



Universidad Técnica
Federico Santa María



Universidad
de Valparaíso

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN CIENCIAS,
MENCIÓN QUÍMICA

**SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS
DE BRASINOESTEROIDES
A PARTIR DE ÁCIDO HIODESOXICÓLICO
CON POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA Y ANTINEOPLÁSICA**

Rodrigo Javier Carvajal Fernández

Doctor en Ciencias, mención Química

Valparaíso, Chile
2018



Universidad Técnica
Federico Santa María



Universidad
de Valparaíso

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN CIENCIAS,
MENCIÓN QUÍMICA

**SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS
DE BRASINOESTEROIDES
A PARTIR DE ÁCIDO HIODESOXICÓLICO
CON POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA Y ANTINEOPLÁSICA**

Tesis de grado presentada por
Rodrigo Javier Carvajal Fernández

como requisito para optar al grado de
Doctor en Ciencias, mención Química

Director de tesis
Dr. Luis Espinoza Catalán

Codirector de Tesis
Dr. Joan Villena García

Valparaíso, Chile
2018



Universidad Técnica
Federico Santa María



Universidad
de Valparaíso

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN CIENCIAS,
MENCIÓN QUÍMICA

TÍTULO DE LA TESIS:

**SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS DE BRASINOESTEROIDES A PARTIR DE ÁCIDO
HIODESOXICÓLICO CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y
ANTINEOPLÁSICA**

AUTOR:

RODRIGO JAVIER CARVAJAL FERNÁNDEZ

TRABAJO DE TESIS, presentado en cumplimiento de los requisitos para la obtención del Grado de Doctor en Ciencias, mención Química. Programa impartido por la Universidad Técnica Federico Santa María y la Universidad de Valparaíso.

Dr. Héctor Carrasco Altamirano

Dr. Mauricio Cuellar Fritis

Dra. Katy Díaz Peralta

Dr. Daniel Ramírez Ruiz

Valparaíso, 2018

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda directa o indirecta han colaborado en la realización de este trabajo.

Primero agradezco de manera especial al Dr. Luis Espinoza Catalán, por aceptarme bajo su dirección, por completar mi formación académica y enseñarme lo que es ser un químico orgánico; pero lo más importante, su apoyo, su confianza y su infinita paciencia, los cuales han sido invaluable. Profe, nada de esto sería posible si no hubiese estado ahí, en los buenos y en los malos momentos.

A mis madres, que me hicieron lo que soy, las amo. Kenita, mamita, estás y estarás siempre conmigo, no hay día que no piense en ti, eres el ángel que cuida mis pasos; a mi viejuita linda que me crió. Quitita, esto es por y para ti. A mi padre que se desvive por nosotros; papá, gracias por todo ¡lo hicimos! A mis hermanos, el regalo más grande que me dejó mi madre. A Wladimir, a Ely, que me abrieron su corazón, gracias por estar ahí siempre conmigo.

Agradezco al Dr. Joan Villena, cotutor de esta tesis, por su disposición, ayuda y paciencia, además de haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas. Un agradecimiento especial a la Dra. Katy Díaz, profesora y amiga, siempre preocupada, además partícipe de esta investigación como cotutora no oficial y con la cual compartimos el amor por el estudio de las plantas. A Cesar González, jefe de laboratorio que tuvo la ardua labor de preparar el camino de los BRs, y del cual todos nos apoyamos. Al primero compañero y profesor Dr. Lautaro Taborga, siempre voluntarioso y con el cual disfrutaba de extensas conversaciones. A Karen Catalán y Macarena López, quienes con su ayuda y disposición son un enorme soporte en el trabajo del laboratorio y para el programa de doctorado.

A mis amigos y compañeros: María Isabel Chávez, Chavelina, eres mi eterna partner del lab; Karol Ferrer, amiga eres un regalo que nos cayó del cielo; Mauricio Osorio, Nitza Soto, Mauricio Soto y Fernanda Aguilera, con quienes he compartido durante tanto tiempo, sobre todo en esos momentos cuando la síntesis orgánica nos daba la espalda. Chicos, realmente hicieron del trabajo en el laboratorio algo entrañable.

Finalmente, agradezco al Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias mención Química y a las universidades que lo sustentan: Universidad Técnica Federico Santa María y Universidad de Valparaíso, Programa de becas de postgrado de la Dirección General de Investigación y Postgrado USM (DGIP-USM N° 13.15.83), Programa de Incentivos a la Iniciación Científica USM (PIIC 018/2012 y PIIC 026/2014), Programa de asistencias de becas del Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias mención Química, UV-USM.

A todos, muchas gracias.

A Kenita, mi madre,
una estrella que brilló intensamente,
pero se extinguió demasiado pronto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
CAPÍTULO 1 – Introducción	5
Antecedentes generales	6
Estructura y función de los brasinoesteroides	6
Potencial actividad antifúngica de los brasinoesteroides	10
Potencial actividad antineoplásica de los brasinoesteroides	13
Análisis de la relación estructura-actividad de los brasinoesteroides	16
Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides en el anillo A	16
Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides en el anillo B	19
Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides en la fusión de anillos A/B	20
Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides en la cadena lateral	21
Estrategias sintéticas	22
Modificaciones hemisintéticas de la cadena lateral	22
PROPUESTA	32
HIPÓTESIS	34
CAPÍTULO 2 – Objetivos	35
Objetivo general	36
Objetivos específicos	36
CAPÍTULO 3 – Métodos experimentales	37
Esquema general de síntesis	38
Estrategia sintética diseñada para la obtención de los nuevos análogos de brasinoesteroides	39

Ruta de síntesis del compuesto análogo 104	39
Ruta de síntesis del compuesto análogo 84	39
Ruta de síntesis de los compuestos análogos 86 y 87	40
Ruta de síntesis del compuesto análogo 85	40
Ruta de síntesis de los compuestos análogos 88 y 89	41
Materiales e instrumentación usados en síntesis orgánica	42
Cromatografía en capa fina (CCF)	42
Cromatografía en columna de sílica gel (CC)	42
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	42
Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)	42
Espectroscopía IR	43
Puntos de fusión	43
Rotación óptica $[\alpha]_D^t$	43
Reactivos e insumos utilizados en esta investigación	43
Solventes utilizados como eluyentes en esta investigación	45
Metodologías usadas en la síntesis de los análogos de brasinoesteroides	46
Síntesis del compuesto 3 α ,6 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (90)	46
Síntesis de los compuestos: 3 α ,6 α -dietoxicarbonil-5 β -colan-24-oato de metilo (91) y 3 α -hidroxi-6 α -etoxicarbonil-5 β -colan-24-oato de metilo (92)	47
Síntesis de los compuestos: 3 α ,6 α -dibenzoiloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (93) y 3 α -benzoiloxi-6 α -hidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (94)	49
Síntesis de 3-dimetoxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (95) mediante oxidación con clorocromato de piridinio (PCC)	51
Síntesis de 3,6-dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (95) y 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (97) mediante oxidación con reactivo de Jones	52
Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (97)	54
Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (98)	55
Síntesis de 3 α -metanesulfonil-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (99)	56
Síntesis de 3-desoxi-6-oxo-5 α -2-colen-24-oato de metilo (100) a partir del compuesto mesilado (99)	57

Síntesis de 3-desoxi-6-oxo-5 α -2-colen-24-oato de metilo (100) desde el compuesto hidroxilado (98)	58
Síntesis de 2 α ,3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (101)	59
Síntesis de ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (102)	60
Síntesis de ácido 3 α -acetoxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (103)	62
Síntesis de 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona (104)	63
Síntesis de la mezcla epimérica de 22(<i>R/S</i>), 23-dihidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (108 y 109)	64
Síntesis de 23-benzoiloxi-22 <i>S</i> -hidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (110)	66
Síntesis de 3 α , 22 <i>S</i> , 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (84)	67
Síntesis de 3 α , 22 <i>S</i> , 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (111)	68
Síntesis de 3 α , 22 <i>S</i> , 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (112) y 3 α , 22 <i>S</i> , 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-6-oxalactona (113)	70
Síntesis de 3 α , 22 <i>S</i> , 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (86)	72
Síntesis de 3 α , 22 <i>S</i> , 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-oxalactona (87)	73
Síntesis de 3 α -acetoxi, 22(<i>S</i>)-23-epoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (106) y 3 α -acetoxi, 22(<i>R</i>)-23-epoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (107)	74
Materiales y métodos usados en la evaluación de la actividad antifúngica de los análogos de brasinoesteroides frente al hongo <i>Botrytis cinerea</i> in vitro	77
Materiales y métodos usados en la evaluación de la actividad de promoción de crecimiento vegetal de los análogos de brasinoesteroides	78
Materiales y métodos usados en la evaluación de la actividad antineoplásica de los análogos de brasinoesteroides	79
Cuantificación de citotoxicidad mediante método de tinción con SRB	80
CAPÍTULO 4 – Resultados y discusiones	82
Resultados y discusiones de la síntesis de los análogos de BRs	83
Resultados y discusiones de la evaluación de la actividad antifúngica de los análogos de BRs sintetizados contra <i>Botrytis cinerea</i> in vitro	106
Resultados y discusiones de la evaluación de los análogos de BRs sintetizados como promotores de elongación celular vegetal	117

Resultados y discusiones de la evaluación de la actividad citotóxica de los análogos de brasinoesteroides sintetizados en líneas celulares tumorales <i>in vitro</i>	122
CAPÍTULO 5 – Conclusiones	135
REFERENCIAS	140
ANEXO	151
A. Espectroscopía RMN	152
A.1. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α, 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5α-colan-6-ona (84)	152
A.2. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α, 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5α-colan-7-oxalactona (86)	154
A.3. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α, 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5α-colan-7-oxo-6-oxalactona (87)	156
A.4. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN del compuesto 3,6-dioxo-5β-colan-24-oato de metilo (95)	158
A.5. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN del compuesto 3α-hidroxi-6-oxo-5β-colan-24-oato de metilo (97)	159
A.6. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN del compuesto 3α-hidroxi-6-oxo-5α-colan-24-oato de metilo (98)	160
A.7. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN del compuesto 3α-acetoxi-24-nor-5α-22-colen-6-ona (104)	161
A.8. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22S, 23-dihidroxi-3α-acetoxi-24-nor-5α-colan-6-ona (109)	162
A.9. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 23-benzoiloxi-22S-hidroxi-3α-acetoxi-24-nor-5α-colan-6-ona (110) ..	165
A.10. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α, 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5β-colan-6-ona (111)	167
A.11. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α, 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5α-colan-6-oxo-7-oxalactona (112)	169
A.12. Espectroscopía ¹ H RMN, ¹³ C RMN, ¹³ C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α, 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5α-colan-7-oxo-6-oxalactona (113)	171
B. Espectrometría de masas	173
B.1. Espectrometría de masas del compuesto 3α, 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5α-colan-6-ona (84)	173

B.2.	Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-oxo-7-oxalactona (86)	173
B.3.	Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxo-6-oxalactona (87)	174
B.4.	Espectrometría de masas del compuesto 3 α - acetoxi - 24 - nor - 5 α - 22 - colen - 6 - ona (104)	174
B.5.	Espectrometría de masas del compuesto 22S, 23-dihidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (109)	175
B.6.	Espectrometría de masas del compuesto 23-benzoiloxi-22S-hidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (110)	175
B.7.	Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 β -colan-6-ona (111)	176
B.8.	Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-6-oxo-7-oxalactona (112)	176
B.9.	Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-7-oxo-6-oxalactona (113)	177
C.	Imágenes del ensayo de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea in vitro</i> (compuestos más activos).....	178
D.	Imágenes del test de inclinación de la lámina de arroz (RLIT)	179
E.	Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular no tumoral CoN	181
F.	Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular tumoral PC-3	185
G.	Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular tumoral HT-29	189
H.	Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular tumoral MCF7	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de los nuevos análogos de brasinoesteroides sintetizados en esta investigación	1
Figura 2.	Análogos de brasinoesteroides que presentaron mayores actividades en las pruebas biológicas evaluadas	2
Figura 3.	Estructura del brasinólido	5
Figura 4.	Estructura de los brasinoesteroides naturales y variaciones del esqueleto de 5 α -colestano	7
Figura 5.	Vía de señalización de BRs en la célula vegetal	8
Figura 6.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides I	9
Figura 7.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides II	17
Figura 8.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides III	18
Figura 9.	Funciones comunes en el anillo A, ordenados por actividad relativa biológica asociada	19
Figura 10.	Funciones comunes en el anillo B, ordenados por actividad relativa biológica asociada	19
Figura 11.	Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5 α -colestano y 5 β -colestano con fusión de los anillos A/B tipo <i>cis</i> y con fusión de los anillos A/B tipo <i>tras</i>	20
Figura 12.	Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5 α -colestano con presencia en el anillo B de las funciones: 6-desoxo, 6-oxo y 7-oxalactona	21
Figura 13.	Cadena lateral de 5 α -colestano en orden de su actividad relativa biológica asociada	22
Figura 14.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales de tipo espiroestánicas	23
Figura 15.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides con diferencias significativas en la cadena lateral	24
Figura 16.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales de tipo 24-alquil; 24-cicloalquil y grupos ésteres en posición 17	25
Figura 17.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales no oxigenadas y diferente tamaño de anillo B	26
Figura 18.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales no oxigenadas y función 5 α -hidroxi-6-oxo	27

Figura 19.	Análogos de brasinoesteroides monohidroxilados, con cadena lateral y función de éster metílico	27
Figura 20.	Estructuras de análogos derivados de ácido hiodesoxicólico (53) con significativo efecto en el crecimiento vegetal	28
Figura 21.	Estructuras de análogos derivados de ácido hiodesoxicólico (53) con funciones mono, dihidroxilada, mono y diacetilada en anillo A, función lactona en anillo B y cadena lateral de ácido carboxílico y éster metílico	29
Figura 22.	Estructuras de análogos derivados de ácido hiodesoxicólico (53) con funciones α -mono y α -dihidroxiladas en anillo A, función cetona en anillo B y cadena lateral de ácido carboxílico y éster metílico	29
Figura 23.	Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales de tipo 24-nor colanos, preparados desde ácido hiodesoxicólico (53) y desoxicólico (76)	31
Figura 24.	Estructuras de los compuestos objetivos de síntesis y estudio de actividad antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> y actividad antineoplásica en líneas de cáncer hormono-dependientes	33
Figura 25.	Esquema de recuperación compuesto 4, mediante reducción quimioselectiva desde 3	38
Figura 26.	Esquema de síntesis propuesto para la obtención del compuesto precursor común 104	39
Figura 27.	Esquema de síntesis propuesto para la obtención del compuesto 84	39
Figura 28.	Esquema de síntesis propuesto para la obtención de los compuestos 86 y 87	40
Figura 29.	Esquema de síntesis propuesto para la obtención del compuesto 85	40
Figura 30.	Esquema de síntesis propuesto para la obtención de los compuestos 88 y 89	41
Figura 31.	Esquema de síntesis y estructura del compuesto 90	46
Figura 32.	Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 91 y 92	47
Figura 33.	Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 93 y 94	49
Figura 34.	Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 95 y 96	51
Figura 35.	Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 95 y 97	52
Figura 36.	Esquema de recuperación compuesto 97, mediante reducción quimioselectiva desde 95	54
Figura 37.	Esquema de síntesis y estructura del compuesto 98	55
Figura 38.	Esquema de síntesis y estructura del compuesto 99	56
Figura 39.	Esquema de síntesis y estructura del compuesto 100	57
Figura 40.	Esquema de síntesis y estructura del compuesto 100 (II)	58

Figura 41. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 101	59
Figura 42. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 102	60
Figura 43. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 103	62
Figura 44. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 104	63
Figura 45. Esquema de síntesis y estructuras de la mezcla epimérica de compuestos 108 y 109	64
Figura 46. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 110	66
Figura 47. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 84	67
Figura 48. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 111	68
Figura 49. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 112 y 113	70
Figura 50. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 86	72
Figura 51. Esquema de síntesis y estructura del compuesto 87	73
Figura 52. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 106 y 107	74
Figura 53. Estructura 3D del compuesto 95 y ataque preferencial regio y estereoselectivo del agente reductor	87
Figura 54. Reacción de isomerización del compuesto 97 catalizada por HCl, para obtener el compuesto 98	88
Figura 55. Principales diferencias espectrales observadas de ^1H y ^{13}C RMN entre los compuestos 97 y 98, en el cambio conformacional al pasar de una fusión <i>cis</i> de anillos A/B a fusión <i>trans</i>	89
Figura 56. Análisis estructural 3D del compuesto 99 que muestra la preferencia de ataque de la base sobre el H-2 β , para formar en forma regioespecífica el compuesto 100 (enlace doble en C2-C3)	90
Figura 57. Principales correlaciones heteronucleares a $^2\text{J}_{\text{HC}}$ y $^3\text{J}_{\text{HC}}$ 2D-HMBC que confirman las asignaciones y posiciones de =CH-2 y =CH-3 en el compuesto 100	91
Figura 58. Adición preferencial del OsO ₄ por la cara inferior del plano del enlace doble C2-C3, en el compuesto 100, que permitirá la formación diastereoespecífica del diol 2 α -3 α en el compuesto 101	91
Figura 59. Estructura modelada en 3D del compuesto 101. Efectos NOE confirmando las orientaciones 2 α y 3 α el grupo glicol en el anillo A	92
Figura 60. Estructura de los análogos I-IV propuestos inicialmente como objetivos de este trabajo de tesis	93
Figura 61. Estructura de rayos-X de mono cristal para el derivado 110	97
Figura 62. Ruta de síntesis para la obtención de los análogos 86 y 87	99

Figura 63.	Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC y principales correlaciones a $^2\text{J}_{\text{HC}}$ (rojo) y $^3\text{J}_{\text{HC}}$ (azul) observadas para los hidrógenos H-5 α y H-7 del compuesto 112	100
Figura 64.	Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC y principales correlaciones a $^2\text{J}_{\text{HC}}$ (rojo) y $^3\text{J}_{\text{HC}}$ (azul) observadas para los hidrógenos H-5 α y H-7 del compuesto 113	102
Figura 65.	Mayores diferencias entre los desplazamientos químicos de los hidrógenos H-5 y H-7. Espectros de ^1H RMN parcial ($\delta = 1,85\text{-}5,00$ ppm) de 6-oxa/7-oxalactonas para los compuestos 86 y 87	103
Figura 66.	Esquema de síntesis propuesto para la obtención de los análogos 85, 88 y 89	104
Figura 67.	Ruta de síntesis para la obtención de los análogos 106 y 107	105
Figura 68.	Análogos sintéticos 84, 111 y 112, los cuales presentaron mayor actividad promotora del crecimiento vegetal en test RLIT	122
Figura 69.	Análogos sintéticos de BRs evaluados en el primer grupo (moléculas intermediarias de síntesis)	123
Figura 70.	Análogos sintéticos de BRs evaluados en el segundo grupo (moléculas objetivo final de síntesis)	123
Figura 71.	Citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como intermediarios de síntesis contra línea celular CoN (célula epitelial de colon normal)	124
Figura 72.	Citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea celular CoN (célula epitelial de colon normal)	125
Figura 73.	Análogos de BRs que presentaron la menor variación de porcentaje de variabilidad posterior a la exposición de las células a los compuestos	125
Figura 74.	Citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como intermediarios de síntesis contra línea cel. PC-3 (células epitelio tumoral de próstata)	127
Figura 75.	Citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea cel. PC-3 (células epiteliales tumorales de próstata) ...	127
Figura 76.	Citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como intermediarios de síntesis contra línea celular HT-29 (células epiteliales tumorales de colon)	128
Figura 77.	Citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea celular HT-29 (células epiteliales tumorales de colon)	129
Figura 78.	Análogos de BRs que presentaron mayor actividad citotóxica frente a la línea celular HT-29	129
Figura 79.	Citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea celular MCF7 (células epiteliales tumorales de pecho)	130
Figura 80.	Análogos de BRs que presentaron mayor selectividad frente a línea tumoral HT-29	132
Figura 81.	Estructura de los compuestos brasinólido (BL), 24-epi-brasinólido (24epiBL), 28-homo-castaterona (28homoCS) (6) y 24-epi-castaterona (24epiCS)	133

Figura 82.	Totalidad de los compuestos sintetizados en esta tesis	136
-------------------	---	------------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Reactivos e insumos utilizados en esta investigación (Número CAS)	43
Tabla 2.	Solventes utilizados como eluyentes en esta investigación	45
Tabla 3.	Líneas celulares humanas (tumores y no tumorales) utilizadas en esta investigación (Códigos de acceso ATCC)	79
Tabla 4.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> para los análogos: 53, 84, 86, 87, 90, 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 112 y 113 ..	106
Tabla 5.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> (% $\pm$ DS), para la serie 95, 96 y 97 (modificación exclusiva en el anillo A) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm	110
Tabla 6.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> (% $\pm$ DS), para los compuestos 97 y 98 (modificación en la fusión de anillos A/B) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm	110
Tabla 7.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> (% $\pm$ DS), para la serie 86, 87, 112 y 113 (funciones 6-oxalactona/7-oxalactona en anillo B versus tipo de función oxigenada en C3, C22 y C23) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm	112
Tabla 8.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> (% $\pm$ DS), para la serie 84, 98 y 102 (modificación exclusiva de la cadena lateral) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm	113
Tabla 9.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> (% $\pm$ DS), para la serie 90, 95, 96 y 97 (cadena lateral metilester) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm	114
Tabla 10.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> (% $\pm$ DS), para la serie 53, 98, 101, 102 y 103 (cadena lateral de ácidos cólicos) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm	115
Tabla 11.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i> (% $\pm$ DS), para la serie BL, 84, 86 y 87 (cadena lateral dihidroxilada) para las concentraciones 50, 100 y 150 ppm	115
Tabla 12.	Efecto de la aplicación de análogos de BRs sobre la inclinación de la lámina de arroz para los análogos: 84, 86, 87, 109, 111, 112 y 113 (ángulo promedio de apertura en grados $\pm$ DS)	117

Tabla 13.	Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados $\pm$ DS) para la serie BL, 84, 86 y 87 (cadena lateral dihidroxilada) a concentraciones de 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M	119
Tabla 14.	Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados $\pm$ DS) para la serie BL, 111, 112 y 113 (cadena lateral acetilada + BL) a concentraciones 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M	120
Tabla 15.	Valores de IC_{50} (μ M) estimado e índice de selectividad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra las distintas líneas celulares estudiadas	131

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN SÍNTESIS ORGÁNICA

anh.	Anhidro
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CFE	Cloroformiato de etilo
DMAP	4-N,N-dimetil amino piridina
DMF	N,N-Dimetilformamida
hex	Hexano
m-CPBA	Ácido meta-cloroperbenzoico
MsCl	Cloruro de mesilo
NMMNO	N-metilmorfolina-N-óxido
PCC	Clorocromato de piridinio
pp	Precipitado
py	Piridina
t.amb.	Temperatura ambiente
Tf₂O	Anhídrido tríflico (anhídrido trifluorometansulfónico)
THF	Tetrahidrofurano

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ANÁLISIS INSTRUMENTAL

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

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	singlete
t	triplete
δ	desplazamiento químico

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EVALUACIONES BIOLÓGICAS

ANOVA	Análisis de varianzas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CoN	Línea celular epitelial de colon humano normal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Medio de cultivo <i>Eagle</i> modificado de Dulbecco
DS	Desviación estándar
HT-29	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano
MCF7	Línea celular de adenocarcinoma de seno humano
PC-3	Línea celular de adenocarcinoma de próstata humano
PDA	Medio de cultivo papa-dextrosa-agar
RLIT	Test de inclinación de la lámina de arroz (<i>Rice Lamina Inclination Test</i>)

RESUMEN

Los brasinoesteroides son un grupo de fitohormonas que participan en diversos procesos fisiológicos en las plantas, cumpliendo un rol clave en la regulación del crecimiento vegetal. En esta tesis se planteó el objetivo de sintetizar nuevos análogos de brasinoesteroides con cadena lateral corta de tipo 24-nor, manteniendo la función diol en C22-C23 y usando ácido hiedesoxicólico como material de partida. Así, en este trabajo, se describe la síntesis de compuestos tipo 2-desoxibrasinoesteroides, 3 α -hidroxi, 6-oxa o 7-oxalactona, con cadena lateral tipo 24-nor, 22S,23-dihidroxi/diacetil.

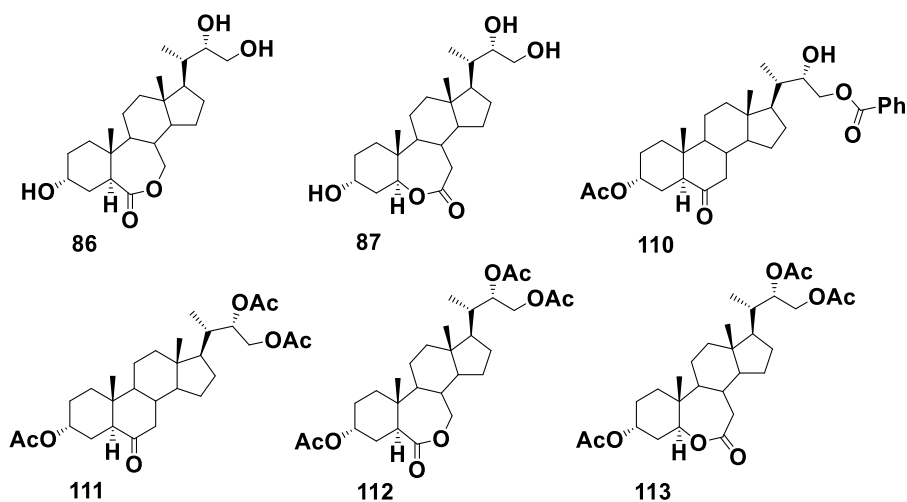


Figura 1. Estructura de los nuevos análogos de brasinoesteroides sintetizados en esta investigación.

Mediante diferentes rutas de síntesis, se logró obtener un total de 26 compuestos de tipo brasinoesteroides, de los cuales 6 corresponden a nuevos análogos de brasinoesteroides (Figura 1). Además, se obtuvo la caracterización completa de los compuestos sintetizados mediante el uso de técnicas espectroscópicas combinadas (IR, 1D y 2D-RMN y EMAR).

Adicionalmente, se realizaron distintos ensayos biológicos a los análogos sintetizados. En primer lugar, se midió la actividad antifúngica de 14 de los análogos sintéticos de

brasinoesteroides mediante el test radial de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* del hongo patógeno *Botrytis cinerea*. Del total evaluado, los análogos **84** y **112** presentaron elevada actividad contra el hongo (≥ 95 % de inhibición a 100 y 150 ppm).

Por otra parte, se cuantificó la actividad promotora de elongación celular vegetal de 7 de los análogos de brasinoesteroides, mediante el test RLIT de inclinación de lámina de arroz. Entre los resultados obtenidos, destacan los compuestos análogos **84**, **111** y **112**, que presentaron elevada actividad promotora, superando incluso al brasinólido, fitohormona utilizada como control positivo de ensayo.

Por último, se evaluó la actividad citotóxica de 18 de los análogos sintéticos obtenidos contra las líneas celulares tumorales PC-3, HT-29, MCF7 y contra la línea celular no tumoral CoN, mediante un ensayo colorimétrico con Sulforodamina B (SRB). Del total de los compuestos evaluados; el análogo **112** presentó frente a PC-3 valores de IC_{50} de 38,6 μ M e índice de selectividad de 2,313, mientras que los análogos **86** y **87** presentaron frente a HT-29 valores de IC_{50} de 21,4 μ M y 33,5 μ M e índice de selectividad de 2,099 y 4,801, respectivamente.

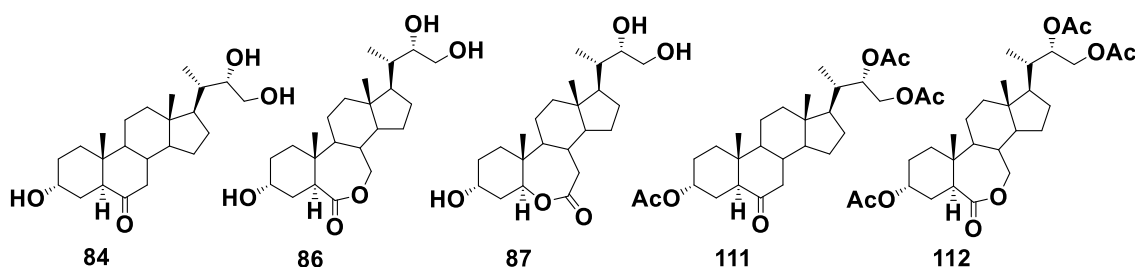


Figura 2. Análogos de brasinoesteroides que presentaron mayores actividades en las pruebas biológicas evaluadas.

Palabras claves: brasinoesteroides, ácido hiodesoxicólico, síntesis de fitohormonas, promotor del crecimiento vegetal, inclinación de la lámina de arroz, antifúngico, citotóxico.

ABSTRACT

Brassinosteroids are a widespread group of phytohormones that play an important role in multiple physiological processes of plants and having a key role in the regulation of plant growth. This thesis had the objective of synthesizing new analogs of brassinosteroids with shorter 24-nor side chains but keeping the C22-C23 diol function, starting with hyodeoxycholic acid. Thus, this work describes the synthesis of 6 new 2-deoxybrassinosteroids analogs with 3 α -hydroxy, 6-oxa or 7-oxalactone, 24-nor, 22S,23-dihydroxy/diacetyl side chain type.

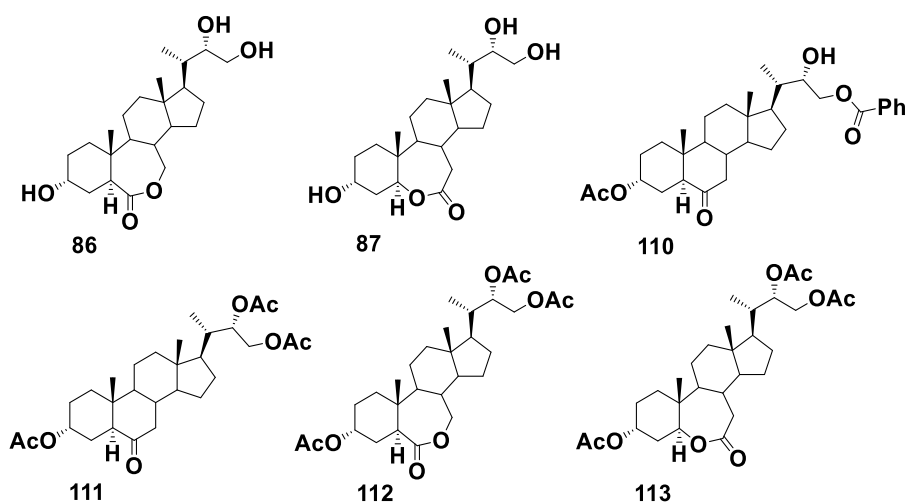


Figure 1. Structure of new analogs of brassinosteroids synthesized in this work.

Through different synthetic routes, a total of 26 brassinosteroid compounds were obtained with 6 of them corresponding to new brassinosteroid analogs (Figure 1). Complete structural characterization of synthesized compounds was achieved through combined using of spectroscopic techniques (IR, 1D and 2D NMR and HRMS).

We also have studied the bioactivities levels of synthesized analogs. First, the antifungal capacity of 14 of the synthetic brassinosteroid analogs was measured by the radial test of *in vitro* mycelial growth inhibition of pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. Thus, the

analogs **84** and **112** showed high activity against the fungus ($\geq 95\%$ inhibition at 100 and 150 ppm).

Moreover, growth-promoting effect 14 of the synthetic brassinosteroid analogs was measured using the rice lamina inclination test (RLIT). According to the results obtained, the analogs **84**, **111** and **112** were more active than brassinolide, which was used as positive control.

Finally, cytotoxic potential of 18 of the synthetic analogs obtained was measured against the tumor cell lines PC-3, HT-29, MCF7 and against the non-tumor cell line CoN using sulforhodamine B (SRB) colorimetric assay. According to the results obtained, the analog compound **112** showed against PC-3 an IC_{50} value of $38.6\ \mu\text{M}$ and a selectivity index of 2.313, while analogs **86** and **87** showed against HT-29 an IC_{50} value of $21.4\ \mu\text{M}$ and $33.5\ \mu\text{M}$ and a selectivity index of 2.099 and 4.801, respectively.

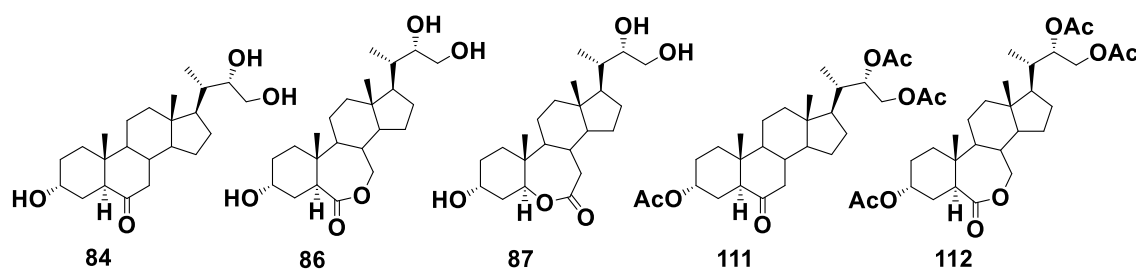


Figure 2. Analogs of brassinosteroids that showed higher activities in the different biological tests evaluated.

Keywords: brassinosteroids, hyodeoxycholic acid, synthesis of phytohormones, plant growth-promoting, rice lamina inclination test, antifungal, cytotoxic.

CAPÍTULO 1 - Introducción

Antecedentes generales

Estructura y función de los brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (BRs) son una familia de fitohormonas de naturaleza polihidroxiesteroideal, bajo peso molecular y estructura de tipo 5α -colestano. En las plantas, las principales funciones de los BRs se engloban en la promoción de crecimiento y diferenciación celular. Desde el punto de vista fisiológico, los BRs actúan en diversos procesos; incluyendo germinación, crecimiento radicular, elongación del tallo, fotomorfogénesis en plántulas, diferenciación vascular, floración, fertilidad, senescencia, además de resistencia al estrés biótico y abiótico [1]–[3]. A partir del descubrimiento del brasinólido (Figura 3), el primer brasinoesteroide identificado, extraído desde el polen de *Brassica napus* [4], se ha identificado más de 70 análogos de BRs en plantas superiores, algas y hongos [5]. Los BRs han sido detectados en todos los órganos de las plantas (polen, anteras, semillas, hojas, tallos, raíces, flores y semillas), produciéndose y almacenándose endógenamente en muy bajas concentraciones; siendo las semillas de polen inmaduras la fuente más rica, en un rango de 1-100 ng/g de peso fresco, mientras que en brotes y hojas suele tener un rango de concentración de 0,01-0,1 de ng/g de peso fresco [6]. La baja disponibilidad de BRs en fuentes naturales ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias de síntesis o la creación de nuevos análogos bioactivos a partir de los BRs disponibles [7].

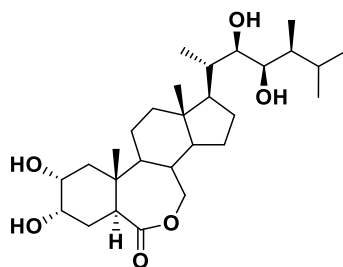


Figura 3. Estructura del brasinólido, primer brasinoesteroide identificado por Grove et al, 1979.

En su estructura, los BRs tienen un esqueleto común de 5α -colestano y pueden ser clasificados en 27, 28 o 29 átomos de carbono, dependiendo de la sustitución del grupo alquilo en el C24. Sus variaciones estructurales se observan, principalmente, en la cadena lateral, además del tipo y orientación de las funciones oxigenadas presentes en los anillos A y B, y la orientación espacial de la fusión de estos anillos (A/B *cis* o A/B *trans*). Los BRs naturales comparten una estructura básica compuesta por una función oxigenada en las posiciones en C2 y C3 del anillo A (preferente 2,3-dihidroxilo), posición C6 oxigenada en anillo B preferente en forma de cetona o lactona (6-desoxo, 6-oxa o 7-oxalactona), posición C22 y C23 oxigenada (preferente como 22,23- dihidroxilo), fusión tipo *trans* entre los anillos A y B, además de llevar sustituyentes alquilo o hidroxilados en posición C24 (Figura 4). En la naturaleza, se han identificado BRs con variaciones fuera del esqueleto 5α -colestano, como BRs conjugados con azúcares o ácidos grasos [6].

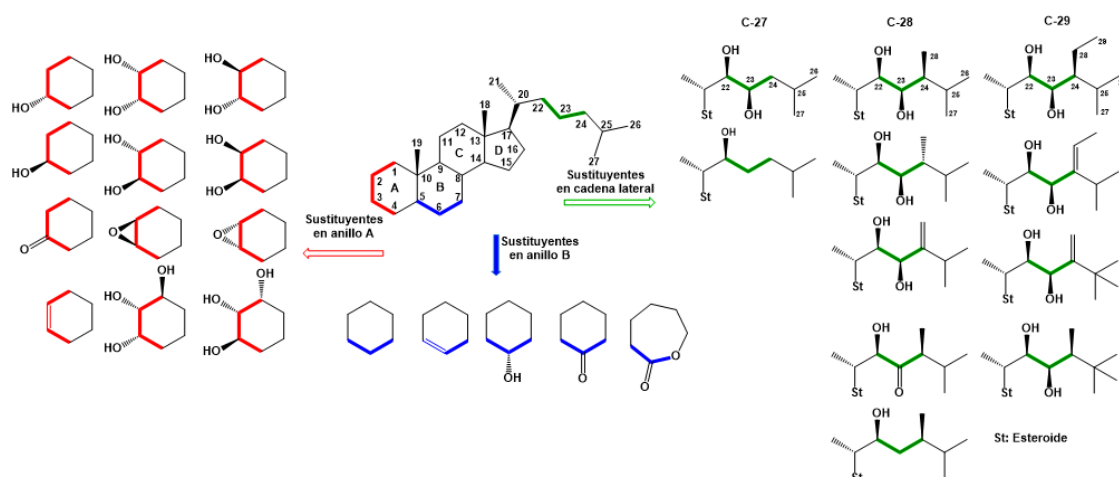


Figura 4. Estructura de los brasinoesteroides naturales y variaciones del esqueleto de 5α -colestano [6].

Desde el inicio de las investigaciones con BRs, el estudio mediante screenning genético ha sido la herramienta más usada para la identificación y caracterización de la vía de transducción de señal y vías de expresión; componentes como BRI1 (*brassinosteroid insensitive 1*) [8] y BIN2 (*brassinosteroid insensitive 2*) [9]. Recientemente, se han identificado nuevos componentes de la vía de transducción (Figura 5), los que incluyen proteínas de interacción con BRI1, tales como: *BRI1-associated receptor kinase 1* (BRK1), *BRI1 kinase inhibitor 1* (BK11), *BRI1-EMS supresor 1* (BES1) y *brassinazole resistant 1*

(BZR1) [10]. El uso de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo ha permitido el descubrimiento y estudio de un amplio rango de anomalías fenotípicas mostradas por plantas que no producen o no pueden realizar transducción de señales de BRs [11]. Plantas mutantes en BRs muestran fenotipos evidentes, tales como enanismo, reducida fertilidad en plantas machos, florecimiento retrasado, desarrollo vascular alterado y morfogénesis anómala [12], [13].

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 [14]. 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 [15].

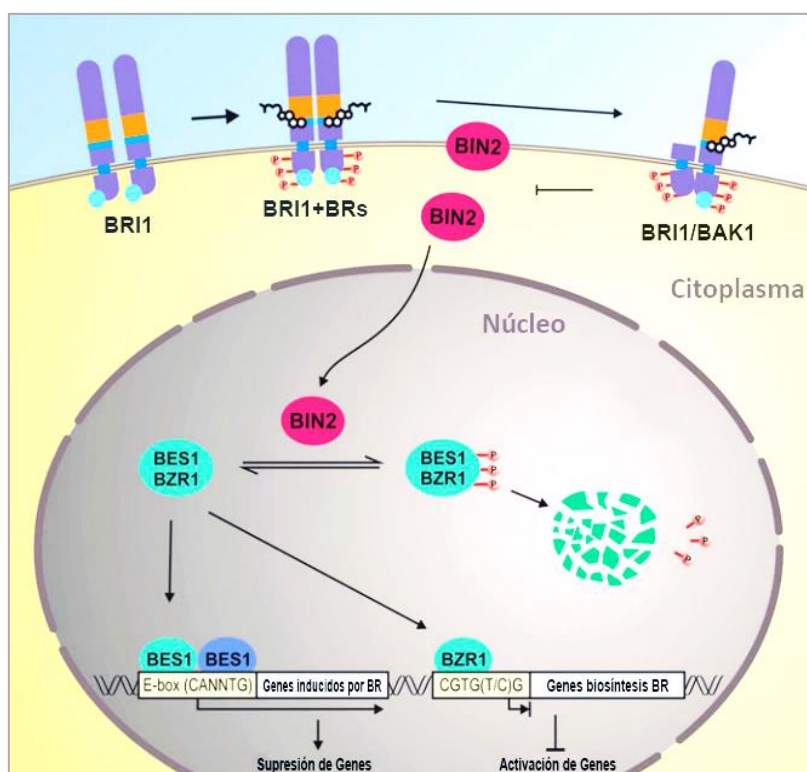


Figura 5. Vía de señalización de BRs en la célula vegetal. La molécula de BRs se une al dominio extracelular del receptor BRI1, lo que conduce a la fosforilación del dominio serina-treonina quinasa intracelular de BRI1, permitiendo la disociación del inhibidor BKI1 para formar un complejo con un segundo 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 [19].

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 [16]. La transducción de señales en la célula es mediada por fosforilación y factores de transcripción [17]-[18] (Figura 5), activando la expresión de diferentes genes, incluyendo a los que están involucrados en la modificación de la pared celular y el crecimiento.

Se debe estudiar y recopilar mayores antecedentes de los mecanismos de acción de los componentes de la transducción de señales y las secuencias específicas en los promotores de los genes regulados directamente por los BRs que podrían estar involucrados en las vías de señalización que se activan con los genes involucrados en los mecanismos de resistencia de la planta [20].

Se ha demostrado que el 24-epibrasinólido (**2**) (Figura 6) es un importante regulador positivo del ciclo celular. Hasta el momento no ha sido identificado ningún gen que codifique un receptor intracelular de BRs, similar a los receptores esteroidales en animales [21].

