

## UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA MAGISTER EN CIENCIAS,  
MENCIÓN QUÍMICA

**“Síntesis de Nuevos Análogos de  
Brasinoesteroides y su rol frente al proceso de  
germinación en presencia del metal pesado  
Cobre (Cu) en semillas de *Lycopersicum sp.*”**

**Nitza Daniela Soto Covarrubias**

Magíster en Ciencias, mención Química

Enero de 2020

## UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA MAGISTER EN CIENCIAS,  
MENCIÓN QUÍMICA

### **“Síntesis de Nuevos Análogos de Brasinoesteroides y su rol frente al proceso de germinación en presencia del metal pesado Cobre (Cu) en semillas de *Lycopersicum sp.*”**

Tesis de Grado presentada por

**Nitza Daniela Soto Covarrubias**

Como requisito parcial para optar al grado de

**Magíster en Ciencias, mención Química.**

Profesor Guía  
Dr. Luis Espinoza Catalán

Profesor Co-Director  
Dra. Katy Díaz Peralta

Enero de 2020

PROGRAMA MAGÍSTER EN CIENCIAS,  
MENCIÓN QUÍMICA

TÍTULO DE LA TESIS:

**“SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS DE  
BRASINOESTEROIDES Y SU ROL FRENTE AL PROCESO DE  
GERMINACIÓN EN PRESENCIA DEL METAL PESADO COBRE  
(CU) EN SEMILLAS DE *Lycopersicum Sp.*”**

AUTOR:

**NITZA DANIELA SOTO COVARRUBIAS**

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.

Dr. Lautaro Taborga (UTFSM) .....

Dra. Katy Díaz Peralta (UTFSM) .....

Dr. Jan Bergmann (PUCV) .....

Valparaíso, Chile. Enero del 2020.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia, mi madre Elizabeth Covarrubias T., a mi padre Víctor Soto A. a mi hermano Ronny Soto C. a mi abuelita Ester Traslaviña A. que, desde el cielo, todos los días me cuida. A mi pareja Luis Álvarez F. por su apoyo incondicional.

Se agradece al Doctor Luis Espinoza Catalán, quien me aceptó en el programa y le saqué más de diez canas por día. También a la Doctora Katy Díaz Peralta, profesora y amiga, y quien me ayudó en este proceso.

A todos mis amigos de sufrimiento, Rodrigo Carvajal, Karoll Ferrer, María Chávez, Julián Chacón y Josselyn Gómez que, sin ellos, no estaría aquí. Sin dejar de lado a Doctor Mauricio Osorio, profesor y amigo incondicional, y a la más pequeña del Laboratorio, Fernanda Aguilera, una de mis mejores amigas. Y obviamente a la persona que paso más rabias conmigo Cesar González, un buen amigo e instructor.

A los amigos del almuerzo Mauricio Soto, Karen Catalán, Luz Triviño, Daniel Pérez y Priscilla Torres, gracias por sus conversaciones y secciones de relajación son y serán una agradable compañía.

Finalmente, agradezco al Programa de Magíster en Ciencias, mención Química, al programa de becas de postgrado de la Dirección General de investigación y Posgrado (DGIP), de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso-Chile y al Proyecto FONDECYT N° 1160446.

**“La materia no se crea  
ni se destruye,  
sólo se transforma...”**

## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN.....  | 1  |
| ABSTRACT.....   | 2  |
| CAPITULO 1- Introducción.....   | 1  |
| Antecedentes generales sobre hormonas y reguladores de crecimiento vegetal.....   | 2  |
| <b>1.1.</b> Brasinoesteroides.....  | 4  |
| <b>1.1.</b> Relación estructura-actividad relativa de los brasinosteroides.....   | 6  |
| 1.2.1. Relación estructura-actividad relativa en el anillo A.....   | 6  |
| 1.2.2. Relación estructura-actividad relativa en el anillo B.....   | 8  |
| 1.2.3. Relación estructura-actividad relativa en la fusión de los anillos A/B.....  | 8  |
| 1.2.4. Relación estructura-actividad relativa de la cadena lateral.....   | 10 |
| <b>1.1.</b> Generalidades sobre síntesis de brasinoesteroides.....  | 11 |
| <b>1.1.</b> Uso de ácidos cólicos en la síntesis del Brasinoesteroides y sus análogos.....                                  | 11 |
| <b>1.1.</b> Problemática de la presencia de metales pesados en Chile.....   | 14 |
| <b>1.1.</b> Antecedentes de brasinoesteroides con actividad protectora en plantas por contaminación de metales pesados..... | 15 |
| <b>1.1.</b> Respuesta a estrés por metales pesados.....   | 22 |
| <b>1.1.</b> Efecto de los metales pesados en la agricultura del tomate.....   | 24 |
| PROPUESTA.....  | 28 |
| HIPÓTESIS.....  | 30 |
| CAPITULO 2- Objetivos.....  | 31 |
| Objetivos Generales.....  | 32 |
| Objetivos específicos.....  | 32 |
| CAPITULO 3- Métodos Experimentales.....   | 33 |
| Síntesis Química General.....   | 34 |
| Materiales e instrumentación usados en síntesis orgánica.....   | 39 |
| Cromatografía en capa fina (CCF).....   | 39 |
| Cromatografía en columna de sílica gel (CC).....  | 39 |
| Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....   | 39 |
| Espectrometría de masas de resolución unitaria (EM).....  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| Espectroscopía IR.....  | 40 |
| Puntos de fusión.....   | 40 |
| Evaluación de la actividad biológica de nuevos análogos de brasinoesteroides (BRs)....  | 40 |
| Bioensayo de inclinación de la lámina de arroz (RLIT) .....   | 40 |
| Efecto de los análogos de BRs sobre el estrés abiótico producido por Cobre (Cu) en plantas de Tomate.....   | 41 |
| Preparación de análogo de BRs .....   | 41 |
| Efecto de análogos de brasinoesteroides en presencia del metal pesado Cobre (Cu) sobre la germinación de semillas de Tomate.....  | 41 |
| Reactivos e insumos utilizados en esta investigación .....  | 44 |
| Solventes utilizados como eluyentes en esta investigación.....  | 46 |
| Metodologías usadas en la síntesis de los análogos de brasinoesteroides.....  | 47 |
| Síntesis del ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-5 $\beta$ -colan-24-oico <b>24</b> .....  | 47 |
| Síntesis de 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-24-nor-5 $\beta$ -23-coleno <b>25</b> .....  | 49 |
| Síntesis de 22( <i>S/R</i> ), 23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>26a/26b</b> .....   | 51 |
| Síntesis de 3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 22 ( <i>S/R</i> ), 23-Tetrahidroxi-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>27a/27b</b> .....  | 53 |
| Síntesis de 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-22( <i>S/R</i> ), 23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>28a/28b</b> .....   | 55 |
| Síntesis de 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-22 ( <i>S/R</i> ), 23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>29a/29b</b> .....   | 57 |
| Síntesis del ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Acetil-5 $\beta$ -colan-24-oico <b>32</b> .....  | 59 |
| Síntesis del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -23-coleno <b>33</b> .....   | 61 |
| Síntesis de 22 ( <i>S/R</i> ), 23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>34a/34b</b> .....  | 63 |
| Síntesis de los compuestos 22 ( <i>S</i> )-hidroxi-23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>35a</b> , 22 ( <i>R</i> )-hidroxi-23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>35b</b> y 22 ( <i>S</i> ) ,23-dibenzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano <b>36a</b> ..... | 65 |
| CAPITULO 4- Resultados y Discusiones.....   | 68 |
| Resultados y discusiones de la síntesis de los análogos de brasinoesteroides.....   | 69 |
| Resultados y discusiones de la evaluación de los análogos de brasinoesteroides sintetizados como promotores de elongación celular vegetal.....  | 91 |
| Resultados y discusion de la evaluación de los análogos de brasinoesteroides sintetizados en los parámetros de germinación.....   | 99 |

|   |     |
|---|-----|
| Porcentaje de germinación.....  | 99  |
| Tiempo Promedio de germinación.....   | 101 |
| Tasa de germinación .....   | 103 |
| Peso Seco de semillas germinadas.....   | 105 |
| CAPITULO 5- Conclusiones .....  | 108 |
| REFERENCIAS.....  | 112 |
| ANEXO.....  | 123 |
| 1. Mecanismo de acción de metales sin Brs.....  | 124 |
| 2. Mecanismo de acción de metales con Brs, modificado.....  | 124 |
| 3. Espectroscopía RMN.....  | 126 |
| 3.1. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto Ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-5 $\beta$ -colan-24-oico ( <b>24</b> ) .....                | 126 |
| 3.2. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-24-nor-5 $\beta$ -23-coleno ( <b>25</b> ).....                    | 128 |
| 3.3. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22,23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>26a/26b</b> ) ..... | 130 |
| 3.4. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,22,23-Tetrahidroxi-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>27a/27b</b> ).....        | 132 |
| 3.5. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-22,23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>28a/28b</b> ) .....     | 134 |
| 3.6. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-22,23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>29a/29b</b> ).....     | 136 |
| 3.7. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto Ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Acetil-5 $\beta$ -colan-24-oico ( <b>32</b> ).....                   | 138 |
| 3.8. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -23-coleno ( <b>33</b> ) .....                   | 140 |
| 3.9. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22,23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>34a/34b</b> ).....  | 142 |
| 3.10. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN, <sup>13</sup> C RMN, <sup>13</sup> C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>35a</b> ).....          | 144 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.11. | Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto 23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>35a/35b</b> ).....                                | 146 |
| 3.12. | Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22,23-dibenzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano ( <b>36a</b> ). ..... | 147 |
| 4.    | Imágenes del test de inclinación de la lámina de arroz (RLIT).....  | 149 |
| 5.    | Imagen del efecto de los análogos 26a/26b, 27a/27b, 35a y 1 con y sin la presencia de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), en el estudio de germinación de semillas de <i>Lycopersicum sp.</i><br>151              |     |
| 6.    | Análisis Estadístico de los factores: Porcentaje de germinación (%), tiempo medio de germinación (MT), tasa de germinación (MR) y peso seco (PS) de semillas germinadas para cada tratamiento .....                 | 155 |
| 6.1.  | Porcentaje de germinación (%) sin cobre.....  | 155 |
| 6.2.  | Porcentaje de germinación (%) con cobre .....   | 156 |
| 6.3.  | Tiempo promedio de germinación sin cobre (MT) .....   | 157 |
| 6.4.  | Tiempo promedio de germinación con cobre (MT).....  | 160 |
| 6.5.  | Tasa de germinación sin cobre (MR) .....  | 163 |
| 6.6.  | Tasa de germinación con cobre (MR) .....  | 166 |
| 6.7.  | Peso seco (PS).....   | 169 |

## ÍNDICE FIGURA

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Fitohormonas que regulan todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas.....  | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Estructuras de algunos brasinoesteroides naturales.....   | 5  |
| <b>Figura 3.</b> Diferentes patrones de sustituyentes en los anillos A, B y la cadena lateral de brasinoesteroides de origen natural. ....   | 5  |
| <b>Figura 4.</b> Estructuras de 2-deoxi-3 $\beta$ -28-homobrasinólido ( <b>9</b> ) y 28-homotifasterol ( <b>10</b> )....   | 7  |
| <b>Figura 5.</b> Estructuras de algunos brasinólidos y relación estructura-actividad relativa en el anillo A. ....   | 7  |
| <b>Figura 6.</b> Efecto en la actividad biológica de la funcionalización relativa en el anillo B. ....   | 8  |
| <b>Figura 7.</b> Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5 $\alpha$ -colestano y 5 $\beta$ -colestano con fusión de los anillos A/B tipo <i>trans</i> (izquierda) y con fusión de los anillos A/B tipo <i>cis</i> (derecha) optimización espacial realizada con herramienta mm2 dynamics, cambrid cambridgesoft®, ma 02451 usa. ....  | 9  |
| <b>Figura 8.</b> Estructuras del <b>I-VII</b> y <b>IX</b> con función de anillo A/B <i>cis</i> (5 $\beta$ ) y función de anillo A/B <i>trans</i> (5 $\alpha$ ) con actividad biológica. ....   | 10 |
| <b>Figura 9.</b> Estructura de 22,23-diepi-28-homobrasinólido ( <b>15</b> ) y efecto en la actividad biológica de los sustituyentes en la cadena lateral.....  | 11 |
| <b>Figura 10.</b> Estructuras de algunos ácidos biliares naturales utilizados en la síntesis de análogos de brasinoesteroides. ....  | 12 |
| <b>Figura 11.</b> Estructuras de algunos derivados de ácido hiodeoxicólico con efecto en crecimiento vegetal. ....   | 12 |
| <b>Figura 12.</b> Vía de señalización de brs en la célula vegetal. la molécula de BRs se une al dominio extracelular del receptor BRI1, lo que conduce a la fosforilación del dominio serina-treonina quinasa intracelular de BRI1, permitiendo la disociación del inhibidor BKI1 para formar un complejo con un segundo receptor quinasa BAK1. el complejo activo BRI1/BAK1 permite la propagación de la señal mediante la inactivación de la proteína BIN2, que es un regulador negativo de la señalización de BRs. las proteínas BES1 y BZR1 son fosforiladas por BIN2 y están íntimamente relacionadas con activadores transcripcionales de genes inducidos por BRs [83]. .... | 20 |
| <b>Figura 13.</b> Estructuras de los compuestos objetivos de síntesis. ....  | 29 |
| <b>Figura 14.</b> Esquema de síntesis y estructura del compuesto <b>24</b> . ....  | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Esquema de síntesis y estructura del compuesto <b>25</b> . ....  | 49 |
| <b>Figura 16.</b> Esquema de síntesis y estructura de los compuestos <b>26a/26b</b> . ....   | 51 |
| <b>Figura 17.</b> Esquema de síntesis y estructura de los compuestos <b>27a/27b</b> . ....   | 53 |
| <b>Figura 18.</b> Esquema de síntesis y estructura de los compuestos <b>28a/28b</b> . ....   | 55 |
| <b>Figura 19.</b> Esquema de síntesis y estructura de los compuestos <b>29a/29b</b> . ....   | 57 |
| <b>Figura 20.</b> Esquema de síntesis y estructura del compuesto <b>32</b> . ....  | 59 |
| <b>Figura 21.</b> Esquema de síntesis y estructura del compuesto <b>33</b> . ....  | 61 |
| <b>Figura 22.</b> Esquema de síntesis y estructura de los compuestos <b>34a/34b</b> . ....   | 63 |
| <b>Figura 23.</b> Esquema de síntesis y estructura de los compuestos <b>35a, 35b y 36a</b> . ....  | 65 |
| <b>Figura 24.</b> Comparación entre los espectros de <sup>1</sup> H RMN para el precursor <b>24</b> y el alqueno <b>25</b> . ....  | 70 |
| <b>Figura 25.</b> Representación de las posibles conformaciones en equilibrio en el estado de transición para el ataque de OsO <sub>4</sub> sobre el enlace doble en C22-C23, que explica la formación preferencial del epímero <b>26a</b> en la mezcla. ....  | 71 |
| <b>Figura 26.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN de la mezcla de epímeros <b>26a/26b</b> . ....  | 72 |
| <b>Figura 27.</b> Espectros de <sup>1</sup> H RMN para la mezcla de análogos epiméricos <b>27a/27b</b> . ....  | 73 |
| <b>Figura 28.</b> Espectros de <sup>1</sup> H RMN para mezcla de epímeros <b>28a/28b</b> . ....  | 75 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 29.</b> Representación de las posibles conformaciones en equilibrio en el estado de transición para el ataque de MCPBA sobre el enlace doble C22-C23, que muestra la conformación preferencial IV para la reacción de epoxidación y posterior formación del epímero mayoritario..... | 75  |
| <b>Figura 30.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN de la mezcla de epímeros epoxidados <b>29a/29b</b> .....  | 76  |
| <b>Figura 31.</b> Espectros de $^1\text{H}$ RMN del derivado <b>32</b> .....   | 80  |
| <b>Figura 32.</b> Espectros de $^1\text{H}$ RMN para el derivado <b>33</b> .....   | 80  |
| <b>Figura 33.</b> Espectros de $^1\text{H}$ RMN para la mezcla de epímeros <b>34a/34b</b> .....  | 81  |
| <b>Figura 34.</b> Diferencias observadas en la proporción de mezclas de glicoles epiméricos <b>26a/26b</b> y <b>34a/34b</b> en C-22( <i>S</i> ) y C-22( <i>R</i> ) obtenidas en las reacciones de dihidroxilación de Upjohn y Sharpless respectivamente.....                                   | 82  |
| <b>Figura 35.</b> Representación esquemática del ataque del complejo OsO <sub>4</sub> -L sobre el enlace doble C22-C23, que muestra las conformaciones preferenciales V y VI para la reacción de dihidroxilación asimétrica de sharpless.....  | 83  |
| <b>Figura 36.</b> Principales correlaciones heteronucleares $^3J_{\text{H-C}}$ HMBC entre los hidrógenos H-23a, H-23b y HAr-2' con el grupo carbonilo aromático, que confirman la posición de la función éster de benzoato en C-23 para el derivado monobenzoilado <b>35a</b> .....            | 85  |
| <b>Figura 37.</b> Espectros de $^1\text{H}$ RMN, comparación entre los derivados <b>35a</b> mezcla <b>35a/35b</b> y <b>36a</b> .....   | 87  |
| <b>Figura 38.</b> Principales correlaciones heteronucleares $^2\text{D}$ HMBC a $^2J_{\text{HC}}$ (azul) y $^3J_{\text{HC}}$ (rojo) observadas para el derivado dibenzoilado <b>36a</b> , que confirman las posiciones de ambos grupos benzoatos en C-22 y C-23 de la cadena lateral.....      | 88  |
| <b>Figura 39.</b> Totalidad de los compuestos sintetizados en esta tesis. en el recuadro se destacan los 2 nuevos análogos de brasinoesteroides no reportados previamente en literatura.....   | 109 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Resumen de antecedentes reportados del efecto de brs sobre la presencia de metales pesados (estrés abiótico) frente a la protección vegetal. ....  | 18  |
| <b>Tabla 2.</b> Diseño experimental de estudio de germinación de semillas de tomate bajo la aplicación de distintos análogos de BRs y aplicación de sulfato de cobre.....  | 43  |
| <b>Tabla 3.</b> Reactivos e insumos utilizados en esta investigación (Número CAS). ....  | 44  |
| <b>Tabla 4.</b> Solventes utilizados como eluyentes en esta investigación. ....  | 46  |
| <b>Tabla 5.</b> Comparación entre las señales observadas de $^1\text{H}$ RMN para H-22, H-23a, H-23b en los compuestos <b>24</b> y <b>25</b> . ....  | 70  |
| <b>Tabla 6.</b> Comparación entre las señales de $^1\text{H}$ RMN para H-22, H-23a-b y $\text{CH}_3$ -21, en la mezcla de epímeros <b>26a/26b</b> . ....   | 72  |
| <b>Tabla 7.</b> Comparación entre las señales de $^1\text{H}$ RMN para H-22, H-23 $\alpha$ , H-23 $\beta$ y $\text{CH}_3$ -21, para los epímeros <b>28a/28b</b> . ....   | 74  |
| <b>Tabla 8.</b> $\delta$ (ppm) $^1\text{H}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400.1 MHz) para los compuestos <b>24–29</b> de los epimeros mayoritarios. ....   | 77  |
| <b>Tabla 9.</b> $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz) para los compuestos <b>24–29</b> de los epimeros mayoritarios. ....   | 77  |
| <b>Tabla 10.</b> Comparación entre las señales de $^1\text{H}$ RMN para H-22, H-23a, H-23b y $\text{CH}_3$ -21, para los epímeros <b>34a/34b</b> . ....  | 82  |
| <b>Tabla 11.</b> Comparación entre las señales de $^1\text{H}$ RMN para H-22, H-23a, H-23b y $\text{CH}_3$ -21, para los epímeros <b>35a</b> y <b>35b</b> . ....   | 85  |
| <b>Tabla 12.</b> $\delta$ (ppm) $^1\text{H}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400,0 MHz) para los compuestos <b>32–36a</b> . ....   | 89  |
| <b>Tabla 13.</b> $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz) para los compuestos <b>32–36a</b> . ....   | 90  |
| <b>Tabla 14.</b> Efecto de la aplicación de análogos de BRs sobre la inclinación de la lámina de arroz (ángulo promedio de apertura en grados $\pm$ DS). ....  | 91  |
| <b>Tabla 15.</b> Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados $\pm$ DS) para la serie <b>26a/26b</b> y <b>27a/27b</b> a concentraciones $1 \times 10^{-6}$ M, $1 \times 10^{-7}$ M y $1 \times 10^{-8}$ M. ....                 | 94  |
| <b>Tabla 16.</b> Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados $\pm$ DS) para la serie <b>28a/28b</b> y <b>29a/29b</b> a las concentraciones de $1 \times 10^{-6}$ M, $1 \times 10^{-7}$ M y $1 \times 10^{-8}$ M. ....          | 95  |
| <b>Tabla 17.</b> Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados $\pm$ DS) para la serie <b>35a/35b</b> , <b>35a</b> y <b>36a</b> a las concentraciones de $1 \times 10^{-6}$ M, $1 \times 10^{-7}$ M y $1 \times 10^{-8}$ M. .... | 96  |
| <b>Tabla 18.</b> Efecto en el porcentaje de germinación obtenido por el <b>1</b> , las mezclas de epímeros <b>26a/26b</b> , <b>27a/27b</b> y el análogo puro <b>35a</b> con y sin la adición de sulfato de cobre. ....                       | 100 |
| <b>Tabla 19.</b> Efecto sobre el peso seco posterior a la germinación de cada tratamiento con el <b>1</b> , mezcla de análogos <b>26a/26b</b> y <b>27a/27b</b> y el análogo puro <b>35a</b> , ....   | 105 |

## INDICE GRAFICOS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Gráficos 1.</b> Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del <b>1</b> , las mezclas de análogos <b>26a/26b</b> y <b>27a/27b</b> y el análogo puro <b>35a</b> , en comparación al control negativo (agua). * indica los análogos más significativos. ....           | 101 |
| <b>Gráficos 2.</b> Efectos sobre tiempo promedio de germinación de <b>1</b> , las mezclas de análogos <b>26a/26b</b> y <b>27a/27b</b> , y el análogo puro <b>35a</b> , con control negativo (agua + CuSO <sub>4</sub> a 80um). *indica los análogos más significativos. .... | 102 |
| <b>Gráficos 3.</b> Efectos sobre la tasa de germinación de <b>1</b> , las mezclas de análogos <b>26a/26b</b> y <b>27a/27b</b> y el análogo puro <b>35a</b> , en comparación con el control negativo agua. *indica los análogos más significativos. ....                      | 103 |
| <b>Gráficos 4.</b> Tiempo medio de germinación en días v/s el <b>1</b> , las mezclas de análogos <b>26a/26b</b> y <b>27a/27b</b> y el análogo puro <b>35a</b> , con control negativo (agua + CuSO <sub>4</sub> a 80um). *son los análogos más significativos.....            | 104 |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS.

|  |    |
|--|----|
| <b>Esquema 1.</b> Estrategia de síntesis propuesta para obtener del tetrahidroliados <b>27a</b> dese el ácido hiodeoxicólico <b>16</b> .....   | 35 |
| <b>Esquema 2.</b> Ruta sintética propuesta para la obtención del análogo epoxidado <b>29b</b> desde el derivado olefínico <b>25</b> .....  | 36 |
| <b>Esquema 3.</b> Ruta sintética propuesta para la obtención del análogo <b>27b</b> a partir del derivado <b>26a</b> .....   | 37 |
| <b>Esquema 4.</b> Estrategia de síntesis propuesta para obtener monobenzoilado <b>35a</b> y dibenzoilado <b>36a</b> dese el ácido hiodeoxicólico <b>16</b> .....   | 38 |
| <b>Esquema 5.</b> Estrategia de síntesis propuesta para obtener los derivados monobenzoilados <b>35a, 35b</b> , y que por posterior saponificación de estos se obtendrían los análogos <b>27a y 27b</b> .<br>..... | 79 |
| <b>Esquema 6.</b> Estructura de los derivados monobenzoilados <b>35a, 35b</b> , y dibenzoilado <b>36a</b> , producidos en la reacción de benzoilación de la mezcla de glicoles <b>34a/34b</b> .....                | 84 |

ABREVIATURAS UTILIZADAS

EN SÍNTESIS ORGÁNICA.

|                                     |                              |
|-------------------------------------|------------------------------|
| <b>HCOOH</b>                        | Ácido fórmico                |
| <b>HClO<sub>4</sub></b>             | Ácido perclórico             |
| <b>Ac<sub>2</sub>O</b>              | Anhídrido acético            |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>             | Sulfato de magnesio          |
| <b>EtOAc</b>                        | Acetato de etilo             |
| <b>Cu(OAc)<sub>2</sub></b>          | Acetato de cobre (II)        |
| <b>Pb(OAc)<sub>4</sub></b>          | Acetato de plomo (IV)        |
| <b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b> | Diclorometano                |
| <b>NMMO</b>                         | N- óxido de N-metilmorfolina |
| <b>OsO<sub>4</sub></b>              | Tetraóxido de osmio          |
| <b>CH<sub>3</sub>OH</b>             | Metanol                      |
| <b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>  | Carbonato de potasio         |
| <b>HCl</b>                          | Ácido clorhídrico            |
| <b>mCPBA</b>                        | Ácido metacloroperbenzoico   |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>            | Bicarbonato de sodio         |
| <b>t-butanol</b>                    | Terbutanol                   |
| <b>DMAP</b>                         | 4-N,N-dimetilaminopiridina   |

## ABREVIATURA UTILIZADA

### EN ANÁLISIS INSTRUMENTAL

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b><sup>1</sup>D</b>      | Espectro de RMN mono-dimensional                    |
| <b><sup>2</sup>D</b>      | Espectro de RMN bidimensional                       |
| <b><sup>2</sup>J</b>      | Acoplamiento escalar heteronuclear a 2 enlaces      |
| <b><sup>3</sup>J</b>      | Acoplamiento escalar heteronuclear a 3 enlaces      |
| <b>cm<sup>-1</sup></b>    | Inverso de la frecuencia en centímetros             |
| <b>d</b>                  | doblete   |
| <b>dd</b>                 | doble doblete                                       |
| <b>ddd</b>                | doblete de doble doblete                            |
| <b>DEPT</b>               | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| <b>dt</b>                 | doble triplete                                      |
| <b>EMAR</b>               | Espectro de masas de alta resolución                |
| <b>HMBC</b>               | Heteronuclear Multiple Bond Connectivities          |
| <b>HSQC</b>               | Heteronuclear Single Quantum Correlation            |
| <b>IR</b>                 | Espectro Infrarrojo                                 |
| <b>J</b>                  | constante de acoplamiento                           |
| <b>m</b>                  | multiplete  |
| <b>m/z</b>                | Relación masa versus carga                          |
| <b>[M]<sup>+</sup></b>    | Masa ion molecular                                  |
| <b>[M+1]<sup>+</sup></b>  | Masa ion molecular más 1                            |
| <b>[M -1]<sup>+</sup></b> | Masa ion molecular menos 1                          |
| <b>NOESY</b>              | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy         |
| <b>ppm</b>                | partes por millón                                   |
| <b>RMN</b>                | Resonancia Magnética Nuclear                        |
| <b>s</b>                  | singlete  |
| <b>t</b>                  | triplete  |
| <b>δ</b>                  | desplazamiento químico                              |

**ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EVALUACIÓN BIOLÓGICA**

|             |   |
|-------------|---|
| <b>C-</b>   | Control negativo  |
| <b>C+</b>   | Control positivo  |
| <b>RLIT</b> | Test de inclinación de la lámina de arroz<br>(Rice Lamina Inclination Test) |

## RESUMEN

---

Los brasinoesteroides (BRs) son una clase de hormona vegetal que se caracteriza por promover el crecimiento de las plantas y la protección al estrés abiótico y biótico. Los BRs se encuentran en muy bajas concentraciones, debido a esto la síntesis de estos compuestos es una alternativa viable para la obtención de éstos. Por otra parte, la economía chilena basada en la minería cúprica conlleva a la contaminación en suelos agrícolas por la extracción y producción de este mineral; en base a esta problemática se busca obtener nuevos análogos de BRs, para la protección de las plantas debido al estrés causado por la presencia de cobre en los suelos. Para esto, se ha propuesto sintetizar inicialmente los compuestos, **27a**, **27b** y **29b** los cuales no fueron posibles separar por métodos tradicionales de cromatografía en columna y/o re-cristalizaciones. Sin embargo, se sintetizaron los compuestos **26a/26b**, **27a/27b**, **28a/28b**, **29a/29b**, **35a/35b**, obteniendo los nuevos análogos **35a** y **36a**. Las síntesis de los nuevos análogos se realizaron desde el Ácido hiodeoxicólico (**16**). Los compuestos sintetizados fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas combinadas (FTIR,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR, 2D HSQC, 2D HMBC y GCMS). Estos compuestos fueron sometidos a dos tipos de bioensayo para determinar la actividad biológica. El primero fue el test de inclinación de la lámina de arroz (RLIT), mediante la cual se seleccionaron a los compuestos más activos para estudiar su efecto sobre la germinación en semillas de tomate bajo condición de estrés *in vitro* por la presencia de Cobre (Cu) a 80  $\mu\text{M}$ . Los resultados de RLIT demuestran que los análogos de Brs **26a/26b**, **27a/27b**, **35a/35b** y el compuesto puro **35a** fueron activos. Sin embargo el análogo **35a/35b** presentó la mayor actividad de elongación celular vegetal, con un promedio de 86% de incremento, comparado con el control negativo (agua). Sin embargo para analizar la importancia de la actividad de la cadena lateral se seleccionaron los compuestos **26a/26b**, **27a/27b** y **35a** para evaluar el ensayo de germinación; determinando que la mezcla de epímeros **26a/26b** fue efectiva en ambos casos con y sin la aplicación del  $\text{CuSO}_4$  a las concentraciones de  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  [M]. El análogo **26a/26b** presenta glicoles en los carbonos C-22 y C-23 con configuración mayoritaria *S* en C-22, lo que podría estar estimulando una mejor respuesta en los parámetros de germinación de tiempo medio de germinación (MT), tasa de germinación (MR) y peso seco (PS). Finalmente se demuestra, a través de todos estos resultados biológicos, que la mezcla de análogos **26a/26b**, con variación en cadena lateral del tipo 24-nor y fusión de anillos A/B de tipo *cis*, al ser aplicada de forma exógena mejora la respuesta en germinación bajo la presencia del metal pesado Cobre (Cu) sobre semillas de *Lycopersicon sp.*

**Palabras claves:** brasinoesteroides, ácido hiodeoxicólico, síntesis de análogos de brasinoesteroides, promotor de germinación vegetal y mezclas epímeras de BRs.

## ABSTRACT

---

Brassinosteroids (BR) are a class of plant hormone that is characterized by promoting plant growth and protection from abiotic and biotic stress. BRs are at very low losses, because this synthesis of these compounds is a viable alternative to obtain the criteria. On the other hand, the Chilean economy based on cupric mining involves contamination in agricultural soils by the extraction and production of this mineral; Based on this problem, new BRs analogs are sought, for the protection of plants due to the stress affected by the presence of copper in the soil. For this, it has been proposed to synthesize specifically the compounds, **27a**, **27b** and **29b**, which were not possibly separated by traditional methods of column chromatography and/or re-crystallizations. However, the compounds were synthesized **26a/26b**, **27a/27b**, **28a/28b**, **29a/29b**, **35a/35b** were synthesized, obtaining the new analogs **35a** and **36a**. The syntheses of the new analogs were made from the Hydoxycholic Acid (**16**). The synthesized compounds were characterized by combined spectroscopic techniques (FTIR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, 2D HSQC, 2D HMBC and GCMS). These compounds were subjected to two types of bioassay to determine biological activity. The first was the rice leaf inclination test (RLIT), whereby the most active compounds were selected to study their effect on germination in tomato seeds under in vitro stress conditions due to the presence of Copper (Cu ) at 80  $\mu\text{M}$ . The RLIT results show that Brs analogs **26a/26b**, **27a/27b**, **35a/35b** and pure compound 35a were the most active. However, analog **35a/35b** showed the highest activity of plant cell elongation, with an average of 86% increase, compared to the negative control (water). However, to analyze the importance of the side chain activity, compounds **26a/26b**, **27a/27b** and **35a** were selected for the germination test. For the germination test, determining that the mixture of epimers **26a/26b** was effective in both cases with and without the application of  $\text{CuSO}_4$  at the concentrations of  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-6}$  [M]. Analog 26a/26b has glycols in carbons C-22 and C-23 with a majority configuration S in C-22, which could be stimulating a better response in the germination parameters of average germination time (MT), germination rate (MR) and dry weight (PS). Finally, it is demonstrated, through all these biological results, that the mixture of analogs **26a/26b**, with variation in side chain of the 24-nor type and fusion of A/B rings of cis type, when applied exogenously improves the germination response in the presence of heavy metal Copper (Cu) on seeds of *Lycopersicum sp.*

**Key words:** brassinosteroids, hydoxycholic acid, synthesis of brassinosteroid analogs, plant germination promoter and epimeral mixtures of BRs.

## **CAPITULO 1- INTRODUCCIÓN**

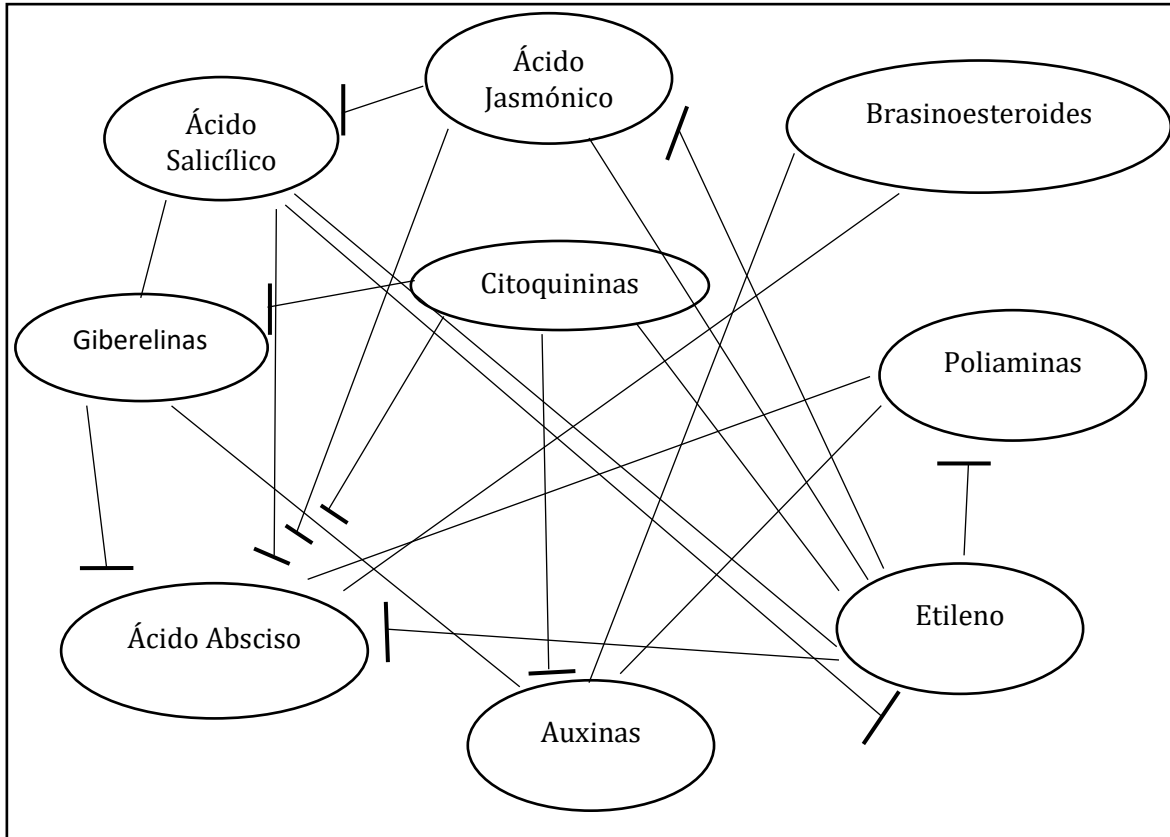
---

## Antecedentes generales sobre hormonas y reguladores de crecimiento vegetal.

---

Para llevar a cabo el funcionamiento normal de organismos superiores como las plantas, existen mecanismos de regulación y compuestos que actúan como reguladores del crecimiento y desarrollo, los cuales responden a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. En las plantas, las fitohormonas son menores en número, comparados con las que presentan los animales (los que tienen una enorme variedad de hormonas), por lo que 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 parte, 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].

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]. 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); estas pueden actuar en forma antagónica o sinérgica entre ellas (Figura 1). En conjunto 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]. En las plantas ninguna hormona tiene un control exclusivo de un determinado proceso fisiológico, cualquier hormona vegetal ejerce efectos notables sobre la mayoría de las fases del desarrollo de la planta [7].



**Figura 1.** Fitohormonas que regulan todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas.

## 1.1. Brasinoesteroides

---

En 1970 se reportó que los extractos del polen de Colza (*Brassica napus L.*) producían un efecto de elongación en el tallo de frijol. Las sustancias que promovieron este crecimiento se les llamó “brassinos” [8]. En 1979 se reportó un potente regulador de crecimiento vegetal llamado brasinólido (**1**) (Figura 2) que promueve la división celular y crecimiento de las plantas [9]. Posteriormente, al evaluar los usos prácticos del BL se consideró que una acción importante de este compuesto era acelerar la resistencia a varios tipos de estrés abióticos [10].

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 [11]. Desde el descubrimiento del brasinólido (**1**) (Figura 3), el primer BRs [9], más de 70 análogos han sido identificados en plantas superiores, algas y hongos [12]. Se han detectado en todos los órganos de las plantas (polen, anteras, semillas, hojas, tallos, raíces, flores, y semillas), se producen endógenamente en muy bajos niveles y se almacenan a muy bajas concentraciones; siendo las semillas de polen inmaduras la fuente más rica, encontrándose en un rango de 1-100 ng/Kg de peso fresco, mientras que en brotes y hojas suele tener una menor concentración: 0,01-0,1 de ng/Kg peso fresco [13].

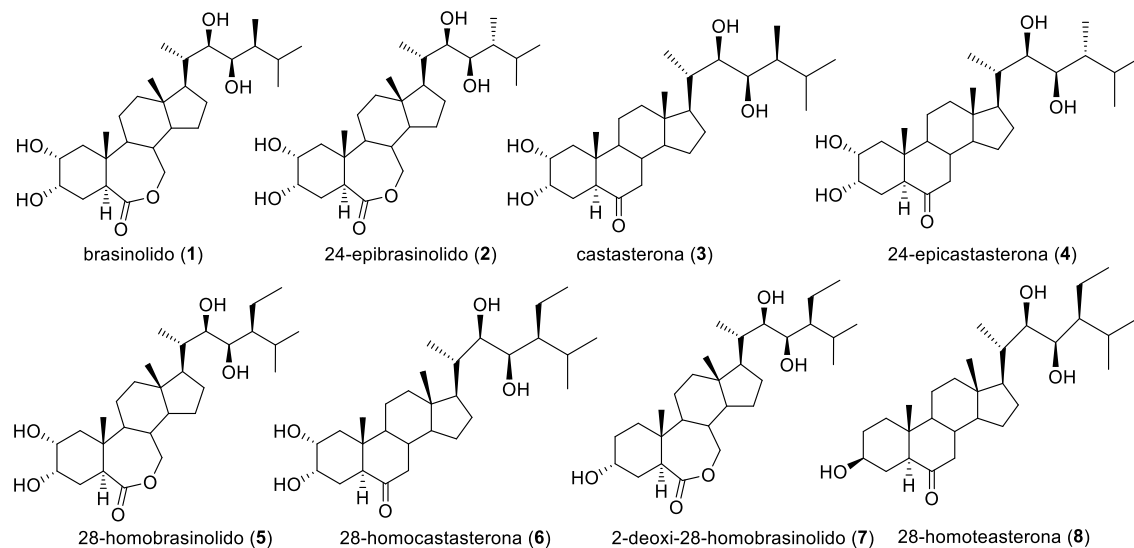
Las mayores concentraciones de los BRs se encuentran en los órganos reproductivos y tejidos en crecimiento (polen, semillas no maduras y brotes) por lo que esta fitohormona regula la expresión de numerosos genes desempeñando un papel esencial en el crecimiento de plantas, morfogénesis y otorgando resistencia al estrés biótico y abiótico [9, 14, 15-18].

Estas propiedades de los brasinoesteroides (BRs) fueron confirmadas y cada vez fue mayor el interés por investigar las respuestas de las plantas a diferentes tipos estrés [14,19-20].

Los BRs son hormonas de naturaleza polihidroxi-esteroidal de bajo peso molecular que se incluyen entre las siete familias de hormonas vegetales o fitohormonas [21]. Se encuentran principalmente en gimnospermas, en planta monocotiledóneas, dicotiledóneas y en algas [14, 22-25]. Algunos ejemplos de estructuras de Brasinoesteroides naturales más comunes presentes en las plantas, se muestran en la Figura 2.

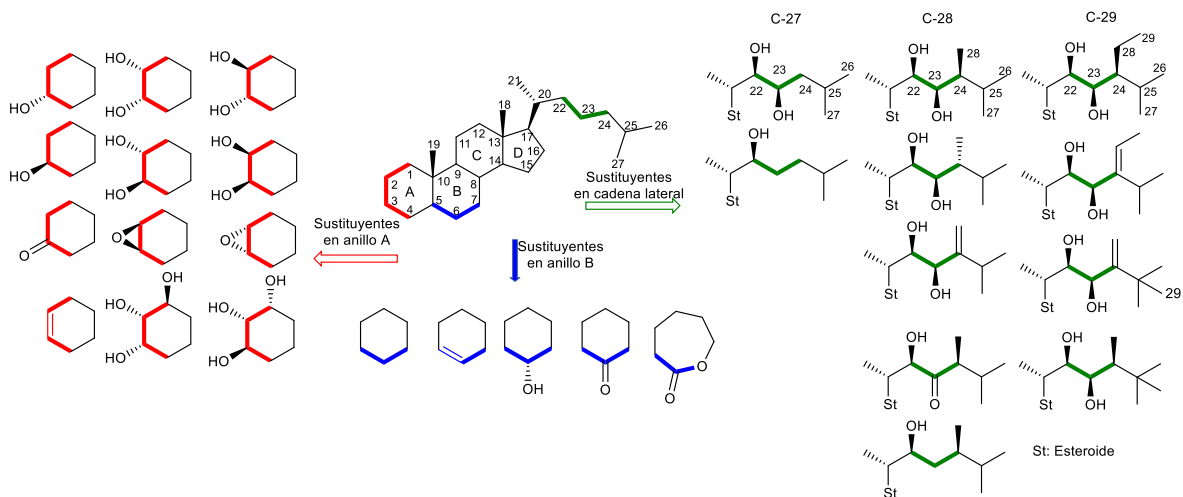
Otros brasinoesteroides naturales considerados como importantes son 24-epibrasinólido (**2**), castasterona (**3**) y 24-epicastasterona (**4**). A pesar de que los BRs con C-28 son los más

recurrentes en la naturaleza, también son conocidos otros BRs con una cadena lateral esteroide diferente. Entre ellos, 28-homobrassinolido (5) y 28-homocasterona (6), que tienen una estructura de 5 $\alpha$ -estigmastano, son los más activos de la serie C-29 [26, 27]. Estos brasinoesteroides y algunos otros, se muestran en la Figura 2.



**Figura 2.** Estructuras de algunos brasinoesteroides naturales.

La estructura de los BRs tiene un esqueleto común de 5 $\alpha$ -colestano (Figura 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 de la cadena lateral (Figura 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*). [28].



**Figura 3.** Diferentes patrones de sustituyentes en los anillos A, B y la cadena lateral de brasinoesteroides de origen natural.

## **1.1. Relación estructura-actividad relativa de los brasinosteroides.**

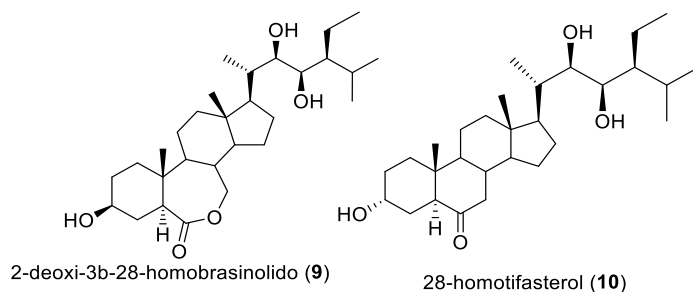
---

La bioactividad de BRs se evalúa por diferentes tipos de bioensayos cuyos resultados no son siempre coherentes entre sí. La prueba de inclinación de la lámina arroz o RLIT (*Oryza sativa*) es el bioensayo más comúnmente utilizado en investigación, sin embargo, diferentes grupos han adaptado el protocolo básico de RLIT, además, utilizan diferentes cultivares de arroz, entregando gran variación en los resultados [29]. El ensayo RLIT tiene un límite de detección de 50 ppm para el ácido indolacético, su límite de detección para brasinólido (**1**) y 28-homobrasinólido (**5**) es 0,5 y 5 ppb, respectivamente [29-30]. 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 bioactividad 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 brasinólido/castasterona (**1/3**) [31], mientras que la 24-epicastasterona (**4**) es aproximadamente 3 veces más activo que castasterona (**3**) [32]. A pesar de estas limitaciones, se pueden realizar las siguientes generalizaciones.

### **1.2.1. Relación estructura-actividad relativa en el anillo A.**

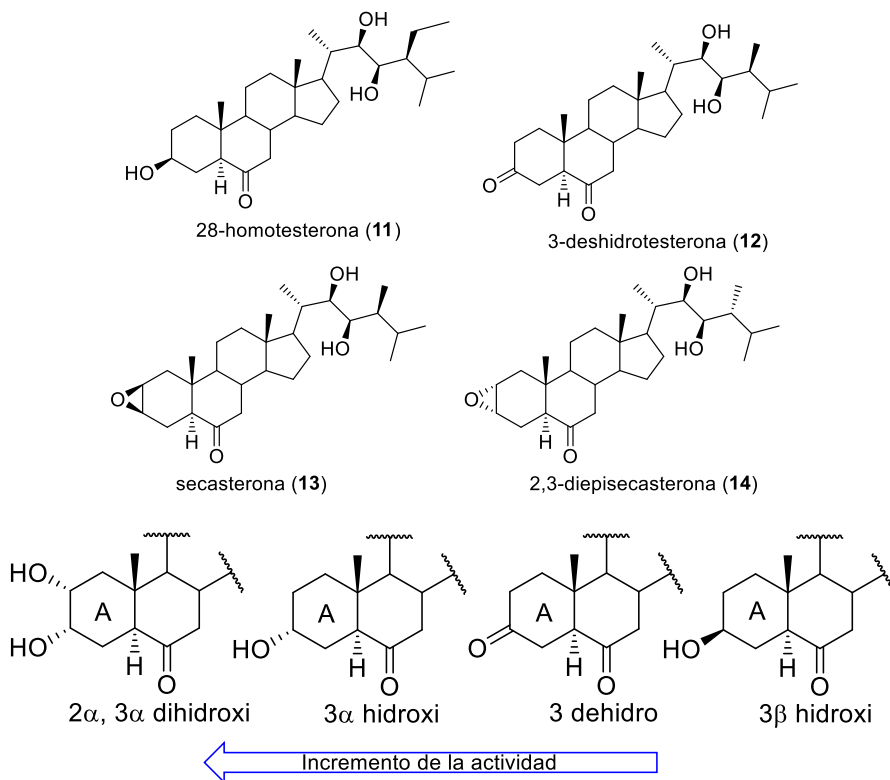
---

El efecto de los sustituyentes en el anillo A ha sido estudiado con cierto detalle dentro de la serie 28-homo [33] se encontró que el cambio en las posiciones de hidroxilos de  $2\alpha$ ,  $3\alpha$  (**5**) a  $2\alpha$ ,  $3\beta$  en 28-homobrasinólido reduce ligeramente la bioactividad en RLIT (*Oryza sativa* cultivar Arborio). Los autores también reportaron que 2-desoxi-28-homobrasinólido (**7**) y su epímero  $3\beta$  (**9**) (Figura 4) son aproximadamente 10 veces menos activos que 28-homobrasinólido (**5**), mientras que el 28-homotifasterol (**10**) (Figura 4) es aproximadamente diez veces menos activo que 28-homocastasterona (**6**) en el mismo tipo de ensayo, lo que indica que el grupo hidroxilo en la posición  $2\alpha$  no es indispensable para provocar la actividad biológica promoviendo el crecimiento.



**Figura 4.** Estructuras de 2-deoxi-3b-28-homobrasinolido (9) y 28-homotifasterol (10).

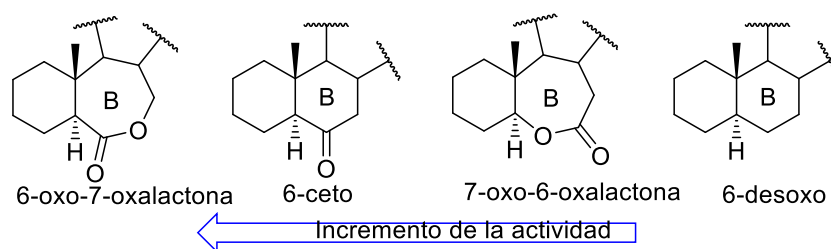
En relación a los isómeros 3 $\beta$ , como 28-homotesterona (11) también son 10 veces menos activos que el 28-homobrasinolido (5) y 28-homocastasterona (6), respectivamente. 3-deshidrotesterona (12), secasterona (13) y 2,3-diepisecasterona (14) muestran, respectivamente, 74%, 59% y 89% de la actividad relativa de 24-epicastasterona (4) en el ensayo RLIT [34, 35] (Figura 5).



**Figura 5.** Estructuras de algunos brasinolidos y relación estructura-actividad relativa en el anillo A.

### 1.2.2. Relación estructura-actividad relativa en el anillo B.

La mayoría de los brasinoesteroides más activos llevan la función 6-oxo-7-oxalactona, seguida en actividad relativa por los BRs 6-ceto. La ausencia de una función de oxígeno en el anillo B disminuye significativamente la actividad relativa de BRs, como en el caso de 6-deoxocasterona que muestra sólo el 1% de la actividad relativa de castasterona (**3**) [36]. También se confirmó que los BRs 6-desoxo son prácticamente inactivos [37]. La transformación de la 6-oxo-7-oxalactona a 6-oxa-7-oxolactona o éter reduce drásticamente su actividad relativa (Figura 6) [38-40].



**Figura 6.** Efecto en la actividad biológica de la funcionalización relativa en el anillo B.

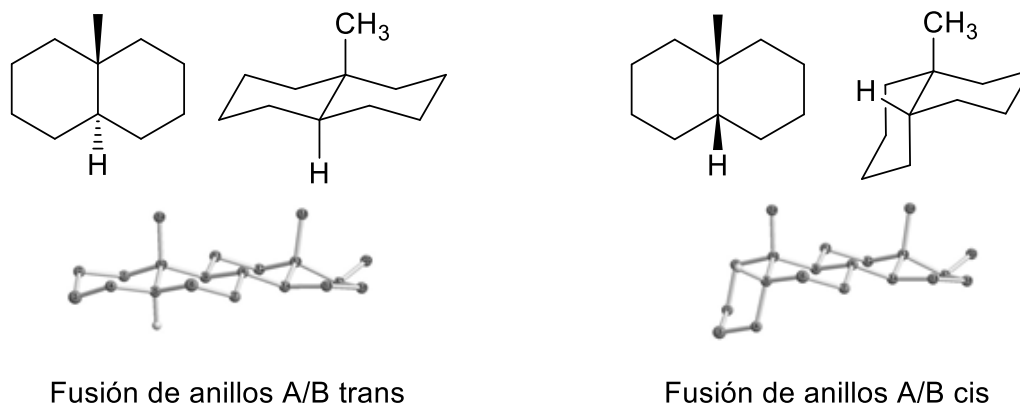
### 1.2.3. Relación estructura-actividad relativa en la fusión de los anillos A/B

Los análisis sobre la relación de estructura-actividad fueron llevados a cabo por Brosa et al. (1996), en los que utilizaba los análogos de Brasinoesteroides para el análisis de actividades biológicas. En los cuales contribuía en gran parte la distribución de los grupos hidroxilos y la fusión de anillos A/B *cis* o *trans*, los que dependen de la actividad biológica encontrada. En el anillo A/B *cis* no natural, ha presentado en pruebas de RLIT resultados sorprendentes. [41]

Como parte de la bibliografía de los BRs, se demuestra la que la fusión de anillo A/B *trans* (Figura 7) obtiene una buena actividad relativa medida a través de RLIT [42-43]. Esto depende de la estructura que presente el BRs.

En esta investigación se trabajará en la fusión de anillo A/B *cis*. En BRs de la serie 5 $\beta$  (fusión de anillos A/B *cis*), el anillo A también asume una conformación "silla", pero se establece casi perpendicularmente al plano formado por los anillos B, C y D (Figura 7). Aunque BRs con una fusión de anillo *cis* (configuración 5 $\beta$ ) aún no han sido aislados a partir de fuentes

naturales, sólo se han sintetizado algunos análogos. La fusión *cis* de anillos A/B, junto con una función diol 2 $\beta$ , 3 $\beta$  son característicos en los ecdisteroides [44]



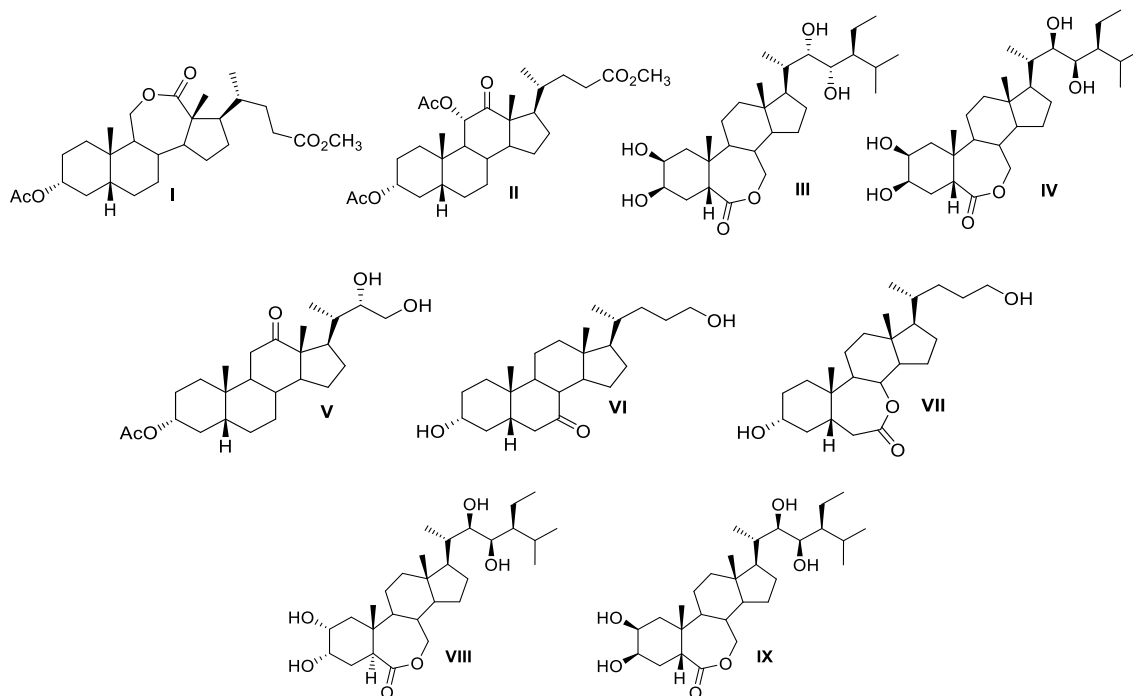
**Figura 7.** Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5 $\alpha$ -colestano y 5 $\beta$ -colestano con fusión de los anillos A/B tipo *trans* (izquierda) y con fusión de los anillos A/B tipo *cis* (derecha) optimización espacial realizada con herramienta mm2 dynamics, cambrid cambridgesoft®, ma 02451 usa.

En las estructuras de los nuevos BRs activos se encuentra la fusión de anillos A/B *cis*, los que tienen actividades biológicas en diferentes rangos medidas por RLIT, algunas de estas se muestran en la Figura 8:

- En la investigación reportada por Espinoza et al. (2000), los análogos de BRs **I** y **II** (Figura 8) mostraron una alta actividad biológica. Ambos análogos tienen fusión de anillo A/B *cis* y una función hidroxilo en C-3  $\alpha$ . [45]
- En otro estudio reportado por Espinoza y Cortés (2002) el análogo **V** demostró alta actividad biológica ensayada en los tests de elongación de hipocótilos y expansión de cotiledones del rábano. [47]
- En el estudio reportado por Pérez (1998) se demostró que los análogos **VI** y **VII** (Figura 8) poseen actividad biológica la que fue examinado por la prueba del rábano. [48]

Finalmente, en el estudio informado por Brosa et al. (1996) de la actividad biológica de los análogos **III**, **IV**, **VIII** y **IX** (Figura 8), demostraron obtener el mismo rango de actividad. Esta actividad fue medida a través de la prueba de la inclinación de lámina de arroz, de la variedad de Bahía. Aunque las estructuras de ellos fueran diferentes.

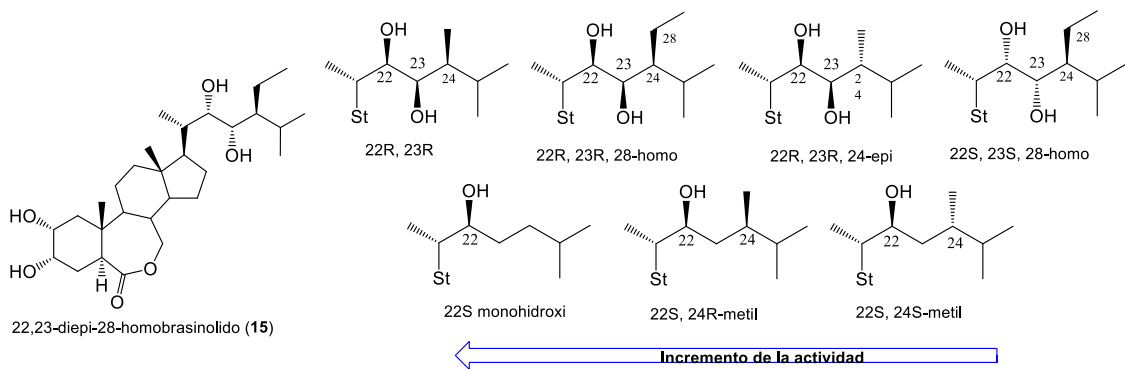
En el análogo **VIII** la fusión de anillo A/B es *trans* y en su anillo A posee diol 2 $\alpha$  y 3 $\alpha$ , en cambio el análogo **IX** su fusión de anillo A/B es *cis* y su anillo A posee diol 2 $\beta$  y 3 $\beta$  a pesar de su diferencia estructural, presentaron el mismo valor como resultado en la actividad biológica medida a través de RLIT de 94%, demostrando que la alta actividad biológica depende principalmente de las interacciones de los grupos funcionales que se encuentre en los anillos, independiente que sus anillos sean *cis* o *trans*. [49]



**Figura 8.** Estructuras del **I-VII** y **IX** con función de anillo A/B *cis* (5 $\beta$ ) y función de anillo A/B *trans* (5 $\alpha$ ) con actividad biológica.

#### 1.2.4. Relación estructura-actividad relativa de la cadena lateral.

En el año 1980 se reportó la síntesis y la alta actividad biológica de 22, 23 diepi-28-homobrasinólido (**15**) de RLIT (*Oryza sativa* cultivar Kinmaze) la que obtuvo un ángulo de 120°, aumentando en 97° comparado con el control [50-51]. 28-homobrasinólido (**5**) y 28-homocastasterona (**6**) presentaron 100 y 87% de la actividad relativa comparada con el brasinólido (**1**) y castasterona (**3**) respectivamente, en RLIT (Figura 9) [29, 52].



**Figura 9.** Estructura de 22,23-diepi-28-homobrasinólido (**15**) y efecto en la actividad biológica de los sustituyentes en la cadena lateral.