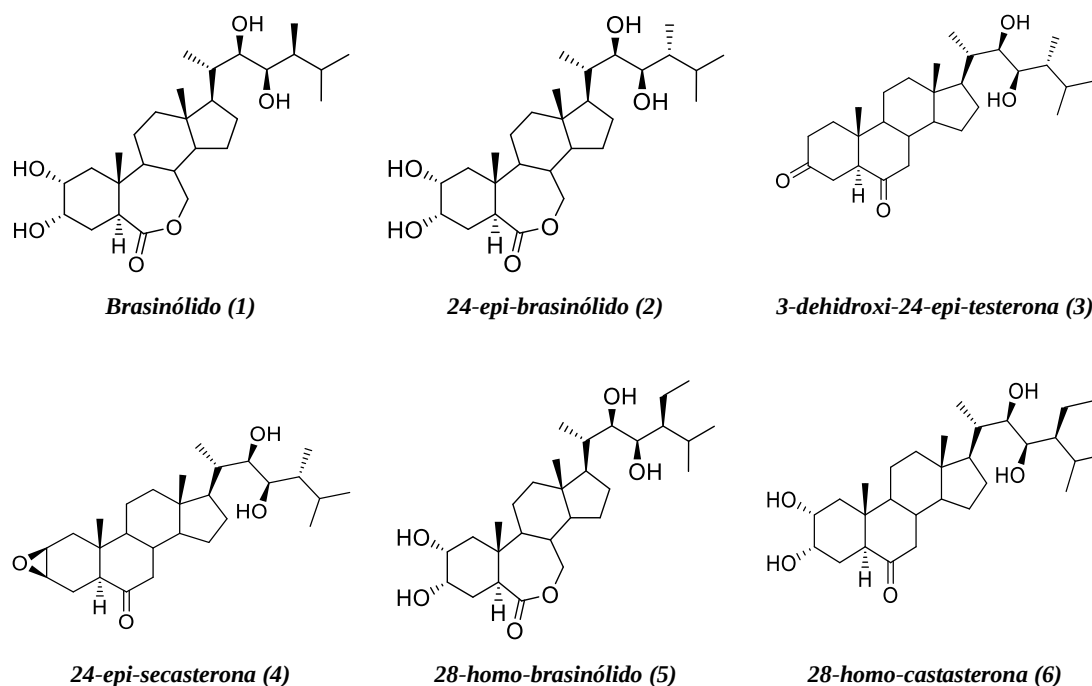


Figura 6. Estructuras de análogos de brasinoesteroides I.

Potencial actividad antifitopatógica de los brasinoesteroides

Una de las actividades de los BRs en los tejidos metabólicamente activos es promover y regular el crecimiento, mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El rol de BR no sólo está implicado en respuesta de las plantas al estrés abiótico sino también en estrés biótico [22], [23]. La aplicación de extractos de tejido que contienen BRs y análogos de BRs ha demostrado mejorar la capacidad de ciertos tejidos vegetales de protegerse frente a ciertos tipos de fitopatógenos, pero se desconoce completamente como interacciona con otras fitohormonas involucradas en mecanismos de defensa, tales como ácido jasmónico o ácido salicílico [24]. Una mayor resistencia en tabaco, pepino, tomate a los patógenos virales (TMV) y hongos (*Sphaerotheca fuliginea*, *Botrytis cinerea*, etc.) fue observada cuando éstas fueron tratadas con extracto de semilla de *Lychnis viscaria*, presentando activación en los mecanismos de defensa de la planta. Dos compuestos de la familia de los BRs fueron identificados en el extracto utilizado: 3-dehidroxi-24-epi-testerona (**3**) y 24-epi-secasterona (**4**) (Figura 6) [25]. A pesar de la aparición de los síntomas visibles de infección, la reducción en la incidencia de enfermedades fue entre 11% y 34% respectivamente [26]. Estudios muestran que 24-epi-brasinólido (**2**) (Figura 6) protege a la papa (*Solanum tuberosum*) contra plagas de *Phytophthora cinnamomi*. Además, cultivos de cebada (*Hordeum vulgare*) tratados con 24-epi-secasterona (**4**) (Figura 6) redujeron considerablemente la incidencia de la enfermedad en hojas producida por *Helminthosporium* [26].

Los resultados también muestran los efectos protectores del brasinólido (**1**) (Figura 6) en arroz (*Oryza sativa*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) [27]. La aplicación de brasinólido en plantas de tabaco induce un amplio rango de resistencias, tanto contra inoculación viral (TMV) y bacteriana (*Pseudomonas syringae*) como contra hongos de la clase *Oidium*; mientras que en el arroz induce la resistencia contra *Maganoprothe grisea* y *Xathomonas oryzae* [28]. Estudios han mostrado que el tratamiento de pepinos (*Cucumis sativus*) con brasinólido aumenta la resistencia contra hongos que generan Peronosporosis, además, el aumento de la actividad de las enzimas peroxidasa y

polifenol oxidasa en hojas se correlacionó con la mayor resistencia de las plantas a los patógenos [24]. Otros estudios han mostrado efectos protectores y desprotectores frente a patógenos. Ambos tipos de funciones se han atribuido a BR, dependiendo de la hora y el método de aplicación al momento de interacción del huésped con el patógeno [27], [29]. En caso de tizón tardío de la papa, ha sido reportado que los BRs son capaces de suprimir el estado inmune de los tejidos vegetales y la reparación de heridas.

El hongo *Botrytis cinerea* es causante de la enfermedad del moho gris en una amplia variedad de huéspedes, y es un grave problema económico en cultivos como uva de mesa, vides, fresas, frambuesas, lechugas, pepinos, habas, tomates, frijoles, flores y plantas forestales [30]. Por otro lado, los cambios en las poblaciones fúngicas en respuesta a la selección resistente debido a la exposición a xenobióticos, especialmente fungicidas sintéticos, es bastante común en las poblaciones de *Botrytis cinerea*. El control químico, ampliamente utilizado para combatir las plagas que afectan a las producciones agrícola y forestal, produce una creciente contaminación del medio ambiente con graves consecuencias para la salud de la población en general y en particular para los trabajadores agrícolas.

En Chile, la infección por *Botrytis cinerea* es el principal problema fitosanitario para la producción frutícola y vitivinícola, y se produce en virtud de una amplia variedad de condiciones, incluso a bajas temperaturas, lo que conduce a pérdidas significativas tanto antes como después de la cosecha, asociado a su capacidad de permanecer inactivo en el tejido del huésped por períodos variables [31]. Las plantas poseen una amplia gama de mecanismos de defensa. Muchas de estas defensas incluyen metabolitos secundarios tales como estilbeno, resveratrol, saponinas, antocianidinas, barreras estructurales y modificaciones de la pared celular, por otra parte, *Botrytis cinerea* ha generado mecanismos para contrarrestar estas defensas. La interacción planta-patógeno y la epidemiología fueron presentadas a fondo por Jarvis (1980) [32].

Se ha demostrado que *Botrytis cinerea* explota la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tejidos de las plantas que son colonizados. ROS interactúan con los sistemas antioxidantes de la planta infectada y los procesos bioquímicos parecen ser

claves para el desarrollo de la lesión [33]. Kuzniak y Sklodowska (2004) informaron que bajo condiciones de estrés bióticos la actividad inicial del sistema antioxidante aumenta, seguido de una disminución de actividad (relación entre la producción de ROS y la actividad de la maquinaria antioxidante) frente a la oxidación [34]. La literatura sugiere que la actividad del sistema antioxidante (por lo tanto, los niveles de producción de ROS) está regulada por factores comunes a los que regulan el crecimiento en condiciones de desarrollo y estrés, así, las fitohormonas son reguladores del crecimiento en estado normal, y los BRs serían capaces de regular el crecimiento de las plantas bajo diferentes condiciones de estrés. La menor concentración de BRs mejora el funcionamiento de otras hormonas con actividad promotora facilitando el crecimiento, mientras que a concentraciones altas de BRs actúa como reclutadora de moléculas relacionadas a defensa altamente activas como NO, ROS, etc., con un costo en el crecimiento [35]. El aumento de ROS y el aumento del estado oxidativo de las células/tejidos de la planta alteran el mecanismo de infección del invasor y evitan el establecimiento de patógenos. Tras el término de la infección, en el estado post-estrés, se reclutan las moléculas relacionadas a defensa altamente activas, para luego volver a sus niveles normales, niveles previos a la infección. Las proteínas de defensa y sus metabolitos se metabolizan y se reactiva el crecimiento. Por este motivo, las alteraciones metabólicas y la afección de la maquinaria de crecimiento conducen a la generación de fenotipos pequeños. La menor actividad de los sistemas antioxidantes, sin embargo, protege a las plantas de la posible amenaza de la infección, a partir de la inducción de síntesis de antioxidantes. Está claro que los BRs afectan múltiples vías de señalización relacionados a los mecanismos de protección contra el daño oxidativo [36].

Potencial actividad antineoplásica de los brasinoesteroides

El rol de las hormonas en ciertos tipos de cáncer es indiscutible, y las consecuencias prácticas del concepto de inhibir la acción mitogénica, por ejemplo, del estrógeno en las células de cáncer de mama, han sido el establecimiento con éxito de las terapias endocrinas para el tratamiento de este cáncer, así se proporcionan nuevas opciones para la prevención del desarrollo de la enfermedad [37]. Mientras que el concepto en sí es relativamente simple, nuestra comprensión de los mecanismos moleculares exactos por los que el estrógeno está implicado en estos procesos sigue evolucionando, siendo más complejo y multifacético de lo inicialmente pensado [38].

Los receptores de estrógenos (ER), se presentan como factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas. El descubrimiento de un segundo receptor de estrógeno llamado ER- β [39], ha llevado a una reevaluación completa de la acción de estrógenos en todos los tejidos diana, incluyendo el cáncer de mama humano [40]. Los receptores de estrógeno (ER- α y ER- β) muestran un alto grado de similitud, con una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 97% en el dominio de unión a ADN y aproximadamente el 56% en el dominio de unión al ligando (LBD), mientras que el extremo N terminal es homólogo en un 24% [41]. ER- α y ER- β pueden ser detectados en un amplio espectro de tejidos. En algunos órganos, ambos subtipos de receptores se expresan en niveles similares, pero uno o el otro subtipo generalmente dominan. ER- α se expresa principalmente, por ejemplo, en útero, próstata (estroma), ovario (células de la teca), testículos (células de Leydig), epidídimo, hueso, mama, varias regiones del cerebro, hígado y tejido adiposo blanco. ER- β se expresa en colon, próstata (epitelio), testículo, ovario (células de la granulosa), médula ósea, glándula salival, endotelio vascular, y ciertas regiones del cerebro [42]. El rol exacto de ER- β en cáncer de mama humano sigue siendo poco claro, sin embargo, los datos emergentes sugieren que ER- β puede cumplir una función importante en el desarrollo de cáncer de mama [40], [43], [44]. La mayoría de la información publicada ha concluido que ER- β tiene actividades antiproliferativas y pro-apoptótica. Por lo tanto, se puede sugerir la posibilidad que ER-

β cumple un importante rol en el desarrollo del cáncer y su progresión. Un hallazgo consistente es que, en contraste con ER- α , el total de ER- β disminuye en sus niveles durante la carcinogénesis de mama [45], [46], un fenómeno observado también en otros cánceres como el de próstata [47], colon, ovario y pulmón [48], pero no el cáncer de endometrio [49], sugiriendo un potencial rol como supresor de tumores. En general, se encontraron niveles más altos de expresión de ER- β asociado a buenos pronósticos o mejores resultados clínicos. A pesar del hecho de que varios estrógenos tienen alta selectividad a ER- α , sólo se ha informado de un número limitado de compuestos que muestran buenos niveles de selectividad para ER- β . Por lo tanto, los receptores de estrógeno, y particularmente ER- β , son buenos candidatos para posibles estudios del control de la progresión de carcinoma [39]–[41]. Los estrógenos son una familia de hormonas esteroidales derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno y altamente análogos de los BRs. El uso de BRs como “moduladores selectivos de los receptores de estrógeno”, el cual implica utilizar análogos de BRs como agonistas de estrógenos selectivos para ER- β , se presenta como una terapia potencial contra el cáncer.

Los BRs son esenciales para muchos procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. Sin embargo, la información acerca de los efectos de BRs y sus análogos sintéticos en las células animales es aún más desconocida. Se han reportado efectos contradictorios de BRs en la división celular en diferentes líneas de células humanas cultivadas [19]. El efecto de BRs en la división celular se ha demostrado que es principalmente promotor. Sustituyen a los efectos de las citoquininas: ambos inducen la expresión de genes y promueven la división celular durante las fases tempranas de cultivo de células, lo que sugiere que BRs son factores limitantes de la velocidad en la inducción del ciclo celular [21]. También se han descrito los posibles efectos del 24-epi-brasinólido (**2**) (Figura 6) en células de ratón en cultivo de hibridoma. Los efectos típicos de 24-epibrasinólido fueron: aumento en el valor del potencial de membrana mitocondrial; aumento en la fracción de las células en la fase G0/G1 y disminución en la proporción de células en fase S [50].

Recientemente, se ha informado un efecto inhibitor de los BRs naturales, 24-epi-brasinólido (**2**) y 28-homo-castasterona (**6**) (Figura 6), en el crecimiento y la viabilidad de diferentes líneas celulares normales y cancerígenas. Los compuestos 24-epi-brasinólido y 28-homo-castasterona demostraron tener efectos sobre la viabilidad de líneas celulares de cáncer de diversos orígenes histopatológicos. Las líneas celulares probadas incluyeron líneas celulares: leucemia linfoblástica, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma cervical, melanoma maligno y osteosarcoma. Líneas celulares de cáncer de próstata y mama, sensibles e insensibles a estrógeno y andrógeno, mostraron una respuesta diferente al tratamiento con BRs naturales [52]. La mayoría de los cánceres de mama consisten en una mezcla de células sensibles e insensibles a los estrógenos, y la clave para el control del cáncer de mama parece estar en la eliminación de ambos tipos de células. Líneas celulares sensibles a las hormonas fueron más susceptibles al tratamiento con BRs. Este hallazgo podría apuntar a la posibilidad de modulación de la respuesta del receptor de esteroides por BRs naturales. Los BRs parecen impartir su efecto como inhibidor del crecimiento y los efectos del ciclo celular a través de la maquinaria del ciclo celular animal y pueden ser desarrollados como un agente para el tratamiento del cáncer de mama. Por lo tanto, estas fitohormonas y sus derivados podrán ser buenos candidatos para posibles fármacos contra el cáncer [51].

Análisis de la relación estructura-actividad de los brasinoesteroides

La actividad biológica de BRs se evalúa por diferentes tipos de bioensayos cuyos resultados no siempre son coherentes entre sí. La prueba de inclinación de la lámina arroz o RLIT (*Oryza sativa*) es el bioensayo más comúnmente utilizado en investigación química, sin embargo, diferentes grupos han adaptado el protocolo básico de RLIT, además, utilizan diferentes cultivares de arroz, entregando gran variación en los resultados [2]. El ensayo RLIT tiene límites de detección para brasinólido (**1**) y 28-homo-brasinólido (**5**) (Figura 6) de 0,5 y 5 ppb, respectivamente [2], [53], [54]. A pesar de estas limitaciones, se pueden realizar las siguientes generalizaciones.

Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides 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 por Takatsuto *et al.* (1983) [55], el cual encontró que la modificación de los hidroxilos 2α , 3α en el 28-homo-brasinólido (**5**) reduce considerablemente la actividad biológica en RLIT (*Oryza sativa* cultivar arborio). Los autores también reportaron que de la serie del tifasterol (**7**) el compuesto 28-nor-tifasterol (**8**) no varía su actividad biológica, mientras 28-homo-tifasterol (**9**) (Figura 7) es aproximadamente 50% menos activo que 28-homo-castasterona (**6**) (Figura 6) en el mismo tipo de ensayo, lo que indica que el grupo hidroxilo en la posición 2α es importante, pero no indispensable, para promover el crecimiento. Por otro lado, el compuesto 2-desoxi-28-homo-brasinólido (**10**) y su epímero 3β (**11**) (Figura 7) conservaron, aproximadamente, una décima parte de la actividad biológica mostrada por el compuesto 28-homo-brasinólido (**5**) (Figura 6) en el mismo tipo de ensayo, lo que indica la importancia de la función lactona en el incremento de la actividad biológica [55].

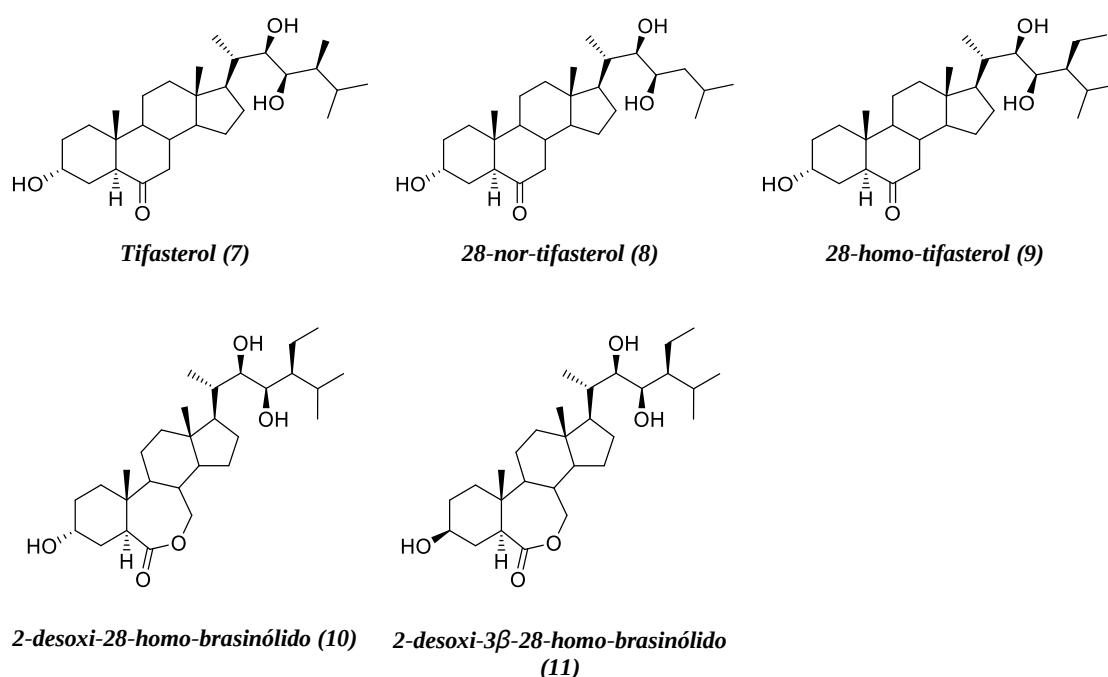


Figura 7. Estructuras de análogos de brasinoesteroides II.

Takatsuto *et al.* (1983) informaron sobre la serie derivada de testosterona (**12**) y 24-epi-testosterona (**13**) (Figura 8). En este análisis, los análogos 3-deshidro-28-homo-testosterona (**14**) y 3-desoxi-28-homo-testosterona (**15**) (Figura 8) presentan una actividad relativa 10 y 100 veces menor respecto a 2,3-didesoxi-28-homo-brasinólido (**16**), mientras que los análogos 3-deshidro-2-desoxi-28-homo-brasinólido (**17**) y 2,3-didesoxi-28-homo-brasinólido (**16**) (Figura 8) poseen el 5% de la actividad relativa del análogo 28-homo-brasinólido (**5**) (Figura 6). En resumen, la Figura 9 muestra el efecto de funciones oxigenadas comunes en el anillo A, ordenados por actividad relativa biológica asociada (de mayor a menor) según Takatsuto *et al.* (1983) [55].

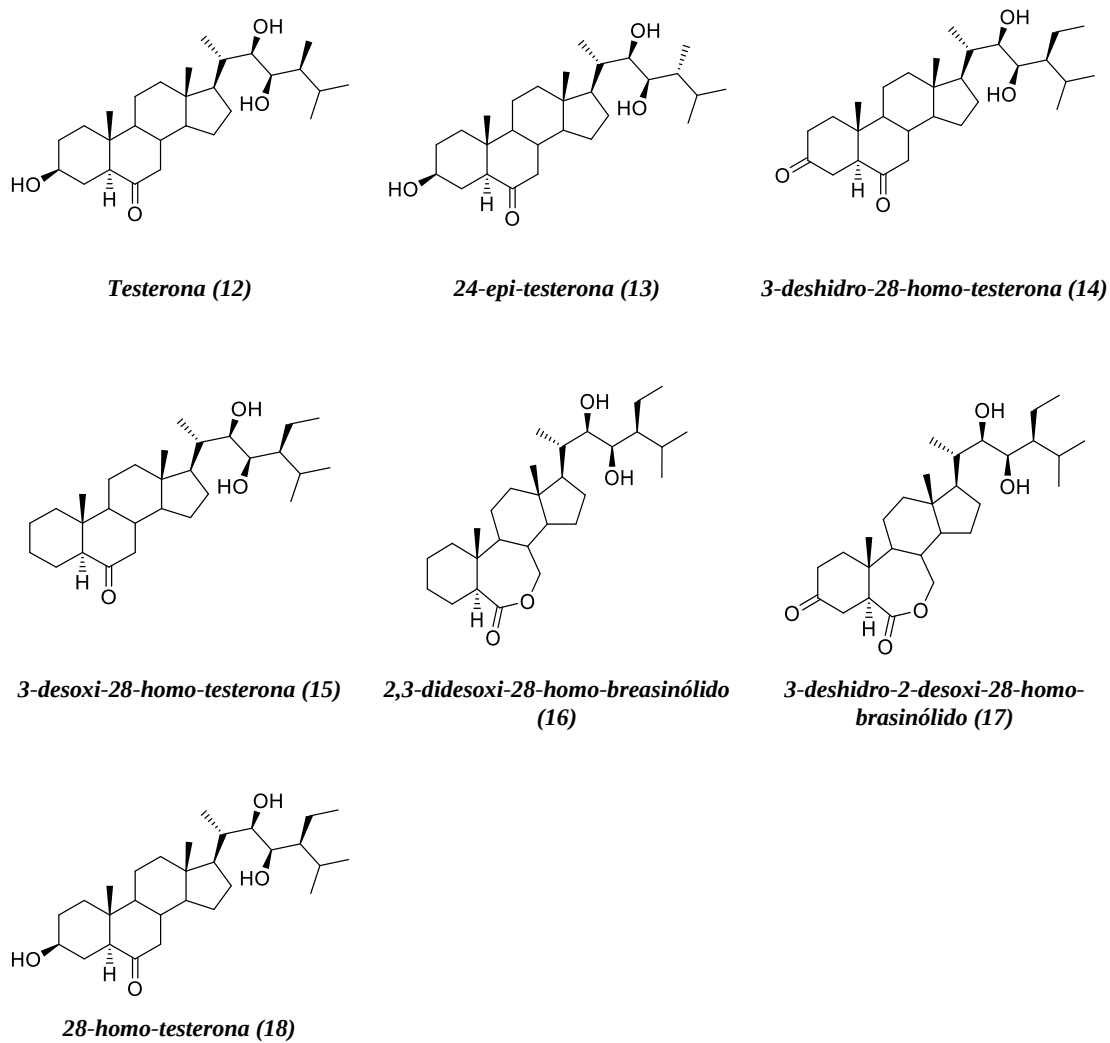


Figura 8. Estructuras de análogos de brasinoesteroides III.

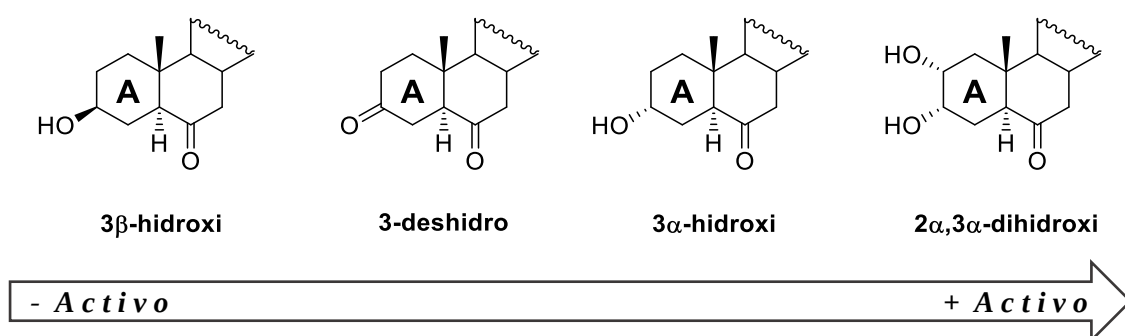


Figura 9. Funciones comunes en el anillo A, ordenados por actividad relativa biológica asociada (de menor a mayor) según Takatsuto et al. (1983) [55].

Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides en el anillo B

La mayoría de los BRs 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 [56]. Mandava (1988) confirmó que los BRs 6-desoxo son prácticamente inactivos [57]. La transformación de la 6-oxo-7-oxalactona a cetona o 7-oxo-6-oxalactona cambia drásticamente su actividad biológica relativa (Figura 10) [58]–[60].

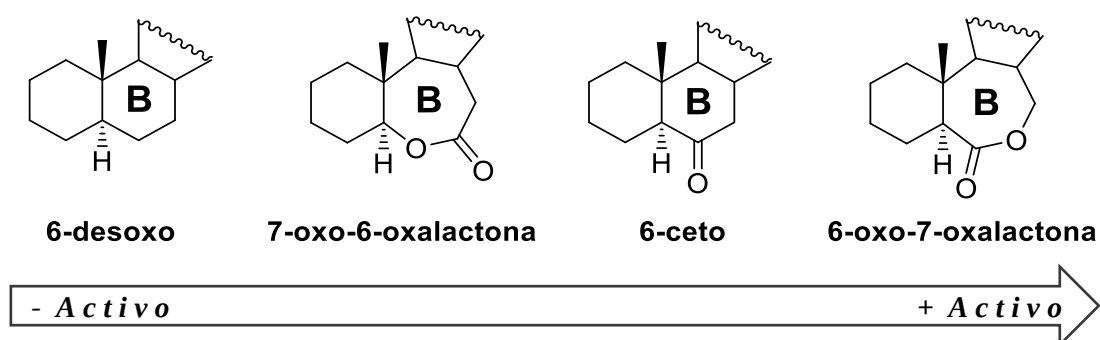


Figura 10. Funciones comunes en el anillo B, ordenados por actividad relativa biológica asociada (de menor a mayor) según Takatsuto et al. (1983) [55].

Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides en la fusión de anillos A/B

La estructura del núcleo esteroidal de los BRs ha sido confirmada por cálculos cuánticos de orbitales moleculares, experimentos de RMN y estudios de difracción de rayos X, los cuales también han revelado que en la serie 5α (fusión de anillos A/B *trans*), los anillos A y B asumen una conformación “silla” (Figura 11). Este tipo de conformación ha sido también confirmada por el anillo B de 6-cetobrasinosteroide, mientras que en los 6-oxo-7-oxalactona el anillo B de 7 miembros tiende a inclinarse respecto al plano de los anillos adyacentes (Figura 12) [4], [61]. En BRs de la serie 5β (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 11). La transformación de brasinólido (de conformación nativa 5α) a 5β -brasinólido [62] mostró una pérdida casi completa de la actividad relativa medida a través de RLIT, lo que indica que la fusión *trans* de anillos A/B es esencial para esta actividad biológica [63].

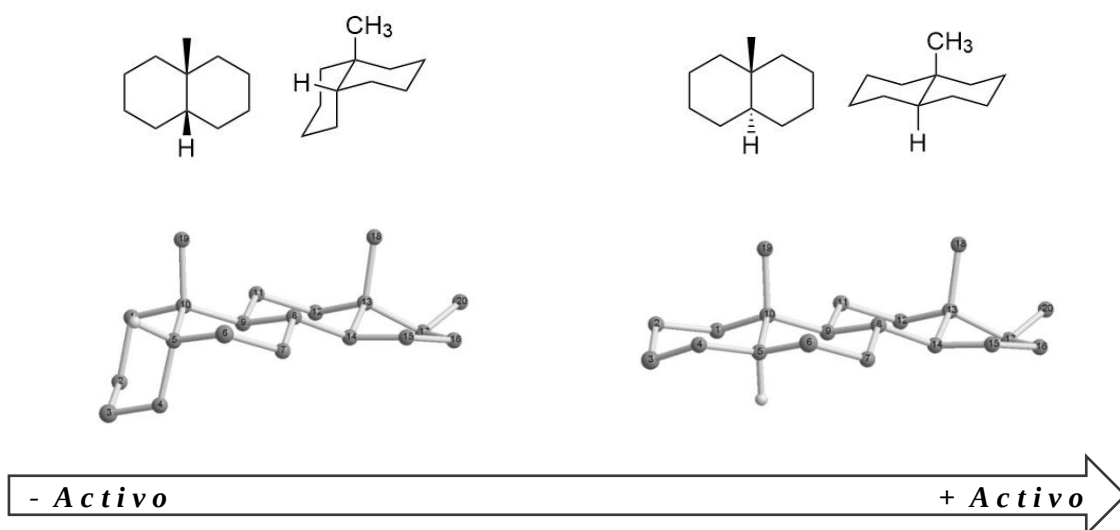
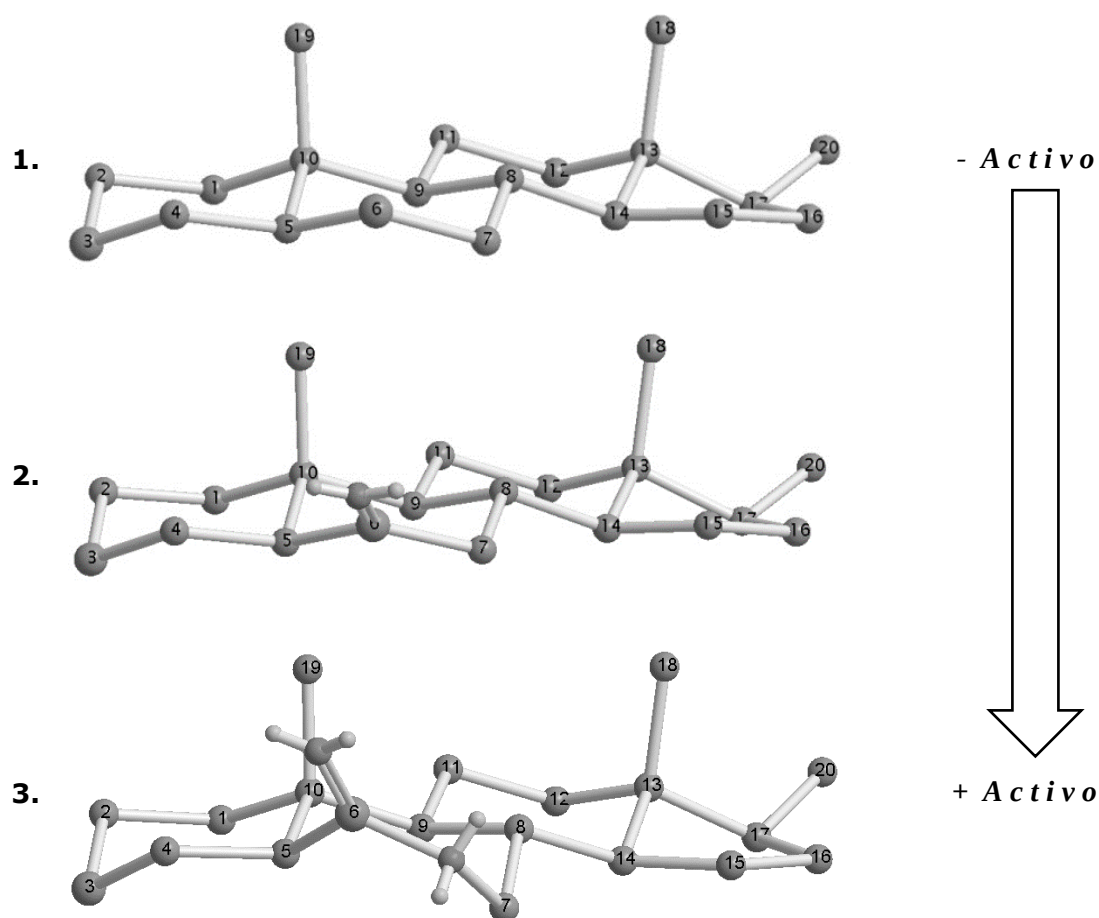


Figura 11. Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5α -colestano y 5β -colestano con fusión de los anillos A/B tipo *cis* (izquierda) menos activo biológicamente y con fusión de los anillos A/B tipo *trans* (derecha) con mayor actividad relativa biológica asociada. Optimización espacial realizada con herramienta MM2 Dynamics, CambridgeSoft®, MA 02451 USA.



Relación estructura-actividad de los brasinoesteroides en la cadena lateral

Mori (1980) fue el primero en reportar la síntesis y la alta actividad biológica de 22,23 diepi-28-homobrasinólido en RLIT (*Oryza sativa* cv. Kinmaze) [64]. Los análogos 28-homo-brasinólido (**5**) y 28-homo-castasterona (**6**) (Figura 6) presentan 100 y 87% de la actividad relativa comparada con el brasinólido (**1**), respectivamente, en RLIT [65]. La Figura 13 presenta la cadena lateral de los BRs naturales en orden de actividad según Romero-Ávila *et al.* (2007).

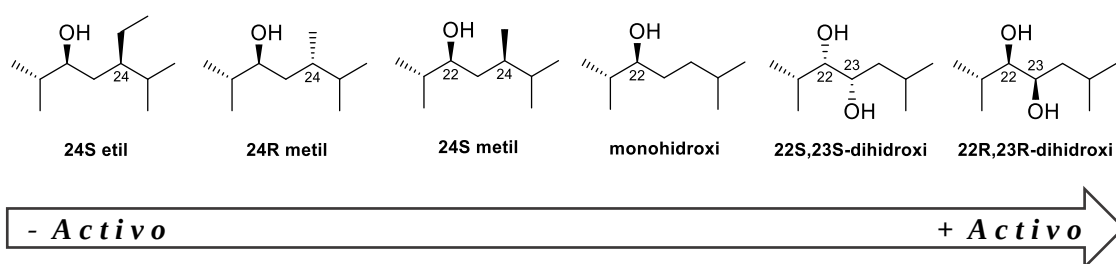


Figura 13. Cadena lateral de 5 α -colestano en orden de actividad relativa biológica asociada de menor a mayor según Romero-Ávila et al. (2007) [66].

Estrategias sintéticas

Modificaciones hemisintéticas de la cadena lateral

Entre las diversas modificaciones, la principal realizada al esqueleto esteroideal de ciclopentanoperhidrofenantreno ha sido la síntesis de análogos espirostánicos, los cuales han sido informados y preparados por diferentes autores. Algunas de estas estructuras se muestran en la (Figura 14). Los compuestos **19** hasta **22** son ingredientes activos incorporados en formulaciones comerciales, que actualmente están siendo utilizados en la producción y protección agrícola [67]–[71].

La aplicación de soluciones de los compuestos **25** y **26** en H₂O/EtOH (concentraciones entre 0,001-0,1 pg /mL) en semillas de naranjo, produjo una fuerte promoción en la germinación [72], [73]. Además, el compuesto **27** produce una estimulación significativa a las dosis de 2,5 y 5 ng/planta en el ensayo de la elongación del segundo entrenudo de habas [66]. Por otro lado, el mismo compuesto mostró actividad biológica al ser evaluado en bioensayo de elongación y expansión de cotiledones de rábanos (*Raphanus sativus* L.). La actividad promotora del crecimiento más alta se observó a la concentración de 10⁻⁵ ppm, a la cual los hipocótilos de rábano tratados con el epóxido **27** aumentaron significativamente su longitud de 20,7% por sobre el control sin tratar [74]. Mientras que las soluciones en H₂O/EtOH [Concentraciones 0,01, 0,1 y 1 ppm] de los compuestos **28** y **29** (Figura 14), mostraron un fuerte aumento en la promoción de

la actividad de la planta. El efecto consistió en un aumento en la longitud de los hipocótilos y en el aumento en peso de los cotiledones tratados [75].

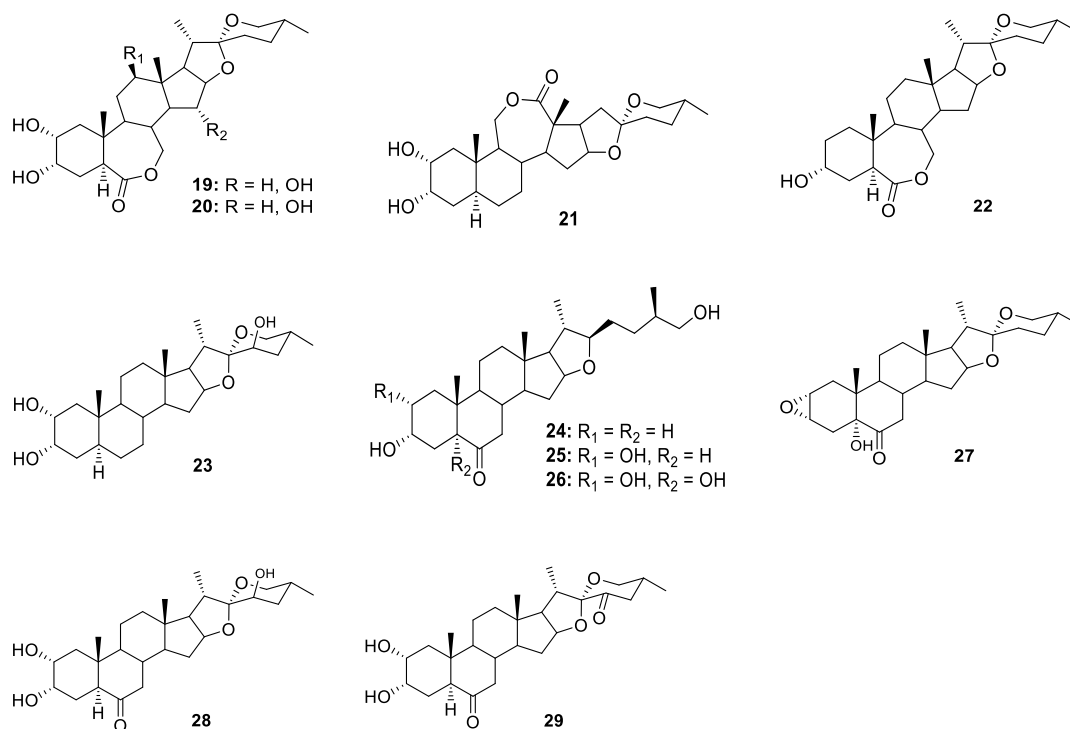


Figura 14. Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales de tipo espirostánicas.

La mayoría de los BRs bioactivos poseen en la cadena lateral la función 22R, 23R diol vecinal, que parece esencial para una alta actividad biológica. Sobre esta base, varios estudios han informado de los requisitos estructurales que deben poseer estos compuestos para poseer una alta actividad biológica. Estas investigaciones concluyen que la actividad de los BRs depende de la orientación espacial y de los átomos de oxígeno. Por lo tanto, los requisitos estructurales no deben indicarse como la presencia o no de un grupo funcional específico en la molécula, pero sí como la distribución espacial de todas las funcionalidades presentes en ella. Esta orientación espacial puede ser indicada como distancias o ángulos entre los átomos de oxígeno presentes en un

BRs. En este sentido, se propone una nueva forma de definir los requisitos estructurales para que un brasinoesteroide sea activo [76], [77].

Sin embargo, en las últimas décadas, los esfuerzos se han centrado en la síntesis de nuevos análogos de BRs, manteniendo patrones comunes de funciones orgánicas en los anillos A/B y fusión “*cis-trans*” entre estos, como en algunos BRs naturales, pero con cambios estructurales dramáticos en la cadena lateral (cadenas laterales más cortas, diferentes funciones oxigenadas, espirostánicas, sustituyentes aromáticos, ésteres, ácidos carboxílicos cíclicos, etc.) Sorprendentemente estos análogos han presentado resultados interesantes en la actividad biológica. A continuación, se describen algunas estructuras y propiedades biológicas de los análogos más representativos de este tipo.

El compuesto **30** (Figura 15), muestra alta actividad promotora del crecimiento en granos, evaluada en los ensayos del primer y segundo entrenudo del frijol [78]. Mientras que el compuesto **31** (23-Arilbrasinoesteroide) y otros análogos de este tipo son considerados como posibles promotores de crecimiento de las plantas y candidatos prometedores para la aplicación en la agricultura [79], [80]. El análogo **32** (Figura 15), muestra una considerable actividad promotora del crecimiento en el incremento de longitud en epicótilo [81].

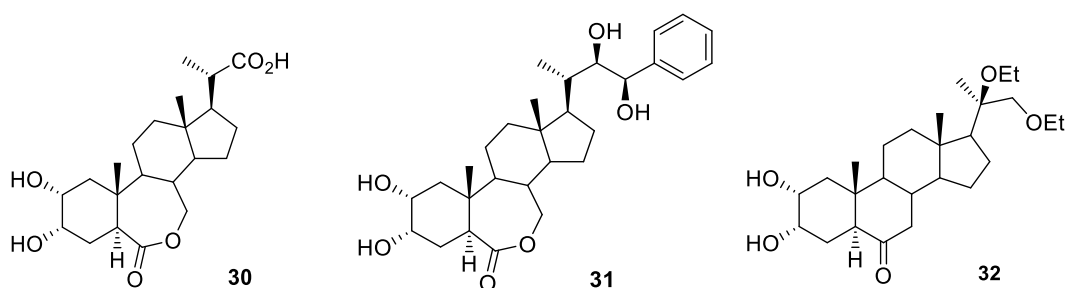


Figura 15. Estructuras de análogos de brasinoesteroides con diferencias significativas en la cadena lateral.

Otros análogos de BRs con importantes cambios estructurales en la cadena lateral se muestran en la (Figura 16). Los análogos **33-38** mostraron una actividad similar y en

algunos casos superiores al brasinólido (compuesto usado como control positivo) en el ensayo de la inclinación de la hoja (lámina) de arroz [82]. Mientras que los análogos **39-42** con cadenas laterales de tipo acilo fueron ensayados en el test de inclinación de la lámina de arroz de la variedad enana, destacándose la mayor actividad mostrada para los compuestos **41** y **42** [83]. Los análogos de BRs de tipo androstano, con grupos 17 β -éster como los compuestos **43** y **44** (Figura 16), mostraron la actividad más alta, con valores de (19,5 mm) y (17,4 mm) respectivamente. En el caso de epóxido **43**, la cantidad aplicada fue de 10^{-9} M y en el caso del compuesto **44**, 10^{-8} M por planta, en el bioensayo del segundo entrenudo del frijol [84].

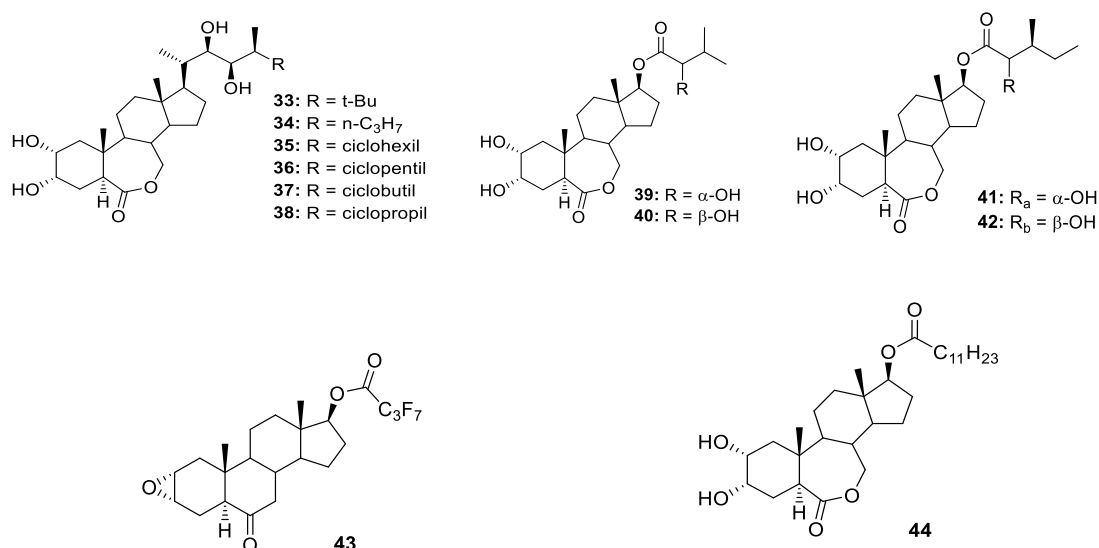


Figura 16. Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales de tipo 24-alquil; 24-cicloalquil y grupos ésteres en posición 17.

Un interesante trabajo relacionado con las actividades biológicas de análogos de BRs con funciones de tipo dioles 2 α ,3 α frente a dioles 3 α ,4 α fue explicada por métodos de modelamiento molecular. En este caso, los análogos de tipo dioles 3 α ,4 α , sorprendentemente, fueron más activos que los dioles 2 α ,3 α . Este trabajo sugiere que la mayor actividad de los 3 α , 4 α podría ser explicada por la torsión y distorsión de las moléculas debido al tamaño del anillo B cuando este es de siete u ocho átomos y también por la posición de un grupo carbonilo con respecto a la función diol en el anillo

A. Metodologías informáticas de 3D-SAR, como los alineamientos y superposiciones de mapas de potencial electrostático en los análisis 3D-QSAR GRID-GOLPE (similar a CoMFA) que se utilizaron como herramientas para explicar la mayor actividad biológica de los dioles $3\alpha,4\alpha$ para los compuestos **45** y **46** (Figura 17) en comparación con los dioles equivalente $2\alpha,3\alpha$ del anillo B expandido de los BRs. Sin embargo, en estos análogos la función oxigenada no está presente en la cadena lateral, pero muestran elevada actividad biológica en el bioensayo del segundo entrenado de frijol (BSIB) [85].

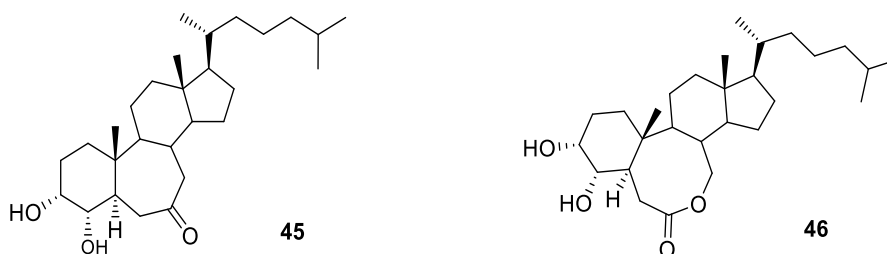


Figura 17. Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales no oxigenadas y diferente tamaño de anillo B.

Por otra parte, las tres cetonas polihidroxiladas **47-49** (Figura 18) presentes en la función 5α -hidroxi-6-oxo se obtuvieron a partir del colesterol. Dos de ellas son promotoras de crecimiento en el bioensayo del segundo entrenado del frijol. Los resultados obtenidos indican que la presencia de la función 5α -hidroxi-6-oxo puede ser capaz de inducir la promoción del crecimiento de la planta, incluso en ausencia de funciones oxigenadas en la cadena lateral [86].

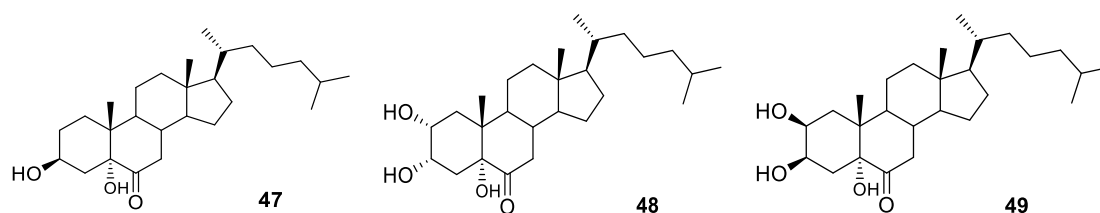


Figura 18. Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales no oxigenadas y función 5 α -hidroxi-6-oxo.

Recientemente se informaron las actividades biológicas de nuevos análogos de BRs monohidroxilados con menor número de átomos de carbono y función de éster metílico en la cadena lateral. Es así como los compuestos **50-52** (Figura 19) mostraron actividad en el bioensayo del segundo internodo de habas [87].

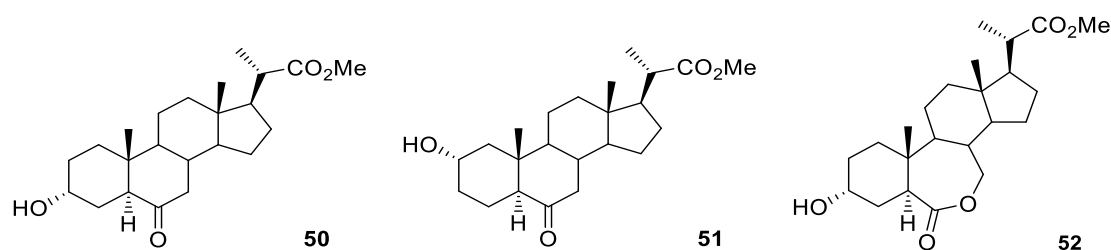


Figura 19. Análogos de brasinoesteroides monohidroxilados, con cadena lateral y función de éster metílico.

Una importante recopilación de antecedentes sobre la síntesis y evaluaciones biológicas de derivados de BRs preparados a partir de ácido hiodesoxicólico (**53**) describe la obtención de análogos con diferente largo en la cadena lateral, manteniendo las funciones carboxílicas y ésteres metílicos, así como las diferentes estrategias utilizadas para la construcción de la cadena lateral de los BRs [88].

De esta forma fue descrita la síntesis de los compuestos **54** y **55** (Figura 20) [89], donde **54** mostró una alta actividad en los ensayos del primer y segundo internodo de habas [78]. Mientras que los compuestos **56** y **57** (Figura 20), mostraron un leve efecto en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz a concentraciones entre 1 - 0,01x10⁻⁶ M [90].

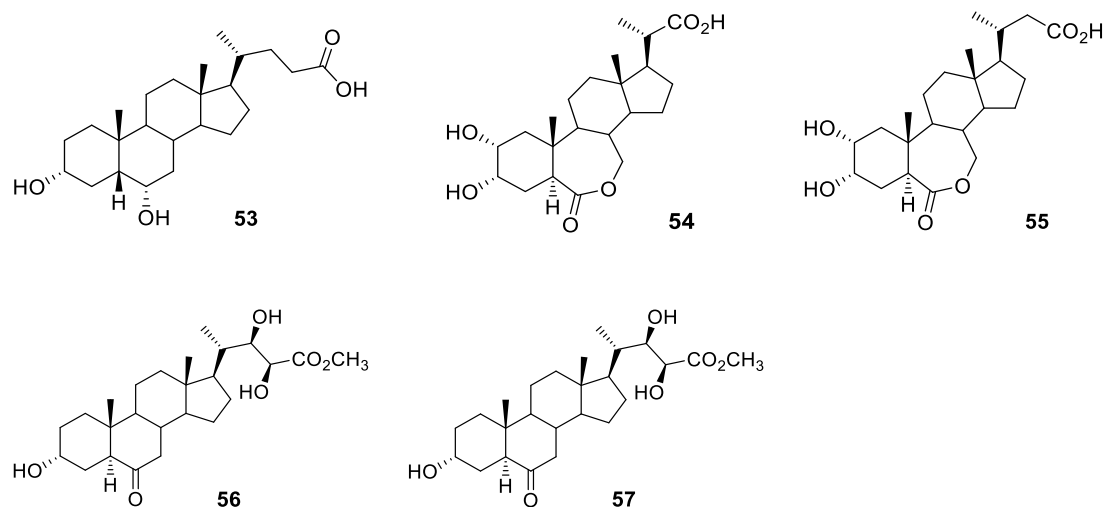


Figura 20. Estructuras de análogos derivados de ácido hihodesoxicólico (**53**) con significativo efecto en el crecimiento vegetal.

Por otra parte, una serie de derivados mono, dihidroxilados y diacetilados, en forma de ácidos y ésteres metílicos en la cadena lateral, fueron sintetizados desde ácido hihodesoxicólico, este trabajo reportó la síntesis del compuesto **54** (Figura 20) y los compuestos **58** al **67** (Figura 21) [91]. De todos estos derivados, sólo se informó la actividad biológica del compuesto **66** [89] y del compuesto **67**, donde este último mostró actividad cercana a 50% en los ensayos del primer y segundo internodo de habas, comparada con el 24-epibrasinólido (**2**) [89], [92].

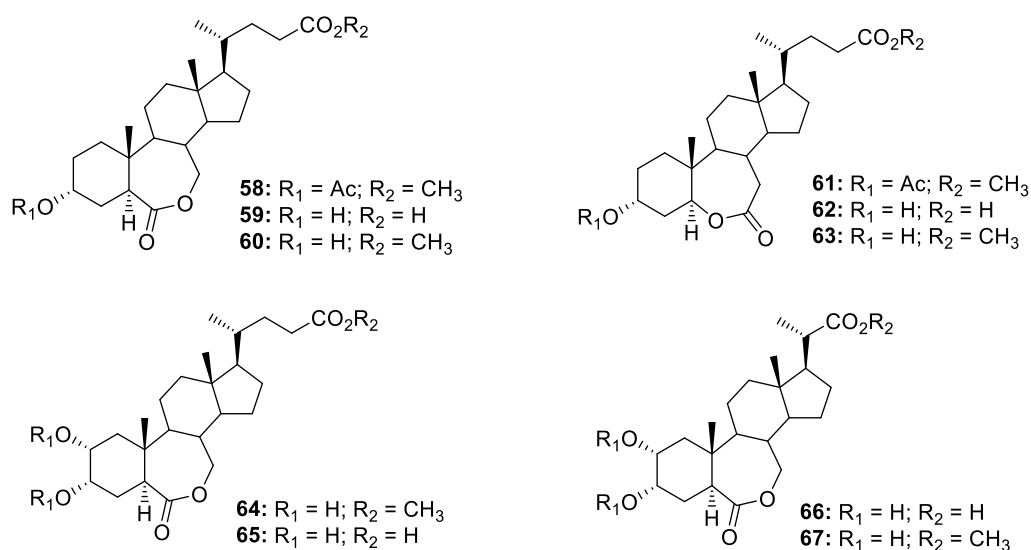


Figura 21. Estructuras de análogos derivados de ácido hiedesoxicólico (53) con funciones mono, dihidroxilada, mono y diacetilada en anillo A, función lactona en anillo B y cadena lateral de ácido carboxílico y éster metílico.

Adicionalmente los compuestos **68-70** (Figura 22) fueron preparados como intermedios de síntesis para acceder a los análogos **64** y **65** (Figura 21) [93]. Sin embargo, los autores no reportaron las evaluaciones biológicas de estos compuestos.

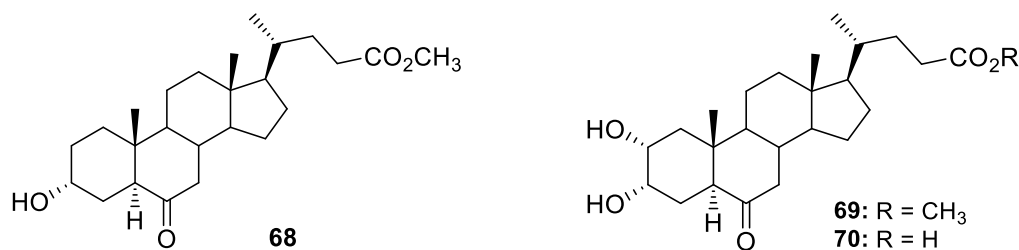


Figura 22. Estructuras de análogos derivados de ácido hiedesoxicólico (53) con funciones α -mono y α -dihidroxiladas en anillo A, función cetona en anillo B y cadena lateral de ácido carboxílico y éster metílico II.

Teniendo en consideración los significativos cambios introducidos en la cadena lateral de análogos de BRs y el posible efecto biológico que esto puede producir, otros autores han reportado la síntesis de los compuestos con cadenas laterales más cortas del tipo 24-nor, 22-23-dihidroxi-colanos. Sin embargo, la actividad biológica de estos compuestos no fue informada [79]. Adicionalmente, se reportó un nuevo método para

la síntesis de los compuestos **74** y **75**. Sin embargo, estos fueron evaluados como potenciales inhibidores del sistema neuroinflamatorio [94].

Por otra parte, y considerando estas modificaciones en la cadena lateral de tipo 24-nor, se sintetizaron otros análogos de 2-desoxi-BRs a partir del ácido desoxicólico **76**, que contienen funciones oxigenadas en el anillo C, con cadena lateral del tipo 24-nor, 22(S)-23-dihidroxi y con fusión cis de los anillos A/B, como los compuestos **77** y **78** (Figura 23). Las actividades promotoras del crecimiento en plantas de los compuestos **77** y **78** fueron ensayadas en los test de elongación de hipocótilos y en la expansión de los cotiledones de rábano. En este caso el compuesto **77** mostró actividad promotora del crecimiento a una concentración de 10^{-5} ppm en ambos bioensayos, mientras que el compuesto **80** mostró un efecto inhibidor en el test de expansión de cotiledones a la misma concentración [95], [96]. Siguiendo la misma línea, recientemente se informó la síntesis de nuevos análogos 2-desoxi-BRs con funcionalización 11-oxo-12 β -hidroxi en el anillo C, y con cadena del tipo 24-nor-22(S)-23-dihidroxi y 22(S)-23-diacetoxi [compuestos **81-83**, (Figura 23)], para estos compuestos no se informaron datos de actividades biológicas y fueron preparados desde ácido desoxicólico **76** [97].

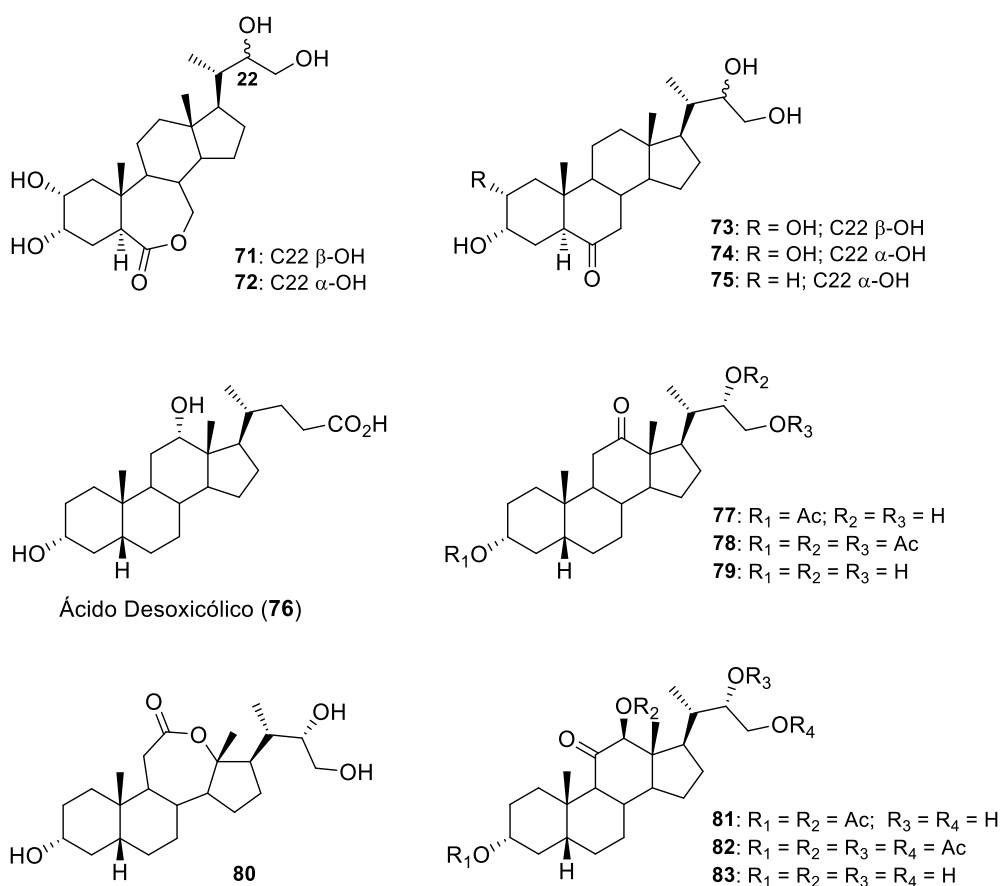


Figura 23. Estructuras de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales de tipo 24-nor colanos, preparados desde ácido hiodeoxicólico (**53**) y desoxicólico (**76**).

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 α , 3 α -glicol o 3 α -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 C22 y C23 preferentemente con configuraciones 22*R*, 23*R* y un grupo sustituyente alquilo de tipo metilo o etilo en el carbono C-24.

Sin embargo, este último requisito parece 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.

En base a estos antecedentes bibliográficos previamente expuestos se plantea determinar el efecto de la aplicación de los nuevos análogos de BRs en cultivos *in vitro* del hongo *Botrytis cinerea* y el efecto de la aplicación de estos análogos en cultivos celulares *in vitro* de diferentes líneas de cáncer humano. Estos análogos tendrán en su estructura cadena lateral del tipo 24-nor derivada del ácido hiodesoxicólico (**53**), con

funciones C22(S), C22(R) y C23 dihidroxilado, función 3 α -monohidroxilada en anillo A, función 6-oxo-7-oxalactona o 7-oxo-6-oxalactona en anillo B y fusión de anillos A/B de tipo *trans*. Los que corresponden al compuesto conocido **84** y los compuestos nuevos **85** al **89** (Figura 24).

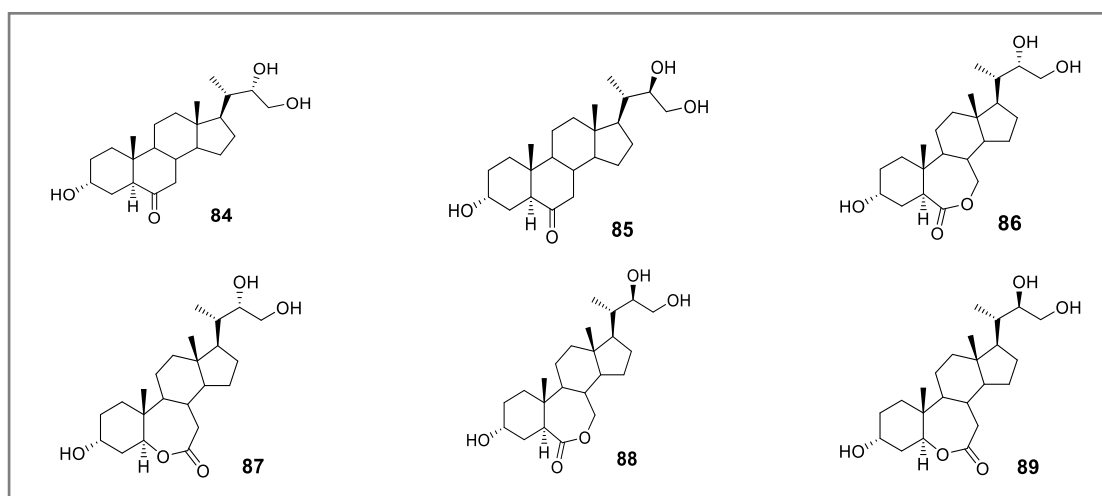


Figura 24. Estructuras de los compuestos objetivos de síntesis y estudio de actividad antifitopatógena contra *Botrytis cinerea* y actividad antineoplásica en líneas de cáncer hormono-dependientes.

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes bibliográficos, la hipótesis que sustenta esta investigación es:

Nuevos análogos de BRs sintetizados a partir del ácido hiodesoxicólico (**53**) con cadena lateral del tipo 24-nor, con C22(*S*), C22(*R*) y C23 dihidroxilados, función 3 α -monohidroxilado en anillo A, función 6-oxo-7-oxalactona o 7-oxo-6-oxalactona en anillo B y con fusión de anillos A/B de tipo *trans* serán capaces de inhibir el crecimiento micelial del hongo *Botrytis cinerea* en cultivo *in vitro*.

Además, estos nuevos análogos de BRs serán capaces de reducir la viabilidad celular de líneas celulares humanas tumorales: *PC-3* (cáncer de próstata), *HT-29* (cáncer de colon), *MCF7* (cáncer mamario), respecto a la línea celular humana normal tipo *CoN* (células epiteliales no tumorales de colon).

CAPÍTULO 2 - Objetivos

Objetivo general

Sintetizar nuevos análogos de BRs a partir del ácido hiodesoxicólico (**53**) y determinar el efecto de la aplicación del compuesto conocido **84** y los nuevos derivados sintéticos **85-89**, (Figura 24) en la inhibición de crecimiento del hongo patógeno *Botrytis cinerea* bajo condiciones *in vitro* y en la viabilidad de distintas líneas celulares tumorales humanas.

Objetivos específicos

1. Sintetizar el compuesto conocido **84** y los nuevos análogos **85-89** (Figura 24).
2. Caracterizar mediante propiedades físicas (punto de fusión, rotación óptica) y espectrométricas (RMN, IR y EM) los compuestos análogos sintetizados.
3. Evaluar el efecto de la aplicación de los compuestos análogos sintetizados sobre la inhibición del crecimiento micelial del hongo *Botrytis cinerea in vitro*.
4. Evaluar el efecto de la aplicación de los compuestos análogos sintetizados sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3), cáncer colorrectal (HT-29), cáncer de mamas (MCF7) y línea celular epitelial no tumoral de colon (CoN), mediante ensayos colorimétricos de cuantificación de citotoxicidad celular *in vitro*.

CAPÍTULO 3 – Métodos experimentales

Esquema general de síntesis

En la Figura 25 se presenta la estrategia general de síntesis, diseñada y optimizada para la obtención del compuesto análogo **84** y los nuevos compuestos análogos **85** al **89**, a partir de ácido hiodesoixólico (**53**).

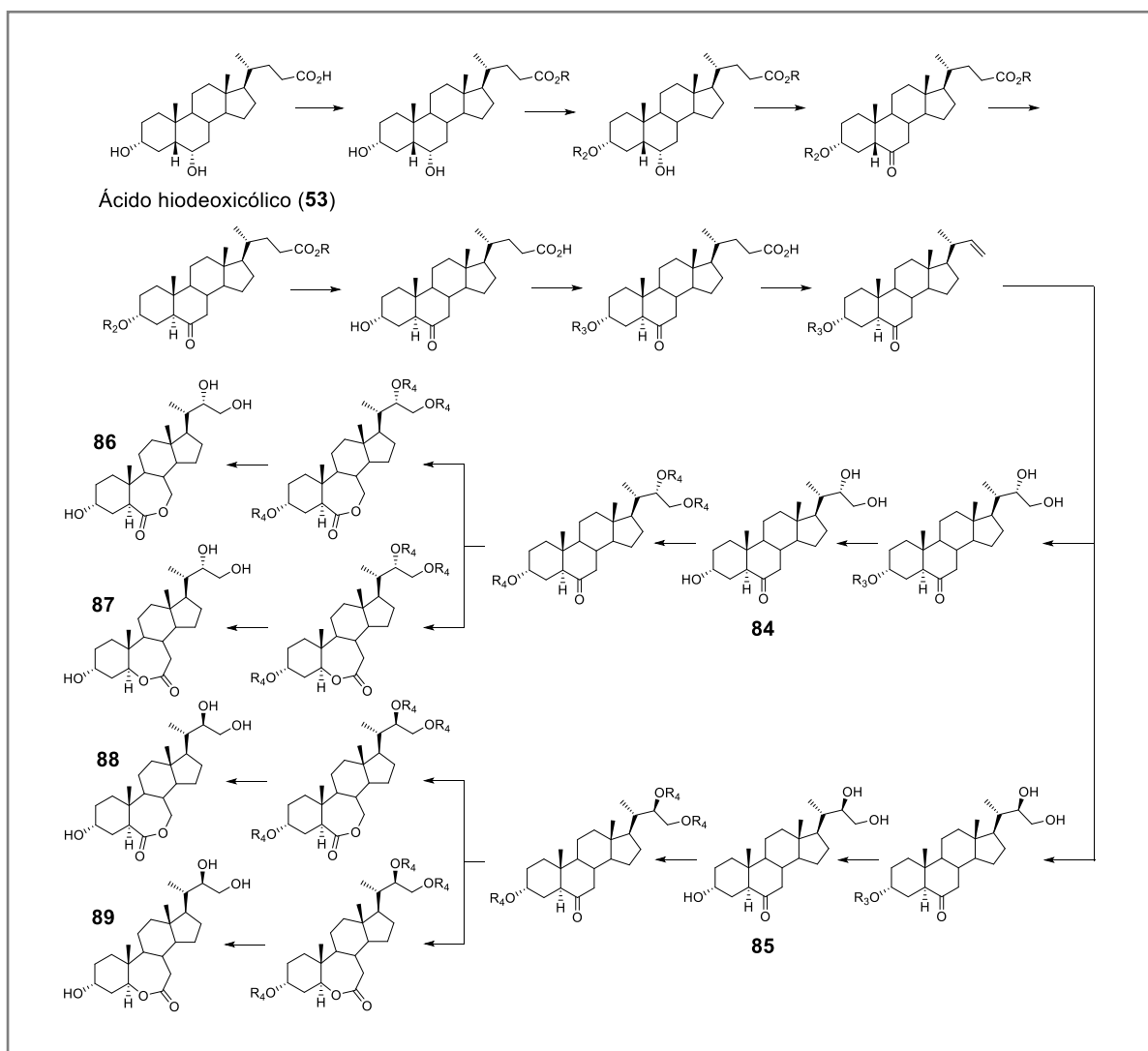


Figura 25. Esquema general de síntesis para la obtención de los compuestos objetivos y estudio de actividad antifitopatígena contra *Botrytis cinerea* y actividad antineoplásica frente a células de cáncer de diverso origen histopatológico.

Estrategia sintética diseñada para la obtención de los nuevos análogos de brasinoesteroides

Ruta de síntesis del compuesto análogo 104

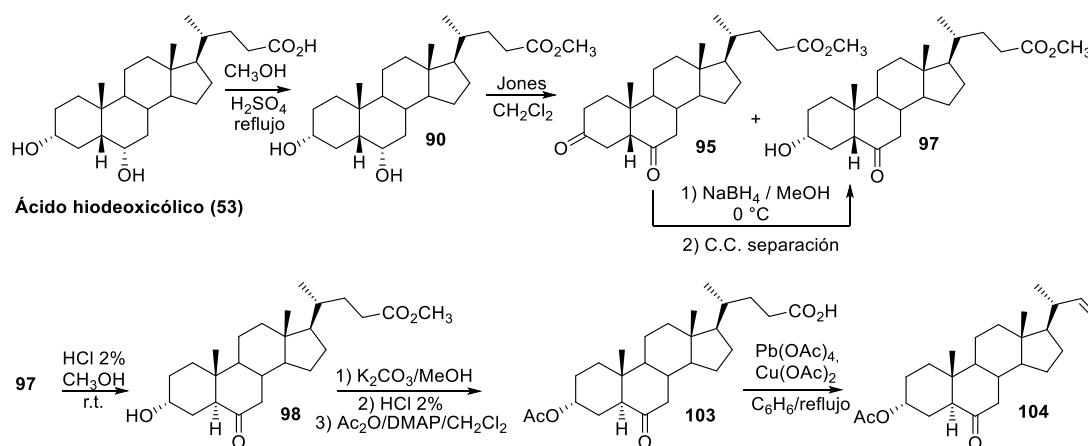


Figura 26: Esquema de síntesis propuesto para la obtención del compuesto precursor común 104 [98]–[102].

Ruta de síntesis del compuesto análogo 84

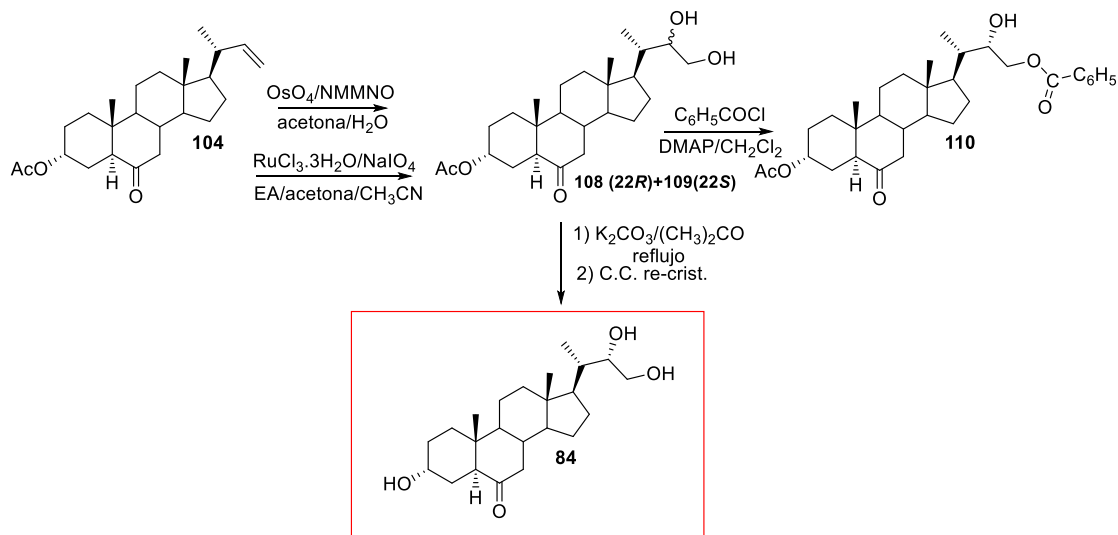


Figura 27: Esquema de síntesis propuesto para la obtención del compuesto 84 [72], [95], [101], [103]–[106].

Ruta de síntesis de los compuestos análogos 86 y 87

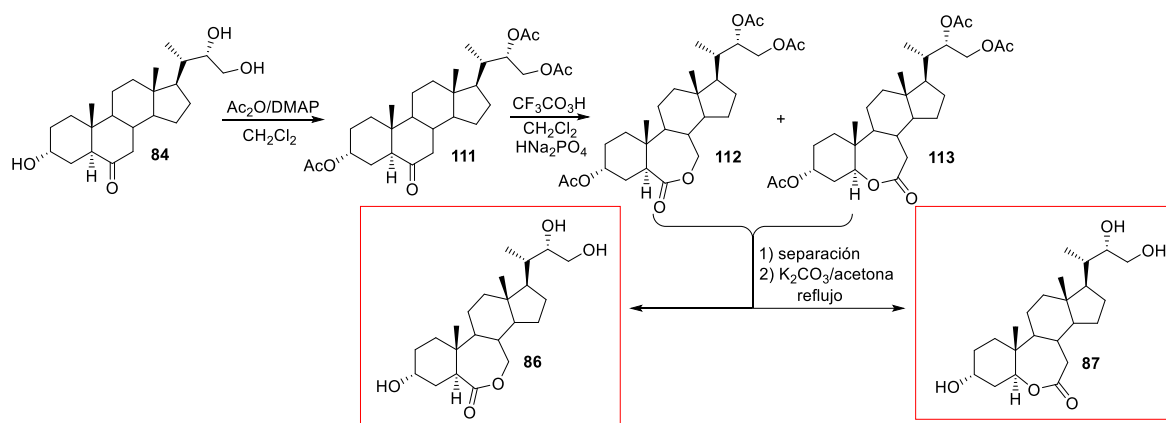


Figura 28: Esquema de síntesis propuesto para la obtención de los compuestos **86** y **87** [72], [101], [103]–[105].

Ruta de síntesis del compuesto análogo 85

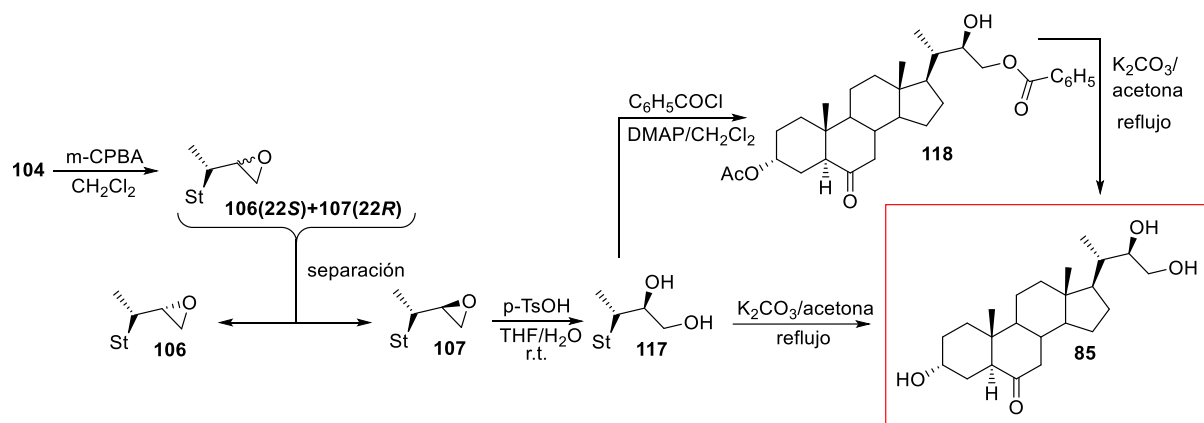


Figura 29: Esquema de síntesis propuesto para la obtención del compuesto **85** [72], [95], [101], [103]–[106].

Ruta de síntesis de los compuestos análogos 88 y 89

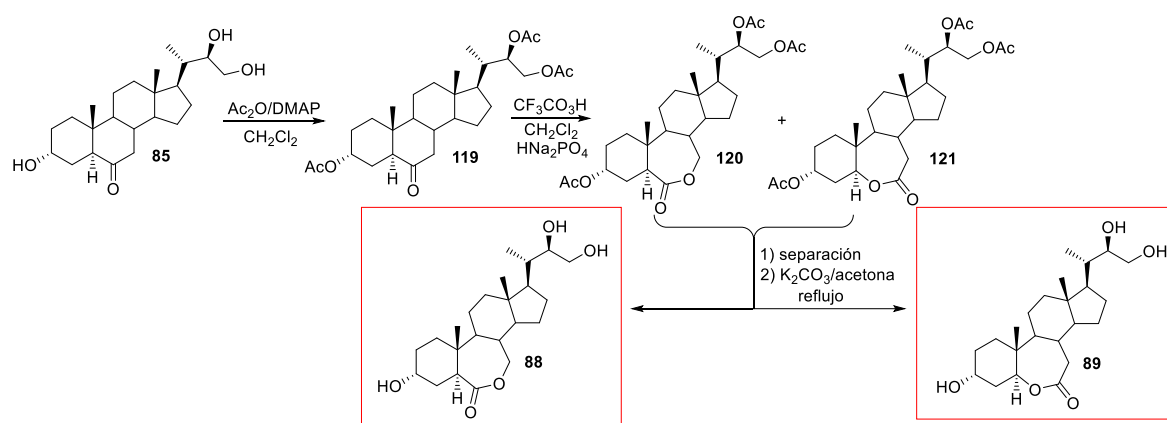


Figura 30: Esquema de síntesis propuesto para la obtención de los compuestos 88 y 89 [72], [101], [103]–[105].

Materiales e instrumentación usados en síntesis orgánica

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizan placas cromatográficas de Sílica gel Merck® 60F-254. Las placas son 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 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 (^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC) fueron registrados en un espectrómetro digital Bruker Avance 400, utilizando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3) o metanol deuterado (CD_3OD) al 99,8%. Los desplazamientos químicos (δ) son expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento J en Hertz (Hz). Como referencia se utilizó el desplazamiento químico de las señales residuales para los espectros de ^1H : $\delta \text{CDCl}_3 = 7,24$ ppm, $\delta \text{CD}_3\text{OD} (1) = 3,31$ ppm, $\delta \text{CD}_3\text{OD} (2) = 4,78$ ppm; y las señales residuales para los espectros de ^{13}C : $\delta \text{CDCl}_3 = 77,00$ ppm $\delta \text{CD}_3\text{OD} = 49,2$ ppm, y respectivamente.

Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)

Los EMAR fueron registrados en un espectrómetro de masas Thermo Fisher Scientific Exactive Plus Orbitrap con un poder de resolución de 140,000 FWHM, además, fueron

registrados en modo de barrido completo, cubriendo masas con un rango m/z de 300 a 500.

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^{-1}).

Puntos de fusión

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

Rotación óptica $[\alpha]_D^t$

Las rotaciones ópticas fueron registradas en un polarímetro Optical Activity LTD, modelo AA-5 con lámpara de sodio. Se determinaron en solución de CHCl_3 o MeOH, utilizando celdas de 1 cm. Las concentraciones se expresan en g/100 mL. La temperatura de lectura fue de 19° C, a menos que se indique lo contrario.

Reactivos e insumos utilizados en esta investigación

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

Tabla 1. Reactivos e insumos utilizados en esta investigación (Número CAS).

Nombre	Marca	Número CAS
Acetato de cobre II	Merck	142-71-2
Acetato de plomo IV	Sigma-Aldrich	546-67-8
Acetona p.a.	Merck	67-64-1
Acetonitrilo p.a.	Merck	75-05-8
Ácido acético glacial	Merck	64-19-7
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
Anhídrido tríflico	Merck	358-23-6
Anhídrido trifluoroacético	Sigma-Aldrich	407-25-0
Benceno p.a.	Merck	71-43-2
Borohidruro de sodio	Sigma-Aldrich	16940-66-2
Bromuro de litio	Merck	231-439-8
Carbonato de litio	Sigma-Aldrich	554-13-2
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 ₂₅₄	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
m-CPBA	Sigma-Aldrich	937-14-4
Metanol p.a.	Merck	67-56-1
N-Metilmorfolina N-óxido	Sigma-Aldrich	7529-22-8
Óxido de cromo VI	Sigma-Aldrich	1333-82-0
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
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 2. 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

El trabajo sintético se realizó bajo la supervisión del Dr. Luis Espinoza Catalán, en el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

Síntesis del compuesto 3 α ,6 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (90)

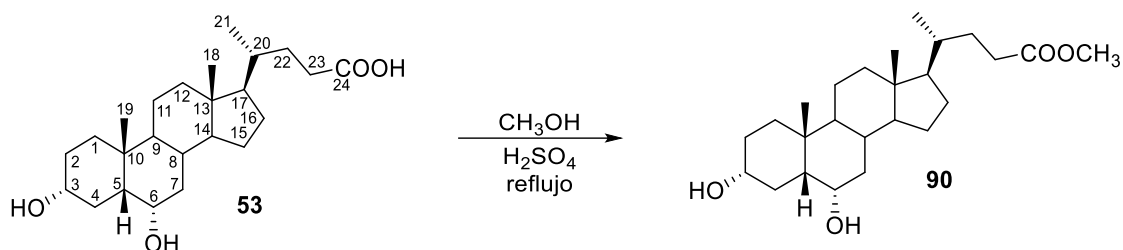


Figura 31. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **90**.

Se disolvió 25,0 g (63,68 mmol) de ácido hiodesoxicólico (**53**) (PM 392,58 gr/mol) en 150 mL de CH_3OH , luego se agregó 1 mL de H_2SO_4 y mantuvo en reflujo con trampa Dean-Stark por 120 minutos. El término de la reacción se monitoreó por CCF. Finalizada la reacción se concentró en rotavapor, lavó con una solución saturada de NaHCO_3 (2 x 25 mL) y se extrajo con acetato de etilo, lavando la fase orgánica hasta obtener pH 7. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anh. Finalmente, el solvente se evaporó a sequedad en rotavapor.

Compuesto **90**:

En la síntesis de 3 α ,6 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (**90**) se obtuvo un rendimiento de 97,3 %

Punto de fusión: $62,5 \pm 2,5$ °C

IR ν_{max} (cm^{-1}): 3385 (O-H), 2938 (C- CH_3), 2858 (C- CH_2 -C), 1743 (C=O), 1452 (CH_2), 1376 (CH_3), 1169 (C-O).

^1H RMN δ : 4,05 (ddd, $J = 4,8, 4,8$ y $11,9$ Hz, 1 H, H-C6), 3,66 (s, 3H, OCH_3), 3,62 (m, 1H, H-C3), 2,35 (ddd, $J = 5,1, 10,1$ y $15,0$ Hz, 1H, H-C23), 2,21 (ddd, $J = 6,6, 9,6$ y 15 Hz, 1H, H-C23), 0,91 (d, $J = 5,1$ Hz, 3H, H-C21), 0,90 (s, 3H, H-C19), 0,63 (s, 3H, H-C18).

^{13}C RMN δ : (C1) 35,56, (C2) 29,2, (C3) 71,48, (C4) 34,86, (C5) 48,4, (C6) 67,98, (C7) 30,11, (C8) 34,79, (C9) 39,81, (C10) 35,9, (C11) 20,72, (C12) 39,92, (C13) 42,8, (C14) 55,89, (C15) 28,1, (C16) 24,17, (C17) 56,14, (C18) 11,98, (C19) 23,48, (C20) 35,32, (C21) 18,21, (C22) 30,91, (C23) 31,02, (C24) 174,71, (OCH_3) 51,48.

Síntesis de los compuestos: 3 α -hidroxi-6 α -etoxicarbonil-5 β -colan-24-oato de metilo (91) y 3 α ,6 α -dietoxicarbonil-5 β -colan-24-oato de metilo (92)

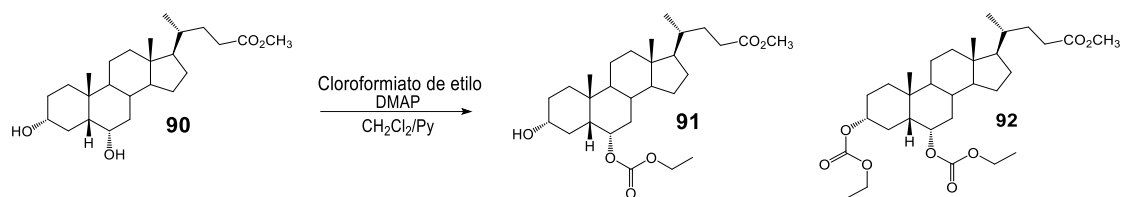


Figura 32. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **91** y **92**.

Se disolvió 1,0 g (2,46 mmol) del compuesto **90** (PM 406,61 gr/mol) en 60 mL de CH_2Cl_2 y se mantuvo en baño de agua-hielo (0°C) y agitación suave. Se agregó 10 mL de py, 10 mg de DMAP y 2,0 mL de cloroformiato de etilo (en exceso). El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF. Finalizada la reacción se agregó 25 mL de acetato de etilo y 10 mL de HCl 2 %. La fase orgánica fue lavada con H_2O hasta obtener pH 7 y luego con Na_2SO_4 anh. El producto se filtró y evaporó completamente el solvente. El material se diluyó en 3 mL CH_2Cl_2 y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para finalmente ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de 20 mL en polaridad creciente.

Compuesto 91:

Para la síntesis de 3 α -hidroxi-6 α -etoxicarbonil-5 β -colan-24-oato de metilo (**91**) se obtuvo un rendimiento de 8,1 %.

Punto de fusión: 53 ± 3 °C

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 3451 (O-H), 2942 (C-CH₃), 2869 (C-CH₂-C), 1740 (C=O), 1454 (CH₂), 1373 (CH₃), 1170 (C-O).

¹H RMN δ : 4,85 (ddd, $J = 4,8, 7,3$ y $12,1$ Hz, 1H, H-C6), 4,04 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,54 (s, 3H, OCH₃), 3,47 (m, 1H, H-C3), 2,23 (m, 1H, H-C23), 2,10 (m, 1H, H-C23), 1,34 (t, $J = 7,9$ Hz, 3H, CH₃CH₂O-C6), 0,85 (s, 3H, H-C19), 0,79 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-C21), 0,54 (s, 3H, H-C18).