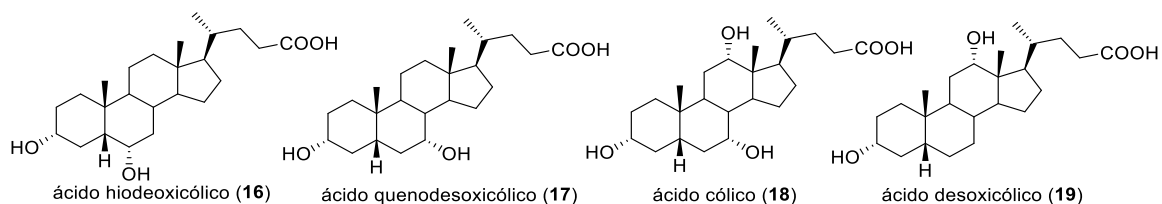
## 1.1. Generalidades sobre síntesis de brasinoesteroides.

Hay dos enfoques conceptualmente diferentes a la síntesis de esteroides: síntesis total y síntesis parcial. El primer enfoque implica la síntesis de toda la estructura esteroidal a partir de precursores simples. Prácticamente todas las síntesis informadas para la obtención de brasinoesteroides naturales y sus análogos corresponden a la estrategia de síntesis parciales [52-53], lo que implica la introducción de los grupos funcionales necesarios en el núcleo esteroidal y por otra parte la construcción de la cadena lateral. El primer problema que debe ser resuelto en síntesis parciales de BRs es la elección de un material de partida apropiado, preferiblemente uno que reúna el máximo de similitud estructural o que se pueda modificar en forma relativamente sencilla. Es importante tener grupos funcionales en el compuesto de partida que puede ser transformado en aquellos que son característicos de BRs. Para preparaciones a gran escala, la disponibilidad del material de partida es un factor determinante. Algunas otras posibilidades son ofrecidas por los derivados de ácidos cólicos, por ejemplo, ácido hideosoxicólico (**16**) son abundantes y su uso principal ha estado dirigido hacia la producción de hormonas farmacéuticas esteroides.

### 1.1. Uso de ácidos cólicos en la síntesis del Brasinoesteroides y sus análogos.

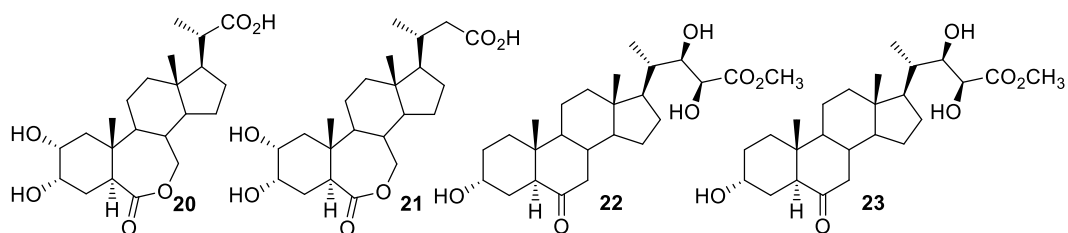
Los ácidos biliares como el hideosoxicólico (**16**), quenodesoxicólico (**17**), cólico (**18**) y desoxicólico (**19**) (Figura 10), se han utilizado como sustratos de partida para la síntesis de un importante número de análogos de brasinoesteroides, manteniendo la función

carboxílica o éster metílico en la cadena lateral. Sin embargo, el ácido hiodeoxicólico (**16**), es el que se ha utilizado mayormente, dado que contiene las funciones orgánicas en posiciones adecuadas para modificarse, y de esta forma generar los requerimientos estructurales en el anillo A y B de los brasinoesteroides activos.



**Figura 10.** Estructuras de algunos ácidos biliares naturales utilizados en la síntesis de análogos de brasinoesteroides.

Una importante recopilación de antecedentes sobre la síntesis y evaluaciones biológicas de derivados de brasinoesteroides preparados a partir de ácido hiodeoxicólico (**16**), describe la obtención de análogos, con diferente largo en la cadena lateral, manteniendo las funciones carboxílicas y ésteres metílicos, como también las diferentes estrategias utilizadas para la construcción de la cadena lateral de los brasinoesteroides [54]. De esta forma fue descrita la síntesis de los compuestos **20** y **21** (Figura 11) [55], donde **20** mostró una alta actividad en los ensayos del primer y segundo internodo de habas [56]. Mientras que los compuestos **22** y **23** (Figura 11), mostraron un leve efecto en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz a concentraciones entre  $1-0,01 \times 10^{-6}$  M [57].



**Figura 11.** Estructuras de algunos derivados de ácido hiodeoxicólico con efecto en crecimiento vegetal.

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:  $cis\ 2\alpha, 3\alpha$ -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 *cis* 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.

Los requisitos de los Brasinoesteroides, mencionados anteriormente, no están del todo claro. Las actividades biológicas que muestra cada uno, depende de la estructura y grupos funcionales que presente cada molécula. Al trabajar con modificaciones estructurales, en síntesis, orgánicas, por lo general se modifica su cadena lateral y la estructura de sus anillos, junto a los grupos funcionales que se encuentren en ellos. Cada cambio que se realice a su cadena lateral como cadenas laterales más cortas, diferentes funciones oxigenadas, cadenas de tipo espiroestánicas, sustituyentes aromáticos y cíclicos, cadenas laterales sin funciones oxigenadas, con funciones carboxílicas, ésteres, epóxidos, acetatos, amidas, etc [21,58], permiten que su funcionalidad sea mayor o menor, las que juegan un rol importante para la actividad biológica de cada uno. Lo mismo ocurre con los anillos, donde la funcionalidad de los anillos A/B puede ser *cis* o *trans*, también se puede jugar con las interacciones y posiciones de sus sustituyentes, los que pueden ser grupos hidroxilos, metoxilos y lactonas, que se encuentran los anillos A y B. Estas variaciones en la posición y estereoquímica se modifican con facilidad en el desarrollo de la síntesis. Sin embargo, aún no se tiene claro una posición exacta en el esqueleto de los Brasinoesteroides para estas funciones, pero estos se pueden modificar con facilidad y así aumentar su actividad biológica.

## 1.1. Problemática de la presencia de metales pesados en Chile.

---

Chile en el siglo XX se enfocó principalmente en el desarrollo de las industrias mineras [59]. Sin embargo, en esa época, no se consideraba el impacto ambiental que causarían dichas industrias. Hoy en día se sabe, que las emisiones atmosféricas generadas por las industrias, por ejemplo, industrias fundidoras de metales causan daños importantes en el suelo de las zonas aledañas, afectando principalmente a la vegetación, daño que es causado por la falta de normas ambientales que regulan las emisiones de gases sulfurados y nitrogenados y de materiales particulados (metales y metaloides) [60].

En regiones de Chile, como Los Andes, La Ligua, San Felipe, Quillota y El Trebal, se encuentran suelos contaminados con metales pesados como el: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Molibdeno (Mo), Níquel (Ni), Plomo (Pb) y Selenio (Se). En la Zona de El Trebal se presenta, una mayor cantidad de As con  $17,1 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de un  $41 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de Concentración Limitante Contaminante (CLC), en la Zona de los Andes las concentraciones mayores de los metales pesados son, Cu el cual presenta  $1.303 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de  $1.500$  de CLC y Pb con  $27,85$  de  $300 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  como CLC [61].

Entre los años 1981 y 1990, se desarrollaron dos estudios prospectivos del contenido total de As, Cd, Cu, Mo, Pb y (Zinc) Zn, en suelos aluviales entre los ríos Huasco (II Región) y Simpson (XI Región). Los principales resultados demuestran que: el contenido total promedio de Cu fue alto en las regiones IV (Valles de Elqui y Limarí), V (Valles de Ligua, Aconcagua y Puchuncaví), Metropolitana (Valles del Mapocho y Maipo) y VI (Valles del Cachapoal y Tinguiririca). Al comparar los valores mínimos y máximos se concluye que estos valles han experimentado contaminación con Cu, ya que los contenidos totales mínimos fluctúan entre  $6,3$  y  $52 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  mientras que los contenidos totales máximos fluctúan entre  $242$  y  $3833 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  [61-62].

Un estudio realizado en la zona costera de Chile central, muestra como la industria de Ventanas (V Región) (1986), provoca efectos negativos sobre el suelo y el ambiente incorporando cantidades de metales en el suelo, los que fueron excedidos en la totalidad del área, siendo más afectadas las zonas más cercanas a la industria. Los contaminantes determinados entre ellos fueron Cu, Zn, Pb y Cd siendo la zona costera de Chile la más afectada con Cu [63]. Encontrándose su deposición atmosférica la presencia de estas partículas metálicas /metaloides (polvo de fundición; media de  $12 \text{ ton} \cdot \text{d}^{-1}$ ; [64]), produciendo un gran daño a los vegetales y en sus suelos [65]

La restricción de los contaminantes no se efectuó hasta la década de los noventa, encontrando los suelos dañados, muy erosionados, acidificados y contaminados con metales (Cu, Zn, Pb y Cd) y metaloides [63]. Aunque ya se han normalizados los estudios de campo, se ha demostrado que la acidificación de los suelos y sus contenidos elevados de metales y metaloides permanecen hasta hoy [63]. Cabe destacar que, al contrario de los contaminantes orgánicos, los metales no se biodegradan y generalmente se presentan en formas inmóviles, lo que supone un elevado tiempo de residencia en el ambiente [66]. Por lo tanto, es más difícil descontaminar toda la zona y menos factible poder proteger las cosechas que se encuentran en esos suelos.

### **1.1. Antecedentes de brasinoesteroides con actividad protectora en plantas por contaminación de metales pesados.**

---

Por otra parte, y de acuerdo a lo mencionado referente al gran número de actividades biológicas que ha demostrado el brasinólido (1), sus análogos naturales y derivados sintéticos, existe una propiedad recientemente estudiada y de interés para los investigadores en la línea de estrés abiótico, la cual está relacionada con la capacidad que tendrían estos compuestos para proteger a las plantas de contaminación por metales pesados.

En un estudio comparativo de metales pesados, en los que se trabajó con Mn, Zn, Cu y Co a diferentes concentraciones (0, 25, 50 y 100 mg\*L<sup>-1</sup>) en plántulas de *Brassica juncae L.*, se demostró que el 24-epibrasinólido (2) (Figura 2) posee mayor actividad biológica inhibiendo el estrés por Co a la concentración de 1x10<sup>-7</sup> M. A esta misma concentración, se obtuvieron mejores resultados inhibiendo el estrés causado por los cinco metales. La concentración de los metales que provoca un mayor estrés en raíz es de 25 mg\*L<sup>-1</sup>, sin embargo al aplicarse el 24-epibrasinólido (2) se obtuvo un crecimiento en la longitud de las raíces de 4,0 cm aumentando en 1,3 cm comparado con el control y en los brotes se obtuvo un crecimiento de 4,4 cm aumentando en 2,2 cm comparado con el control [67].

En otro estudio, el 24-epibrasinólido (2) demostró disminuir el estrés causado por el Cu (25 mg/kg) a una concentración óptima de 1x10<sup>-7</sup> M en las plántulas *Brassica juncae* obteniendo un incremento de 0,6 cm en la longitud del brote de la planta comparado con el control [68].

En un estudio comparativo se evaluó el efecto de cuatro niveles de cadmio (3, 6, 9, 12 mg\*kg<sup>-1</sup>) en interacción con los análogos 24-epibrasinólido (2) y 28-homobrasinólido (5)

(Figura 2) sobre el crecimiento, rendimiento y calidad del tomate bajo condiciones de invernadero, resultando que ambos compuestos mejoran el crecimiento (largo de brotes y raíces) en todos los niveles de concentración de Cadmio a diferencia de los tratamientos cuando no se encuentran presentes los análogos. De los dos análogos aplicados sobre las plantas el 24-epibrasinólido (**2**) fue más efectivo en anular el efecto tóxico del metal y favorecer el crecimiento [69].

Además, se analizó el contenido de enzimas como la peroxidasa (POX), superoxidasa (SOD) (las cuales utilizan las plantas en defensa por la oxidación de los metales pesados) y el contenido de prolina, donde el 24-epibrasinólido (**2**) demostró ser más activo, incrementando el contenido de estas enzimas comparando con el control, entre 10 a 100 mg\*L<sup>-1</sup> en comparación al 28-homobrasinólido (**5**), el cual sólo neutralizó el efecto perjudicial en la planta [69]. El mecanismo de acción detrás de esta respuesta aún no se ha elucidado. Sin embargo, se ha asumido que este efecto se debe a las diferencias en la estructura de estos dos análogos. La mayoría de los BRs llevan un grupo alquilo con orientación (S) (metilo o etilo) en el C-24 de la cadena lateral. Aunque el 24-epibrasinólido (**2**) está entre las excepciones junto al 24-epicastasterona (**4**) portando un alquilo de orientación (R) en la cadena lateral del núcleo esteroidal. Se puede concluir que el impedimento estérico debido a la unión de la molécula 24-epibrasinólido (**2**) al sitio enlazante de su receptor lleva a un estado conformacional tridimensional más distorsionado comparado con el 28-homobrasinólido (**5**) [70].

Sin embargo, si comparamos el efecto protector entre el brasinólido (**1**) y el 24-epibrasinólido (**2**) a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M, en presencia de metales pesados como Cd, Pb y Cu aplicados a  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M, se demuestra que brasinólido (**1**) favorece el crecimiento de la plántula *Chlorella vulgaris*, a diferentes escalas. [70].

A esta misma concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M en otro estudio se ha demostrado como los diferentes análogos de BRs, , inhiben el estrés causado por Pb en la plántula de *Chlorella vulgaris*, obteniendo una disminución en la actividad en el siguiente orden: (**1**) > (**2**) > (**5**) > (**3**) > (**4**) > (**6**) Figura 2 [70], concluyendo que el brasinólido (**1**) es un mejor estimulante del proceso de eliminación, seguido por 24-epibrasinólido (**2**), los que aumentaron la activación de la fitoquelación (PCs) [71]. La presencia de los metales pesados provoca en la planta la pérdida de clorofila, azúcares y proteínas. Con la aplicación del brasinólido (**1**), se redujo la acumulación de los metales pesados, impidiendo así la pérdida de clorofila, azúcares y proteínas, además a modo de defensa se encontró un aumento en la síntesis de PCs [70,72].

También cuando se aplica un factor de estrés, a nivel bioquímico, la influencia de 24-epibrasinólido (2) sobre la degradación lipídica oxidativa en guisante [73] demostró que cuando las plantas fueron tratadas con una solución de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de este compuesto, disminuyeron los niveles de los productos de la peroxidación lipídica particularmente en condiciones de hipoxia o de medio enriquecido con  $\text{CO}_2$  [74]. Por otra parte, se estudió el efecto de los BRs sobre el crecimiento de plantas de rábano *Raphanus Sativus L.* bajo el estrés producido por Cd, en este caso, el 28-homobrasinólido (5) fue más efectivo que 24-epibrasinólido (2), aumentando la actividad de las enzimas antioxidantes y aumentando el crecimiento de las plántulas [75].

Igualmente, en otro estudio se determinó el efecto del pre-tratamiento con 28-homobrasinólido (5), sobre semillas de *Brassica juncea L.* en presencia de distintas concentraciones de los metales Ni y Cu observándose un incremento en la germinación, crecimiento y actividad de algunas enzimas antioxidantes. La reducción de la toxicidad inducida por estos análogos de BRs parece estar asociada al incremento del contenido de proteínas solubles y ácidos nucleicos, así como al incremento de la actividad de la ATPasa [76-77].

La alta actividad biológica de BRs sugiere un importante rol en la regulación de procesos fisiológicos en plantas y también de actividad antiestrés. La aplicación de BRs en bajas concentraciones en ciertos estados de desarrollo reducen la absorción del metal en cebada, tomates y remolacha azucarera [78].

A modo de resumen, en la Tabla 1, se presentan algunos estudios donde queda demostrado el efecto de protección y promoción de crecimiento de brasinosteroides sobre algunas plantas afectadas por estrés abiótico producido por metales pesados.

**Tabla 1.** Resumen de antecedentes reportados del efecto de brs sobre la presencia de metales pesados (estrés abiótico) frente a la protección vegetal.

| Planta                      | BRs  | Concentración Molar Efectiva (M) | Metales Pesados Estudiados | Concentración del Metal Efectiva | Crecimiento/Aumento en comparación del control (Longitud de raíz) (cm) | Referencia   |
|-----------------------------|------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--|--|
| <i>Brassica juncae</i> L.   | 2    | 1x10 <sup>-7</sup>               | Zn, Mn, Cu, Co, Ni         | 25 mg/L                          | 4,0 /1,3   | P. Sharma y R. Bhardwaj [67]                                     |
| <i>Brassica juncae</i> L.   | 5    | 1x10 <sup>-7</sup>               | Ni                         | 25 mg/L                          | 4,8/0,2  | P. Sharma, R. Bhardwaj, N. Aror, H.K. Arora y A. Kumar [76]      |
| <i>Brassica juncae</i> L.   | 5    | 1x10 <sup>-6</sup>               | Cu                         | 50 mg/kg                         | 11,3/5,9   | Q. Fariduddin, M. Yusuf, S. Hayat, A. Ahmad [93]                 |
| <i>Brassica juncae</i> L.   | 2    | 1x10 <sup>-7</sup>               | Cu                         | 25 mg/kg                         | 2,8/0,6  | Priyanka Sharma y Renu Bhardwaj [68]                             |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | 2, 5 | 1x10 <sup>-8</sup>               | Cd                         | 3 mg/kg                          | 3,4/0,9<br>3,2/0,7   | Shamsul Hayat, Mohammed Nasser Alyemeni A, Syed Aiman Hasan [69] |
| <i>Raphanus sativus</i> L.  | 2, 5 | 3x10 <sup>-6</sup>               | Cd                         | 2 μM                             | 5,8/3,1<br>6,8/4,1   | S. Anuradha, S.S.R. Rao [75]                                     |
| <i>Brassica juncea</i>      | 2    | 1x10 <sup>-9</sup>               | Ni                         | 0,5 Mm                           | 6,2/2,6  | Kanwar et al [92]  |

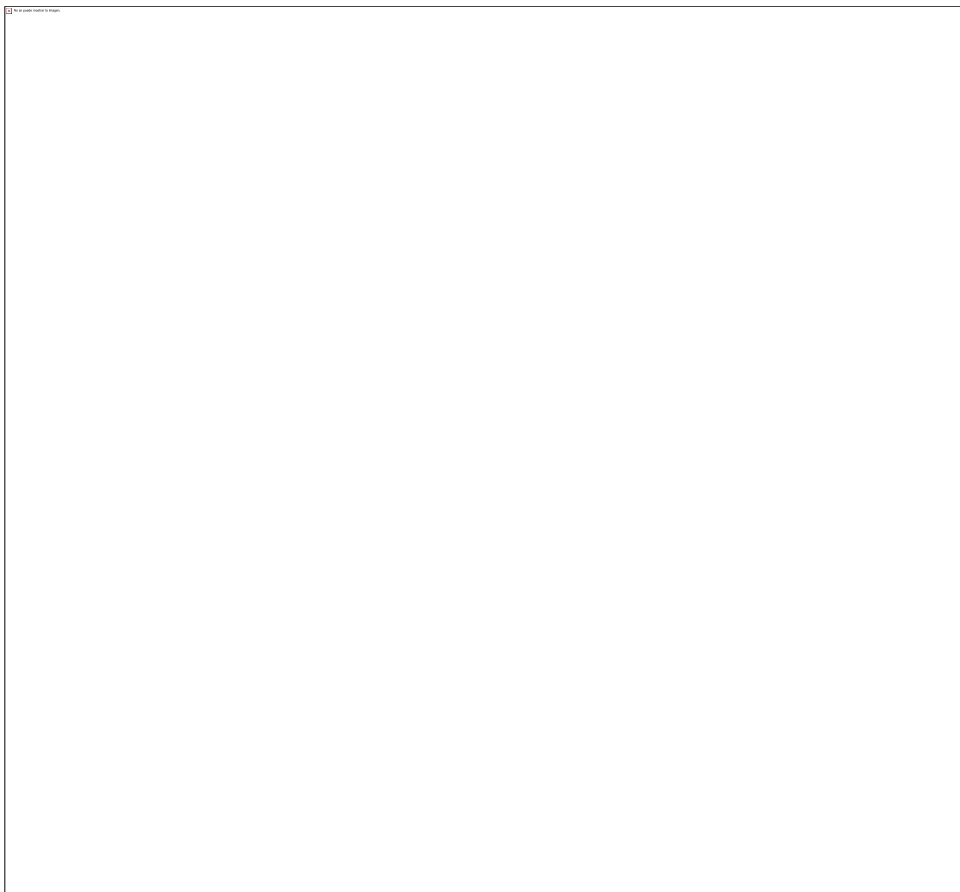
Se han postulado dos tipos de mecanismos de acción por el cual actúan los BRs sobre el estrés producido por metales pesados: Con actividad oxidativa cuando está presente el Cr, Cu, Mn y Fe y el otro sin actividad oxidativa cuando se encuentran presentes los metales Cd, Ni, Hg, Zn y Al [79].

A menudo se liberan grandes cantidades de metales pesados en el suelo. Algunos metales son esenciales (Mn, Fe, Zn o Cu) y otros letales (Al, Cd, Hg, Ni o Pb), para el metabolismo de las plantas, dependiendo de la concentración de cada uno. Estos metales se alojan en la membrana celular vegetal y existen tres principios básicos que se pueden observar por parte de la planta para evitar toxicidad: el primero consiste en regular la captación, reduciendo el metal (Quelación), el segundo consiste en la muerte de la célula y el tercero generar un estado pre-oxidativo, generando especies reactivas de oxígeno (ROS).

Al ingresar el metal en la planta, se activa el sistema de osmoprotección en forma de defensa al estrés, incrementando las acuaporinas, osmolitos compatibles (pequeños solutos usados por células de numerosos organismos y tejidos con estrés hídrico para mantener un volumen celular), y niveles de ácido abscísico. Una respuesta común en plantas estresadas es la acumulación de prolina, consecuencia del descenso del potencial hídrico celular. Esta acumulación, se acompaña de incrementos de las actividades enzimáticas: glutamato sintasa, pirrolín-5-carboxilato sintasa y pirrolín-5-carboxilato reductasa, e inhibición de la prolina deshidrogenasa.

Cuando las plantas son tratadas exógenamente con BRs bajo el efecto de metales pesados, se debe destacar que la respuesta de crecimiento de las plantas sometidas a este tipo de estrés abiótico, se ha asociado de forma general con un incremento del nivel del sistema antioxidante incluyendo la prolina, con una mayor eficiencia del uso del agua y de la actividad fotosintética, además se mejora la síntesis de fitoquelatinas [80]. El mecanismo de acción del BRs, se encuentra descrito por Iwona Rajewska *et al*, en Anexo 1 [80].

Otra potente herramienta para el estudio de las vías de señalización de BRs en respuesta a diferentes tipos de estímulos fue el descubrimiento de brasinazole, un inhibidor de la biosíntesis de BRs que induce un fenotipo similar a *Arabidopsis thaliana* deficiente en BRs [81]. Potentes inhibidores de biosíntesis de BRs en *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* se han descubierto en los últimos años, tales como propiconazole, placobutrazol y uniconazol [82].



**Figura 12.** Vía de señalización de brs en la célula vegetal. la molécula de BRs se une al dominio extracelular del receptor BRI1, lo que conduce a la fosforilación del dominio serina-treonina quinasa intracelular de BRI1, permitiendo la disociación del inhibidor BKI1 para formar un complejo con un segundo receptor quinasa BAK1. el complejo activo BRI1/BAK1 permite la propagación de la señal mediante la inactivación de la proteína BIN2, que es un regulador negativo de la señalización de BRs. las proteínas BES1 y BZR1 son fosforiladas por BIN2 y están íntimamente relacionadas con activadores transcripcionales de genes inducidos por BRs [83].

Analizando el mecanismo de acción, la señalización por BRs y las respuestas genómicas resultantes, se inician con la unión de una molécula de BR a un receptor específico llamado BRI1 (*Brassinosteroid insensitive-1*), localizado en la membrana plasmática de la célula diana. La transducción de señales en la célula es mediada por fosforilación y factores de transcripción [84]-[85] (Figura 12), activando la expresión de diferentes genes, incluyendo a los que están involucrados en la modificación de la pared celular y el crecimiento.

Sin embargo, se hace necesario profundizar más en el mecanismo que utilizan estas hormonas esteroidales, para disminuir la toxicidad que el exceso de metales pesados provoca en las plantas.

Es por ello que, debido a la problemática presente en nuestro país y a las propiedades biológicas reportadas referente a este grupo de fitohormonas, se hace interesante investigar qué efectos tendrían nuevos análogos de BRs sintéticos sobre el proceso de germinación de

semillas de tomate, que podrían establecerse y crecer en los suelos dañados por metales pesados; principalmente contaminados por Cu, debido a que actualmente en nuestro país existen importantes zonas contaminadas (Regiones IV, V y VI) [62], adicionalmente se tiene como antecedente bibliográfico la eficacia en la protección por compuestos esteroidales sobre el estrés abiótico producido en las plantas por contaminación con metales [69]. Por ejemplo, el estudio mencionado anteriormente del análogo 24-epibrasinolido (**2**) en estrés provocado por Cd, se demostró la eficacia no solo en la protección frente al estrés, sino también a la productividad y calidad de la fruta.

## 1.1. Respuesta a estrés por metales pesados

---

En la investigación reportada por Núñez *et al.* (2010), las plantas tienen la capacidad de absorber metales pesados del medio externo y acumularlos en su interior. Las concentraciones altas de estos metales, incluidos los esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ejercen efectos tóxicos en sus rutas metabólicas, ya que ellos pueden, entre otros, bloquear grupos funcionales de moléculas importantes, sustituir iones esenciales de sitios celulares, desnaturalizar o inactivar enzimas y afectar la integridad de las membranas de células y organelos [86]. La toxicidad por metales pesados genera una variedad de respuestas de adaptación en las plantas. Un mecanismo conocido para la desintoxicación de metales pesados es la formación de quelatos del ión metálico por un ligando, que puede ser un ácido orgánico, aminoácido, péptido o polipéptido. Las fitoquelatinas son ligandos péptidos que desintoxican a las plantas de los metales intracelulares y se ha demostrado que en células de *Chlorella vulgaris* tratadas con plomo, los brasinoesteroides estimulan la síntesis de fitoquelatinas, resultando el orden de actividad el siguiente: **1>2>5>3>4>6** [71]. Este mismo autor ya había demostrado [87] que la aplicación de **2** mezclado con diferentes metales pesados bloqueaba su acumulación en estas células y, por tanto, reducía el impacto que este estrés provocaba en el crecimiento y la concentración de azúcares y proteínas.

La influencia de los BR en la acumulación de metales pesados (cadmio, cobre, plomo y zinc) ha sido estudiada en diferentes cultivos, tales como cebada, tomate, rábano y remolacha y se ha informado que la aplicación de **2** redujo significativamente la absorción del metal. Por ejemplo, en raíces de remolacha (*Beta vulgaris*), se encontró que el contenido de plomo se redujo en un 50 % [21], al igual que el cobre en plantas de mostaza de la India (*Brassica juncea* L. Czern and Coss) [68]. Por otra parte, se ha evidenciado que 14 días después que las plántulas de nabo (*Brassica napus*) han crecido in vitro en medio que contiene **2** y cadmio, este BR redujo el efecto tóxico del metal en los procesos fotoquímicos a través de la disminución del daño en los centros de reacción activos y en los de evolución de O<sub>2</sub> del fotosistema II y del mantenimiento de un transporte electrónico fotosintético eficiente [88]. Además, los autores plantearon que, probablemente, el efecto protector de **2** incrementa en un tejido más viejo, que es más sensible al daño por cadmio.

Algunos autores han informado que el brasinólido mejoró el crecimiento de posturas de frijol mungo ante condiciones de estrés por aluminio [89]. Además, plántulas de mostaza de

la India cv. T-59 crecidas en solución nutritiva suplementada con 150 mM de NiCl<sub>2</sub> y asperjadas a los 15 días con solución 1 μM de **2**, exhibieron a los 30 días después de la siembra, un incremento del nivel del sistema antioxidante y la prolina, lo que pudo asociarse a la protección de la maquinaria fotosintética y el crecimiento y, por ende, a una mayor tolerancia de las plantas al estrés [90]. Con anterioridad, trabajando con plántulas de la misma especie y cultivar, otros autores encontraron que la aspersión foliar con 0,01 μM de **5** revirtió en cierta medida la reducción que en el crecimiento provocó el estrés por cadmio [91]. En otro estudio el efecto de **2** en *Brassica juncea* provocó una actividad mayor en el crecimiento a concentraciones menores de 10<sup>-9</sup> [M] en contra del Niquel a 0,5 Mm [92]. Más recientemente, se demostró que el tratamiento de semillas de esta especie con **5** mejoró el crecimiento y los indicadores fotosintéticos en plántulas crecidas en presencia de cobre y sugirieron que el incremento en las actividades de las enzimas antioxidantes, así como en los niveles de prolina, fueron los responsables de la reversión de los efectos tóxicos que provoca el exceso de este metal en las plantas [93].

En experimentos realizados con plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*) cv. Uday, se demostró que la aspersión foliar con 0,01 μM del compuesto **5** mejoró, de forma general, el comportamiento de las plantas ante la presencia de cadmio en el suelo, asociándose esta respuesta al incremento significativo del sistema antioxidante estimulado por este compuesto [94]. Se conoce que uno de los mecanismos para la extracción del metal es la biosorción, que se basa en las interacciones físico-químicas entre los iones metálicos y grupos funcionales presentes en la superficie de la célula. Los grupos funcionales más comúnmente implicados en estas interacciones incluyen los grupos carboxilos, hidroxilos y aminos, entre otros, los cuales están presentes en componentes de las paredes celulares, tales como los polisacáridos, los lípidos y las proteínas. Todos estos resultados revelan el efecto protector de las aplicaciones de los compuestos **2** y **5** ante el estrés por metales pesados; sin embargo, se hace necesario profundizar en las investigaciones para determinar cuál es el mecanismo que utilizan estas hormonas esteroidales, para disminuir la toxicidad que el exceso de estos iones provoca en las plantas. [77-87]

## 1.1. Efecto de los metales pesados en la agricultura del tomate.

---

El tomate *Solanum lycopersicum* (denominado con frecuencia *Lycopersicum esculentum* Mill.), es uno de los cultivos vegetales más importantes de la familia *Solanaceae*, suele crecer hasta 1000-3000 mm de altura, y posee un tallo débilmente leñoso, su fruto es comestible, de colores brillantes, generalmente rojo, y pese a que botánicamente es una fruta, generalmente se le considera un vegetal [95].

Aunque, el tomate es nativo de América central y Sudamérica, debido a su importancia nutricional y económica se cultiva a nivel mundial. Nutricionalmente, es una fuente importante de vitamina C, potasio, ácido fólico, flavonoides y carotenoides, como el licopeno, lo que le confiere propiedades antioxidantes, por lo que puede contribuir a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cancerígenas [96]. En términos económicos, en el año 2018, la producción mundial de tomate fresco alcanzó 160 millones de toneladas a nivel mundial [97], constituyendo uno de los mayores cultivos de hortalizas, siendo sólo superado por la papa. En Chile, el tomate es una de las hortalizas más cultivadas, en cuanto a superficie y producción. En el año 2011, obtuvo la posición 40<sup>to</sup> en superficie mundial, con 13.864 ha, y 24<sup>to</sup> en producción, con 872.485 toneladas. [98]. Actualmente, entre los meses de enero y mayo del año 2020, se han obtenido 149.916 toneladas de tomate, los cuales son comercializados como productos frescos o derivados tales como jugos, salsas, tomates en trozos, rodajas, triturados, pulverizados o secos [97]. Esta alta producción de tomate, se debe a que constituye parte importante de la alimentación de la población chilena, ocupando el primer lugar, en la canasta del hogar (ponderando el 0,32%, de la canasta total), lo que implica que es la hortaliza a la que se destinan más recursos, de acuerdo a datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE 2007)[97].

Una de las ventajas que proporciona el cultivo de tomates es que es una planta perenne, tierna, cálida y dado su rusticidad, posee una amplia tolerancia climática, cultivándose en regiones tropicales y templadas en todo el mundo, ya sea mediante cultivo en campo abierto o invernadero [99].

Un aspecto importante a considerar para la obtención de una buena producción y un buen cultivo en este tipo de plantas, se relaciona con las etapas de germinación, crecimiento y emergencia de la radícula a través de las cubiertas seminales. La germinación de la semilla

es una etapa crítica, porque el resto de la vida de la planta depende directamente de la tasa de germinación. Además, si las semillas no alcanzan la fase de crecimiento de forma eficiente, no pueden retornar a etapas previas, y en caso que las condiciones del medio no sean favorables, la semilla morirá. Por otra parte, una vez que la radícula ha roto las cubiertas seminales, inicia el desarrollo de la plántula, esto implica un proceso complejo, que requiere un elevado gasto energético proveniente de las reservas nutritivas de la semilla [100], implicando un incremento en la actividad metabólica, y por consiguiente, de nutrientes esenciales para la planta.

Dentro de los nutrientes minerales esenciales se distinguen los macronutrientes, que corresponden a aquellos de mayor requerimiento y que a su vez, se encuentran en mayor proporción. Existen dos clases, los primarios tales como: Nitrógeno (N), potasio (K) y calcio (Ca) y los secundarios como: fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S). Por otra parte, aquellos nutrientes esenciales requeridos en menor proporción en la planta se denominan micronutrientes, algunos son: zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), hierro (Fe), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y, finalmente, pero sin importancia práctica, el níquel (Ni) [101]. En este contexto los suelos agrícolas constituyen un recurso natural de gran importancia, dado que la superficie terrestre funciona como un reactor natural y un hábitat de organismos, así como soporte de infraestructura y fuente de materiales no renovables. Sin embargo, pese a que este suelo proporciona el medio y los nutrientes necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo de la planta, es vulnerable a la contaminación por metales pesados, debido a que está expuesto al empleo de agroquímicos que contienen metales pesados, también a aguas residuales y a la contaminación aérea que generan las actividades mineras e industriales [102-103]. De esta forma, la biodisponibilidad de estos metales es importante, ya que se pueden encontrar en el suelo en solución como iones de metales libres y/o como complejos metálicos solubles, absorbidos en sitios de intercambio de los constituyentes inorgánicos del suelo, ligados a la materia orgánica, precipitados como óxidos, hidróxidos, carbonatos o formando parte de minerales silicatados [104].

La biodisponibilidad de estos metales pesados en el suelo corresponde a la concentración de metal que está disponible para los microorganismos y las plantas y depende de las propiedades físicas y químicas del suelo, por ejemplo, de pH, contenido de materia orgánica, arcilla, óxidos de hierro, potencial redox e interacciones de equilibrio [105-106]. Dentro de estas propiedades, el factor pH, es el más importante, debido a que influye fuertemente en la solubilidad y en la especiación de los metales en el suelo. La disminución del pH en una

unidad provoca un aumento de hasta dos veces la concentración de  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  biodisponible [105-107].

De esta forma, hay que considerar que si bien los metales pesados disponibles en el suelo, en una proporción adecuada son beneficiosos para las plantas, en exceso pueden ocasionar graves daños en estas, tales como inhibición de la germinación y crecimiento celular, disminución de la respiración en las raíces e interferencia con varias enzimas. Además, modifican la estructura y funcionamiento de la membrana plasmática, reducen e interfieren en la toma de agua (proceso fundamental en la germinación), en el transporte y metabolismo de varios nutrientes esenciales [61]. En un estudio realizado por Zucconi et al. Evaluaron el efecto de la contaminación de Zn(II), en semillas de Lechuga, empleando el siguiente método [108]. Para ello, a una cápsula Petri se depositó un disco de papel filtro Whatmann N°3, luego se procedió a embeber el papel filtro con 5 ml de un extracto 1:10 (50 g mezcla: 500 ml agua destilada), cada tratamiento fue realizado por triplicado. Posteriormente, se depositaron 20 semillas de lechuga, dejando espacio suficiente para permitir la elongación de las radículas. Se procedió a cubrir las cápsulas y se trasladaron a una cámara de germinación, para realizar el proceso de incubación, en oscuridad, durante un período de 120 horas y a una temperatura de 22°C ( $\pm 2$ ). Como control negativo se empleó agua destilada, a fin de asegurar una buena germinación y para el control positivo se utilizó una disolución de una sal de Zn(II), con el objetivo de asegurar una inhibición total. Como resultado se instituyó que este bioensayo es importante para determinar la madurez de los biosólidos y sus niveles de toxicidad sobre las semillas. Los resultados de la evaluación del control positivo donde se aprecia que una concentración igual a 0,001 molar de Zn (II) es suficiente para producir una inhibición cercana al 50% de las semillas. [109]. Hay que considerar que la germinación debe estar por sobre el 50% para considerar que no produce efectos negativos sobre las plántulas [110].

Otros efectos de germinación se han observado en las semillas de *A. cepa*, *B. vulgaris*, *O. sativa* y *R. sativus*. El bioensayo consistió en agregar 5 semillas en unos envases que contenían dos trozos de papel absorbente con diferentes concentraciones de los metales  $Cr^{6+}$ ,  $Hg^{+2}$  ó  $Pb^{+2}$  por envase. El agua utilizada para los ensayos biológicos consistió en una solución hidropónica con las características descritas por *Iannacone et al. (2000)* [111]. La prueba se realizó bajo condiciones de oscuridad. La duración de la prueba fue de 192 h (8 días). Los indicadores para el bioensayo fueron el crecimiento de la radícula (mm) en comparación con el control. Los bioensayos se realizaron a una temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}C$ . Como resultado

obtienen que las semillas de *B. vulgaris* debido a su mayor sensibilidad a la acción de los tres metales, podría usarse para el monitoreo ecotoxicológico de suelos contaminados por relaves mineros. En contraste, las especies de plantas más tolerantes a los tres metales pesados, como *R. sativus* y *A. cepa*, permiten su uso para la revegetación en suelos afectados por la minería [112].

## PROPUESTA

---

A partir de la revisión bibliográfica, los requerimientos estructurales necesarios para que un brasinoesteroide presente una alta actividad biológica, se pueden resumir de la siguiente forma:

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

Sin embargo, los requisitos 2 y 4 parecen estar en contradicción con las actividades biológicas mostradas por un importante número de análogos de BRs, en los cuales se observan modificaciones estructurales considerables en la cadena lateral en comparación con los BRs naturales, por ejemplo: cadenas laterales más cortas, diferentes funciones oxigenadas, cadenas de tipo espirostánicas, sustituyentes aromáticos y cíclicos, cadenas laterales sin funciones oxigenadas, con funciones carboxílicas, ésteres, epóxidos, acetatos, amidas, etc. Según la información recopilada y dada la diversidad de posibles estructuras encontradas en la cadena lateral, se establece que los requerimientos estructurales de la cadena para que estos análogos presenten actividad biológica no estarían del todo claro. Aspecto similar observado en aquellos análogos que presentaron actividad biológica conteniendo fusión de anillos A/B de tipo *cis*.

En base a estos antecedentes bibliográficos expuestos se plantea determinar el efecto de la aplicación de nuevos análogos de BRs sobre el proceso de germinación en semillas de tomate *in vitro* en presencia de Cobre (Cu) a distintas concentraciones. Estos análogos tendrán en su estructura cadena lateral del tipo 24-nor derivada del ácido hiodeoxicólico (**16**), funciones C-22 (*S*), C-22 (*R*) y C-23 dihidroxilado, también C-22 (*R*) y C-23 epóxidado, además de C-22 (*S*) monobenzoilado y C-22 (*S*) y C-23 dibenzoilados, con función  $3\alpha,6\alpha$ -dihidroxilada en anillo A y B y fusión de anillos A/B de tipo *cis*. Los que corresponden a los compuestos

**26a/26b, 27a/27b, 28a/28b, 29a/29b, 35a/35b** y los compuestos puros **35a** y **36a**.  
(Figura 13).



**Figura 13.** Estructuras de los compuestos objetivos de síntesis.

## HIPÓTESIS

---

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos señalados anteriormente, la hipótesis planteada para desarrollar esta investigación es la siguiente:

“Nuevos análogos de Brasinoesteroides con variaciones estructurales en la cadena lateral del tipo 24-norcolanos, con fusión de anillos A/B de tipo *cis*, al ser aplicados de forma exógena bajo la presencia del metal pesado Cobre (Cu) influyen positivamente en los parámetros de germinación in vitro en semillas de *Lycopersicum sp.* Además al ser aplicados de forma exógena influyen en la inclinación de lámina de arroz ILA”

## **CAPITULO 2- OBJETIVOS**

---

---

### Objetivos Generales

---

Sintetizar nuevos análogos **27a**, **27b**, **29b**, **35a** y **36a** de brasinoesteroides desde ácido hiodeoxicólico (**16**) y evaluar sus actividades biológicas de promoción de elongación y sobre el proceso de germinación bajo estrés abiótico provocado por la presencia del metal pesado (Cu) en semillas tomate.

---

### Objetivos específicos

---

1. Sintetizar los intermedios **24-26a** y análogo **27a** indicados en el Esquema 1 desde ácido hiodeoxicólico (**16**), caracterizar los productos obtenidos por métodos físicos y espectroscópicos.
2. Sintetizar el intermedio **28b** y análogo **29b** indicados en el Esquema 2 desde el derivado **25**, caracterizar los productos obtenidos por métodos físicos y espectroscópicos.
3. Sintetizar los intermedios **30-31** y el análogo **27b** indicados en el Esquema 3 desde el compuesto **26a**, caracterizar los productos obtenidos por métodos físicos y espectroscópicos.
4. Sintetizar los intermedios **32-34** y los análogos **35a** y **36a** indicados en el Esquema 4 desde el compuesto **16**, caracterizar los productos obtenidos por métodos físicos y espectroscópicos.
5. Evaluar la actividad biológica promotora de elongación de los análogos finales (**27a**, **27b**, **29b**, **35a** y **36a**), comparar los resultados de esta actividad entre ellos, usando como control negativo el agua y control positivo el Brasinolido (**1**), mediante el bioensayo de inclinación de la lámina de arroz.
6. Determinar el efecto del o los análogos de BRs más activo resultante del objetivo 4 sobre el proceso de germinación de semillas de *Lycopersicum sp* bajo condiciones de estrés por la presencia del metal pesado Cobre (Cu).

## **CAPITULO 3- MÉTODOS EXPERIMENTALES**

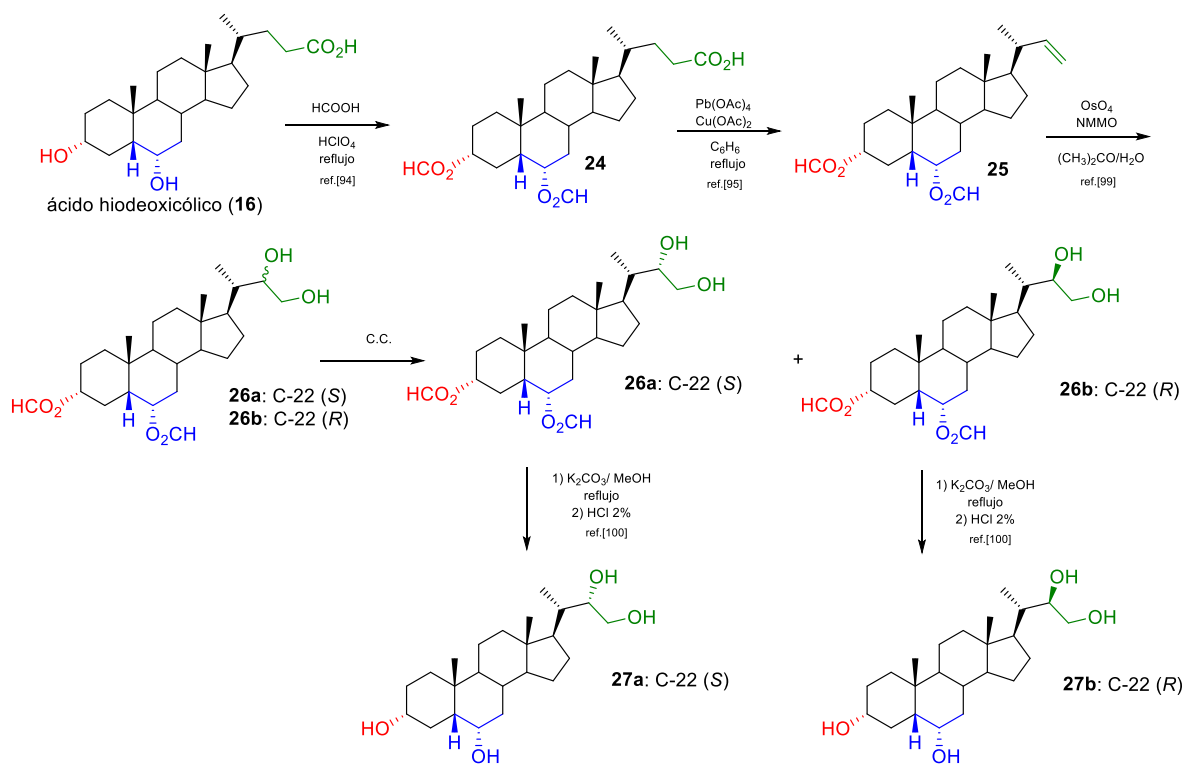
---

## Síntesis Química General

---

Los procesos de síntesis de los nuevos análogos de brasinoesteroides (**27a**, **27b**, **29b**, **35a** y **36a**) serán llevados a cabo en el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile. La estrategia sintética para la obtención de los nuevos análogos de brasinoesteroides, propone una primera etapa la síntesis del compuesto **27a**, de acuerdo a la ruta mostrada en el Esquema 1.

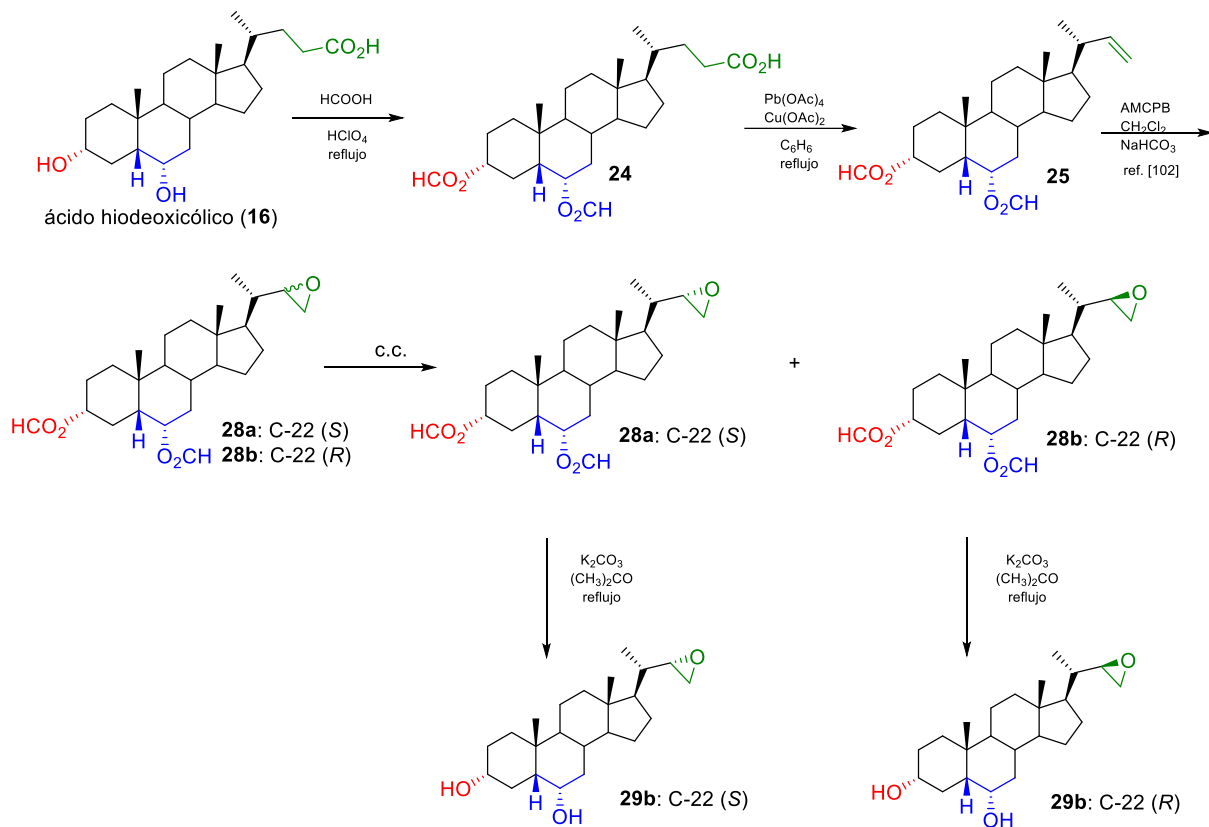
La formilación estándar del ácido hiodeoxicólico (**16**) para la protección de los grupos hidroxilos, produce el derivado **24** [113]. El intermedio olefínico **25** puede ser obtenido por reacción de descarboxilación directa de **24** con  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  o  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$  según se ha informado para la obtención de otros derivados olefínicos [114-117]. Dihidroxilación del compuesto **25** con  $\text{OsO}_4/\text{NMMNO}$ , permitirá la obtención de la mezcla de glicoles **26a/26b**, produciendo mayoritariamente el epímero **26a**, según se ha informado para otros derivados preparados por este sistema [118-120]. Posterior separación y purificación de la mezcla **26a/26b**, se espera obtener el derivado puro **26a**, el cual será saponificado para la obtención de uno de los productos finales correspondiente al compuesto **27a** (Esquema 1).



**Esquema 1.** Estrategia de síntesis propuesta para obtener del tetrahidroliados **27a** dese el ácido hideoxicólico **16**.

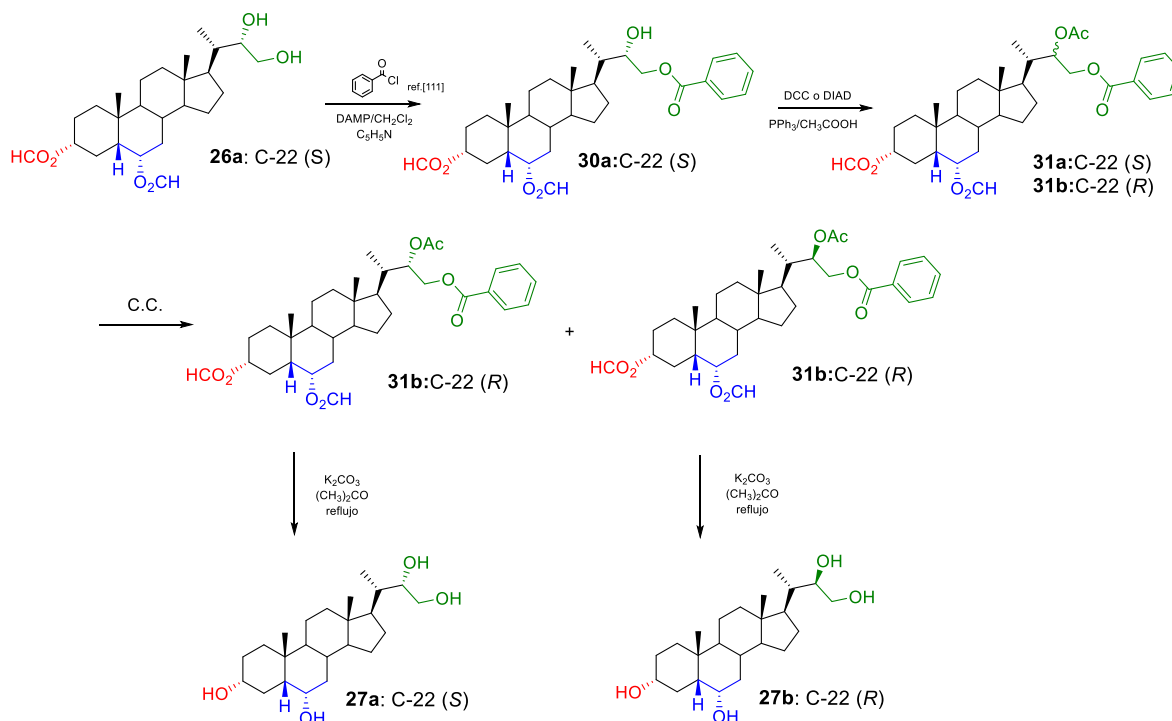
Considerando que derivados epoxidados en la cadena lateral, representan a estructuras de nuevos análogos con posible actividad biológica, además de considerarlos como precursores en la síntesis de análogos naturales como la 24-epicatasterona [121], se propone la síntesis del análogo epoxidado **29b** desde la olefina **25**, de acuerdo con lo indicado en el Esquema 2.

La epoxidación de **25** se realizará con AMCPB como agente de epoxidación, utilizado también en la preparación de otros análogos [108-109,121]. Esta reacción producirá la mezcla epimérica **28a-28b**, donde el epímero mayoritario esperado es el **28b**, tal como se indicó para la epoxidación de olefinas esteroidales de estructuras similares [108-109]. Finalmente saponificación del epímero **28b** producirá el epóxido **29b** (Esquema 2) [122].



**Esquema 2.** Ruta sintética propuesta para la obtención del análogo epoxidado **29b** desde el derivado olefínico **25**.

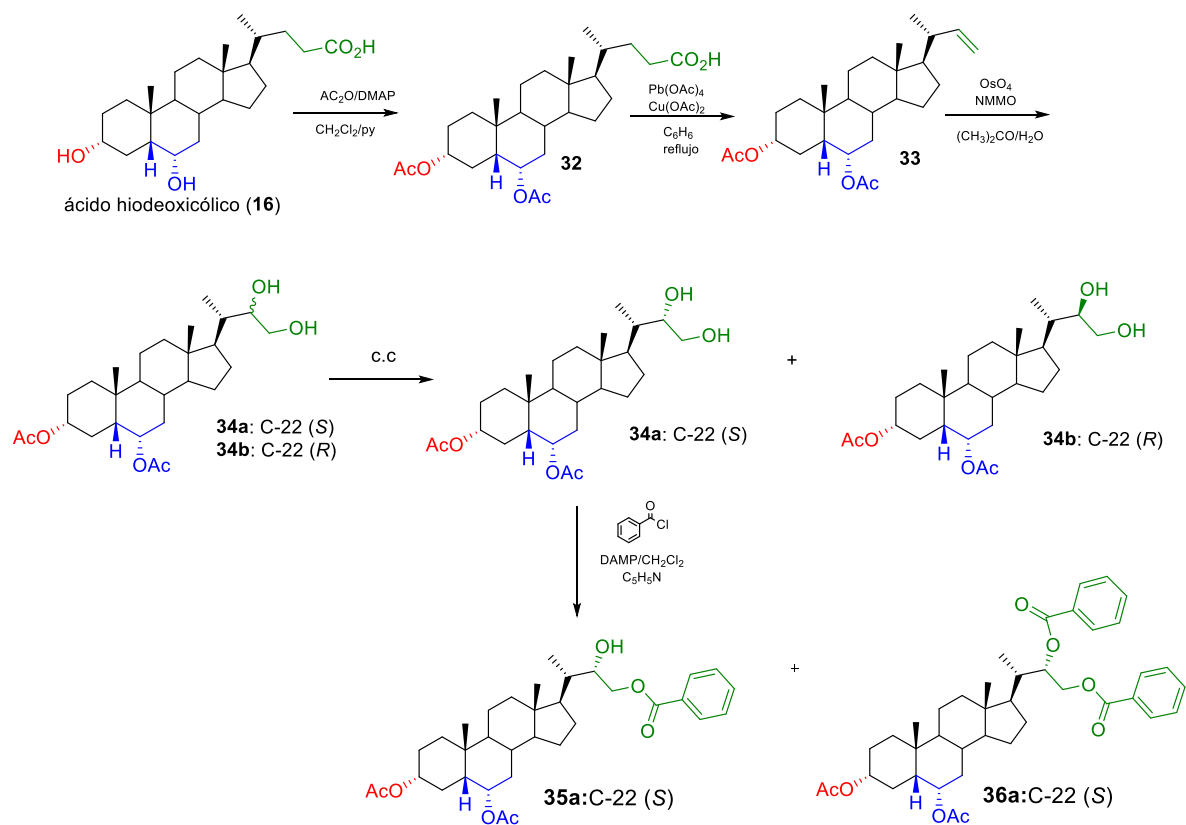
Con el objetivo de evaluar la actividad biológica presentada en análogos con una configuración del carbono 22 como 22 (*R*), y así contractar el efecto con el análogo **27a**, que presenta una configuración en el carbono 22 como 22 (*S*), se propone la síntesis del derivado tetrahidroxilado **27b**, que se desarrollará de acuerdo con lo mostrado en el Esquema 3. El sustrato de partida a utilizar será el compuesto **26a** (obtenido desde el Esquema 1), el cual será protegido selectivamente en la posición C-23, transformando el alcohol primario en un éster de benzoilo, por reacción directa de **26a** con cloruro de benzoilo, utilizando DMAP como catalizador con lo cual se espera obtener el compuesto monobenzoilado **30** [122]. La configuración del carbono en C-22 (*S*) se espera invertir utilizando la reacción de Mitsunobu, utilizando el sistema de DCC o DIAD en PPH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>COOH [123-124]. Finalmente, por saponificación y posterior acidificación del derivado **31**, se obtendrá el análogo **27b**, de acuerdo a lo indicado en el Esquema 3[119].



**Esquema 3.** Ruta sintética propuesta para la obtención del análogo **27b** a partir del derivado **26a**.

Para la obtención de los compuestos benzoilados **35a** y **36a** a partir de ácido hiodeoxicólico (**16**) se realizó una reacción de acetilación con anhídrido acético y DMAP, obteniendo el ácido diacetilado **32** [125]. Luego se realizó la descarboxilación con  $\text{OsO}_4/\text{NMMNO}$  obteniendo el alqueno **33** [114].

Para acceder a dioles **34a** (Esquema 4), se realiza la dihidroxilación directa de Sharpless sobre el doble enlace C-22-23 del intermediario **33** con un inductor quiral (sistema DHQD-CLB/ $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2/\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{OsO}_4$ ) [126-127]. Finalmente se procedió a derivar esta mezcla selectivamente en la posición C-23, en forma de ésteres monobenzoatos [128-129], generando los derivados monobenzoilado **35a** y dibenzoilados **36a** (Esquema 4).



**Esquema 4.** Estrategia de síntesis propuesta para obtener monobenzoilado **35a** y dibenzoilado **36a** dese el ácido hideoxicólico **16**.

## Materiales e instrumentación usados en síntesis orgánica

---

### Cromatografía en capa fina (CCF)

---

Se utilizaron placas cromatográficas de Sílica gel Merck® 60F-254. Las placas fueron eluidas en mezclas de solventes orgánicos según el tipo de compuesto a separar. Los cromatogramas se revelaron por inmersión en una solución de ácido sulfúrico al 10% y posterior calcinación sobre una placa calefactora.

### Cromatografía en columna de sílica gel (CC)

---

Las separaciones por columna se realizaron con Sílica gel Merck® 60 (0,032 - 0,063 mm). Los eluyentes son mezcla de solventes orgánicos en polaridad creciente, los cuales se ajustan en composición y proporción según los compuestos a separar.

### Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

---

Los espectros ( $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC) fueron registrados en un espectrómetro digital Bruker Avance 400, utilizando como solvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) o metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) al 99,8%. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) 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  $^1\text{H}$ :  $\delta$   $\text{CDCl}_3$   $\delta = 7,24$  ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1)  $\delta = 3,31$  ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$  (2)  $\delta = 4,78$  ppm; y las señales residuales para los espectros de  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$   $\delta = 77,00$  ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta = 49,2$  ppm, respectivamente.

---

### **Espectrometría de masas de resolución unitaria (EM)**

---

Los espectros de masas unitarias fueron registrados en un equipo GCMS-QP2010 Ultra (Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas SHIMADZU, Japón, Columna RTx-5 MS, temperatura de 300 °C, solventes CHCl<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>OH, y rango 70 a 550,10 m/z, Ionización por Impacto de Electrones)

---

### **Espectroscopía IR**

---

Los espectros de Infrarrojo fueron registrados en un espectrómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR, usando discos soporte de NaCl. Las frecuencias de absorción fueron expresadas en número de onda (cm<sup>-1</sup>).

---

### **Puntos de fusión**

---

Los puntos de fusión fueron determinados utilizando un instrumento marca Aldrich, modelo Stuart SMP3. Una vez medidos no fueron corregidos.

---

### **Evaluación de la actividad biológica de nuevos análogos de brasinoesteroides (BRs)**

---

El estudio biológico de los efectos de los nuevos análogos de brasinoesteroides sobre el crecimiento y estrés abiótico, se llevaron a cabo bajo la dirección y colaboración de la Dra. Katy Díaz Peralta perteneciente al Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

---

### **Bioensayo de inclinación de la lámina de arroz (RLIT)**

---

Para determinar la actividad sobre la elongación de la lámina de arroz de los análogos de BRs se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa*) variedad *Zafiro* facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-La Platina. Las semillas se lavaron y se dejaron en remojo con agua destilada estéril durante 24 horas, luego se sembraron en sustrato/perlita/vermiculita (3:1:1).