¹³CRMN δ : (C1) 35,56, (C2) 27,97, (C3) 74,78, (C4) 34,87, (C5) 45,23, (C6) 77,08, (C7) 30,85, (C8) 34,56, (C9) 39,68, (C10) 35,96, (C11) 20,56, (C12) 39,77, (C13) 42,78, (C14) 55,78, (C15) 26,24, (C16) 24,0, (C17) 56,02, (C18) 11,92, (C19) 23,06, (C20) 35,22, (C21) 18,15, (C22) 30,93, (C23) 31,16, (C24) 174,55, (OCH₃) 51,38, (CO₃) 154,51, (OCH₂CH₃) 68,65, (OCH₂CH₃) 21,19.

Compuesto 92:

Para la síntesis de 3 α ,6 α -dietoxicarbonil-5 β -colan-24-oato de metilo (**92**) se obtuvo un rendimiento de 41,2 %.

Punto de fusión: 54 ± 2 °C

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 2946 (C-CH₃), 2870 (C-CH₂-C), 1740 (C=O), 1466 (CH₂), 1369 (CH₃), 1171 (C-O).

¹H RMN δ : 4,96 (ddd, $J = 4,6, 9,8$ y $11,8$ Hz, 1H, H-C6), 4,55 (ddd, $J = 4,3, 10,8$ y $15,5$ Hz, 1H, H-C3), 4,14 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H, 2xOCH₂CH₃), 3,63 (s, 3H, OCH₃), 2,32 (m, 1H, H-C23), 2,19 (m, 1H, H-C23), 1,33 (t, $J = 8,0$ Hz, 6H, 2xOCH₂CH₃), 0,95 (s, 3H, H-C19), 0,88 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, H-C21), 0,61 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 35,29, (C2) 27,32, (C3) 73,33, (C4) 31,09, (C5) 46,21, (C6) 73,35, (C7) 36,41, (C8) 31,04, (C9) 53,81, (C10) 35,53, (C11) 21,09, (C12) 39,97, (C13) 42,88, (C14) 55,06, (C15) 27,19, (C16) 28,42, (C17) 56,34, (C18) 12,14, (C19) 13,18, (C20) 35,82, (C21) 18,29, (C22) 31,33, (C23) 31,11, (C24) 174,55, (OCH₃) 51,38, (CO₃) 154,62, (CO₃) 154,51, (C3-OCH₂CH₃) 70,55, (C3-OCH₂CH₃) 21,34, (C6-OCH₂CH₃) 71,72, (C6-OCH₂CH₃) 21,31.

Síntesis de los compuestos: 3 α ,6 α -dibenzoiloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (93) y 3 α -benzoiloxi-6 α -hidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (94)

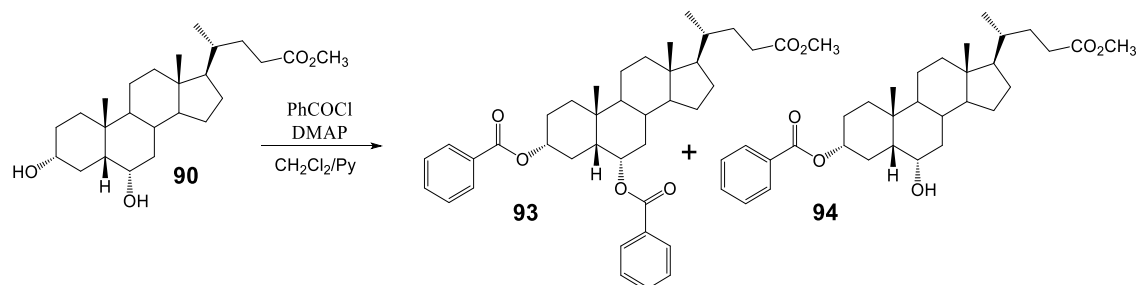


Figura 33. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 93 y 94.

Se disolvió 1,0 g (2,46 mmol) del compuesto **90** (PM 406,61 gr/mol) en 60 mL de CH₂Cl₂ con 0,1 mL de py, 10 mg de DMAP y 3,0 mL de cloruro de benzoilo (en exceso). El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción se agregó 10 mL de HCl 2% y 25 mL de EtOAc, luego lavó con H₂O hasta obtener pH 7. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anh. y posteriormente el solvente fue evaporado completamente. El producto se diluyó en 3 mL CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para finalmente ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente.

Compuesto 93:

Para la síntesis de 3 α ,6 α -dibenzoiloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (**93**) se obtuvo un rendimiento de 40,6 %.

Punto de fusión: 72,5 $\pm$ 2,5 °C

IR ν_{max} (cm⁻¹): 3072 (C-H, Ar), 2950 (C-CH₃), 2872 (C-CH₂-C), 1688 (C=O), 1602 (C=C, Ar), 1583 (Ar), 1453 (CH₂), 1326 (CH₃), 1178 (C-O).

¹H RMN δ : 8,08 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-C2-Ar-C3), 8,02 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-C2-Ar-C6), 7,54 (m, 2H, H- C4-Ar-C3), 7,42 (m, 4H, H-C 3,5 Ar-C3 y Ar-C6), 5,46 (ddd, J = 4,6. 9,9 y 12,1

Hz, 1H, H-C6), 5,03 (m, 1H, H-C3), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 2,35 (m, 1H, H-C23), 2,26 (m, 1H, H-C23), 1,08 (s, 3H, H-C19), 0,94 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-C21), 0,69 (s, 1H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 36,10, (C2) 26,87, (C3) 75,28, (C4) 35,05, (C5) 45,21, (C6) 77,05, (C7) 37,64, (C8) 30,56, (C9) 53,81, (C10) 36,18, (C11) 20,68, (C12) 39,88, (C13) 42,89, (C14) 55,74, (C15) 25,33, (C16) 28,44, (C17) 56,81, (C18) 12,11, (C19) 12,46, (C20) 35,61, (C21) 18,33, (C22) 30,97, (C23) 31,09, (C24) 174,43, (OCH₃) 51,44, (C1-Ar) 130,62, (C2-Ar) 129,31, (C3-Ar) 128,18, (C4-Ar) 132,76, (C5-Ar) 128,18, (C6-Ar) 129,31, (CO₂-Ar) 166,45, (C1'-Ar) 131,14, (C2'-Ar) 129,62, (C3'-Ar) 128,42, (C4'-Ar) 132,78, (C5'-Ar) 128,42, (C6'-Ar) 129,62, (CO₂-Ar') 166,67.

Compuesto 94:

Para la síntesis de 3 α -benzoiloxi-6 α -hidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (**94**) se obtuvo un rendimiento de 16,9 %.

Punto de fusión: 77,5 $\pm$ 2,5 °C

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3490 (O-H), 3061 (C-H, Ar), 2944 (C-CH₃), 2868 (C-CH₂-C), 1736 (C=O), 1716 (C=O), 1602 (C=C, Ar), 1584 (C=C, Ar), 1450 (CH₂), 1379 (CH₃), 1174 (C-O).

¹H RMN δ : 8,03 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-C1-Ar), 7,54 (dd, $J = 7,4$ y $7,4$ Hz, 1H, H-C4-Ar), 7,42 (dd, $J = 7,6$ y $7,6$ Hz, 2H, H-C3-Ar), 4,97 (m, 1H, H-C3), 4,10 (m, 1H, H-C6), 3,66 (s, 3H, OCH₃), 2,33 (m, 1H, H-C23), 2,24 (m, 1H, H-C23), 0,95 (s, 3H, H-C19), 0,92 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-C21), 0,65 (s, 1H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 35,56, (C2) 26,67, (C3) 74,76, (C4) 34,86, (C5) 48,38, (C6) 67,9, (C7) 28,09, (C8) 34,77, (C9) 39,81, (C10) 36,01, (C11) 20,78, (C12) 39,86, (C13) 42,84, (C14) 55,94, (C15) 25,43, (C16) 24,15, (C17) 56,12, (C18) 12,01, (C19) 23,46, (C20) 35,31, (C21) 18,25, (C22) 30,96, (C23) 31,03, (C24) 174,73, (OCH₃) 51,48, (C1-Ar) 130,82, (C2 y C6-Ar) 129,51, (C3 y C5-Ar) 128,23, (C4-Ar) 133,69, (CO₂-Ar) 166,05.

Síntesis de 3-dimetoxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (95) mediante oxidación con clorocromato de piridinio (PCC)

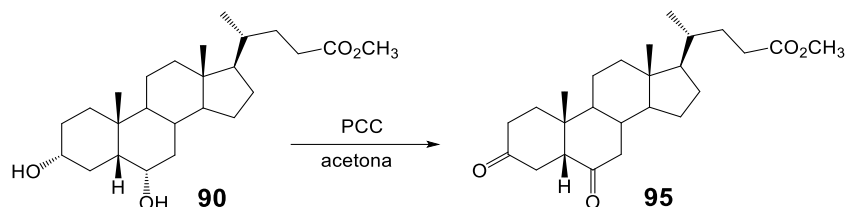


Figura 34. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos 95.

Se disolvió 10,0 g (24,6 mmol) del compuesto **90** (PM 406,61 gr/mol) en 100 mL de acetona. Se agregó, gota a gota, una solución de 5,30 g (24,6 mmol) de clorocromato de piridinio disuelto en 60 mL de CH₂Cl₂, la reacción se mantuvo en agitación suave por 48 h a t.amb. El término de la reacción se monitoreó por CCF. Finalizada la reacción, se agregó 10 mL de CH₃OH, para desactivar el exceso de PCC. Posteriormente la solución fue filtrada en columna con sílica gruesa y se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). El filtrado fue secado completamente. El producto se diluyó en 3 mL de CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por CC, utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente.

Compuesto 95:

Para la síntesis de 3,6 dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (**95**) se obtuvo un rendimiento de 66,1 %.

Punto de fusión: 106,5 $\pm$ 0,5 °C

IR ν_{max} (cm⁻¹): 2947 (C-CH₃), 2874 (C-CH₃), 1743 (C=O), 1717 (C=O), 1689 (C=O), 1469 (CH₂), 1383 (CH₃), 1164 (C-O).

¹H RMN δ : 3,64 (s, 3H, OCH₃), 2,63 (dd, J = 13,4 y 14,7 Hz, 1H, H-C12), 0,93 (s, 3H, H-C19), 0,91 (d, J = 6,5 Hz, 3H, H-C21), 0,67 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 35,71, (C2) 36,42, (C3) 208,58, (C4) 39,83, (C5) 59,67, (C6) 210,75, (C7) 42,08, (C8) 36,61, (C9) 40,83, (C10) 38,22, (C11) 21,23, (C12) 39,41, (C13) 43,02, (C14)

55,74, (C15) 27,88, (C16) 23,85, (C17) 56,7, (C18) 11,92, (C19) 22,4, (C20) 35,19, (C21) 18,18, (C22) 30,8, (C23) 30,95, (C24) 174,5, (OCH₃) 51,44.

Compuesto 96 (artefacto de síntesis)

Como artefacto se formó el compuesto 3,3-dimetoxi-5 β -colan-24-oato de metilo (**96**).

Punto de fusión: 87,5 $\pm$ 2,5 °C

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2952 (C-CH₃), 2875 (C-CH₃), 2828 (O-CH₃), 1744 (C=O), 1702 (C=O), 1439 (CH₂), 1375 (CH₃), 1174 (C-O), 1122 (C-O-C), 1088 (C-O-C).

¹H RMN δ : 3,65 (s, 3H, C24-OCH₃), 3,18 (s, 3H, OCH₃), 3,12 (s, 3H, OCH₃), 2,33 (ddd, J = 5,3, 10,2 y 15,3 Hz, 1H, H-C23), 0,91 (d, J = 6,4 Hz, 3H, H-C21), 0,84 (s, 3H, H-C19), 0,64 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 32,09, (C2) 32,11, (C3) 99,2, (C4) 27,96, (C5) 57,39, (C6) 213,91, (C7) 42,86, (C8) 36,97, (C9) 39,37, (C10) 38,15, (C11) 21,07, (C12) 39,58, (C13) 43,07, (C14) 55,77, (C15) 27,38, (C16) 23,9, (C17) 56,8, (C18) 11,93, (C19) 23,0, (C20) 35,25, (C21) 18,2, (C22) 30,88, (C23) 31,01, (C24) 174,61, (OCH₃) 51,48, C(OCH₃)₂ 47,63 y 47,46.

Síntesis de 3,6-dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (**95**) y 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (**97**) mediante oxidación con reactivo de Jones

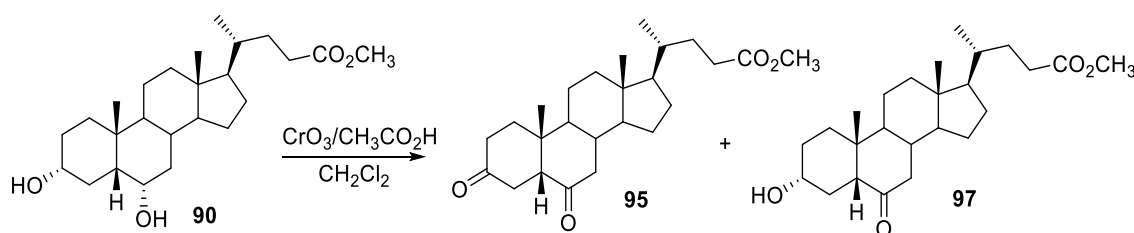


Figura 35. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **95** y **97**.

Se disolvió 20,5 g (50,4 mmol) del compuesto **90** (PM 406,61 gr/mol) en 50 mL de CH₂Cl₂, manteniendo en baño de agua-hielo (0 °C) y en agitación constante. Se agregó, gota a gota, 0,92 mL (2,46 mmol) de reactivo de Jones (26,72 g de CrO₃, 23 mL AcOH, aforando a 100 mL con H₂O), manteniendo agitación durante 3 h. El término de la reacción se

monitoreó por CCF. Finalizada la reacción se agregó 2 mL de CH₃OH y 5 mL de solución saturada de NaHCO₃. Se extrajo con acetato de etilo (3 x 40 mL) y la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anh. y filtrado. Finalmente, el solvente fue evaporado y el producto se diluyó con 3 mL de CH₂Cl₂ y mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm). El compuesto fue separado con CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente.

Compuesto 95:

Para la síntesis de 3,6 dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (**95**) se obtuvo un rendimiento de 19,4 %.

Punto de fusión: 106,5 $\pm$ 0,5 °C

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2947 (C-CH₃), 2874 (C-CH₃), 1743 (C=O), 1717 (C=O), 1689 (C=O), 1469 (CH₂), 1383 (CH₃), 1164 (C-O).

¹H RMN δ : 3,64 (s, 3H, OCH₃), 2,63 (dd, J = 13,4 y 14,7 Hz, 1H, H-C12), 0,93 (s, 3H, H-C19), 0,91 (d, J = 6,5 Hz, 3H, H-C21), 0,67 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 35,71, (C2) 36,42, (C3) 208,58, (C4) 39,83, (C5) 59,67, (C6) 210,75, (C7) 42,08, (C8) 36,61, (C9) 40,83, (C10) 38,22, (C11) 21,23, (C12) 39,41, (C13) 43,02, (C14) 55,74, (C15) 27,88, (C16) 23,85, (C17) 56,7, (C18) 11,92, (C19) 22,4, (C20) 35,19, (C21) 18,18, (C22) 30,8, (C23) 30,95, (C24) 174,5, (OCH₃) 51,44.

Compuesto 97:

Para la síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (**97**) se obtuvo un rendimiento de 55,6 %.

Punto de fusión: 97,5 $\pm$ 2,5 °C

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3301 (O-H), 2943 (C-CH₃), 2867 (C-CH₂-C), 2849 (C-CH₂-C), 2828 (O-CH₃), 1740 (C=O), 1709 (C=O), 1436 (CH₂), 1326 (CH₃), 1171 (C-O).

¹H RMN δ : 3,66 (s, 3H, OCH₃), 3,62 (m, 1H, H-C3), 2,33 (ddd, J = 5,0 y 10,1 y 15,2 Hz, 1H, H-C23), 0,92 (d, J = 6,4 Hz, 3H, H-C21), 0,83 (s, 3H, H-C19), 0,64 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 34,37, (C2) 34,86, (C3) 70,15, (C4) 29,85, (C5) 59,4, (C6) 213,88, (C7) 37,97, (C8) 37,06, (C9) 39,6, (C10) 39,99, (C11) 20,83, (C12) 42,91, (C13) 43,09, (C14)

55,79, (C15) 27,98, (C16) 23,96, (C17) 56,82, (C18) 11,96, (C19) 23,16, (C20) 35,28, (C21) 18,23, (C22) 30,9, (C23) 31,05, (C24) 174,67, (OCH₃) 51,52.

Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (97)

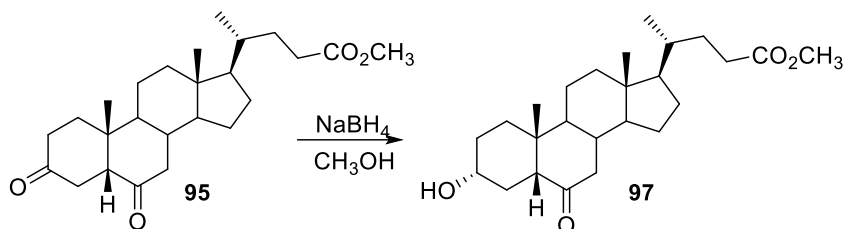


Figura 36. Esquema de recuperación compuesto **97**, mediante reducción quimioselectiva desde **95**.

Se disolvió 3,50 g (8,69 mmol) del compuesto **95** (PM 402,57 gr/mol) en 100 mL de CH₃OH y mantuvo en baño de agua-hielo (0 °C) con agitación suave. Se agregó 328 mg (8,68 mmol) de NaBH₄ dividido en cuatro porciones. El avance y el término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción se agregó 20 mL de acetona y 5 mL de HCl 2,5 %, luego redujo el volumen en rotavapor y se agregó 40 mL de EtOAc. La solución fue lavada con H₂O destilada hasta obtener pH 7. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto fue diluido 3 mL de CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de 50 mL en polaridad creciente.

Para la síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (**97**) se obtuvo un rendimiento de 69,1 %.

Punto de fusión, datos espectroscópicos de ¹H RMN y ¹³C RMN para el compuesto **97** fueron consistentes con los indicados anteriormente por oxidación directa desde **90**.

Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (98)

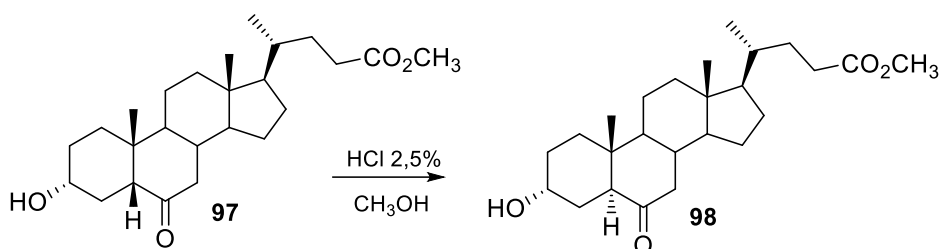


Figura 37. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **98**.

Se disolvió 5,0 g (24,72 mmol) del compuesto **97** (PM 404,59 gr/mol) en una solución de 100 mL 2,5 % v/v HCl en CH₃OH, manteniendo en agitación constante y a t.amb. durante 24 h. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF. Se redujo el volumen de la solución en rotavapor y se agregó 40 mL de acetato de etilo. La fase orgánica fue lavada con solución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 mL), luego secada con Na₂SO₄ anh., para luego el solvente ser completamente evaporado en rotavapor. El producto fue diluido en 3 mL de CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser finalmente separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente.

Compuesto 98:

Para la síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (**98**) se obtuvo un rendimiento de 77,4 %.

Punto de fusión: 130,0 $\pm$ 2,0 °C

IR ν_{max} (cm⁻¹): 3302 (O-H), 2943 (C-CH₃), 2867 (C-CH₂-C), 2848 (C-CH₂-C), 2822 (O-CH₃), 1739 (C=O), 1709 (C=O), 1435 (CH₂), 1328 (CH₃), 1172 (C-O).

¹H RMN δ : 4,16 (m, 1H, H-C3), 3,66 (s, 3H, OCH₃), 2,70 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H-C5), 2,33 (ddd, J = 5,3, 10,3 y 15,5 Hz, 1H, H-C23), 0,91 (d, J = 6,4 Hz, 3H, H-C21), 0,72 (s, 3H, H-C19), 0,65 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 31,65, (C2) 28,16, (C3) 65,41, (C4) 27,9, (C5) 51,65, (C6) 212,7, (C7) 46,83, (C8) 37,94, (C9) 53,77, (C10) 41,53, (C11) 21,03, (C12) 39,45, (C13) 42,89, (C14) 55,71, (C15) 27,67, (C16) 23,88, (C17) 56,73, (C18) 12,0, (C19) 12,29, (C20) 35,29, (C21) 18,21, (C22) 30,89, (C23) 31,03, (C24) 174,67, (OCH₃) 51,5.

Síntesis de 3 α -metanesulfonyl-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (99)

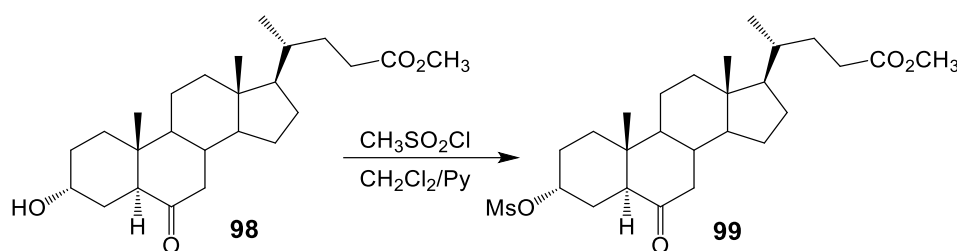


Figura 38. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **99**.

Se disolvió 1,0 g (2,47 mmol) del compuesto **98** (PM 404,59 gr/mol) en 20 mL de CH_2Cl_2 y 1 mL de py manteniendo en baño de agua-hielo (0 °C) y agitación suave. Una vez estabilizado, se agregó 3 mL de MsCl mediante goteo lento e indirecto. La agitación se mantuvo por 2 h manteniendo la temperatura. El término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción, se agregó 25 mL de acetato de etilo y redujo su volumen a la mitad, usando rotavapor, para luego ser lavada con H_2O destilada (3 x 25mL) y una vez separada la fase orgánica, esta fue secada con Na_2SO_4 anh. y el solvente se evaporó a sequedad en rotavapor. El producto fue diluido en 3 mL CH_2Cl_2 y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm), para finalmente ser separado por CC utilizando una mezcla de hex-EtOAc en gradiente de polaridad creciente.

Compuesto 99:

Para la síntesis de 3 α -metanesulfonyl-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (**99**) se obtuvo un rendimiento de 57,2 %.

Punto de fusión: $131,0 \pm 0,5$ °C

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 2945 (C-CH₃), 2867 (C-CH₂-C), 1736 (C=O), 1709 (C=O), 1435 (CH₂), 1351 (CH₃), 1255, C-O), 1171 (C-O).

¹H RMN δ : 5,02 (s, 1H, H-C3), 3,64 (s, 3H, CH₃O), 2,97 (s, 3H, CH₃SO₃), 2,60 (dd, $J = 2,3$ y 12,4 Hz, 1H, H-C5), 0,90 (s, 3H, H-C21), 0,638 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 31,64, (C2) 27,79, (C3) 78,70, (C4) 26,56, (C5) 51,78, (C6) 211,08, (C7) 46,51, (C8) 37,78, (C9) 53,35, (C10) 40,99, (C11) 20,93, (C12) 39,25, (C13) 42,89, (C14) 56,57, (C15) 26,09, (C16) 23,79, (C17) 55,61, (C18) 11,94, (C19) 12,39, (C20) 35,19, (C21) 18,12, (C22) 30,79, (C23) 30,93, (C24) 174,55, (OCH₃) 51,42, (CH₃SO₃) 37,78.

Síntesis de 3-desoxi-6-oxo-5 α -2-colen-24-oato de metilo (100) a partir del compuesto mesilado (99)

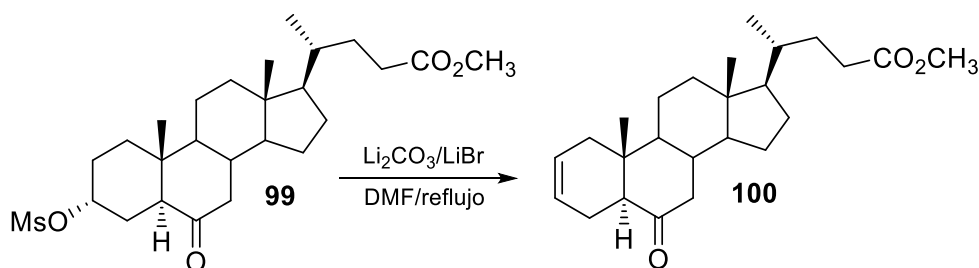


Figura 39. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **100**.

Se disolvió 1,30 g (0,269 mmoles) del compuesto **99** en 40 mL de DMF, se agregó 200 mg (2,71 mmoles) de Li₂CO₃ y 235 mg (2,71 mmoles) de LiBr. La mezcla se reflujo a 80 °C y la reacción se mantuvo en agitación constante y a la temperatura indicada durante 1,5 h. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se filtró y la solución resultante se concentró en rotavapor a un volumen aproximado de 15 mL, se agregó 30 mL de AcOEt a la mezcla y la solución se lavó con H₂O destilada (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anh., se filtró y el sólido residual se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). Luego el solvente se evaporó a sequedad

en rota-vapor. El producto fue diluido en 3 mL CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm), para finalmente ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente.

Compuesto 100:

Para la síntesis de 3-desoxi-6-oxo-5 α -2-colen-24-oato de metilo (**100**) se obtuvo un rendimiento de 74,9 %.

Punto de fusión: 78,0 $\pm$ 1,0 °C

IR ν_{max} (cm⁻¹): 3020 (CH=), 2968 (CH₃-), 2939 (CH₃-), 2899 (C-CH₂-C), 2867 (C-CH₂-C), 1737 (C=O), 1703 (C=O), 1435 (CH₂), 1383 (CH₃), 1250 (C-O), 1168 (C-O).

¹H RMN δ : 5,68 (m, 1H, H-C2), 5,56 (m, 1H, H-C3), 3,66 (s, 3H, OCH₃), 0,902 (d, J = 6,4 Hz, 3H, CH₃-C21), 0,703 (s, 3H, CH₃-C19), 0,638 (s, 3H, CH₃-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 39,44, (C2) 124,95, (C3) 124,48, (C4) 23,89, (C5) 53,35, (C6) 211,96, (C7) 46,95, (C8) 37,67, (C9) 53,82, (C10) 40,0, (C11) 27,88, (C12) 39,34, (C13) 42,84, (C14) 56,69, (C15) 23,95, (C16) 29,67, (C17) 55,75, (C18) 14,14, (C19) 12,08, (C20) 35,46, (C21) 18,22, (C22) 30,91, (C23) 30,98, (C24) 174,82, (OCH₃) 51,36.

Síntesis de 3-desoxi-6-oxo-5 α -2-colen-24-oato de metilo (100**) desde el compuesto hidroxilado (**98**)**

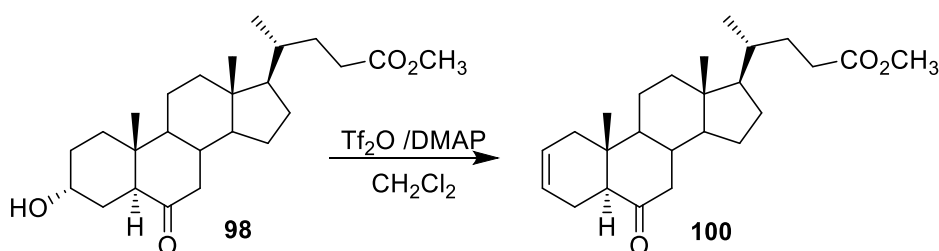


Figura 40. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **100** (II)

Se disolvió 5,0 g (12,36 mmol) del compuesto **98** (PM 404,59 gr/mol) en 60 mL de CH₂Cl₂ en baño agua-hielo (0 °C) manteniendo agitación suave. Una vez estabilizado se agregó 3 mL de py (75 mmol) y 3,26 mL de anhídrido tríflico (19 mmol), manteniendo la

temperatura y agitación suave por 2 h. El término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción el producto fue extraído con CH_2Cl_2 (3 x 20mL). La fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anh., y el solvente se evaporó a sequedad, en rotavapor. El producto fue diluido en 3 mL CH_2Cl_2 y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm), para finalmente ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de 20 mL en polaridad creciente.

Compuesto 100:

Para la síntesis de 3-desoxi-6-oxo-5 α -2-colen-24-oato de metilo (**100**) se obtuvo un rendimiento de 62,0 %.

Punto de fusión, datos espectroscópicos de ^1H RMN y ^{13}C RMN para el compuesto **100** fueron totalmente consistentes con los obtenidos por reacción del compuesto **99**.

Síntesis de 2 α ,3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (**101**)

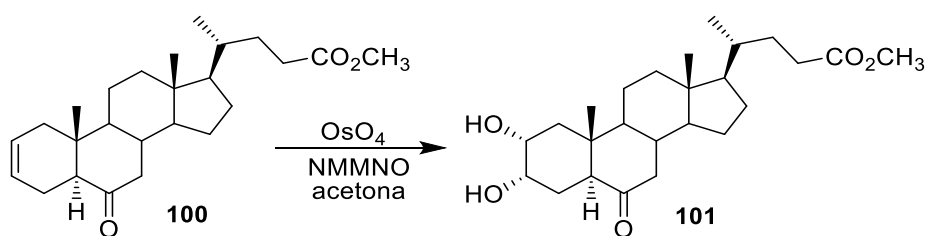


Figura 41. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **101**.

Se disolvió 2,0 g (5,17 mmol) del compuesto **100** (PM 386,58 gr/mol) en 40 mL de acetona y se agregó 5,17 mmol de NMMNO. La mezcla se mantuvo en agitación constante y a t.amb., para luego agregar 1,5 mL de una solución acuosa 4% de OsO_4 por goteo muy lento. La agitación se mantuvo por 24 h. El término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción, se agregó 25 mL de H_2O y 25 mL de solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. La muestra fue extraída con acetato de etilo (2 x 50 mL), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto se diluyó en 3 mL de acetona y se mezcló con

sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de 20 ml en polaridad creciente.

Compuesto 101:

Para la síntesis de 2 α ,3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (**101**) se obtuvo un rendimiento de 43,1 %.

Punto de fusión: 178,5 $\pm$ 0,5 $^{\circ}$ C

IR $\nu_{\max}$ (cm $^{-1}$): 3392 (OH), 2944 (CH $_3$ -), 2867 (C-CH $_2$ -C), 1738 (C=O), 1709 (C=O), 1435 (CH $_2$), 1376 (CH $_3$), 1255 (C-O), 1170 (C-O).

^1H RMN δ : 4,05 (s, 1H, H-C3), 3,76 (m, 1H, H-C2), 3,66 (s, 3H, OCH $_3$), 2,67 (dd, J = 3 y 12,6 Hz, 1H, H-C5), 0,926 (d, J = 6,4 Hz, 3H, CH $_3$ -C21), 0,752 (s, 3H, CH $_3$ -C19), 0,659 (s, 3H, CH $_3$ -C18).

^{13}C RMN δ : (C1) 40,18, (C2) 68,29, (C3) 68,39, (C4) 26,28, (C5) 50,69, (C6) 214,15, (C7) 46,73, (C8) 37,65, (C9) 53,66, (C10) 42,98, (C11) 21,17, (C12) 39,35, (C13) 42,55, (C14) 56,61, (C15) 23,91, (C16) 27,91, (C17) 55,69, (C18) 12,01, (C19) 13,55, (C20) 35,30, (C21) 18,22, (C22) 31,04, (C23) 30,89, (C24) 174,72, (OCH $_3$) 51,54.

Síntesis de ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (**102**)

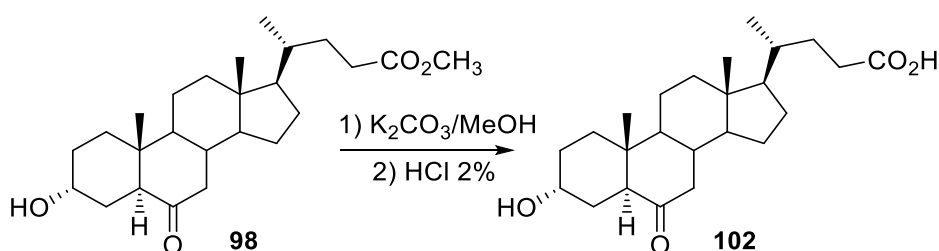


Figura 42. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **102**.

Se disolvió 2,0 mg (5,17 mmol) del compuesto **98** (PM 386,58 gr/mol) en 60 mL de CH $_3$ OH, manteniendo en agitación suave y condiciones de reflujo. Se agregó 20 mL de

solución de K_2CO_3 al 15% y se mantuvo las condiciones hasta el término de la reacción, indicado por CCF. La muestra se concentró en rotavapor hasta aproximadamente 20 mL. La solución fue acidificada con solución HCl 10% hasta alcanzar un pH 4. El producto fue extraído con acetato de etilo (2x25 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh., se filtró y el solvente fue evaporado completamente en rotavapor. El producto se diluyó en 3 mL de acetona y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm) para ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo en gradiente de 20 mL en polaridad creciente.

Compuesto 102:

Para la síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (**102**) se obtuvo un rendimiento de 82,2 %.

Punto de fusión: 104,5 $\pm$ 2,5 °C

IR ν_{max} (cm^{-1}): 3403-2500 (O-H), 2945 (C-CH₃), 2869 (C-CH₃), 1712 (C=O), 1689 (C=O), 1442 (CH₂), 1380 (CH₃).

¹H RMN δ : 4,04 (m, 1H, H-C3), 2,75 (t, J = 8,1 Hz, 1-H, H-C5), 2,31 (ddd, J = 5,3, 9,9 y 15,2 Hz, 1H, H-C23), 0,96 (d, J = 6,5 Hz, 3H, H-C21), 0,73 (s, 3H, H-C19), 0,71 (s, 3H, H-C18).

¹³C RMN δ : (C1) 32,87, (C2) 28,96, (C3) 66,01, (C4) 28,7, (C5) 52,83, (C6) 215,65, (C7) 47,59, (C8) 39,41, (C9) 55,03, (C10) 43,71, (C11) 22,17, (C12) 40,78, (C13) 44,16, (C14) 57,18, (C15) 28,42, (C16) 24,92, (C17) 57,89, (C18) 12,41, (C19) 12,68, (C20) 36,6, (C21) 18,72, (C22) 32,01, (C23) 32,24, (C24) 178,19.

Síntesis de ácido 3 α -acetoxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (103**)**

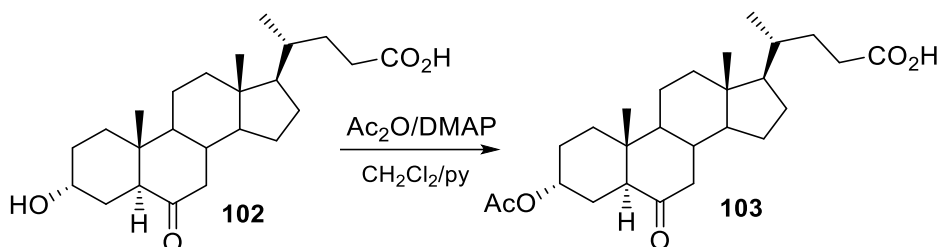


Figura 43. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **103**.

Se disolvió 5,0 g (12,80 mmol) del compuesto **102** (PM 390,56 gr/mol) en 60 mL de CH₂Cl₂ a t.amb. y con agitación constante. Se agregó 1 mL de py, 10 mg de DMAP y 1,5 mL de AcO₂. El término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción se agregó 25 mL de solución HCl 2 % y 25 mL de EtOAc. La muestra fue lavada con H₂O destilada hasta obtener pH 7. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anh. y el solvente se evaporó a sequedad en rotavapor. El producto fue diluido en 3 mL CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica fina (0,032 - 0,063 mm), para finalmente ser separado por CC utilizando una mezcla de hexano-EtOAc en gradiente de 20 mL en polaridad creciente.

Compuesto 103:

Para la síntesis de ácido 3 α -acetoxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (**103**) se obtuvo un rendimiento de 72,8 %.

Punto de fusión: 174,0 $\pm$ 3,0 °C

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3373 (O-H), 2947 (C-CH₃), 2869 (C-CH₃), 1736 (C=O), 1708 (C=O), 1444 (CH₂), 1376 (CH₃).

¹H RMN δ : 5,12 (m, 1H, H-C3), 2,56 (dd, J = 3,3 y 12 Hz, 1H, H-C5), 2,38 (ddd, J = 5,4, 10,3 y 15,4 Hz, 1H, H-C23), 2,03 (s, 3H, CH₃CO), 0,94 (d, J = 6,4 Hz, 3H, H-C21), 0,74 (s, 3H, H-C19), 0,67 (s, 3H, H-C18).

^{13}C RMN δ : (C1) 32,38, (C2) 27,89, (C3) 68,87, (C4) 25,26, (C5) 52,58, (C6) 211,86, (C7) 46,71, (C8) 37,91, (C9) 53,73, (C10) 41,26, (C11) 21,06, (C12) 39,44, (C13) 43,02, (C14) 55,79, (C15) 25,0, (C16) 23,88, (C17) 56,74, (C18) 12,01, (C19) 12,39, (C20) 35,24, (C21) 18,19, (C22) 30,67, (C23) 30,84, (C24) 179,2, (CH_3CO_2) 170,31, (CH_3CO_2) 21,39.

Síntesis de 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona (104)

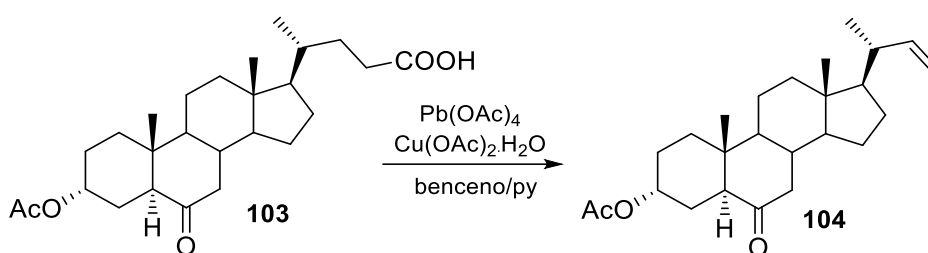


Figura 44. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **104**.

Se disolvió 4,0 g (9,25 mmol) del compuesto **103** (PM 432,60 gr/mol) en 150 mL de benceno previamente secado, manteniendo en agitación y condiciones de reflujo. Se agregó 0,29 g de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ (1,6 mmol) y 1,5 mL de py. Se mantuvo en reflujo por 1 h y se agregó 9,75 g de $\text{Pb}(\text{AcO})_4$ (22,0 mmoles) dividido en cuatro porciones, agregadas en un intervalo de 1 h cada una. El término de la reacción se monitoreó por CCF. La solución se dejó enfriar, lavó con H_2O destilada saturada en NaCl hasta obtener pH neutro. La fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anh., filtrada y secada en rotavapor. El producto crudo se diluyó en 10 mL de CH_2Cl_2 y separó por cromatografía en sílica gel (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (éter de petróleo: EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 $\rightarrow$ 15,8:4,2).

Compuesto 104:

Para la síntesis de 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona se obtuvo un rendimiento de 74,5 %.

Punto de fusión: 64,0-66,1°C

[α]D¹⁹: -21.2° (c: 2,36, MeOH)

IR ν_{max} (cm⁻¹): 3082 (CH=CH₂); 2946; 2909; 2868 y 2849 (C-H), 1740 (C=O), 1708 (C=O), 1637 (C=C), 1263 (C-O), 1021 (C-O), 988 (CH=CH₂), 926 (CH=CH₂)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 5,66 (ddd, J = 17,0; 10,2 y 8,4 Hz, 1H, H-22), 5,12 (m, 1H, H-3), 4,93 (dd, J = 17,0 y 1,8 Hz, 1H, H_{trans}-23), 4,83 (dd, J = 10,2 y 1,8 Hz, 1H, H_{cis}-23), 2,56 (dd, J = 12,1 y 3,2 Hz, 1H, H-5), 2,31 (dd, J = 13,1 y 4,5 Hz, 1H, H-7 α), 2,04 (s, 3H, CH₃CO), 1,04 (d, J = 6,6 Hz, 3H, H-21), 0,748 (s, 3H, H-19), 0,694 (s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ : (C1) 32,38, (C2) 28,19, (C3) 68,85, (C4) 25,27, (C5) 52,27, (C6) 211,81, (C7) 46,75, (C8) 37,92, (C9) 53,79, (C10) 41,28, (C11) 21,06, (C12) 39,36, (C13) 42,94, (C14) 55,41, (C15) 25,01, (C16) 23,91, (C17) 56,80, (C18) 12,18, (C19) 12,41, (C20) 41,10, (C21) 20,04, (C22) 144,89, (C23) 111,84, (CH₃CO₂) 170,26, (CH₃CO₂) 21,41.

EMAR (modo positivo): m/z calculado para C₂₅H₃₈O₃: 386,2821 [M]⁺; encontrado 387,2874 [M+1]⁺.

Síntesis de mezcla epimérica 22(R/S), 23-dihidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (108 y 109)

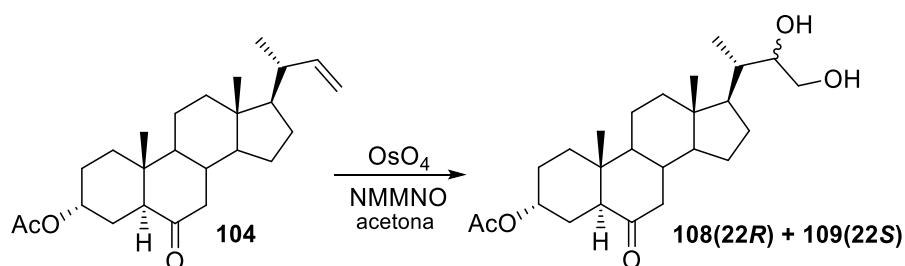


Figura 45. Esquema de síntesis y estructura de la mezcla epimérica de compuestos **108** y **109**.

Se disolvió 2,5 g (6,47 mmol) del compuesto **104** (PM 386,58 gr/mol) en 150 mL de acetona y se agregó 0,45 g de NMMNO (3,84 mmol). Posteriormente, a t.amb., se agregó a la mezcla 2,0 mL de una solución acuosa 4% de OsO_4 (0,210 mmol) por goteo lento. La agitación fue mantenida por 36 h. El término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción, se agregó 25 mL de H₂O y 25 mL de solución saturada de

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. La muestra fue extraída con EtOAc (2 x 30 mL), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto crudo se diluyó en 10 mL de CH_2Cl_2 y separó por cromatografía en sílica gel (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (éter de petróleo:EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 $\rightarrow$ 9,8:10,2).