Una vez que las plantas alcanzaron el tamaño ideal para obtener el segundo internudo de la lámina, se cortaron los segmentos de la hoja, que consiste en la segunda lámina foliar y la segunda lámina conjunta y la vaina (5 cm de largo), éstos segmentos se incubaron en 60 mL de agua destilada estéril y se probaron a distintas concentraciones de brasinolido (**1**, APE BIO; control positivo) y análogos de BRs ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  M) y control negativo solo llevaba agua. Después de incubar durante 72 horas a 25°C en oscuridad, la magnitud de la apertura del ángulo se midió entre la hoja y la vaina (Versión modificada de Wada *et al.*, 1981)[130].

### Efecto de los análogos de BRs sobre el estrés abiótico producido por Cobre (Cu) en plantas de Tomate.

---

#### Preparación de análogo de BRs

---

Una vez seleccionado el análogo de BRs más activo (a partir del resultado en RLIT) se disolvió en una cantidad mínima de etanol (500  $\mu$ L) para preparar la solución madre de  $1 \times 10^{-4}$  M con agua destilada estéril. La concentración de  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M se preparó a partir de la dilución de la solución madre.

### Efecto de análogos de brasinosteroides en presencia del metal pesado Cobre (Cu) sobre la germinación de semillas de Tomate.

---

Las semillas de tomate (variedad Cal-Ace) fueron obtenidas de SEMILLAS MUSIC®; se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio a 0,05% (p/v), luego se lavaron con agua desionizada tres veces. Una vez que las semillas se esterilizaron, se dejaron sumergidas en los análogos de brasinoesteroides **26a/26b**, **27a/27b** y **35a** y el Control positivo (**1**) a diferentes concentraciones preparadas en etanol/agua ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  [M]) por 24 horas. Se

colocó en cada placa petri una toalla de papel humedecido con agua destilada estéril, en el caso de los tratamientos donde se aplicaba el metal se humedeció con una solución de Sulfato de Cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración de  $80 \mu\text{M}$ . Cada tratamiento (Ver Tabla 2) se realizó por triplicado y en cada replica se depositaron 25 semillas de tomate empapada en cada solución de los compuestos. Posteriormente, se incubaron bajo condiciones ambientales controladas en una cámara de crecimiento de plantas BIOBASE;  $22/20^\circ\text{C}$  (día / noche), 50% HR (día / noche), en oscuridad, y fueron humectadas con agua destilada esteril o con solución de Sulfato de Cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) cuando fue necesario. Se monitoreó cada placa petri diariamente para registrar el número de semillas germinadas, luego de una semana transcurrido el ensayo todas las semillas germinadas se secaron en una estufa a  $30^\circ\text{C}$  con su radícula emergida y en algunos casos con su primer cotiledón. Los resultados fueron transformados según la metodología de *Marli A. Ranal* [131] obteniendo las variables de germinación, peso seco, tiempo medio de germinación (MT) y tasa de germinación (MR). Los datos obtenidos se analizaron usando la prueba estadística ANOVA con post-hoc Tukey con el programa STATISTICA 7 para establecer diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Diseño experimental de estudio de germinación de semillas de tomate bajo la aplicación de distintos análogos de BRs y aplicación de sulfato de cobre.

| Tratamiento | Solución Agua  |                       | Tratamiento | Solución CuSO <sub>4</sub> 80 μM |                       |
|-------------|----------------|-----------------------|-------------|----------------------------------|-----------------------|
|             | BRs            | Concentración BRs (M) |             | BRs                              | Concentración BRs (M) |
| 1           | <b>1</b>       | 1x10 <sup>-6</sup>    | 1           | <b>1</b>                         | 1x10 <sup>-6</sup>    |
| 2           | <b>1</b>       | 1x10 <sup>-7</sup>    | 2           | <b>1</b>                         | 1x10 <sup>-7</sup>    |
| 3           | <b>1</b>       | 1x10 <sup>-8</sup>    | 3           | <b>1</b>                         | 1x10 <sup>-8</sup>    |
| 4           | <b>26a/26b</b> | 1x10 <sup>-6</sup>    | 4           | <b>26a/26b</b>                   | 1x10 <sup>-6</sup>    |
| 5           | <b>26a/26b</b> | 1x10 <sup>-7</sup>    | 5           | <b>26a/26b</b>                   | 1x10 <sup>-7</sup>    |
| 6           | <b>26a/26b</b> | 1x10 <sup>-8</sup>    | 6           | <b>26a/26b</b>                   | 1x10 <sup>-8</sup>    |
| 7           | <b>27a/27b</b> | 1x10 <sup>-6</sup>    | 7           | <b>27a/27b</b>                   | 1x10 <sup>-6</sup>    |
| 8           | <b>27a/27b</b> | 1x10 <sup>-7</sup>    | 8           | <b>27a/27b</b>                   | 1x10 <sup>-7</sup>    |
| 9           | <b>27a/27b</b> | 1x10 <sup>-8</sup>    | 9           | <b>27a/27b</b>                   | 1x10 <sup>-8</sup>    |
| 10          | <b>35a</b>     | 1x10 <sup>-6</sup>    | 10          | <b>35a</b>                       | 1x10 <sup>-6</sup>    |
| 11          | <b>35a</b>     | 1x10 <sup>-7</sup>    | 11          | <b>35a</b>                       | 1x10 <sup>-7</sup>    |
| 12          | <b>35a</b>     | 1x10 <sup>-8</sup>    | 12          | <b>35a</b>                       | 1x10 <sup>-8</sup>    |
| 13          | Control Agua   |                       | 13          | Control CuSO <sub>4</sub> 80 μM  |                       |

### Reactivos e insumos utilizados en esta investigación

---

Estos reactivos fueron utilizados directamente y sin procesos adicionales de purificación.

**Tabla 3.** Reactivos e insumos utilizados en esta investigación (Número CAS).

| <b>Nombre</b>                            | <b>Marca</b>  | <b>Número CAS</b>     |
|--|---------------|-----------------------|
| Acetato de cobre II                      | Merck         | 142-71-2              |
| Acetato de plomo IV                      | Sigma-Aldrich | 546-67-8              |
| Acetona p.a.                             | Merck         | 67-64-1               |
| Ácido clorhídrico 37%                    | Merck         | 7647-01-0             |
| Ácido hiodeoxicólico                     | Alfa Aesar    | 83-49-8               |
| Ácido p-toluensulfónico                  | Merck         | 104-15-4              |
| Ácido sulfúrico                          | Merck         | 7664-93-9             |
| Anhídrido acético                        | Merck         | 108-24-7              |
| Benceno p.a.                             | Merck         | 71-43-2               |
| Carbonato de potasio                     | Fluka         | 584-08-7              |
| Carbonato monoácido de sodio             | Merck         | 144-55-8              |
| Cloroformiato de etilo                   | Merck         | 541-41-3              |
| Cloroformo p.a.                          | Merck         | 67-66-3               |
| Cloruro de benzoilo                      | Merck         | 98-88-4               |
| Cloruro de metansulfonilo                | Sigma-Aldrich | 124-63-0              |
| TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub>       | Merck         | 105715 (código Merck) |
| Diclorometano p.a.                       | Merck         | 75-09-2               |
| Dimetilfomamida                          | Merck         | 68-12-2               |
| DMAP                                     | Sigma-Aldrich | 1122-58-3             |
| Fosfato monoácido de sodio               | Merck         | 7558-79-4             |
| Ácido meta cloro peroxibenzoico (m-CPBA) | Sigma-Aldrich | 937-14-4              |
| Metanol p.a.                             | Merck         | 67-56-1               |

|   |               |            |
|---|---------------|------------|
| N-Metilmorfolina N-óxido                                    | Sigma-Aldrich | 7529-22-8  |
| Piridina  | Merck         | 110-86-1   |
| Sílica gel para cromatografía en columna (0,040 - 0,063 mm) | Merck         | 7631-86-9  |
| Sulfato de sodio, anh.                                      | Fluka         | 7757-82-6  |
| Cobre(II) sulfato pentahidrato                              | Merck         | 7758-99-8  |
| Sulfato monoácido de potasio                                | Merck         | 7681-38-1  |
| Tetróxido de osmio  | Sigma-Aldrich | 20816-12-0 |
| Tiosulfato de sodio   | Merck         | 7772-98-7  |

### Solventes utilizados como eluyentes en esta investigación

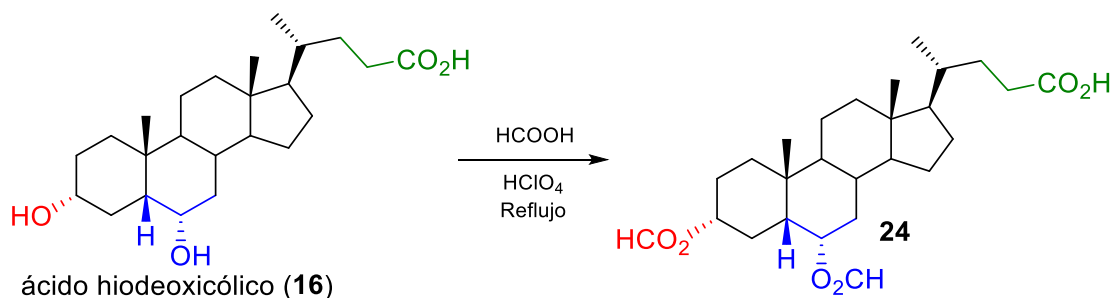
Los solventes grado técnico utilizados para este fin fueron purificados por destilación con columna de fraccionamiento y trampa de humedad, y posteriormente secados con sulfato de sodio anh. o cloruro de calcio anh.

**Tabla 4.** Solventes utilizados como eluyentes en esta investigación.

| Solvente         | Temperatura de captura (°C) |
|------------------|-----------------------------|
| Acetato de etilo | 77                          |
| Diclorometano    | 40                          |
| <i>n</i> -Hexano | 60 - 80                     |
| Metanol          | 64                          |

## Metodologías usadas en la síntesis de los análogos de brasinoesteroides

### Síntesis del ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformal-5 $\beta$ -colan-24-oico **24**.



**Figura 14.** Esquema de síntesis y estructura del compuesto **24**.

En un balón se agregó 2,03 g (5,18 mmol) de Ácido hiodeoxicólico (**16**), 20 mL (529 mmol) de HCOOH 98-100% y 5 gotas de HClO<sub>4</sub> 70-72%. La reacción se dejó a reflujo con agitación a una temperatura de 40 °C por dos horas. Se dejó enfriar por 20 minutos, y se agregó 6,50 mL de Ac<sub>2</sub>O a goteo con agitación, se dejó 20 minutos con agitación. Una vez terminada la reacción se agregó 81 ml de agua, se filtró al vacío. Se realizó un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de EtOAc hasta neutralizar (pH = 7). Una vez neutralizado la fase orgánica, se le agregó MgSO<sub>4</sub> como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8 → 20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo el derivado **24** con un 95% de rendimiento.

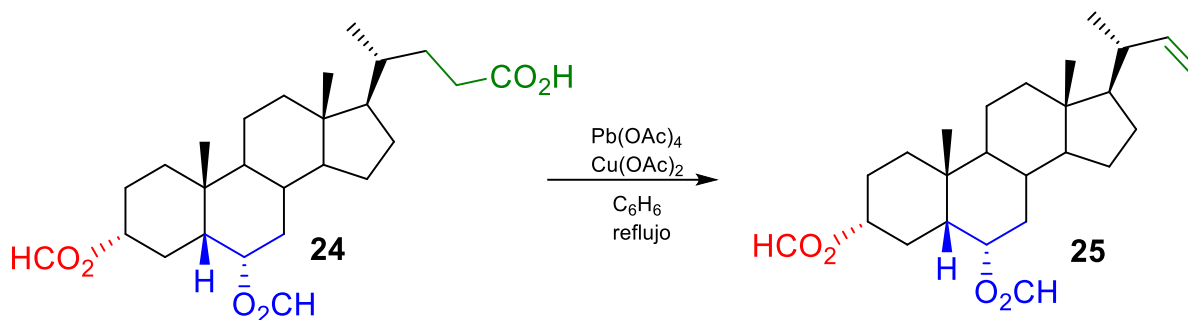
#### Compuesto **24**:

Compuesto de color amarillo claro, goma.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3422(O-H), 2939(C-H), 2869 (C-H), 1742 (C=O), 1723 (C=O). **<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm): 8,04 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C3), 8,01 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C6), 5,30(dt,  $J = 12,0$  y  $5,0$  Hz, 1H, H-6), 4,83 (m, 1H, H-3), 2,40 (m, 2H, H-22), 2,26 (m, 2H, H-23), 0,99 (s, 3H, H-19), 0,92 (d,  $J = 8,0$  Hz, 3H, H-21), 0,65 (s, 3H, H-18).

**$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  (ppm):** (C1) 34,92, (C2) 26,13, (C3) 73,55, (C4) 30,68, (C5) 45,38, (C6) 70,91, (C7) 26,40, (C8) 34,63, (C9) 39,85, (C10) 36,13, (C11) 20,66, (C12) 39,80, (C13) 42,89, (C14) 55,89, (C15) 28,03, (C16) 24,05, (C17) 56,02, (C18) 12,01, (C19) 23,21, (C20) 35,24, (C21) 18,22, (C22) 30,94, (C23) 31,23, (C24) 179,98, (HCO<sub>2</sub>-C3) 160,60, (HCO<sub>2</sub>-C6) 160,51.

**EM m/z (%):** M<sup>+</sup>: 448 (2,5), 403 (28,7), 341 (23,7), 281 (56,7), 207 (66,4), 197 (19,5), 147 (34,8), 135 (77,2), 85 (30,7), 84 (21,7), 83 (52,3), 77 (21,2), 73 (100).

Síntesis de 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-24-nor-5 $\beta$ -23-coleno **25**.

**Figura 15.** Esquema de síntesis y estructura del compuesto **25**.

Se disolvió 1,00 g (2,23 mmol) del compuesto **24** en 50 mL de benceno seco y se reflujo a una temperatura de 90°C y agitación constante. Luego se agregaron 0,20 g (1,10 mmol) de  $\text{Cu(OAc)}_2$ , 10 gotas de piridina y 2,50 g (5,64 mmol) de  $\text{Pb(OAc)}_4$  en proporciones 1:4 cada media hora. El término de la reacción se monitoreó por TLC a una relación del 20% de EtOAc y 80% de hexano, tiempo aproximado de 8 hrs. Una vez termina la reacción se concentró al vacío y se realizó un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de EtOAc. Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó  $\text{MgSO}_4$  como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8  $\rightarrow$  20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo el derivado **25** con un 55% de rendimiento.

**Compuesto 25:**

Compuesto de color blanco, sólido polvo.

**Punto de fusión:** 83-89°C.

**IR v<sub>max</sub>** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3078(C=C-H), 1726 (C=O), 1710 (C=O), 1632 (C=C), 1184 (C-O), 1197 (C-O).

**$^1\text{H RMN}$**   $\delta$  (ppm): 8,01 (s, 1H,  $\text{HCO}_2\text{-C3}$ ), 8,01 (s, 1H,  $\text{HCO}_2\text{-C6}$ ), 5,67 (m, 1H, H-22), 5,31 (dt,  $J = 12,0$  y  $5,0$  Hz, 1H, H-6), 4,88 (dd,  $J = 17,1$  y  $0,8$  Hz, 1H, H-23a) 4,80 (dd,  $J = 10,0$  y  $1,6$ , 1H, H-23b), 4,80 (m, 1H, H-3), 1,00 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H, H-21), 0,98 (s, 3H, H-19), 0,66 (s, 3H, H-18).

**$^{13}\text{C RMN}$**   $\delta$  (ppm): (C1) 34,89, (C2) 26,32, (C3) 73,43, (C4) 31,17, (C5) 45,30, (C6) 70,79, (C7) 26,06, (C8) 34,56, (C9) 39,87, (C10) 36,07, (C11) 20,59, (C12) 39,64, (C13) 42,74, (C14) 55,46,

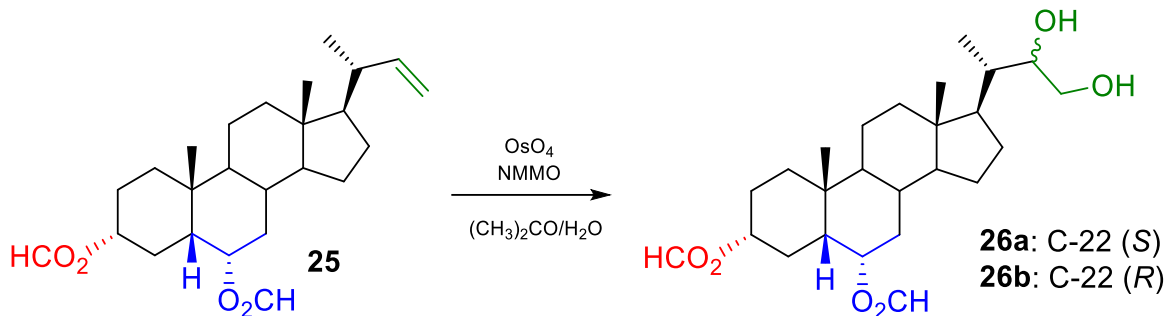
(C15) 28,26, (C16) 24,01, (C17) 56,01, (C18) 12,11, (C19) 23,15, (C20) 41,04, (C21) 20,00, (C22) 144,88, (C23) 111,68, (HCO<sub>2</sub>-C3) 160,44, (HCO<sub>2</sub>-C6) 160,37.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>: 403 (0,16), 402 (0,46), 345 (49,2), 310 (20,5) 256 (21,9 ), 255 (100), 213 (25,9), 159 (23,7), 81 (22,0).

---

**Síntesis de 22(*S/R*), 23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-24-nor-5 $\beta$ -colano **26a/26b**.**


---



**Figura 16.** Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **26a/26b**.

Se disolvieron 2,00 g (4,97 mmol) del compuesto **25** en 40 mL de Acetona. Se agregó una punta de espátula de NMMO, 9 gotas de piridina y 1 mL de OsO<sub>4</sub> 4% (6,25 mL de agua y 0,25 g (0,98 mmol) de OsO<sub>4</sub>) a temperatura ambiente con agitación. El término de la reacción se monitoreó por TLC a una relación del 50% de acetato de etilo y 50% de hexano, tiempo aproximado de 72 hrs. Una vez terminada la reacción se concentró al vacío y se realizó un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de EtOAc. Una vez lavada la fase orgánica, se agregó MgSO<sub>4</sub> como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8 → 20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo la mezcla de epímeros **26a/26b** con un 28% de rendimiento total.

### Compuesto **26a**:

Compuesto de color amarillo, goma.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3433 (O-H), 2942 (C-H), 2868 (C-H), 1723 (C=O), 1704 (C=O).

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm): 8,05 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C3), 8,04 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C6), 5,27(dt,  $J = 12,0$  y  $4,4$  Hz, 1H, H-6), 4,78 (m, 1H, H-3), 3,71 (m, 1H, H-22), 3,58 (dd,  $J = 11,3$  y  $2,4$  Hz, 1H, H-23a), 3,38 (dd,  $J = 11,3$  y  $8,9$  Hz, 1H, H-23b), 1,00 (s, 3H, H-19), 0,92 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H, H-21), 0,70 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$ : (C1) 30,09, (C2) 28,95, (C3) 73,60, (C4) 33,92, (C5) 48,18, (C6) 76,31, (C7) 37,39, (C8) 37,48, (C9) 55,72, (C10) 38,66, (C11) 28,71, (C12) 42,50, (C13) 45,74, (C14) 58,75, (C15)

26,69, (C16) 23,20, (C17) 58,31, (C18) 13,58, (C19) 25,00, (C20) 42,58, (C21) 14,84, (C22) 76,62, (C23) 64,62, (HCO<sub>2</sub>-C3) 163,92, (HCO<sub>2</sub>-C6) 163,78.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>: 437 (0,13), 429 (22,4), 405 (19,5), 358 (26,0), 344 (27,0), 341 (48,7), 331 (19,7), 327 (34,3), 313 (29,1), 312 (100), 297 (30,1), 284 (37,3), 281 (68,2), 282 (20,8), 274 (26,4), 269 (26,0), 259 (24,1), 253 (66,8), 255 (31,4), 254 (28,7), 229 (19,8), 228 (49,9), 214 (30,0), 213 (98,0), 208 (19,8), 207 (95,8), 199 (20,0), 173 (21,8), 171 (23,5), 159 (38,7), 157 (26,3), 147 (47,8), 146 (21,7), 145 (55), 143 (28,3), 135 (43,7), 133 (45,7), 131 (37,5), 121 (24,5), 119 (35,0), 117 (21,3), 109 (20,4), 107 (36,6), 105 (57,6), 95 (40,5), 93 (50,1), 91 (54,7), 81 (55,3), 79 (48,6), 73 (71,6).

### **Compuesto 26b:**

Compuesto de color amarillo, goma.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3433 (O-H), 2942 (C-H), 2868 (C-H), 1723 (C=O), 1704 (C=O).

**<sup>1</sup>H RMN δ** (ppm): 8,05 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C3), 8,04 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C6), 5,27(dt, J = 12,0 y 4,4 Hz, 1H, H-6), 4,78 (m, 1H, H-3), 3,71 (m, 1H, H-22), 3,58 (dd, J = 11,3 y 2,4 Hz, 1H, H-23a), 3,38 (dd, J = 11,3 y 8,9 Hz, 1H, H-23b), 1,00 (s, 3H, H-19), 0,87 (d, J = 6,0 Hz, 3H, H-21), 0,70 (s, 3H, H-18).

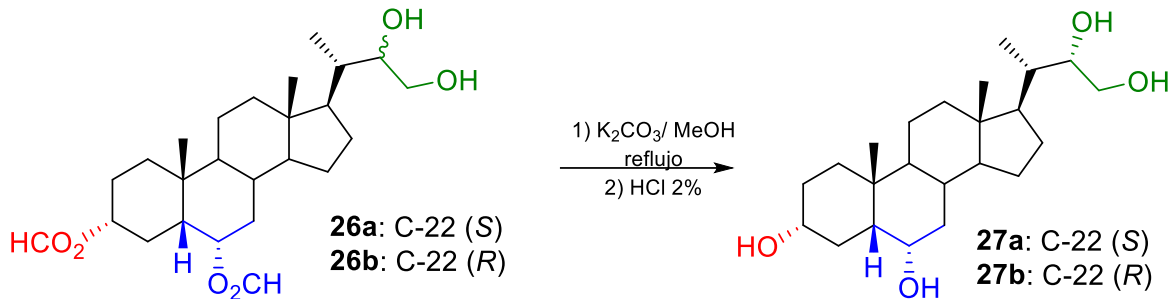
**<sup>13</sup>C RMN δ**: (C1) 32,08, (C2) 28,95, (C3) 73,60, (C4) 33,92, (C5) 55,05, (C6) 76,31, (C7) 37,39, (C8) 37,48, (C9) 55,05, (C10) 40,10, (C11) 28,71, (C12) 42,50, (C13) 45,26, (C14) 58,75, (C15) 26,69, (C16) 23,20, (C17) 58,31, (C18) 13,58, (C19) 25,00, (C20) 43,44, (C21) 14,84, (C22) 76,62, (C23) 64,62, (HCO<sub>2</sub>-C3) 163,92, (HCO<sub>2</sub>-C6) 163,78.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>: 437 (0,13), 429 (22,4), 405 (19,5), 358 (26,0), 344 (27,0), 341 (48,7), 331 (19,7), 327 (34,3), 313 (29,1), 312 (100), 297 (30,1), 284 (37,3), 281 (68,2), 282 (20,8), 274 (26,4), 269 (26,0), 259 (24,1), 253 (66,8), 255 (31,4), 254 (28,7), 229 (19,8), 228 (49,9), 214 (30,0), 213 (98,0), 208 (19,8), 207 (95,8), 199 (20,0), 173 (21,8), 171 (23,5), 159 (38,7), 157 (26,3), 147 (47,8), 146 (21,7), 145 (55), 143 (28,3), 135 (43,7), 133 (45,7), 131 (37,5), 121 (24,5), 119 (35,0), 117 (21,3), 109 (20,4), 107 (36,6), 105 (57,6), 95 (40,5), 93 (50,1), 91 (54,7), 81 (55,3), 79 (48,6), 73 (71,6).

---

**Síntesis de 3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 22 (S/R), 23-Tetrahydroxi-24-nor-5 $\beta$ -colano 27a/27b**


---



**Figura 17.** Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **27a/27b**.

Se disolvió 1,00 g (2,29 mmol) de la mezcla de epímeros **26a/26b** en 150 mL de CH<sub>3</sub>OH. Se agregaron 15 mL de una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% (5,00 g (36,18mmol) en 100 mL de agua), y se dejó reaccionar a reflujo durante 1 hr, con agitación constante. La reacción se dejó enfriar y se concentró a semi-sequedad. Una vez concentrado y enfriado, se agregó una solución de HCl 2% (1 mL de HCl concentrado en 20 mL de agua), y se realizó un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de EtOAc hasta neutralizar (pH = 7). Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó MgSO<sub>4</sub> como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8 → 20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo la mezcla de epímeros **27a/27b** con un 89,9% de rendimiento.

### Compuesto 27a:

Compuesto color blanco, sólido polvo.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3376 (O-H), 2937 (C-H), 2887 (C-H), 2863 (C-H).

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm): 4,01 (dt,  $J = 12,0$  y  $4,7$  Hz, 1H, H-6), 3,72 (m, 1H, H-22), 3,61 (dd,  $J = 11,4$  y  $2,6$  Hz, 1H, H-23a), 3,50 (m, 1H, H-3), 3,40 (dd,  $J = 11,4$  y  $8,9$  Hz, 1H, H-23b), 0,93 (s, 3H, H-19), 0,94 (d,  $J = 5,4$  Hz, 3H, H-21), 0,70 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm): (C1) 36,57, (C2) 30,09, (C3) 73,38, (C4) 32,13, (C5) 54,73, (C6) 69,64, (C7) 42,31, (C8) 37,25, (C9) 55,43, (C10) 37,93, (C11) 22,91, (C12) 37,79, (C13) 45,31, (C14) 58,71, (C15) 26,42, (C16) 30,99, (C17) 58,26, (C18) 13,19, (C19) 25,07, (C20) 43,03, (C21) 14,44, (C22) 76,25, (C23) 64,20.

**EM m/z** (%): M<sup>+</sup>: 381 (0,07), 284 (24,3), 117 (100), 116 (25,7).

**Compuesto 27b:**

Compuesto color blanco, sólido polvo.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3376 (O-H), 2937 (C-H), 2887 (C-H), 2863 (C-H).

**<sup>1</sup>H RMN δ** (ppm): 4,01 (dt, *J* = 12,0 y 4,7 Hz, 1H, H-6), 3,72 (m, 1H, H-22), 3,61 (dd, *J* = 11,4 y 2,6 Hz, 1H, H-23a), 3,50 (m, 1H, H-3), 3,40 (dd, *J* = 11,4 y 8,9 Hz, 1H, H-23b), 0,95 (s, 3H, H-19), 0,89 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H, H-21), 0,71 (s, 3H, H-18).

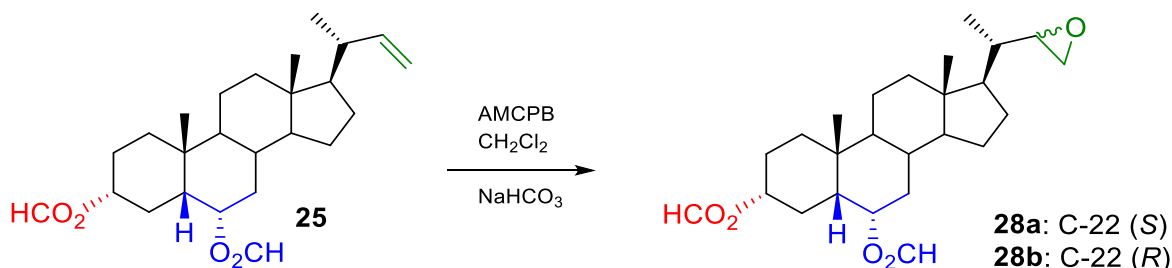
**<sup>13</sup>C RMN δ** (ppm): (C1) 36,57, (C2) 30,09, (C3) 73,38, (C4) 32,13, (C5) 45,31, (C6) 69,64, (C7) 42,48, (C8) 39,75, (C9) 54,73, (C10) 37,93, (C11) 22,91, (C12) 37,79, (C13) 45,31, (C14) 58,71, (C15) 26,26, (C16) 29,72, (C17) 58,26, (C18) 13,36, (C19) 25,07, (C20) 42,48, (C21) 13,41, (C22) 75,50, (C23) 66,56.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>: 381 (0,07), 284 (24,3), 117 (100), 116 (25,7).

---

**Síntesis de 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformal-22(*S/R*), 23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano **28a/28b****


---



**Figura 18.** Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **28a/28b**.

Se disolvió 0,50 g (1,24 mmol) del alqueno **25** en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se agregaron 0,21 g (1,24 mmol) de mCPBA y 2,5 mg (0,029 mmol) de  $\text{NaHCO}_3$ . El término de la reacción se monitoreó por TLC a una relación del 30% de acetato de etilo y 70% de hexano, tiempo aproximado de 72 hrs. Una vez termina la reacción se concentra al vacío y se lava con 50 mL de agua y 50 mL de EtOAc, al lavado se agrega  $\text{NaHCO}_3$  para neutralizar (pH = 7). Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó  $\text{MgSO}_4$  como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8  $\rightarrow$  20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo la mezcla de epímeros **28a/28b** con un 94% de rendimiento.

### Compuesto **28a**:

Compuesto transparente, goma.

**IR  $\nu_{\text{max}}$**  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2954 (C-H), 2890 (C-H), 2867 (C-H), 1727 (C=O), 1712 (C=O).

**$^1\text{H RMN}$**   $\delta$  (ppm): 8,03 (s, 1H,  $\text{HCO}_2\text{-C3}$ ), 8,01 (s, 1H,  $\text{HCO}_2\text{-C6}$ ), 5,30 (dt,  $J = 11,9$  y 5,6 Hz, 1H, H-6), 4,83 (m, 1H, H-3), 2,66 (dd,  $J = 4,4$  y 4,4 Hz, 1H, H-23 $\beta$ ), 2,62 (m, 1H, H-22), 2,40 (m, 2H, H-23 $\alpha$ ), 1,00 (s, 3H, H-19), 0,95 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H, H-21), 0,64 (s, 3H, H-18).

**$^{13}\text{C RMN}$**   $\delta$  (ppm): (C1) 34,92, (C2) 26,38, (C3) 73,49, (C4) 44,76, (C5) 55,63, (C6) 70,81, (C7) 39,65, (C8) 34,65, (C9) 53,78, (C10) 36,14, (C11) 20,64, (C12) 39,97, (C13) 43,08, (C14) 57,05, (C15) 24,30, (C16) 26,89, (C17) 45,36, (C18) 12,15, (C19) 23,20, (C20) 39,51, (C21) 15,60, (C22) 56,05, (C23) 49,03, ( $\text{HCO}_2\text{-C3}$ ) 160,51, ( $\text{HCO}_2\text{-C6}$ ) 160,44.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>: 418 (1,8), 343 (28,9), 342 (69,0), 341 (45,2), 327 (48,0), 296 (49,1), 282 (26,9), 281 (99,5), 254 (27,8), 253 (71,9), 227 (38,6), 213 (35,0), 208 (21,2), 206 (100), 185 (30,3), 171 (20,3), 159 (27,4), 157 (22,5), 147 (41,4), 145 (38,4), 143 (23,8), 135 (38,9), 133 (37,2), 131 (30,1), 121 (20,4), 119 (32,6), 117 (35,8), 107 (29,8), 105 (48,4), 95 (36,7), 93 (41,2), 91 (49,8), 82 (31,0), 81 (36,5), 79 (39,6), 73 (66,3).

**Compuesto 28b:**

Compuesto transparente, goma.

**IR vmax** (cm<sup>-1</sup>): 2954 (C-H), 2890 (C-H), 2867 (C-H), 1727 (C=O), 1712 (C=O).

**<sup>1</sup>H RMN δ** (ppm): 8,03 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C3), 8,01 (s, 1H, HCO<sub>2</sub>-C6), 5,30 (dt, *J* = 11,9 y 5,6 Hz, 1H, H-6), 4,83 (m, 1H, H-3), 2,80 (dd, *J* = 4,3 y 4,3 Hz, 1H, H-23β), 2,73 (m, 1H, H-22), 2,58 (m, 1H, H-23α), 1,00 (s, 3H, H-19), 0,95 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, H-21), 0,64 (s, 3H, H-18).

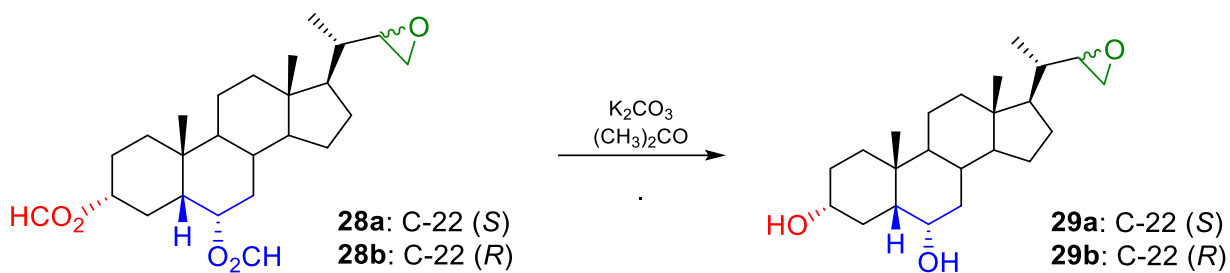
**<sup>13</sup>C RMN δ** (ppm): (C1) 34,92, (C2) 26,13, (C3) 73,49, (C4) 31,23, (C5) 53,96, (C6) 70,81, (C7) 39,65, (C8) 34,65, (C9) 53,78, (C10) 36,14, (C11) 20,61, (C12) 39,94, (C13) 43,15, (C14) 57,31, (C15) 24,16, (C16) 27,18, (C17) 45,36, (C18) 12,10, (C19) 23,20, (C20) 39,51, (C21) 16,89, (C22) 55,67, (C23) 49,03, (HCO<sub>2</sub>-CC3) 160,51, (HCO<sub>2</sub>-C6) 160,44.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>: 418 (1,8), 343 (28,9), 342 (69,0), 341 (45,2), 327 (48,0), 296 (49,1), 282 (26,9), 281 (99,5), 254 (27,8), 253 (71,9), 227 (38,6), 213 (35,0), 208 (21,2), 206 (100), 185 (30,3), 171 (20,3), 159 (27,4), 157 (22,5), 147 (41,4), 145 (38,4), 143 (23,8), 135 (38,9), 133 (37,2), 131 (30,1), 121 (20,4), 119 (32,6), 117 (35,8), 107 (29,8), 105 (48,4), 95 (36,7), 93 (41,2), 91 (49,8), 82 (31,0), 81 (36,5), 79 (39,6) 73 (66,3).

---

**Síntesis de 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-22 (*S/R*), 23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano **29a/29b**.**


---



**Figura 19.** Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **29a/29b**.

Se disolvió 0,70 g (1,92 mmol) de la mezcla de epímeros **28a/28b** en 34,7 mL de CH<sub>3</sub>OH y se agregó 15 mL de una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% (5,00 g (36,18mmol) en 100 mL de agua) a temperatura ambiente por 1,5 h. El término de la reacción se monitoreó por TLC a una relación del 50% de acetato de etilo y 50% de hexano. La reacción se dejó enfriar y se concentró a semi-sequedad. Una vez concentrado y enfriado se agregaron 20 gotas de una solución de HCl 2% (1 mL de HCl concentrado en 20 mL de agua) y se realizó un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de acetato de etilo hasta neutralizar (pH=7). Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó MgSO<sub>4</sub> como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8 → 20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo la mezcla de epímeros **29a/29b** con un 93% de rendimiento.

### Compuesto 29a:

Compuesto transparente, goma.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3394 (O-H), 2937 (C-H), 2866 (C-H).

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm): 4,05 (dt,  $J = 11,3$  y  $5,3$  Hz, 1H, H-6), 3,62 (m, 1H, H-3), 2,66 (t,  $J = 4,5$  Hz, 1H, H-23 $\beta$ ), 2,61 (m, 1H, H-22), 2,40 (m, 1H, H-23 $\alpha$ ), 2,40 (m, 1H, H-17), 0,95 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H, H-21), 0,90 (s, 3H, H-19), 0,64 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm): (C1) 35,54, (C2) 26,94, (C3) 71,54, (C4) 30,22, (C5) 53,96, (C6) 68,00, (C7) 39,69, (C8) 34,84, (C9) 38,49, (C10) 35,95, (C11) 20,68, (C12) 39,88, (C13) 43,05, (C14) 57,10,

(C15) 24,42, (C16) 29,16, (C17) 48,38, (C18) 12,11, (C19) 23,44, (C20) 39,61, (C21) 15,55, (C22) 56,05, (C23) 50,00.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>:362 (0,91), 344 (60,6), 329 (49,0), 326 (43,3), 311 (35,5), 272 (26,39), 271 (23,6), 255 (25,0), 253 (30,3), 246 (38,5), 232 (26,5), 231 (66,2), 229 (22,1), 228 (40,8), 227 (23,6), 215(23,1), 214 ( 32,2) 213 (100), 211 (27,7), 199 (31,8), 187 (23,3), 185 (25,8), 173 (39,0), 172 (21,4), 171 (31,4), 161 (31,0), 160 (22,0), 159 (45,3), 157 (36,4), 147 (49,4), 146 (22,6), 145 (56,3), 143 (29,0), 135 (30,1), 134 ( 20,2), 133 (46,6), 131 (46,3), 121 (36,3), 119 (46,1), 117 (20,7), 109 (28,8), 108 (20,4), 107 (4,9), 105 (60,8), 95 (91,0), 94 (28,3), 93 (64,8), 91 (53,9), 81 (70,1), 79 (65,5).

### **Compuesto 29b:**

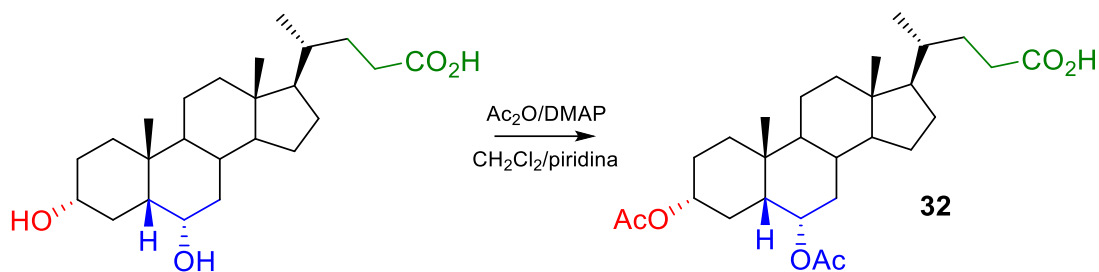
Compuesto transparente, goma.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3394 (O-H), 2937 (C-H), 2866 (C-H).

**<sup>1</sup>H RMN δ** (ppm): 4,05 (dt, *J* = 11,3 y 5,3 Hz, 1H, H-6), 3,62 (m, 1H, H-3), 2,79 (dd, *J* = 4,3 y 4,3 Hz, 1H, H-23β), 2,73 (m, 1H, H-22), 2,58 (m, 1H, H-23α), 2,40 (m, 1H, H-17), 0,95 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H, H-21), 0,90 (s, 3H, H-19), 0,64 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN δ** (ppm): (C1) 34,99, (C2) 27,23, (C3) 71,54, (C4) 30,22, (C5) 55,73, (C6) 68,00, (C7) 39,78, (C8) 34,84, (C9) 38,49, (C10) 35,95, (C11) 20,68, (C12) 39,88, (C13) 43,05, (C14) 57,41, (C15) 24,29, (C16) 29,19, (C17) 48,38, (C18) 12,16, (C19) 23,44, (C20) 39,61, (C21) 17,00, (C22) 55,76, (C23) 50,00.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>:362 (0,91), 344 (60,6), 329 (49,0), 326 (43,3), 311 (35,5), 272 (26,39), 271 (23,6), 255 (25,0), 253 (30,3), 246 (38,5), 232 (26,5), 231 (66,2), 229 (22,1), 228 (40,8), 227 (23,6), 215(23,1), 214 ( 32,2) 213 (100), 211 (27,7), 199 (31,8), 187 (23,3), 185 (25,8), 173 (39,0), 172 (21,4), 171 (31,4), 161 (31,0), 160 (22,0), 159 (45,3), 157 (36,4), 147 (49,4), 146 (22,6), 145 (56,3), 143 (29,0), 135 (30,1), 134 ( 20,2), 133 (46,6), 131 (46,3), 121 (36,3), 119 (46,1), 117 (20,7), 109 (28,8), 108 (20,4), 107 (4,9), 105 (60,8), 95 (91,0), 94 (28,3), 93 (64,8), 91 (53,9), 81 (70,1), 79 (65,5).

Síntesis del ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Acetil-5 $\beta$ -colan-24-oico **32**ácido hideoxicólico (**16**)**Figura 20.** Esquema de síntesis y estructura del compuesto **32**.

Se disolvieron 1,04 g (2,65 mmol) de ácido hideoxicólico (**16**) en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente y con agitación constante. Una vez disuelto se agregaron 3 gotas de piridina, una punta de espátula de DMAP y 0,37 mL (3,36 mmol) de Ac<sub>2</sub>O (en exceso). El término de la reacción se monitoreó por TLC a una relación del 20% de acetato de etilo y 80% de hexano, tiempo aproximado de 24 hrs. Una vez terminada, se filtró al vacío y se realizó un lavado con agua y EtOAc, se neutralizó con una solución de HCl 2%. Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó MgSO<sub>4</sub> como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8 → 20,0:0,0) agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo el producto **32** con un 81% de rendimiento.

**Compuesto 32:**

Compuesto de color blanco, sólido polvo.

**Punto de fusión:** 107-111°C.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 3525 (O-H), 2949 (C-H), 2868 (C-H), 1722 (C=O), 1680 (C=O).

**<sup>1</sup>H RMN** δ (ppm): 5,12 (dt, *J* = 11,9 y 4,5 Hz, 1H, H-6), 4,68 (m, 1H, H-3), 2,37 (m, 1H, H-22), 2,23 (m, 2H, H-23), 2,02 (s, 3H, AcO-C6), 1,99 (s, 3H, AcO-C3), 0,97 (s, 3H, H-19), 0,90 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, H-21), 0,64 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** δ: (C1) 31,20, (C2) 26,15, (C3) 73,66, (C4) 28,01, (C5) 45,27, (C6) 70,92, (C7) 34,54, (C8) 35,18, (C9) 45,28, (C10) 35,97, (C11) 20,61, (C12) 34,95, (C13) 42,81, (C14) 56,06 (C15)

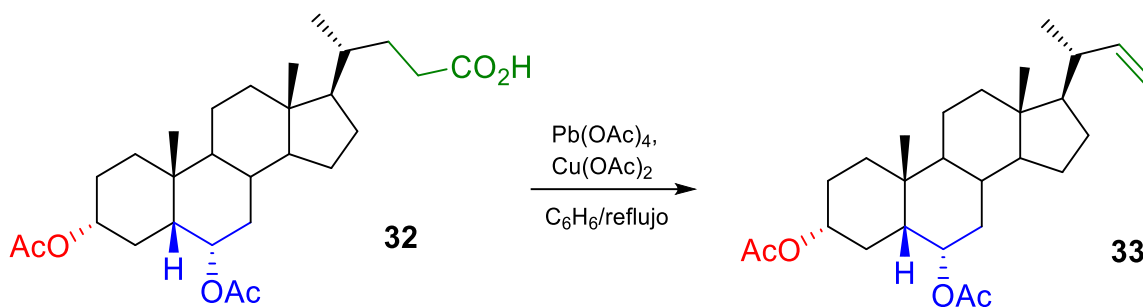
24,00, (C16) 26,35, (C17) 55,84, (C18) 11,94, (C19) 23,19, (C20) 35,18, (C21) 18,16, (C22) 30,93, (C23) 30,64, (C24) 180,09, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 21,32, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 170,55, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 21,36, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 170,52.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>:476 (0,74), 429 (20,7), 341 (29,3), 327 (28,3), 281 (66,7), 253 (37,7), 207 (100) 147 (24,1), 135 (26,9).

---

**Síntesis del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -23-coleno 33**


---



**Figura 21.** Esquema de síntesis y estructura del compuesto 33.

Se disolvió 1,00 g (2,10 mmol) de **32** en 50 mL de benceno seco a reflujo a una temperatura de 90°C y con agitación constante. Luego se agregó 0,20 g (1,10 mmol) de  $\text{Cu(OAc)}_2$ , 10 gotas de piridina y 2,50 g (5,64 mmol) de  $\text{Pb(OAc)}_4$  en proporciones 1:4 cada media hora. El término de la reacción se monitoreó por TLC a una relación del 20% de acetato de etilo y 80% de hexano, tiempo aproximado de 8 hrs. Una vez termina la reacción se concentró al vacío y se realizó un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de EtOA. Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó  $\text{MgSO}_4$  como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8  $\rightarrow$  20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo el derivado **33** con un 55% de rendimiento.

**Compuesto 33:**

Compuesto de color blanco, sólido polvo.

**Punto de fusión:** 94-100°C.

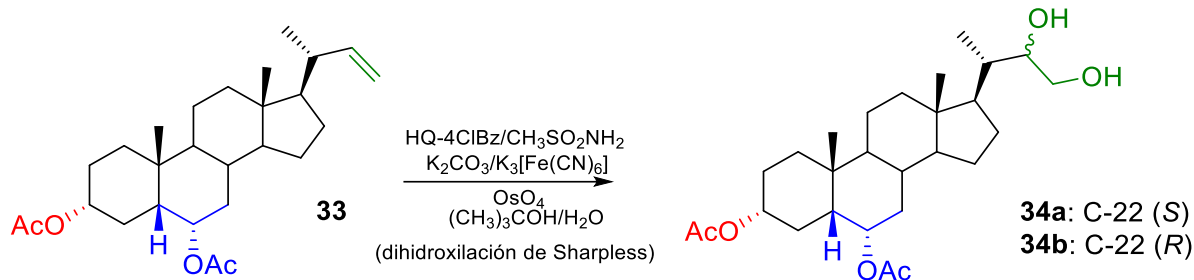
**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 1638 (C=C), 1740 (C=O), 1729 (C=O), 1258 (C-O), 1245 (C-O).

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm): 5,65 (m, 1H, H-22), 5,14 (dt,  $J = 12,1$  y  $4,8$  Hz, 1H, H-6), 4,90 (dd,  $J = 17,0$  y  $1,7$  Hz, 1H, H-23a), 4,82 (dd,  $J = 10,3$  y  $1,7$  Hz, 1H, H-23b), 4,70 (m, 1H, H-3), 2,04 (s, 3H, AcO-C6), 2,01 (s, 3H, AcO-C3), 1,02 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H, H-21), 0,98 (s, 3H, H-19), , 0,67 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm): (C1) 31,30, (C2) 26,44, (C3) 73,69, (C4) 26,25, (C5) 39,93, (C6) 70,95, (C7) 35,05, (C8) 34,63, (C9) 45,39, (C10) 36,07, (C11) 20,67, (C12) 39,80, (C13) 42,82, (C14) 56,21, (C15) 24,09, (C16) 28,36, (C17) 55,59, (C18) 12,18, (C19) 23,27, (C20) 41,13 (C21) 20,07, (C22)

145,06, (C23) 111,69, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 21,37, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 170,47, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 21,41, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 170,47.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>: 430 (1,59), 373 (31,24), 355 (24,1), 313 (46,5), 296 (20,1), 295 (80,1), 254 (21,5), 253 (100).

Síntesis de 22 (*S/R*), 23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano **34a/34b**

**Figura 22.** Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **34a/34b**.

Se disolvieron 0,25 g (0,58 mmol) del producto **33** en una solución de 22 mL de *t*-butanol y agua 1:1 v/v (11 mL *t*-butanol y 11 mL agua) en agitación a temperatura ambiente. Se agregaron 0,08 g (0,17 mmol) de 4-cloro-benzoato de hidroquinidina, 0,12 g (1,22 mmol) de metafulfamida, 0,50 g (3,65 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0,86 g (2,61 mmol) de ferrocianuro de potasio y 0,36 mL de solución de  $\text{OsO}_4$  en *t*-butanol (1,0 g por cada 20 mL (0,039 mmol)) se dejó en agitación suave por 1,5 hrs. Se monitorea por TLC a una relación del 50% de acetato de etilo y 50% de hexano. Una vez terminada la reacción se agrega tiosulfato de sodio saturado disuelto en agua y se deja agitando por 30 minutos. Se concentra al vacío y se realiza un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de EtOAc. Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó  $\text{MgSO}_4$  como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Hexano/Acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente (0,2:19,8  $\rightarrow$  20,0:0,0), agregando de 20 mL cada vez. Se obtuvo la mezcla de epímeros de **34a/34b** con un 95% de rendimiento.

#### Compuesto **34a**:

Compuesto de color blanco, sólido polvo.

**IR v<sub>max</sub>** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3446 (O-H), 2934 (C-H), 2870 (C-H), 1737 (C=O), 1717 (C=O).

**$^1\text{H RMN}$**   $\delta$  (ppm): 5,14 (dt,  $J = 11,5$  y  $5,3$  Hz, 1H, H-6), 4,70 (m, 1H, H-3), 3,80 (m, 1H, H-22), 3,63 (dd,  $J = 9,9$  y  $9,9$  Hz, 1H, H-23a), 3,51 (dd,  $J = 9,1$  y  $9,1$  Hz, 1H, H-23b), 2,04 (s, 3H, AcO-C6), 2,01 (s, 3H, AcO-C3), 0,97 (s, 3H, H-19), 0,94 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H, H-21), 0,66 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN δ (ppm):** (C1) 31,25, (C2) 27,78, (C3) 73,64, (C4) 26,22, (C5) 45,37, (C6) 70,87, (C7) 35,01, (C8) 34,68, (C9) 45,32, (C10) 36,04, (C11) 20,67, (C12) 39,89, (C13) 42,72, (C14) 56,04, (C15) 24,17, (C16) 26,41, (C17) 55,78, (C18) 11,75, (C19) 24,02, (C20) 45,37, (C21) 12,62, (C22) 74,11, (C23) 62,47, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 21,40, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 170,52, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 21,37, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 170,49.

**EM m/z (%):** M<sup>+</sup>: 464,9 (0,09), 313 (25,6), 312 (100), 213 (21,7).

### **Compuesto 34b:**

Compuesto de color blanco, sólido polvo.

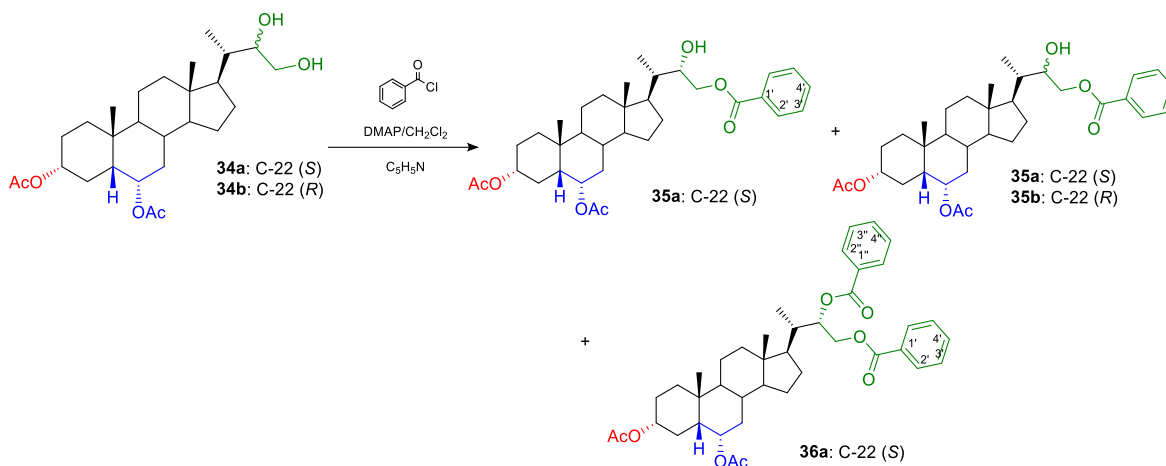
**IR ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3446 (O-H), 2934 (C-H), 2870 (C-H), 1737 (C=O), 1717 (C=O).

**<sup>1</sup>H RMN δ (ppm):** 5,14 (dt, *J* = 11,5 y 5,3 Hz, 1H, H-6), 4,70 (m, 1H, H-3), 3,80 (m, 2H, H-22), 3,63 (dd, *J* = 9,9 y 9,9 Hz, 1H, H-23a), 3,51 (dd, *J* = 9,1 y 9,1 Hz, 1H, H-23b), 2,04 (s, 3H, AcO-C6), 2,01 (s, 3H, AcO-C3), 0,97 (s, 3H, H-19), 0,90 (d, *J* = 5,7 Hz, 3H, H-21), 0,66 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN δ (ppm):** (C1) 31,25, (C2) 27,54 (C3) 73,64, (C4) 26,22, (C5) 45,37, (C6) 70,93, (C7) 35,01, (C8) 34,68, (C9) 45,32, (C10) 36,01, (C11) 20,67, (C12) 39,82, (C13) 40,10, (C14) 56,04, (C15) 24,17, (C16) 26,41, (C17) 55,78, (C18) 11,87, (C19) 24,01, (C20) 45,37, (C21) 13,01, (C22) 73,88, (C23) 66,04, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 21,40, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 170,52, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 21,37, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 170,49.

**EM m/z (%):** M<sup>+</sup>: 464,9 (0,09), 313 (25,6), 312 (100), 213 (21,7).

Síntesis de los compuestos 22 (*S*)-hidroxi-23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano **35a**, 22 (*R*)-hidroxi-23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano **35b** y 22 (*S*),23-dibenzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano **36a**.



**Figura 23.** Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **35a**, **35b** y **36a**.

Se disolvieron 500 mg (1,08 mmol) de la mezcla de epímeros de **34a/34b** en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y se agregaron 1,4 mL de cloruro de benzoilo (12,06 mmol), dos gotas de piridina y una punta de espátula de DMAP, se dejó en agitación a temperatura ambiente. El término de la reacción se monitoreó por TLC a una relación del 50% de EtOAc y 50% de hexano, después de 7 hrs se agregaron 1,4 mL de cloruro de benzoilo (12,06 mmol) y dos gotas de piridina y el tiempo de reacción total fue de 36 hrs. Una vez terminada la reacción se filtró al vacío y se realizó un lavado con 50 mL de agua y 50 mL de acetato de etilo y se agregó bicarbonato de sodio para neutralizar (pH = 7). Una vez lavada la fase orgánica, se le agregó  $\text{MgSO}_4$  como desecante, se filtró y concentró. El producto se disolvió con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) y posteriormente separado por columna cromatografía, utilizando una mezcla de Acetato de etilo/Hexano en de polaridad creciente (0,5:35,0  $\rightarrow$  40,0:0,0), agregando porciones de 40 mL. Se obtuvieron las siguientes fracciones. Fracción I: 65,7 mg (9,1 %) del compuesto **36a**. Fracción II: 527 mg (86,2 %) de la mezcla de epímeros **35a/35b**. Fracción III: 68,9 mg (11,3 %) del compuesto **35a**.

#### Compuesto 35a:

Compuesto de color blanco, sólido polvo.

**Punto de fusión:** 130-136°C.

**IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3523 (O-H), 2942 (C-H), 2890 (C-H), 2866 (C-O), 1735 (C=O), 1716 (C=O), 1276 (OCOAr).

**<sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm):** 8,05 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H, HAr-2'), 7,58 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H, HAr- 4'), 7,45 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H, HAr-3'), 5,15 (dt,  $J = 11,4$  y 5,3 Hz, 1H, H-6), 4,70 (m, 1H, H-3), 4,48 (dd,  $J = 11,4$  y 2,0 Hz, 1H, H-23a), 4,21 (dd,  $J = 11,4$  y 10,2, 1H, H-23b), 4,07 (dd,  $J = 3,4$  y 2,0 Hz, 1H, H-22), 2,02 (s, 3H, AcO-C3), 2,01 (s, 3H, AcO-C6), 1,04 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H, H-21), 0,98 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN  $\delta$  (ppm):** (C1) 31,26, (C2) 27,56, (C3) 73,63, (C4) 26,42, (C5) 39,81, (C6) 70,87, (C7) 39,86, (C8) 38,40, (C9) 45,34, (C10) 36,03, (C11) 20,66, (C12) 35,02, (C13) 43,29, (C14) 53,06, (C15) 26,23, (C16) 24,18, (C17) 55,78, (C18) 11,80, (C19) 23,24, (C20) 40,34, (C21) 12,90, (C22) 71,79, (C23) 68,95, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 21,40, (CH<sub>3</sub>CO-C3), 170,50, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 21,36, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 170,45 (CH<sub>3</sub>CO-C-3), 166,99 (CO-Ar), 129,90 (C1'- Ar), 129,62 (C2'-Ar), 128,42 (C3'-Ar), 133,17 (C4'-Ar).

**EM m/z (%):** M<sup>+</sup>: 568, 327 (32,4), 326 (100), 213 (29,6), 207 (26,1), 145 (19,0), 133 (19,1).

**Compuesto 35b:**

**<sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm):** 8,05 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H, HAr-2'), 7,58 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H, HAr- 4'), 7,45 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H, HAr-3'), 5,15 (dt,  $J = 11,4$  y 5,3 Hz, 1H, H-6), 4,70 (m, 1H, H-3), 4,39 (dd,  $J = 11,3$  y 8,4 Hz, 1H, H-23a), 4,26 (dd,  $J = 11,4$  y 3,3 Hz, 1H, H-23b), 4,05 (dd,  $J = 4,0$  y 3,3 Hz, 1H, H-22), 2,05 (s, 3H, AcO-C3), 2,02 (s, 3H, AcO-C6), 1,00 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H, H-21), 0,98 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN  $\delta$  (ppm):** (C1) 31,26, (C2) 27,56, (C3) 73,63, (C4) 26,42, (C5) 39,81, (C6) 70,87, (C7) 39,86, (C8) 38,40, (C9) 45,34 (C10) 36,03, (C11) 20,66, (C12) 35,02, (C13) 43,29, (C14) 53,06, (C15) 26,23, (C16) 24,18, (C17) 55,78, (C18) 11,90, (C19) 23,24, (C20) 40,34, (C21) 12,39, (C22) 71,89, (C23) 68,88, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 21,40, (CH<sub>3</sub>CO-C3), 170,52 (CH<sub>3</sub>CO-C3), 21,36 (CH<sub>3</sub>CO-C3) 170,45 (CH<sub>3</sub>CO-C-3), 166,68 (CO-Ar), 129,88 (C1'- Ar), 129,62 (C2'-Ar), 128,36 (C3'-Ar), 133,08 (C4'-Ar).

**Compuesto 36a:**

Compuesto de color blanco, sólido polvo.

**Punto de fusión:** 119-125°C.

**IR v<sub>max</sub>** (cm<sup>-1</sup>): 2946 (C-H), 2870 (C-H), 1282 (C-O), 1249 (C-O), 1723 (C=O), 1723 (C=O), 1283 (OCOAr), 1263 (OCOAr).

**<sup>1</sup>H RMN δ** (ppm): 8,06 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, HAr-2'), 7,97 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, HAr-2''), 7,56 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, HAr-4'), 7,52 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, HAr-4''), 7,44 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, HAr-3'), 7,38 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, HAr-3''), 5,56 (da, *J* = 9,1 Hz, 1H, H-22), 5,16 (dt, *J* = 11,4 y 5,3 Hz, 1H, H-6), 4,71 (m, 1H, H-3), 4,64 (d, *J* = 11,8, 1H, H-23a), 4,50 (dd, *J* = 11,8 y 9,3 Hz, 1H, H-23b), 2,05 (s, 3H, AcO-C6), 2,02 (s, 3H, AcO-C3), 1,13 (d, *J* = 6,0-Hz, 3H, H-21), 0,98 (s, 3H, H-19), 0,69 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN δ** (ppm): (C1) 31,28, (C2) 27,41, (C3) 73,64, (C4) 26,45, (C5) 45,35, (C6) 70,87, (C7) 39,86, (C8) 38,60, (C9) 53,12, (C10) 36,03, (C11) 20,69, (C12) 34,67, (C13) 43,40, (C14) 55,82, (C15) 26,25, (C16) 24,21, (C17) 55,82, (C18) 11,88, (C19) 23,25, (C20) 35,05, (C21) 13,76, (C22) 74,67, (C23) 63,00, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 21,42, (CH<sub>3</sub>CO-C3) 170,50, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 21,37, (CH<sub>3</sub>CO-C6) 170,45, 166,61 (CO-Ar'), 165,91 (CO-Ar''), (C1'-Ar) 129,81, (C1''-Ar) 130,38 (C2'-Ar) 129,62, (C2''-Ar) 129,65, (C3'-Ar) 128,37, (C3''-Ar) 128,35 (C4'-Ar) 133,04, (C4''-Ar) 132,98.