Compuesto 108(22R) + 109(22S):

Para la síntesis de la mezcla epimérica 22(R/S),23-dihidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**108** + **109**) se obtuvo un rendimiento de 72,3 %. El compuesto **109** pudo ser purificado mediante recristalización (MeOH:Et₂O = 3:1), lográndose un rendimiento de 64,0%.

Punto de fusión: 250,1-253,8°C

[α]_D¹⁹: -7.41° (c: 5,40, CHCl_3)

IR ν_{max} (cm^{-1}): 3519 (O-H), 2941 y 2885 (C-H), 1732 (C=O), 1708 (C=O), 1278 (C-O), 1050 (C-O).

¹H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,11 (m, 1H, H-3), 3,79 (dt, J = 9,6 y 3,6 Hz, 1H, H-22), 3,64 (dd, J = 10,8 y 3,6 Hz, 1H, H-23 α), 3,51 (dd, J = 10,8 y 9,6 Hz, 1H, H-23 β), 2,55 (dd, J = 12,1 y 3,2 Hz, 1H, H-5), 2,31 (dd, J = 13,1 y 4,5 Hz, 1H, H-7 α), 2,03 (s, 3H, CH_3CO), 0,954 (d, J = 6,9 Hz, 3H, H-21), 0,735 (s, 3H, H-19), 0,675 (s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ : (C1) 32,17, (C2) 27,20, (C3) 68,70, (C4) 25,05, (C5) 52,38, (C6) 211,72, (C7) 46,49, (C8) 37,74, (C9) 52,68, (C10) 41,07, (C11) 20,87, (C12) 39,19, (C13) 43,16, (C14) 53,51, (C15) 24,78, (C16) 23,85, (C17) 56,15, (C18) 11,56, (C19) 12,20, (C20) 39,87, (C21) 12,86, (C22) 73,69, (C23) 62,22, (CH_3CO_2) 170,15, (CH_3CO_2) 21,21.

EMAR (modo negativo): m/z calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_5$: 420,2876 $[\text{M}]^+$; encontrado 419,2811 $[\text{M}-1]^+$.

Síntesis de 23-benzoiloxi-22S-hidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (110)

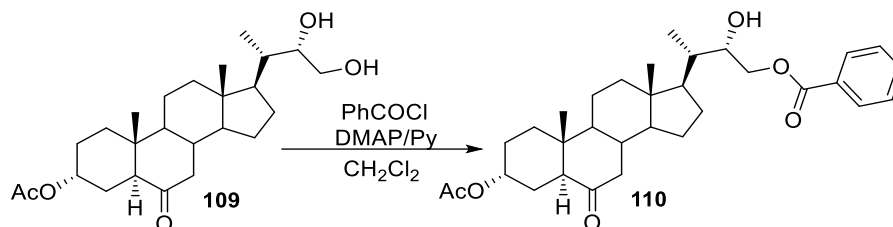


Figura 46. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **110**.

Se disolvió 0,5 g (1,19 mmol) del compuesto **109** (PM 406,61 gr/mol) en 25 mL de CH₂Cl₂, con 1,0 mL de py, 10 mg de DMAP y 0,5 mL de PhCOCl (4,30 mmol). El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción se redujo el volumen de la reacción a aproximadamente 10 mL y se agregó 20 mL de EtOAc. La fase orgánica fue lavada con solución KHSO₄ al 5% (2 x 5mL) y H₂O hasta obtener pH neutro (2 x 10 mL). la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto crudo se diluyó en 10 mL de CH₂Cl₂ y separó por cromatografía en sílica gel (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (éter de petróleo:EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 → 14,2:5,8).

Compuesto 110:

Para la síntesis de 23-benzoiloxi-22S-hidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**110**) se obtuvo un rendimiento de 93,8 %.

Punto de fusión: 210,5-211,7°C

[α]_D¹⁹: -17.1° (c: -1,75, CHCl₃)

IR ν_{max} (cm⁻¹): 3502 (O-H), 2951, 2936, 2893 y 2870 (C-H), 1730 (C=O), 1715 (C=O), 1693 (C=O), 1601 (C=C Ar), 1276 (C-O), 1070 (C-O), 716 (C-H Ar).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,05 (d, J = 7,4 Hz, 2H, HAr-2'), 7,58 (t, J = 7,4 Hz, 1H, HAr-4'), 7,46 (t, J = 7,4 Hz, 2H, HAr-3'), 5,12 (m, 1H, H-3), 4,50 (dd, J = 11,4 y 1,7 Hz, 1H, H-23 α), 4,20 (dd, J = 11,4 y 4,2 Hz, 1H, H-23 β), 4,06 (m, 1H, H-22), 2,57 (dd, J = 12,0 y 2,9

Hz, 1H, H-5), 2,32 (dd, $J = 13,1$ y $4,5$ Hz, 1H, H-7 α), 2,04 (s, 3H, CH₃CO), 1,06 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-21), 0,748 (s, 3H, H-19), 0,709 (s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ : (C1) 32,36, (C2) 27,41, (C3) 68,81, (C4) 25,26, (C5) 52,58, (C6) 211,62, (C7) 46,69, (C8) 37,90, (C9) 52,90, (C10) 41,23, (C11) 21,06, (C12) 39,41, (C13) 43,41, (C14) 53,72, (C15) 25,01, (C16) 24,02, (C17) 56,41, (C18) 11,81, (C19) 12,40, (C20) 40,33, (C21) 12,90, (C22) 71,77, (C23) 66,39, (CH₃CO₂) 170,27, (CH₃CO₂) 21,41, (CO₂-Ar) 167,01, (C1'-Ar) 129,86, (C2'-Ar) 129,63, (C3'-Ar) 128,45, (C4'-Ar) 133,22.

EMAR (modo positivo): m/z calculado para C₃₂H₄₄O₆: 524,3138 [M]⁺; encontrado 525,3186 [M + 1]⁺.

Síntesis de 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (84)

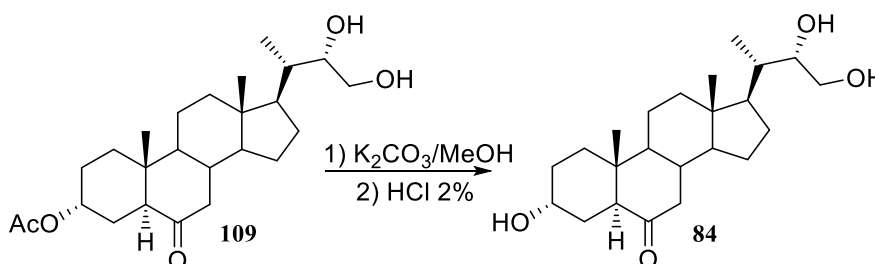


Figura 47. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **84**.

Se disolvió 1,0 mg (2,46 mmol) del compuesto **109** (PM 406,61 gr/mol) en 60 mL de CH₃OH, manteniendo en agitación suave y condiciones de reflujo. Se agregó 20 mL de solución de K₂CO₃ al 15% y se mantuvo las condiciones hasta el término de la reacción, indicado por CCF (3 h). La muestra se concentró en rotavapor hasta aproximadamente 20 mL. La solución fue lavada secuencialmente con solución HCl 10% (10 mL), solución NaHCO₃ (2 x 20 mL), H₂O (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor.

Compuesto 84:

Para la síntesis de 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**84**) se obtuvo un rendimiento de 97,0 %.

Punto de fusión: 227,0-229,1°C

[α]_D¹⁹: -3,67° (c: -2,73, MeOH)

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3387 (O-H), 2940, 2906 y 2871 (C-H), 1700 (C=O), 1246 (C-O), 1050 (C-O), 754 (CH).

¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ : 4,04-4,03 (m, 1H, H-3), 3,71 (dt, J = 8,9 y 3,2 Hz, 1H, H-22), 3,60 (dd, J = 11,3 y 2,7 Hz, 1H, H-23 α), 3,40 (dd, J = 11,3 y 8,9 Hz, 1H, H-23 β), 2,74 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H-5), 2,21 (dd, J = 13,1 y 4,8 Hz, 1H, H-7 β), 2,11 (t, J = 13,1 Hz, 1H, H-7 α), 2,04 (dt, J = 12,2 y 2,2 Hz, 1H, H-12 β), 0,943 (d, J = 6,9 Hz, 3H, H-21), 0,732 (s, 3H, H-19), 0,716 (s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ : (C1) 32,88, (C2) 28,73, (C3) 66,02, (C4) 28,53, (C5) 52,84, (C6) 214,49, (C7) 47,61, (C8) 39,45, (C9) 54,18, (C10) 42,62, (C11) 22,19, (C12) 40,76, (C13) 44,46, (C14) 55,08, (C15) 28,45, (C16) 25,07, (C17) 57,56, (C18) 12,14, (C19) 12,67, (C20) 42,01, (C21) 13,42, (C22) 75,19, (C23) 63,19.

EMAR (modo positivo): m/z calculado para C₂₉H₄₄O₇: 504,3087 [M]⁺; encontrado 505,3134 [M + 1]⁺.

Síntesis de 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 β -colan-6-ona (111**)**

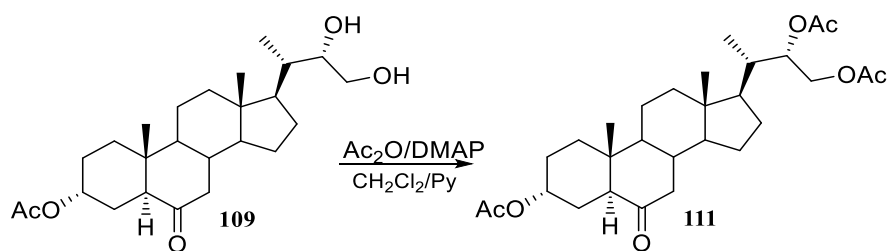


Figura 48. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **111**.

Se disolvió 2,0 g (4,76 mmol) de la mezcla de compuestos **109** (PM 406,61 gr/mol) en 30 mL de CH₂Cl₂ a t.amb. y con agitación constante. Se agregó 3,0 mL de py, 5,0 mg de

DMAP y 1 mL de Ac_2O . El término de la reacción se monitoreó por CCF (30 min). Una vez finalizada la reacción, la mezcla se lavó con 25 mL de solución acuosa HCl 2 % y extrajo la fase orgánica con EtOAc (2 x 25 mL). La muestra fue lavada con solución KHSO_4 al 5% (2 x 10 mL) y H_2O (2 x 10 mL). la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto crudo se diluyó en 10 mL de CH_2Cl_2 y separó por cromatografía en sílica gel (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (éter de petróleo:EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 $\rightarrow$ 11,8:8,2).

Compuesto 111:

Para la síntesis de 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 β -colan-6-ona (**111**) se obtuvo un rendimiento de 97,0 %.

Punto de fusión: 136,1-137,6°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{19}$: +2,53° (c: 3,95, CHCl_3)

IR ν_{max} (cm^{-1}): 2945, 2908 y 2871 (C-H), 1737 (C=O), 1711 (C=O), 1369 (CH₃), 1242 (C-O), 1224 (C-O), 1051 (C-O), 757 (C-H).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,10-5,09 (m, 2H, H-3 y H-22), 4,31 (dd, J = 11,9 y 1,9 Hz, 1H, H-23 α), 3,99 (dd, J = 11,9 y 9,4 Hz, 1H, H-23 β), 2,54 (dd, J = 12,1 y 3,1 Hz, 1H, H-5), 2,30 (dd, J = 13,1 y 4,4 Hz, 1H, H-7 β), 2,06 (s, 3H, AcO), 2,04 (s, 3H, AcO), 2,03 (s, 3H, AcO), 0,973 (d, J = 7,0 Hz, 3H, H-21), 0,723 (s, 3H, H-19), 0,651 (s, 3H, H-18).

^{13}C RMN δ : (C1) 32,35, (C2) 27,01, (C3) 68,79, (C4) 25,24, (C5) 52,55, (C6) 211,49, (C7) 46,63, (C8) 37,85, (C9) 52,84, (C10) 41,18, (C11) 21,03, (C12) 39,38, (C13) 43,39, (C14) 53,67, (C15) 24,98, (C16) 23,94, (C17) 56,37, (C18) 11,81, (C19) 12,38, (C20) 38,32, (C21) 13,37, (C22) 73,97, (C23) 62,69, (CH_3CO_2 -C3) 171,09, (CH_3CO_2 -C3) 21,39, (CH_3CO_2 -C22) 170,42, (CH_3CO_2 -C22) 21,23, (CH_3CO_2 -C23) 170,25, (CH_3CO_2 -C23) 20,86.

EMAR (modo positivo): m/z calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_7$: 504,3087 $[\text{M}]^+$; encontrado 505,3134 $[\text{M} + 1]^+$.

Síntesis de 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (112) y 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-6-oxalactona (113)

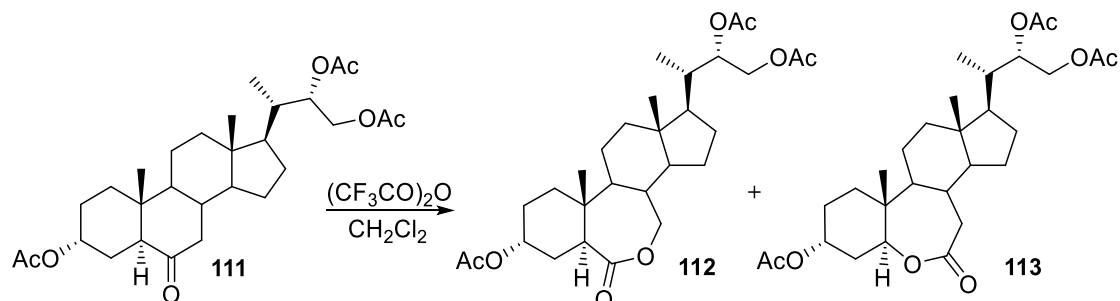


Figura 49. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **112** y **113**.

Para la preparación de la solución oxidante, 1,20 mL de $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ (8,52 mmol) fue diluida en 3 mL de CHCl_3 a 0 °C. Se agregó a la mezcla 1,0 mL de H_2O_2 (30%) (9,77 mmol) muy lentamente, procurando mantener la temperatura y en agitación suave por 30 minutos. La mezcla oxidante (3,0 mL) fue agregada sobre una solución de compuesto **111** (1,0 g, 1,98 mmol en 10 mL de CHCl_3) a 0 °C y ambiente de N_2 por 24 h. El fin de la reacción fue monitoreada por CCF. La mezcla fue filtrada y concentrada en rotavapor a un volumen aproximado de 10 mL. Se agregó 40 mL de EtO_2 y luego la mezcla fue lavada con una solución saturada de NaHCO_3 (2 x 20 mL) y luego con H_2O (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto crudo se diluyó en 10 mL de CH_2Cl_2 y separó por cromatografía en sílica gel (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (hexano:EtOAc) en polaridad creciente (0,2:50,0 $\rightarrow$ 23,8:26,2).

Compuesto 112:

Para la síntesis de 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (**112**) se obtuvo un rendimiento de 35,2 %.

Punto de fusión: 90,3-91,8°C

[α] D^{19} : +50,9° (c: 4,13, CHCl_3)

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 2965, 2946, 2909 y 2872 (C-H), 1735 (C=O), 1438 (C-H), 1368 (CH₃), 1242 (C-O), 1182 (C-O), 1052 (C-O), 754 (C-H).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 5,11-5,09 (m, 2H, H-3 y H-22), 4,32 (dd, J = 11,9 y 1,9 Hz, 1H, H-23 α), 4,13-4,04 (m, 2H, H-7 α y H-7 β), 3,99 (dd, J = 11,9 y 9,4 Hz, 1H, H-23 β), 3,03 (dd, J = 12,2 y 4,3 Hz, 1H, H-5), 2,08 (ddd, J = 16,2, 12,2 y 2,70 Hz, 1H, H-4 β), 2,08 (s, 6H, AcO), 2,05 (s, 3H, AcO), 0,979 (d, J = 6,8 Hz, 3H, H-21), 0,897 (s, 3H, H-19), 0,701 (s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ : (C1) 33,66, (C2) 26,95, (C3) 68,38, (C4) 29,74, (C5) 42,57, (C6) 175,97, (C7) 70,31, (C8) 39,42, (C9) 58,31, (C10) 36,14, (C11) 22,10, (C12) 39,53, (C13) 43,03, (C14) 52,80, (C15) 25,13, (C16) 24,83, (C17) 51,10, (C18) 11,57, (C19) 14,54, (C20) 38,32, (C21) 13,28, (C22) 73,80, (C23) 62,30, (CH₃CO₂-C3) 171,07, (CH₃CO₂-C3) 21,36, (CH₃CO₂-C22) 170,40, (CH₃CO₂-C22) 21,21, (CH₃CO₂-C23) 170,28, (CH₃CO₂-C23) 20,86.

EMAR (modo positivo): m/z calculado para C₂₉H₄₄O₈: 520,3036 [M]⁺; encontrado 521,3085 [M + 1]⁺.

Compuesto 113:

Para la síntesis de 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-6-oxalactona (**113**) se obtuvo un rendimiento de 14,1 %.

Punto de fusión: 169,9-170,8°C

[α]_D¹⁹: +61,4° (c: 0,44, MeOH)

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 2965, 2949 y 2871 (C-H), 1743 (C=O), 1736 (C=O), 1725 (C=O), 1445 (C-H), 1368 (CH₃), 1258 (C-O), 1239 (C-O), 1225 (C-O), 1044 (C-O), 1022 (C-O), 754 (C-H).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 5,14-5,09 (m, 2H, H-3 y H-22), 4,46 (dd, J = 11,3 y 5,3 Hz, 1H, H-5), 4,32 (dd, J = 12,0 y 2,0 Hz, 1H, H-23 α), 3,99 (dd, J = 12,0 y 9,4 Hz, 1H, H-23 β), 2,55-2,43 (m, 2H, H-7 α y H-7 β), 2,07 (s, 6H, AcO), 2,05 (s, 3H, AcO), 0,971 (d, J = 6,9 Hz, 3H, H-21), 0,901 (s, 3H, H-19), 0,695 (s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ : (C1) 31,84, (C2) 26,65, (C3) 69,56, (C4) 32,95, (C5) 79,68, (C6) 174,64, (C7) 38,12, (C8) 38,31, (C9) 57,97, (C10) 39,55, (C11) 22,17, (C12) 39,69, (C13) 43,09, (C14) 55,13, (C15) 25,33, (C16) 24,83, (C17) 53,14, (C18) 11,59, (C19) 11,58, (C20) 34,78, (C21)

13,29, (C22) 73,80, (C23) 62,35, (CH₃CO₂-C3) 171,12, (CH₃CO₂-C3) 21,32, (CH₃CO₂-C22) 170,41, (CH₃CO₂-C22) 21,24, (CH₃CO₂-C23) 170,17, (CH₃CO₂-C23) 20,88.

EMAR (modo positivo): m/z calculado para C₂₉H₄₄O₈: 520,3036 [M]⁺; encontrado 521,3082 [M + 1]⁺.

Síntesis de 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (86)

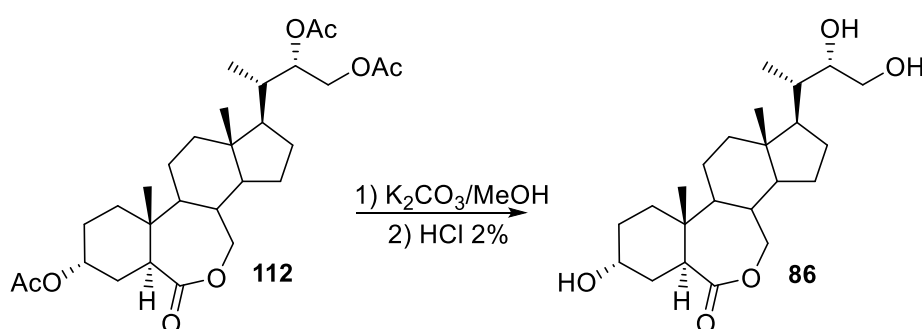


Figura 50. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **86**.

Se disolvió 0,1 g (0,288 mmol) del compuesto **112** (PM 386,58 gr/mol) en 20 mL de CH₃OH, manteniendo en agitación suave y condiciones de reflujo. Se agregó 20 mL de solución de K₂CO₃ al 15% y se mantuvo las condiciones hasta el término de la reacción, indicado por CCF (3 h). La muestra se concentró en rotavapor hasta aproximadamente 20 mL. La solución fue lavada secuencialmente con solución HCl 10% (10 mL), solución NaHCO₃ (2 x 20 mL), H₂O (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor.

Compuesto 86:

Para la síntesis de 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (**86**) se obtuvo un rendimiento de 86,0 %.

Punto de fusión: 91,8-94,5°C

[α]_D¹⁹: +54,2° (c: 2,95, MeOH)

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 3400 (O-H); 2959; 2941; 2902 y 2870 (C-H); 1709 (C=O); 1315 (C-H); 1249 (C-O); 1183 (C-O), 1065 (C-O); 1048 (C-O), 753 (C-H).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,19-4,15 (m, H-3), 4,08-4,07 (m, 2H, H-7 α y H-7 β), 3,79 (dt, $J = 9,3$ y $3,1$ Hz, 1H, H-22), 3,64 (dd, $J = 11,0$ y $2,8$ Hz, 1H, H-23 α), 3,52 (dd, $J = 11,0$ y $9,4$ Hz, 1H, H-23 β), 3,17 (dd, $J = 12,3$ y $4,4$ Hz, 1H, H-5), 2,13 (ddd, $J = 13,7$, $12,4$ y $2,7$ Hz, 1H, H-4 β), 1,98 (dt, $J = 12,6$ y $3,3$ Hz, 1H, H-12 α), 0,950 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-21), 0,888 (s, 3H, H-19), 0,710 (s, 3H, H-18).

^{13}C RMN δ : (C1) 32,78, (C2) 24,84, (C3) 64,32, (C4) 32,50, (C5) 41,67, (C6) 177,44, (C7) 70,43, (C8) 39,54, (C9) 58,15, (C10) 36,17, (C11) 22,03, (C12) 40,03, (C13) 42,91, (C14) 52,70, (C15) 27,87, (C16) 27,20, (C17) 50,98, (C18) 11,41, (C19) 14,39, (C20) 39,33, (C21) 12,77, (C22) 73,57, (C23) 62,08.

EMAR (modo positivo): m/z calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_5$: 394,2719 $[\text{M}]^+$; encontrado 395,2771 $[\text{M} + 1]^+$.

Síntesis de 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-oxalactona (87)

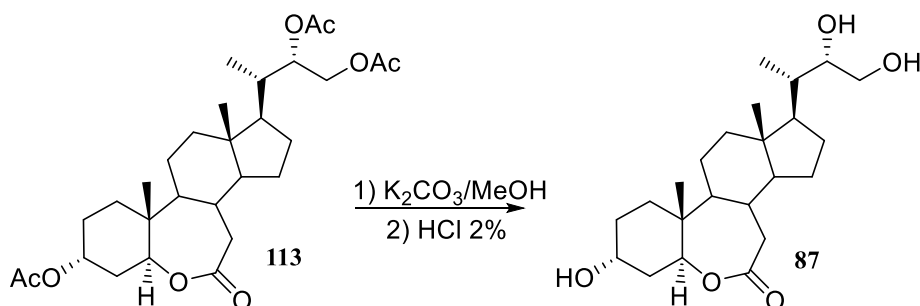


Figura 51. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **87**.

Se disolvió 0,1 g (0,288 mmol) del compuesto **113** (PM 386,58 gr/mol) en 20 mL de CH_3OH , manteniendo en agitación suave y condiciones de reflujo. Se agregó 20 mL de solución de K_2CO_3 al 15% y se mantuvo las condiciones hasta el término de la reacción, indicado por CCF (3 h). La muestra se concentró en rotavapor hasta aproximadamente 20 mL. La solución fue lavada secuencialmente con solución HCl 10% (10 mL), solución

NaHCO₃ (2 x 20 mL), H₂O (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor.

Compuesto 87:

Para la síntesis de 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-oxalactona (**87**) se obtuvo un rendimiento de 81,0 %.

Punto de fusión: 227,4-229,5°C

[α]_D¹⁹: +27,1° (c: 1,48, MeOH)

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3386 (O-H); 2942; 2889; 2869 y 2851 (C-H); 1710 (C=O); 1278 (C-O); 1038 (C-O); 751 (C-H).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4,60 (dd, J = 11,3 y 5,3 Hz, 1H, H-5), 4,23-4,21 (m, 1H, H-3), 3,79 (dt, J = 9,4 y 3,1 Hz, 1H, H-22), 3,64 (dd, J = 10,9 y 2,6 Hz, 1H, H-23 α), 3,50 (dd, J = 10,9 y 9,4 Hz, 1H, H-23 β), 2,53-2,43 (m, 2H, H-7 α y H-7 β), 0,944 (d, J = 6,9 Hz, 3H, H-21), 0,892 (s, 3H, H-19), 0,701 (s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ : (C1) 31,06, (C2) 25,25, (C3) 65,60, (C4) 35,39, (C5) 80,04, (C6) 176,08, (C7) 37,88, (C8) 39,89, (C9) 57,77, (C10) 39,64, (C11) 22,02, (C12) 39,48, (C13) 42,91, (C14) 54,94, (C15) 27,46, (C16) 26,76, (C17) 52,97, (C18) 11,32, (C19) 11,32, (C20) 34,77, (C21) 12,66, (C22) 73,50, (C23) 62,02.

EMAR (modo negativo): m/z calculado para C₂₃H₃₈O₅: 394,2719 [M]⁺; encontrado 393,2652 [M - 1]⁺.

Síntesis de 3 α -acetoxi, 22(S)-23-epoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**106**) y 3 α -acetoxi, 22(R)-23-epoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**107**)

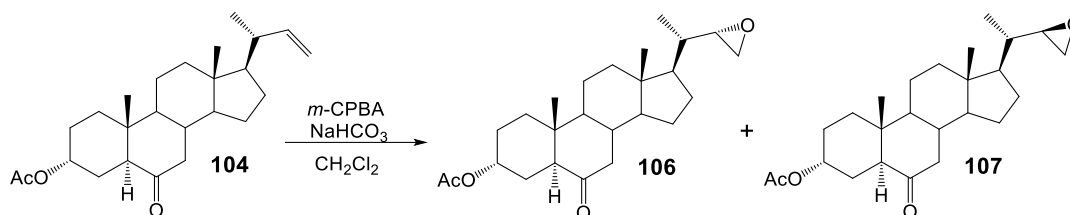


Figura 52. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **106** y **107**.

Se disolvió 1,874 g del alqueno **104** en 100 mL de CH₂Cl₂, luego se agregó 368 mg de NaHCO₃ y 892 mg de *m*-CPBA. La mezcla se dejó en agitación por 48 horas (indicado por CCF). Posteriormente la mezcla de reacción fue filtrada al vacío y la solución resultante fue concentrada por destilación en rotavapor. El residuo se disolvió en EtOAc (50 mL) y la solución se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 mL), posteriormente con agua (3 x 10 mL). La fase orgánica fue secada sobre NaSO₄ y el solvente fue removido por destilación en rotavapor. El residuo fue disuelto en 5 mL de CH₂Cl₂ y mezclado con sílica fina y purificado por CC. Se aisló la mezcla de epóxidos cristalinos (1,04 g, 55,7%).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) (mezcla **106/107**): 2944; (C-H); 2870 (C-H), 1741 (C=O); 1708 (C=O); 1462 (CH₂); 1446 (CH₂); 1380 (CH₃); 1364 (CH₃); 1251 (C-O); 1035 (C-O); 1020 (C-O).

Compuesto 106: 3 α -acetoxi, 22(S)-23-epoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 5,13-5,11(m, 1H, H-3), 2,64 (dd, *J* = 4,1 y 5,1 Hz, 1H, H-23 β), 2,63 (ddd, *J* = 2,8, 4,1 y 6,9 Hz, 1H, H-22), 2,40 (dd, *J* = 2,8 y 5,1 Hz, 1H, H-23 α), 2,56 (dd, *J* = 2,1 y 12,7 Hz, 1H, H-5), 2,33 (dd, *J* = 4,6 y 13,2 Hz, 1H, H-7 α), 2,03 (s, 3H, CH₃CO), 0,970 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, H-21), 0,744 (s, 3H, H-19), 0,667 (s, 3H, H-18). **¹³C RMN** δ : (C1) 32,45, (C2) 27,06, (C3) 68,83, (C4) 25,26, (C5) 52,59, (C6) 211,63, (C7) 46,72, (C8) 37,93, (C9) 53,78, (C10) 41,26, (C11) 21,06 (C12) 39,31, (C13) 41,26, (C14) 55,99, (C15) 25,00, (C16) 24,14, (C17) 56,39, (C18) 12,17, (C19) 12,40, (C20) 39,31, (C21) 15,61, (C22) 57,03, (C23) 44,78, (CH₃CO₂) 170,23, (CH₃CO₂) 21,40.

Compuesto 107: 3 α -acetoxi, 22(R)-23-epoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 5,13-5,11(m, 1H, H-3), 2,80 (dd, *J* = 3,8 y 4,8 Hz, 1H, H-23 β), 2,73 (ddd, *J* = 2,5, 3,8 y 6,5 Hz, 1H, H-22), 2,59 (dd, *J* = 2,7 y 4,8 Hz, 1H, H-23 α), 2,56 (dd, *J* = 2,1 y 12,7 Hz, 1H, H-5), 2,32 (dd, *J* = 4,6 y 13,3 Hz, 1H, H-7 α), 2,03 (s, 3H, CH₃CO), 1,11 (d, *J* = 5,6 Hz, 3H, H-21), 0,744 (s, 3H, H-19), 0,659 (s, 3H, H-18). **¹³C RMN** δ : (C1) 32,45,

(C2) 27,06, (C3) 68,83, (C4) 25,26, (C5) 52,59, (C6) 211,61, (C7) 46,71, (C8) 37,91, (C9) 53,83, (C10) 41,26, (C11) 21,03 (C12) 39,44, (C13) 41,26, (C14) 55,94, (C15) 25,00, (C16) 24,01, (C17) 56,34, (C18) 12,12, (C19) 12,40, (C20) 39,22, (C21) 16,82, (C22) 57,26, (C23) 48,99, (CH₃CO₂) 170,23, (CH₃CO₂) 21,40.

Materiales y métodos usados en la evaluación de la actividad antifúngica de los análogos de brasinoesteroides frente al hongo *Botrytis cinerea* in vitro

El estudio de los efectos de los nuevos análogos de BRs sobre la propagación de *Botrytis cinerea* in vitro se llevaron a cabo bajo la dirección de la Dra. Katy Díaz Peralta, en el Laboratorio de Pruebas Biológicas, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

La cepa de *Botrytis cinerea* fue aislada desde frutos de vid infectados naturalmente (*Vitis vinifera*) y se mantuvo en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA; Difco, Detroit, MI, EE. UU.) a 4 °C. El inóculo del patógeno fue cultivado en PDA bajo fotoperíodos de 16h luz/ 8h oscuridad a 23 °C durante 5 días.

Las actividades antifúngicas de los compuestos, así como el control negativo (C-) y el control positivo (C+, fungicida comercial Captan®), fueron evaluados utilizando la técnica de prueba de crecimiento radial en medio de PDA. Todos los compuestos ensayados se disolvieron en etanol al 1% en H₂O, y fueron añadidos en diferentes cantidades para obtener concentraciones finales de 50, 100, 150 y 300 ppm en medio PDA. El control negativo contiene sólo medio PDA que contiene etanol al 1%, mientras que el control positivo es medio PDA que incluye el fungicida comercial Captan® a la misma concentración especificada para los compuestos de interés. Un disco (4 mm) de micelio de 5 días de crecimiento del patógeno en medio PDA se colocó en el centro de la placa Petri con medio PDA con o sin la adición del análogo de BRs. Posteriormente, se incubaron en condiciones controladas de temperatura a 23 °C y fotoperiodo 16 h luz / 8h durante 72 h. El porcentaje de inhibición se determinó para cada compuesto mediante la medición del halo de crecimiento del hongo en presencia del análogo de BRs con respecto al control negativo. Se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial para cada compuesto en comparación con el control negativo. Todos los tratamientos se realizaron de forma independiente en triplicado.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Área del halo control negativo (mm}^2\text{)} - \text{Área del halo compuesto (mm}^2\text{)}}{\text{Área del halo control negativo (mm}^2\text{)}} \times 100$$

Materiales y métodos usados en la evaluación de la actividad de promoción de crecimiento vegetal de los análogos de brasinoesteroides

Los estudios de evaluación de la actividad de promoción de crecimiento vegetal de los nuevos análogos de BRs se llevaron a cabo bajo la dirección de la Dra. Katy Díaz Peralta, en el Laboratorio de Pruebas Biológicas, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

El test de inclinación de la lámina de arroz (RLIT) utiliza el segmento del segundo internodo de la lámina de acuerdo a la metodología descrita por Wada *et al.* (1981) [107] con modificaciones menores de Duran *et al.* (2017) [108]. Después de remojar las semillas de un cultivar de arroz (*Oryza sativa*) cv. Zafiro (facilitado por el Instituto Nacional de Investigación Agrícola (INIA)) durante 24 h en H₂O destilada, se cultivaron en macetas (10 cm de longitud x 15 cm de diámetro) con sustrato + vermiculita + perlita (en la proporción 2: 1: 1) en el interior de una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de fotoperiodo, 16 h día con una densidad de flujo de fotones máxima de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (22 °C) / 8 h noche (20 °C), con 50-60% de humedad relativa. Se seleccionaron plántulas uniformes y se cortaron segmentos de hojas de aproximadamente 8 cm, que consistían en el segundo internodo de la lámina de la hoja. Para cada tratamiento, cuatro de estos segmentos previamente se incubaron en 60 ml de solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%) durante 24 h dentro de una placa petri para posteriormente agregar una cantidad finita (1×10^{-6} , 1×10^{-7} y 1×10^{-8} M) de la muestra de prueba (análogos de BRs: **84**, **86**, **87**, **109**, **111**, **112**, **113**) y usando brasinólido (**BL**) como control positivo. El brasinólido, utilizada como control positivo, se adquirió en Sigma Chemical Co., St. Louis. Estados Unidos. El control negativo contiene sólo solución

salina fisiológica. Después de incubar durante 48 h a 25 °C en oscuridad, se midió la magnitud del ángulo de apertura entre la hoja y la vaina con un transportador. Las imágenes se tomaron usando un microscopio estereoscópico Leica EZ4HD con software de cámara. Esta prueba se realizó dos veces para cada tratamiento. Los resultados fueron expresados como el ángulo medido promedio $\pm$ su desviación estándar.

Materiales y métodos usados en la evaluación de la actividad antineoplásica de los análogos de brasinoesteroides

Las distintas evaluaciones de los efectos de los nuevos análogos de BRs sobre líneas celulares de carcinoma humano se llevaron a cabo gracias al Dr. Joan Villena García, en el Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Chile.

Las distintas líneas celulares están disponibles gracias al Dr. Joan Villena (Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso). En el siguiente esquema se muestran las distintas líneas celulares utilizadas en este trabajo. Estas se presentan según American Type Culture Collection con su correspondiente código de ATCC.

Tabla 3. Líneas celulares humanas (tumoraes y no tumoral) utilizadas en esta investigación. (Códigos de acceso ATCC)

Líneas celulares humanas evaluadas con los análogos sintéticos de brasinoesteroides	
Línea celular: PC-3	Línea celular: HT-29
Código ATCC: CRL-1435	Código ATCC: HTB-38
Organismo: Homo sapiens (humano)	Organismo: Homo sapiens (humano)
Tipo celular: Epitelial	Tipo celular: Epitelial
Tejido: Próstata	Tejido: Colon
Enfermedad: Cáncer prostático	Enfermedad: Cáncer colorrectal

Línea celular: MCF7	Línea celular: CCD-841 (CoN)
Código ATCC: HTB-22	Código ATCC: CRL-1790
Organismo: Homo sapiens (humano)	Organismo: Homo sapiens (humano)
Tipo celular: Epitelial	Tipo celular: Epitelial
Tejido: Glándula mamaria	Tejido: Colon
Enfermedad: Cáncer de pecho	Enfermedad: Tejido normal (no tumoral)

La tabla muestra las distintas líneas utilizadas, presentadas según American Type Culture Collection con su correspondiente código de acceso ATCC. Fuente: "ATCC Cell Lines." (n.d.). Revisado el 01 de marzo de 2017, desde https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx

Cuantificación de citotoxicidad mediante método de tinción con SRB

La citotoxicidad de un compuesto es determinada a través de la cuantificación de viabilidad celular, mediante un ensayo colorimétrico con Sulforodamina B (SRB). La sulforodamina B es un colorante de aminoxantano que en condiciones ácidas aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas en placa. Así los valores de absorbancia se corresponden directamente con los niveles de supervivencia celular, dado que las células muertas pierden su adherencia y no quedan fijadas. El ensayo colorimétrico fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Skehan *et al.* (1990) [124] con modificaciones de Vichai y Kirtikara (2006) [125]. Primeramente, se preparó una solución madre de cada compuesto en DMSO a una concentración de 100 mM, a partir de esta concentración mayor se prepararon concentraciones menores de trabajo de 1 mM en H₂O destilada. Las células de cada línea celular fueron sembradas en placas de 96 pocillos en 100 µL de medio de DMEM/F-12 a una concentración de 5x10³ células por pocillo, y luego se dejaron crecer en esas condiciones durante 18-24h. Posteriormente se agregó alícuotas de soluciones de los análogos de BRs en H₂O destilada (a una concentración final de Etanol al 1%) para obtener concentraciones finales de los compuestos de 25, 50 y 100 µM en cada pocillo. Después de la exposición de 72 h, las células fueron fijadas agregando 50 µL/pocillo de una solución de ácido tricloroacético al 50% (p/v), posteriormente se incubó durante 60 minutos a 4 °C. Las placas fueron lavadas con H₂O destilada tres veces y secadas a t.amb. Una vez secas, se agregó una solución de SRB (50

μL de solución SRB 0,1% p/v en ácido acético 1%) a cada pocillo y se incubó por 30 minutos a t.amb. La SRB no unida se removió mediante tres lavados con ácido acético al 1%. Una vez secas las placas, el colorante unido se diluyó con Tris-base (100 μL , 10mM) y se procedió a determinar la densidad óptica en un espectrofotómetro con lector de placa automatizado (tipo ELISA) a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados fueron divididos por el valor obtenido para el control con etanol y libre de compuestos, este resultado multiplicado por cien corresponde al porcentaje normalizado de viabilidad celular. Los datos fueron graficados como el promedio del porcentaje de viabilidad celular $\pm$ su desviación estándar (DS). Todos los tratamientos se realizaron independientemente y por triplicado. La concentración citotóxica media (IC_{50}) se determinó por análisis de regresión lineal para las 3 concentraciones estudiadas, aceptando $r > 0,9$. El índice de selectividad fue calculado mediante la razón entre el IC_{50} calculado para cada línea celular tumoral y el IC_{50} de la línea celular control (IC_{50} Línea control/ IC_{50} Línea tumoral). Para el análisis de significancia estadística se realizó el test ANOVA a dos vías con $p < 0.001$ usando el software OriginPro 2018 SR1 v9.5.1 de OriginLab®.

CAPÍTULO 4 – Resultados y discusiones

Resultados y discusiones de la síntesis de los análogos de brasinoesteroides

La estrategia de síntesis comienza con la protección del ácido hiodesoxicólico (**53**), lo cual se logró mediante la reacción de esterificación de Fischer, con CH_3OH y H_2SO_4 como catalizador, de acuerdo a lo reportado para la obtención del éster metílico (**90**) [91]–[94], [109] obteniendo un 98% de rendimiento (Figura 31). En el espectro de ^1H RMN se observó la señal del grupo CH_3O a $\delta_{\text{H}} = 3,66$ ppm, que fue comprobada por ^{13}C RMN al observar la presencia de dos señales a $\delta_{\text{C}} = 174,71$ ppm ($\text{CH}_3\text{O}\text{C}\text{O}$) y $\delta_{\text{C}} = 51,48$ ppm (CH_3O).

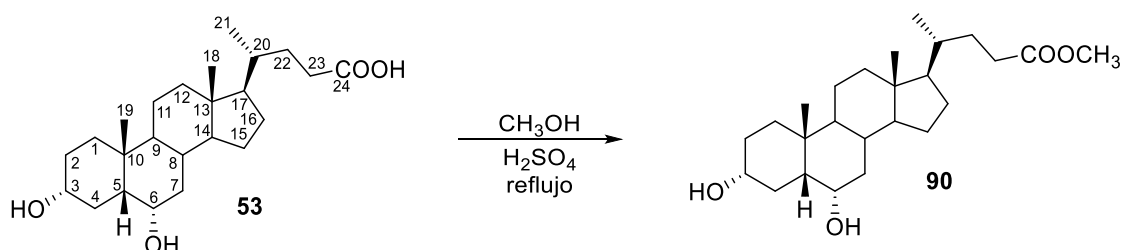


Figura 31. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **90**

Posteriormente, el siguiente paso de síntesis consistió en la oxidación selectiva del grupo hidroxilo de la posición 6α , para lo cual se pensó en proteger el grupo hidroxilo de la posición 3α , y posterior oxidación, de acuerdo a protocolos desarrollados para otros ácidos biliares [95], [96], [110]. De esta forma el compuesto **90** fue tratado con cloroformiato de etilo, obteniéndose los derivados **91** y **92** (Figura 32) con rendimientos de 8,1 y 41,2%, respectivamente. Sin embargo, no se logró proteger selectivamente la posición 3α .

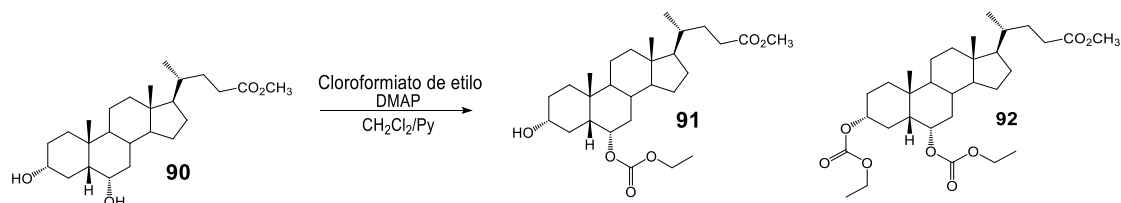


Figura 32. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **91** y **92**

Evidencia espectroscópica de ^1H RMN, muestra que para el compuesto **91** la señal asignada al H-6 β (observada a $\delta_{\text{H}} = 4,05$ ppm en el compuesto **90**) se desplazó a campo bajo con $\delta_{\text{H}} = 4,85$ ppm (ddd, $J = 4,8, 7,3$ y $12,1$ Hz) y que para el H-3 β (observada a $\delta_{\text{H}} = 3,62$ ppm en el compuesto **90**) se observó a $\delta_{\text{H}} = 3,47$ ppm en el compuesto **91** (no hay cambio importante de desplazamiento químico para esta señal) lo que indica que el grupo hidroxilo protegido fue el de la posición 6 β . Además, se confirma la incorporación del grupo formiato de etilo por las señales observadas en el espectro de ^1H RMN a $\delta_{\text{H}} = 4,04$ (q, $J = 7,0$ Hz, 2H) y $1,34$ (t, $J = 7,0$ Hz, 3H) ppm asignadas al grupo $\text{O-CH}_2\text{CH}_3$, respectivamente. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN, la presencia de señales a $\delta_{\text{C}} = 154,51, 68,65$ y $21,19$ ppm confirman la presencia de los carbonos correspondientes al grupo $\text{CO}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_3$.