**EM m/z (%)**: M<sup>+</sup>:673, 327 (26,0), 326 (100), 213 (33,3), 145 (22,2), 105 (20,4), 81 (19,1).

## **CAPITULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIONES**

---

## Resultados y discusiones de la síntesis de los análogos de brasinoesteroides

---

Las estrategias de síntesis fueron desarrolladas de acuerdo con lo indicado en los Esquema 1 Esquema 2 Esquema 3, donde la primera etapa consistió en la protección de los grupos hidroxilos en las posiciones C-3 y C-6 del ácido hiodesoxicólico (**16**).

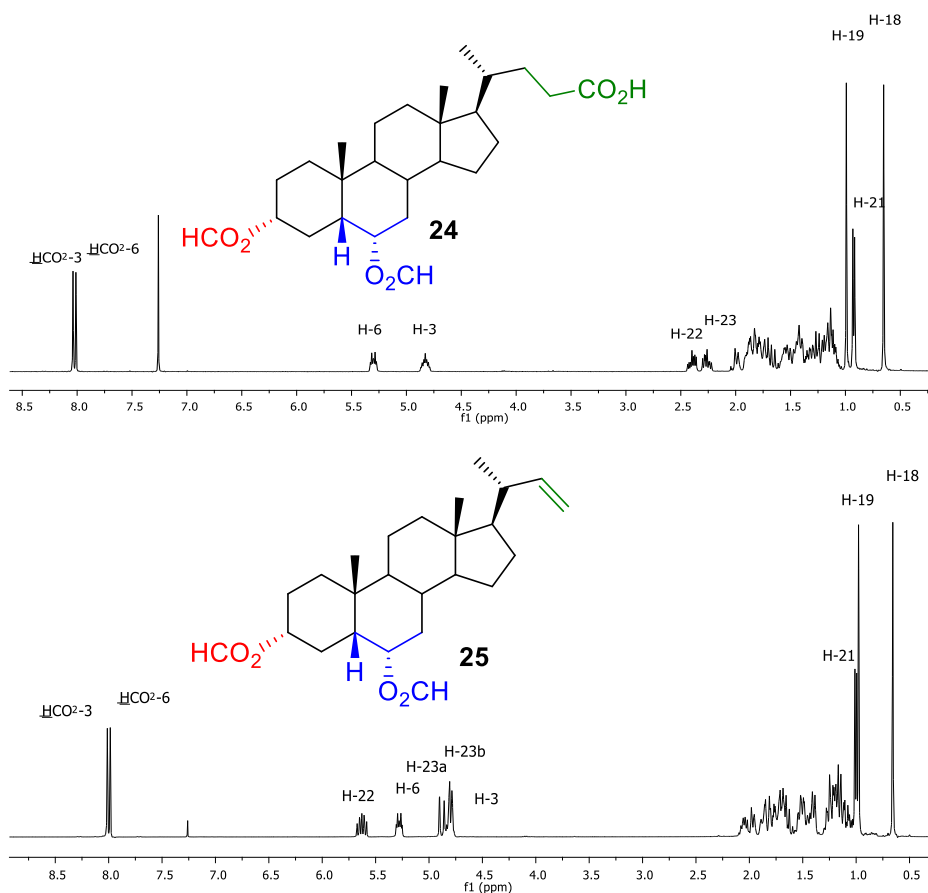
El derivado diformilado **24** (Esquema 1) se obtuvo por reacción de **16** con el sistema HCOOH/HClO<sub>4</sub> [95] con un 95% de rendimiento. La estructura de **24** fue confirmada por datos espectroscópicos, donde desde el espectro de <sup>1</sup>H RMN (Figura 24). se observaron las señales a  $\delta_H = 8,04$  (s, 1H) y  $\delta_H = 8,01$  ppm (s, 1H), asignados a los hidrógenos de las posiciones HCO<sub>2</sub>-3 y HCO<sub>2</sub>-6 respectivamente. Además, la presencia de ambos grupos formilos fueron confirmados desde el espectro de <sup>13</sup>C RMN, donde se observaron las señales a  $\delta_C = 160,60$  y  $\delta_C = 160,51$  ppm asignadas a HCO<sub>2</sub>-C3 y HCO<sub>2</sub>-C6 respectivamente (Tabla 9). Adicionalmente estos grupos funcionales fueron observados en IR, a 2939(C-H), 2869 (C-H), 1742 (C=O) y 1723 (C=O) cm<sup>-1</sup>. Obteniendo el compuesto **24** con un rendimiento de 95%.

Posteriormente, el siguiente paso de síntesis consistió en la reacción de descarboxilación de la cadena lateral del compuesto **24**, usando el sistema Pb(OAc)<sub>4</sub>/Cu(OAc)<sub>2</sub> (Esquema 1). Este método ha sido propuesto para obtener enlaces dobles terminales a partir de ácidos carboxílicos [114-117]. Específicamente, se ha aplicado ampliamente para la degradación de la cadena lateral de un gran número de ácidos biliares, incluidos derivados del ácido hiodesoxicólico [114]. De esta forma, el compuesto **24** fue tratado con este sistema, lo que permitió la obtención del derivado **25** con un 55% de rendimiento. (Figura 24).

La formación del alqueno en la posición C-22 y C-23 fue confirmada por datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN. Donde en el espectro de <sup>1</sup>H RMN (Figura 24) se observaron las señales a  $\delta_H = 5,67$ , 4,88 y 4,80 ppm, que fueron asignadas a los hidrógenos H-22 (m, 1H), H-23a (dd,  $J = 17,1$  y 0,8 Hz, 1H) y H-23b (dd,  $J = 10,0$  y 1,6 Hz, 1H) respectivamente (Tabla 5). Mientras que la presencia del enlace doble terminal en C22-C23 también fue confirmado por las señales de <sup>13</sup>C RMN observadas a  $\delta_C = 144,88$  y 111,68 ppm, que fueron asignadas a los carbonos C-22 y C-23. Información adicional de la presencia del enlace doble C22-C23 fue proporcionada desde el espectro de IR, donde las señales observadas a 3078 y 1632 cm<sup>-1</sup> fueron asignadas a los enlaces C=C-H y C=C.

**Tabla 5.** Comparación entre las señales observadas de  $^1\text{H}$  RMN para H-22, H-23a, H-23b en los compuestos **24** y **25**.

| Señal | Compuesto <b>24</b> | Compuesto <b>25</b>                      |
|-------|---------------------|--|
| H-22  | 2,40 ppm (m, 1H)    | 5,67 ppm (m, 1H)                         |
| H-23  | 2,26 ppm (m, 1H)    | -  |
| H-23a | -                   | 4,88 ppm (dd, $J = 17,1$ y $0,8$ Hz, 1H) |
| H-23b | -                   | 4,80 ppm (dd, $J = 10,0$ y $1,6$ Hz, 1H) |

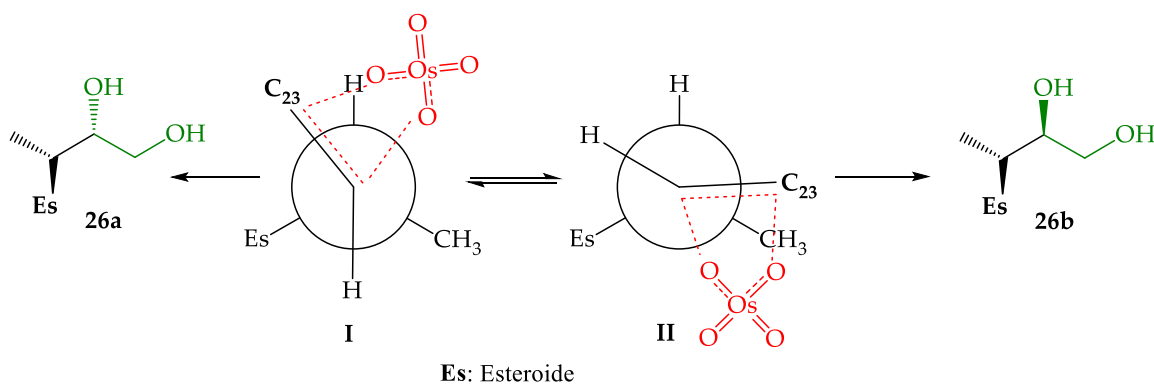


**Figura 24.** Comparación entre los espectros de  $^1\text{H}$  RMN para el precursor **24** y el alqueno **25**.

De acuerdo con lo indicado en el Esquema 1, reacción de dihidroxilación directa sobre el alqueno **25** con el sistema  $\text{OsO}_4/\text{NMMNO}$ , produjo la mezcla de epímeros dihidroxilados

**26a/26b** con un 28% de rendimiento. La proporción de cada epímero en la mezcla fue de **26a:26b** = 5:1, la cual fue determinada utilizando los datos de integración de las señales del espectro de  $^1\text{H}$  RMN asignadas a los grupos  $\text{CH}_3\text{-21}$ , según se indica más adelante.

La proporción de los epímeros **26a/26b** en la mezcla podría ser explicada considerando el siguiente análisis. La preferencia del ataque en la dihidroxilación con  $\text{OsO}_4$  supone un equilibrio entre dos conformaciones preferenciales (I y II) en el estado de transición (Figura 25), donde la conformación I parece ser la más estable y posteriormente permite la formación del epímero mayoritario deseado con configuración (*S*) en C-22 (**26a**). Mientras que la conformación II (menos estables) conduce a la formación del epímero minoritario **26b** [118]. Lamentablemente, en estudios desarrollados se ha comprobado que mezclas de epímeros con similar estructura a **26a/26b** no fueron posibles de separarla por métodos tradicionales de cromatografía en columna y/o re-cristalizaciones [125-132].



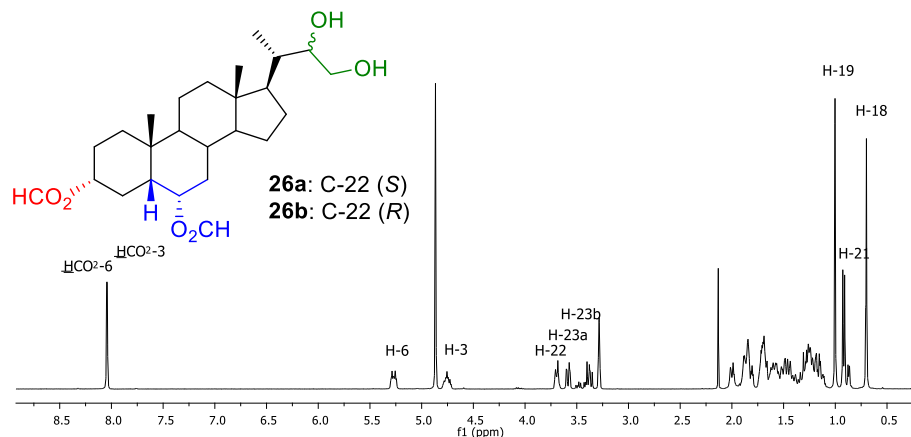
**Figura 25.** Representación de las posibles conformaciones en equilibrio en el estado de transición para el ataque de  $\text{OsO}_4$  sobre el enlace doble en C22-C23, que explica la formación preferencial del epímero **26a** en la mezcla.

La formación de los grupos hidroxilos en las posiciones C22-C23 fueron confirmadas por datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN. De esta forma, las señales observadas a  $\delta_{\text{H}} = 3,71$  (m, 1H),  $\delta_{\text{H}} = 3,58$  (dd,  $J = 11,3$  y  $2,4$  Hz, 1H) y  $\delta_{\text{H}} = 3,38$  (dd,  $J = 11,3$  y  $8,9$  Hz, 1H), fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23a y H-23b respectivamente. Estas señales fueron comparadas con el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del precursor **25** según se indica en la Figura 26, confirmando la formación de la mezcla de glicoles epiméricos **26a/26b**. La proporción de epímeros en la mezcla **26a:26b** = 5:1 se determinó en base a las áreas de integración de las señales dobles del grupo  $\text{CH}_3\text{-21}$  en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN para esta señal se observaron dos desplazamientos, para **26a** a  $\delta_{\text{H}} = 0,92$  ppm (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H), y para **26b** a  $\delta_{\text{H}} = 0,87$  ppm (d,  $J = 6,0$  Hz, 3H) (Tabla

6), el área de integración del primer desplazamiento es más intensa en altura que la segunda señal, demostrando que el epímero con la configuración *S* está en mayor proporción que el epímero *R*. Mientras que las señales observadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN a  $\delta_{\text{C}} = 76,62$  y  $\delta_{\text{C}} = 64,62$  ppm fueron asignadas a los carbonos C22 y C23, respectivamente. Información adicional de la presencia de los grupos dihidroxilos en C22-C23 fue proporcionada desde el espectro de IR, donde las señales observadas a  $3433$ ,  $2942$  y  $2868$   $\text{cm}^{-1}$  fueron asignadas a los enlaces O-H, C-H y C-H respectivamente.

**Tabla 6.** Comparación entre las señales de  $^1\text{H}$  RMN para H-22, H-23a-b y CH<sub>3</sub>-21, en la mezcla de epímeros **26a/26b**.

| Señal               | Compuesto <b>26a</b>                     | Compuesto <b>26b</b>                     |
|---------------------|--|--|
| H-22                | 3,71 ppm (m, 1H)                         | 3,71 ppm (m, 1H)                         |
| H-23a               | 3,58 ppm (dd, $J = 11,3$ y $2,4$ Hz, 1H) | 3,58 ppm (dd, $J = 11,3$ y $2,4$ Hz, 1H) |
| H-23b               | 3,38 ppm (dd, $J = 11,3$ y $8,9$ Hz, 1H) | 3,38 ppm (dd, $J = 11,3$ y $8,9$ Hz, 1H) |
| CH <sub>3</sub> -21 | 0,92 ppm (d, $J = 6,9$ Hz, 3H)           | 0,87 ppm (d, $J = 6,0$ Hz, 3H)           |

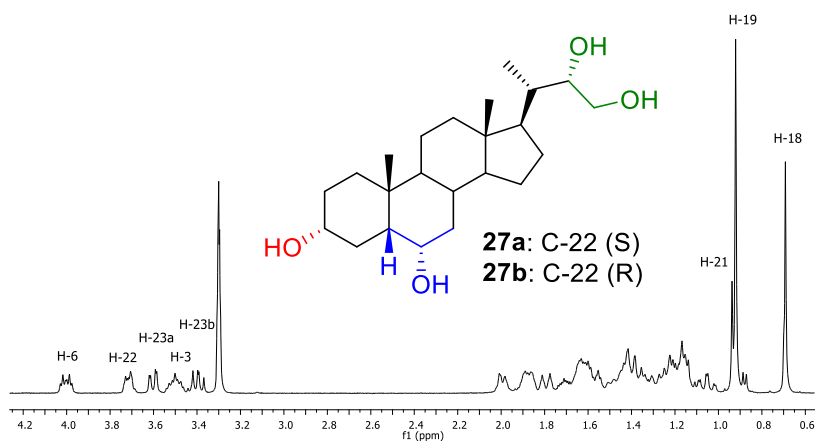


**Figura 26.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la mezcla de epímero **26a/26b**.

Como se indicó en la metodología que no es posible separar los glicoles desde la mezcla **26a/26b** por métodos convencionales (C.C., cristalización, etc.), y siguiendo con lo propuesto e indicado en el Esquema 1, el paso siguiente consistió en realizar la reacción de saponificación

con  $\text{CH}_3\text{OH}$  y una solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  al 5%, obteniendo la mezcla de epimeros **27a/27b** (7:1) tetrahidroxilados, con un rendimiento total de 89,9%.

La formación de los grupos hidroxilados en las posiciones C3 y C6, fue confirmada por datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN. De esta forma, la ausencia de las señales  $\delta_{\text{H}} = 8,05$  (s, 1H,  $\text{HCO}_2$ ), y  $\delta_{\text{H}} = 8,04$  (s, 1H,  $\text{HCO}_2$ ) observadas en el espectro de **26a/26b** asignadas a C-3 y C-6, ahora no se observan en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del producto. En el espectro de la mezcla **27a/27b** (Figura 27), se confirma la obtención de los grupos dihidroxilados por la observación de las señales a  $\delta_{\text{H}} = 3,50$  ppm (m, 1H), y 4,01 ppm (dt,  $J = 12,0$  y 4,7 Hz, 1H), asignadas a los hidrógenos H-3 y H-6 respectivamente. Mientras que las señales a  $\delta_{\text{H}} = 3,61$  ppm y  $\delta_{\text{H}} = 3,40$  ppm asignadas a los hidrógenos H-23a y H-23b se mantienen (Figura 27). La proporción en la mezcla fue establecida como **27a/27b** (7:1) se determinó en base a las áreas de integración de las señales dobles del grupo  $\text{CH}_3$ -21 en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN para esta señal se observaron dos desplazamientos, para **27a** a  $\delta_{\text{H}} = 0,94$  ppm (d,  $J = 5,4$  Hz, 3H), y para **27b** a  $\delta_{\text{H}} = 0,89$  ppm (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H) (Figura 27), el área de integración del primer desplazamiento es más intensa en altura que la segunda señal, demostrando que el epímero con la configuración *S* está en mayor proporción que el epímero *R*. Las señales observadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN a  $\delta_{\text{C}} = 73,38$ , 69,64, 76,25 y 64,20 ppm fueron asignadas a los carbonos C3, C6, C22 y C23 respectivamente, confirmando la desaparición de los grupos diformilados. Información adicional de la presencia de los grupos hidroxilos fue proporcionada desde el espectro IR donde se observa la señal  $3376\text{ cm}^{-1}$  asignada a O-H.



**Figura 27.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN para la mezcla de análogos epiméricos **27a/27b**.

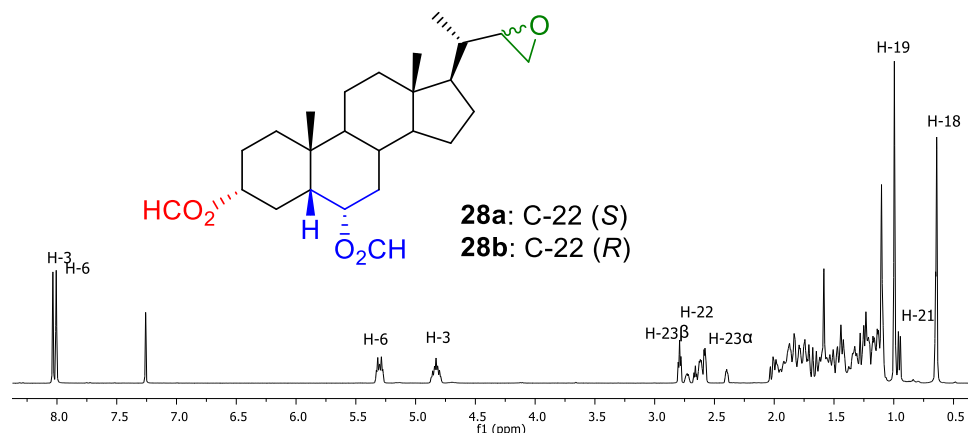
Continuando con la propuesta de síntesis, la siguiente etapa consistió en desarrollar la ruta indicada en el Esquema 2. De esta forma, la reacción de epoxidación con MCPBA sobre el alqueno **25** produce la mezcla epimérica **28a/28b**, según se indicó en la metodología [118-119,121]. En este caso se obtuvo la mezcla de epóxidos epiméricos **28a/28b** con 94% de rendimiento.

La formación del epóxido en la posición C22-C23 fue confirmada por datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN. De esta forma, las señales observadas a  $\delta_{\text{H}}=2,62$ ,  $\delta_{\text{H}}=2,58$  y  $\delta_{\text{H}}=2,79$  ppm fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23 $\alpha$  y H-23 $\beta$  respectivamente (Tabla7) en el espectro de la Figura 28.

Mientras que las señales de **28a/28b** observadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN a  $\delta_{\text{C}}= 56,05$  y  $49,03$  ppm fueron asignadas a los carbonos C-22 y C-23 respectivamente (Tabla 9).

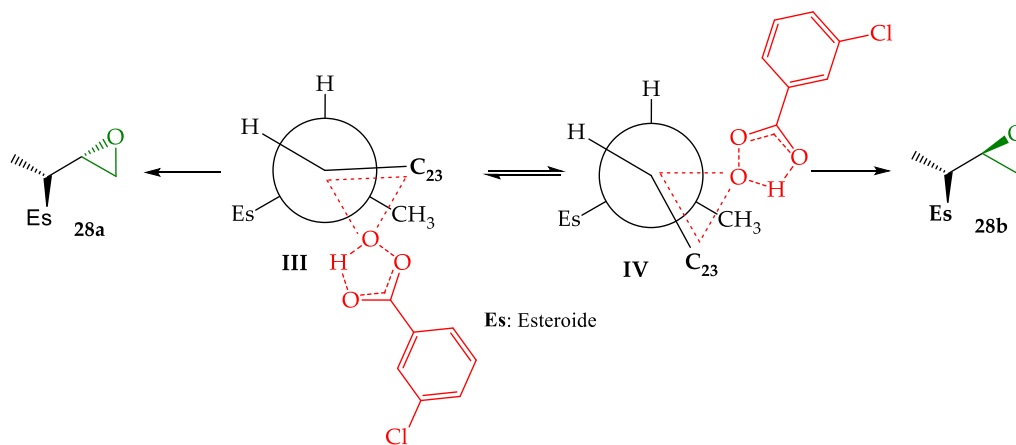
**Tabla 7.** Comparación entre las señales de  $^1\text{H}$  RMN para H-22, H-23 $\alpha$ , H-23 $\beta$  y CH<sub>3</sub>-21, para los epímeros **28a/28b**.

| Señal               | Compuesto <b>28a</b>                    | Compuesto <b>28b</b>                    |
|---------------------|---|---|
| H-22                | 2,62 ppm (m, 1H)                        | 2,73 ppm (m, 1H)                        |
| H-23 $\alpha$       | 2,40 ppm (m, 1H)                        | 2,58 ppm (m, 1H)                        |
| H-23 $\beta$        | 2,66 ppm (dd, $J = 4,4$ y $4,4$ Hz, 1H) | 2,80 ppm (dd, $J = 4,3$ y $4,3$ Hz, 1H) |
| CH <sub>3</sub> -21 | 0,95 ppm (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)          | 0,95 ppm (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)          |



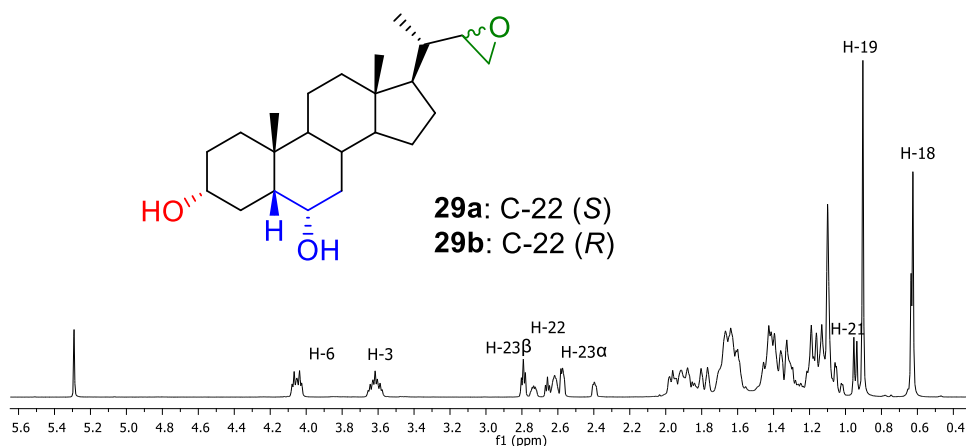
**Figura 28.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN para mezcla de epímeros **28a/28b**.

Desde los datos referenciales para la reacción de epoxidación de alquenos terminales de tipo esteroidal de similar estructura, se conocía que el epímero mayoritario debiese ser el epóxido **28b** [118], lo que fue confirmado por los datos de integración de las señales de H-22, H-23 $\alpha$  y H-23 $\beta$  de la mezcla **28a/28b**. De esta forma se estableció que la proporción en mezcla como **28a/28b** = 0,39:1,0. La preferencia a formar mayoritariamente el epímero **28b** se podría explicar en función de las conformaciones más estables en el equilibrio (III y IV), y la mayor facilidad de ataque del peroxiácido sobre la conformación IV en el estado de transición indicada en la Figura 29.



**Figura 29.** Representación de las posibles conformaciones en equilibrio en el estado de transición para el ataque de MCPBA sobre el enlace doble C22-C23, que muestra la conformación preferencial IV para la reacción de epoxidación y posterior formación del epímero mayoritario.

Debido a que no fue posible separar la mezcla de epímeros epoxidados **28a/28b**, se procedió a saponificar esta mezcla en las posiciones C-3 y C-6, la cual fue realizada con una solución de  $K_2CO_3$  al 5% en  $CH_3OH$ , obteniéndose la mezcla de epimeros **29a/29b** = 0,5:1,0 (Figura 30) con un 93 % de rendimiento. La presencia de los grupos dihidroxidos en la posición C3 y C6 fue confirmada por datos espectroscópicos de  $^1H$  RMN y  $^{13}C$  RMN. De esta forma, la ausencia de las señales a  $\delta_H = 8,03$  y  $\delta_H = 8,01$  ppm en el espectro de la mezcla **28a/28b** (Figura 28), confirman la saponificación de los grupos formilos. Mientras que las señales observadas a  $\delta_C = 71,54$  y  $68,00$  ppm en el espectro de  $^{13}C$  RMN de la mezcla de epímeros **29a/29b** fueron asignadas a los carbonos C-3 y C-6 respectivamente (Tabla 9). Información adicional de la presencia de los grupos dihidroxidos en fue proporcionada desde el espectro de IR, donde las señales observadas a  $3394$ ,  $2937$  y  $2866$   $cm^{-1}$  fueron asignadas a los enlaces O-H, C-H y C-H respectivamente.



**Figura 30.** Espectro de  $^1H$  RMN de la mezcla de epímeros epoxidados **29a/29b**.

Adicionalmente en las Tabla 8 y Tabla 9 se encuentran los datos espectroscópicos de  $^1H$  RMN y  $^{13}C$  RMN de los compuestos **24** hasta el **29**, en las que se pueden observar los diferentes desplazamientos para cada uno de estos compuestos en las distintas reacciones realizadas. En la tablas solo se incluyen los desplazamientos para los epímeros mayoritarios.

**Tabla 8.**  $\delta$  (ppm)  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400.1 MHz) para los compuestos **24–29** de los epimeros mayoritarios.

| <b>H</b><br><b>Compuestos</b> | <b>24</b> | <b>25</b> | <b>26</b> | <b>27</b> | <b>28</b> | <b>29</b> |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 3                             | 4,83      | 4,80      | 4,78      | 3,50      | 4,83      | 3,62      |
| 6                             | 5,30      | 5,31      | 5,27      | 4,01      | 5,30      | 4,05      |
| 21                            | 0,92      | 1,0       | 0,92      | 0,94      | 0,95      | 0,95      |
| 22                            | 2,40      | 5,64      | 3,71      | 3,72      | 2,73      | 2,73      |
| 23                            | 2,26      | -         | -         | -         | -         | -         |
| 23a                           | -         | 4,88      | 3,58      | 3,61      | 2,58      | 2,58      |
| 23b                           | -         | 4,80      | 3,38      | 3,40      | 2,80      | 2,79      |
| $\text{HCO}_2\text{-C3}$      | 8,04      | 8,01      | 8,05      | -         | 8,03      | -         |
| $\text{HCO}_2\text{-C6}$      | 8,01      | 8,01      | 8,04      | -         | 8,01      | -         |

**Tabla 9.**  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz) para los compuestos **24–29** de los epimeros mayoritarios.

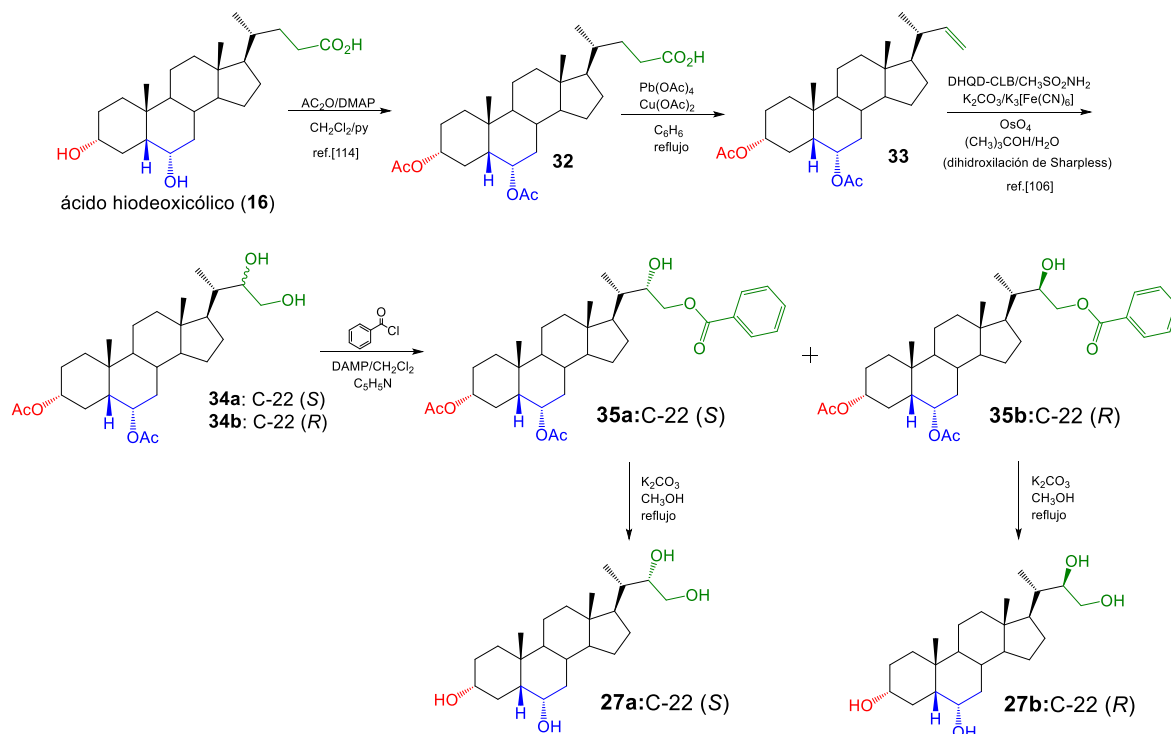
| <b>C</b><br><b>Compuestos</b> | <b>24</b> | <b>25</b> | <b>26</b> | <b>27</b> | <b>28</b> | <b>29</b> |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 3                             | 73,55     | 73,43     | 73,60     | 73,38     | 73,49     | 71,54     |
| 6                             | 70,91     | 70,79     | 76,31     | 69,64     | 70,81     | 68,00     |
| 21                            | 18,22     | 20,00     | 14,84     | 14,44     | 16,89     | 17,00     |
| 22                            | 30,94     | 144,88    | 76,62     | 76,25     | 55,67     | 55,76     |
| 23                            | 31,23     | 111,68    | 64,62     | 64,20     | 49,03     | 50,00     |
| 24                            | 179,98    | -         | -         | -         | -         | -         |

|                      |        |        |        |   |        |   |
|----------------------|--------|--------|--------|---|--------|---|
| HCO <sub>2</sub> -C3 | 160,60 | 160,44 | 163,92 | - | 160,51 | - |
| HCO <sub>2</sub> -C6 | 160,51 | 160,37 | 163,78 | - | 160,44 | - |

Como se indicó anteriormente no fue posible separar los glicoles **26a** y **26b** 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 con el objetivo de lograr la separación de los epímeros y luego para la obtención de los análogos **27a** y **27b**.

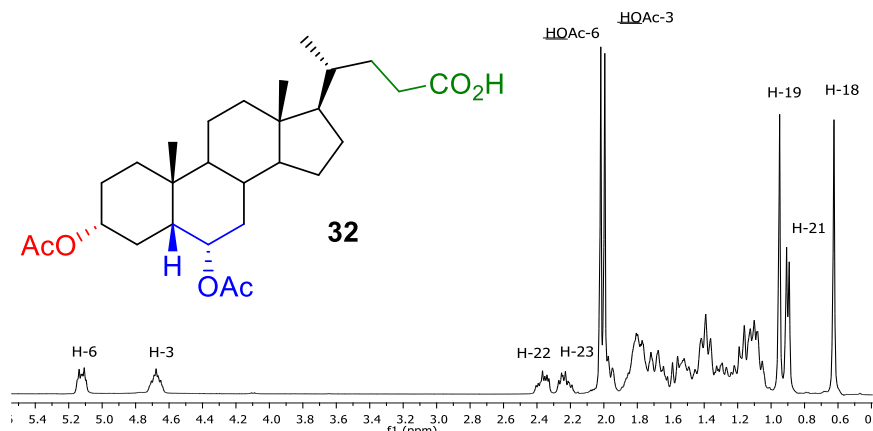
Sin embargo, la reacción de benzoilación sobre la mezcla **26a/26b**, de acuerdo al método reportado en bibliografía [132] para análogos de similar estructura, al parecer produjo una reacción no deseada, presumiblemente la saponificación de los grupos formilo de las posiciones C-3 y C-6, generándose un mezcla compleja de productos de reacción, la cual no fue posible de separar ni identificar, con lo cual no se logró el objetivo deseado para esta reacción. Debido a que no se pueden obtener los derivados benzoilados **30a** y **31b** indicados en la propuesta inicial del Esquema 3, se procedió a realizar una ruta de síntesis alternativa, la cual se indica en el Esquema 5.

En esta nueva ruta se propone reemplazar los grupos formilos de las posiciones C-3 y C-6 por grupos acetilos, además se evalúa la posibilidad de utilizar la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless [126-127] por la de Upjohn, con el objetivo de aumentar la estereo selectividad en la formación de los epímeros hidroxilados en C-22, dado que la dihidroxilación de Upjohn produce mayoritariamente el epímero con configuración (*S*) en C-22 [108,109,132]. Posteriormente se realizará la reacción de benzoilación selectiva en la posición C-23 donde se establece que los alcoholes primarios son más reactivos que los alcoholes secundarios frente a esta reacción [129-133], lo que permitirá la obtención de los derivados monobenzoilados **35a** y **35b**, y que posteriormente por reacción de saponificación produciría los análogos finales **27a** y **27b** (Esquema 5).



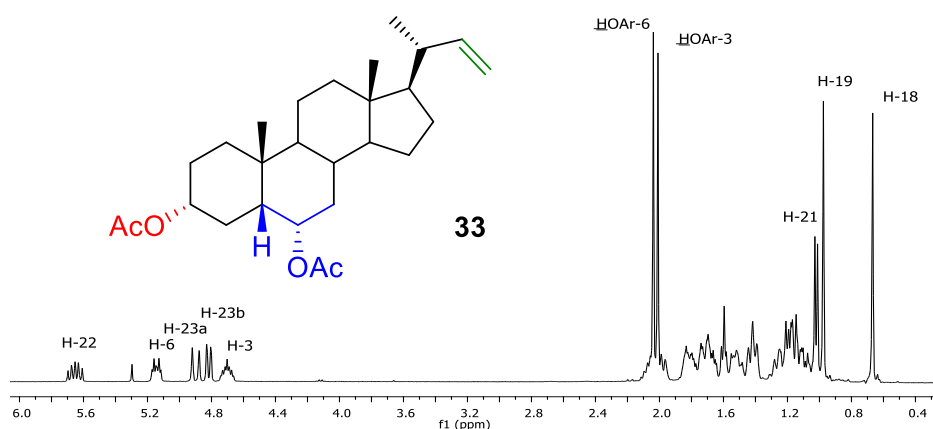
**Esquema 5.** Estrategia de síntesis propuesta para obtener los derivados monobenzoilados **35a**, **35b**, y que por posterior saponificación de estos se obtendrían los análogos **27a** y **27b**.

La reacción de acetilación de **16** bajo condiciones estándares (Ac<sub>2</sub>O/DMAP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [132], produjo el derivado diacetilado **32** con un 81% de rendimiento. La estructura del compuesto diacetilado **32** fue confirmada por datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN. De esta forma, las señales observadas a δ<sub>H</sub>= 1,99 (CH<sub>3</sub>CO-C6) y δ<sub>H</sub>= 2,02 (CH<sub>3</sub>CO-C3) ppm fueron asignadas a los hidrógenos de ambos grupos acetatos (Figura 31). Mientras que las señales observadas en el espectro de <sup>13</sup>C RMN a δ<sub>C</sub> = 170,55 y 170,52 ppm fueron asignadas a los carbonos CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-C3 y CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-C6 respectivamente (Tabla 13). Información adicional de la presencia de los grupos acetatos en C3-C6, fueron proporcionadas desde el espectro IR, donde las señales observadas a 3525, 2949, 2868, 1722 y 1680 cm<sup>-1</sup> fueron asignadas a los enlaces O-H, C-H, C-H, C=O y C=O.



**Figura 31.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN del derivado **32**.

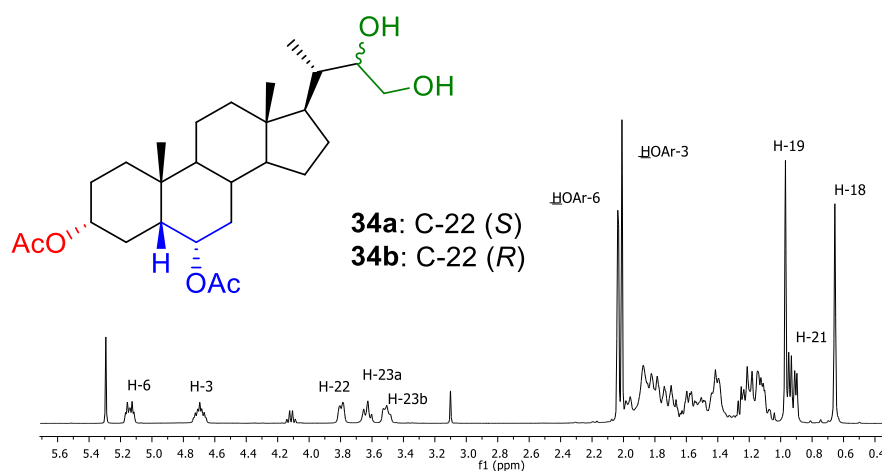
Posteriormente se realizó la reacción de descarboxilación del derivado **32**, de acuerdo al método descrito anteriormente [114], en esta oportunidad se obtuvo el alqueno **33** con un 55% de rendimiento. La formación del Alqueno en la posición C22-C23 fue confirmada por datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN y por datos de referencia [114]. De esa forma, las señales observadas en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN a  $\delta_{\text{H}} = 5,65, 4,90$  y  $4,82$  ppm fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23a y H-23b respectivamente (Figura 32), a diferencia de las señales observadas en el análogo **32** las que fueron observadas a  $\delta_{\text{H}} = 2,37$  y  $\delta_{\text{H}} = 2,23$  ppm, y asignadas a los hidrógenos H-22 y H-23. Además la ausencia de la señal a  $\delta_{\text{C}} = 180,09$  ppm (Tabla 13) en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN asignada al carbono C-24, confirma la eliminación de la función carboxílica, mientras que la observación de las señales a  $\delta_{\text{C}} = 145,06$  y  $111,69$  ppm confirman la presencia del enlace doble terminal en la posición C22-C23.



**Figura 32.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN para el derivado **33**.

Posteriormente se realizó la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless, sobre el enlace doble de la posición C22-C23 del compuesto **33**, utilizando como un inductor quiral el sistema DHQD-CLB/CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/OsO<sub>4</sub> [129-130]. Sin embargo, mediante este procedimiento se obtuvo la mezcla de glicoles epiméricos **34a/34b** con un 95% de rendimiento. La formación de la función glicol fue confirmada por datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN. De esa forma, las señales observadas a  $\delta_H = 3,88, 3,63$  y  $3,51$  ppm fueron asignadas a los hidrógenos s H-22, H-23a y H-23b respectivamente (Figura 33).

La proporción de epímeros en la mezcla **34a/34b** fue establecida como **34a/34b** = 1,0:0,7 la cual se determinó en base a la integración de las áreas de las señales dobletes del grupo CH<sub>3</sub>-21 en el espectro de <sup>1</sup>H RMN en la mezcla. Para esta señal se observaron dos desplazamientos a  $\delta_H = 0,94$  y  $\delta_H = 0,90$  ppm (Tabla 10). El área de integración de la señal a  $\delta_H = 0,94$  ppm es más intensa en altura que la señal a  $\delta_H = 0,90$  ppm, demostrando que el epímero con la configuración C-22 (*S*) está en mayor proporción con respecto al epímero C-22 (*R*). Esta asignación al epímero mayoritario fue establecida por comparación de datos espectroscópicos para la señal de CH<sub>3</sub>-21 entre los espectros de <sup>1</sup>H RMN de la mezcla **34a/34b**, con aquellos obtenidos para la mezcla **26a/26b**. Mientras que las señales observadas en el espectro <sup>13</sup>C RMN a  $\delta_C = 74,11$  y  $62,47$  ppm fueron asignadas a C22 y C23 respectivamente. Información adicional de la presencia de los grupos hidroxilos en C22-C23 fue proporcionada desde el espectro de IR, donde las señales observadas a 3446, 2934, 2870, 1737 y 1717 cm<sup>-1</sup> fueron asignadas a los enlaces O-H, C-H, C-H, C=O y C=O.

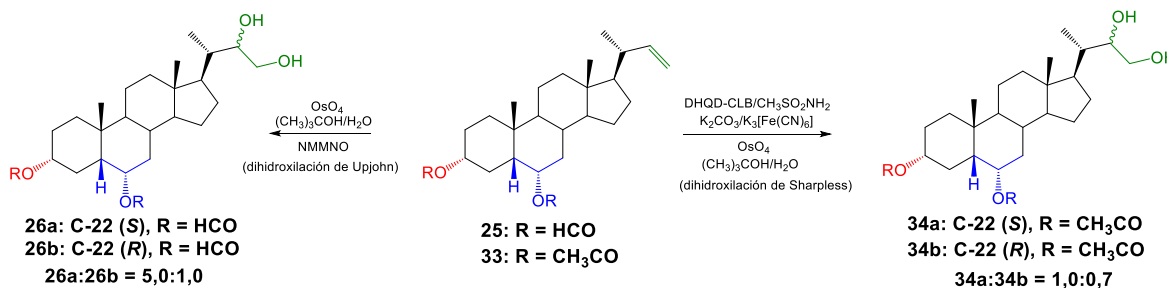


**Figura 33.** Espectros de <sup>1</sup>H RMN para la mezcla de epímeros **34a/34b**.

**Tabla 10.** Comparación entre las señales de  $^1\text{H}$  RMN para H-22, H-23a, H-23b y CH<sub>3</sub>-21, para los epímeros **34a/34b**.

| Señal               | Compuesto <b>34a</b>                    | Compuesto <b>34b</b>                    |
|---------------------|---|---|
| H-22                | 3,80 ppm (m, 2H)                        | 3,80 ppm (m, 2H)                        |
| H-23a               | 3,63 ppm (dd, $J = 9,9$ y $9,9$ Hz, 1H) | 3,63 ppm (dd, $J = 9,9$ y $9,9$ Hz, 1H) |
| H-23b               | 3,51 ppm (dd, $J = 9,1$ y $9,1$ Hz, 1H) | 3,51 ppm (dd, $J = 9,1$ y $9,1$ Hz, 1H) |
| CH <sub>3</sub> -21 | 0,90 ppm (d, $J = 5,7$ Hz, 3H)          | 0,94 ppm (d, $J = 6,8$ Hz, 3H)          |

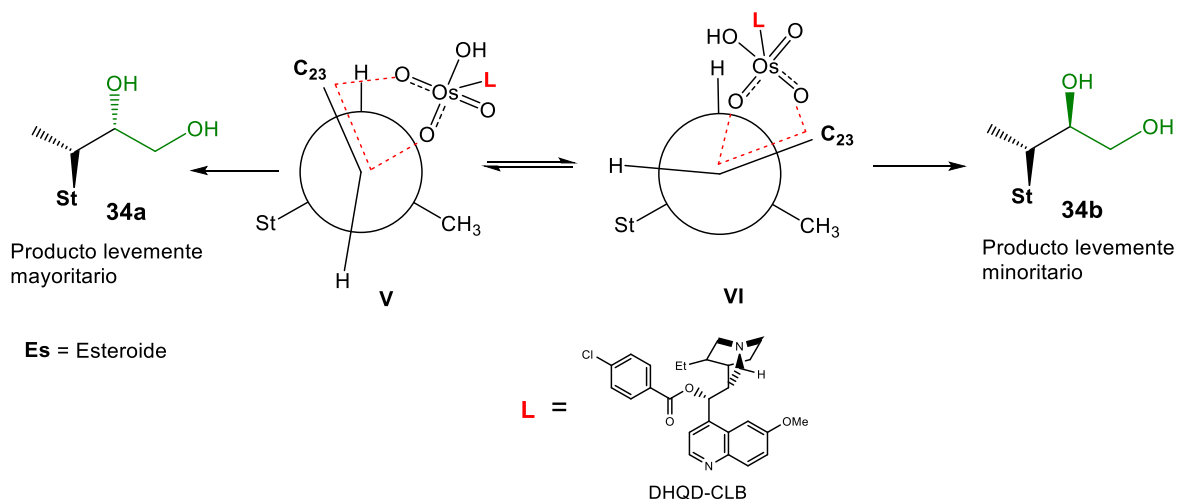
Como se indicó anteriormente, en la dihidroxilación de Upjohn se obtuvo una mezcla de glicoles en C-22(S)/C-22(R) de **26a/26b** = 5,0:1,0, mientras que en la dihidroxilación de Sharples la mezcla de glicoles en C-22(S)/C-22(R) fue de **34a/34b** = 1,0:0,7 (Figura 34), aún cuando estas sólo difieren estructuralmente en los grupos presentes en las posiciones C-3 y C-6 (grupos formilos para el primer caso y grupos acetatos para el segundo), y se estima que mayormente no interfiere en la reacción, por lo cual cabe la posibilidad de realizar un análisis para explicar las preferencias en la obtención del epímero mayoritario en cada uno de estos métodos.

**Figura 34.** Diferencias observadas en la proporción de mezclas de glicoles epiméricos **26a/26b** y **34a/34b** en C-22(S) y C-22(R) obtenidas en las reacciones de dihidroxilación de Upjohn y Sharpless respectivamente.

Es sabido que la reacción de dihidroxilación de Upjohn en enlaces dobles terminales de núcleos esteroidales, produce la mezcla de glicoles epiméricos en C-22, donde predomina el epímero C-22 (S) como mayoritario [118-119,132], lo cual fue explicado anteriormente en la Figura 25.

Mientras que para el caso de la dihidroxilación de Sharpless se proponen las conformaciones en equilibrio V y VI como más estables en el estado de transición para el ataque del complejo OsO<sub>4</sub>-L (Figura 35), que presenta un mayor tamaño y disposición espacial, comparado con las

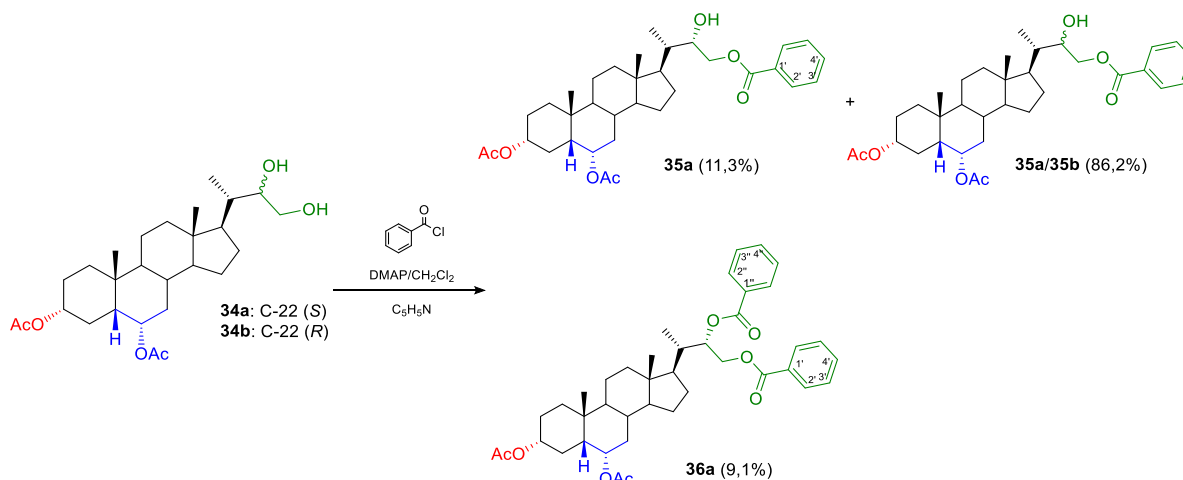
propuestas para el caso de la dihidroxilación de Upjohn, lo que estaría favoreciendo de cierta forma la formación del epímero **34b** (C-22 *R*), en una mayor proporción comparado con el método de Upjohn.



**Figura 35.** Representación esquemática del ataque del complejo OsO<sub>4</sub>-L sobre el enlace doble C22-C23, que muestra las conformaciones preferenciales V y VI para la reacción de dihidroxilación asimétrica de sharpless.

Siguiendo con la ruta de síntesis indicada en el Esquema 4, el paso siguiente consistió en realizar la reacción de benzoilación selectiva en la posición C-23 de la mezcla de glicoles **34a/34b**, que permitirá la obtención de los derivados monobenzoilados **35a** y **35b**, y así, por separación por columna cromatográfica y subsecuente cristalización se espera lograr separar la mezcla de epímeros derivados en forma de benzoatos. Posterior reacción de saponificación produciría los análogos finales **27a** y **27b** (Esquema 5).

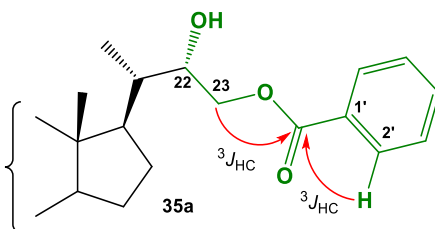
Sin embargo, luego de la reacción de benzoilación, se obtuvo una mezcla compleja de productos, que por posterior separación por C.C. y recristalización, se lograron aislar los derivados **35a** (11,3%), la mezcla de epímeros **35a/35b** (86,2%) y el derivado dibenzoilado **36a** (9,1%) (Esquema 6).



**Esquema 6.** Estructura de los derivados monobenzoilados **35a**, **35b**, y dibenzoilado **36a**, producidos en la reacción de benzoilación de la mezcla de glicoles **34a/34b**.

La estructura del derivado benzoilado **35a** fue confirmada por datos espectrocópicos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN. De esa forma, las señales observadas a  $\delta_{\text{H}} = 8,05, 7,45$  y  $7,58$  ppm fueron asignadas a los hidrógenos HAr-2', HAr-3' y HAr-4' respectivamente (Figura 37). Mientras que en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN las señales observadas a  $\delta_{\text{C}} = 166,99, 129,90, 129,62, 128,42$  y  $133,17$  ppm fueron asignadas a los carbonos CO-Ar, C1'-Ar, C2'-Ar, C3'-Ar y C4'-Ar respectivamente, mientras que las señales observadas a  $\delta_{\text{C}} = 71,79$  y  $68,95$  ppm, fueron asignadas a los carbonos C-22 y C-23 respectivamente. Información adicional de la presencia del grupo benzoato fue proporcionada desde el espectro de IR, donde las señales observadas a  $3523, 2942, 2890, 2890, 2866, 1735$  y  $1276$   $\text{cm}^{-1}$  fueron asignadas a los enlaces O-H, C-H, C-H, C=O, y OCOAr.

La posición de benzoilación selectiva en C-23 fue confirmada desde los datos espectroscópicos proporcionados por el espectro 2D HMBC del compuesto **35a**, donde las principales correlaciones heteronucleares fueron observadas entre los hidrogenos H-23 con el grupo C=O (Ar) a  $\delta_{\text{C}} = 166,99$  ppm, según se indica en la Figura 36.



**Figura 36.** Principales correlaciones heteronucleares  $^3J_{\text{H-C}}$  HMBC entre los hidrógenos H-23a, H-23b y HAr-2' con el grupo carbonilo aromático, que confirman la posición de la función éster de benzoato en C-23 para el derivado monobenzoilado **35a**.

Adicionalmente se obtuvo la mezcla de derivados monobenzoilados **35a/35b** con un 86,2% de rendimiento (Esquema 6). La proporción de los derivados en la mezcla fue establecida como **35a:35b** = 1,0:0,45, considerando las integraciones de las señales asignadas a los hidrógenos CH<sub>3</sub>-21 observadas a  $\delta_{\text{H}}$  = 1,05 y 1,00 ppm respectivamente. La determinación estructural para el epímero **35b** fue establecida por comparaciones de los datos espectrocópicos de  $^1\text{H}$  RMN asignados al epímero puro **35a** con los observados en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la mezcla **35a/35b** (Figura 37). De esta forma, las principales diferencias observadas en la mezcla fueron establecidas para los hidrógenos H-22, H-23a, H-23b y CH<sub>3</sub>-21, según se indica en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Comparación entre las señales de  $^1\text{H}$  RMN para H-22, H-23a, H-23b y CH<sub>3</sub>-21, para los epímeros **35a** y **35b**.

| Señal               | Compuesto <b>35a</b>                    | Compuesto <b>35b</b>                   |
|---------------------|---|--|
| H-22                | 4,07 ppm (dd, $J$ = 3,4 y 2,0 Hz, 1H)   | 4,05 ppm (dd, $J$ = 4,0 y 3,3 Hz, 1H)  |
| H-23 <sup>a</sup>   | 4,48 ppm (dd, $J$ = 11,4 y 2,0 Hz, 1H)  | 4,39 ppm (dd, $J$ = 11,3 y 8,4 Hz 1H)  |
| H-23b               | 4,21 ppm (dd, $J$ = 11,4 y 10,2 Hz, 1H) | 4,26 ppm (dd, $J$ = 11,4 y 3,3 Hz, 1H) |
| CH <sub>3</sub> -21 | 1,04 ppm (d, $J$ = 6,8 Hz, 3H)          | 1,00 ppm (d, $J$ = 6,4 Hz, 3H)         |

Por otra parte, se obtuvo el derivado dibenzoilado **36a** con un 9,1% de rendimiento. La incorporación de ambos grupos benzoatos para este derivado en las posiciones C-22 y C-23 fue confirmada por datos espectrocópicos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN.

El anillo aromático que se encuentra presente en C-23 fue confirmado por la presencia de las señales observadas a  $\delta_H = 8,06, 7,44$  y  $7,56$  ppm, que fueron asignadas a los hidrógenos HAr-2', HAr-3' y HAr-4' respectivamente. Mientras que las señales observadas a  $\delta_H = 4,64$  y  $4,50$  ppm fueron asignadas a los hidrógenos H-23a y H-23b respectivamente. El anillo aromático que se encuentra enlazado con C-22, fue confirmado por la presencia de las señales observadas a  $\delta_H = 7,97, 7,38$  y  $7,52$  ppm, que fueron asignadas a los hidrógenos HAr-2'', HAr-3'' y HAr-4'' respectivamente. (Tabla 12). Mientras que la señal observada a  $\delta_H = 5,56$  ppm fue asignada a H-22.

Las señales de  $^{13}\text{C}$  RMN del anillo aromático enlazado a C-23, fueron observadas a  $\delta_C = 129,81, 129,62, 128,37$  y  $133,04$  ppm, las que fueron asignadas a los carbonos C1'-Ar, C2'-Ar, C3'-Ar, C4'-Ar respectivamente. Adicionalmente se observa la señal a  $\delta_C = 166,61$  ppm que fue asignada al grupo CO-Ar'. Mientras que la señal observada a  $\delta_C = 63,00$  ppm fue asignada a C-23. Para el anillo aromático enlazado a C-22, las señales observadas en el espectro  $^{13}\text{C}$  RMN a  $\delta_C = 130,38, 129,65, 128,35$  y  $132,98$  ppm fueron asignadas a los carbonos C1''-Ar, C2''-Ar, C3''-Ar, C4''-Ar respectivamente. Adicionalmente se observa la señal a  $\delta_C = 165,91$  ppm que fue asignada al grupo CO-Ar''. Mientras que la señal observada a  $\delta_C = 74,67$  ppm fue asignada a C-22 (Tabla 13). En la Figura 37 se observa una comparación entre los espectros de  $^1\text{H}$  RMN para los derivados monobenzoilado **35a**, la mezcla **35a/35b** y el derivado dibenzoilado **36a**. La proporción en la mezcla fue establecida como **35a/35b** (1,0:0,4) se determinó en base a las áreas de integración de las señales dobles del grupo CH<sub>3</sub>-21 en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se determinó en base a las áreas de integración de las señales dobles del grupo CH<sub>3</sub>-21 en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN para esta señal se observaron dos desplazamientos, para **35a** a  $\delta_H = 1,04$  ppm (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H, H-21), y para **35b** a  $\delta_H = 1,00$  ppm (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H, H-21), (Figura 37), el área de integración del primer desplazamiento es más intensa en altura que la segunda señal, demostrando que el epímero con la configuración *S* está en mayor proporción que el epímero *R*.

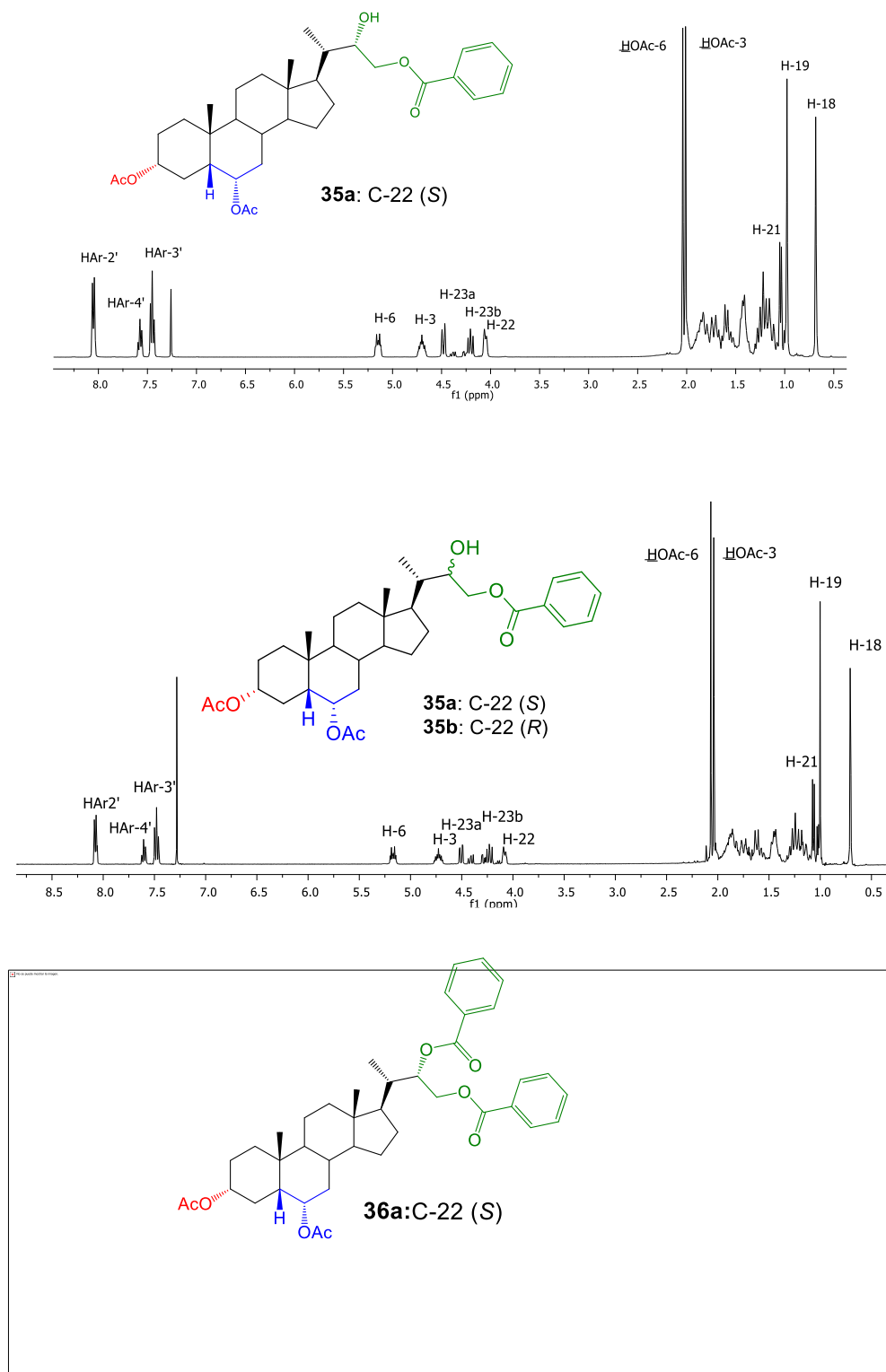


Figura 37. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN, comparación entre los derivados 35a mezcla 35a/35b y 36a.

Finalmente la determinación estructural del derivado dibenzoilado **36a** fue establecida utilizando técnicas espectroscópicas combinadas de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC y por comparaciones y correlaciones de RMN con el derivado monobenzoilado **35a**. De esta forma, la principal información estructural fue proporcionada desde el espectro 2D HMBC, donde las asignaciones de ambos grupos benzoatos mostraron correlaciones heteronucleares a  $^2J_{\text{HC}}$  y  $^3J_{\text{HC}}$  según se indican en la Figura 38.



**Figura 38.** Principales correlaciones heteronucleares 2D HMBC a  $^2J_{\text{HC}}$  (azul) y  $^3J_{\text{HC}}$  (rojo) observadas para el derivado dibenzoilado **36a**, que confirman las posiciones de ambos grupos benzoatos en C-22 y C-23 de la cadena lateral.

A modo de resumen en las Tabla 12 y 13 se muestran los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN para las principales señales observadas en los derivados **32-36a**.

**Tabla 12.**  $\delta$  (ppm)  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400,0 MHz) para los compuestos **32-36a**.

| <b>H</b><br><b>Compuestos</b> | <b>32</b> | <b>33</b> | <b>34a</b> | <b>34b</b> | <b>35a</b> | <b>35b</b> | <b>36a</b> |
|-------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 3                             | 4,68      | 4,70      | 4,70       | 4,70       | 4,70       | 4,70       | 4,71       |
| 6                             | 5,12      | 5,14      | 5,14       | 5,14       | 5,15       | 5,15       | 5,16       |
| 21                            | 0,90      | 1,02      | 0,94       | 0,90       | 1,04       | 1,00       | 1,13       |
| 22                            | 2,37      | 5,65      | 3,80       | 3,80       | 4,05       | 4,05       | 5,56       |
| 23                            | 2,23      | -         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 23 <sup>a</sup>               | -         | 4,90      | 3,63       | 3,63       | 4,48       | 4,39       | 4,64       |
| 23 <sup>b</sup>               | -         | 4,82      | 3,51       | 3,51       | 4,21       | 4,26       | 4,50       |
| <u>CH<sub>3</sub></u> COO-C3  | 1,99      | 2,01      | 2,01       | 2,01       | 2,01       | 2,05       | 2,02       |
| <u>CH<sub>3</sub></u> COO-C6  | 2,02      | 2,04      | 2,04       | 2,04       | 2,02       | 2,02       | 2,05       |
| HAr-2'                        | -         | -         | -          |            | 8,05       | 8,05       | 8,06       |
| HAr-2''                       | -         | -         | -          |            | -          | -          | 7,97       |
| HAr-3'                        | -         | -         | -          |            | 7,45       | 7,45       | 7,44       |
| HAr-3''                       | -         | -         | -          |            | -          | -          | 7,38       |
| HAr-4'                        | -         | -         | -          |            | 7,58       | 7,58       | 7,56       |
| HAr-4''                       | -         | -         | -          |            | -          | -          | 7,52       |

TABLA 13.  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz) para los compuestos 32–36a.

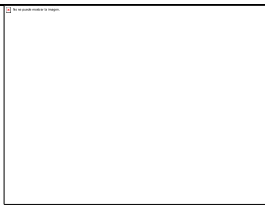
| <b>C</b><br><b>Compuestos</b>                    | <b>32</b> | <b>33</b> | <b>34</b> | <b>34b</b> | <b>35<sup>a</sup></b> | <b>35b</b> | <b>36a</b> |
|--|-----------|-----------|-----------|------------|-----------------------|------------|------------|
| 3  | 73,66     | 73,69     | 73,64     | 73,64      | 73,63                 | 73,63      | 73,64      |
| 6  | 70,92     | 70,95     | 70,87     | 70,93      | 70,87                 | 70,87      | 70,87      |
| 21   | 18,16     | 20,07     | 12,62     | 13,01      | 12,90                 | 12,39      | 13,76      |
| 22   | 30,93     | 145,06    | 74,11     | 73,88      | 71,79                 | 70,89      | 74,67      |
| 23   | 30,64     | 111,69    | 62,47     | 66,04      | 68,95                 | 68,88      | 63,00      |
| 24   | 180,09    | -         | -         | -          | -                     | -          | -          |
| $\text{CH}_3\text{C}\text{O}_2\text{-C3}$        | 170,55    | 170,47    | 170,52    | 170,52     | 170,50                | 170,50     | 170,51     |
| $\text{CH}_3\text{C}\text{O}_2\text{-C6}$        | 170,52    | 170,47    | 170,49    | 170,49     | 170,45                | 170,45     | 170,45     |
| $\text{C}\text{H}_3\text{C}\text{O}_2\text{-C3}$ | 21,36     | 21,41     | 21,40     | 21,40      | 21,40                 | 21,40      | 21,42      |
| $\text{C}\text{H}_3\text{C}\text{O}_2\text{-C6}$ | 21,32     | 21,37     | 21,37     | 21,37      | 21,36                 | 21,36      | 21,37      |
| $\text{CO-Ar}'$                                  | -         | -         | -         | -          | 166,99                | 166,68     | 166,61     |
| $\text{CO-Ar}''$                                 | -         | -         | -         | -          | -                     | -          | 165,91     |
| Ar-1'  | -         | -         | -         | -          | 129,90                | 129,88     | 129,81     |
| Ar-1''   | -         | -         | -         | -          | -                     | -          | 130,38     |
| Ar-2'  | -         | -         | -         | -          | 129,62                | 129,62     | 129,62     |
| Ar-2''   | -         | -         | -         | -          | -                     | -          | 129,65     |
| Ar-3'  | -         | -         | -         | -          | 128,42                | 128,36     | 128,37     |
| Ar-3''   | -         | -         | -         | -          | -                     | -          | 128,35     |
| Ar-4'  | -         | -         | -         | -          | 133,17                | 133,08     | 133,04     |
| Ar-4''   | -         | -         | -         | -          | -                     | -          | 132,98     |


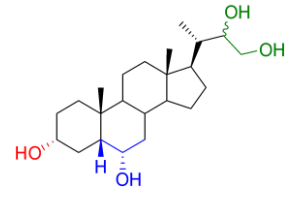
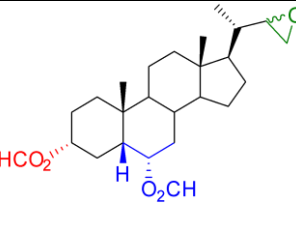
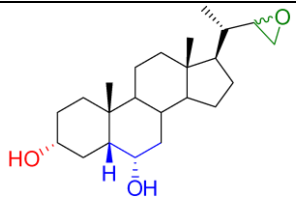
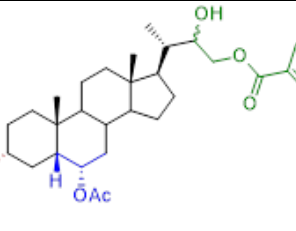
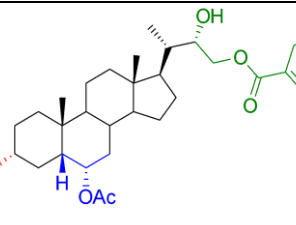
## Resultados y discusiones de la evaluación de los análogos de brasinoesteroides sintetizados como promotores de elongación celular vegetal.

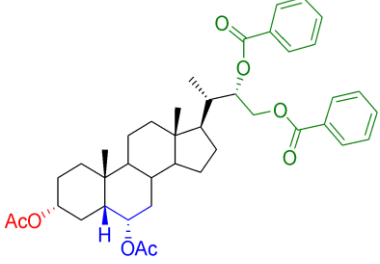
Debido a que la promoción del crecimiento vegetal es una de las propiedades intrínsecas de los BRs naturales [8], se midió el efecto de la aplicación de análogos y derivados de BRs sintetizados, aquellos que se obtuvieron como mezclas **26a/26b**, **27a/27b**, **28a/28b** y **29a/29b**, **35a/35b** y los que se obtuvieron en forma pura **35a** y **36a**, como promotores de elongación celular vegetal. La cuantificación se realizó mediante el test de la Inclinación de la lámina de arroz (RLIT)[130,134], usando brasinólido **1** como control positivo de actividad. La Tabla 14 muestra las moléculas evaluadas y el efecto de la aplicación de estos análogos sintéticos de BRs en la medición del ángulo (en grados) de la inclinación de la lámina de arroz (*Oryza sativa* cultivar Zafiro). Los resultados corresponden al ángulo promedio de apertura  $\pm$  DS, producto de seis replicas independientes para las concentraciones  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M.

En el Anexo 5 se entrega el registro visual del ensayo RLIT y los ángulos obtenidos posterior a la aplicación de los diferentes análogos testeados.

**Tabla 14.** Efecto de la aplicación de análogos de BRs sobre la inclinación de la lámina de arroz (ángulo promedio de apertura en grados  $\pm$  DS).

| Angulo de Inclinación de la lámina de arroz (RLIT) (°) |   |                                 |                    |                    |
|--|---|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| Compuestos (Código)                                    | Estructura de los Análogos de Brs   | Concentración del compuesto [M] |                    |                    |
|  |   | $1 \times 10^{-6}$              | $1 \times 10^{-7}$ | $1 \times 10^{-8}$ |
| Brasinolido <b>1</b>                                   |  | 70 $\pm$ 7,6                    | 41 $\pm$ 4,5       | 31 $\pm$ 1,0       |

|         |   |        |        |        |
|---------|---|--------|--------|--------|
| 26a/26b |    | 30±4,5 | 26±2,7 | 21±2,7 |
| 27a/27b |    | 44±4,2 | 14±2,2 | 8±3,5  |
| 28a/28b |    | 21±1,0 | 20±0,0 | 20±1,6 |
| 29a/29b |   | 28±2,9 | 30±0,0 | 17±2,4 |
| 35a/35b |  | 46±2,9 | 50±2,5 | 68±2,5 |
| 35a     |  | 49±2,5 | 48±2,9 | 20±1,0 |

|                       |   |        |        |       |
|-----------------------|---|--------|--------|-------|
| <b>36<sup>a</sup></b> |  | 23±2,1 | 25±1,0 | 6±2,5 |
| Control negativo      | Agua  | 7±4,5  |        |       |

Analizando los resultados, se observa que los análogos sintéticos de BRs evaluados presentaron una dependencia directa de la concentración para los efectos como promotor de elongación celular vegetal. Se observa que la mezcla de epímeros **35a/35b** a las concentraciones de  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  [M] y el análogo **35a** a concentración de  $1 \times 10^{-7}$  [M] superan el efecto del control positivo **1**, y todos los analogos obtenidos superan el control negativo, a excepción del análogo **36a** a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  [M].

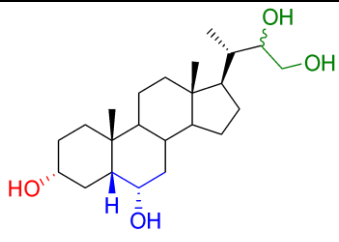
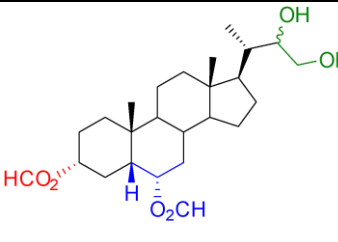
Si se realiza el análisis porcentual, a una concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M, las mezclas **26a/26b**, **27a/27b**, **35a/35b** y el compuesto **35a**, superaron el control negativo en un 73%, 50%, 86% y 85% respectivamente. Estos análogos presentan cadena lateral 24-nor con C22-C23 dihidroxilados (**26a/26b** y **27a/27b**), C22 hidroxilado y C-23 monobenzoilado (**35a**) y C22-C23 dibenzoilados (**36a**), Tabla 15, 16 y 17. Comparando entre ellos se puede observar la importancia del grupo hidroxilo en la cadena lateral en C-22, el cuál influye positivamente en la apertura de la lamina de arroz.

A pesar que **26a/26b**, **27a/27b** y **35a/35b** son mezclas de epímeros, se obtuvieron los mejores resultados sobre la elongación celular vegetal. De los seis análogos y derivados evaluados, se observó que la mezcla de epimeros **35a/35b** mostró los mayores resultados (90%) a la concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M.

Para establecer algún tipo de Relación-Estructura-Actividad como promotores de la elongación vegetal entre los análogos y derivados evaluados, estos se agruparon en función de las

modificaciones estructurales presentadas en la cadena lateral para cada pareja homóloga de análogos, es decir con función dihidroxilo (compuestos **26a/26b** y **27a/27b**), epóxido (compuestos **28a/28b** y **29a/29b**) y benzoilo (compuestos **35a/35b**, **35a** y **35b**). Estos datos se muestran en las Tablas 15-17.

**Tabla 15.** Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados  $\pm$  DS) para la serie **26a/26b** y **27a/27b** a concentraciones  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M.

|                      | <br><b>27a/27b</b> | <br><b>26a/26b</b> |
|----------------------|---|--|
| $1 \times 10^{-6}$ M | 44 $\pm$ 4,2  | 30 $\pm$ 4,5   |
| $1 \times 10^{-7}$ M | 14 $\pm$ 2,2  | 26 $\pm$ 2,7   |
| $1 \times 10^{-8}$ M | 8 $\pm$ 3,5   | 21 $\pm$ 2,7   |

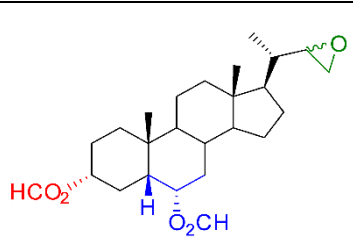
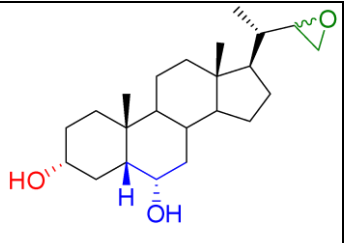
- Actividad

+ Actividad

Se observa desde la Tabla 15 que la mezcla **26a/26b** presentó la mayor actividad, con un promedio de 72% de aumento, comparado con el control negativo (agua) con un ángulo de 7 $\pm$ 4,5.

Si se comparan los resultados observados entre las mezclas de los análogos **26a/26b** y **27a/27b**, su esqueleto es el mismo, lo único que difieren es en los grupos funcionales del anillo A y B. En el caso de **27a/27b** se encuentran dihidroxilado en C-3 y C-6, en cambio en **26a/26b**, se encuentran diformilados. Ambas cadenas se encuentran dihidroxiladas en C-22 y C-23. La proporción entre los epímeros *S*:*R* fue de 5:1 en **26a/26b** y 7:1 para **27a/27b**. La diferencia entre las actividades biológicas podría estar asociada sólo al cambio de las funciones orgánicas en las posiciones C-3 y C-6.

**Tabla 16.** Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados  $\pm$  DS) para la serie **28a/28b** y **29a/29b** a las concentraciones de  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M.

|                      | <br><b>28a/28b</b> | <br><b>29a/29b</b> |
|----------------------|---|--|
| $1 \times 10^{-6}$ M | 21 $\pm$ 1,0  | 28 $\pm$ 2,9   |
| $1 \times 10^{-7}$ M | 20 $\pm$ 0,0  | 30 $\pm$ 0,0   |
| $1 \times 10^{-8}$ M | 20 $\pm$ 1,6  | 17 $\pm$ 2,4   |

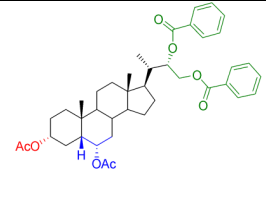
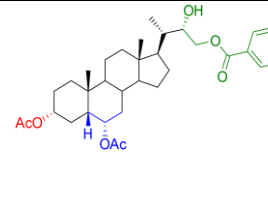
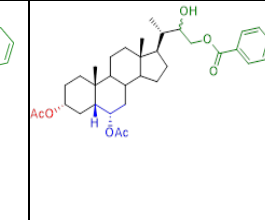
- Actividad

+ Actividad

En la Tabla 16 cabe destacar, que las mezclas de los análogos **28a/28b** y **29a/29b** superan al control negativo. La mezcla que presentó mayor actividad fue **29a/29b**, superando en un 77% al control negativo a una concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M.

Si se comparan las mezclas de los análogos **28a/28b** y **29a/29b**, su esqueleto es el mismo, lo único que difieren es en los grupos funcionales del anillo A y B. En el caso de **28a/28b** se encuentran diformilados en C-3 y C-6 y en **29a/29b** se encuentran dihidroxilados. Ambas cadenas se encuentran epoxidadas en C-22 y C-23.

**Tabla 17.** Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados  $\pm$  DS) para la serie **35a/35b**, **35a** y **36a** a las concentraciones de  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M.

|                      |  |  |  |
|----------------------|---|--|---|
|                      | <b>36<sup>a</sup></b>   | <b>35a</b>   | <b>35a/35b</b>  |
| $1 \times 10^{-6}$ M | 23 $\pm$ 2,1  | 49 $\pm$ 2,5   | 46 $\pm$ 2,9  |
| $1 \times 10^{-7}$ M | 25 $\pm$ 1,0  | 48 $\pm$ 2,9   | 50 $\pm$ 2,5  |
| $1 \times 10^{-8}$ M | 6 $\pm$ 2,5   | 20 $\pm$ 1,0   | 68 $\pm$ 2,5  |

- Actividad

+ Actividad

En la Tabla 17 Cabe destacar, que los resultados para el análogo puro **35a**, son similares en la respuesta para la concentración  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-7}$ , sin embargo **35a/35b** a menor concentración, la mezcla entre los epímeros provoca una mayor elongación en el ángulo de apertura de la lamina de arroz. El análogo **36a** es el que presenta menos apertura, posiblemente por la benzoilación de C-22.

La mezcla **35a/35b** fue la que presentó mayor actividad en todas las concentraciones,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$ , superaron el control negativo en un 84%, 86% y 88 %, respectivamente. La proporción de los derivados en la mezcla fue establecida como S:R = 1,0:0,4 entre los epímeros.

Si comparamos la mezcla anterior con **35a** este posee en su cadena lateral configuración C-22 (S), a diferencia de **35a/35b** el cual posee ambas configuraciones (S/R), lo que puede causar el aumento del ángulo en está mezcla. Si comparamos sus actividades a la concentración de  $1 \times 10^{-7}$  la actividades de ambos superan al control negativo y la respuesta de ellos es similar, siendo la mejor **35a/35b** con una actividad de 86% en comparación de 85% de **35a**.

Si se comparan los análogos **35a** y **36a**, su esqueleto es el mismo, lo único que difieren es en los grupos funcionales presentes en la cadena lateral. En el caso de **36a** se encuentra benzoilado en C-22 y C-23 y en **35a** se encuentra hidroxilado en C-22 y benzoilado en C-23. Ambos son productos puros con configuración C-22 (*S*). El análogo **35a** obtiene mejor resultado debido a su cadena lateral hidroxilada en C-22, en cambio el análogo **36a** tiene bloqueada esta posición, con un grupo benzoílo.

Con respecto a la bibliográfica citada, la actividad según la función hidroxilada en el anillo A y B, cumple con el requerimiento como promotor del crecimiento, aumentando su actividad. Como fue demostrado por *Brosa et al.* de la actividad biológica de los análogos **III**, **IV**, **VIII** y **IX** (Figura 8), demostraron obtener el mismo rango de actividad. Esta actividad fue medida a través del ensayo de RLIT, de la variedad de Bahía. Con respecto a este estudio, coincide el resultado obtenido con la mezcla de los análogos **27a/27b** a la concentración de  $1 \times 10^{-6}$  [M], ya que la función dihidroxilada se encuentra presente en C-3 y C-6 de los anillos A y B.

En el análogo **VIII** la fusión de los anillos A/B es de tipo *trans* y en el anillo A posee la función diol  $2\alpha$  y  $3\alpha$ , en cambio el análogo **IX** la fusión de anillo A/B es de tipo *cis* y en el anillo A posee la función diol  $2\beta$  y  $3\beta$  a pesar de las diferencias estructurales, ambos presentaron el mismo valor de 94% como resultado en la actividad biológica medida a través de RLIT, demostrando que la alta actividad biológica depende principalmente de las interacciones de los grupos funcionales que se encuentren en los anillos, independiente que sus anillos contengan fusiones de tipo *cis* o *trans*. [49]. Esto está en acuerdo con la actividad observada a la concentración de  $1 \times 10^{-6}$  [M] para la mezcla de análogos **27a/27b**.

En otro estudio reportado por *Espinoza L.* [47] el análogo **V** (Figura 9) demostró actividad biológica ensayada en los tests de elongación de hipocótilos y expansión de cotiledones del rábano. Si se compara este análogo con las mezclas de los análogos **27a/27b** y **26a/26b**, estructuralmente ambos poseen con una cadena lateral C-22 y C-23 dihidroxilada, siendo la mezcla **26a/26b** uno de los más activa en promedio en el ensayo de RLIT. Sin dejar de lado el análogo **35a/35b** el cual es el más activo en promedio en el ensayo de RLIT, aunque no esté dihidroxilado en C-22 y C-23, pero sí se encuentra mono hidroxilado en C-22.

Finalmente, los análogos que obtuvieron un promedio mayor, se destacan por poseer, grupos hidroxilados en la cadena lateral C-22 y C-23, o benzoilado en C-23, y diformilados o diacetilados en los anillos A y B en C-3 y C-6.

Luego del primer análisis y de los resultados observados en los ensayos biológicos, se realizaron las pruebas *in vitro* de germinación para las mezclas de análogos **26a/26b**, **27a/27b** y el análogo puero **35a**, con y sin la presencia de Cu (metal pasado)

## Resultados y discusión de la evaluación de los análogos de brasinoesteroides sintetizados en los parámetros de germinación.

Los parámetros del proceso de germinación evaluados para las mezclas epiméricas de análogos **26a/26b** y **27a/27b**, el análogo puro **35a** y el BRs natural **1** fueron: porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación (MT), tasa de germinación (MR) y peso seco (PS) de la plántula germinada para cada tratamiento **(ANEXO 6)**.

Para cada análisis se trabajó con diferentes concentraciones  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M de los análogos y el brasinólido (**1**), con y sin la adición de Cobre (II) a la concentración de  $80 \mu\text{M}$ , como fue mencionado anteriormente en la metodología.

---

### Porcentaje de germinación.

---

Los resultados obtenidos en relación al porcentaje de germinación con los análogos de BRs fueron positivos para las mezclas de epímeros **26a/26b** y **27a/27b**, el análogo puro **35a** y el control positivo el **1**, en todas las concentraciones aplicadas sin y con sulfato de Cobre (Tabla 18). Si bien no hubo diferencia significativa entre ellos, los porcentajes obtenidos tienen una tendencia a aumentar y acelerar la germinación cuando la mezcla de análogos **26a/26b** se encuentran a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-7}$  [M]. Se puede observar que, comparando con el control negativo cuando solo se aplicó agua, todos los análogos superaron el porcentaje de germinación, siendo los más efectivos en promover la germinación en un 100% las mezclas **27a/27b** a  $10^{-8}$  [M] y **26a/26b** a  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  [M], estos resultados fueron similares a la respuesta del **1** a  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  [M], el cuál fue utilizado como control positivo.

Los análogos que resultaron superiores al control negativo que presenta solo aplicación de  $\text{CuSO}_4$  y que obtuvieron un 100% de germinación fueron las mezclas **27a/27b** a  $1 \times 10^{-6}$  [M], **26a/26b** a  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-7}$  [M], y el compuesto puro **35a** a  $1 \times 10^{-8}$  [M]. Cabe destacar que la mezcla de epímeros **26a/26b**, fue efectiva en ambos casos con y sin la aplicación del  $\text{CuSO}_4$  (ver Tabla 18).

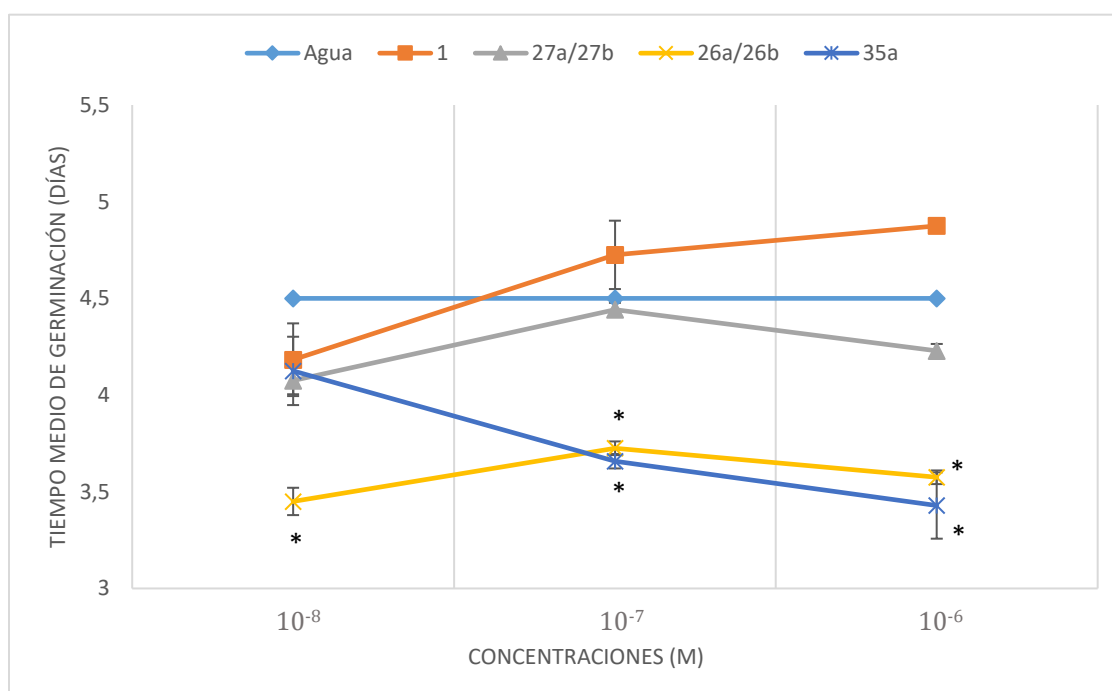
**Tabla 18.** Efecto en el porcentaje de germinación obtenido por el **1**, las mezclas de epímeros **26a/26b**, **27a/27b** y el análogo puro **35a** con y sin la adición de sulfato de cobre.

| Porcentaje de germinación (%)                    |   |                      |                      |                      |
|--|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| Soluciones                                       | Tratamientos                                  | Concentraciones      |                      |                      |
|  |   | 1x10 <sup>-6</sup> M | 1x10 <sup>-7</sup> M | 1x10 <sup>-8</sup> M |
| H <sub>2</sub> O                                 | <b>1</b>                                      | 100±0,0              | 100±0,0              | 98±3,5               |
|  | <b>26a/26b</b>                                | 100±0,0              | 100±0,0              | 100±0,0              |
|  | <b>27a/27b</b>                                | 98±3,5               | 95±7,1               | 100±0,0              |
|  | <b>35a</b>                                    | 83±24,7              | 95±0,0               | 98±3,5               |
|  | H <sub>2</sub> O                              | 90±0,0               |                      |                      |
| H <sub>2</sub> O +<br>CuSO <sub>4</sub> 80<br>μM | <b>1</b>                                      | 98±3,5               | 95±0,0               | 100±0,0              |
|  | <b>26a/26b</b>                                | 100±0,0              | 100±0,0              | 95±7,1               |
|  | <b>27a/27b</b>                                | 100±0,0              | 98±3,5               | 90±7,1               |
|  | <b>35a</b>                                    | 98±3,5               | 95±0,0               | 100±0,0              |
|  | H <sub>2</sub> O + CuSO <sub>4</sub><br>80 μM | 98±3,5               |                      |                      |

### Tiempo Promedio de germinación.

Con respecto al tiempo promedio de germinación se puede observar una diferencia significativa entre las mezclas de los análogos evaluados en ambos casos con y sin la adición de  $\text{CuSO}_4$  (Gráfico 1 y 2).

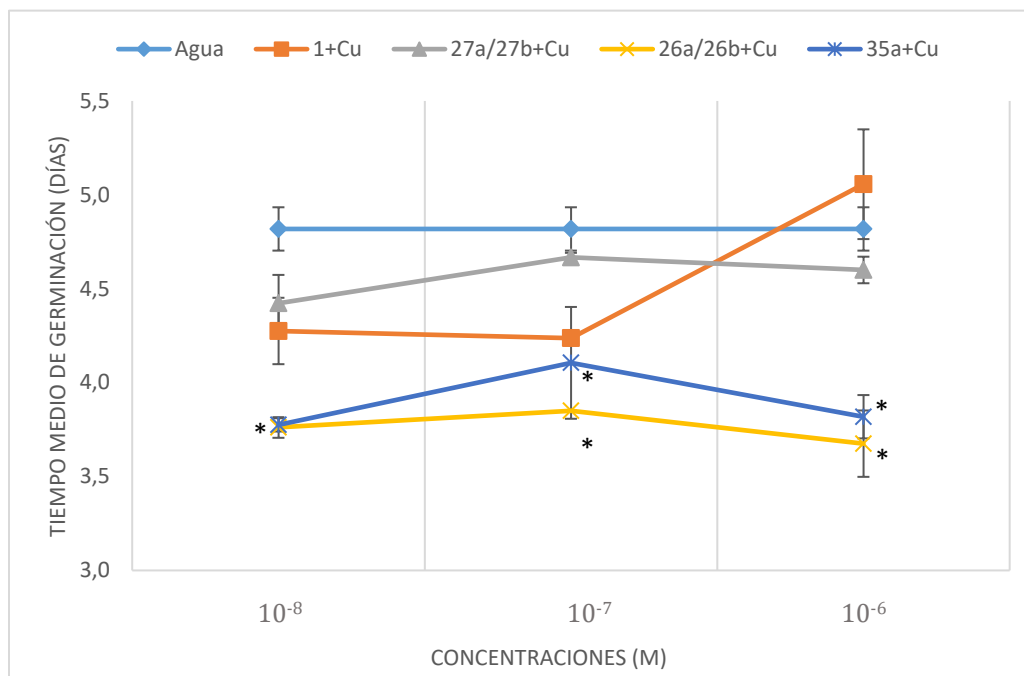
En el Gráfico 1, se observa que el control negativo en que solo se aplicó agua, tarda 4,5 días en germinar, en cambio la mezcla de análogos **26a/26b** a  $1 \times 10^{-8}$  M y el análogo puro **35a** a  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M, aceleraron el tiempo de germinación. Entre ellos la mezcla de análogos **26a/26b** fue más significativa presentando un promedio de 3,6 días de un total de 5 que duró el experimento.



**Gráficos 1.** Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del **1**, las mezclas de análogos **26a/26b** y **27a/27b** y el análogo puro **35a**, en comparación al control negativo (agua). \* indica los análogos más significativos.

En el Gráfico 2, se puede observar que el control negativo que presenta la adición de  $\text{CuSO}_4$  en la solución, tarda 4,8 días en germinar, en cambio la presencia de la mezcla de epímeros **26a/26b** a  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  [M] y el análogo puro **35a** a  $1 \times 10^{-8}$  [M] presentan valores menores

acortando el tiempo de germinación. La mezcla de análogos **26a/26b** es la más significativa con un promedio de 3,8 días de un total de 5, que duró el experimento.

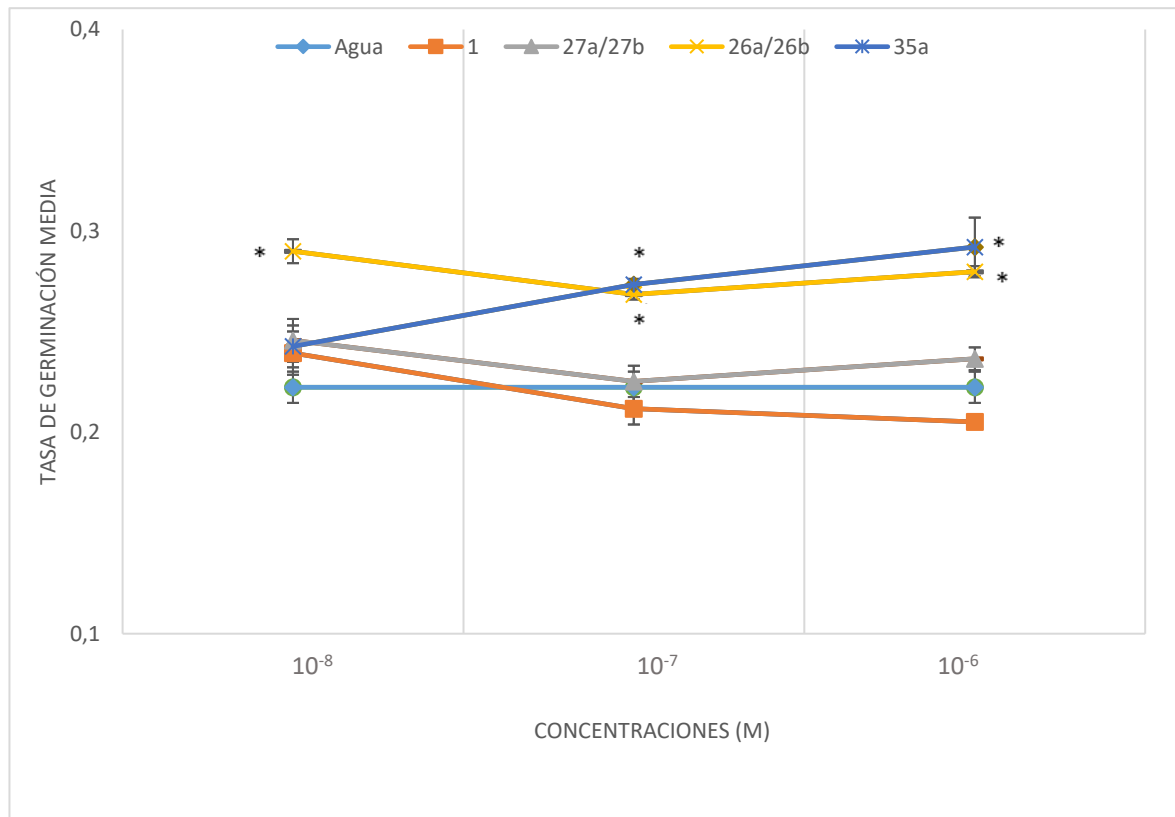


**Gráficos 2.** Efectos sobre tiempo promedio de germinación de **1**, las mezclas de análogos **26a/26b** y **27a/27b**, y el análogo puro **35a**, con control negativo (agua + CuSo<sub>4</sub> a 80um). \*indica los análogos más significativos.

### Tasa de germinación

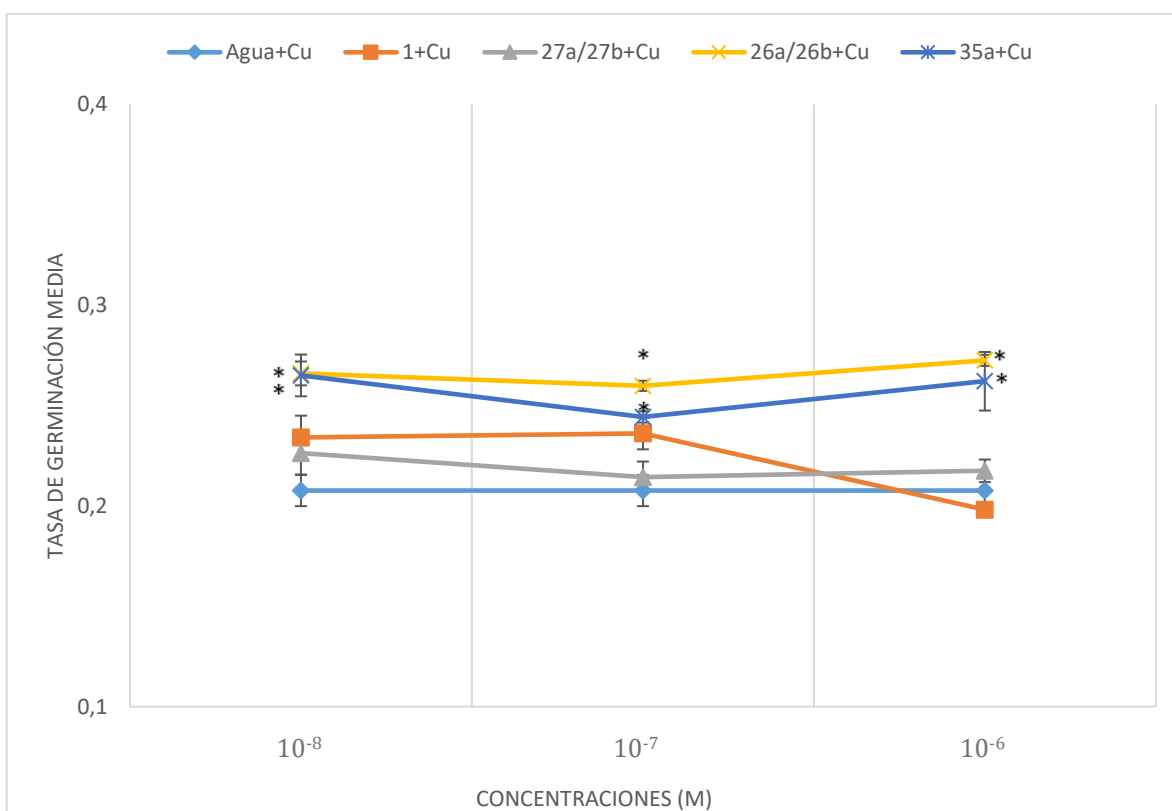
En relación al parámetro de tasa de germinación, la cual está directamente relacionada con el porcentaje de germinación y el tiempo promedio de germinación de las semillas, se observa una clara tendencia que indica que la mezcla de epímeros **26a/26b**, con y sin  $\text{CuSO}_4$  es la más activa para ser utilizado en la promoción de la germinación en este cultivo (Tomate) (Ver Gráficos 3 y 4)

Se observa desde el Gráfico 3, que los análogos más activos, y que fueron significativos estadísticamente frente al control negativo, fueron la mezcla de epímeros **26a/26b** a  $1 \times 10^{-8}$  [M] y el análogo puro **35a** a  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  [M], alcanzando un promedio de tasa de germinación de 0,24 y 0,28 respectivamente.



**Gráficos 3.** Efectos sobre la tasa de germinación de **1**, las mezclas de análogos **26a/26b** y **27a/27b** y el análogo puro **35a**, en comparación con el control negativo agua. \*indica los análogos más significativos.

De forma similar, para el caso de los tratamientos que presentaban la adición de cobre en la mezcla de epímeros **26a/26b** a  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  [M] presenta diferencias significativas versus el control, con un promedio de tasa de germinación de 0,27 siendo superior a todos los análogos en todas las concentraciones aplicadas (Ver Gráfico 4).



**Gráficos 4.** Tiempo medio de germinación en días v/s el **1**, las mezclas de análogos **26a/26b** y **27a/27b** y el análogo puro **35a**, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80 $\mu\text{m}$ ). \*son los análogos más significativos.

### Peso Seco de semillas germinadas.

Este estudio está directamente relacionado a determinar el efecto de los análogos en el proceso de germinación de las semillas, sin embargo, como datos complementarios se evaluó el peso seco de las semillas germinadas (considerando crecimiento de radícula y algunos primordios foliares, ver Anexo 4) de los diferentes tratamientos. En la Tabla 18 no se observa diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, sin embargo, se puede indicar que existe una tendencia a que los mayores promedios en el peso seco fueron obtenidos cuando las semillas habían sido aplicadas con los análogos de BRs en presencia de  $\text{CuSO}_4$  (ver Tabla 19)

Si comparamos entre ellos las mezclas de análogos **26a/26b** y **27a/27b**, obtuvieron el mayor peso seco con un promedio de 43 mg para el ensayo sin presencia de cobre y 45 mg con la adición de cobre (ver Tabla 19).

**Tabla 19.** Efecto sobre el peso seco posterior a la germinación de cada tratamiento con el **1**, mezcla de análogos **26a/26b** y **27a/27b** y el análogo puro **35a**,

| Peso seco (mg)                                |  |                     |                    |                    |
|---|--|---------------------|--------------------|--------------------|
| Solución                                      | Tratamientos                               | Concentraciones (M) |                    |                    |
|   |  | $1 \times 10^{-6}$  | $1 \times 10^{-7}$ | $1 \times 10^{-8}$ |
| H <sub>2</sub> O                              | <b>1</b>                                   | 44,4±2,5            | 49,9±5,0           | 40,9±4,9           |
|   | <b>26a/26b</b>                             | 40,1±4,2            | 44,3±3,6           | 45,2±2,1           |
|   | <b>27a/27b</b>                             | 46,7±4,5            | 39,3±3,9           | 43,6±1,9           |
|   | <b>35a</b>                                 | 37,4±10,2           | 39,4±0,4           | 46,1±1,5           |
|   | H <sub>2</sub> O                           | 39,1±4,0            |                    |                    |
| H <sub>2</sub> O + CuSO <sub>4</sub><br>80 μM | <b>1</b>                                   | 44,6±1,7            | 42,0±0,4           | 45,2±0,4           |
|   | <b>26a/26b</b>                             | 47,8±5,7            | 45,3±3,1           | 42,0±3,0           |
|   | <b>27a/27b</b>                             | 44,4±1,8            | 43,4±0,3           | 36,1±5,2           |
|   | <b>35a</b>                                 | 46,1±2,8            | 42,8 ±1,8          | 43,8±1,2           |
|   | H <sub>2</sub> O + CuSO <sub>4</sub> 80 μM | 40,2±0,0            |                    |                    |

Finalmente se demuestra a través de todos estos resultados estadísticos, que la mezcla de análogos **26a/26b** fue la más activa en los diferentes estudios biológicos.

Como se mencionó en bibliografía, los brasinoesteroides cumplen con diferentes funciones biológicas ya sea aumentando el crecimiento, combatiendo contra el estrés abiótico y biótico, contaminación de metales pesado y germinación [11]. En los que destacan los brasinoesteroides 24-epibrasinólido (**2**) y 28-homobrasinólido (**5**), por inhibir el estrés de diferentes metales pesados, ya sea mejorando el crecimiento o germinación [67] (Tabla 1).

Desde un punto de vista estructural presente en los BRs, y para una mejor actividad, se requiere de una cadena lateral con función cis glicol en los carbonos C-22 y C-23 preferentemente con configuraciones 22, 23-R y un grupo sustituyente de tipo metilo o etilo en el carbono C-24 [21,58]. En este estudio la mezcla de análogos más activa fue **26a/26b**, solo cumple con un requerimiento, como la presencia de glicoles en los carbonos C-22 y C-23 con configuración mayoritaria S en C-22, lo que podría estar estimulando los resultados favorables en MT, MR y PS.

Si se compara desde el punto de vista estructural de las moléculas, en el estudio de *Sharma et al.* 2006 se demuestra que el 24-epibrasinólido (**2**) (brasinoesteroide natural) incrementó significativamente el porcentaje de germinación en un 96 % de *Brassica juncea* a una concentración de  $1 \times 10^{-9}$  M, cuando se encuentra presente un metal pesado (Zn) a 50 mg/L [71], siendo esta estructura más compleja y difícil de obtener por los numerosos pasos de la ruta sintética para su elaboración, en cambio en este estudio el análogo más activo fue la mezcla de epímeros **26a/26b**, que incremento el porcentaje de germinación en un 100% a las concentraciones de  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  [M], bajo la presencia de Cu a 20 mg/L, lo cual es muy favorable, dado que es una mezcla de epímeros de cadena corta, que requiere una síntesis con un menor número de pasos, y de fácil acceso, comparado con la ruta de síntesis requerida para obtener el 24-epibrasinólico (**2**)

En el caso de 28-homobrasinólido (**5**) en el estudio de *Raphanus Sativus* bajo el estrés producido por Cd a  $2 \mu\text{M}$ , se llegó a la conclusión que al aumentar la concentración de **5**, aumenta el porcentaje de germinación, la concentración de  $3 \times 10^{-6}$  M [75]. En el caso de la mezcla de análogos más activa **26a/26b**, bajo el estrés de Cu a  $20 \mu\text{M}$ , el porcentaje de germinación

aumento en todas las concentraciones aplicadas  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  [M], lo que es muy favorable, ya que a menores concentraciones se necesita menor cantidad del análogo y se obtiene la misma respuesta.

En relación a la síntesis, se destaca que la mezcla **26a/26b** es más simple de obtener, debido a la presencia de cadenas laterales más cortas, y no se requieren pasos adicionales de isomerización de los anillos A/B, ni de oxidaciones selectivas en el anillo B. La única similitud que tiene la mezcla de epímero **26a/26b** con **5**, es el grupo funcional que tienen en común, independiente del largo de cada cadena, ambas presentan la cadena lateral dihidroxilada en C-22 y C-23.

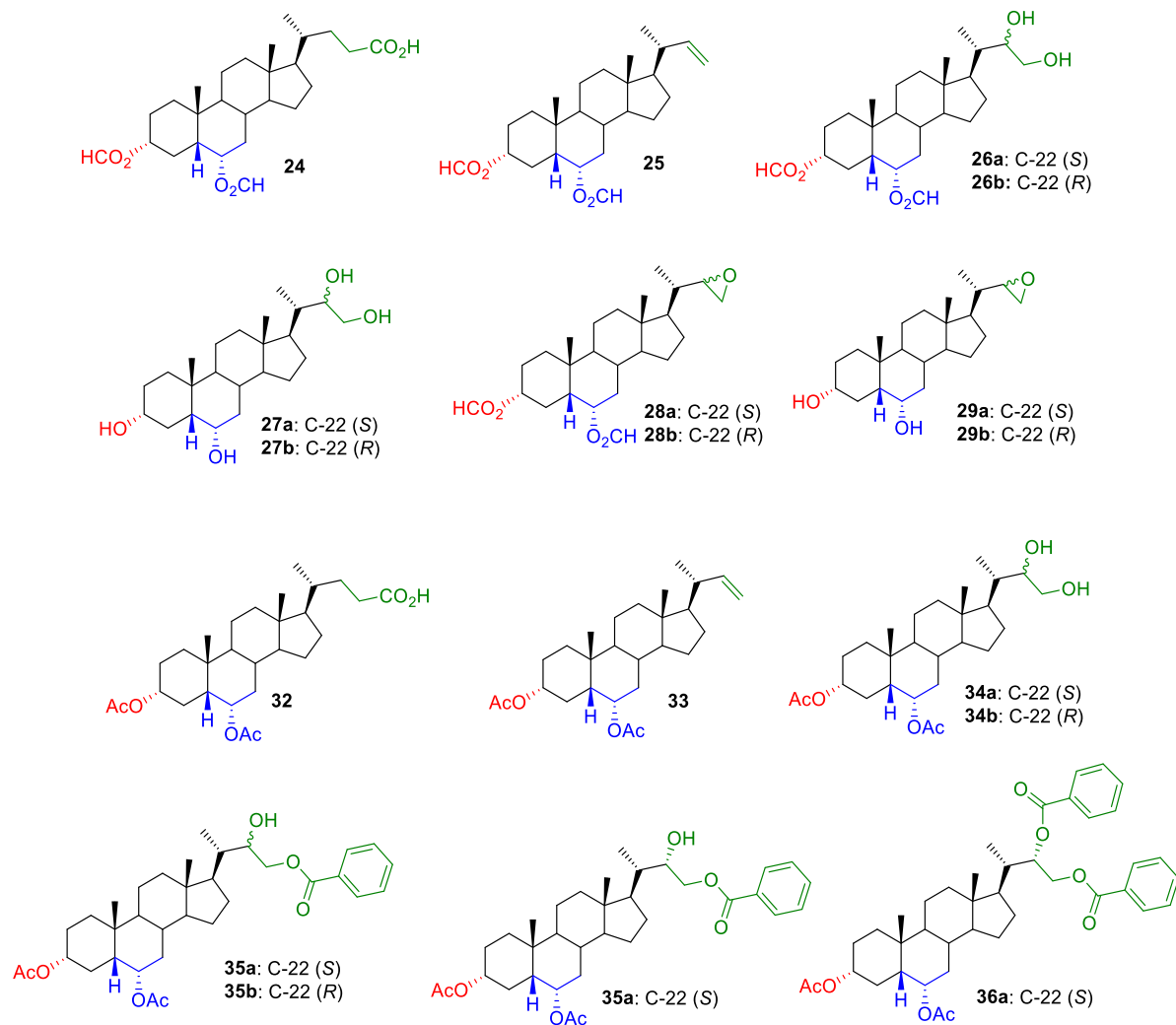
Considerando los datos referenciales [21,58, 34,35], se esperaba que la mezcla de epímero **27a/27b**, fuera el más activa, por la presencia de funciones hidroxiladas en C-3, C-6, C-22 y C-23, sin embargo, la respuesta sobre los parámetros de germinación fue menor probablemente debido a la influencia en la proporción de la mezcla de epímeros, predominando la relación *S* (7:1; *S/R*), convirtiéndose la mezcla **26a/26b**, en la más activa, ya que su configuración es de 5:1, predominando a cantidad de configuración *R*, la cual por bibliografía se conoce que es más activa. También se puede inferir, la importancia del grupo hidroxilo en C-22, pues los mejores resultados predominan para la mezcla de epímeros **26a/26b** y para el análogo puro **35a**, los cuales tienen en común este grupo funcional en la posición mencionada anteriormente.

## **CAPITULO 5- CONCLUSIONES**

---

Del trabajo realizado en esta tesis, se obtienen las siguientes conclusiones:

- Mediante diferentes rutas de síntesis, se obtuvo un total de 11 compuestos **24**, **25**, **26a/26b**, **27a/27b**, **28a/28b**, **29a/29b**, **32**, **33**, **34a/34b**, **35a/35b**, **35a** y **36b**, de los cuales 2 corresponden a nuevos análogos **35a** y **36a** (Figura 39)



**Figura 39.** Totalidad de los compuestos sintetizados en esta tesis. en el recuadro se destacan los 2 nuevos análogos de brasinoesteroides no reportados previamente en literatura

2. De los compuestos objetivos de esta tesis, se logró obtener la mezcla **27a/27b** con un rendimiento global de 89,9%, además de la mezcla de epóxidos **29a/29b** con un rendimiento de 93% y los benzoilados **35a** y **36a** con rendimientos globales de 11,3% y 9,1%, respectivamente.
3. En algunas de las reacciones se obtuvieron los productos principales como mezclas de epímeros y productos secundarios, sin embargo, utilizando técnicas de separación por CC y por gradiente de polaridades, se aisló casi la totalidad de los productos obtenidos. Todos los productos finales e intermedios de síntesis fueron caracterizados mediante el uso de técnicas espectroscópicas, tales como  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC, IR y EMAR.
4. Se obtuvieron los nuevos análogos benzoilados **35a** y **36a**. La estereoquímica absoluta en C22 (*S*) de estos análogos fue determinada mediante correlaciones espectroscópicas de  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC, con análogos de estructuras similares reportados previamente.
5. De un total de 6 compuestos evaluados, se demostró que los análogos **26a/26b**, **27a/27b**, **35a/35b** y **35a** promueven la elongación celular vegetal. Estos compuestos, cumplen la hipótesis planteada por esta investigación, que análogos de brasinoesteroides con cadena lateral tipo 24-nor, con grupos hidroxilados y configuración C22 (*S*), son capaces de promover la elongación celular vegetal.
6. En la actividad biológica evaluada de elongación celular vegetal, la mezcla de epimeros **35a/35b** presentó la mayor actividad, con un promedio de 86% de incremento, comparado con el control negativo (agua) con un ángulo de  $7\pm 4,5$ .
7. En este estudio se obtuvieron resultados positivos en RLIT con función de anillo A/B *cis*, a pesar que en bibliografía se favorecía a la actividad la función A/B *trans*. Esto resulta favorable para la síntesis, ya que es complejo llegar a una función *trans*, y como escribió *Brosa et al.* es más importante su grupo funcional que su conformación *cis* o *tras*.

8. Finalmente, los análogos que obtuvieron un mayor promedio en RLIT, se destacan por poseer, grupos hidroxilados en la cadena lateral C-22 y C-23, o benzoilado en C-23, y diformilados o diacetilados en los anillos A y B en C-3 y C-6.
9. De esto se puede inferir que, en la cadena lateral, los compuestos monobenzoilados e hidroxilados, son los más activos que los compuestos dibenzoilados y epoxidados. Y la posición hidroxilada en la cadena lateral C-22, favorece la actividad como promotoras de la elongación vegetal.
10. En presencia de los análogos la radícula de las semillas es más larga, esto se debe a que los Brs actúan como estimulador, y protegen a la planta del estrés abiótico producido por el  $\text{CuSO}_4$  haciendola mas tolerante a este tipo de condiciones .
11. En este estudio la mezcla de análogos más activa en parámetros de germinación fue **26a/26b**, solo cumple con un requerimiento estructural a los planteados en los antecedentes, como la presencia de glicoles en los carbonos C-22 y C-23 con configuración mayoritaria *S* en C-22, lo que podría estar estimulando una mejor respuesta en los parámetros de germinación, en MT fue **26a/26b** con 3,8 días sin cobre y 3,6 días con cobre, en MR fue **35a** con 0,28 de tasa sin cobre y **26a/26b** con 0,27 de tasa con cobre y en PS fue **26a/26b** con 43 mg sin cobre y **27a/27b** 45 mg con cobre.
12. Finalmente se demuestra, que el análogo mezcla de epímeros **26a/26b** y análogo puro **35a** con variaciones estructurales en la cadena lateral del tipo 24-norcolanos, con fusión de anillos A/B de tipo *cis*, al ser agregado en forma exógena, aceleran el Tiempo Promedio de germinación (MT) y mejoran Tasa de germinación (MR) de las semillas de *Lycopersicum sp.* con y sin la presencia de metal pesado Cobre (Cu).

## **REFERENCIAS**

---

- [1] www.plantcell.org, accessible en Junio **2011**.
- [2] Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A. & Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth, *Nature Chemical Biology*, **2009**, 5, 301-307.
- [3] Sachs, J., Stoff und Form der Pflanzenorgane. *Arb. Bot. Inst. Würzburg* **1880**, 2, 452-488.
- [4] Darwin, C. The Power of Movement in Plants, *John Murray*, London, **1880**.
- [5] Jun, J. H., Fiume, E., & Fletcher, J. C. The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cell. Mol. LifeSci.* **2008**, 65, 743-755.
- [6] Fukuda, H. and Higashiyama, T. Diverse functions of plant peptides: entering a new phase. *Plant Cell Physiol.* **2011**, 52, 1-4.
- [7] Squeo, F.A. & Cardemil, L. Fisiología vegetal, 1ed, La Serena, Chile, **2006**.
- [8] Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R., Smith, M. V. Brassins-a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen, *Nature*, **1970**, 225, 1065-1066.
- [9] Grove, M. D., Spencer, F. G., Rohwedder, W. K., Mandava, N. B., Worley, J. F., Warthen Jr., Steffens, G. L., Flippen-Anderson, J. L., Cook Jr., J. C. Brassinolide, a plant growth promoting steroid isolated from Brassica napus pollen, *Nature*, **1979**, 281, 216-217.
- [10] Hamada, K. Brassinolide in crop production. In: Maegregor. Plant growth regulators in agriculture, *Food Fertl Technol Cent Asia PacReg*, **1986**, 190-196.
- [11] Clouse, S.D., Sasse, J.M. Brassinosteroid: Essential Regulators of Plant Growth and Development, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **1998**, 49, 427-451.
- [12] Fujioka, S., Yokota, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol*, **2003**, 54, 137-164.
- [13] Bajguz, A., Tretyn, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants, *Phytochemistry*, **2003**, 62, 1027-1046.
- [14] Teixeira M.A., Adam G., Brassinoesteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications, Braz, J. *Plant Physiol*, **2002**, 14, 143-181.
- [15] Clouse, S.D., Brassinosteroid signaling: novel downstream components emerge, *Curr. Biol*, **2002**, 12, 485-487.
- [16] Li, J.M., and Chory, J. A Putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction, *Cell*, **1997**, 90, 929-938.
- [17] Yokota, T. The structure biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci*, **1997**, 2, 137-143.

- [18] Clouse, S.D., Sasse, J.M. Brassinosteroid: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **1998**, 49, 427-451.
- [19] Abe, H. Advances in brassinosteroid research and prospects for its agricultural application. *Japan Pesticide Info*, **1989**, 55, 10-14.
- [20] Takematsu, T. Brassinolides for diminution of salt or herbicide damage to crops. *Jpn. KokaiTokkyoKoho* JP 63 66,104 [88 66,104] **1986**. [C. A. 109, 224716].
- [21] Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., de Groot, A.E. Brassinosteroids. A new class of plant hormones. *Academic Press*, San Diego, 219,1999.
- [22] Fujioka, S., Noguchi T., Yokota T., Takatsuto S., Yoshida S. Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry*, **1998**, 48, 595-599.
- [23] Schmidt, J., Porzel A., Adam G. Brassinosteroids and a pregnane glucoside from *Daucus carota*, *Phytochem Analysis*, **1998**, 9, 14-20.
- [24] Shim, J. H., Kim IS, Lee K.B., Suh YT., Morgan E.D. Determination of brassinolide in rice (*Oryza sativa* L.) by HPLC equipped with a Fluorescence detector, *Agric. Chem. Biotech*, **1998**, 39, 84-88.
- [25] Yokota, T., Higuchi K., Takahashi N., Kamuro Y., Watanabe T., Takatsuto S. Identification of brassinosteroids with epimerized substituents and/or the 23-oxo group in pollen and anthers of Japanese cedar. *Bioscience, Biotech and Biochem*, **1998**, 62, 526-531.
- [26] Bajguz, A., Tretyn, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, **2003**, 62, 1027-1046.
- [27] Hooykaas P.J.J. Hall M.A.. Libbenga K.R. Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones, *Elsevier Science*, **1999**, 1.
- [28] Zullo, M. A. T., Kohout, L., de Azevedo, M. B. M. Some notes on the terminology of brassinosteroids. *Plant Growth Regul*, **2004**, 39, 1-11.
- [29] Khripach, V., Zhabinskii, V., and Ae de Groot, Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones, *Roy Johnson*, San Diego: Academic Press,1999.
- [30] Ramírez, J. A., TemeCenturión, O. M., Gros, E. G., &Galagovsky, L. R. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroidanalogs, *Steroids*, **2000**, 65, 329-337.
- [31] Takatsuto, S., Yazawa, N. Y., Ikekawa, N., Takematsu, T., Takeuchi, Y., Koguchi, M. Structure-activity relationships of brassinosteroids, *Phytochemistry*, **1983**, 22, 2437-2441.