De forma similar, el derivado diprotegido **92**, fue confirmado por la presencia de las señales en el espectro de ^1H RMN a $\delta_{\text{H}} = 4,96$ y $4,55$ ppm que fueron asignadas a los hidrógenos H-6 β y H-3 β , respectivamente. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN se observaron señales a $\delta_{\text{C}} = 154,51, 70,55$ y $21,34$ ppm y a $\delta_{\text{C}} = 154,62, 71,72$ y $21,31$ ppm, las cuales fueron asignadas a los grupos $\text{CO}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_3$ de las posiciones C-3 y C-6, respectivamente.

Debido a que no se logró el objetivo de proteger selectivamente el grupo hidroxilo de la posición C-3, se intentó cambiar el grupo protector por un grupo de mayor tamaño, para lo cual se realizó la reacción con cloruro de benzoílo, de acuerdo a lo indicado en la Figura 33 y a antecedentes reportados para esteroides de estructura similar [111]. En este caso, se obtuvieron los derivados dibenzoilado **93** y monobenzoilado **94**, con rendimientos de $40,6$ y $16,9\%$ respectivamente. Si bien, se logró proteger selectivamente la posición C-3 en el derivado **94**, el rendimiento obtenido fue bajo.

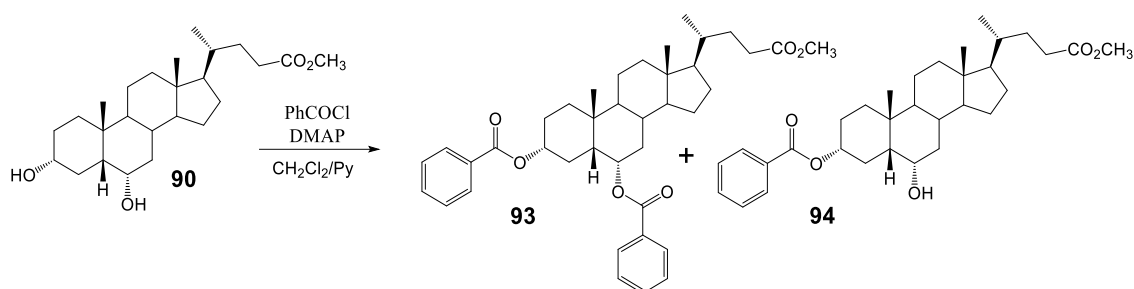


Figura 33. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **93** y **94**.

La caracterización espectroscópica del derivado **93** fue determinada por datos obtenidos desde el espectro de ^1H RMN, donde se observaron señales a $\delta_{\text{H}} = 8,08, 8,02, 7,54$ y $7,42$ ppm correspondientes a los hidrógenos de ambos sistemas aromáticos. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN se observaron señales a $\delta_{\text{C}} = 130,62, 129,31, 128,18, 132,76, 128,18, 129,31, 131,14, 129,62, 128,42, 132,78, 128,42$ y $129,62$ ppm, correspondientes a los carbonos de ambos sistemas aromáticos. Además, se confirma la presencia de ambos grupos carbonilos de los ésteres aromáticos a $\delta_{\text{C}} = 166,45$ y $166,67$ ppm correspondientes a $\text{ArCO}_2\text{-C3}$ y $\text{ArCO}_2\text{-C6}$. Mientras que un análisis similar para el derivado **94**, muestra señales a $\delta_{\text{C}} = 8,03, 7,54$ y $7,42$ ppm asignados a los hidrógenos H-1, H-4 y H-3 del sistema aromático. Por otro lado, se observó un evidente desplazamiento a campo bajo de la señal de H-3 β desde $\delta_{\text{H}} = 3,62$ ppm en el compuesto **90** a $\delta_{\text{H}} = 4,97$ ppm en el compuesto **94**. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN se observaron señales a $\delta_{\text{C}} = 130,82, 129,51, 128,23, 133,69, 128,23$ y $129,51$ ppm, asignadas a los carbonos del anillo aromático C1-Ar, C2/C6-Ar, C3/C5-Ar, C4-Ar. Por otro lado, el carbono del grupo éster del anillo fue observado a $\delta_{\text{C}} = 166,05$ ppm.

Luego de los intentos infructuosos de proteger selectivamente el grupo hidroxilo en posición C3- α , se tomó la decisión de oxidar directamente el compuesto **90**. Antecedentes para esta reacción reportan la oxidación regioselectiva del derivado metilado **90**, con PCC o PDC y que esta produce la dicetona **95** y el derivado deseado **97** en una relación aproximada de 1:3 respectivamente [101]. Sin embargo, al realizar la oxidación con PCC utilizando acetona como solvente (Figura 34), se obtuvo el derivado dioxidado **95** con 78,6%.

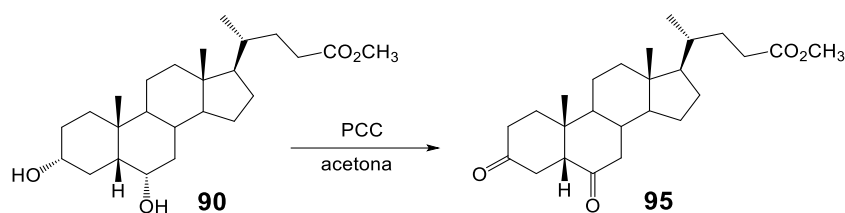


Figura 34. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **95**.

El compuesto **95** fue caracterizado principalmente por espectroscopía de ^{13}C RMN, donde las señales observadas a $\delta_{\text{C}} = 208,58$ y $210,75$ ppm fueron asignadas a los carbonos C-3 y C-6, respectivamente. La detección de un artefacto dimetoxilado en C-3 **96** fue determinado por la observación de dos señales a $\delta_{\text{H}} = 3,65$ (s, 3H, OCH_3) y $3,18$ (s, 3H, OCH_3) ppm asignadas a los grupos metoxilos geminales en C-3. Adicionalmente, en el espectro de ^{13}C RMN, los carbonos de los grupos metoxilos fueron observados a $\delta_{\text{C}} = 47,63$ y $47,46$ ppm.

Considerando que no fue posible obtener por este método el compuesto monooxidado deseado **97**, se realizó la oxidación de Jones de acuerdo con lo indicado en la Figura 35. En este caso, el compuesto dioxidado **95** se obtuvo con 19,4% de rendimiento, mientras que el compuesto monooxidado deseado **97**, se logró obtener con 55,6% de rendimiento.

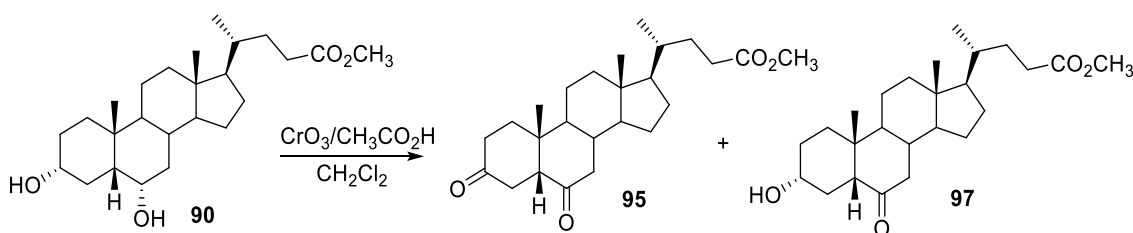


Figura 35. Esquema de síntesis y estructura de los compuestos **95** y **97**.

Los datos espectroscópicos para el compuesto **95**, fueron consistentes con los observados para este derivado obtenido en el procedimiento anterior. Mientras que el compuesto de interés **97**, fue caracterizado principalmente por la señal a $\delta_{\text{H}} = 3,62$ ppm

(m, 1H) asignada al H-3 en el espectro de ^1H RMN y las señales a $\delta_{\text{C}} = 213,88$ ppm ($\underline{\text{C}}\text{O}$) asignada al C-6 y a $\delta_{\text{C}} = 70,15$ ppm ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$), asignada al C-3 en el espectro de ^{13}C RMN.

Sin embargo, debido a que se obtiene una cantidad importante del coproducto **95**, y un rendimiento no tan alto para el compuesto **97**, en la metodología se planteó la posibilidad de convertirlo de forma conveniente al derivado deseado **97**. La reducción estereoselectiva se llevó a cabo con $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ a 5°C , según fue informada anteriormente para un análogo con estructura similar [80]. La regio y estereoselectividad en la reducción puede observarse analizando la modelación molecular 3D (Figura 53), que indica claramente la preferencia de ataque del agente reductor en el carbono C-3 por la cara superior del grupo carbonilo en el anillo A, de tal forma de generar la función $3\alpha\text{-OH}$, requerida para la actividad biológica. De este estudio se observó que la posición C-3 ($\text{C}=\text{O}$) en dicho compuesto aparentemente debe ser más reactiva que la posición C-6, por efectos estéricos asociados a interacciones 1,3-diaxiales del grupo metilo en la posición C-19, a diferencia de un posible ataque en el C-6 del anillo B (con evidente impedimento estérico), como se muestra en la Figura 53. En este caso el compuesto **95** fue convertido en **97**, con un rendimiento de 69,1% y la estructura fue determinada por comparaciones espectroscópicas de ^1H y ^{13}C RMN, con los datos espectrales del compuesto **97**, cuando éste se obtuvo en forma directa por oxidación de **90**.

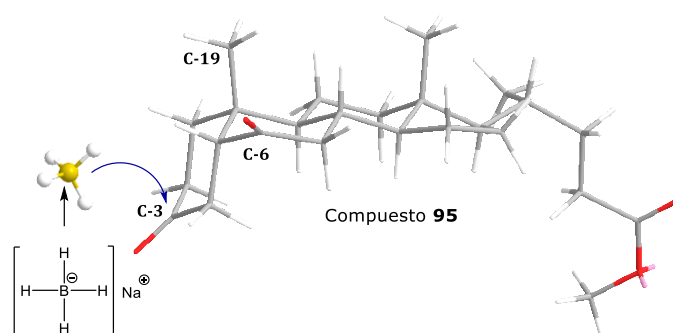


Figura 53. Estructura 3D del compuesto **95** y ataque preferencial regio y estereoselectivo del agente reductor.

El siguiente paso correspondió a uno de los más importantes desde el punto de vista estructural y conformacional. Este consistió en la reacción de isomerización del compuesto **97**, catalizada por el sistema HCl/MeOH al 2,5% para formar el compuesto **98** [93] (Figura 54). Esta isomerización es obligatoria para todos los nuevos análogos formados, debido a que el brasinólido (**1**) y la mayoría de sus análogos estructurales naturales presentan fusión de tipo “*trans*” entre los anillos A y B. Esta conformación se ve reflejada en una mayor actividad biológica asociada a la promoción del crecimiento en plantas [62], [90], [111]. La reacción de epimerización en la posición C-5 desde una orientación espacial 5β hacia 5α se favorece debido a que las fusiones de anillos *trans* son, por lo general, más estables que las fusiones de anillos tipo *cis*. El análisis conformacional para esta reacción de epimerización se muestra en la Figura 54.

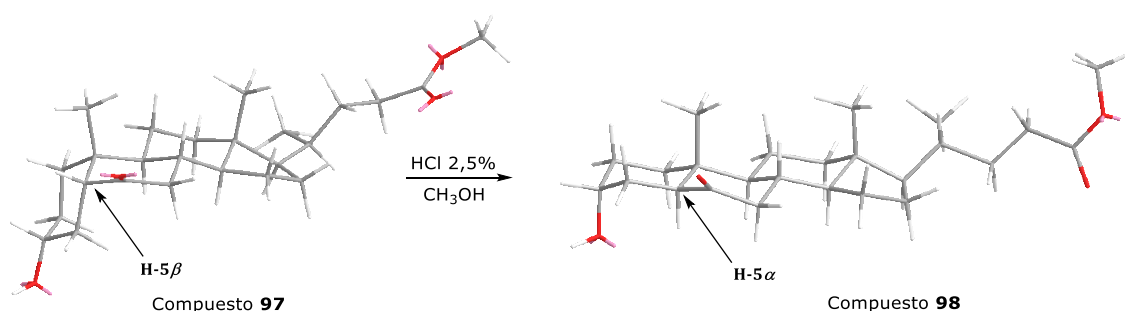


Figura 54. Reacción de isomerización del compuesto **97** catalizada por HCl, para obtener el compuesto **98**. Se observa el cambio que experimentan las conformaciones al pasar de una fusión *cis* de anillos A/B a fusión *trans*.

Por medio de esta reacción se obtuvo el compuesto **98** con un 77,4% de rendimiento. Desde el espectro de ^1H RMN se observan diferencias importantes y éstas se evidencian principalmente en las señales $\delta_{\text{H}} = 4,16$ ppm (m, 1H, CHOH) y $\delta_{\text{H}} = 2,70$ ppm (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), asignadas a los hidrógenos de las posiciones C-3 y C-5 respectivamente, ambas desplazadas a campo bajo en comparación con su isómero **97** ($\delta_{\text{H}} = 3,62$ ppm para H-3 y la señal de H-5 solapada a $\delta_{\text{H}} = 2,33$ ppm con las señales de H-23), como se indica en la Figura 55. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN para **97** se observa la señal a $\delta_{\text{C}} = 12,29$ ppm (CH_3) asignada al grupo metilo enlazado al carbono cabeza de puente de la posición C-10, que al cambiar la fusión de anillos A/B *cis* hacia la fusión *trans*, se ve evidenciado por un cambio significativo en el desplazamiento químico de la señal hacia

campo alto en el espectro de ^{13}C RMN (desde $\delta_{\text{C}} = 23,16$ ppm (C-19) en el compuesto **97** hacia $\delta_{\text{C}} = 12,29$ ppm, en el compuesto **98**), como se muestra en la Figura 55. La estructura de la molécula fue confirmada principalmente por los espectros de correlación 2D-HSQC y 2D-HMBC [80], [112].

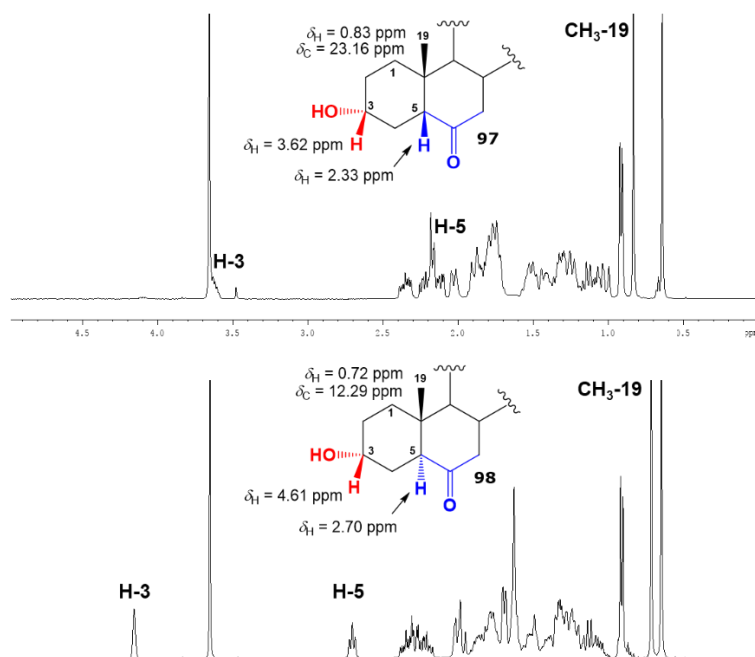


Figura 55. Principales diferencias espectrales observadas de ^1H y ^{13}C RMN entre los compuestos **97** y **98**, en el cambio conformacional al pasar de una fusión cis de anillos A/B a fusión trans.

Posteriormente el compuesto **98** fue convertido en el compuesto mesilado **99**, por medio de la reacción de mesilación en la posición C-3 [111], [113] lo que se logró mediante la reacción del compuesto **98** con cloruro de metanosulfonilo (Cloruro de mesilo; MsCl) catalizada por DMAP en DCM como solvente a temperatura de 0°C y llevando el término de la reacción a 20°C . En este caso, se obtuvo el compuesto **99** con 57,2% de rendimiento. El objetivo principal de esta reacción es convertir al grupo OH de la posición C-3 en un buen grupo saliente (CH_3SO_3^-). La posterior reacción de eliminación del grupo mesilo presente en **99** permitirá la obtención del alqueno **100**.

El compuesto **99** fue caracterizado principalmente por el espectro de ^1H RMN, donde destacan las señales observadas a $\delta_{\text{H}} = 5,02$ y $2,97$ ppm asignadas al H-3 y un singlete adicional correspondiente al grupo metanosulfonilo (s, 3H, CH_3SO_3). Mientras que esta

última señal fue observada a $\delta_c = 38,38$ ppm en el espectro de ^{13}C RMN.

Posteriormente, la reacción del compuesto **99** con $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{LiBr}$ en DMF a 80°C permitió la formación del alqueno **100**, con un 74,9% de rendimiento [71], [80], [112]. Un análisis conformacional indica que el ataque de la base (Li_2CO_3) tiene prácticamente la misma probabilidad de remover los protones de la posición H-2 β y H-4 β , como se indica en la Figura 56. Por lo tanto, el enlace doble se podría formar entre las posiciones C2-C3 y C3-C4. Sin embargo, experimentalmente la reacción es “*regio-específica*”, donde la base remueve el H-2 β , obteniendo el regio-isómero con el enlace doble en las posiciones C2-C3 (compuesto **100**). Estos datos fueron confirmados por comparaciones entre moléculas de similar estructura [71], [80], [94], [112], [114], [115].

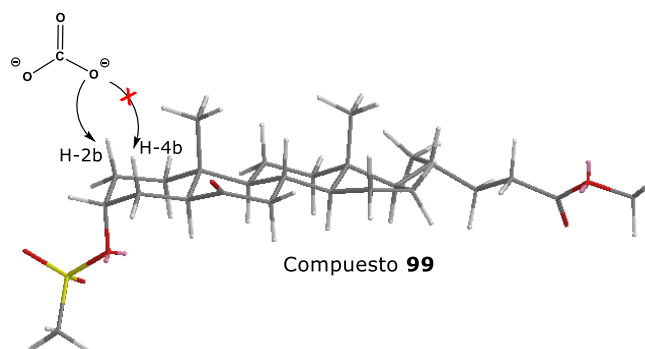


Figura 56. Análisis estructural 3D del compuesto **99** que muestra la preferencia de ataque de la base sobre el H-2 β , para formar en forma regio-específica el compuesto **100** (enlace doble en C2-C3).

La confirmación de la estructura del compuesto **100** se realizó, principalmente, por espectroscopía de IR y $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ RMN. En el espectro IR, se determinó la presencia del enlace doble C=C, por las señales observadas a $\nu = 3020$ y 1635 cm^{-1} , asignadas a vibraciones de enlace C=C-H y C=C, respectivamente. Mientras que en el espectro de ^1H RMN se observaron dos señales a $\delta_H = 5,69 - 5,66$ ppm (m, 1H) y $5,57 - 5,59$ ppm (m, 1H) asignadas a los hidrógenos H-3 y H-2 respectivamente. En el espectro de ^{13}C RMN las señales observadas a $\delta_c = 124,95$ y $124,49$ ppm, asignadas a los carbonos C-3 y C-2, confirman la presencia del enlace doble C=C. Finalmente, las asignaciones de H-2, H-3, C-2 y C-3, fueron confirmadas por espectroscopía de correlación heteronuclear 2D-HSQC y 2D-HMBC, donde las principales correlaciones para determinar la posición y asignación de los hidrógenos enlazados a los carbonos sp^2 (CH-2 y CH-3) se muestran en la Figura

57. Esta información espectroscópica aportó mayores detalles que la proporcionada por otros autores [80], [94], [112], [114], [116].

Alternativamente se intentó realizar la reacción de eliminación en forma directa desde el compuesto **98**, utilizando anhídrido triflico según se reportó para una serie de 3α y 3β -hidroxiesteroides [115]. En este caso se obtuvo el alqueno **100** con un 62% de rendimiento, aspecto que se considera positivo, considerando que el rendimiento total en las etapas de mesilación y posterior eliminación fue de 43% [117].

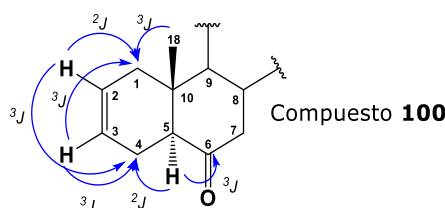


Figura 57. Principales correlaciones heteronucleares a $^2J_{HC}$ y $^3J_{HC}$ 2D-HMBC que confirman las asignaciones y posiciones de $=CH-2$ y $=CH-3$ en el compuesto **100**.

El tratamiento del alqueno **100** con OsO_4 en NMMNO condujo a la formación diastereoespecífica del diol $2\alpha-3\alpha$ **101** (hidroxilación “*syn*”) [89, 93, 115] con 43,1% de rendimiento. La preferencia de ataque en la adición *syn* del OsO_4 por la cara inferior del plano del enlace doble C2-C3, se explica por la interacción estérica que ofrece el grupo metilo CH_3-18 , como se muestra en la Figura 58. El impedimento estérico generado por grupo CH_3-18 conduce a que se forme sólo un diastereoisómero para el compuesto **101**, que por lo demás, corresponde a las orientaciones espaciales deseadas de los grupos OH en C-2 y C-3, correspondiendo al requerimiento para un mayor efecto en la actividad biológica.

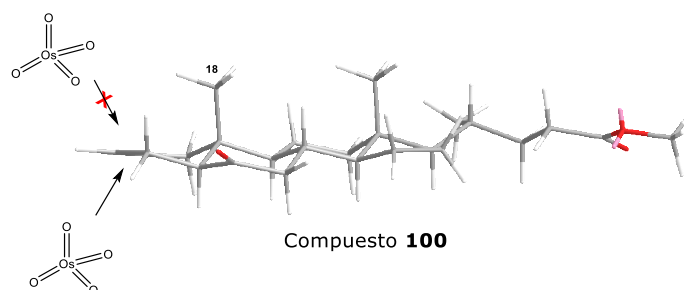
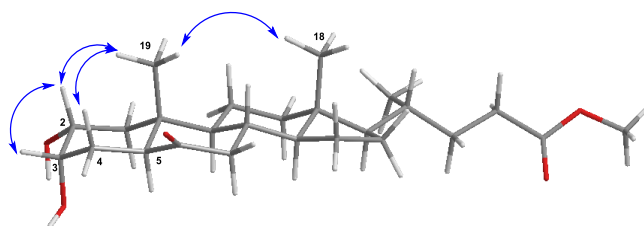


Figura 58. Adición preferencial del OsO_4 por la cara inferior del plano del enlace doble C2-C3, en el compuesto **100**, que permitirá la formación diastereoespecífica del diol $2\alpha-3\alpha$ en el compuesto **101**.

La determinación estructural del compuesto **101**, se realizó principalmente por espectroscopía de ^1H y ^{13}C RMN, donde en el primero se observaron dos señales carbinólicas (C-OH) a $\delta_{\text{H}} = 4,05$ ppm (s, 1H) y 3,77 ppm (d, $J = 11,1$ Hz) asignadas a los hidrógenos H-3 y H-2 respectivamente. En tanto, en el espectro de ^{13}C RMN se confirmó la presencia de los carbonos carbinólicos observados a $\delta_{\text{C}} = 68,39$ y 68, 29 ppm, asignadas a los carbonos C-3 y C-2 respectivamente. Las orientaciones espaciales de ambos grupos hidroxilo asignadas como 2α y 3α fueron confirmadas por experimentos 1D NOESY selectivos, donde las principales interacciones dipolares fueron observadas entre los grupos metilos $\text{CH}_3\text{-18}$ y $\text{CH}_3\text{-19}$ y éste último con H-2 β y H-4 β , según se indica en la Figura 59. Para este compuesto se dispone de mayores antecedentes espectroscópicos de RMN, que aquellos informados previamente [89], [93], [94]. Sin embargo, en este trabajo se realizó la determinación estructural completa del diol **101**.



Compuesto **101**

Figura 59. Estructura modelada en 3D del compuesto **101**. Efectos NOE de la señal a $\delta_{\text{H}} = 0,748$ ppm ($\text{CH}_3\text{-19}$) con $\text{CH}_3\text{-18}$, H-4 β y H-2 β mostrando claramente que todos estos hidrógenos se encuentran en la misma orientación espacial " β ", por sobre el plano de la molécula. Efectos NOE a $\delta_{\text{H}} = 3,76$ ppm (H-2 β) con H-3 β , $\text{CH}_3\text{-19}$ y efecto NOE a tres espines con $\text{CH}_3\text{-18}$, confirmando de esta forma las orientaciones espaciales como " β " de todos estos hidrógenos y por lo tanto como 2α y 3α el grupo glicol en el anillo A.

Inicialmente el Proyecto de tesis tenía contemplado la síntesis de los análogos (I-IV) indicados en la Figura 60, a partir del intermedio avanzado **101**. Debido a que durante el transcurso del desarrollo de esta investigación algunos de estos compuestos fueron publicados y/o patentados en sus actividades biológicas por otros autores [94], [108], se debió realizar cambios en las estructuras de los compuestos objetivos, por lo tanto sólo se llegó a la obtención del compuesto **101**, por esta vía.

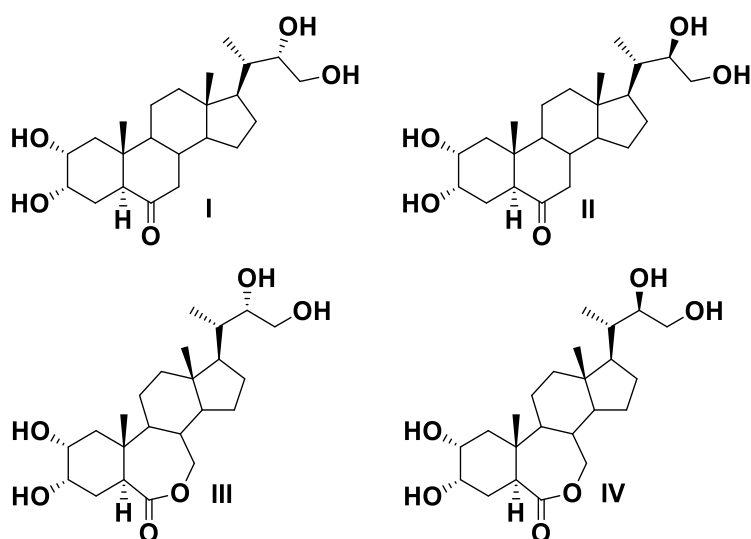


Figura 60. Estructura de los análogos I-IV propuestos inicialmente como objetivos de este trabajo de tesis.

Continuando con la nueva propuesta de síntesis, el derivado **98** fue saponificado, utilizando el sistema de $K_2CO_3/MeOH$ con posterior acidificación, método descrito para otros análogos de estructura similar [96]. De esta forma, el compuesto **102** fue obtenido con un 82,2% de rendimiento. Evidencia espectroscópica de IR indica la presencia de una banda, observada entre $3403-2500\text{ cm}^{-1}$, atribuida a la función de ácido carboxílico en la molécula. Adicionalmente, en el espectro de ^{13}C RMN, se observa la presencia del grupo carbonilo de la función carboxílica a $\delta_c = 178,19\text{ ppm}$, confirmando la presencia de dicha función [117].

Posteriormente, el ácido carboxílico **102** fue acetilado bajo condiciones estándares ($Ac_2O/DMAP$) para producir el derivado acetilado **103** con un rendimiento de 72,8%. La principal evidencia espectroscópica para este compuesto fue la observación en el espectro de 1H RMN de la señal a $\delta_H = 2.03\text{ ppm}$ (s, 3H) asignada al grupo CH_3CO . Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN, la presencia de las señales a $\delta_c = 170,31$ y $21,39\text{ ppm}$ confirman la presencia del grupo acetato [80].

Como se indicó anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo fue sintetizar nuevos análogos de BRs, donde el principal cambio estructural es reducir la longitud de la cadena lateral, pero manteniendo la función de glicol en la posición C22-C23. Generalmente, la introducción de esta función en la cadena lateral es mediante la

reacción de hidroxilación de Upjohn (dihidroxilación con OsO_4), para lo cual se requiere la presencia de un enlace doble terminal. Para el caso de ácidos carboxílicos, esto se puede lograr mediante la reacción de descarboxilación oxidativa previa, usando el sistema $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2$. Este método ha sido propuesto para obtener enlaces dobles terminales a partir de ácidos carboxílicos [89], [118]. Específicamente, se ha aplicado ampliamente para la degradación de la cadena lateral de un gran número de ácidos biliares, incluidos derivados del ácido hiodesoxicólico (**53**) [94]–[96]. Adicionalmente, la reacción de degradación carboxílica también se puede llevar a cabo usando el sistema $\text{PhI}(\text{OAc})_2/\text{CuSO}_4$ [94].

En este caso, cuando el ácido **103** fue tratado con el sistema $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2$, se logró descarboxilar la cadena lateral y se obtuvo el alqueno terminal **104** con 74,5% de rendimiento. La formación del alqueno en la posición C22-C23 fue confirmada por datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN. De esta forma, las señales observadas a $\delta_{\text{H}} = 5,66$ ppm (ddd, $J = 17,0$; $10,2$ y $8,4$ Hz, 1H), $4,93$ ppm (dd, $J = 17,0$ y $1,8$ Hz, 1H) y $4,83$ ppm (dd, $J = 10,2$ y $1,8$ Hz, 1H) fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23 *trans* y H-23 *cis*, respectivamente. Mientras que las señales observadas en el espectro de ^{13}C RMN a $\delta_{\text{C}} = 144,89$ y $111,84$ ppm fueron asignadas a los carbonos C22 y C23, respectivamente. Estos datos espectroscópicos fueron consistentes con los reportados, por otros autores, para alquenos esteroidales con estructuras similares [94], [109].

Dihidroxilación del alqueno **104** con OsO_4 produjo una mezcla de alcoholes epiméricos **108-109** (22*R*/22*S*) con 72,3% de rendimiento. La obtención de la mezcla epimérica es un resultado esperado. Este fenómeno fue también observado cuando otros núcleos esteroidales con enlace doble en la posición C22-C23 (24-nor-colánicos-22-eno) fueron hidroxilados con el mismo procedimiento [119]. Esta reacción es estereoselectiva, debido a que el epímero 22(*S*) fue obtenido como el derivado mayoritario al igual que otros análogos con estructuras similares (compuestos **77**, **80-81**), los cuales fueron informados previamente [95]–[97]. La proporción de los epímeros **108-109** (22*R*/22*S*) presente en la mezcla fue determinada utilizando los datos espectroscópicos de las

señales dobletes observadas a $\delta_H = 0,965$ y $0,928$ ppm (d, $J = 7,0$ Hz y d, $J = 6,6$ Hz, respectivamente), asignadas a los hidrógenos de los grupos metilo de H-21 (CH₃-C20), donde la razón de las integrales para estos hidrógenos indica que el componente mayoritario fue el epímero 22(S) en una proporción aproximada de 5:1.

Luego, la mezcla **108-109** fue sujeta a purificación por CC y posteriormente a re-cristalización utilizando el sistema de solventes MeOH/Et₂O = 3/1, utilizado para la purificación de otros glicoles C22-C23 de estructuras similares [95]–[97]. Sin embargo, sólo se logró separar y purificar el epímero mayoritario **109** (22S) con un rendimiento de 64,0%.

La mayor evidencia espectroscópica de ¹H RMN para la determinación estructural del derivado **109**, fue por la observación de las señales a $\delta_H = 3,79$ ppm (dt, $J = 9,6$ y $3,6$ Hz, 1H), $3,64$ ppm (dd, $J = 10,8$ y $3,6$ Hz, 1H), $3,51$ ppm (dd, $J = 10,8$ y $9,6$ Hz, 1H), las que fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23a y H-23b, respectivamente. Mientras que en el espectro de ¹³C RMN fueron observadas las señales a $\delta_C = 73,69$ y $62,22$ ppm que fueron asignadas a los carbonos carbonílicos C22 y C23, respectivamente.

La estereoquímica en el carbono C22 del compuesto **109** fue asumida como 22(S), basada en resultados reportados previamente para la reacción de dihidroxilación de los análogos **77**, **80-81** [95]–[97]. Sin embargo, en orden a establecer la configuración absoluta en el carbono C22 del glicol **109**, se procedió a la preparación del derivado benzoilado **110** desde **109** por reacción con C₆H₅ClO/DMAP en CH₂Cl₂, según se indica en la Figura 46. En este caso, se logró la benzoilación selectiva en la posición C23, obteniéndose el derivado benzoilado **110** con 93,8% de rendimiento.

La estructura del derivado **110**, fue establecida principalmente por espectroscopía de ¹H, ¹³C RMN, donde las señales observadas a $\delta_H = 8,05$ (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), $7,58$ (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), $7,46$ (t, $J = 7,4$ Hz, 2H) ppm, fueron asignadas a los hidrógenos H_{Ar}-2', H_{Ar}-4' y H_{Ar}-3', respectivamente.

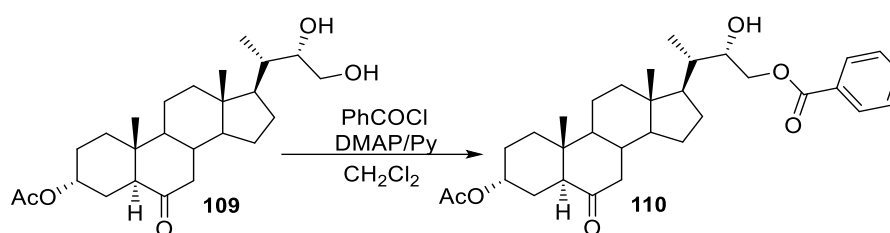


Figura 46. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **110**.

Adicionalmente, las dos señales desplazadas a campo bajo observadas a $\delta_H = 4,50$ (dd, $J = 11,4$ y $1,7$ Hz, 1H) y $4,20$ (dd, $J = 11,4$ y $4,2$ Hz, 1H) ppm corresponden a los hidrógenos H-23a y H-23b, lo que demuestra la selectividad de la reacción de benzoilación en la posición C23. En tanto que en el espectro de ^{13}C RMN la señal observada a $\delta_C = 167,01$ ppm fue asignada al grupo carbonilo del éster aromático. Mientras que las señales a $\delta_C = 129,86$, $129,63$, $128,45$ y $133,22$ ppm fueron asignadas a los carbonos del anillo aromático (cada una de las señales a $\delta_C = 129,63$ y $128,45$ ppm corresponden a dos carbonos simétricos del anillo aromático). Información adicional desde el espectro 2D-HMBC indica que se observaron correlaciones heteronucleares a $^3J_{H-C}$ entre H-23a ($\delta_H = 4,50$ ppm) con el carbono carbonílico del éster aromático ($\delta_C = 167,01$ ppm), de esta forma se confirma la presencia del grupo benzoato en la posición C23 y junto con ello la selectividad de la reacción.

Por medio de la preparación de este derivado benzoilado y posterior purificación por CC y recristalización (MeOH/Et₂O = 1/2) se logró obtener cristales adecuados para realizar el estudio cristalográfico de mono cristal para la determinación de la configuración absoluta en C22. Con este estudio finalmente se determinó la estereoquímica en C22 como *S*, según se indica en la Figura 61.

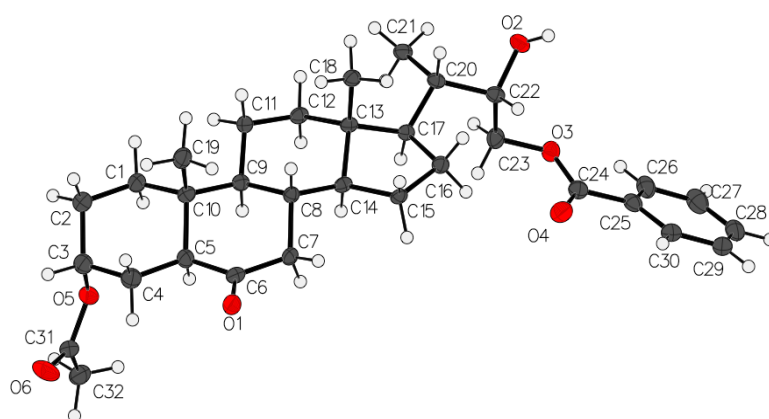


Figura 61. Estructura de rayos-X de mono cristal para el derivado **110**.

Luego de determinada la estructura del derivado **110** y confirmación de la estereoquímica en C22, se procedió a la obtención del análogo de BRs **84** propuesto en los objetivos de la tesis. Para ello, el glicol **109** fue saponificado con $K_2CO_3/MeOH$ en condiciones de reflujo (Figura 47), obteniéndose el triol **84** con 97,0% de rendimiento. Este compuesto fue obtenido anteriormente por otros autores y utilizando rutas de síntesis similares. Estos autores propusieron la estructura para **84** en función de los datos espectroscópicos de 1H , ^{13}C RMN y por técnicas espectrométricas de EIMS y HRMS. Sin embargo, la asignación de las señales de 1H , ^{13}C RMN no fueron reportadas [94].

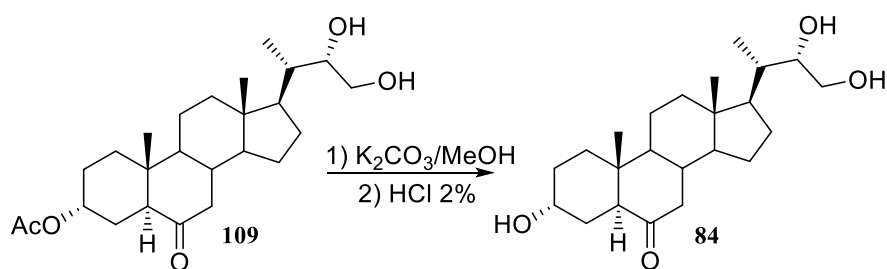


Figura 47. Esquema de síntesis y estructura del compuesto **84**.

El espectro de 1H RMN del triol **84** mostró señales a $\delta_H = 4,04-4,03$ (m, 1H), 3,71 (dt, $J = 8,9$ y 3,2 Hz, 1H), 3,60 (dd, $J = 11,3$ y 2,7 Hz, 1H) y 3,40 (dd, $J = 11,3$ y 8,9 Hz, 1H) ppm,

que fueron asignadas a los hidrógenos H-3, H-22, H-23a y H-23b, respectivamente. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN, la presencia de los carbonos carbinólicos fue observada a $\delta_{\text{C}} = 75,19, 66,02$ y $63,19$ ppm y asignados a C22, C3 y C23, respectivamente.

Siguiendo con los objetivos propuestos en esta tesis, el paso siguiente fue la obtención de los dos nuevos análogos de BRs **86** y **87**, para ello se desarrolló la ruta de síntesis indicada en la Figura 62. La introducción del grupo lactona (B-Homo-7-oxa y B-Homo-6-oxa) en el anillo B, puede llevarse a cabo por medio de la reacción de oxidación de Baeyer-Villiger de 5α -6-ceto esteroides con sustituyentes oxigenados en posiciones 2α - 3α y 3α , la cual ocurre con control regioselectivo, favoreciendo la formación de 7-oxalactonas, en presencia de sustituyentes atractor-electrón en la posición C3 [107] (grupos acetatos [80], [89], [107], [120], [121], benzoatos [107], [120], tosilatos [108], [120], trifluoroacetatos [121] y acetónidos [106], [122]).

También el uso de $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$ como agente oxidante ha demostrado un marcado efecto sobre la razón 6-oxa/7-oxa y puede conducir a la formación preferencial del isómero 7-oxa por sobre el 6-oxa [121]. Además, los rendimientos globales de lactonización en presencia de grupos hidroxilos protegidos (como acetatos, benzoatos, acetónidos, etc.) son mayores que los obtenidos cuando la reacción de oxidación se realiza en la estructura esteroideal directamente en la presencia de grupos hidroxilo [123]. Por estas razones, se llevó a cabo la oxidación de Baeyer-Villiger del derivado triacetilado **111** en lugar de **109** y usando $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}/\text{CHCl}_3$ como sistema oxidante (Figura 62). También se observó una regioselectividad similar en la oxidación de Baeyer-Villiger cuando se utilizó el sistema *m*-CPBA/ $\text{NaHCO}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, sin embargo, las velocidades de oxidación observadas son más lentas [121].

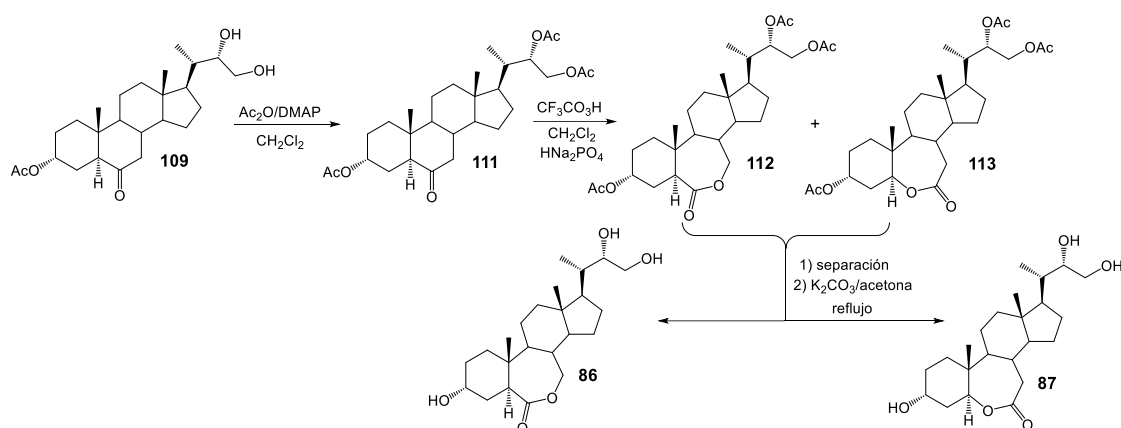


Figura 62. Ruta de síntesis para la obtención de los análogos **86** y **87**.

Considerando los antecedentes mencionados anteriormente, por medio de acetilación estándar ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMAP}$) del glicol **109**, se obtuvo el derivado triacetilado **111** con 97% de rendimiento. La estructura del derivado triacetilado **111** fue establecida principalmente por espectroscopía de ^1H y ^{13}C RMN, donde las señales singletes observadas a $\delta_{\text{H}} = 2,06$, 2,04 y 2,03 ppm, integradas para 3H cada una, fueron asignadas a los hidrógenos de los tres grupos metilos de acetatos. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN se observaron señales a $\delta_{\text{C}} = 171,09$, 170,42, 170,25, 21,39, 21,23 y 20,86 ppm, que confirman la presencia de los tres grupos CH_3CO .