- [32] Thompson, M. J., Meudt, W. J., Mandava, N. B., Dutky, S. R., Lusby, W. R., Spaulding, D. W. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effect, *Steroids*, **1982**, 39, 89-105.
- [33] Takatsuto, S., Yazawa, N. Y., Ikekawa, N., Takematsu, T., Takeuchi, Y., Koguchi, M. Structure-activity relationships of brassinosteroids, *Phytochemistry*, **1983**, 22, 2437-2441.
- [34] Voigt, B., Porzel, A., Golsch, D., Adam, W., & Adam, G. Regioselectiveoxyfunctionalization of brassinosteroids by methyl (trifluoromethyl) dioxirane: Synthesis of 25-hydroxybrassinolide and 25-hydroxy-24-epibrassinolide by direct CH insertion, *Tetrahedro*. **1996**, 52, 10653-10658.
- [35] Takatsuto S., Ikekawa N., Morishita T., Abe H. Structure-activity relationship of brassinosteroids with respect to the A/B-ring functional groups, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1987**, 35, 211-216
- [36] Yokota, T., Kim, S. K., Fukui, Y., Takahashi, N., Takeuchi, Y., & Takematsu, T. Brassinosteroids and sterols from a green alga, "Hydrodictyonreticulatum": Configuration at C-24, *Phytochemistry*. **1987**, 26, 503-506.
- [37] Mandava, N. B. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. **1988**, 39, 23-52.
- [38] Okada, K., Mori, K. Stereoselective synthesis of dolicholide, a plant growth-promoting steroid, *Agricultural Biological Chemistry*. **1983**, 47, 925-926.
- [39] Kishi, T., Wada, K., Marumo, S., Mori, K. Synthesis of brassinolideanalogs with a modified ring B and their plant growth-promoting activity, *Agricultural and Biological Chemistry*. **1986**, 50, 1821-1830.
- [40] Takatsuto S, Ikekawa N, Morishita T, Abe H. Structure-activity relationship of brassinosteroids with respect to the A/B-ring functional groups, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1987**, 35, 211-216.
- [41] MiklósSzekeres y CsabaKoncz. Biochemical and genetic analysis of brassinosteroid metabolism and function in Arabidopsis, *Plant Physiol. Biochem.*, **1998**, 36, 145-155.
- [42] Seto, H., Fujioka, S., Koshino, H., Suenaga, T., Yoshida, S., Watanabe, S., Takatsuto, S. Epimerization at C-5 of brassinolide with sodium methoxide and the biological activity of 5-

- epibrassinolide in the rice lamina inclination assay, *Journal of Chemistry Society, Perkintranslations 1*. **1998**, 3355-3358.
- [43] Seto, H., Fujioka, S., Koshino, H., Suenaga, T., Yoshida, S., Watanabe, T., Takatsuto, S. 2,3,5-Triepi-brassinolide: preparation and biological activity in rice lamina inclination test, *Phytochemistry*. **1999**, 52, 815-818.
- [44] Richter, K., & Koolman, J. Antiecdysteroid effects of brassinosteroids in insects. In *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications. ACS Symp. Ser*, Washington, DC **1991**.
- [45] Espinoza, L., et al., Synthesis And Plant Growth-Actmty Of Three New Brassinosteroids Analogues, *Synth. Commun.*, **2000**, 30, 1963-1974
- [46] Voigt, B., Schmidt, J., and Adam, G., Synthesis of 24-Epiteasterone, 24-Epityphasterol and their B-Homo-6 $\alpha$ -Oxalactones from Ergosterol, *Tetrahedron*. **1996**, 52, 1997-2004.
- [47] Espinoza, L., y Cortés, M., Síntesis Y Actividad Biologica De Análogos De Brasinoesteroides, *Bol. Soc. Chil Quím.* **2002**, 47, 511-516
- [48] Pérez, R., Iglesias, M., et.al. Synthesis of Analogues of Brassinosteroids from Chenodeoxycholic Acid, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2405-2407.
- [49] Brosa, C., Capdevila J.M., and Zamora I., Brassinosteroids: A New Way to Define the Structural Requirements, *Tetrahedron*. **1996**, 52, 2435-2448.
- [50] Mori, K., Sakakibara, M., & Okada, K. Synthesis of naturally occurring brassinosteroids employing cleavage of 23, 34-epoxides as key reactions. Synthesis of brassinolide, castasterone, dolicholide, dolichosterone, homodolicholide, homodolichosterone, 6-deoxocastasterone and 6-deoxodolichosterone. *Tetrahedron*. **1984**, 40, 1767-1781.
- [51] Shozo, F., Takahiro, N., et.al., Activity of Brassinosteroids in the dwarf rice lamina inclination Bioassay, *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1841-1848.
- [52] Adam, G. Synthese von Brassinosteroiden. *Z. Chem.* **1987**, 11, 41-49.
- [53] Back, T.G. *Stereoselective synthesis of brassinosteroids. "Studies in Natural Product Chemistry"*, Atta-ur-Rahman, Amsterdam, The Netherlands, 1995
- [54] Jiang, B., Huang, L., Tian, W. and Zhou, W. *Methods for Construction of Sidechain of Brassionsteroids and Application to Syntheses of Brassionsteroids*, Elsevier Science, **1997**.
- [55] Zhou, W-S., Jiang, L-Z., Tian, W-S., Zhao, X-Y., and Zheng, X. Studies on Steroidal Plant-growth Regulator: VII. Synthesis of 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23, 24-dinor-B-homo-5 $\alpha$ -

- cholic acid and 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-24-nor-B-homo-5 $\alpha$ -cholic acid, *Acta Chimica Sinica*. **1988**, 6, 332-340.
- [56] Cerny, V., Strnad, M., Kaminek, M. Preparation of 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23,24-dinor-B-homo-5 $\alpha$ -cholic acid, its esters and amides as brassinolide analogues, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1986**, 51, 687-697.
- [57] Wang, Y., Luo, W., Xu, R., Zhao, Y., Zhou, W., Huang, L., and Shen, J. Biological Activity of Brassinosteroids and Relationship of Structure to Plant Growth Promoting Effects, *Chinese Science Bulletin*. **1994**, 39, 1573-1577.
- [58] Jiang, B., Huang, L., Tian, W., and Zhou, W. *Methods for Construction of Sidechain of Brassinosteroids and Application to Syntheses of Brassinosteroids*. In: "Structure and Chemistry (Part E)", *Atta-ur-Rahman, Ed., Elsevier*. **1997**, 245-287.
- [59] <http://www.memoriachilena.cl/602/w3-article-647.html>, acceso enero **2017**.
- [60] M. V. Kozlov, E. Haukioja, A. V. Bakhtiarov & D. N. Stroganov. Heavy metals in birch leaves around a nickel-copper smelter at monchegorsk, north western Russia, *Environ mental Pollution*, **1995**, 90, 291-299.
- [61] Proyectos Fondef N°D0111034 y Fondecyt N°1020129, Metales pesados en el suelo. USEPA **1993**.
- [62] INIA. Fuentes de contaminación con residuos de plaguicidas organoclorados y metales pesados en sectores agrícolas, regiones IV a XI. Informe Final. **1990**, Proyecto FIA 1/86.
- [63] Cárcamo V., *Tesis pregrado*, Evaluación de la eficacia de diferentes enmiendas en la rehabilitación de suelos ácidos y contaminados con metales y metaloides en el valle del Puchuncaví, región de Valparaíso. Universidad de Chile, Santiago, Chile, **2010**.
- [64] R. Ginocchio, V. Cárcamo, E. Bustamante, E. Trangolao, L. M. de la Fuente, A. Neaman. Efficacy of fresh and air-dried biosolids as amendments for remediation of acidic and metal-polluted soils: A short-term laboratory assay, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2013**, 13, 855-869.
- [65] Ginocchio R. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncaví Valley, Chile, *Chemosphere*. **2000**, 41,15-23.
- [66] Díez F.J., *Tesis Doctoral*, Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. Universidad de Santiago De Compostela, Santiago De Compostela, España, **2008**.

- [67] Sharma, P., and Bhardwaj, R., Effect of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth and heavy metal uptake in *Brassica Juncea* L.Gen. Appl. *Plant Physiology*. **2007**, 33, 59-73.
- [68] Sharma, P., and Bhardwaj, R., Effects of 24-epibrassinolide on growth and metal uptake in *Brassica juncea* L. under copper metal stress. *Acta Physiol Plant*. **2007**, 29, 259–263.
- [69] Hayat, S., Nasser, M., Aiman, S., Foliar spray of brassinosteroid enhances yield and quality of *Solanumlycopersicum* under cadmium stress, *Saudi Journal of Biological Sciences*. **2012**, 19, 325–335.
- [70] Bajguz, A., Suppression of *Chlorella vulgaris* Growth by Cadmium, Lead, and Copper Stress and Its Restoration by Endogenous Brassinolide. *Arch Environ Contam Toxicol*. **2011**, 60, 406–416.
- [71] Bajguz, A., Brassinosteroids and lead as stimulators of phytochelatinsynthesis in *Chlorella vulgaris*. *J. PlantPhysiol*. **2002**, 159, 321–324.
- [72] Takamura, N., Kasai, F., & Watanabe, M., Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae, *Journal of Applied Phycology*. **1989**, 1, 39-52.
- [73] Russian J. Effect of epibrassinolide on lipid peroxidative in *Pisumsativum* at normal aeration and under oxygen deficiency, *Plant Physiol*.**1996**, 43, 750-752.
- [74] Núñez, M., y Mazorra, L. M., Los brasinoesteides y la respuesta de las plantas al estrés, *Cultivos Tropicales*. **2001**, 22,19-26.
- [75] Anuradha, S., Rao, S.S.R., The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanussativus* L.) seedlings growing under cadmium stress. *Plant Soil Environ*. **2007**,53, 465–472.
- [76] Sharma,P., Bhardwaj R.,et.al. Effects of 28-homobrassinolide on nickel uptake, protein content and antioxidative defence system in *Brassica juncea*. *Biologia Plantarum*. **2008**, 52, 767-770.
- [77] Núñez, M., Mazorra, L. M.,et.al. Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos. una visión actualizada, *Cultivos Tropicales*. **2010**, 31, 56-65.
- [78] Volynets, A.P., Pschenichnaya, L.A., Manzhelesova, N.E., Morozik, G.V., and Khripach,V.A. The nature of protective action of 24-epibrassinolide on barley plants, *Pl.Grow. Regul. Soc. Am*. **1997**, 24, 133–137.
- [79] Emamverdian, A., Ding,Y., Mokhberdoran,F., and Xie, Y.,Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response, *The Scientific World Journal*. **2015**, 2015, 18.

- [80] Rajewska, I., Talarek, M., and Bajguz, A., Brassinosteroids and Response of Plants to Heavy Metals Action. **2016**, 7, 629.
- [81] Asami, T., et.al., "Characterization of Brassinazole, a Triazole Type Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor," *Plant Physiol.* **2000**, 123, 93-100.
- [82] Hartwig, T., et.al., "Propiconazole Is a Specific and Accessible Brassinosteroid (BR) Biosynthesis Inhibitor for Arabidopsis and Maize," *PLoSOne.* **2012**, 5, e36625.
- [83] Hoffmannová, L., et.al., Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health, *Bentham Science Publishers.* **2012**, 84-93.
- [84] Li, J., y Chory, L., "A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction," *Cell.* **1997**, 90, 929-938.
- [85] Tang, W., et.al., "PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1," *Nat. Cell Biol.* **2011**, 13, 124-131.
- [86] Bajguz, A. and Hayat, S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant Physiol. Biochem.* **2009**, 47, 1-8.
- [87] Bajguz, A. Blockade of heavy metal accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide, *Plant Physiol Biochem.* **2000**, 38, 797-801.
- [88] Janeczko, A., Koecieliński, J., Pilipowicz, M., Szarek-Lukaszewska, G. y Skoczowski, A. Protection of winter rape photosystem 2 by 24-epibrassinolide under cadmium stress, *Photosynthetica.* **2005**, 43, 293-298.
- [89] Bilkisu, A. A., Xiao-Gang, G., Ping- Lei, G. y Yong-Hua, Y. Brassinolide amelioration of aluminum toxicity in mungbean seedling growth, *J. Plant Nutr.* **2003**, 26, 1725-1734.
- [90] Ali, B.; Hayat, S., Fariduddin, Q. y Ahmad, A. 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*, *Chemosphere.* **2008**, 72, 1387-1392.
- [91] Alam, M., Hayat, S., Ali, B. y Ahmad, A. Effect of 28-homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*, *Photosynthetica.* **2007**, 45, 139-142.
- [92] Kanwar M.K., Bhardwaj R, et.al. Isolation and characterization of 24-Epibrassinolide from *Brassica juncea* L. and its effects on growth, Ni ion uptake, antioxidant defense of *Brassica* plants and in vitro cytotoxicity, *Acta Physiol. Plant.* **2013**, 1351-1362.

- [93] Fariduddin, Q. Yusuf, M. Hayat, S. Ahmad. A. Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant capacity and photosynthesis in Brassica juncea plants exposed to different levels of copper, *Environ. Exp. Bot.* **2009**, 66, 418-424.
- [94] Hasan, S. A., Hayat, S., Ali, B. y Ahmad, A. 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicerarietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants, *Environmental Pollution.* **2008**, 151, 60-66.
- [95] Wilbur A. G. Tomato production, processing and technology, 3<sup>th</sup> ed, **1991**.
- [96] Slimsted R. and Verheul M. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum mil.*) cultivars, *SCI*, **2009**, 89, 1255-1270.
- [97] [www.odepa.gob.cl](http://www.odepa.gob.cl), accesible en Julio **2020**.
- [98] Flaño A., Situación del tomate para consumo fresco, *ODEPA*, **2013**.
- [99] Ugur B. and Kaim A., Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*): a critical review, *Euphytica*, **2007**, 158, 1-9.
- [100] Doria J., Generalidades sobre las semillas: Su producción, conservación y almacenamiento., *Cultrop*, **2010**, 31, 74-85.
- [101] Torres A., Manual de cultivo del tomate al aire libre, *INIA*, **2017**.
- [102] Tom-Petersen A, Leser TD, Marsh T, Nybroe O. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiol Ecol.* **2003**, 46, 53-62.
- [103] Dell'Amico E, Mazzocchi M, Cavalca L, Allievi L, Andreoni V. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiol Res.* **2008**, 163, 671-683.
- [104] Tessier A, Campbel P, Bisson M. Sequential extraction procedure for the especiation of particulate trace metals. *Anal Chem.* **1979**, 51, 844-851.
- [105] Giller K, Witter E, McGrath S. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem.* **1998**, 30, 1389-1414.
- [106] Niklinska M, Chodak M, Laskowski R. Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biol Biochem.* **2005**, 37, 2185-2194.
- [107] Babich H, Stotzky G, Ehrlich H. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* **1980**, 8, 99-145.

- [108] Zucconi, F., Peram, A., Forte, M., De Bertolidi, M. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle.*, **1981**, 22, 54-56.
- [109] Celis J., Sandoval M., Zagal E. y Briones M., Efecto de la adición de biosólidos urbanos y de salmonicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca Sativa L.*) en un suelo patagónico., *R.C Suelo nutr. Veg.* **2006**, 6, 13-25.
- [110] Sobrero, M.C., Ronco, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas, G. Castillo, Ed., *Ottawa, Canadá.*, **2004**, 71-79
- [111] Iannacone, J., L. Alvarino, C. Caballero, y J. Sánchez. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana.*, **2000**, 64,139-146.
- [112] Iannacone J. y Alvarino L., Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares., *Agric. Téc.*, **2005**,65, 198-203.
- [113] Schteingart' C.D. and Hofmann A.F. Synthesis of 24-nor-5 $\beta$ -cholan-23-oic acid derivatives: a convenient and efficient one-carbon degradation of the side chain of natural bile acids, *Journal of LipidResearch.* **1988**,29, 1387- 1395.
- [114] Kenji Kihira, Yukari Morioka, and Takahiko Hoshita. Synthesis of (22R and 22s)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,22-trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acids and structure of haemulcholic acid, a unique bile acid isolated from fish bile, *Journal of Lipid Research.* **1981**, 22, 1181- 1187.
- [115] Zhou, W.-S. and Tian, Stereoselective synthesis of (22S,23S)-typhasterol from hydroxycholic acid. *Acta Chim. Sin.* (HuaxueXuebao), **1985**, 43, 1060-1067.
- [116] Tian. W.-S. Zhou, W.-S., Jiang, B., and Pan, X.-F. Preparation of 22R-and 22S,24,25,26,27,28-pentanorbrassinolides, *Acta Chim. Sin.* **1989**, 47, 1017-1021.
- [117] Yang Y. X., Zheng L. T., et.al. Síntesis de 5-alfa colestano-6-ona y sus actividades inhibitorias de la producción de NO en microglia activada: Descubrimiento de un nuevo inhibidor de la neuro inflamación, *BioorganicMed. Chem. Lett.* **2014**, 24, 1222-1227.
- [118] Ishiguro, M., Ikekawa, N. Stereochemistry of Electrophilic Reactions at the Steroidal C-22 Double Bond, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* **1975**, 23, 2860-2866.
- [119] Espinoza, L., Cortés, M. Síntesis y Actividad Biológica de Análogos de Brasinosteroides, *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2002**, 47, 511-516.

- [120] Espinoza, L. Synthesis of Four New Brassinosteroids Analogues 11-Oxo-Functionalized on C Ring, with 24-Nor Side Chain and Containing 5 $\alpha$ -Cholanic Acid Skeleton, *Org. Chem. Curr. Res.* **2015**, 4, 156.
- [121] Voigt, B., Porzel, A., Bruhn, C., Wagner, C., Merzweiler, K. Adam, G. Synthesis of 24-Epicathasterone and Related. Brassinosteroids with Modified Side Chain, *Tetrahedron.* **1997**, 53, 17039-17054.
- [122] Espinoza, L. *Tesis Doctoral*, Síntesis de análogos de Brasinoesteroides funcionalizado en el anillo C. Universidad Católica de Chile, Chile, **2002**.
- [123] Z. Wei-Shan, "The synthesis of brassinosteroids," *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 431-434.
- [124] Kvasnica, M., Oklestkova, J., Bazgier, V., Rarova, L., Berka, K, Strnad, M. Biological activities of new monohydroxylated brassinosteroid analogues with a carboxylic group in the side chain, *Steroids.* **2014**, 85, 58-64.
- [125] Herrera, H., Carvajal, R., Olea, A. F. and Espinoza, L. Structural Modifications of Deoxycholic Acid to Obtain Three Known Brassinosteroid Analogues and Full NMR Spectroscopic Characterization. *Molecules* **2016**, 21, 1139-1150.
- [126] Kvasnica, M. Oklestkova, J et.al. Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 8691-8701.
- [127] Heravi, M. M., Zadsirjan, V., Esfandyari, M., Baie, T. L. Applications of Sharpless asymmetric dihydroxylation in the total synthesis of natural products. *Tetrahedron Asymmetry.* **2017**, 28, 987-1043.
- [128] Robert J., Ouellette, J., David Rawn. Organic Chemistry Structure, Mechanism, Synthesis. *Elsevier* **2018**, 2, 625.
- [129] Khan, R. The Chemistry of Maltose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* **1981**, 39, 213-278.
- [130] K. Wada y S. Marumo, "Synthesis and Plant Growth-promoting Activity of Brassinolide Analogues," *Agric. Biol. Chem.* **1981**, 45, 2579-2585.
- [131] Ranal, M. García, D. Resende, W. et.al. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets, *Revista Brasil. Bot.* **2009**, 32, 849-855.

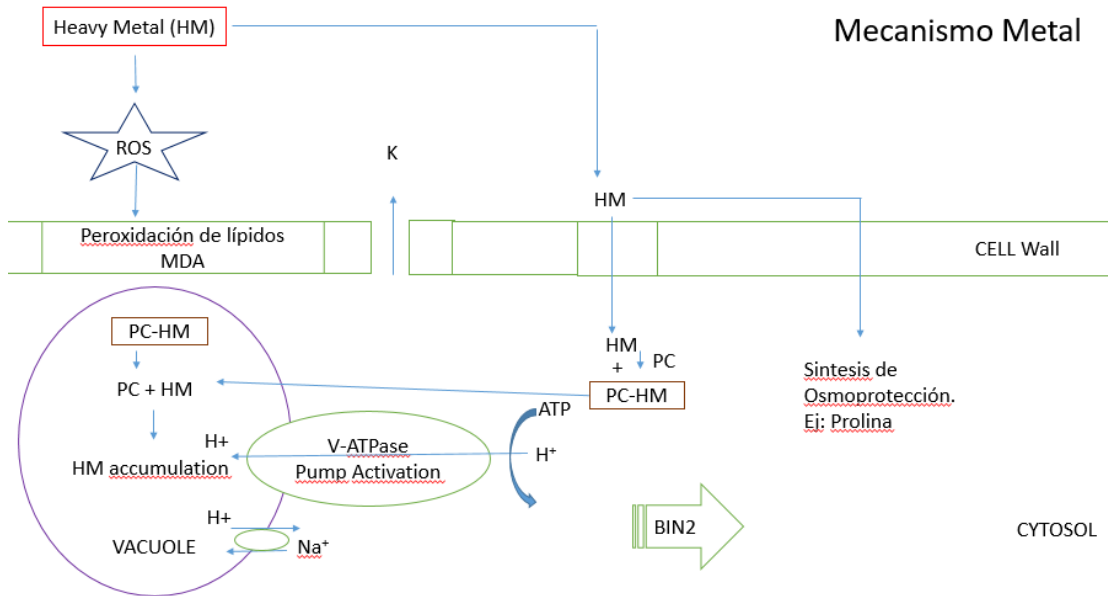
- [132] Carvajal, R., González, C., Olea, A. F., Fuentealba, M. and Espinoza, L. Synthesis of 2-Deoxybrassinosteroids Analogs with 24-nor, 22(S)-23-Dihydroxy-Type Side Chains from Hyodeoxycholic Acid. *Molecules* **2018**, 23, 1306-1321.
- [133] Robert J., Ouellette, J., David Rawn. Organic Chemistry Structure, Mechanism, Synthesis. *Elsevier* **2018**, 2, 625.
- [134] Duran M., *et al.*, "Synthesis of Five Known Brassinosteroid Analogs from Hyodeoxycholic Acid and Their Activities as Plant-Growth Regulators," *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18, 516.

## ANEXO

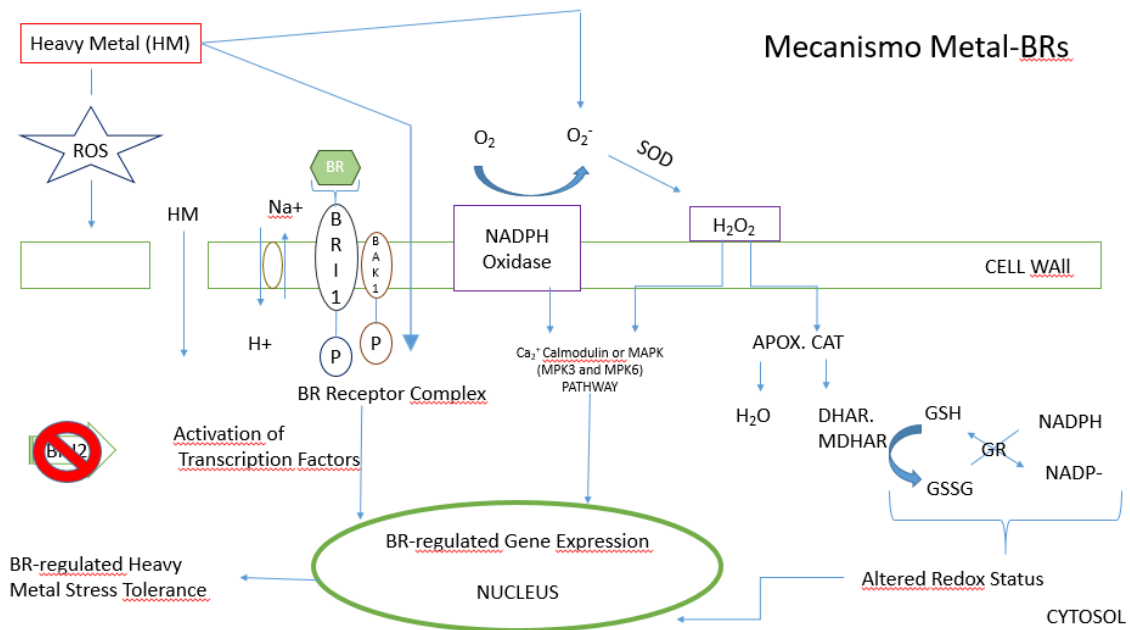
---

---

## 1. Mecanismo de acción de metales sin Brs.



## 2. Mecanismo de acción de metales con Brs, modificado.

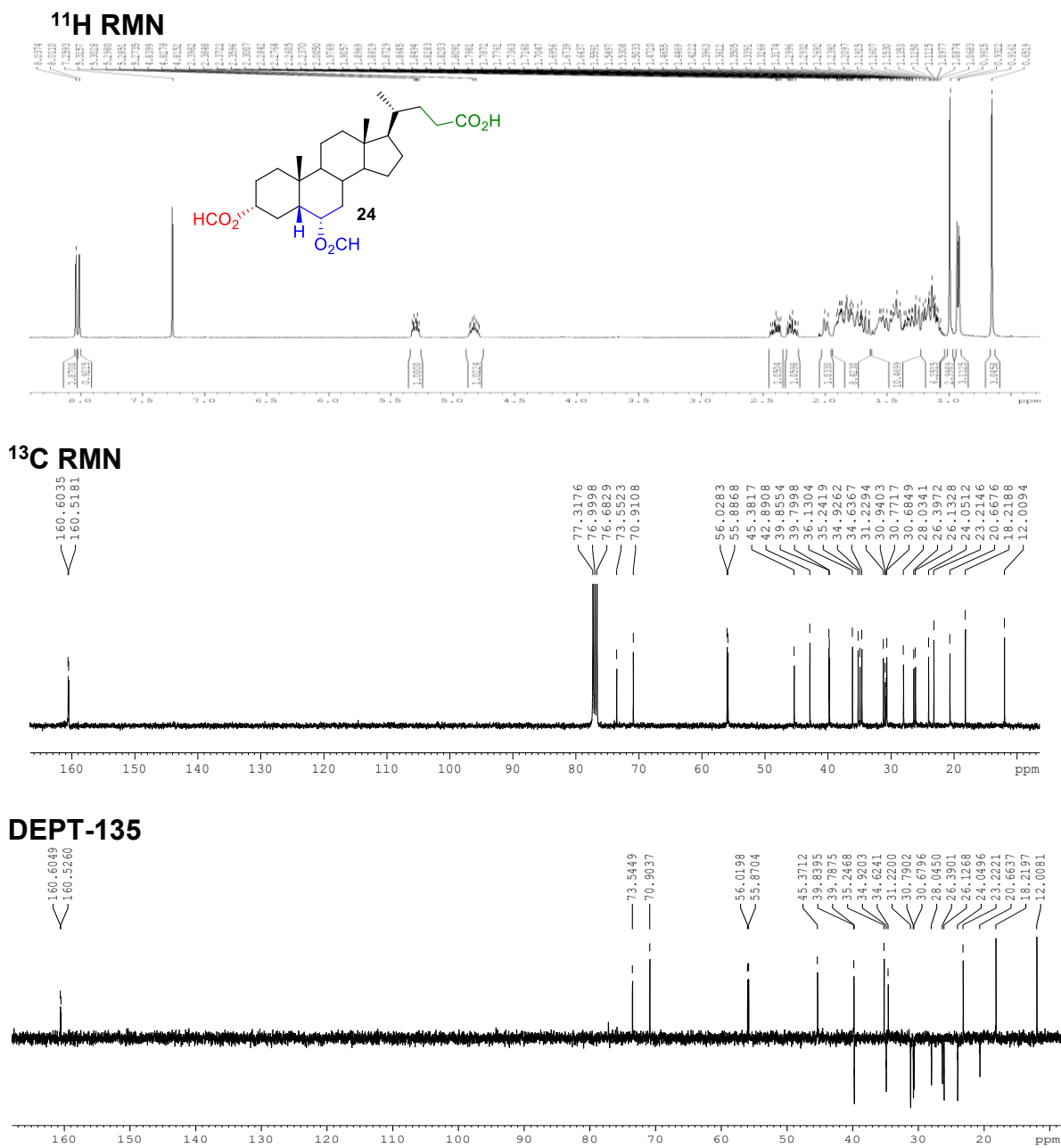


El BRs, es reconocido por un complejo proteico ubicado en la membrana denominado receptor BRI1, el cual codifica para una proteína quinasa receptora con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK), interactúa con BAK1 una proteína de señalización, este complejo receptor activa los factores de transcripciones hacia el núcleo, mientras tanto la proteína quinasa BIN2 permanece inactiva y por tanto se acumula en el núcleo las proteínas BES1 y BZR1 activando la expresión de los genes que se van a expresar para producir todas las propiedades fisiológicas y enzimas protectoras de la planta, incluyendo la modificación de la pared celular y el crecimiento. Se postula que los BRs aplicados exógenamente modifican el estado redox de la célula al activar enzimas NADPH oxidasa la cual cataliza una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular ( $O_2$ ) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua ( $H_2O$ ) o a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y regula las actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), acorbato peroxidasa (APOX), glutatona reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y monodehidroascorbato reductasa (MDHAR). El potencial redox puede ser re-establecido por medio de la reducción de peroxidación de fosfolípidos en la membrana celular o por acumulación de ciertos osmoprotectantes.

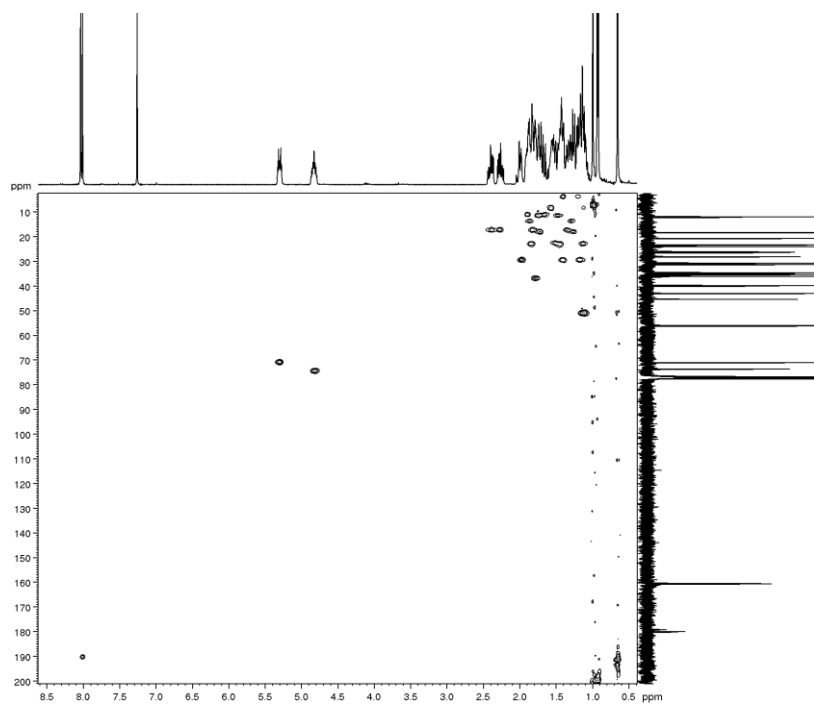
### 3. Espectroscopía RMN

Espectroscopía RMN de los compuestos: **24**, **25**, **26a/26b**, **27a/27b**, **28a/28b**, **29a/29b**, **32,33,34**, **35a** y **36a**.

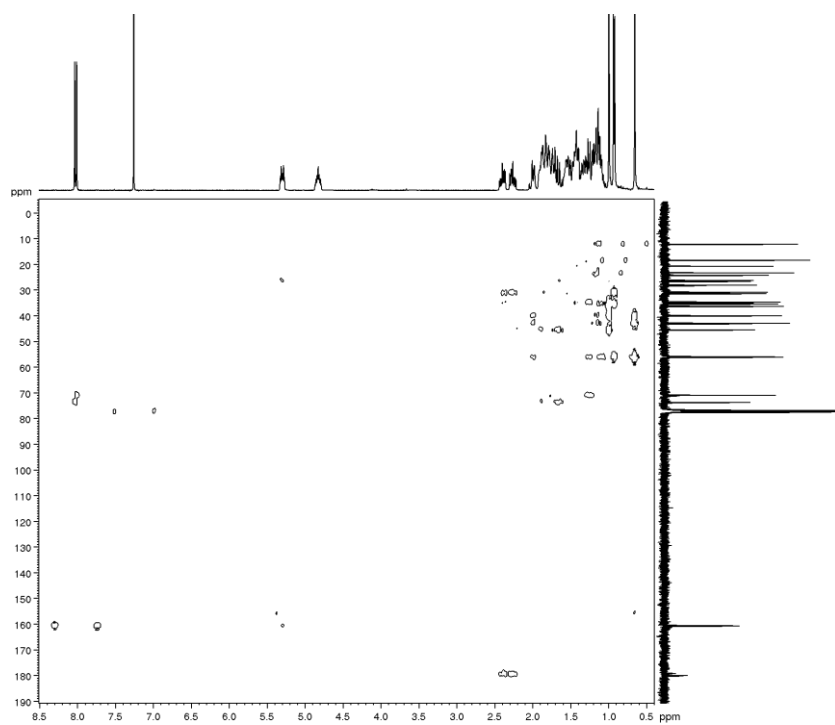
#### 3.1. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto Ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformil-5 $\beta$ -colan-24-oico (**24**)



## 2D-HSQC

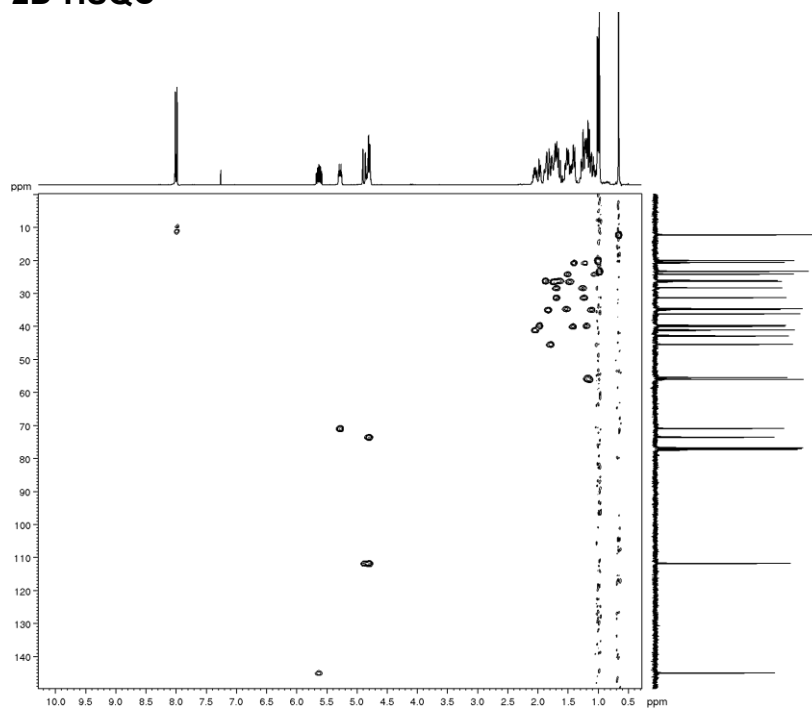


## 2D-HMBC

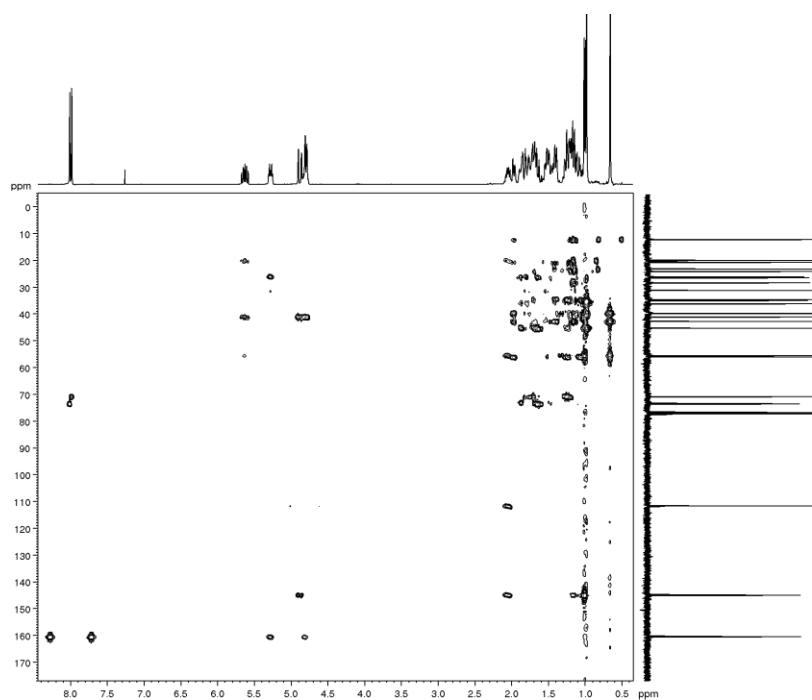




## 2D-HSQC

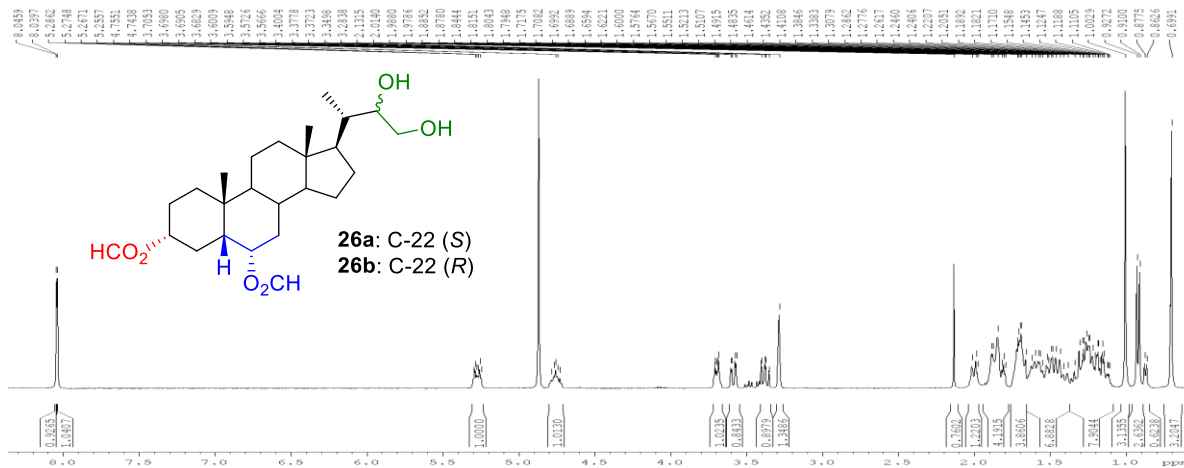


## 2D-HMBC

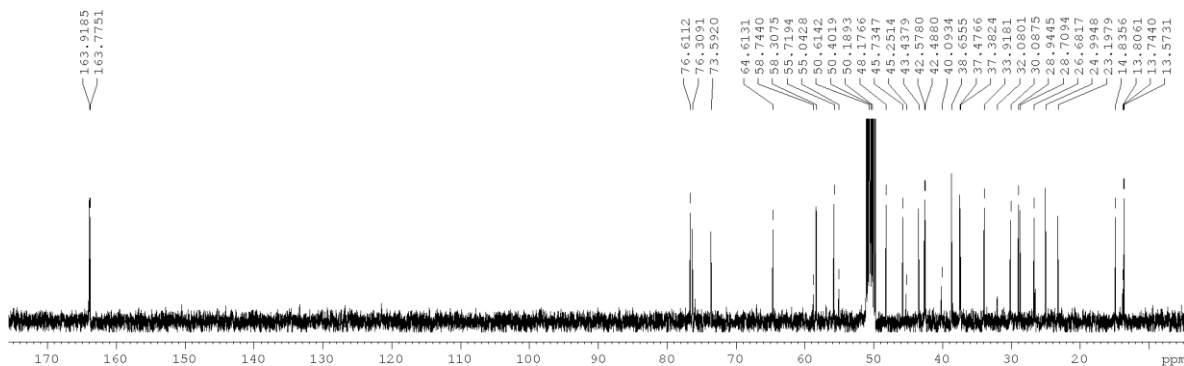


### 3.3. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22,23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diformal-24-nor-5 $\beta$ -colano (26a/26b)

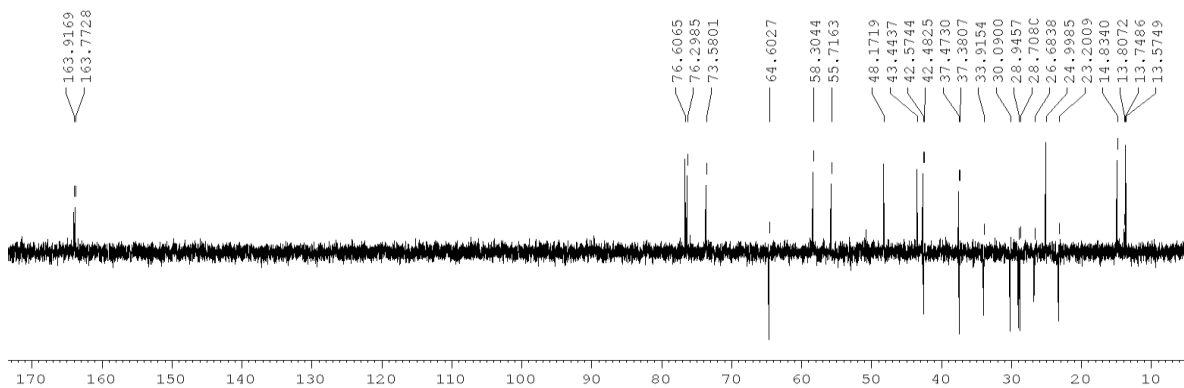
#### $^1\text{H}$ RMN



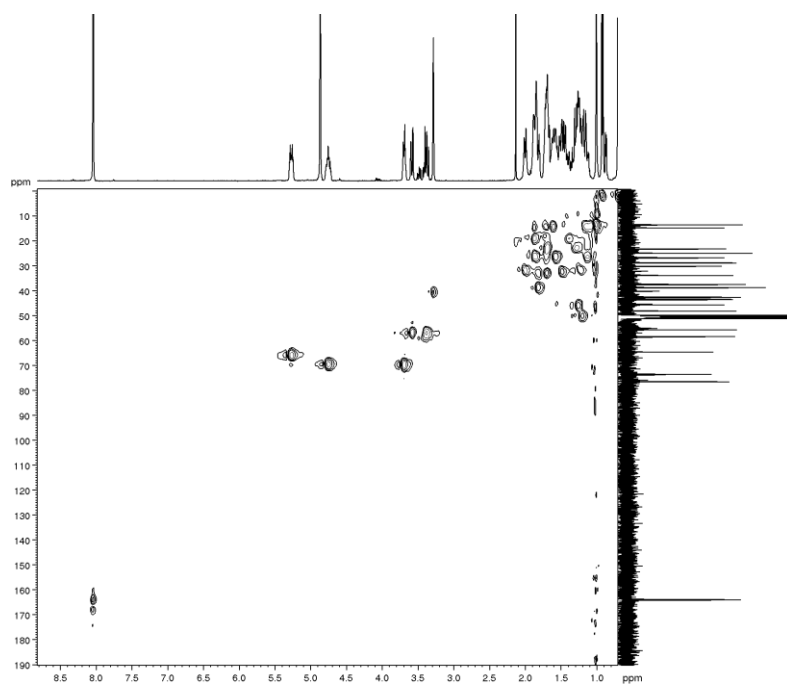
#### $^{13}\text{C}$ RMN



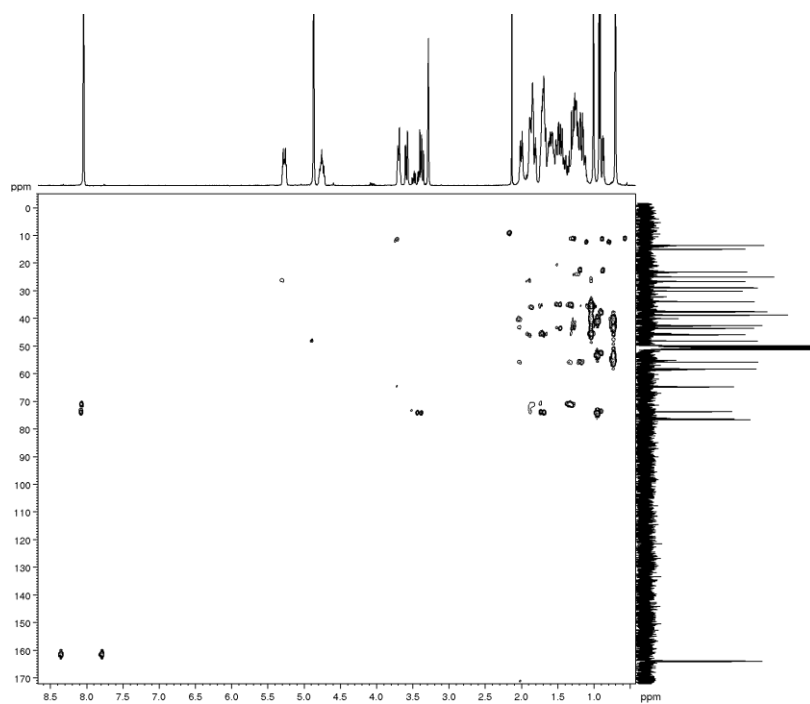
#### DEPT-135



## 2D-HSQC

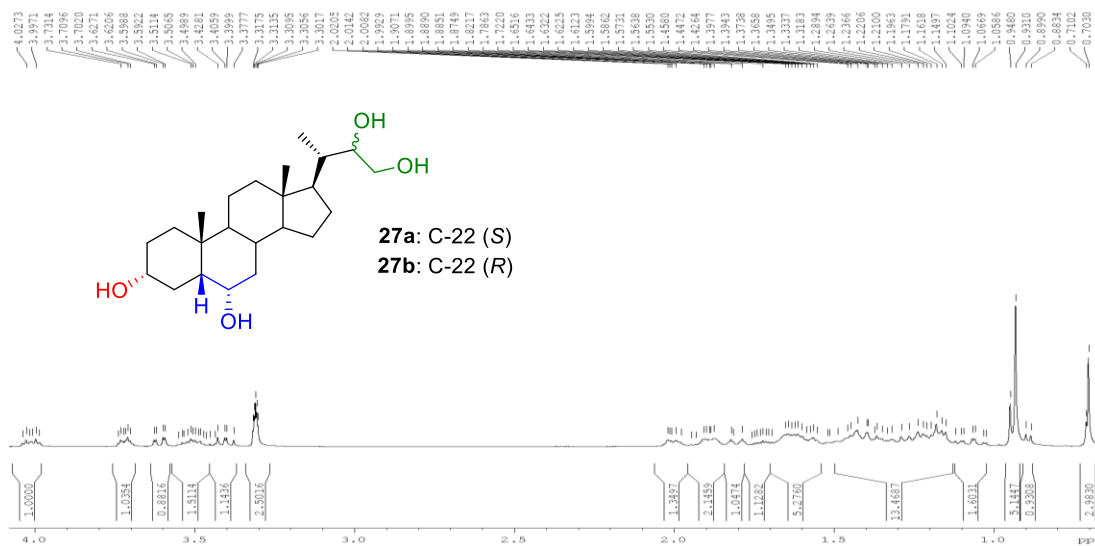


## 2D-HMBC

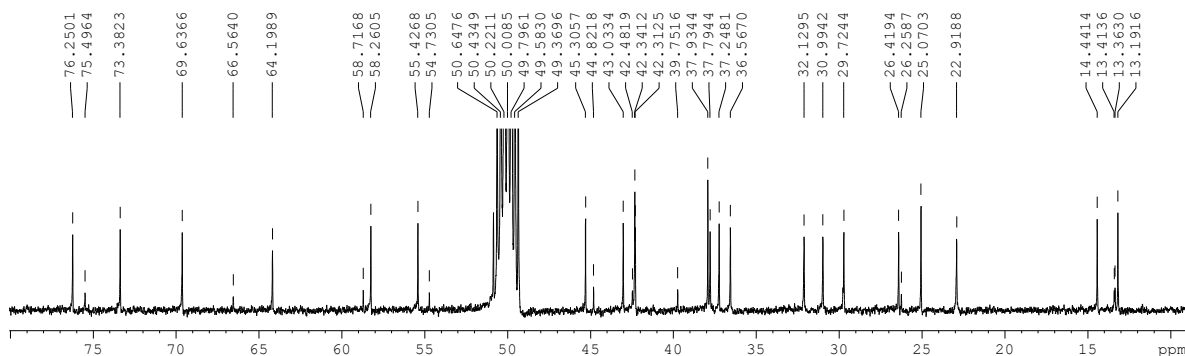


### 3.4. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3 $\alpha,6\alpha,22,23$ -Tetrahydroxi-24-nor-5 $\beta$ -colano (27a/27b)

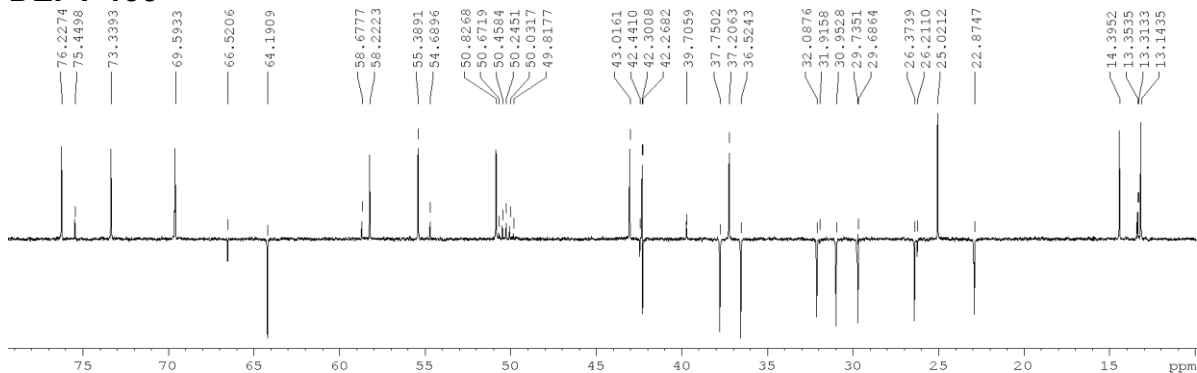
#### $^1\text{H}$ RMN



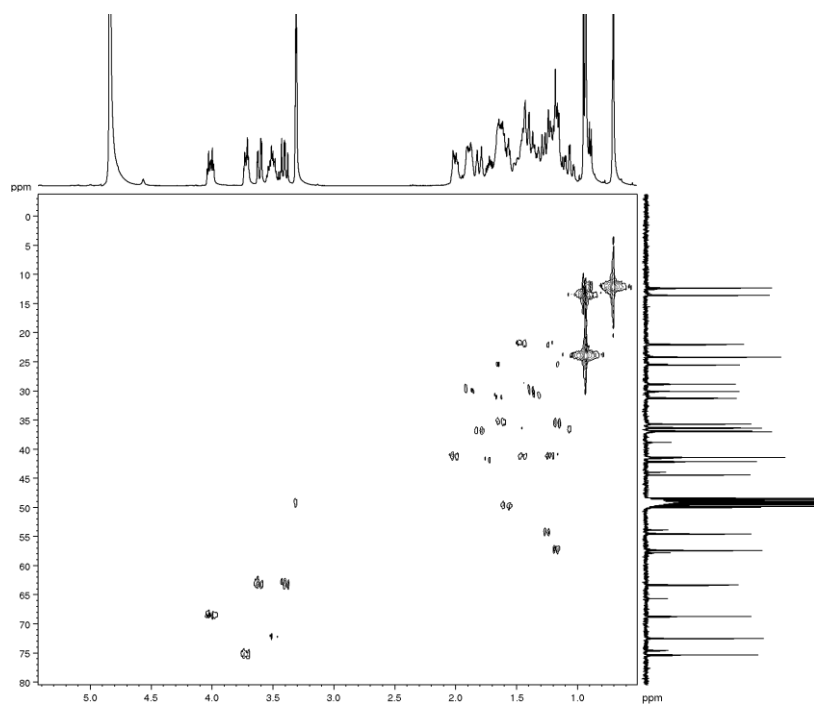
#### $^{13}\text{C}$ RMN



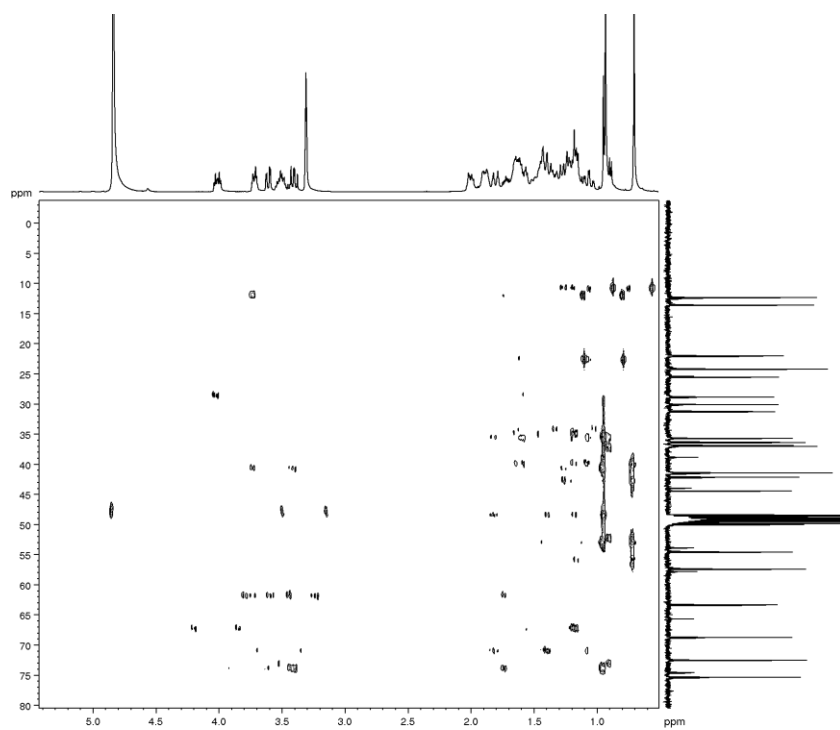
#### DEPT-135



## 2D-HSQC

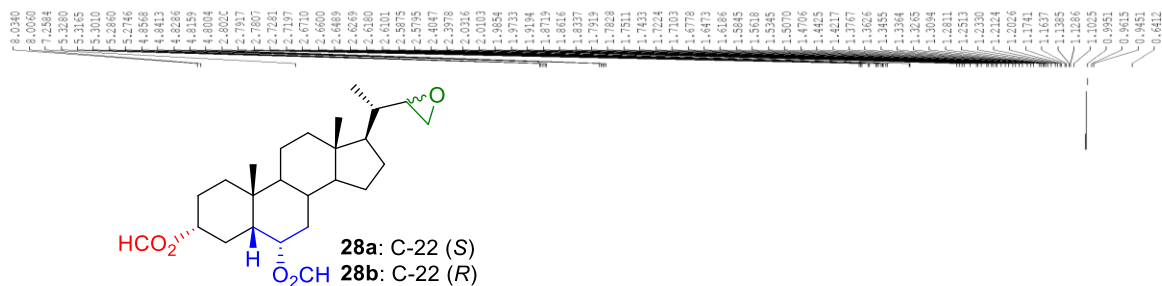


## 2D-HMBC

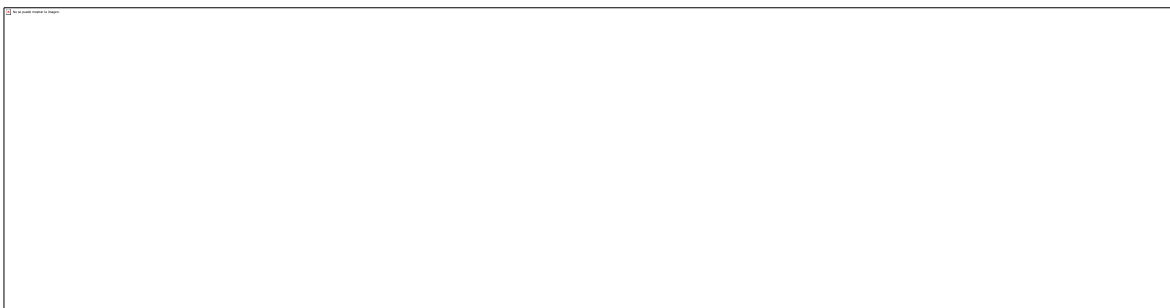


### 3.5. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto $3\alpha,6\alpha$ -diformal-22,23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano (**28a/28b**)

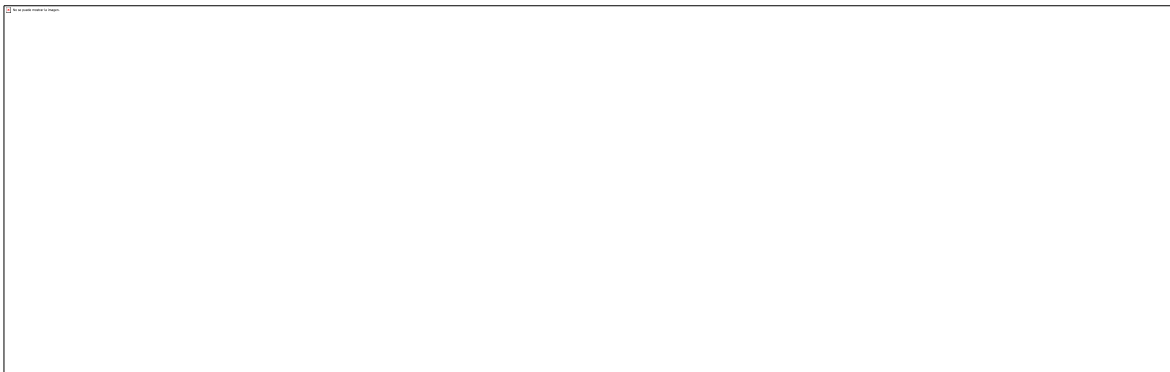
#### $^1\text{H}$ RMN



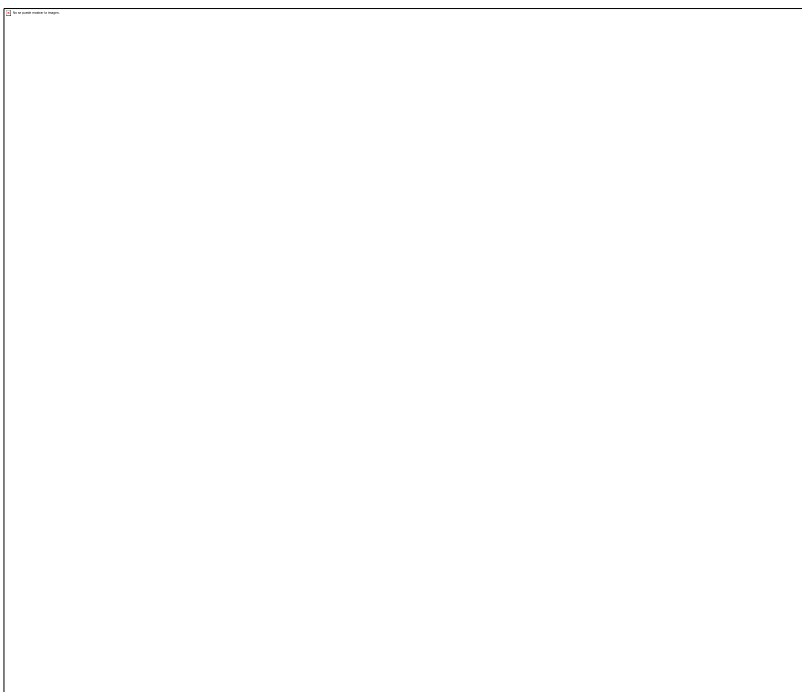
#### $^{13}\text{C}$ RMN



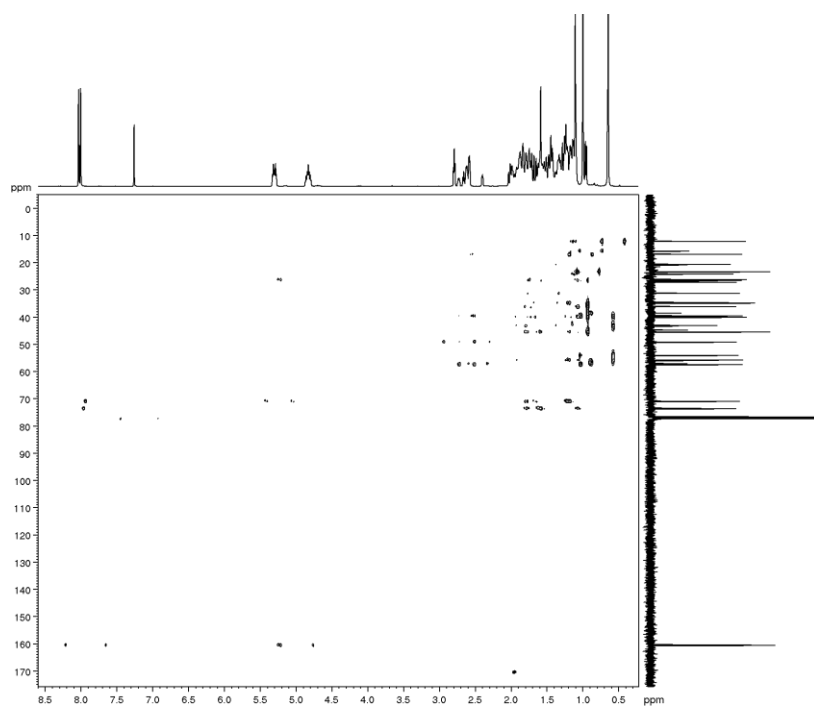
#### DEPT-135



## 2D-HSQC

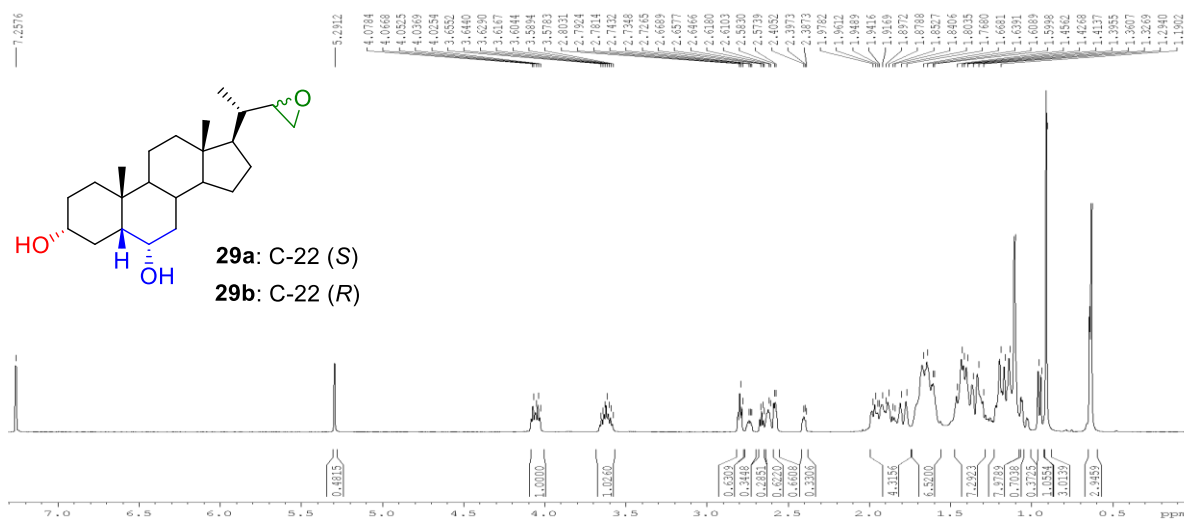


## 2D-HMBC

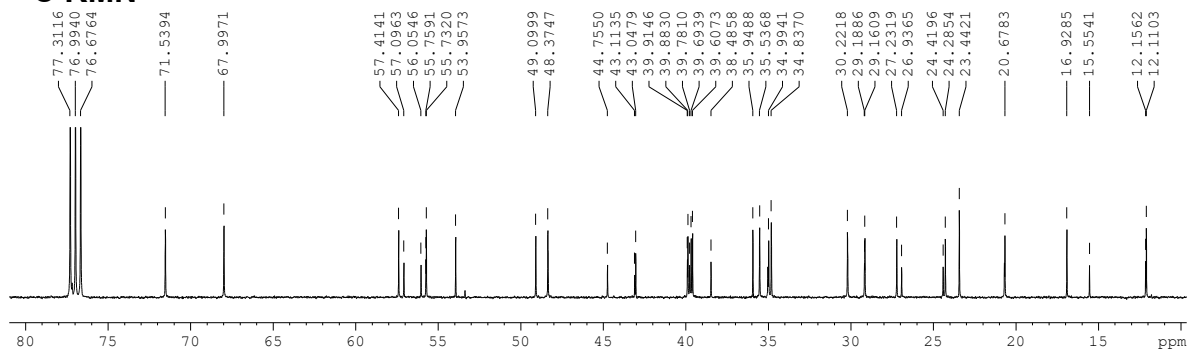


### 3.6. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-22,23-epoxi-24-nor-5 $\beta$ -colano (29a/29b).

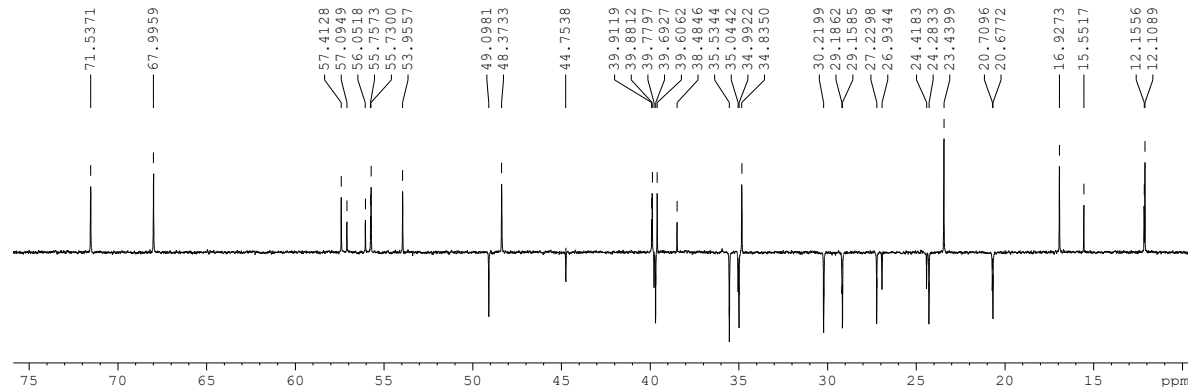
#### $^1\text{H}$ RMN



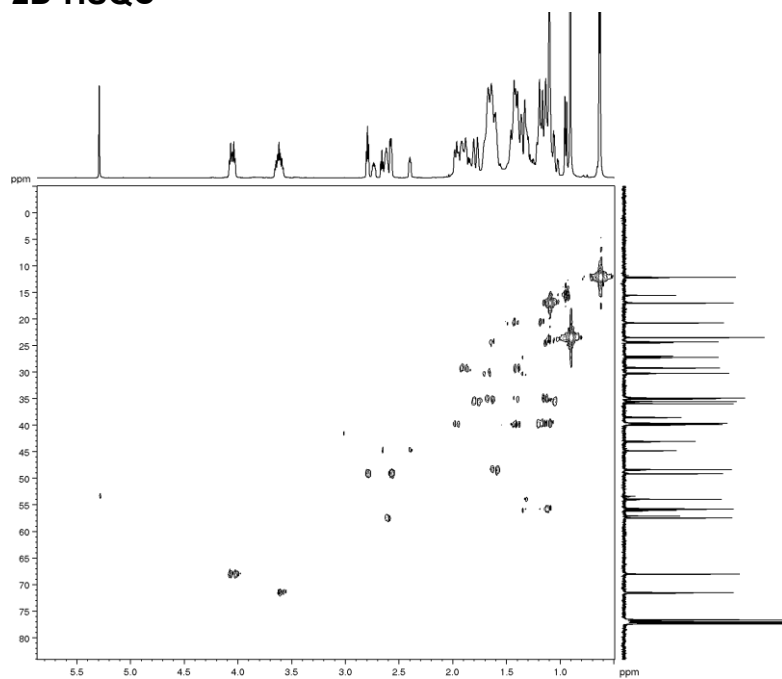
#### $^{13}\text{C}$ RMN



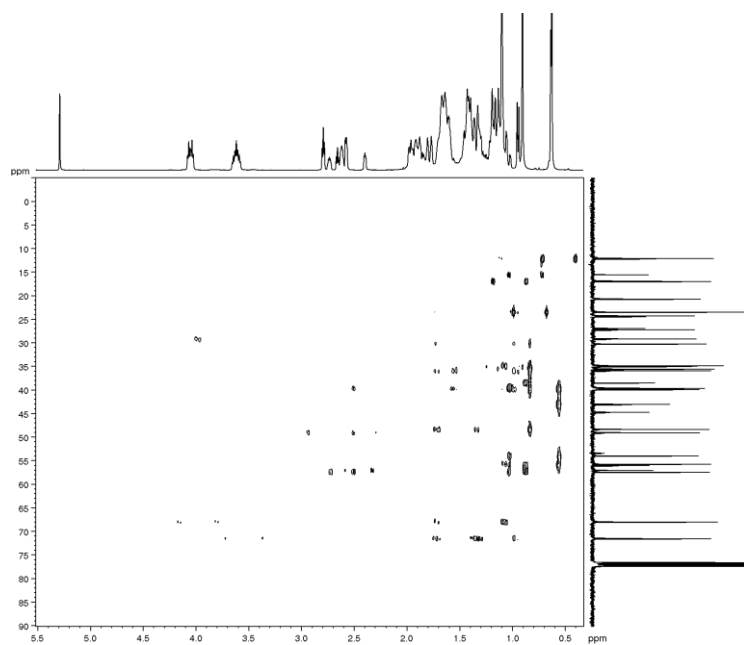
#### DEPT-135



## 2D-HSQC

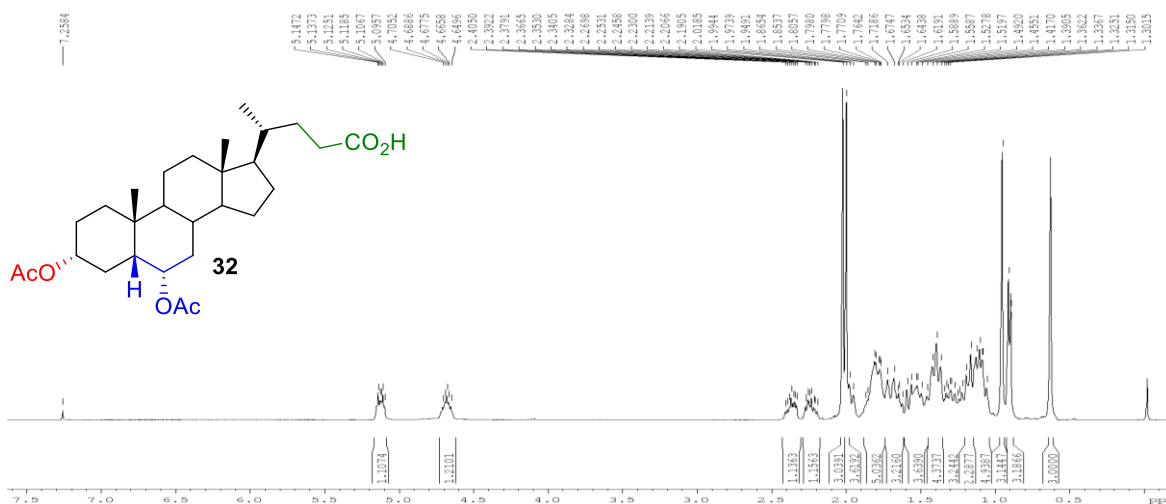


## 2D-HMBC

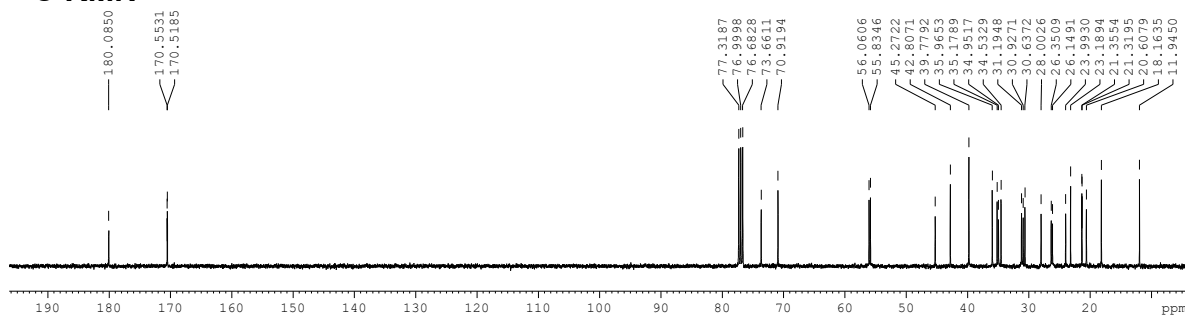


### 3.7. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto Ácido $3\alpha,6\alpha$ -Acetil- $5\beta$ -colan-24-oico (32).

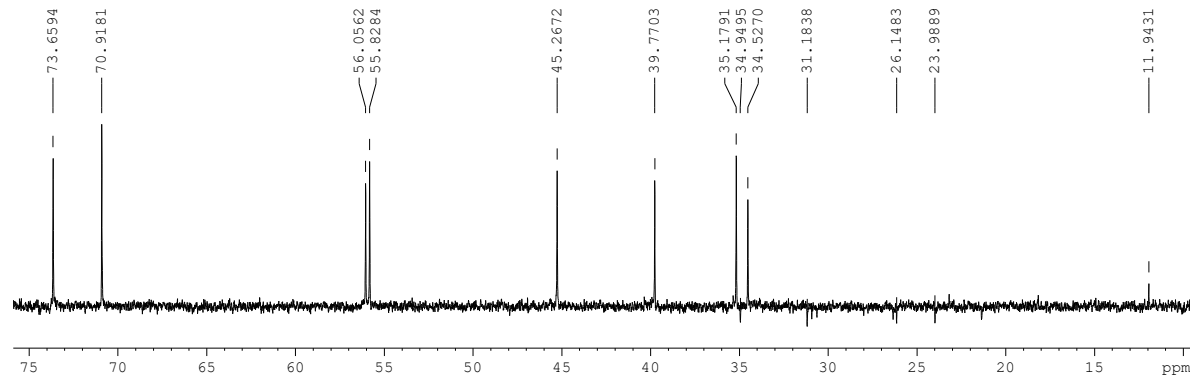
#### $^1\text{H}$ RMN



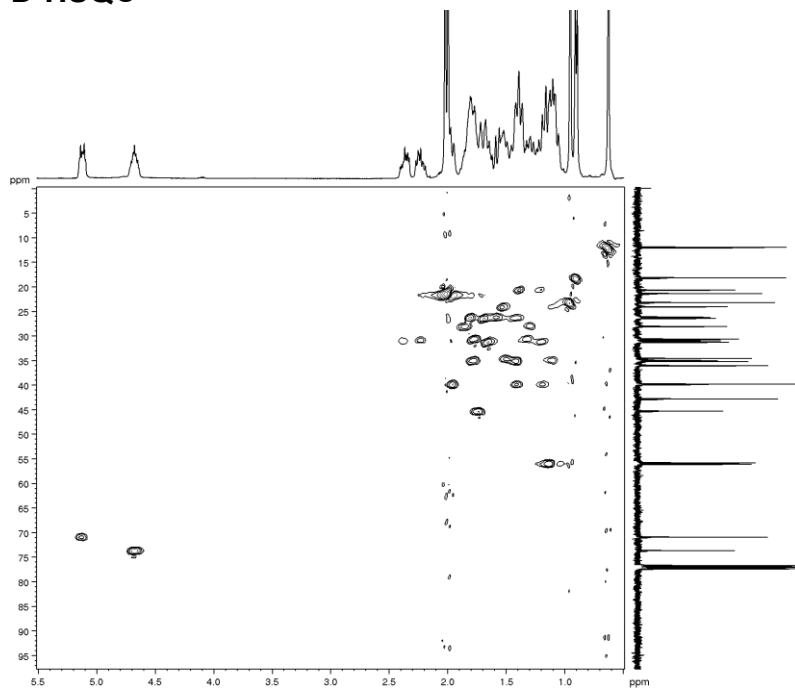
#### $^{13}\text{C}$ RMN



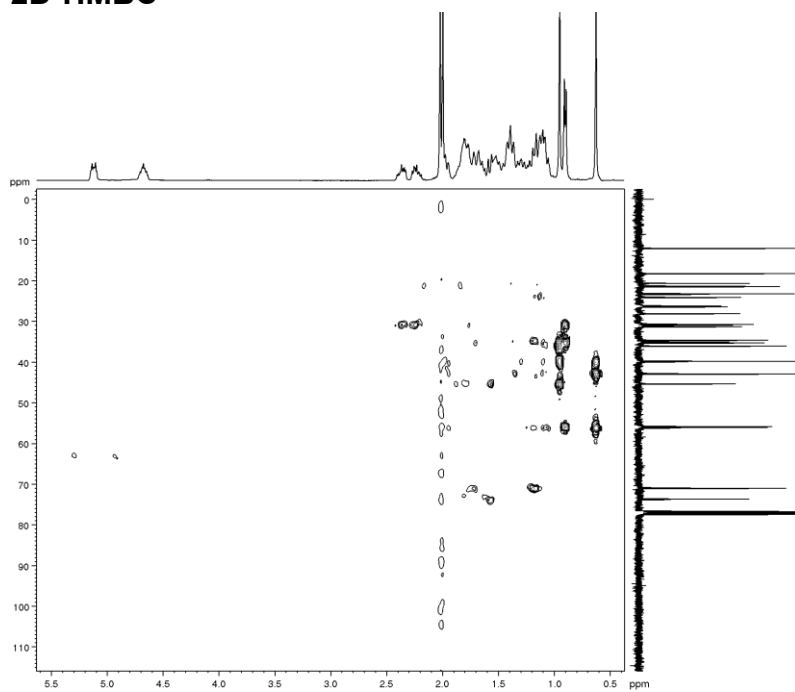
#### DEPT-135



### D-HSQC

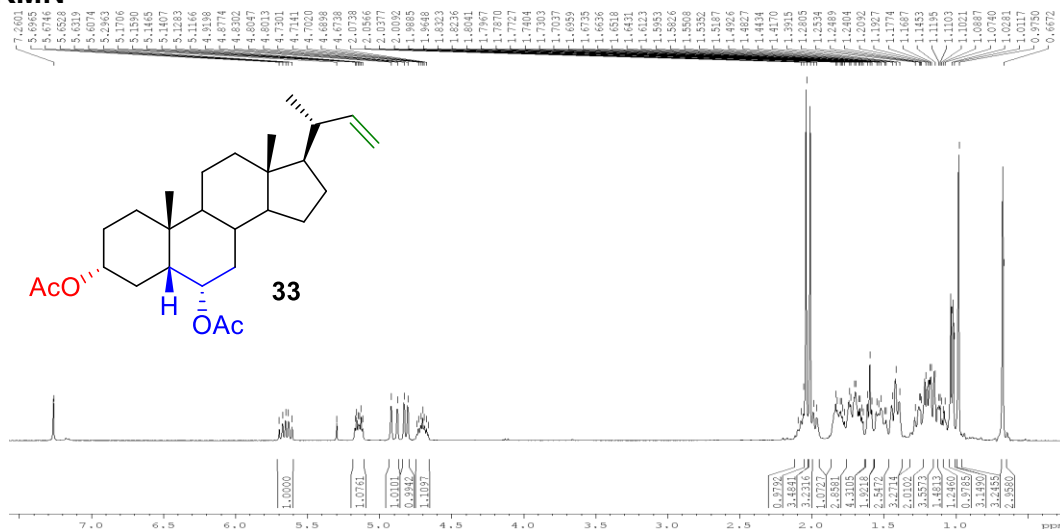


### 2D-HMBC

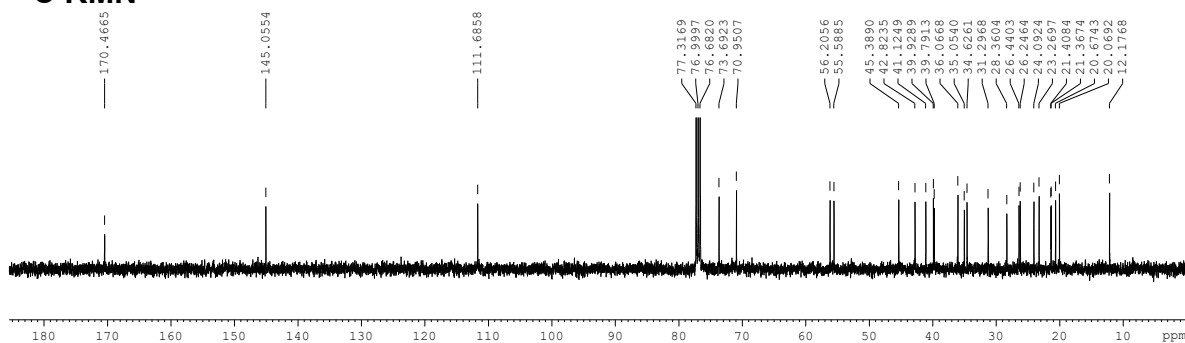


### 3.8. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto $3\alpha,6\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -23-coleno (**33**)

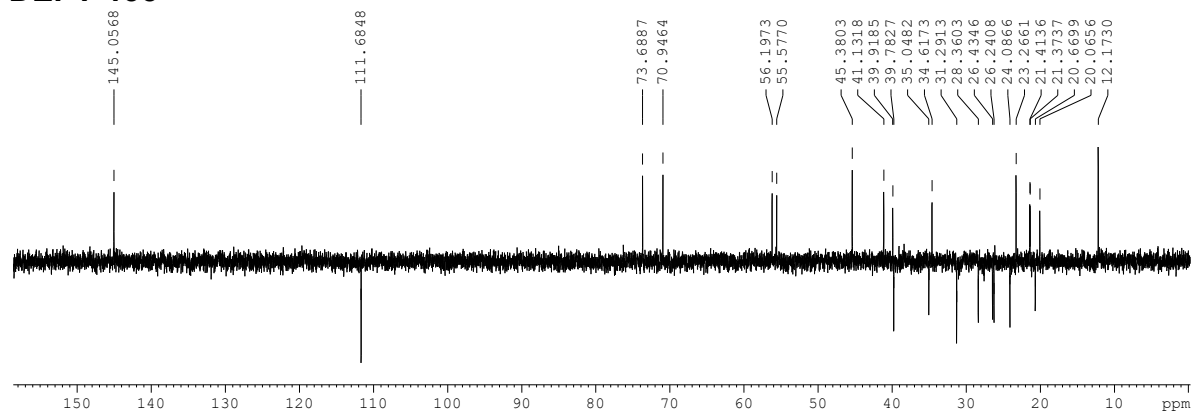
#### $^1\text{H}$ RMN



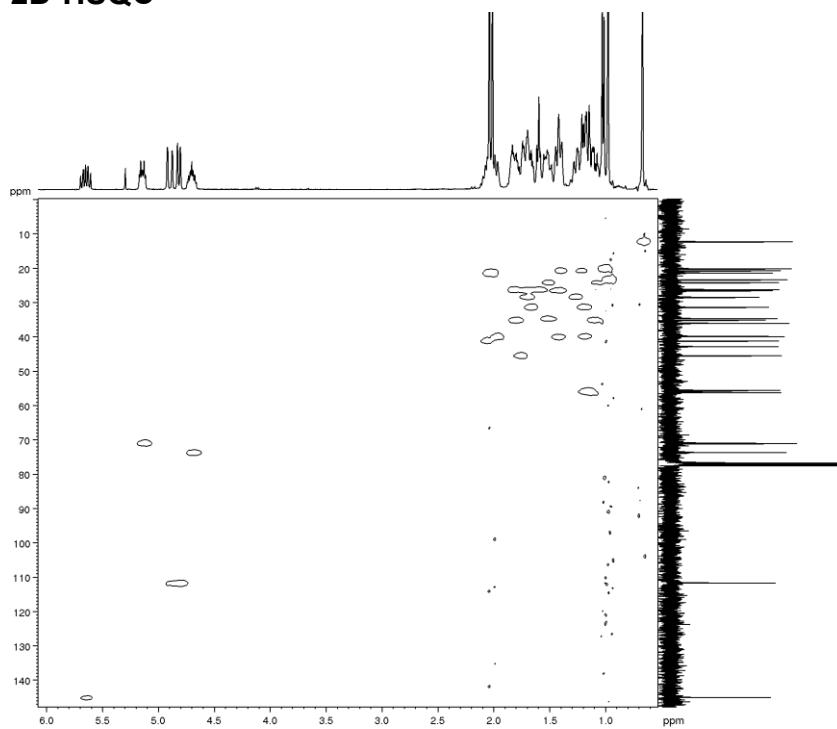
#### $^{13}\text{C}$ RMN



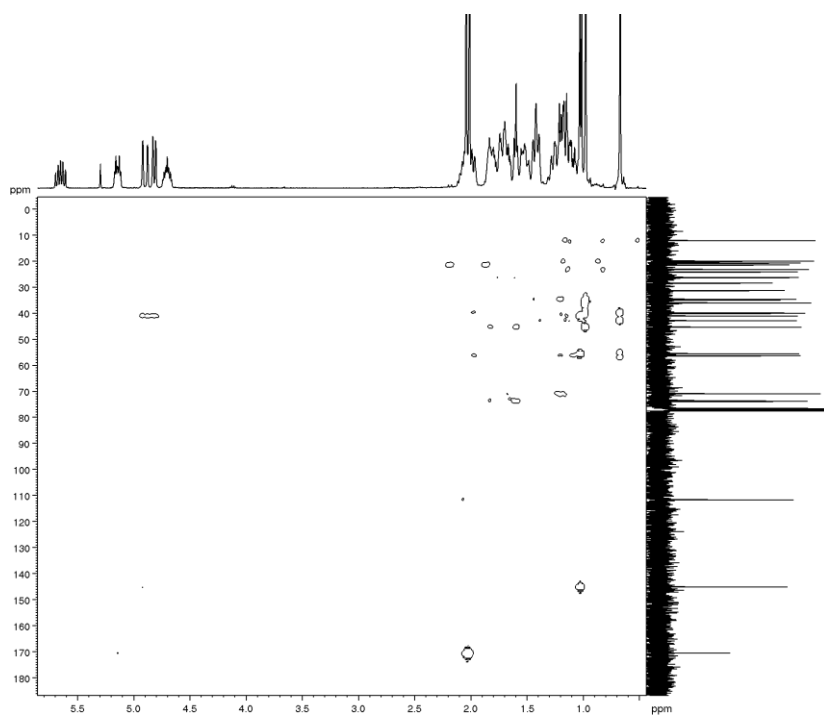
#### DEPT-135



## 2D-HSQC

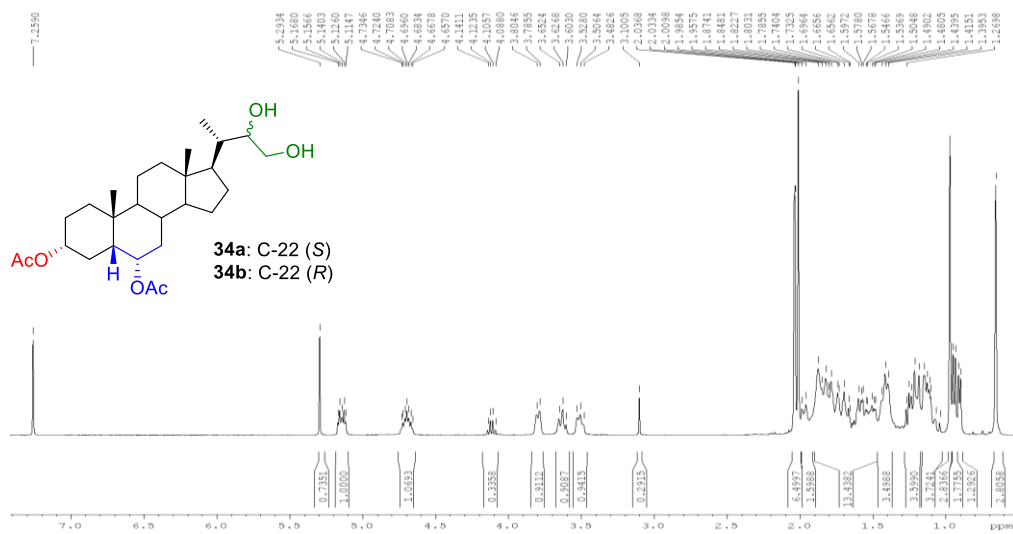


## 2D-HMBC

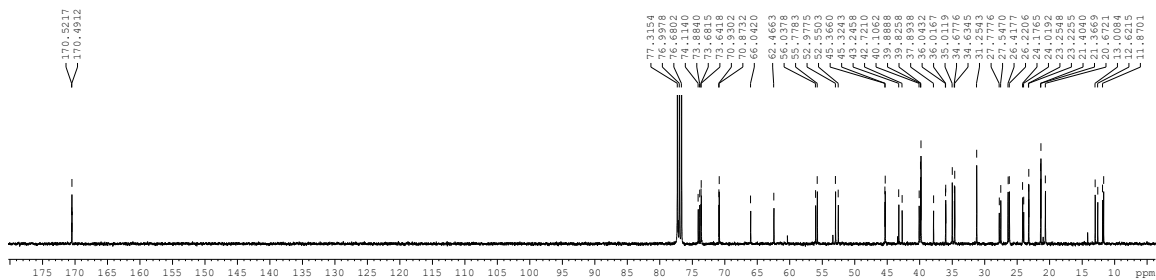


### 3.9. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22,23-dihidroxi-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano (**34a/34b**).

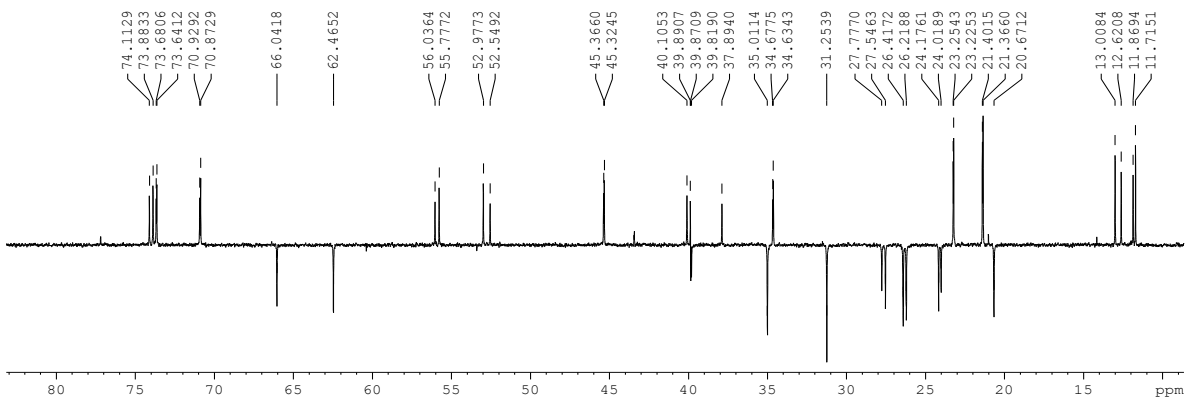
#### $^1\text{H}$ RMN



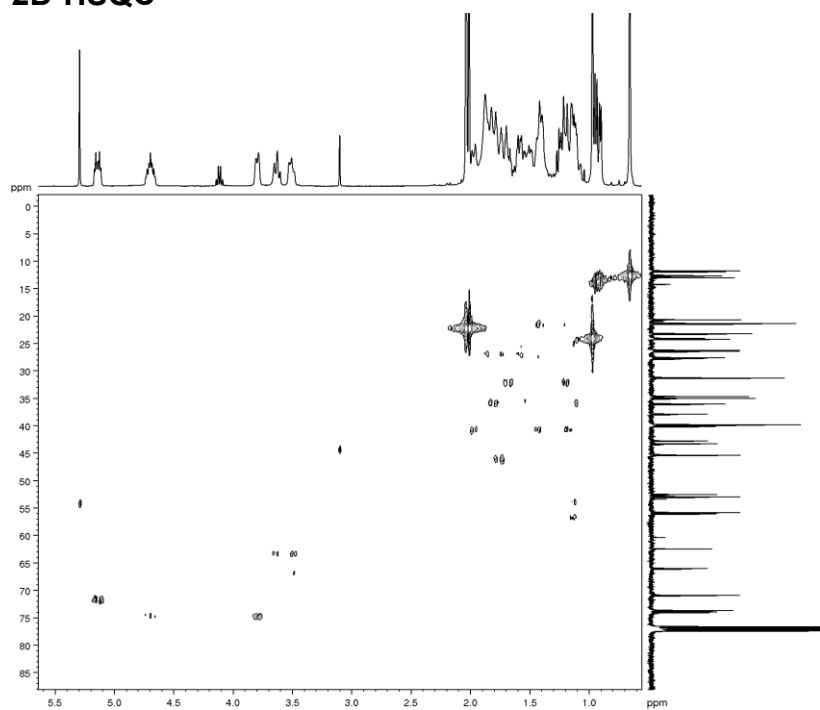
#### $^{13}\text{C}$ RMN



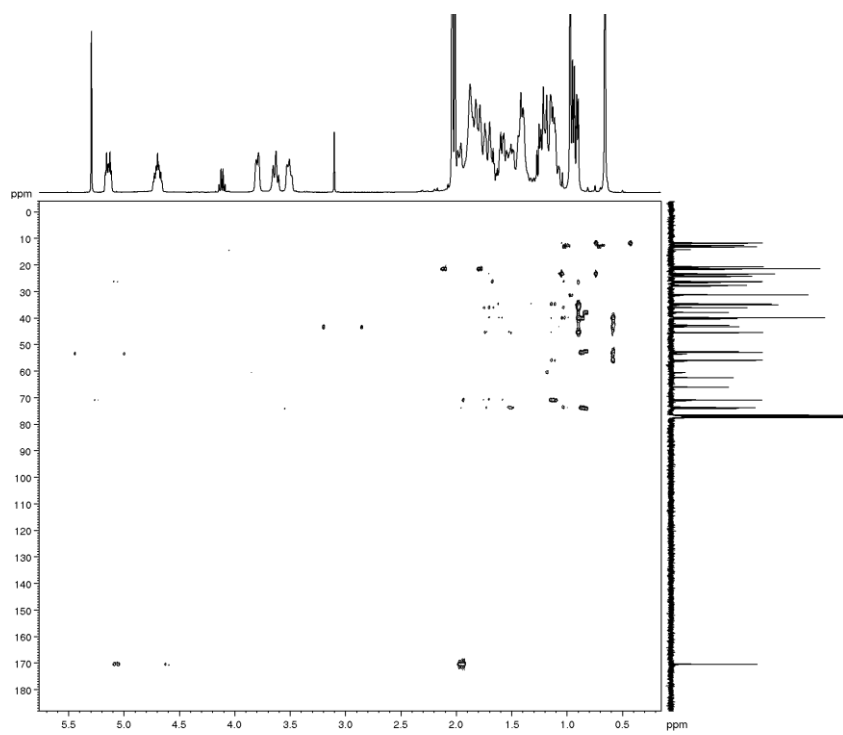
#### DEPT-135



### 2D-HSQC

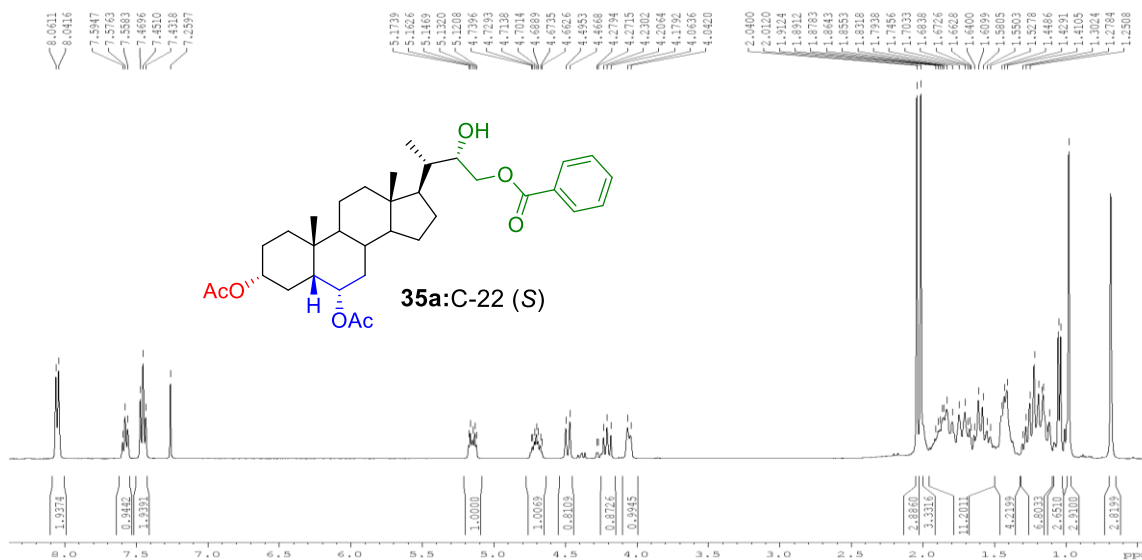


### 2D-HMBC

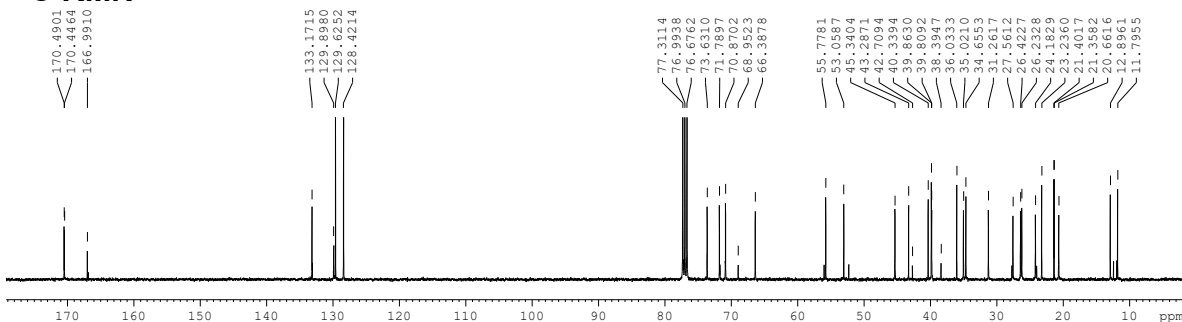


**3.10. Espectroscopía  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano (**35a**).**

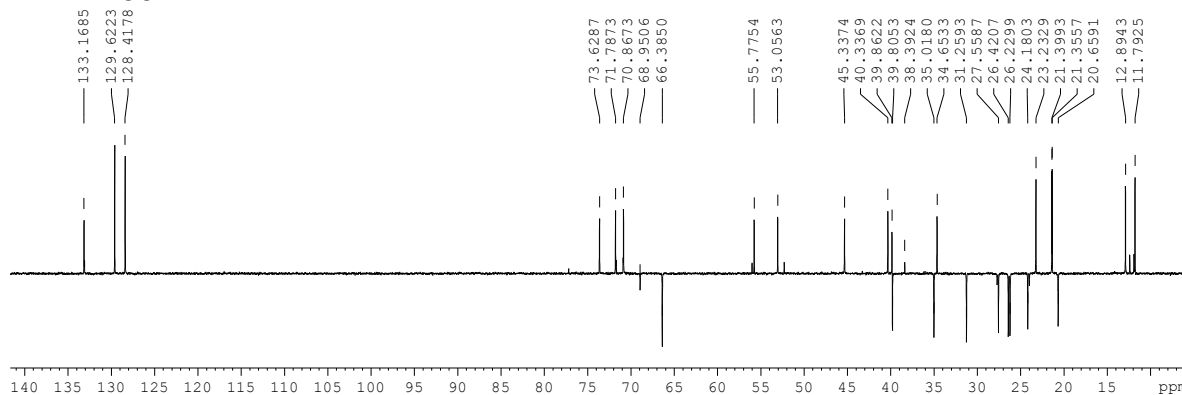
**$^1\text{H}$  RMN**



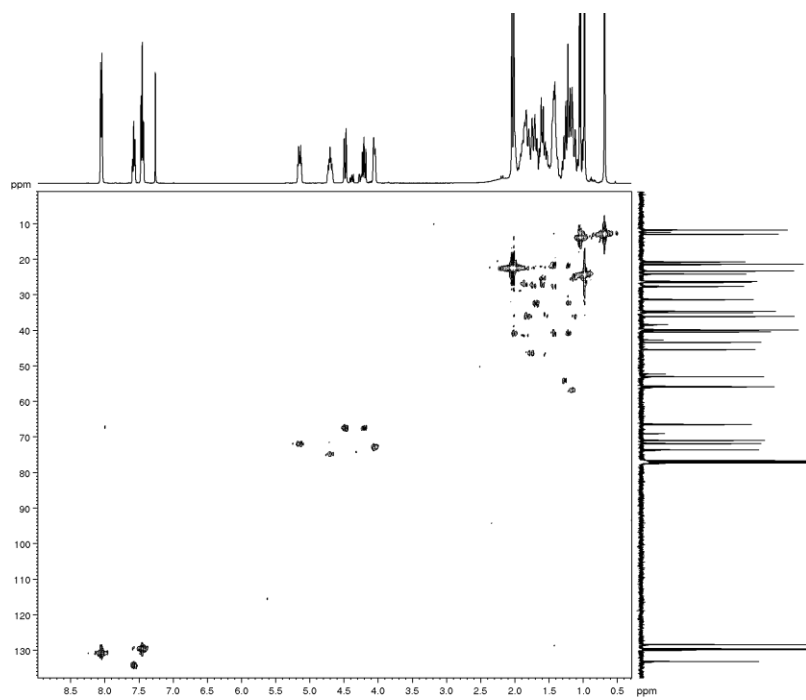
**$^{13}\text{C}$  RMN**



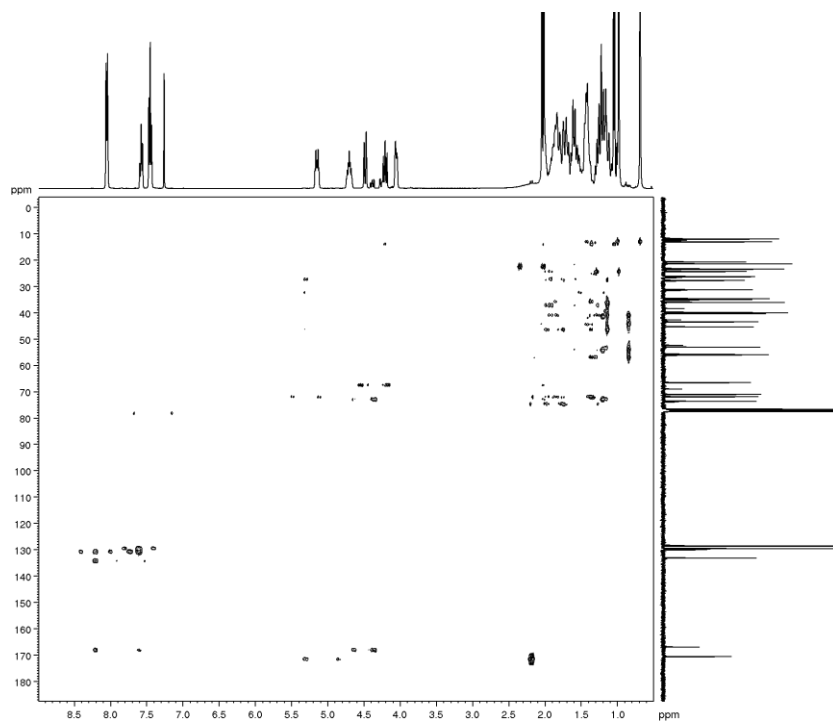
**DEPT-135**



## 2D-HSQC

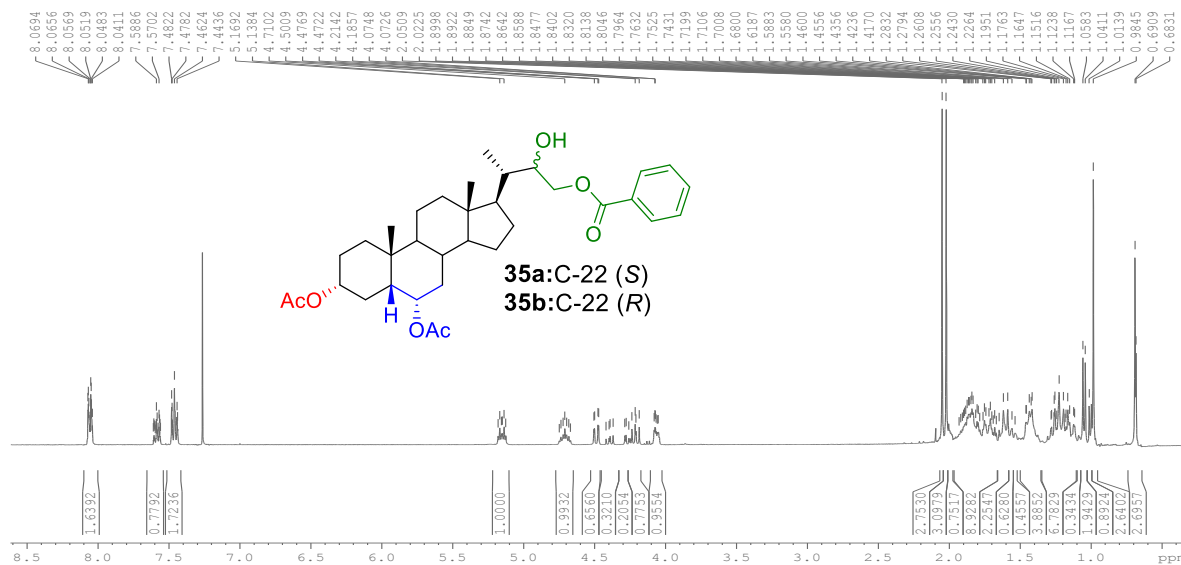


## 2D-HMBC

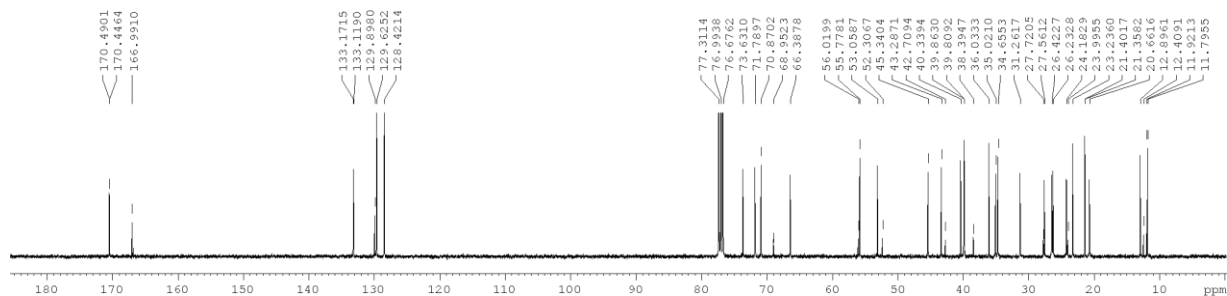


### 3.11. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto 23-benzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano (**35a/35b**).

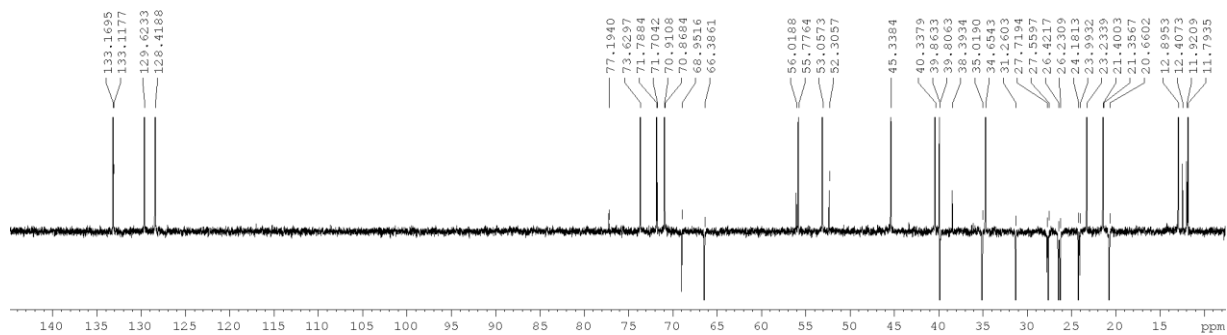
#### $^1\text{H}$ RMN



#### $^{13}\text{C}$ RMN

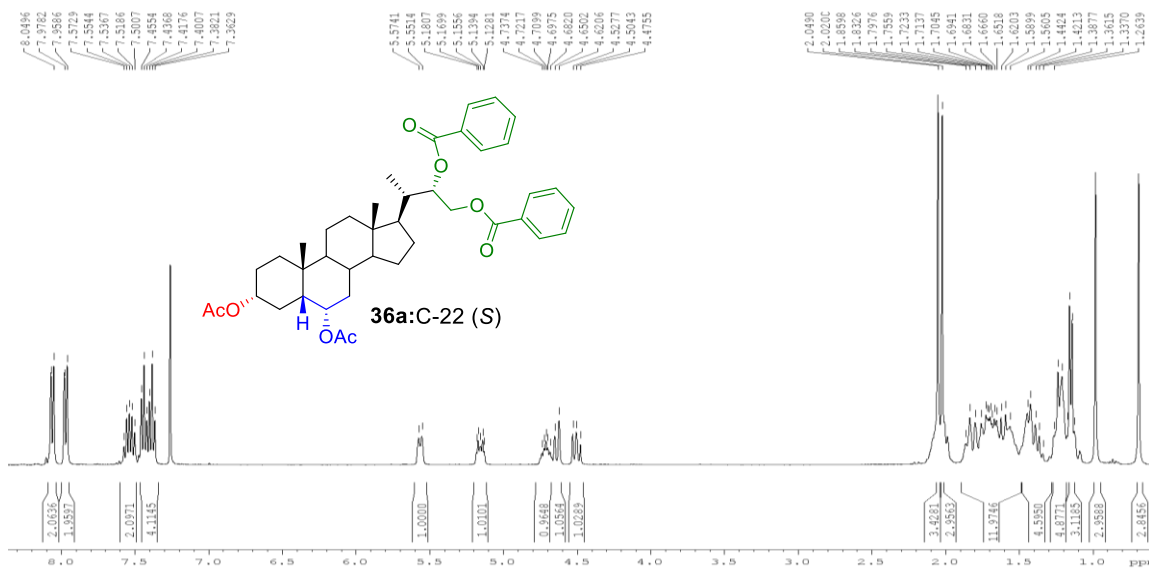


#### DEPT-135

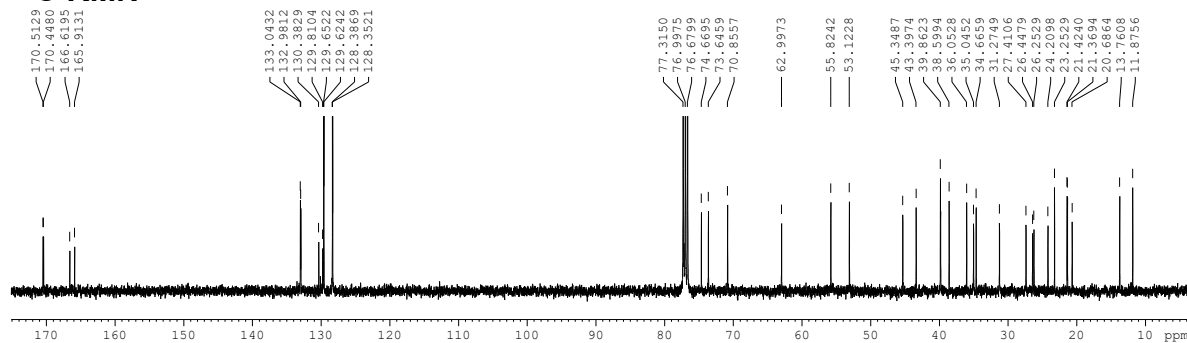


**3.12. Espectroscopía  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22,23-dibenzoil-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetil-24-nor-5 $\beta$ -colano (**36a**).**

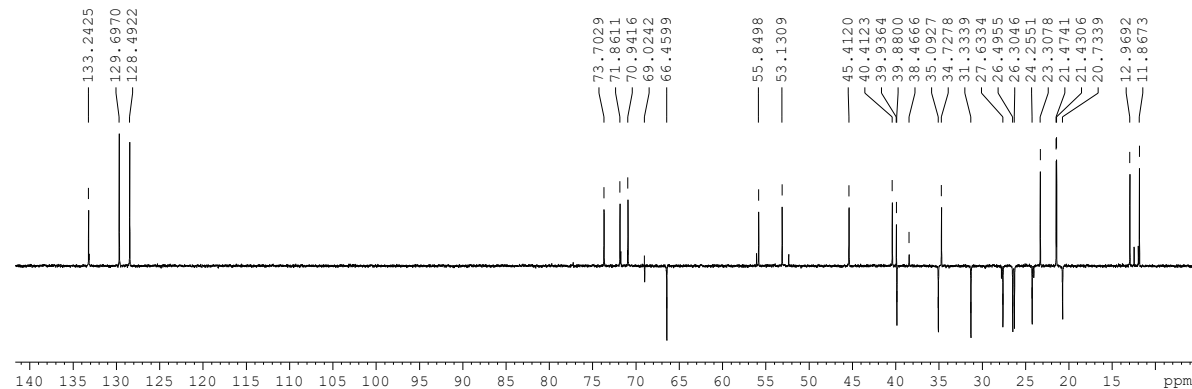
**$^1\text{H}$  RMN**



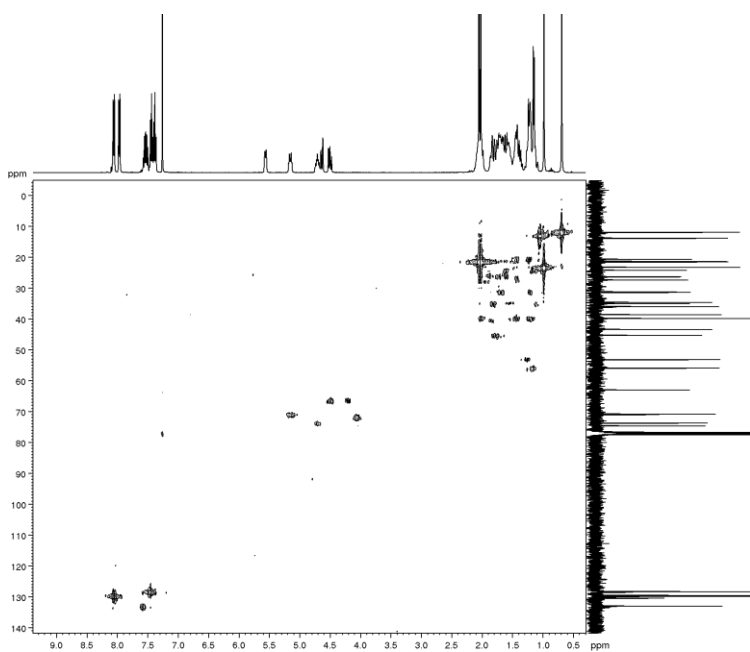
**$^{13}\text{C}$  RMN**



**DEPT-135**



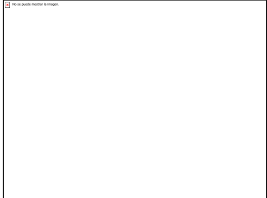
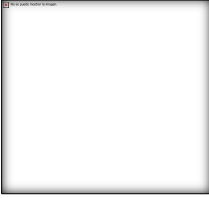
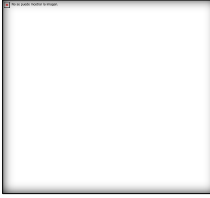
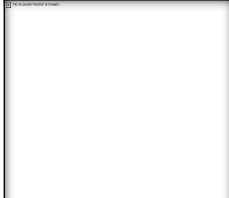

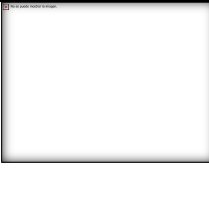
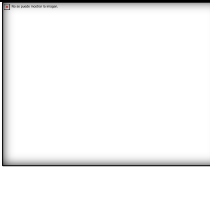
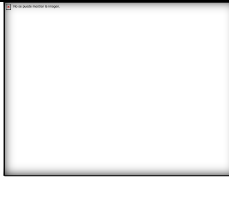

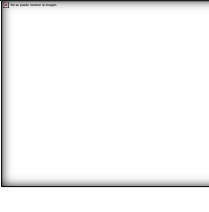


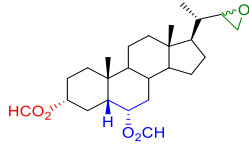
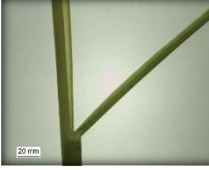
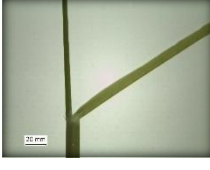

## 2D-HSQC

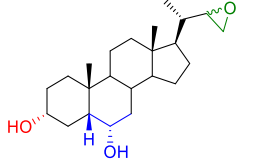
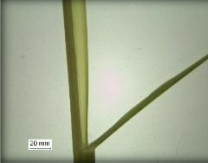
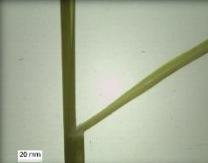

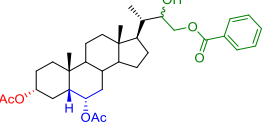
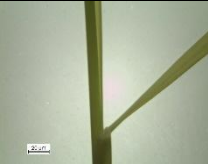

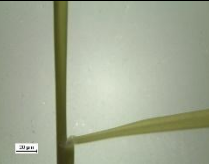
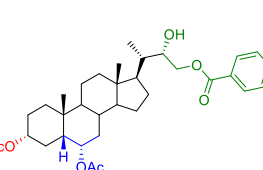
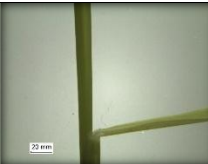

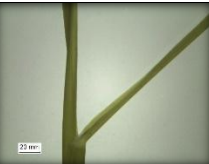
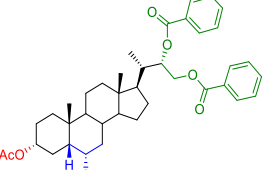
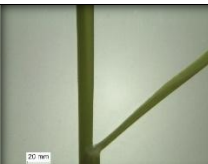
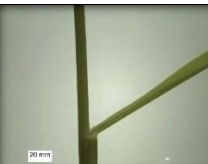
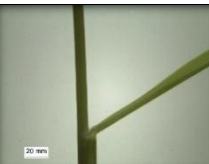



## 2D-HMBC









#### 4. Imágenes del test de inclinación de la lámina de arroz (RLIT)




| Inclinación de la Lamina de arroz (Apertura del angulo) |   |   |  |   |
|---|---|---|--|---|
| Compuestos<br>(Código)                                  | Estructura de los<br>Análogos de Brs  | Concentración del compuesto [M]   |  |   |
|   |   | $1 \times 10^{-6}$  | $1 \times 10^{-7}$   | $1 \times 10^{-8}$  |
| Brasinolido (1)   |    |    |    |    |
| 26a/26b   |   |   |   |   |
| 27a/27b   |  |  |  |  |
| 28a/28b   |  |  |  |  |

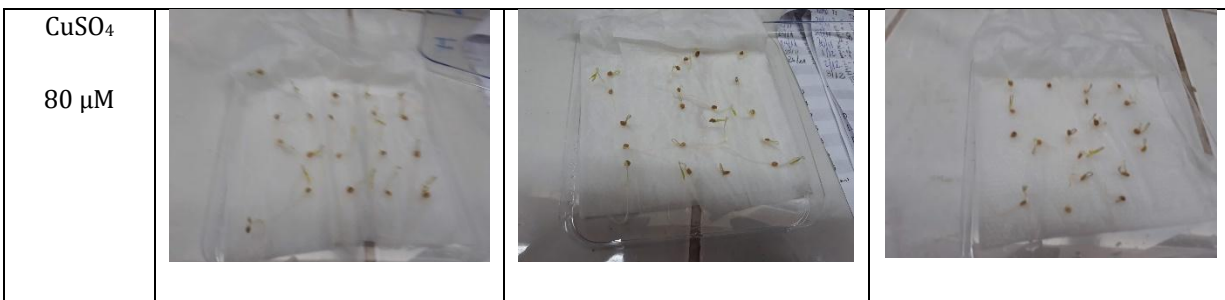
|                     |  |  |   |  |
|---------------------|--|--|---|--|
| <b>29a/29b</b>      |   |     |   |   |
| <b>35a/35b</b>      |   |     |   |   |
| <b>35a</b>          |   |     |   |   |
| <b>36a</b>          |  |    |  |  |
| Control<br>Negativo | Agua   |  |   |  |

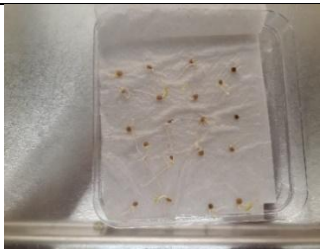





Registro visual del efecto de la aplicación de los compuestos: 1, 26, 27, 28, 29, 35, y 36 en el test RLIT, 72 h después de la exposición. Para la cuantificación se utilizó brasinólido como control (+).