Posteriormente, la oxidación de Baeyer-Villiger del compuesto triacetilado **111** con el sistema $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}/\text{CHCl}_3$ produjo las lactonas **112** y **113** (Figura 62) con 35,2% y 14,1% de rendimiento respectivamente. La asignación completa de las estructuras de **112** y **113** fue establecida principalmente por espectroscopía de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{13}C DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC. De esta forma la posición de la función 7-oxalactona en el compuesto **112** fue establecida por la observación en el espectro de ^1H RMN de las señales a $\delta_{\text{H}} = 4,13 - 4,04$ ppm (m, 2H), que fueron asignadas a los hidrógenos H-7 y correlacionados por 2D ^1H - ^{13}C HSQC con la señal metileno observada a $\delta_{\text{C}} = 70,31$ ppm en el espectro de ^{13}C DEPT-135 (CH_2 -7). Adicionalmente, importantes correlaciones heteronucleares fueron observadas para los hidrógenos H-5 α y H-7 desde el espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC (Figura 63): (i) H-7 muestra correlaciones a $^3J_{\text{HC}}$ con la señal a $\delta_{\text{C}} = 175,97$ ppm que fue

asignada al carbono C-6 (C=O de la función lactona), y con la señal a $\delta_C = 58,31$ ppm, asignada al carbono C-9, y correlaciones a $^2J_{HC}$ con la señal que aparece a $\delta_C = 39,42$ ppm asignada al carbono C-8. (ii) H-5 α que fue observado a $\delta_H = 3,03$ ppm (1H, dd, $J = 12,2$ y $4,3$ Hz) muestra correlaciones a $^3J_{HC}$ con las señales a $\delta_C = 14,54$, y $58,31$ ppm, que fueron asignadas a los carbonos CH₃-19 y C-9, respectivamente. (iii) H-5 α muestra correlaciones a $^2J_{HC}$ con las $\delta_C = 29,74$, $36,14$ y $175,97$ ppm, que fueron asignadas a los carbonos C-4, C-10 y C-6, respectivamente. Todas estas correlaciones son representadas en el espectro 2D-HMBC que se muestra en la Figura 63. Estas observaciones espectroscópicas confirman de manera inequívoca la posición 7-oxalactona en el compuesto **112**.

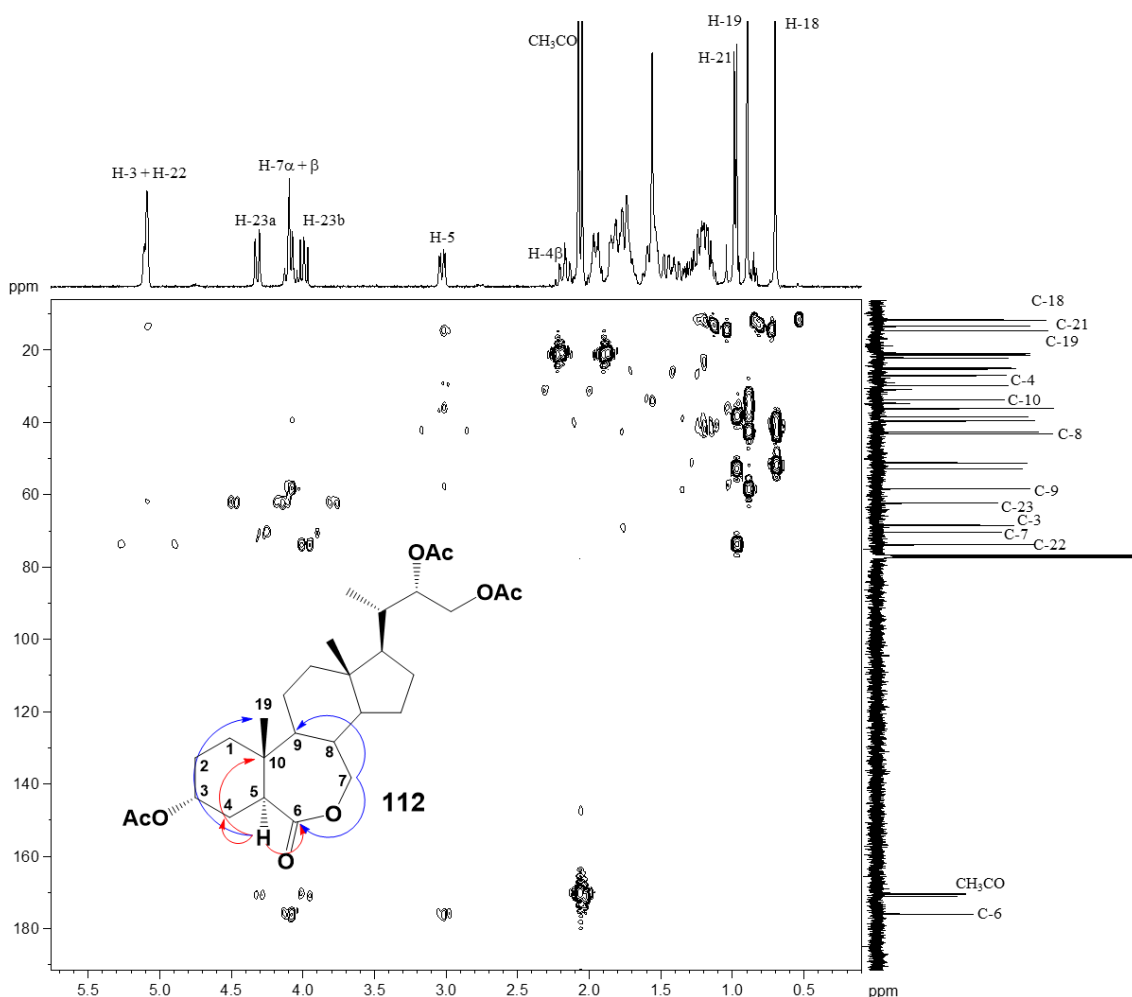


Figura 63. Espectro 2D 1H - ^{13}C HMBC y principales correlaciones a $^2J_{HC}$ (rojo) y $^3J_{HC}$ (azul) observadas para los hidrógenos H-5 α y H-7 del compuesto **112** (7-oxalactona).

análisis similar fue desarrollado para determinar la estructura de la 6-oxalactona **113**. Así, en el espectro de ^1H RMN, la señal observada a $\delta_{\text{H}} = 4,46$ ppm (1H, dd, $J = 11,3$ y $5,3$ Hz) fue asignada al hidrógeno H-5 α y correlacionada por 2D ^1H - ^{13}C HSQC con la señal a $\delta_{\text{C}} = 79,68$ ppm (grupo CH observado con multiplicidad impar desde el espectro ^{13}C DEPT-135). Adicionalmente, H-5 α muestra correlaciones a $^2J_{\text{HC}}$ con la señal a $\delta_{\text{C}} = 32,95$ ppm que fue asignada al carbono C-4 y correlaciones a $^3J_{\text{HC}}$ con las señales a $\delta_{\text{C}} = 11,59, 57,97$ y $174,64$ ppm, que fueron asignadas a los carbonos CH₃-19, C-9 y C-6 respectivamente (C-6 es el C=O de la función lactona).

Por otra parte, la señal en el espectro de ^1H RMN observada a $\delta_{\text{H}} = 2,55\text{-}2,43$ ppm corresponde a los dos hidrógenos H-7 (m, 2H), mostrando correlación a $^2J_{\text{HC}}$ con las señales que aparecen a $\delta_{\text{C}} = 38,31$ y $174,64$ ppm, que fueron asignadas a los carbonos C-8 y C-6 respectivamente. Mientras que H-7 mostró correlación a $^3J_{\text{HC}}$ con la señal a $\delta_{\text{C}} = 57,97$ ppm, que fue asignada al carbono C-9. Estas correlaciones se muestran en el espectro 2D-HMBC de la Figura 64.

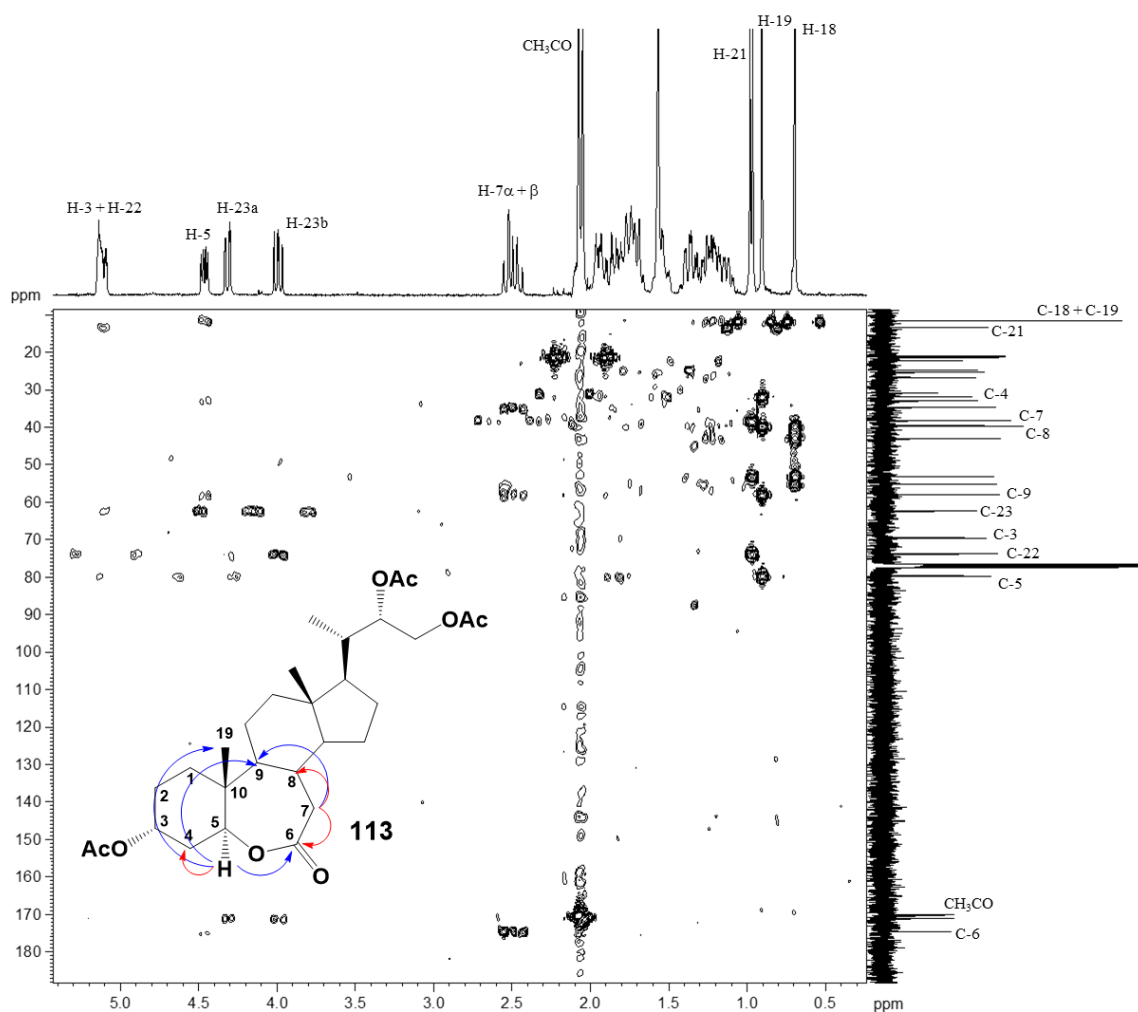


Figura 64. Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC y principales correlaciones a $^2J_{\text{HC}}$ (rojo) y $^3J_{\text{HC}}$ (azul) observadas para los hidrógenos H-5α y H-7 del compuesto **113** (6-oxalactona).

Posteriormente, por medio de reacción de saponificación en $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ de los compuestos **112** y **113**, se obtuvieron las lactonas finales **86** y **87** con rendimientos de 86% y 81% respectivamente. La determinación estructural completa de las lactonas **86** y **87** fue llevada a cabo, principalmente, por espectroscopía de RMN 1D y 2D y para ello se desarrolló un análisis similar al realizado para asignar las estructuras de las 7-oxa y 6-oxalactonas precursoras **112** y **113**.

En la Figura 65 se muestran parte de los espectros de ^1H RMN de los análogos **86** y **87** y con ello las principales diferencias observadas en los desplazamientos químicos para los hidrógenos H-5 y H-7. Por ejemplo, H-5 en el compuesto **112** (7-oxalactona) aparece a

campo más alto ($\delta_H = 3,17$ ppm, dd, $J = 12,3$ y $4,4$ Hz) comparado con el H-5 en el compuesto **113** (6-oxalactona) que aparece a $\delta_H = 4,60$ ppm (dd, $J = 11,3$ y $5,3$ Hz). De forma similar, H-7 α + β en el compuesto **112** fueron observadas a campo más bajo ($\delta_H = 4,08$ - $4,07$, m) mientras que en la 6-oxalactona **113**, los hidrógenos H-7 α + β son desplazados a campo alto ($\delta_H = 2,53$ - $2,43$, m).

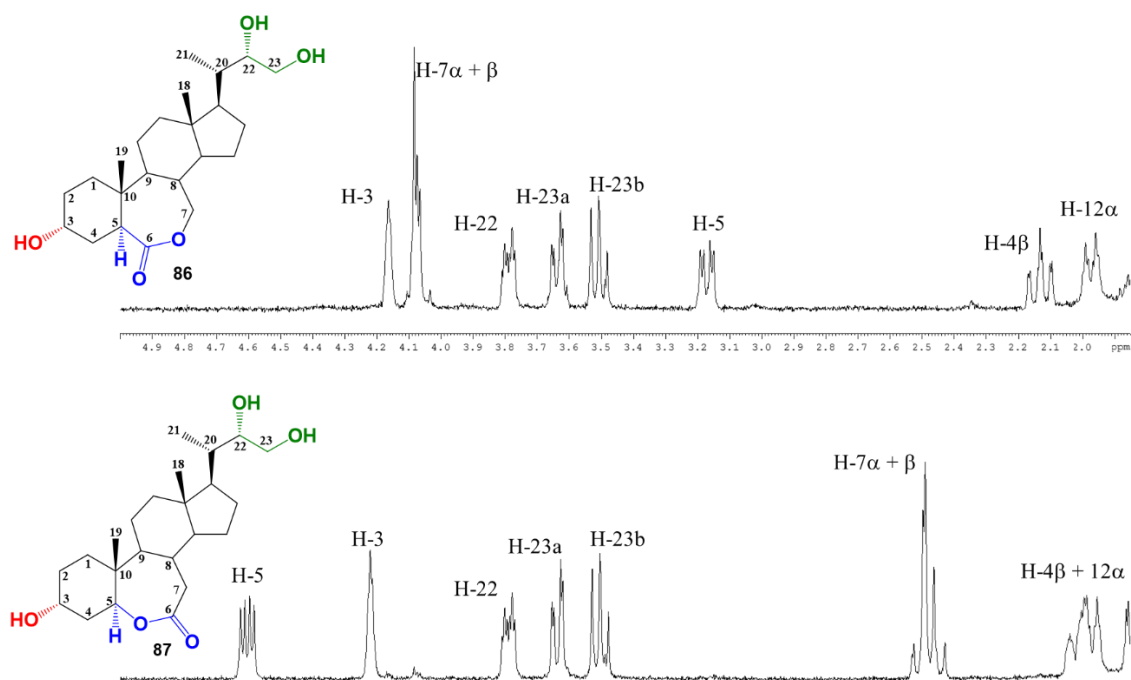


Figura 65. Mayores diferencias entre los desplazamientos químicos de los hidrógenos H-5 y H-7. Espectros de ^1H RMN parcial ($\delta = 1,85$ - $5,00$ ppm) de ambas lactonas **86** y **87**.

Luego de obtener los análogos **84**, **86** y **87**, del tipo 24-nor, con estereoquímica C22(*S*) en la cadena lateral, propuestos en los objetivos del trabajo de tesis, el siguiente paso consistió en la obtención de los análogos **85**, **88** y **89**. Estos análogos se diferencian por tener en la cadena lateral una estereoquímica C22(*R*).

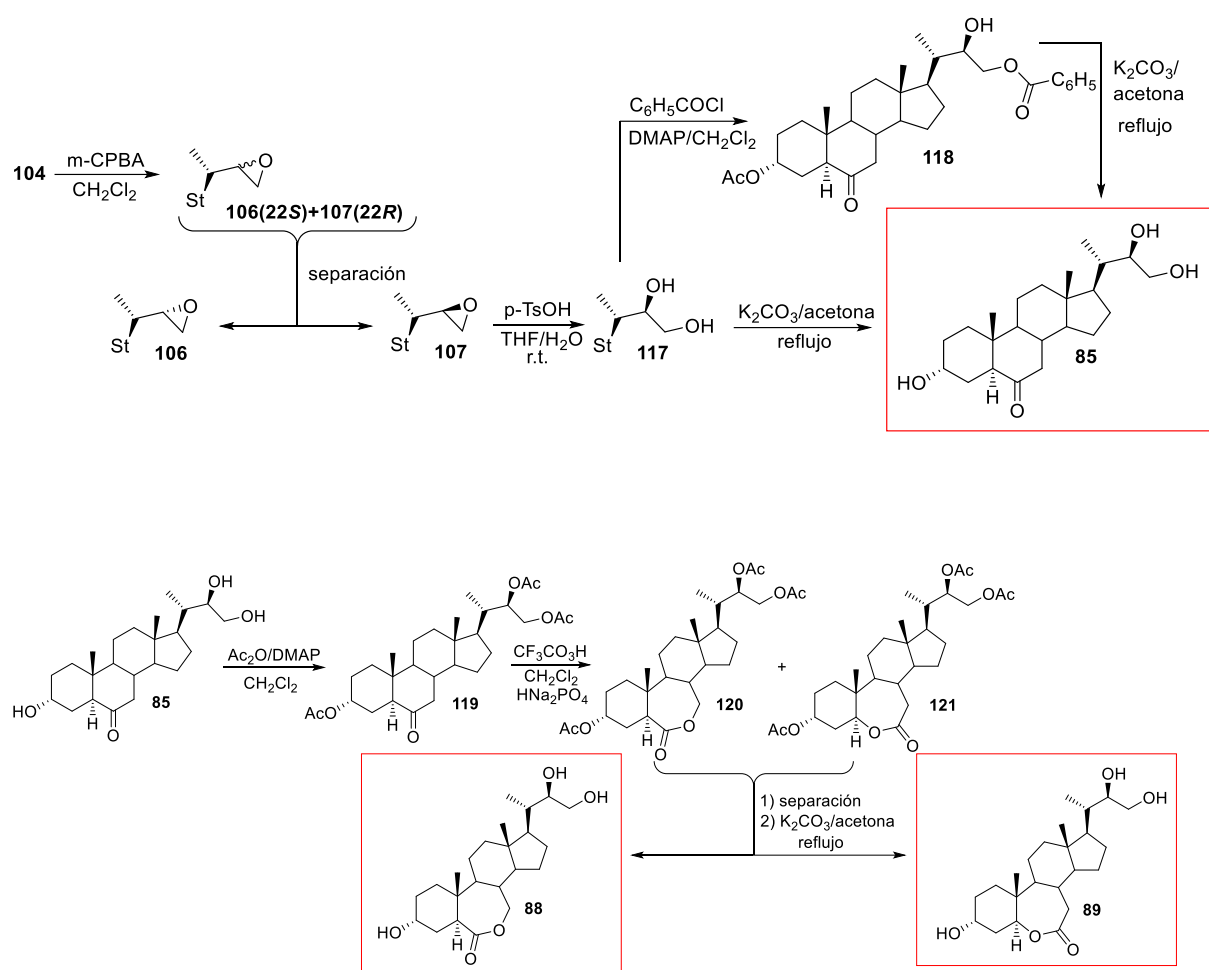


Figura 66: Esquema de síntesis propuesto para la obtención de los compuestos **85**, **88** y **89** [72], [95], [101], [103]–[106]

Para ello, se desarrollaría la secuencia de síntesis indicada en la Figura 66. Sin embargo, sólo se logró llegar hasta el paso de la obtención de la mezcla de epóxidos **106** y **107** desde el alqueno **104** con 55,7% de rendimiento (Figura 67). La razón de esto se debe a que la mezcla de epóxidos no fue posible de separar por los métodos convencionales de purificación (CC y/o recristalización). En este caso sólo se logró identificar la relación en la cual se obtuvieron estos epóxidos que fue **106:107** = 0,44:1. Esta proporción fue calculada en función de las integrales de las señales asignadas a los hidrógenos H-22 (δ = 2,73 ppm), H-23a (δ = 2,59 ppm) del epóxido mayoritario (compuesto **107**) y H-23a (δ = 2,64 ppm), H-23b (δ = 2,40 ppm) del epóxido minoritario (compuesto **106**).

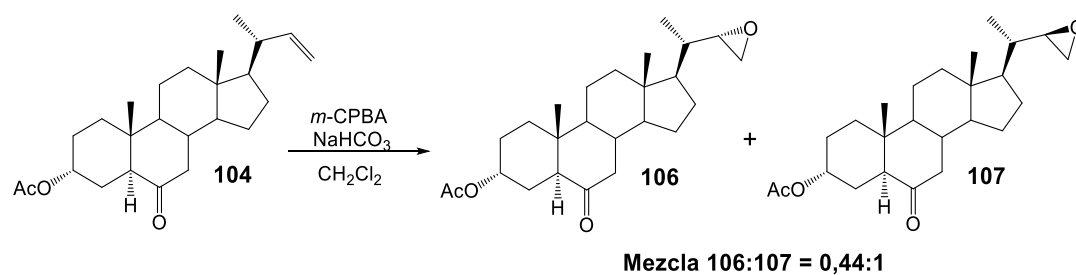


Figura 67. Ruta de síntesis para la obtención de los análogos **106** y **107**.

Para la determinación del epóxido mayoritario, se utilizaron correlaciones experimentales y espectroscópicas reportadas para la obtención de 22-23, 24-nor epóxidos, por el mismo procedimiento experimental de epoxidación (*m*-CPBA) de estructuras esteroidales similares [95], [96], [120].

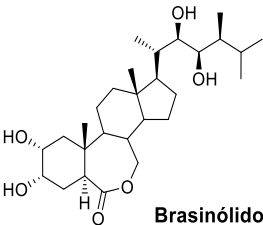
Resultados y discusiones de la evaluación de la actividad antifúngica de los análogos de brasinoesteroides sintetizados contra *Botrytis cinerea* *in vitro*

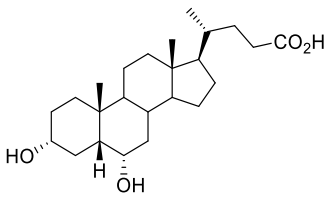
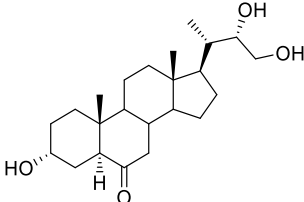
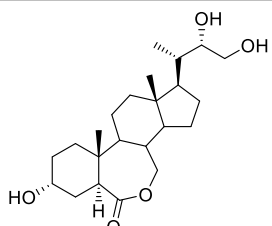
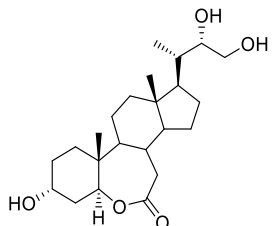
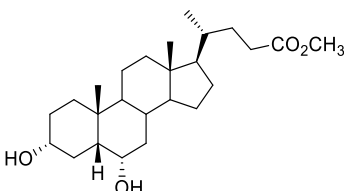
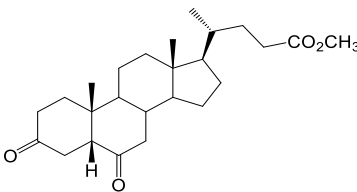
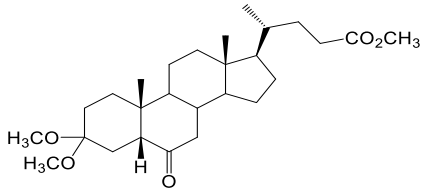
De acuerdo a los objetivos específicos planteados, se midió la actividad antifúngica de los análogos sintéticos de BRs **53, 84, 86, 87, 90, 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 112 y 113**, mediante el test radial de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* del hongo patógeno *Botrytis cinerea*.

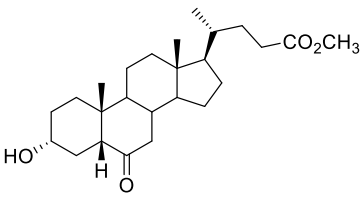
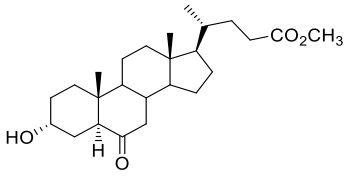
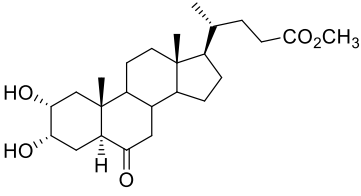
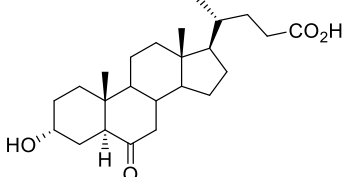
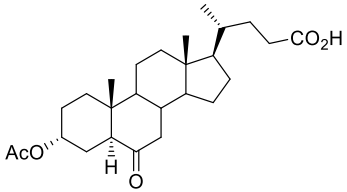
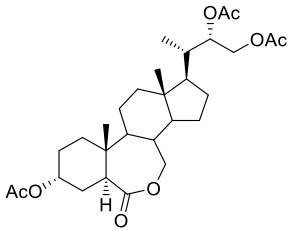
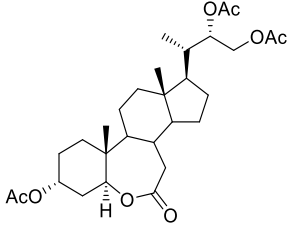
Los resultados mostrados en la tabla 4 corresponden al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Botrytis cinerea* posterior a las 72 h de incubación, evaluado a 3 concentraciones distintas, en comparación al control negativo. Además, como control positivo de ensayo se utilizó el antifúngico comercial Captan®.

En el Anexo I se muestra el registro visual del ensayo de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* *in vitro* para los análogos que presentaron la mayor actividad antifúngica entre los compuestos evaluados (**84, 112**).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* *in vitro* (% $\pm$ DS).

Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (ppm)			
		50	100	150	300
BL	 Brasinólido	10 $\pm$ 2,2	55 $\pm$ 4,1	55 $\pm$ 1,5	

53		$49 \pm 1,2$		$82 \pm 1,0$	$99 \pm 0,0$
84		$51 \pm 0,0$	$92 \pm 1,1$	$100 \pm 0,0$	
86		$41 \pm 8,7$	$56 \pm 6,8$	$100 \pm 0,0$	
87		$19 \pm 0,0$	$19 \pm 0,0$	$90 \pm 2,3$	
90		$36 \pm 2,0$		$86 \pm 1,2$	$89 \pm 2,2$
95		$1 \pm 0,0$		$1 \pm 0,0$	$22 \pm 1,8$
96		$28 \pm 2,8$		$23 \pm 1,2$	$53 \pm 2,0$

97		$60 \pm 1,2$		$66 \pm 0,8$	$91 \pm 0,0$
98		$79 \pm 1,8$		$86 \pm 1,2$	$91 \pm 0,0$
101		$45 \pm 1,0$		$77 \pm 3,2$	$94 \pm 1,0$
102		$73 \pm 1,2$		$78 \pm 1,2$	$89 \pm 0,0$
103		$55 \pm 1,8$		$64 \pm 1,8$	$74 \pm 1,2$
112		$62 \pm 2,9$	$99 \pm 0,0$	$100 \pm 0,0$	
113		$26 \pm 9,0$	$43 \pm 7,5$	$100 \pm 0,0$	

Captan (Control +)	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Control (-)	0 ± 0,0			

La tabla muestra las evaluaciones del promedio de tres replicas independientes para las concentraciones 50, 100, 150 y 300 ppm.

Debido al rendimiento en la síntesis y la baja cantidad de moléculas obtenidas para realizar las diversas pruebas biológicas del estudio, no fue posible testear todos los compuestos a 300 ppm.

Analizados los resultados de la aplicación, se observó una dependencia directa de la concentración para los efectos antifúngicos. Por otra parte, la totalidad de los compuestos presentaron mayor actividad antifúngica comparado con el brasinólido **BL**, a excepción del compuesto **95**, del tipo 3,6-dicetona, el cual presentó una inhibición de 1% en sus concentraciones 50 y 150 ppm.

Entre los productos que mostraron mayor actividad inhibitoria, se destacaron los compuestos **98** y **102**, los cuales presentaron valores de inhibición de 79% y 73%, respectivamente, a la más baja concentración (50 ppm). Ambos compuestos poseen estructuras altamente similares, con C3 α -hidroxilado, 6-oxo, fusión de anillos tipo *trans* y cadena lateral derivada de ácido cólico en C23 para el compuesto **102** y su metilester en **98**. Funciones que mostraron ser claves para una elevada actividad antifúngica. La desprotonación de la cadena lateral a pH fisiológico y con ello la incorporación de una carga negativa en la molécula podría ser importante en la disminución de la actividad mostrada por **102** respecto al análogo **98**. Además, el compuesto **112** mostró un 99% de inhibición de crecimiento micelital a 100 ppm, que junto a los compuestos **84**, **86** y **113** presentaron 100% de inhibición a una concentración de 150 ppm, igualando los resultados mostrados por el control positivo (fungicida comercial). Estos últimos 4 compuestos, tienen en común estructural el poseer funciones oxigenadas en los carbonos C22 y C23, en sus formas hidroxiladas y acetiladas.

Comparando las funciones individuales, la Tabla 5 presenta la serie de compuestos **95**, **96** y **97**, compuestos con modificaciones exclusivas en la función oxigenada del anillo A.

La oxidación de los hidroxilos en C3 y C6 llevó a la casi completa pérdida de la actividad antifúngica del compuesto **95**. La metoxilación de C3 en el compuesto **96** implicó la pérdida de aproximadamente la mitad de la actividad antifúngica respecto a C3 α -hidroxilado (28%, 23% en **96** y 60%, 66% en **97** a 50, 150 ppm, respectivamente). Con ello, se destaca la importancia de la función hidroxilada en C3 en la actividad antifúngica asociada a la estructura. Los resultados concuerdan con lo informado por bibliografía [55], particularmente con los estudios de estructura-actividad de la serie de análogos de testosterona (**12**), donde la sustitución del hidroxilo por una función cetona en C3 llevó a la pérdida de casi un 95% de la actividad del análogo.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro (% $\pm$ DS), para la serie **95**, **96** y **97** (modificación exclusiva en el anillo A) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm.

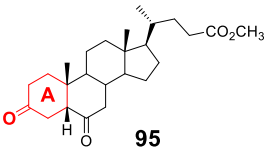
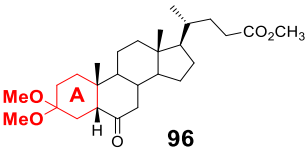
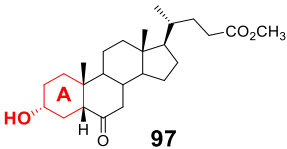
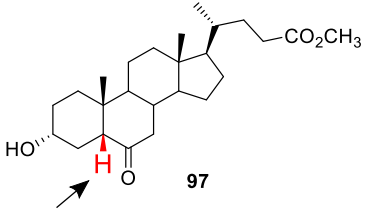
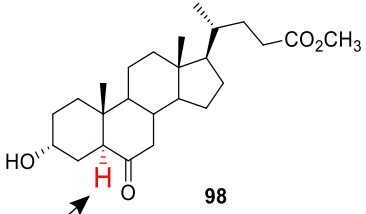
			
	95	96	97
50 ppm	1 $\pm$ 0,0	28 $\pm$ 2,8	60 $\pm$ 1,2
150 ppm	1 $\pm$ 0,0	23 $\pm$ 1,2	66 $\pm$ 0,8
300 ppm	22 $\pm$ 1,8	53 $\pm$ 2,0	91 $\pm$ 0,0
- Activo ➔ + Activo			

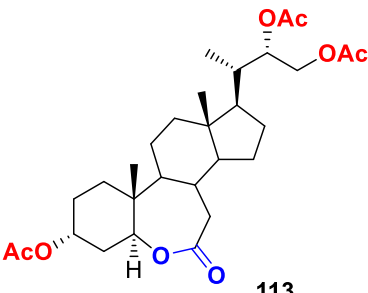
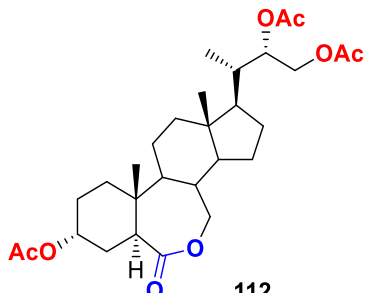
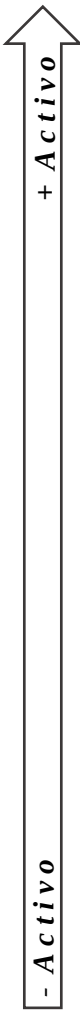
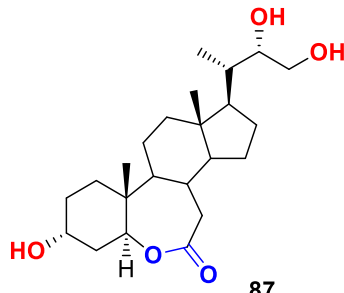
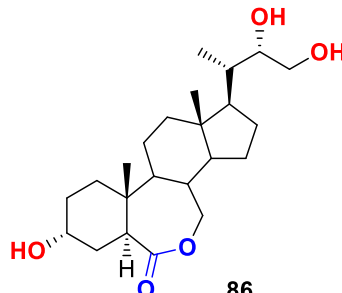
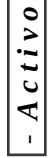
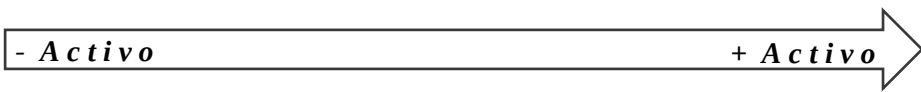
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro (% $\pm$ DS), para los compuestos **97** y **98** (modificación en la fusión de anillos A/B) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm.

		
	97	98
50 ppm	60 $\pm$ 1,2	79 $\pm$ 1,8
150 ppm	66 $\pm$ 0,8	86 $\pm$ 1,2
300 ppm	91 $\pm$ 0,0	91 $\pm$ 0,0
- Activo ➔ + Activo		

Por otro lado, analizando la Tabla 6, se puede observar como la modificación de la fusión de anillos A/B del tipo *cis* o *trans* afectó la actividad antifúngica de los análogos sintéticos de BRs. El análogo **97** con fusión de anillos A/B tipo *trans* presentó en promedio un 19% de mayor capacidad antifúngica a 50 y 100 ppm, respecto al análogo **98** con fusión de anillos tipo *cis*. Al incrementar la concentración de los análogos aplicados a 150 ppm, esta diferencia desaparece. Estos resultados concuerdan con lo observado por Seto *et al.* [63], donde la transformación de la fusión de anillos de *trans* a *cis* llevó a una pérdida total de la actividad medida a través de RLIT, lo que ratifica que la fusión de anillos es esencial para la actividad biológica.

La configuración de las funciones oxigenadas hidroxiladas o acetiladas, además de la orientación espacial de la lactona en el anillo B, mostraron una coherencia en la actividad antifúngica asociada a la estructura. Así, si se toman las concentraciones más bajas, los análogos que poseen función trihidroxilada mostraron en promedio un 46% de mayor actividad antifúngica respecto a los que poseen función triacetilada, los cuales alcanzaron en promedio un 29% de mayor actividad. Este comportamiento se presenta en la Tabla 7, donde se cotejan las actividades para los compuestos **86** y **112** (7-oxa-lactona) y en los compuestos **87** y **113** (6-oxa-lactona). Si hacemos la misma comparación, pero en función a la orientación de la lactona, los análogos 7-oxa-lactona mostraron, en promedio, un 21% de mayor actividad antifúngica, comparado con un 14% para los compuestos con función 6-oxa-lactona. Respecto a la configuración espacial de la función lactona en el anillo B, la bibliografía indica una clara diferencia en la actividad según su orientación [58] - [60]. La mayoría de los BRs más activos llevan la función 7-oxa-lactona, seguida en actividad por los BRs con función 6-ceto, y ambos a su vez más activos que la configuración 6-oxalactona. En este estudio se confirma esta tendencia, donde la configuración 6-oxa-lactona entregó, como media, los valores más bajos de actividad, pero se registraron 2 excepciones para los compuestos análogos **102** y **98**, los cuales siendo 6-ceto mostraron mayor actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* que su análogo 7-oxalactona.

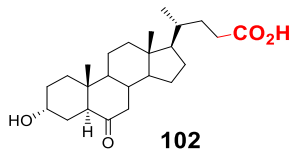
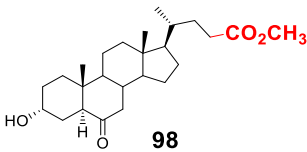
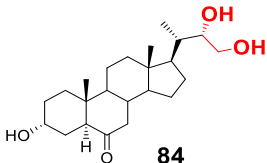
Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro (% $\pm$ DS), para la serie **86**, **87**, **112** y **113** (funciones 6-oxo/7-oxo en anillo B versus tipo de función oxigenada en C3, C22 y C23) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm.

	 113	 112	 + Activo
50 ppm	26 $\pm$ 9,0	62 $\pm$ 2,9	
150 ppm	43 $\pm$ 7,5	99 $\pm$ 0,0	
300 ppm	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	
	 87	 86	 - Activo
50 ppm	19 $\pm$ 0,0	41 $\pm$ 8,7	
150 ppm	19 $\pm$ 0,0	56 $\pm$ 6,8	
300 ppm	90 $\pm$ 2,3	100 $\pm$ 0,0	
	 - Activo		

También es posible ver el efecto de la modificación de la cadena lateral en el potencial antifúngico de los análogos sintetizados. La Tabla 8 presenta la serie **84**, **98** y **102**, todos ellos análogos, con estructuras idénticas salvo en su cadena lateral, con el fin de ver el efecto puntual de la modificación de esta en la actividad antifúngica. Se puede ver como el compuesto dihidroxilado **84** presentó mayor actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* (salvo en su más baja concentración), que los compuestos metilester **98**, y este

a su vez, mostró una tendencia a mayor actividad antifúngica que el análogo con cadena propia de los ácidos cólicos **102**. Es importante destacar que el compuesto **84** alcanza un 100% de inhibición de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* a una concentración de 150 ppm. Los resultados mostrados para este análisis son variables para la configuración de las funciones oxigenadas en las estructuras tipo 24-nor. La existencia de funciones hidroxiladas o acetiladas no muestran clara tendencia y parecen estar fuertemente influenciadas por la configuración funcional del resto de la estructura. Por otro lado, la configuración de las cadenas laterales carboxílicas y con éster de metilo, Wei-Shan *et al.* [89] describió como menos activos que lo observado en este estudio, donde compuestos como **89** presentaron los valores más altos de actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* para su concentración (50 ppm).

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro (% $\pm$ DS), para la serie **84**, **98** y **102** (modificación exclusiva de la cadena lateral) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm.

	 102	 98	 84
50 ppm	73 $\pm$ 1,2	79 $\pm$ 1,8	51 $\pm$ 0,0
150 ppm	78 $\pm$ 1,2	86 $\pm$ 1,2	92 $\pm$ 1,1*
300 ppm	89 $\pm$ 0,0	91 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0**

* 100 ppm, ** 150 ppm

- *Activo*

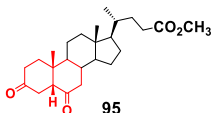
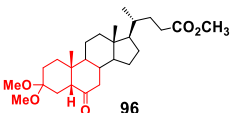
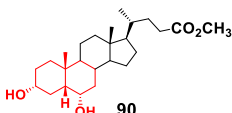
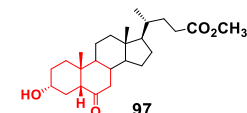
+ *Activo*

Se agrupó a los compuestos por funciones y se les ordenó según la actividad antifúngica presentada a la más baja concentración ensayada.

La Tabla 9 muestra la serie de compuestos **95**, **96**, **97** y **98**, que corresponde a análogos de BRs con cadena lateral funcionalizada en metilester. En esta tabla, se puede ver como el efecto de las funciones oxigenadas en los anillos A y B es claro. La presencia de un hidroxilo en C3 y una cetona en C6 incrementó la efectividad antifúngica de los análogos de la serie, por otro lado, la dioxidación simultanea de C3 y C6 llevó a la pérdida casi

completa de su actividad, como se ve en el análogo **95**. Este fenómeno fue visto en otros ensayos realizados en esta tesis (actividad antineoplásica). Es probable que la formación de alguna interacción tipo puente de hidrógeno sea clave para la actividad del compuesto, esto se ve también en el compuesto **96** que, si bien posee funciones hidrogenadas en C3, este está menos polarizado que en los compuestos **97** y **90**, por ser de origen metílico.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro (% $\pm$ DS), para la serie **90**, **95**, **96** y **97** (cadena lateral metilester) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm.

				
50 ppm	1 $\pm$ 0,0	28 $\pm$ 2,8	36 $\pm$ 2,0	60 $\pm$ 1,2
150 ppm	1 $\pm$ 0,0	23 $\pm$ 1,2	86 $\pm$ 1,2	66 $\pm$ 0,8
300 ppm	22 $\pm$ 1,8	53 $\pm$ 2,0	89 $\pm$ 2,2	91 $\pm$ 0,0

- **Activo**
➔
+ **Activo**

La Tabla 10 muestra la serie de compuestos **53**, **98**, **101**, **102** y **103**, que corresponde a análogos de BRs con cadena lateral tipo no 24-nor (larga). Esta serie incluye a los análogos con cadena lateral metilester y propia de los ácidos cólicos.

Estos resultados están fuertemente correspondidos a lo informado por Takatsuto *et al.* [55] para los anillos A/B. En todos los casos se observan las tendencias descritas en bibliografía, salvo el caso particular del compuesto análogo de castasterona **101**, el cual entregó la menor actividad a la más baja concentración (50 ppm). Takatsuto describe que la modificación de los hidroxilos 2 α , 3 α en el 28-homo-brasinólido redujo considerablemente la actividad biológica en RLIT, sólo por perder o modificar sus funciones en C2-C3.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro (% $\pm$ DS), para la serie **53, 98, 101, 102 y 103** (cadena lateral de ácidos cólicos) para las concentraciones 50, 150 y 300 ppm.

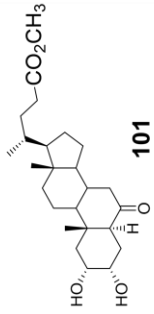
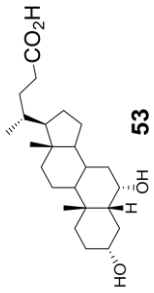
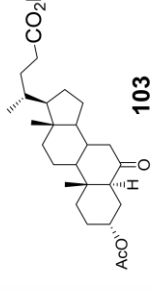
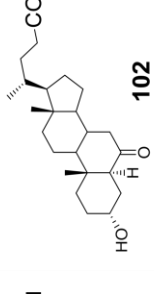
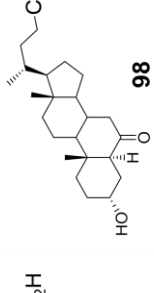
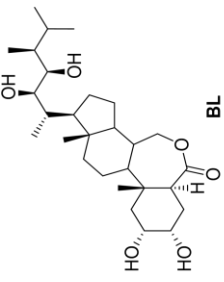
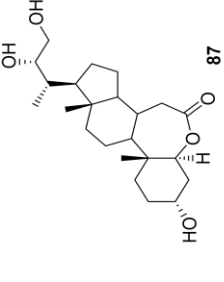
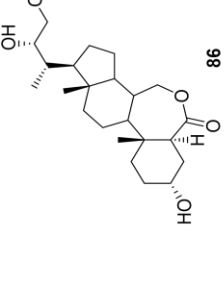
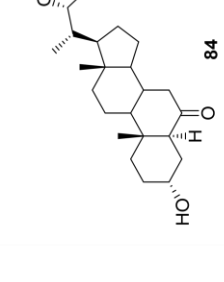
					
50 ppm	45 $\pm$ 1,0	49 $\pm$ 1,2	55 $\pm$ 1,8	73 $\pm$ 1,2	79 $\pm$ 1,8
150 ppm	77 $\pm$ 3,2	82 $\pm$ 1,0	64 $\pm$ 1,8	78 $\pm$ 1,2	86 $\pm$ 1,2
300 ppm	94 $\pm$ 1,0	99 $\pm$ 0,0	74 $\pm$ 1,2	89 $\pm$ 0,0	91 $\pm$ 0,0
- <i>Activo</i> + <i>Activo</i>					

Tabla 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro (% $\pm$ DS), para la serie **BL, 84, 86 y 87** (cadena lateral dihidroxilada) para las concentraciones 50, 100 y 150 ppm.