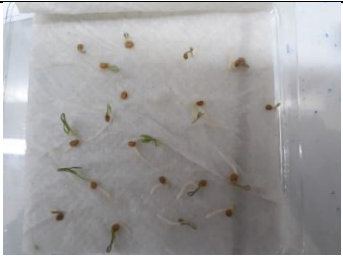



**5. Imagen del efecto de los análogos 26a/26b, 27a/27b, 35a y 1 con y sin la presencia de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), en el estudio de germinación de semillas de *Lycopersicum sp.***



| <b>1</b>                            | Concentraciones [M]  |   |  |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Soluciones                          | $1 \times 10^{-6}$   | $1 \times 10^{-7}$  | $1 \times 10^{-8}$   |
| Agua                                |   |   |   |
| $\text{CuSO}_4$<br>80 $\mu\text{M}$ |  |  |  |

| <b>26a/26b</b> | Concentraciones [M]   |  |   |
|----------------|---|--|---|
| Soluciones     | $1 \times 10^{-6}$  | $1 \times 10^{-7}$   | $1 \times 10^{-8}$  |
| Agua           |  |  |  |



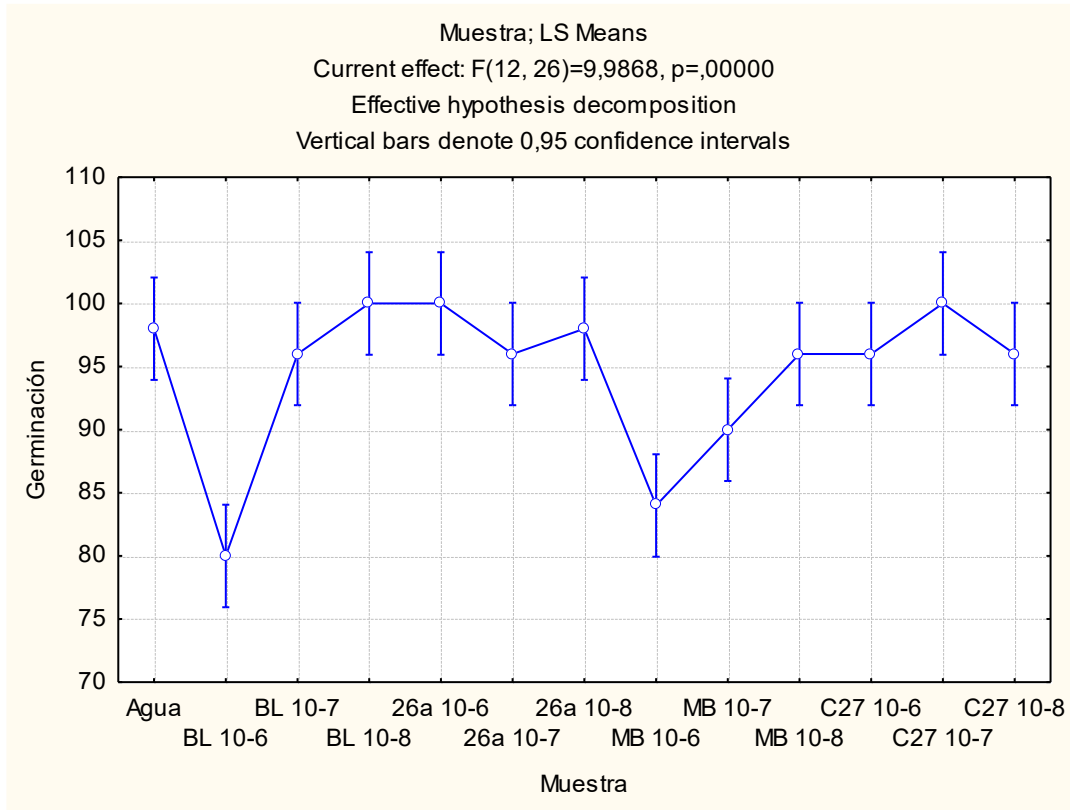
| <b>27a/27b</b>                    | <b>Concentraciones [M]</b>  |  |   |
|-----------------------------------|---|--|---|
| <b>Soluciones</b>                 | <b><math>1 \times 10^{-6}</math></b>  | <b><math>1 \times 10^{-7}</math></b>   | <b><math>1 \times 10^{-8}</math></b>  |
| <b>Agua</b>                       |  |  |  |
| <b>CuSO<sub>4</sub><br/>80 μM</b> |  |  |  |

| <b>35a</b>                        | <b>Concentraciones [M]</b>  |  |   |
|-----------------------------------|---|--|---|
| <b>Soluciones</b>                 | <b><math>1 \times 10^{-6}</math></b>  | <b><math>1 \times 10^{-7}</math></b>   | <b><math>1 \times 10^{-8}</math></b>  |
| <b>Agua</b>                       |  |  |  |
| <b>CuSO<sub>4</sub><br/>80 μM</b> |  |  |  |

| <b>Controles Negativos</b>  |  |
|---|--|
| <b>Agua</b>   | <b>CuSO<sub>4</sub><br/>80 μM</b>  |
|  |  |

## 6. Análisis Estadístico de los factores: Porcentaje de germinación (%), tiempo medio de germinación (MT), tasa de germinación (MR) y peso seco (PS) de semillas germinadas para cada tratamiento

### 6.1. Porcentaje de germinación (%) sin cobre

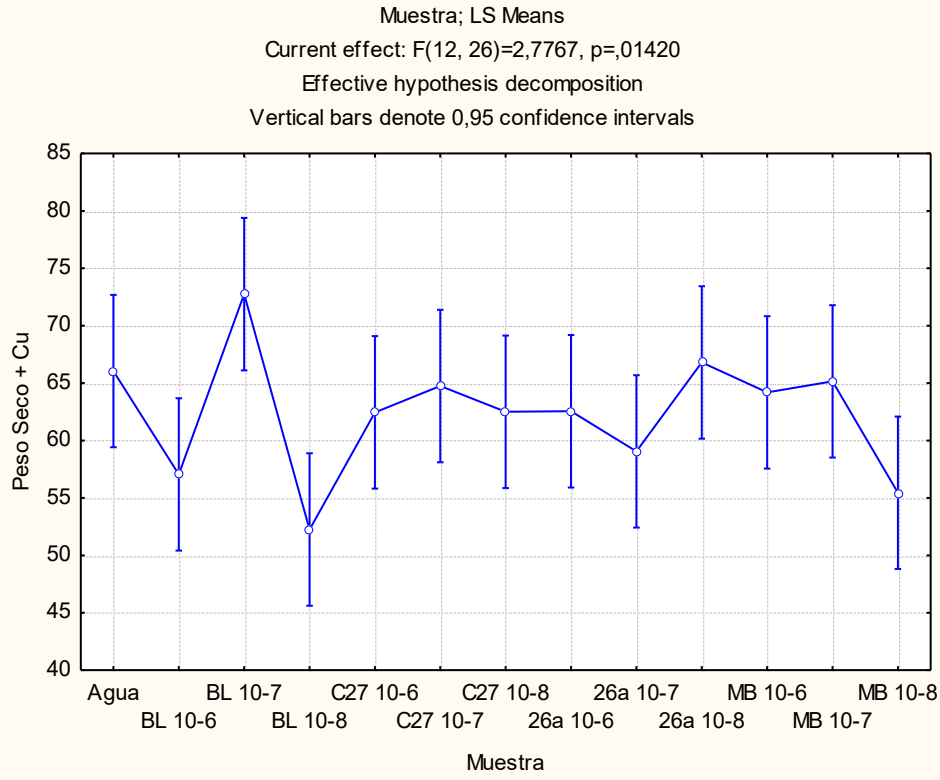


**Grafico 1.** Efecto en el porcentaje de germinación obtenido por el BL: análogo 1, las mezclas de epímeros 26a: 26a/26b, 27a/27b y el análogo puro MB:35a sin la adición de sulfato de cobre.

| Tukey HSD test; variable Germinación (Germinación_Estadística) |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests                   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = 11,692, df = 26,000                        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Cell No.   | Muestra  | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      | {10}     | {11}     | {12}     | {13}     |
| 1  | Agua     | 98,000   | 80,000   | 96,000   | 100,00   | 100,00   | 96,000   | 98,000   | 84,000   | 90,000   | 96,000   | 96,000   | 100,00   | 96,000   |
| 2  | BL 10-6  | 0,000183 |          | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 | 1,000000 | 0,001903 | 0,232684 | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 |
| 3  | BL 10-7  | 0,999919 | 0,000412 |          | 0,958635 | 0,958635 | 1,000000 | 0,999919 | 0,010764 | 0,632003 | 1,000000 | 1,000000 | 0,958635 | 1,000000 |
| 4  | BL 10-8  | 0,999919 | 0,000153 | 0,958635 |          | 1,000000 | 0,958635 | 0,999919 | 0,000412 | 0,056155 | 0,958635 | 0,958635 | 1,000000 | 0,958635 |
| 5  | 26a 10-6 | 0,999919 | 0,000153 | 0,958635 | 1,000000 |          | 0,958635 | 0,999919 | 0,000412 | 0,056155 | 0,958635 | 0,958635 | 1,000000 | 0,958635 |
| 6  | 26a 10-7 | 0,999919 | 0,000412 | 1,000000 | 0,958635 | 0,958635 |          | 0,999919 | 0,010764 | 0,632003 | 1,000000 | 1,000000 | 0,958635 | 1,000000 |
| 7  | 26a 10-8 | 1,000000 | 0,000183 | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 |          | 0,001903 | 0,232684 | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 | 0,999919 |
| 8  | MB 10-6  | 0,001903 | 0,958635 | 0,010764 | 0,000412 | 0,000412 | 0,010764 | 0,001903 |          | 0,632003 | 0,010764 | 0,010764 | 0,000412 | 0,010764 |
| 9  | MB 10-7  | 0,232684 | 0,056155 | 0,632003 | 0,056155 | 0,056155 | 0,632003 | 0,232684 | 0,632003 |          | 0,632003 | 0,632003 | 0,056155 | 0,632003 |
| 10   | MB 10-8  | 0,999919 | 0,000412 | 1,000000 | 0,958635 | 0,958635 | 1,000000 | 0,999919 | 0,010764 | 0,632003 |          | 1,000000 | 0,958635 | 1,000000 |
| 11   | C27 10-6 | 0,999919 | 0,000412 | 1,000000 | 0,958635 | 0,958635 | 1,000000 | 0,999919 | 0,010764 | 0,632003 | 1,000000 |          | 0,958635 | 1,000000 |
| 12   | C27 10-7 | 0,999919 | 0,000153 | 0,958635 | 1,000000 | 1,000000 | 0,958635 | 0,999919 | 0,000412 | 0,056155 | 0,958635 | 0,958635 |          | 0,958635 |
| 13   | C27 10-8 | 0,999919 | 0,000412 | 1,000000 | 0,958635 | 0,958635 | 1,000000 | 0,999919 | 0,010764 | 0,632003 | 1,000000 | 1,000000 | 0,958635 |          |

**Tabla 1.** Efecto en el porcentaje de germinación obtenido por el BL: análogo 1, las mezclas de epímeros 26a: 26a/26b, 27a/27b y el análogo puro MB:35a sin la adición de sulfato de cobre.

**6.2. Porcentaje de germinación (%) con cobre**



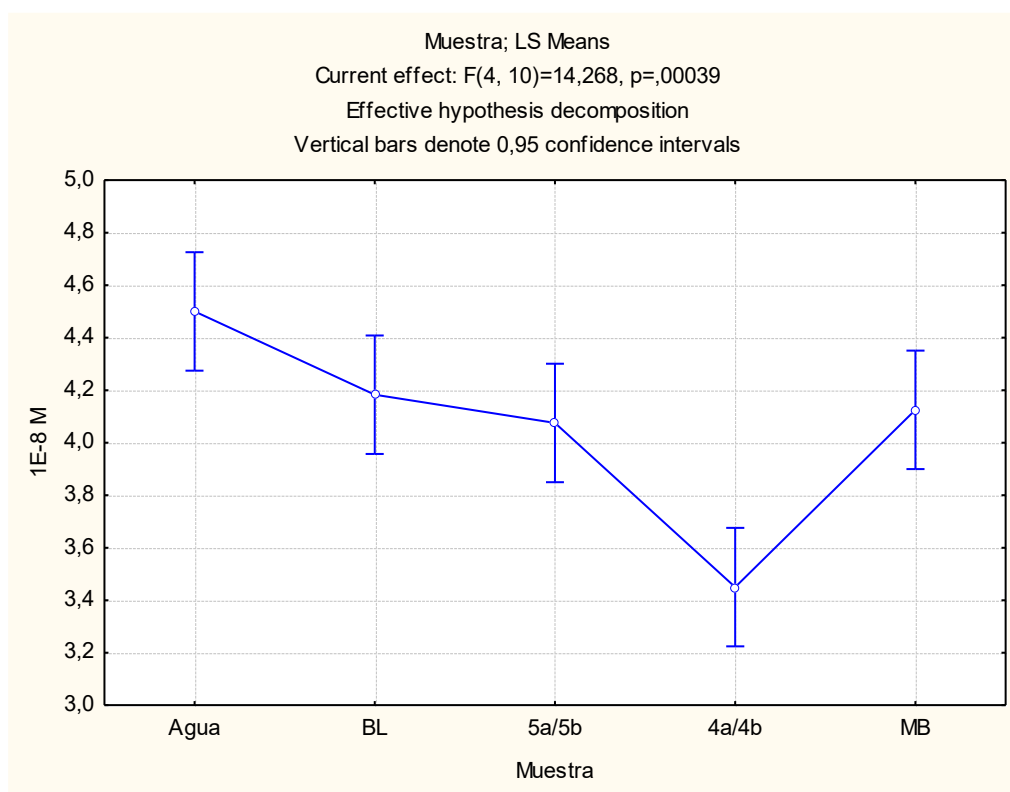
**Grafico 2.** Efecto en el porcentaje de germinación obtenido por el **BL**: análogo **1**, las mezclas de epímeros **26a**: **26a/26b**, **27a/27b** y el análogo puro **MB:35a** con la adición de sulfato de cobre.

| Tukey HSD test; variable Peso Seco + Cu (Spreadsheet4) |         |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|--|---------|----------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests           |         |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = 31,272, df = 26,000                |         |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Cell No.   | Muestra | {1}      | {2}    | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      | {10}     | {11}     | {12}     | {13}     |
| 1  | Agua    | 66,050   | 57,050 | 72,750   | 52,250   | 62,450   | 64,750   | 62,500   | 62,550   | 59,050   | 66,800   | 64,200   | 65,150   | 55,450   |
| 2  | BL 10-6 | 0,741062 |        | 0,076410 | 0,996554 | 0,990465 | 0,882992 | 0,989714 | 0,988917 | 1,000000 | 0,640653 | 0,925182 | 0,845160 | 1,000000 |

**Tabla 2.** Efecto en el porcentaje de germinación obtenido por el **BL**: análogo **1**, las mezclas de epímeros **26a**: **26a/26b**, **27a/27b** y el análogo puro **MB:35a** con la adición de sulfato de cobre.

### 6.3. Tiempo promedio de germinación sin cobre (MT)

#### TIEMPO PROMEDIO DE GERMINACIÓN SIN COBRE CONCENTRACIÓN $1 \times 10^{-8}$

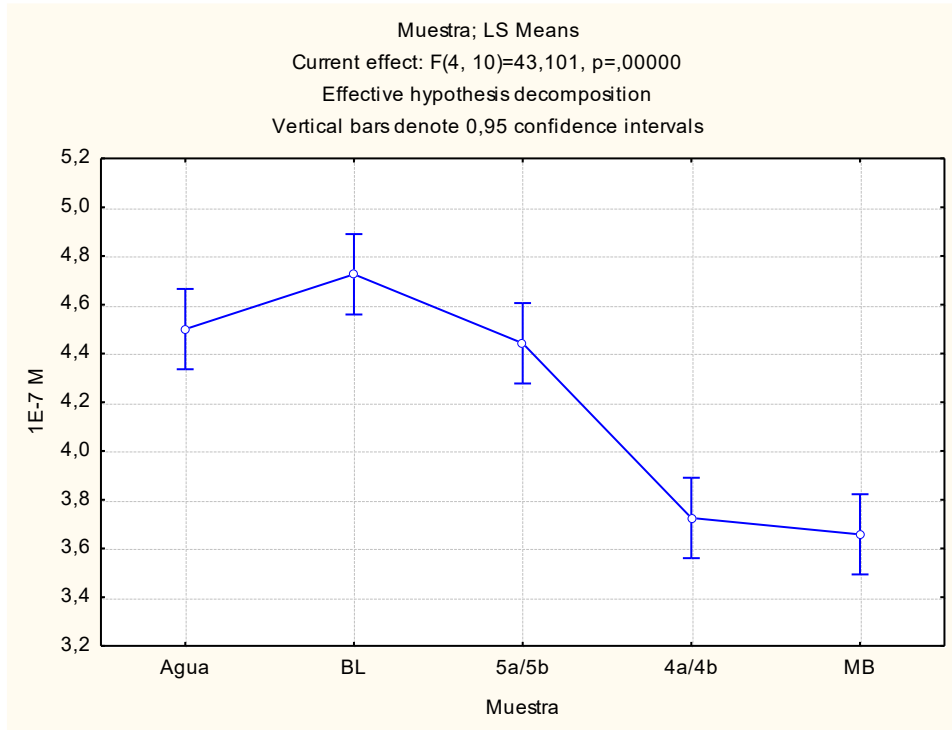


**Grafico 3.** Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b: 26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación al control negativo (agua).

| Tukey HSD test; variable 1E-8 M (Spreadsheet1) |         |          |          |          |          |          |
|--|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests   |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,03075, df = 10,000        |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.                                       | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
| 1  | Agua    | 4,5000   | 0,249504 | 0,082439 | 0,000321 | 0,139809 |
| 2  | BL      | 0,249504 |          | 0,938287 | 0,003317 | 0,993514 |
| 3  | 5a/5b   | 0,082439 | 0,938287 |          | 0,009717 | 0,996311 |
| 4  | 4a/4b   | 0,000321 | 0,003317 | 0,009717 |          | 0,005849 |
| 5  | MB      | 0,139809 | 0,993514 | 0,996311 | 0,005849 |          |

**Tabla 3.** Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b: 26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación al control negativo (agua).

TIEMPO PROMEDIO DE GERMINACIÓN SIN COBRE CONCENTRACIÓN  $1 \times 10^{-7}$

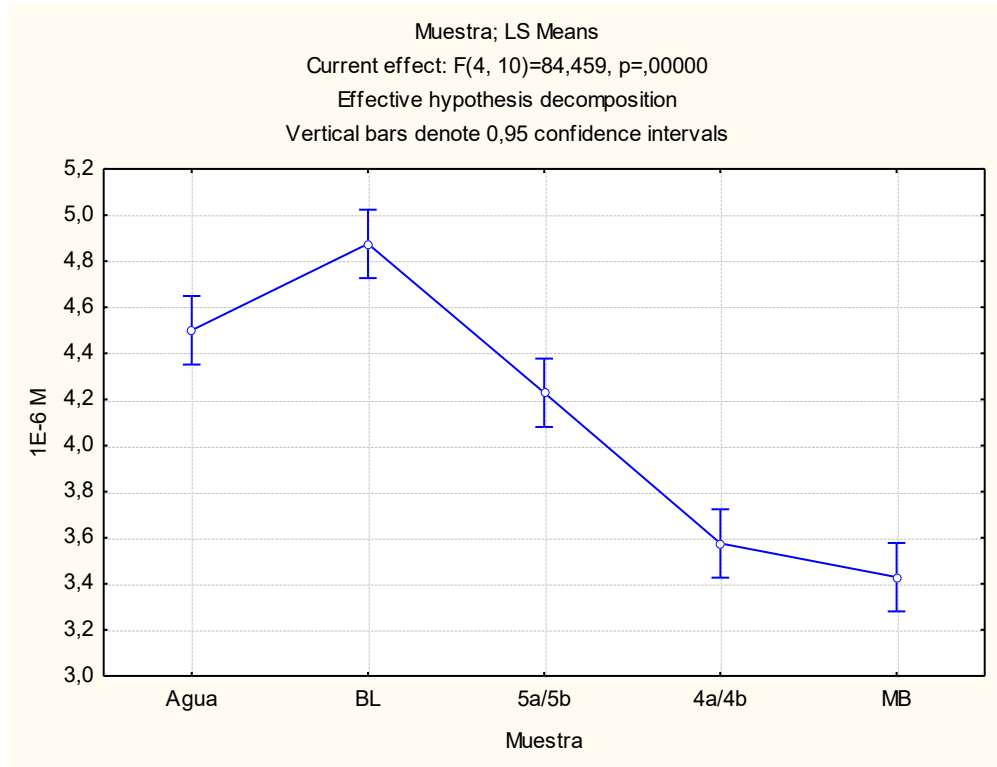


**Grafico 4.** Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b: 26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación al control negativo (agua).

| Tukey HSD test; variable 1E-7 M (Spreadsheet1) |         |          |          |          |          |          |
|--|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests   |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,01641, df = 10,000        |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.                                       | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
| 1  | Agua    | 4,5000   | 0,271964 | 0,978444 | 0,000306 | 0,000230 |
| 2  | BL      | 0,271964 |          | 0,122214 | 0,000182 | 0,000178 |
| 3  | 5a/5b   | 0,978444 | 0,122214 |          | 0,000460 | 0,000292 |
| 4  | 4a/4b   | 0,000306 | 0,000182 | 0,000460 |          | 0,964457 |
| 5  | MB      | 0,000230 | 0,000178 | 0,000292 | 0,964457 |          |

**Tabla 4.** Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b: 26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación al control negativo (agua).

TIEMPO PROMEDIO DE GERMINACIÓN SIN COBRE CONCENTRACIÓN  $1 \times 10^{-6}$



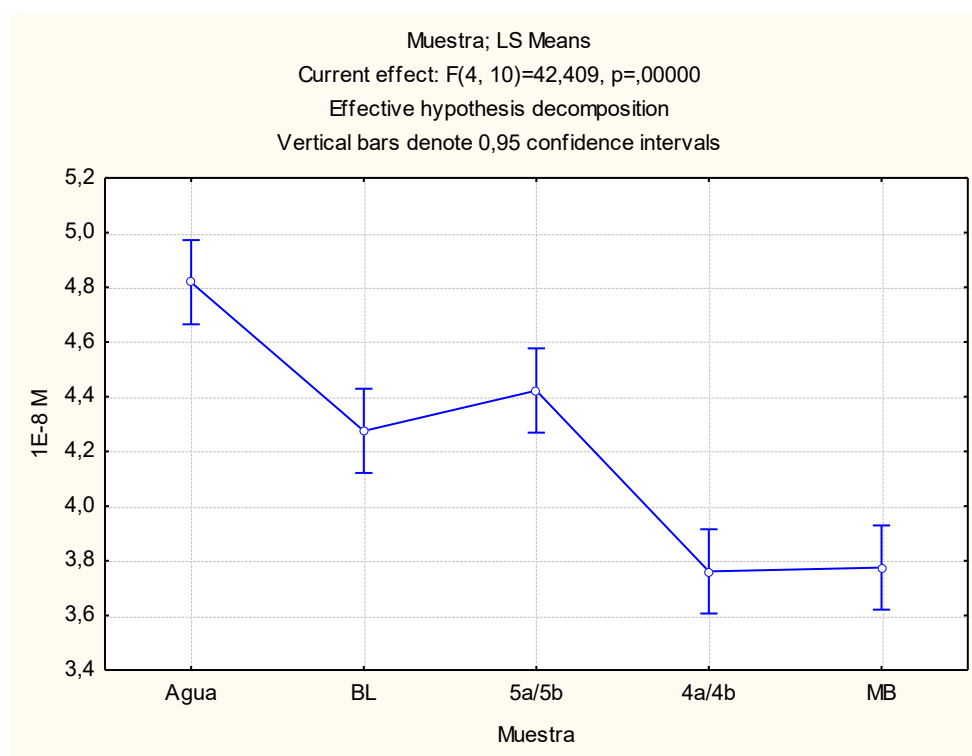
**Grafico 5.** Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b: 26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación al control negativo (agua).

| Tukey HSD test; variable 1E-6 M (Spreadsheet1) |         |          |          |          |          |          |
|--|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests   |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,01333, df = 10,000        |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.                                       | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
|  |         | 4,5000   | 4,8750   | 4,2289   | 3,5750   | 3,4288   |
| 1  | Agua    |          | 0,017385 | 0,095001 | 0,000180 | 0,000176 |
| 2  | BL      | 0,017385 |          | 0,000459 | 0,000176 | 0,000176 |
| 3  | 5a/5b   | 0,095001 | 0,000459 |          | 0,000429 | 0,000205 |
| 4  | 4a/4b   | 0,000180 | 0,000176 | 0,000429 |          | 0,556407 |
| 5  | MB      | 0,000176 | 0,000176 | 0,000205 | 0,556407 |          |

**Tabla 5.** Efectos sobre el tiempo promedio de germinación del **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b: 26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación al control negativo (agua).

### 6.4. Tiempo promedio de germinación con cobre (MT)

#### TIEMPO PROMEDIO DE GERMINACIÓN CON COBRE CONCENTRACIÓN $1 \times 10^{-8}$

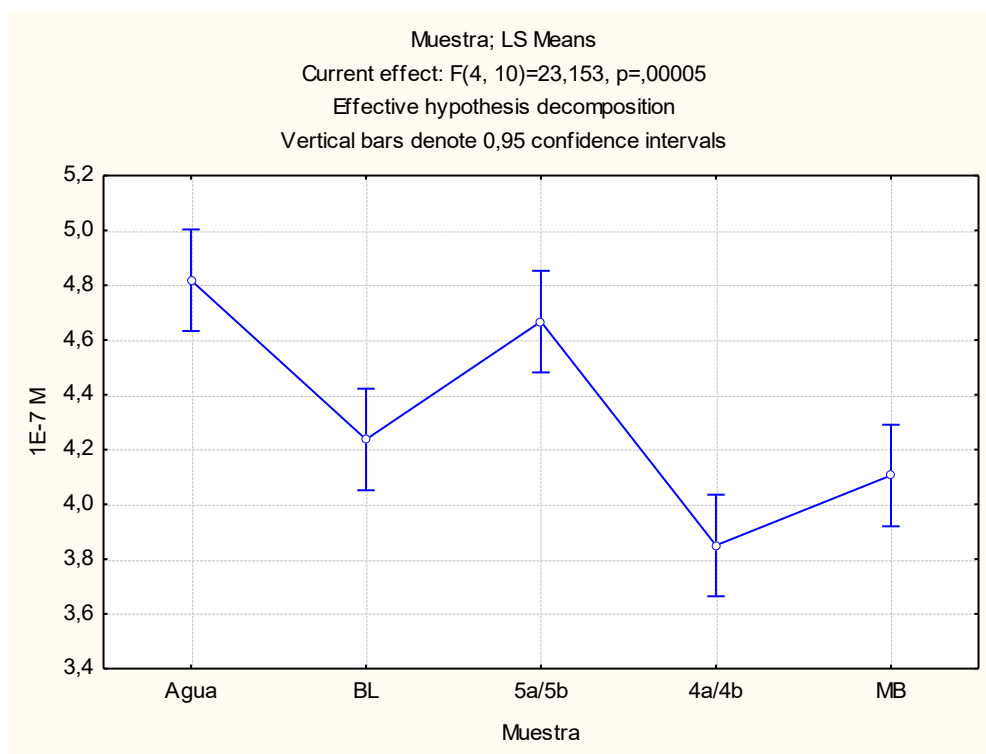


**Grafico 6.** Efectos sobre tiempo promedio de germinación de BL:1, las mezclas de análogos 4a/4b:26a/26b y 5a/5b:27a/27b, y el análogo puro MB:35a, con control negativo (agua + CuSO<sub>4</sub> a 80um).

| Tukey HSD test; variable 1E-8 M (Tasa_Germinación_Con_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,01433, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
| 1   | Agua    | 4,8184   | 4,2750   | 4,4226   | 3,7611   | 3,7750   |
| 2   | BL      | 0,001859 |          | 0,578990 | 0,002751 | 0,003331 |
| 3   | 5a/5b   | 0,015602 | 0,578990 |          | 0,000493 | 0,000560 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000177 | 0,002751 | 0,000493 |          | 0,999896 |
| 5   | MB      | 0,000177 | 0,003331 | 0,000560 | 0,999896 |          |

**Tabla 6.** Efectos sobre tiempo promedio de germinación de BL:1, las mezclas de análogos 4a/4b:26a/26b y 5a/5b:27a/27b, y el análogo puro MB:35a, con control negativo (agua + CuSO<sub>4</sub> a 80um).

TIEMPO PROMEDIO DE GERMINACIÓN CON COBRE COCNETRACIÓN  $1 \times 10^{-7}$

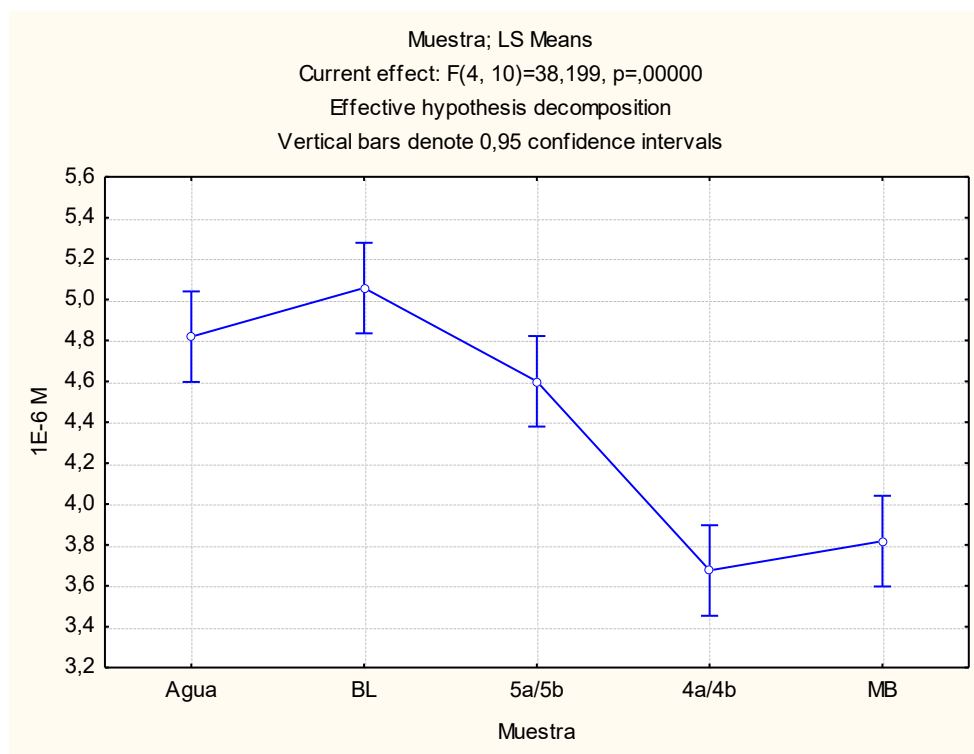


**Grafico 7.** Efectos sobre tiempo promedio de germinación de BL:1, las mezclas de análogos 4a/4b:26a/26b y 5a/5b:27a/27b, y el análogo puro MB:35a, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

| Tukey HSD test; variable 1E-7 M (Tasa_Germinación_Con_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,02078, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
|   |         | 4,8184   | 4,2368   | 4,6671   | 3,8500   | 4,1053   |
| 1   | Agua    |          | 0,004235 | 0,705415 | 0,000218 | 0,001021 |
| 2   | BL      | 0,004235 |          | 0,028525 | 0,050467 | 0,794205 |
| 3   | 5a/5b   | 0,705415 | 0,028525 |          | 0,000423 | 0,005378 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000218 | 0,050467 | 0,000423 |          | 0,265679 |
| 5   | MB      | 0,001021 | 0,794205 | 0,005378 | 0,265679 |          |

**Tabla 7.** Efectos sobre tiempo promedio de germinación de BL:1, las mezclas de análogos 4a/4b:26a/26b y 5a/5b:27a/27b, y el análogo puro MB:35a, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

TIEMPO PROMEDIO DE GERMINACIÓN CON COBRE CONCENTRACIÓN  $1 \times 10^{-6}$



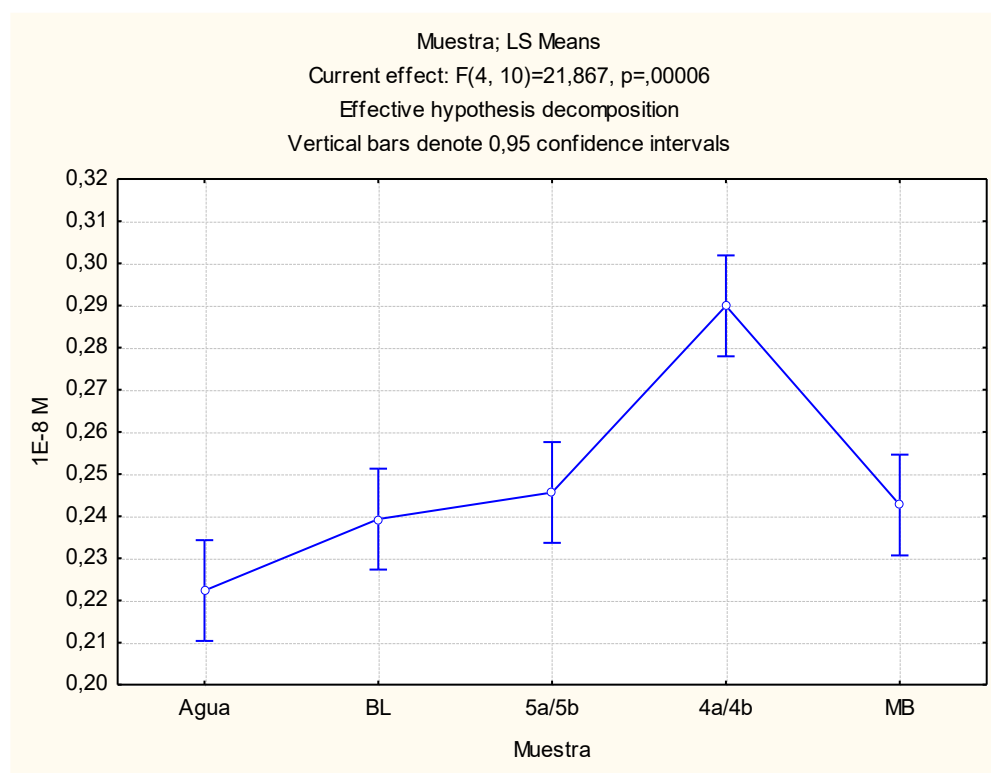
**Grafico 8.** Efectos sobre tiempo promedio de germinación de BL:1, las mezclas de análogos 4a/4b:26a/26b y 5a/5b:27a/27b, y el análogo puro MB:35a, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

| Tukey HSD test; variable 1E-6 M (Tasa_Germinación_Con_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,02964, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
| 1   | Agua    | 4,8184   | 5,0566   | 4,6000   | 3,6750   | 3,8184   |
| 2   | BL      |          | 0,478303 | 0,554589 | 0,000224 | 0,000371 |
| 3   | 5a/5b   | 0,478303 |          | 0,053564 | 0,000180 | 0,000195 |
| 4   | 4a/4b   | 0,554589 | 0,053564 |          | 0,000584 | 0,001859 |
| 5   | MB      | 0,000224 | 0,000180 | 0,000584 |          | 0,840694 |
|   |         | 0,000371 | 0,000195 | 0,001859 | 0,840694 |          |

**Tabla 8.** Efectos sobre tiempo promedio de germinación de BL:1, las mezclas de análogos 4a/4b:26a/26b y 5a/5b:27a/27b, y el análogo puro MB:35a, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

## 6.5. Tasa de germinación sin cobre (MR)

### TASA DE GERMINACIÓN SIN COBRE CONCETRACIÓN 1X10<sup>-8</sup>

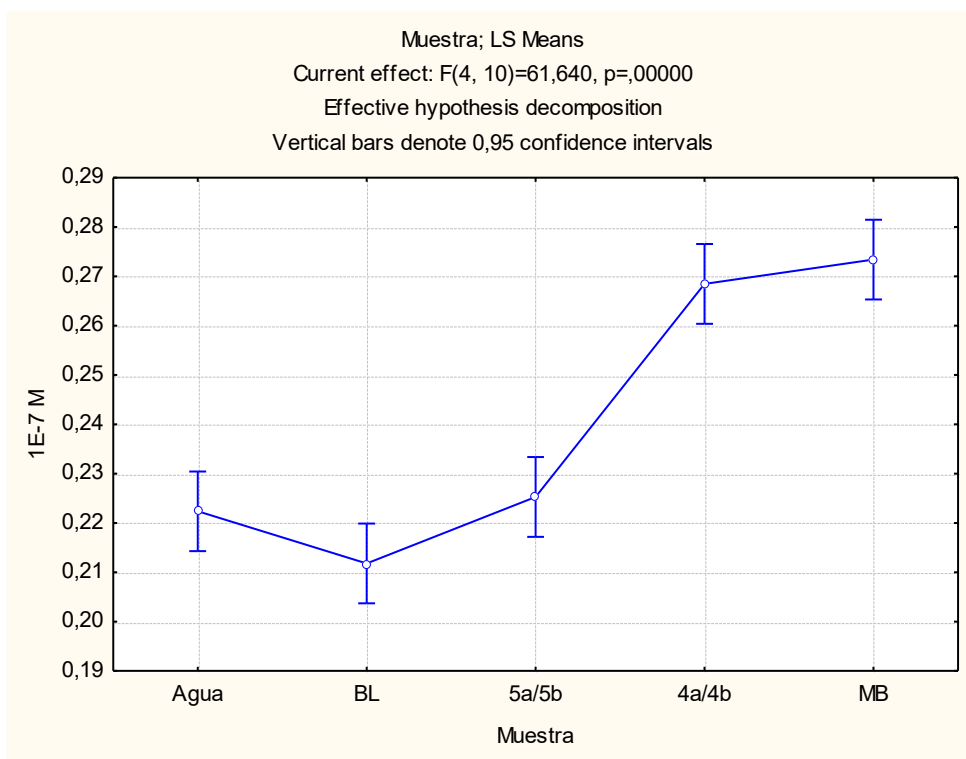


**Gráfico 9.** Efectos sobre la tasa de germinación de **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación con el control negativo agua.

| Tukey HSD test; variable 1E-8 M (Tasa_Germinación_Sin_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,00009, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
| 1   | Agua    | ,22236   | ,23931   | ,24563   | ,28992   | ,24265   |
| 2   | BL      | 0,243826 |          | 0,914677 | 0,000192 | 0,129431 |
| 3   | 5a/5b   | 0,071237 | 0,914677 |          | 0,001339 | 0,994199 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000192 | 0,000542 | 0,001339 |          | 0,000843 |
| 5   | MB      | 0,129431 | 0,991117 | 0,994199 | 0,000843 |          |

**Tabla 9.** Efectos sobre la tasa de germinación de **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación con el control negativo agua.

TASA DE GERMINACIÓN SIN COBRE CONCENTRACIÓN  $1 \times 10^{-7}$



**Gráfico 10.** Efectos sobre la tasa de germinación de **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación con el control negativo agua.

| Tukey HSD test; variable 1E-7 M (Tasa_Germinación_Sin_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,00004, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
| 1   | Agua    |          | 0,307518 | 0,976949 | 0,000190 | 0,000180 |
| 2   | BL      | 0,307518 |          | 0,138183 | 0,000177 | 0,000176 |
| 3   | 5a/5b   | 0,976949 | 0,138183 |          | 0,000209 | 0,000184 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000190 | 0,000177 | 0,000209 |          | 0,866947 |
| 5   | MB      | 0,000180 | 0,000176 | 0,000184 | 0,866947 |          |

**Tabla 10.** Efectos sobre la tasa de germinación de **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación con el control negativo agua.

TASA DE GERMINACIÓN SIN COBRE CONCENTRACIÓN  $1 \times 10^{-6}$

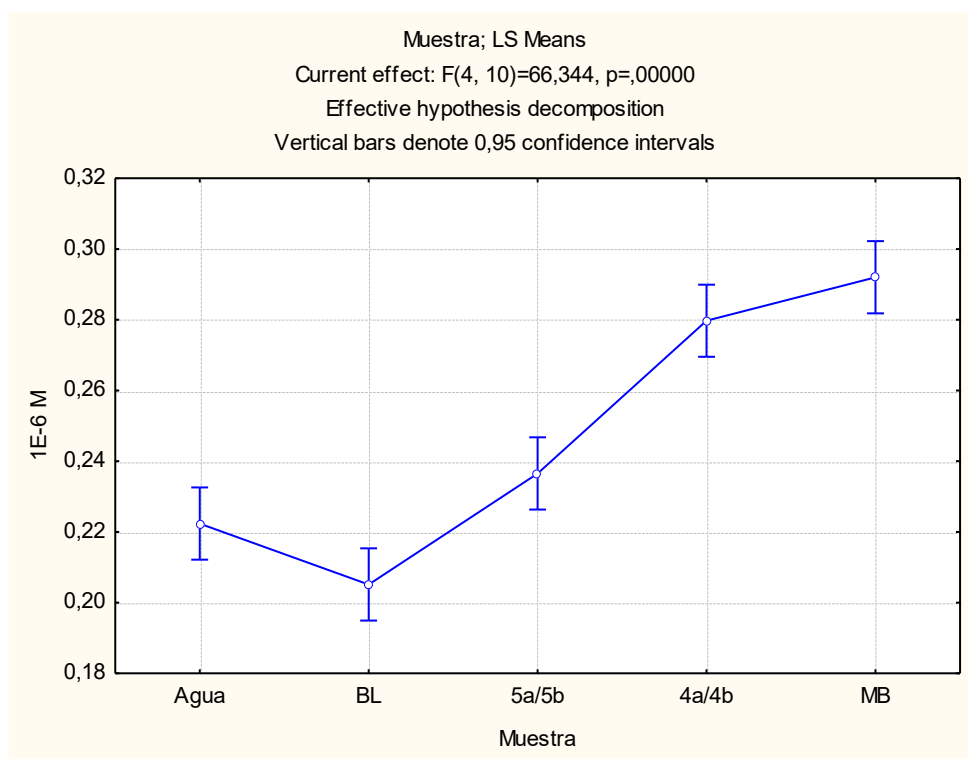


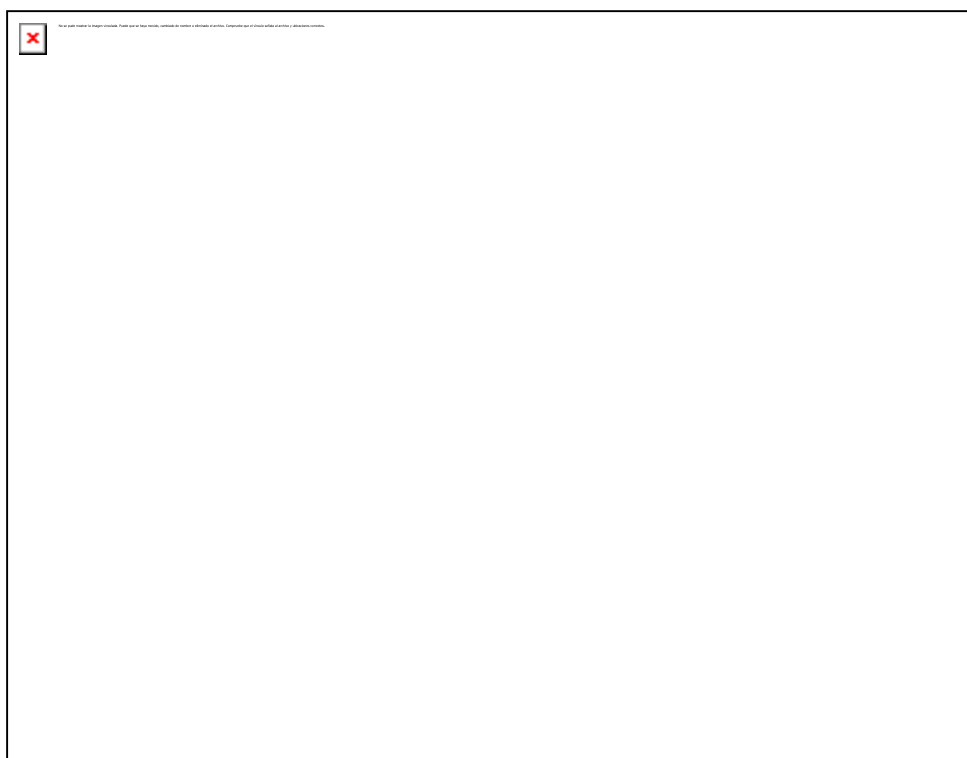
Gráfico 11. Efectos sobre la tasa de germinación de **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación con el control negativo agua.

| Tukey HSD test; variable 1E-6 M (Tasa_Germinación_Sin_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,00006, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
|   |         | ,22236   |          |          |          |          |
| 1   | Agua    |          | 0,131649 | 0,258618 | 0,000193 | 0,000177 |
| 2   | BL      | 0,131649 |          | 0,004830 | 0,000176 | 0,000176 |
| 3   | 5a/5b   | 0,258618 | 0,004830 |          | 0,000537 | 0,000202 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000193 | 0,000176 | 0,000537 |          | 0,378373 |
| 5   | MB      | 0,000177 | 0,000176 | 0,000202 | 0,378373 |          |

Tabla 11. Efectos sobre la tasa de germinación de **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, en comparación con el control negativo agua.

## 6.6. Tasa de germinación con cobre (MR)

### TASA DE GERMINACIÓN CON COBRE CONCENTRACIÓN $1 \times 10^{-8}$

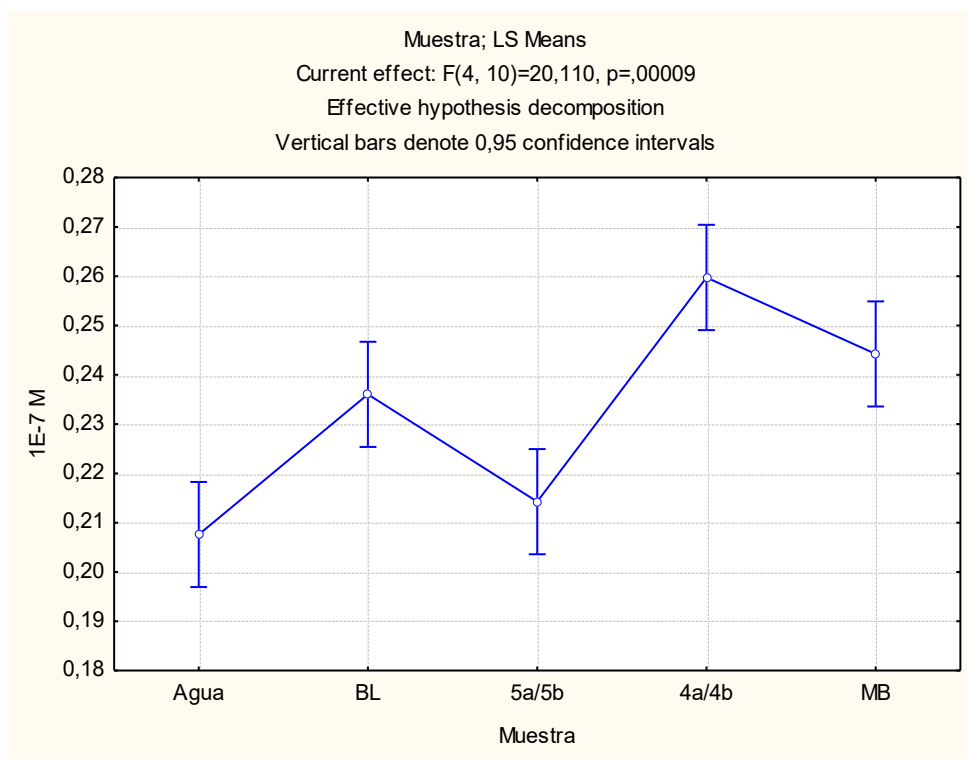


**Gráfico 12.** Tiempo medio de germinación en días v/s el **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

| Tukey HSD test; variable 1E-8 M (Tasa_Germinación_Con_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,00004, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
| 1   | Agua    | ,20760   | ,23412   | ,22624   | ,26591   | ,26491   |
| 2   | BL      | 0,003208 |          | 0,569382 | 0,000897 | 0,001129 |
| 3   | 5a/5b   | 0,030289 | 0,569382 |          | 0,000265 | 0,000291 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000176 | 0,000897 | 0,000265 |          | 0,999650 |
| 5   | MB      | 0,000177 | 0,001129 | 0,000291 | 0,999650 |          |

**Tabla 12.** Tiempo medio de germinación en días v/s el **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

TASA DE GERMINACIÓN CON COBRE CONCENTRACIÓN  $1 \times 10^{-7}$

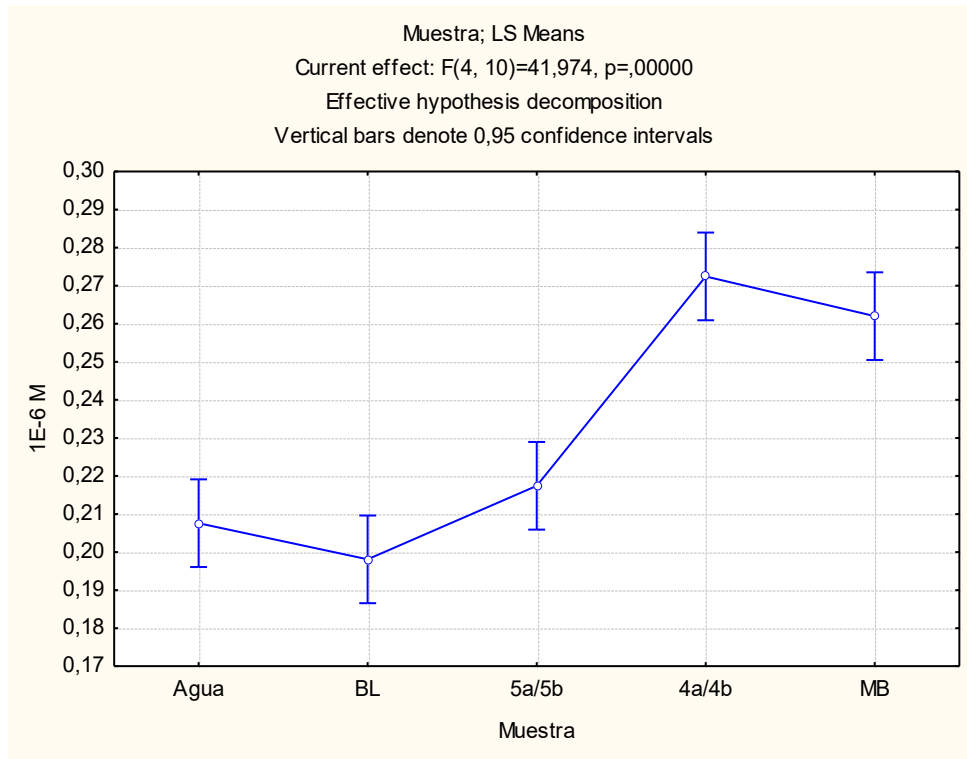


**Gráfico 13.** Tiempo medio de germinación en días v/s el **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

| Tukey HSD test; variable 1E-7 M (Tasa_Germinación_Con_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,00007, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
|   |         | ,20760   | ,23603   | ,21427   | ,25974   | ,24423   |
| 1   | Agua    |          | 0,012442 | 0,856146 | 0,000264 | 0,002249 |
| 2   | BL      | 0,012442 |          | 0,056452 | 0,036220 | 0,746169 |
| 3   | 5a/5b   | 0,856146 | 0,056452 |          | 0,000517 | 0,008902 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000264 | 0,036220 | 0,000517 |          | 0,224807 |
| 5   | MB      | 0,002249 | 0,746169 | 0,008902 | 0,224807 |          |

**Tabla 13.** Tiempo medio de germinación en días v/s el **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua +  $\text{CuSO}_4$  a 80um).

TASA DE GERMINACIÓN CON COBRE CONCENTRACIÓN 1X10<sup>-6</sup>



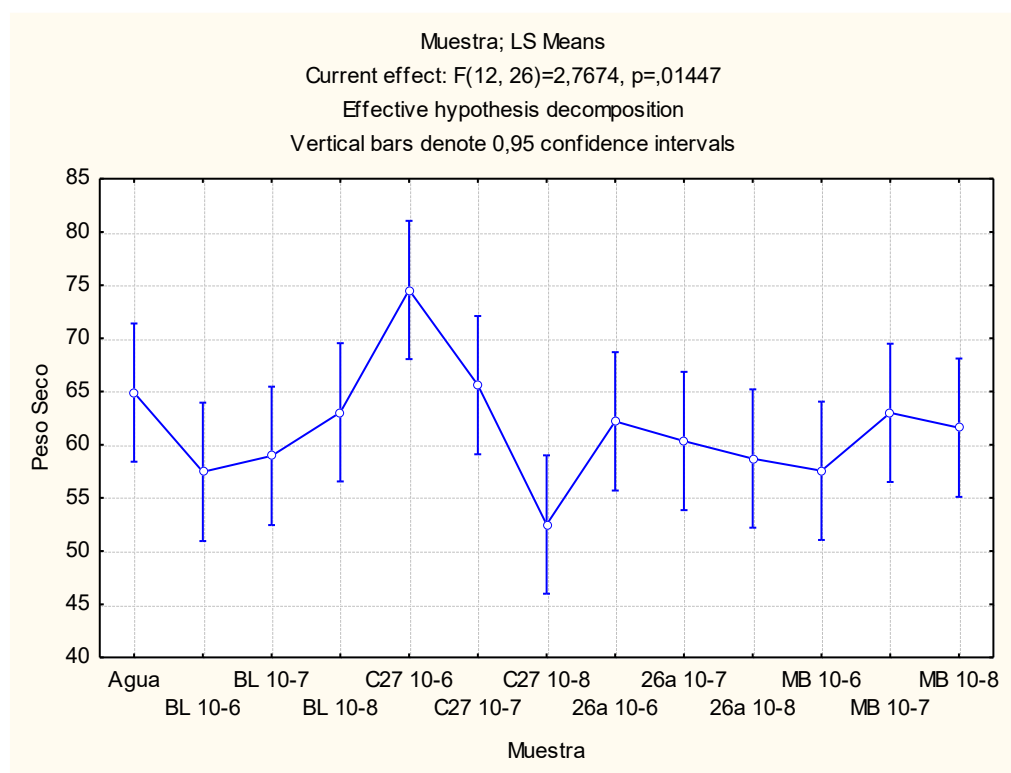
**Gráfico 14.** Tiempo medio de germinación en días v/s el **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua + CuSO<sub>4</sub> a 80um).

| Tukey HSD test; variable 1E-6 M (Tasa_Germinación_Con_Cu) |         |          |          |          |          |          |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests              |         |          |          |          |          |          |
| Error: Between MS = ,00008, df = 10,000                   |         |          |          |          |          |          |
| Cell No.  | Muestra | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      |
|   |         | ,20760   | ,19809   | ,21742   | ,27242   | ,26201   |
| 1   | Agua    |          | 0,697752 | 0,673542 | 0,000193 | 0,000301 |
| 2   | BL      | 0,697752 |          | 0,135081 | 0,000179 | 0,000197 |
| 3   | 5a/5b   | 0,673542 | 0,135081 |          | 0,000288 | 0,000979 |
| 4   | 4a/4b   | 0,000193 | 0,000179 | 0,000288 |          | 0,627584 |
| 5   | MB      | 0,000301 | 0,000197 | 0,000979 | 0,627584 |          |

**Tabla 14.** Tiempo medio de germinación en días v/s el **BL:1**, las mezclas de análogos **4a/4b:26a/26b** y **5a/5b:27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua + CuSO<sub>4</sub> a 80um).

## 6.7. Peso seco (PS)

### PESO SECO SIN COBRE

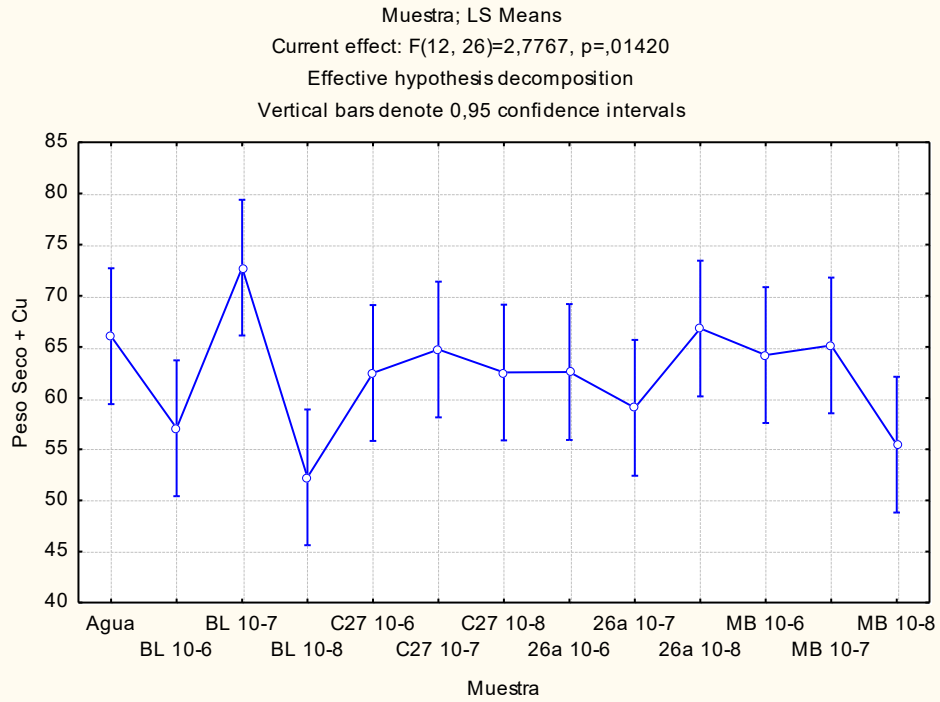


**Gráfico 15.** Efecto sobre el peso seco posterior a la germinación de cada tratamiento con el **BL:1**, mezcla de análogos **26a:26a/26b** y **27a: 27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo agua.

| Tukey HSD test; variable Peso Seco (Spreadsheet4) |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests      |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| Error: Between MS = 30,032, df = 26,000           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| Cell No.  | Muestra  | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      | {10}     | {11}     | {12}     | {13} |
| 1   | Agua     |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| 2   | BL 10-6  | 0,891332 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| 3   | BL 10-7  | 0,975932 | 1,000000 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| 4   | BL 10-8  | 1,000000 | 0,984929 | 0,999043 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| 5   | C27 10-6 | 0,627171 | 0,032876 | 0,068999 | 0,374293 |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| 6   | C27 10-7 | 1,000000 | 0,822321 | 0,946806 | 0,999993 | 0,723922 |          |          |          |          |          |          |          |      |
| 7   | C27 10-8 | 0,273041 | 0,994591 | 0,956830 | 0,499731 | 0,002353 | 0,208474 |          |          |          |          |          |          |      |
| 8   | 26a 10-6 | 0,999987 | 0,996242 | 0,999906 | 1,000000 | 0,278134 | 0,999850 | 0,620076 |          |          |          |          |          |      |
| 9   | 26a 10-7 | 0,997447 | 0,999972 | 1,000000 | 0,999987 | 0,131308 | 0,991078 | 0,854134 | 1,000000 |          |          |          |          |      |
| 10  | 26a 10-8 | 0,967382 | 1,000000 | 1,000000 | 0,998329 | 0,061181 | 0,932173 | 0,967382 | 0,999799 | 1,000000 |          |          |          |      |
| 11  | MB 10-6  | 0,899651 | 1,000000 | 1,000000 | 0,986943 | 0,034588 | 0,833272 | 0,993579 | 0,996895 | 0,999981 | 1,000000 |          |          |      |
| 12  | MB 10-7  | 1,000000 | 0,985964 | 0,999149 | 1,000000 | 0,368173 | 0,999991 | 0,506690 | 1,000000 | 0,999989 | 0,998499 | 0,987868 |          |      |
| 13  | MB 10-8  | 0,999890 | 0,998926 | 0,999989 | 1,000000 | 0,221252 | 0,999245 | 0,703770 | 1,000000 | 1,000000 | 0,999972 | 0,999149 | 1,000000 |      |

**Tabla 15.** Efecto sobre el peso seco posterior a la germinación de cada tratamiento con el **BL:1**, mezcla de análogos **26a:26a/26b** y **27a: 27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo agua.

**PESO SECO CON COBRE**



**Gráfico 16:** Efecto sobre el peso seco posterior a la germinación de cada tratamiento con el **BL:1**, mezcla de análogos **26a:26a/26b** y **27a: 27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua + CuSO<sub>4</sub> a 80um).

| Tukey HSD test; variable Peso Seco + Cu (Spreadsheet4) |         |          |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |
|--|---------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests           |         |          |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |
| Error: Between MS = 31,272, df = 26,000                |         |          |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |
| Cell No.   | Muestra | {1}      | {2} | {3} | {4} | {5} | {6} | {7} | {8} | {9} | {10} | {11} | {12} | {13} |
| 1  | Agua    |          |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |
| 2  | BL 10-6 | 0,741062 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |

**Tabla 16.** Efecto sobre el peso seco posterior a la germinación de cada tratamiento con el **BL:1**, mezcla de análogos **26a:26a/26b** y **27a: 27a/27b** y el análogo puro **MB:35a**, con control negativo (agua + CuSO<sub>4</sub> a 80um).