				
50 ppm	10 $\pm$ 2,2	19 $\pm$ 0,0	41 $\pm$ 8,7	51 $\pm$ 0,0
100 ppm	55 $\pm$ 4,1	19 $\pm$ 0,0	56 $\pm$ 6,8	92 $\pm$ 1,1
150 ppm	55 $\pm$ 1,5	90 $\pm$ 2,3	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
- <i>Activo</i> + <i>Activo</i>				

En esta serie, se ratifica que C3 hidroxilado y la presencia de una cetona en C6 incrementó la efectividad antifúngica de los compuestos, como se puede ver en los compuestos **98** (metilester) y **102** (tipo ácido cólico). La presencia de un hidroxilo en C2 disminuyó fuertemente la actividad del compuesto **101** a 50 ppm, variando en un 34% si se compara con su análogo equivalente no hidroxilado **98**. Esta disminución desaparece a concentraciones mayores, quedando 5% sobre el promedio de las actividades mostradas a 300 ppm.

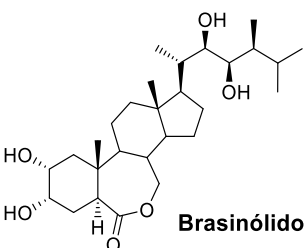
La Tabla 11 muestra la serie de compuestos **BL**, **84**, **86** y **87**, que corresponde a análogos de BRs con cadena lateral tipo 24-nor dihidroxiladas en C22-C23. Esta serie sólo se analizó el efecto de la presencia de una función hidroxilada en C3 y la presencia de una función lactona y su orientación en el anillo B, debido a que la síntesis dirigida no permitió la presencia de otros tipos de análogos.

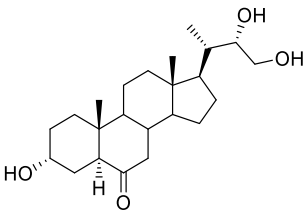
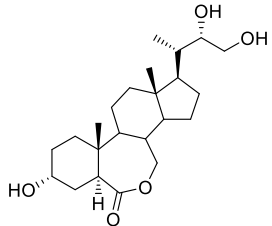
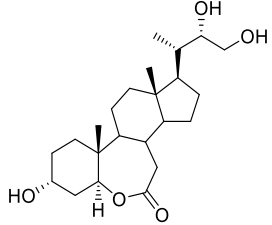
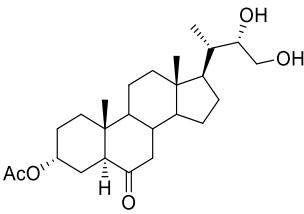
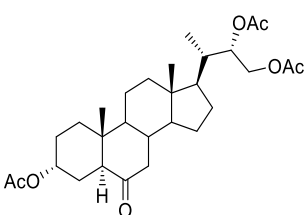
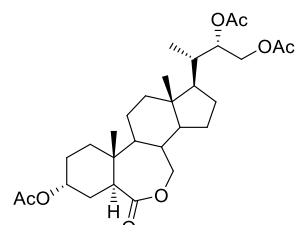
En su configuración trihidroxilado, el compuesto **84**, un análogo de tipo 24-nor-tifasterol, se presentó como el más activo de la serie, superando en 45% la actividad mostrada por **BL** y en 10% al análogo de BRs lactonizado con mayor actividad (**86**). Así, en su configuración trihidroxilada, los análogos de BRs son más activos en ausencia de función lactona en el anillo B. Respecto a la orientación de la función lactona, el compuesto 7-oxa-lactona (**86**) superó en 22% la actividad del compuesto 6-oxa-lactona (**87**), pero, aun así, el compuesto **87** superó en 9% la actividad mostrada por **BL**.

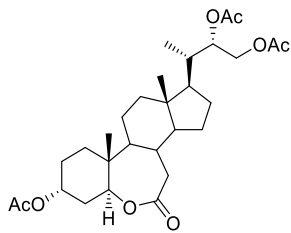
Resultados y discusiones de la evaluación de los análogos de brasinoesteroides sintetizados como promotores de elongación celular vegetal

Si bien, no fue una cuantificación planteada en los objetivos iniciales de esta tesis, y debido a que la promoción del crecimiento vegetal es una de las propiedades intrínsecas de los BRs naturales [3], se midió el efecto de la aplicación de los análogos de BRs sintetizados **84, 86, 87, 109, 111, 112** y **113**, como promotores de elongación celular vegetal. La cuantificación se realizó mediante el test de Inclínación de la lámina de arroz (RLIT), procedimiento creado por Wada *et al.* 1981 [107] con modificaciones menores de Duran *et al.* 2017 [108], usando brasinólido **BL** como control positivo de actividad. La Tabla 12 muestra las moléculas evaluadas y el efecto de la aplicación de estos análogos sintéticos de BRs en el grado de 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 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M. En el Anexo J se entrega el registro visual del ensayo RLIT y los ángulos obtenidos posterior a la aplicación de los diferentes análogos testeados.

Tabla 12. Efecto de la aplicación de análogos de BRs sobre la inclinación de la lámina de arroz (ángulo promedio de apertura en grados $\pm$ DS).

Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (M)		
		1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}
BL		$31 \pm 11,0$	$41 \pm 4,5$	$70 \pm 7,5$

84		$35 \pm 0,0$	$60 \pm 2,7$	$62 \pm 13,1$
86		$40 \pm 2,7$	$37 \pm 4,2$	$45 \pm 2,9$
87		$18 \pm 2,2$	$24 \pm 2,2$	$46 \pm 9,5$
109		$5 \pm 0,0$	$13 \pm 0,0$	$28 \pm 0,0$
111		$34 \pm 3,5$	$45 \pm 2,7$	$53 \pm 6,7$
112		$33 \pm 2,7$	$44 \pm 2,3$	$61 \pm 11,8$

113		$13 \pm 3,5$	$25 \pm 4,5$	$40 \pm 2,9$
Control (-)		$8 \pm 5,0$		

La tabla muestra el ángulo promedio de apertura $\pm$ DS, producto de seis replicas independientes para las concentraciones 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M.

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. Una observación importante es que varios de los compuestos analizados presentaron mayor actividad como promotores de crecimiento vegetal que el control positivo **BL**. Si hacemos el análisis porcentual, a la más baja concentración (1×10^{-8} M), los compuestos **86**, **84**, **111** y **112**, superaron a **BL** en 29%, 13%, 10% y 6%, respectivamente. A una concentración de 1×10^{-7} M, los compuestos **84**, **111** y **112**, superaron a **BL** en 46%, 10% y 7%, respectivamente. Sólo a una concentración de 1×10^{-6} M **BL** fue el compuesto más activo como promotor de crecimiento vegetal, siendo seguido por **112** que tuvo un 11% menor actividad que **BL**. Porcentualmente y en función a **BL**, los resultados más destacados fueron: el efecto del compuesto **84** a una concentración de 1×10^{-7} M, seguido por el efecto de **86** a una concentración de 1×10^{-8} M. Por otro lado, los compuestos **109**, **87** y **113** mostraron la menor actividad promotora de crecimiento vegetal, que fue más evidente en los ensayos a menor concentración, entregando para el compuesto análogo **109** un nivel de actividad de sólo el 16% de lo mostrado por **BL**, a la misma concentración.

Debido al número reducido de moléculas testeadas en su actividad como promotoras de crecimiento vegetal, las características estructurales analizadas fueron: la hidroxilación o acetilación de los carbonos C22-C23 en la cadena lateral, y la presencia y orientación de la función lactona en el anillo B.

Tabla 13. Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados $\pm$ DS) para la serie **BL**, **84**, **86** y **87** (cadena lateral dihidroxilada) a concentraciones 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M.

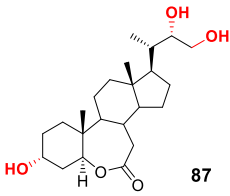
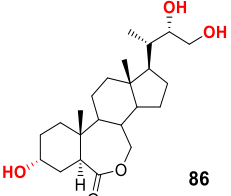
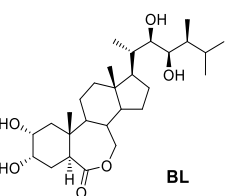
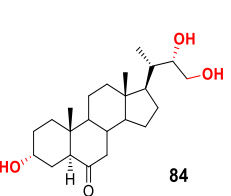
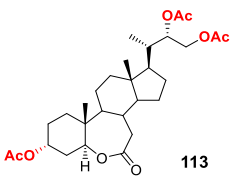
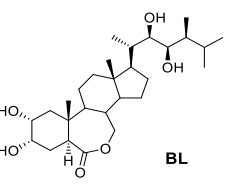
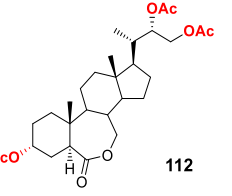
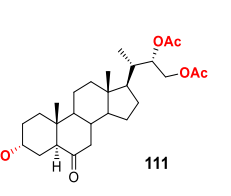
				
1×10^{-8} M	$18 \pm 2,2$	$40 \pm 2,7$	$31 \pm 11,0$	$35 \pm 0,0$
1×10^{-7} M	$24 \pm 2,2$	$37 \pm 4,2$	$41 \pm 4,5$	$60 \pm 2,7$
1×10^{-6} M	$42 \pm 9,5$	$45 \pm 2,9$	$70 \pm 7,5$	$62 \pm 13,1$
- Activo + Activo				

Tabla 14. Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados $\pm$ DS) para la serie **BL**, **111**, **112** y **113** (cadena lateral acetilada + BL) a concentraciones 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M.

				
1×10^{-8} M	$13 \pm 3,5$	$31 \pm 11,0$	$33 \pm 2,7$	$34 \pm 3,5$
1×10^{-7} M	$25 \pm 4,5$	$41 \pm 4,5$	$44 \pm 2,3$	$45 \pm 2,7$
1×10^{-6} M	$40 \pm 2,9$	$70 \pm 7,5$	$61 \pm 11,8$	$53 \pm 6,7$
- Activo + Activo				

Ordenados los análogos de BRs de cadena lateral 24-nor con C22-C23 dihidroxilados y diacetilados, según su actividad como promotores de crecimiento vegetal, se obtuvieron las series **BL**, **84**, **86** y **87**/ **BL**, **111**, **112** y **113**, los cuales son presentadas en las Tablas 13 y 14. En la Tabla 13 el compuesto que presentó mayor actividad fue **84**, en 2 de las 3 concentraciones evaluadas. Así, a la más baja concentración el análogo **84** fue 11% más activo que **BL** a 1×10^{-8} M y 31% más activo que **BL** a 1×10^{-7} M, pero esa ventaja se revirtió a una pérdida de 13% de actividad a 1×10^{-6} M. Por otro lado, en la Tabla 14 Los

compuestos triacetilados **111** y **112** superaron a **BL** en las 2 concentraciones más bajas del total evaluado. Analizando globalmente, entre los compuestos análogos sintetizados evaluados, se ve una clara tendencia; tanto en compuestos dihidroxilados como en diacetilados, los análogos de BRs de tipo 24-nor-tifasterol (**84**, **111**) como las que poseen función 7-oxa-lactona en el anillo B (**86**, **112**) presentaron mayor actividad como promotoras de crecimiento vegetal que la estructura 6-oxalactona (**87**, **113**). Entre los análogos que poseen función triacetilada, el promedio de apertura fue de 40 grados para análogos 7-oxa-lactona (**86**) y 29 grados para análogos 6-oxa-lactona (**87**). Para los análogos que poseen función trihidroxilada, el promedio de apertura fue de 46 grados para análogos 7-oxa-lactona (**112**) y un promedio de 26 grados para análogos 6-oxa-lactona (**113**). De esto se puede inferir, que, para esta configuración de análogos, los compuestos acetilados son más activos que los análogos hidroxilados y que la posición del oxígeno en la función lactona del anillo B, cuando está en posición 7 por sobre 6, favorece la actividad como promotoras de crecimiento vegetal.

Respecto a las actividades según la presencia u orientación de la función lactona en el anillo B, hay concordancia a lo presentado en bibliografía, donde se expone una clara diferencia en la actividad según su orientación de la función dentro del anillo [58] - [60]. En general, la mayoría de los BRs más activos llevan la función 7-oxa-lactona, seguida en actividad por los BRs con función 6-ceto, pero se registraron 2 excepciones para los compuestos análogos **84** y **111**, los cuales siendo 6-ceto mostraron mayor actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* que su análogo 7-oxa-lactona. El principal punto a discutir es la elevada actividad mostrada por los análogos tipo 24-nor trihidroxilados/triacetilados, muchos de los cuales mostraron ser mejores promotores de crecimiento vegetal que **BL**. Son muy pocos los análogos de BRs “superactivos” o más activos que **BL**, reportados en bibliografía, tanto naturales como sintéticos. Bibliografía nos muestra estructuras tipo arilbrasinoesteroides [79]-[80], acilbrasinoesteroides [82] y análogos de BRs de tipo androstanos [83], todos ellos con una fuerte analogía estructural con **BL**, a diferencia de las estructuras tipo 2-desoxi aquí presentadas.

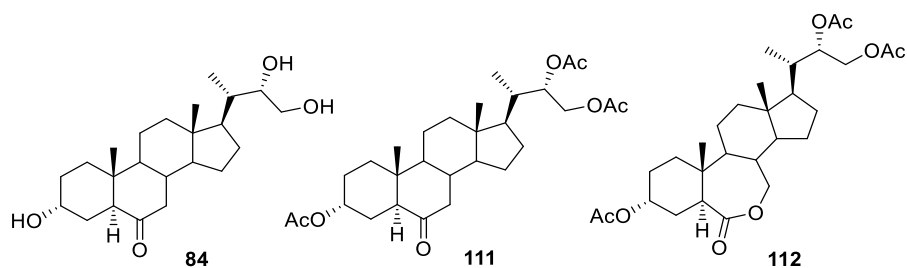


Figura 68. Análogos sintéticos 84, 111 y 112, los cuales presentaron mayor actividad promotora del crecimiento vegetal en test RLIT

Resultados y discusiones de la evaluación de la actividad citotóxica de los análogos de brasinoesteroides sintetizados en líneas celulares tumorales *in vitro*

El siguiente objetivo fue evaluar el potencial citotóxico de los análogos sintéticos de BRs frente a líneas celulares de cáncer de diverso origen histopatológico. Para ello, se cuantificó la viabilidad celular posterior a la aplicación de 18 de los compuestos análogos sintetizados, mediante el ensayo colorimétrico con SRB, sobre tres líneas celulares neoplásicas y una línea celular normal como control. Las líneas celulares neoplásicas utilizadas fueron: PC-3, línea de cáncer de próstata; HT-29, línea de cáncer colorrectal MCF7; línea de cáncer de mama; CoN, línea celular epitelial no tumoral de colon como control de ensayo.

La exposición de las líneas celulares a los análogos sintéticos de BRs se hizo en 2 grupos, el primero integrado por moléculas intermediarias de la ruta de síntesis, las cuales se evaluaron a 2 concentraciones (50 y 100 μM), y el segundo grupo integrado por moléculas objetivos final de síntesis, las cuales se evaluaron a 3 concentraciones (25, 50 y 100 μM).

La Figura 69 muestra todas las moléculas intermediarias de la ruta de síntesis evaluadas,

mientras la Figura 70 muestra las moléculas objetivo final de síntesis evaluadas. (Los Anexos K, L, M y N contienen las tablas con todos los valores obtenidos del cálculo de citotoxicidad con su correspondiente desviación estándar).

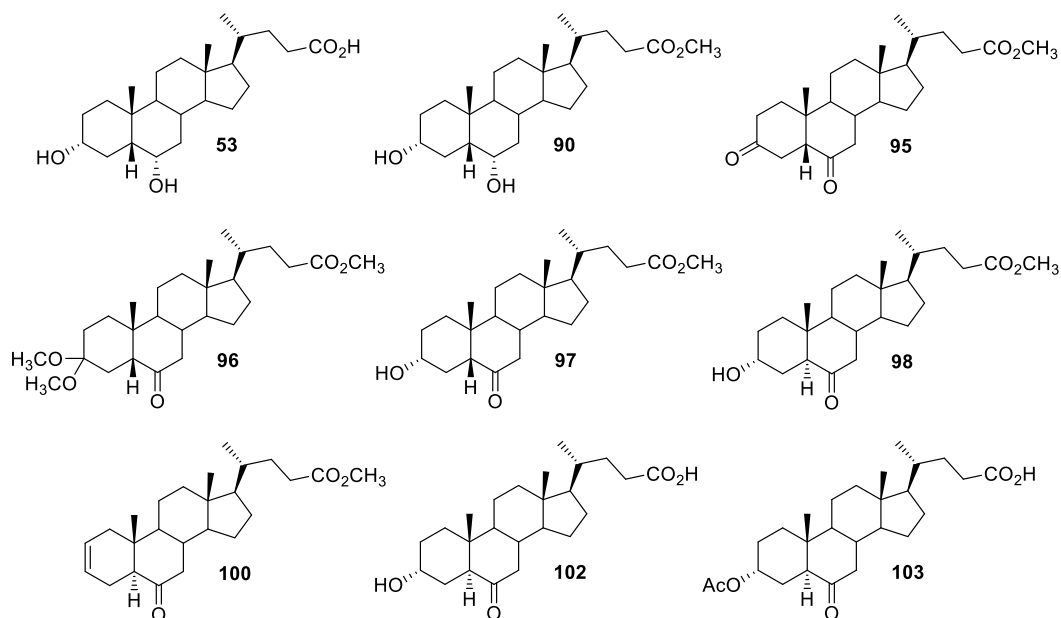


Figura 69. Análogos sintéticos de BRs evaluados en el primer grupo (moléculas intermediarias de síntesis).

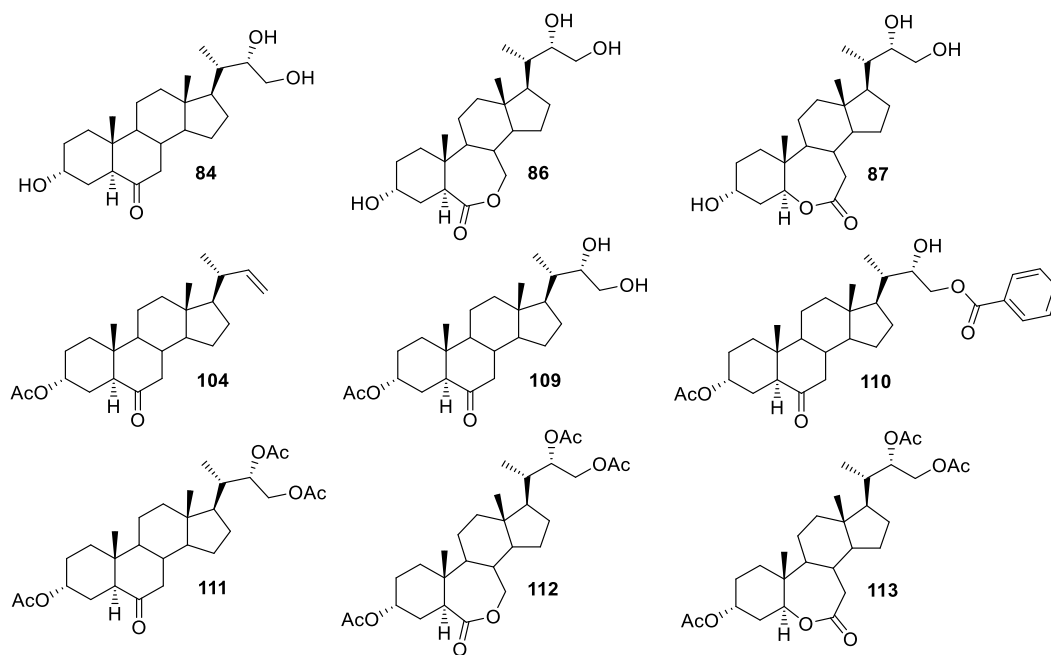


Figura 70. Análogos sintéticos de BRs evaluados en el segundo grupo (moléculas objetivo final de síntesis).

La primera evaluación corresponde a la cuantificación del efecto citotóxico de los análogos sintéticos de BRs en línea celular CoN (células epiteliales no tumorales de colon), utilizada como control de inocuidad general de los compuestos.

La Figura 71 muestra los niveles de citotoxicidad de los compuestos análogos obtenidos como intermediarios de síntesis contra línea celular control. En general, los compuestos analizados mostraron una dependencia directa de la concentración. A una concentración de 50 μ M, los compuestos **98**, **100** y **102** mostraron los menores niveles de variación, con 102,6%, 100,5% y 103,1%, respectivamente. El compuesto **96** entregó una viabilidad de 64,6 % respecto al control, pero debido a su elevada dispersión no es estadísticamente diferente a este. A una concentración de 100 μ M todos los compuestos presentaron una variación respecto a su control, salvo el compuesto **53** que entregó una viabilidad de 95,9%.

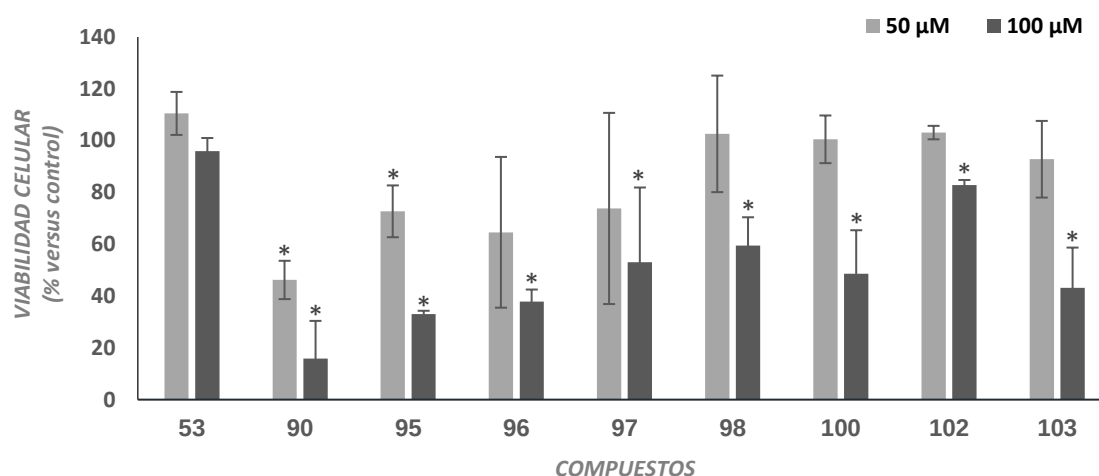


Figura 71. Citotoxicidad de los análogos de BRs obtenidos como intermediarios de síntesis contra línea celular CoN (célula epitelial de colon normal). El gráfico presenta los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones (50 y 100 μ M). Los resultados se presentan como el promedio $\pm$ DS. * Significancia estadística evaluada por ANOVA a dos vías con respecto su correspondiente control negativo con $p < 0.001$.

La Figura 72 muestra los niveles de citotoxicidad de los compuestos análogos obtenidos como objetivos finales de síntesis contra la línea celular control. A la más baja concentración (25 μ M) los compuestos **86**, **87**, **104**, **112** y **113** presentaron elevada actividad citotóxica, llegando incluso a 72,8% para el compuesto **87**. Al aumentar la concentración a 50 μ M, el compuesto **113** se sumó a aquellos que mostraron ser

citotóxicos. Por último, a una concentración de 100 μM , sólo los compuestos **109**, **110** y **111** mostraron bajos niveles de citotoxicidad frente a línea celular control. El compuesto **110** mostró valores superiores a 100%, estadísticamente significativo, implicando que a esa concentración se comporta como un inductor de proliferación celular, efecto contrario a lo buscado.

Analizando la estructura de los compuestos **109** y **111**, los cuales presentaron una mínima citotoxicidad celular, se puede ver una elevada analogía estructural. Ambos compuestos poseen una función mono-oxigenada acetilada en C3, fusión de anillos A/B tipo *trans*, función 6-oxo no lactonizada en el anillo B y funciones oxigenadas en C22 y C23 (Figura 73).

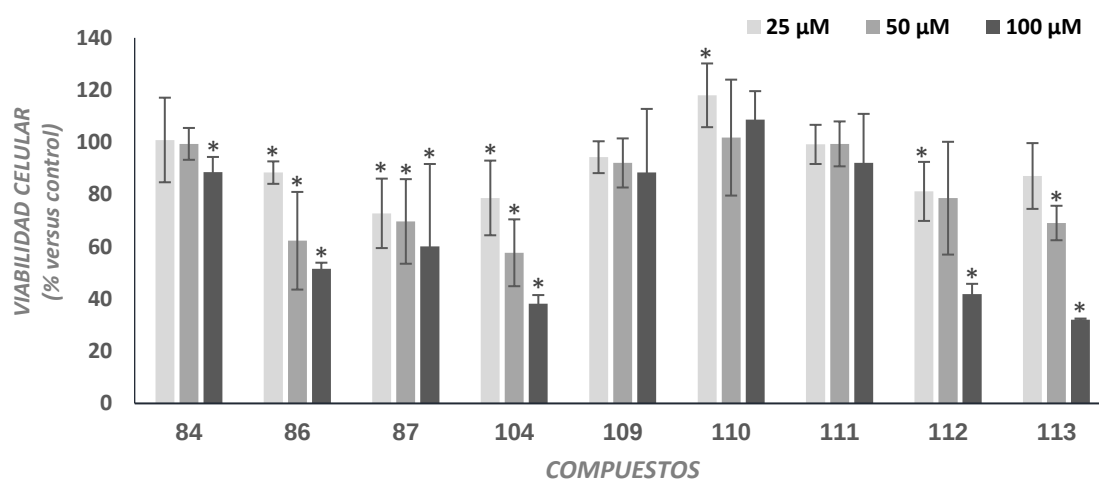


Figura 72. Citotoxicidad de los análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea celular CoN (célula epitelial de colon normal). El gráfico presenta los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones (25, 50 y 100 μM). Los resultados se presentan como el promedio $\pm$ DS. * Significancia estadística evaluada por ANOVA a dos vías con respecto su correspondiente control negativo con $p < 0.001$.

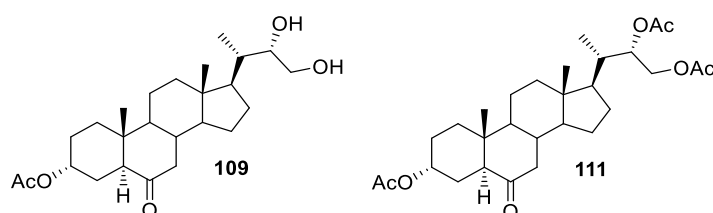


Figura 73. Análogos de BRs que presentaron la menor variación de porcentaje de viabilidad posterior a la exposición de las células a los compuestos. Se puede apreciar la elevada analogía estructural entre ambos compuestos.

El siguiente ensayo fue la cuantificación del efecto citotóxico de los análogos sintéticos de BRs contra línea de células epiteliales tumorales de próstata (PC-3).

La Figura 74 muestra los niveles de citotoxicidad de los compuestos análogos obtenidos como intermediarios de síntesis frente a PC-3. En este grupo, el compuesto **53** mostró ser inductor de proliferación celular ambas concentraciones testeadas, al incrementar el porcentaje de viabilidad celular respecto al basal, quedando fuera de interés de estudio para línea PC-3. Nuevamente, se observa una dependencia directa con la concentración del análogo aplicado. En general, los ensayos realizados en la línea celular PC-3 presentaron una mayor dispersión comparados con la línea CoN. A una concentración de 50 μM destacó únicamente el compuesto **96**, con una viabilidad celular de 43,9%. Al incrementar la concentración a 100 μM , los compuestos **90**, **97**, **98**, **100** y **103**, presentaron una viabilidad celular de 12,2%, 55,5%, 78,3%, 65,4% y 37,8%, respectivamente.

La Figura 75 muestra los niveles de citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis frente a PC-3. El compuesto **104** mostró ser inductor de proliferación celular a una concentración de 25 μM . Nuevamente, se observa una dependencia directa con la concentración del análogo aplicado. Casi todos los análogos mostraron un efecto citotóxico sobre la línea celular PC-3, destacando los compuestos **112**, **84** y **109**, con viabilidades porcentuales particularmente bajas (41,3, 49,3 y 52,5 %, respectivamente).

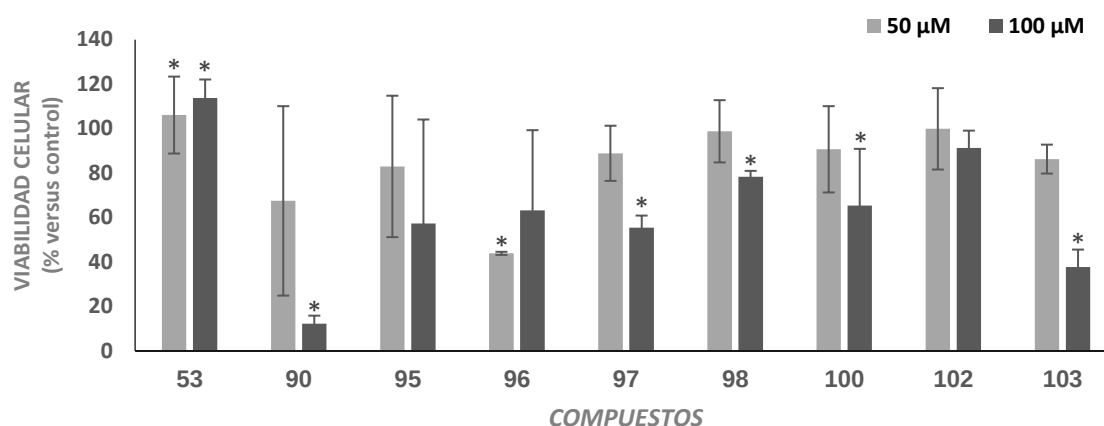


Figura 74. Citotoxicidad de los análogos de BRs obtenidos como intermediarios de síntesis contra línea celular PC-3 (células epiteliales tumorales de próstata). El gráfico presenta los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones (50 y 100 μM). Los resultados se presentan como el promedio ± DS. * Significancia estadística evaluada por ANOVA a dos vías con respecto su correspondiente control negativo con $p < 0.001$.

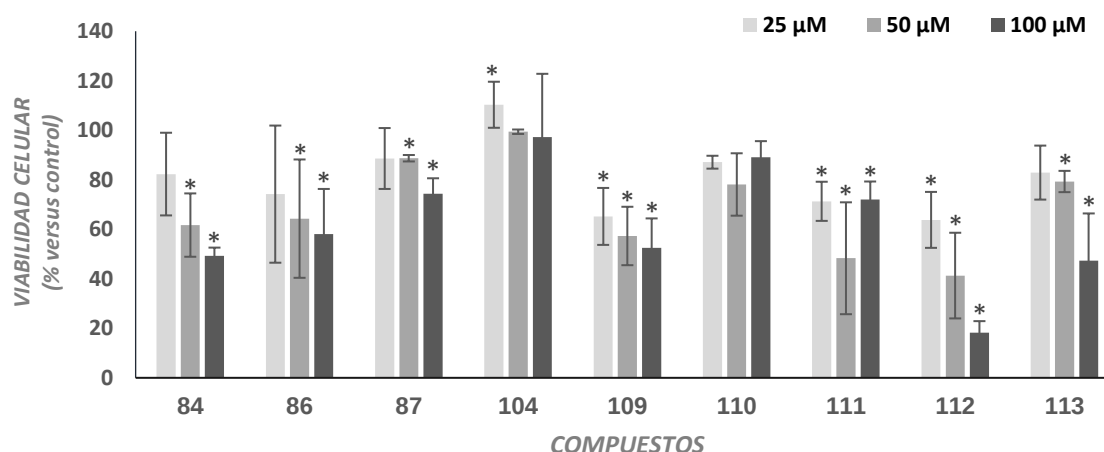


Figura 75. Citotoxicidad de los análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea celular - 3 (células epiteliales tumorales de próstata). El gráfico presenta los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones (25, 50 y 100 μM). Los resultados se presentan como el promedio ± DS. * Significancia estadística evaluada por ANOVA a dos vías con respecto su correspondiente control negativo con $p < 0.001$.

En general, los compuestos **109**, **111**, **112** y **113** entregaron bajos porcentajes de viabilidad celular. Estos 4 compuestos están muy relacionados estructuralmente, sobre todo en la conformación de su cadena lateral, con funciones oxigenadas en C22 y C23. Entre ellos destacan los compuestos **109** y **111** (Figura 73), los cuales, además de producir una disminución considerable de viabilidad celular en línea de cáncer PC-3

(57,3 % y 48,3 %), no generaron mayor alteración en los niveles celulares de la línea celular CoN (94,3 % y 99,2 %, respectivamente) (Figuras 74 y 75).

El siguiente ensayo fue la cuantificación del efecto citotóxico de los análogos sintéticos de BRs contra línea de células epiteliales tumorales de colon (HT-29). La línea HT-29 mostró ser particularmente sensible a la exposición a los análogos tal y como se muestra en las figuras 76 y 77. Nuevamente, se observa una dependencia directa con la concentración del análogo aplicado.

La Figura 76 muestra los niveles de citotoxicidad de los compuestos análogos de BRs obtenidos como intermediarios de síntesis contra la línea HT-29. En este grupo, destacan los compuestos **90** y **97**, los cuales presentaron elevada citotoxicidad en ambas concentraciones aplicadas (50 y 100 μ M), llegando a niveles de viabilidad celular de 8,0% y 29,9%, respectivamente.

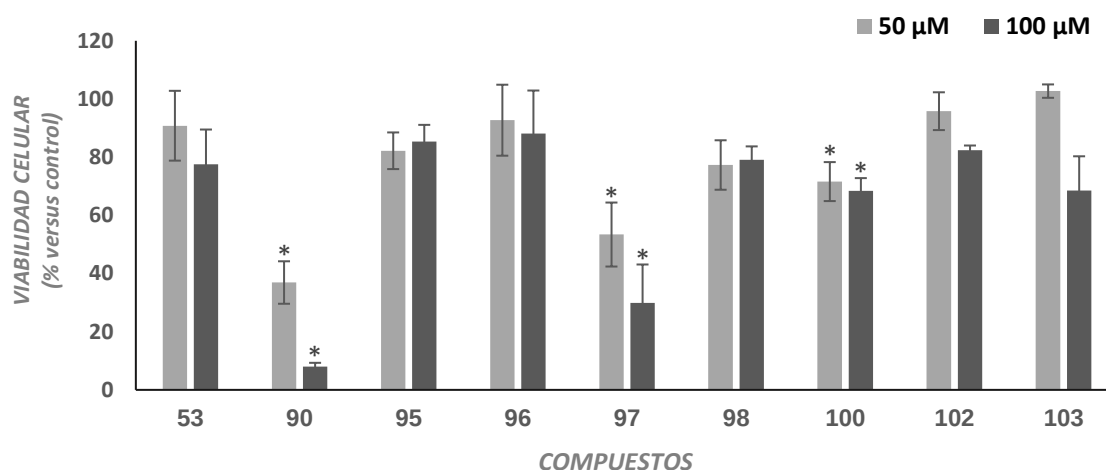


Figura 76. Citotoxicidad de los análogos de BRs obtenidos como intermediarios de síntesis contra línea celular HT-29 (células epiteliales tumorales de colon). El gráfico presenta los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones (50 y 100 μ M). Los resultados se presentan como el promedio $\pm$ DS. * Significancia estadística evaluada por ANOVA a dos vías con respecto su correspondiente control negativo con $p < 0.001$.

La Figura 77 muestra los niveles de citotoxicidad de los compuestos análogos obtenidos como objetivos finales de síntesis contra la línea HT-29. En este grupo, casi todos los compuestos presentaron actividad citotóxica elevada, salvo los compuestos **104** y **110** que parecen ser inductores de proliferación celular frente a HT-29. Destacan

particularmente los compuestos **84**, **86**, **87** que presentaron baja viabilidad celular en las tres concentraciones testeadas, con valores de 18,3, 27,3 y 20,2% a los 100 μ M.

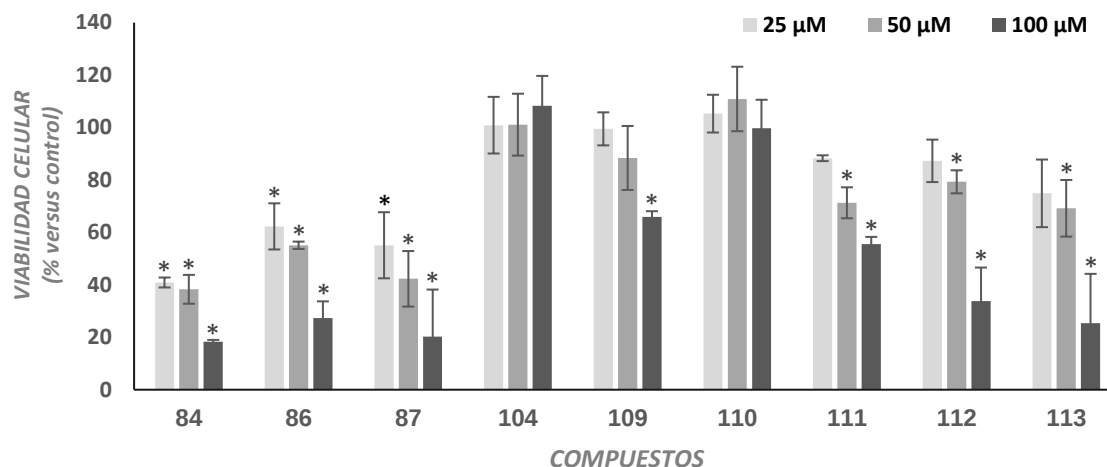


Figura 77. Citotoxicidad de los análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea celular HT-29 (células epiteliales tumorales de colon). El gráfico presenta los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones (25, 50 y 100 μ M). Los resultados se presentan como el promedio $\pm$ DS. * Significancia estadística evaluada por ANOVA a dos vías con respecto su correspondiente control negativo con $p < 0.001$.

Los compuestos **84**, **86** y **87**, de elevada actividad citotóxica contra HT-29, poseen función glicol en C22-C23 y función hidroxilo en posición C3, clasificando estos compuestos como análogos trihidroxilados de BRs (Figura 78).

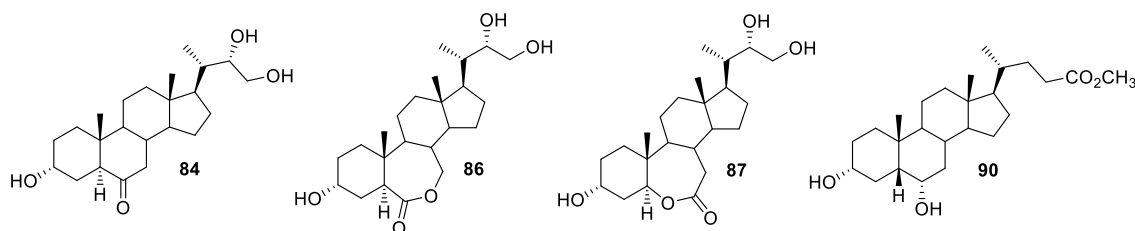


Figura 78. Análogos de BRs que presentaron mayor actividad citotóxica frente a la línea celular HT-29.

Por último, se cuantificó el efecto citotóxico de los análogos sintéticos de BRs contra línea celular MCF7 (células epiteliales tumorales de mama). Esta línea celular sólo fue

evaluada para los compuestos análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis. La línea celular MCF7 no mostró ser tan sensible a la presencia de los análogos, en comparación con HT-29. En este grupo, de un total de 9 compuestos evaluados, sólo los productos **86**, **109**, **110** y **112** respondieron disminuyendo la viabilidad porcentual respecto al promedio basal. Los resultados entregados por esta línea no parecen ser significativos para estos compuestos, debido a la elevada dispersión de los valores obtenidos. (Figura 79)

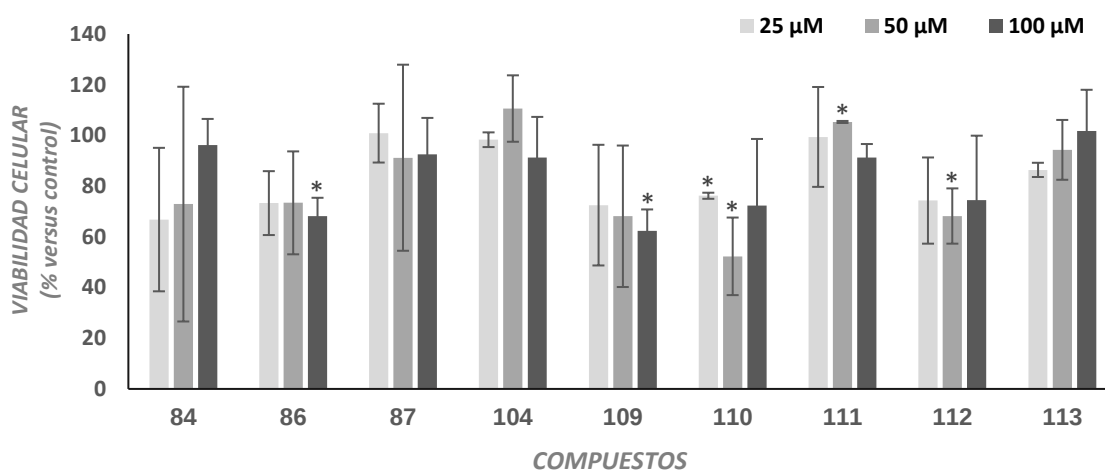


Figura 79. Citotoxicidad de los análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra línea celular MCF7 (células epiteliales tumorales de pecho). El gráfico presenta los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones (25, 50 y 100 μM). Los resultados se presentan como el promedio ± DS. * Significancia estadística evaluada por ANOVA a dos vías con respecto su correspondiente control negativo con $p < 0.001$.

A partir de los valores de citotoxicidad de los compuestos, se procedió a calcular la concentración IC_{50} respecto a las distintas líneas celulares evaluadas (Tabla 15). Es necesaria la evaluación a 3 o más concentraciones para obtener una regresión sigmoideal que entregue un IC_{50} coherente, por ello, este cálculo se realizó sólo para las moléculas objetivos finales de síntesis, ya que las moléculas intermediarias fueron evaluadas para concentraciones (50 y 100 μM). Por otro lado, el cálculo de IC_{50} limitado a la evaluación de 3 concentraciones entrega sólo un valor estimado.

Tabla 15. Valores de IC_{50} (μM) estimado e índice de selectividad de los análogos de BRs obtenidos como objetivos finales de síntesis contra las distintas líneas celulares estudiadas.

Nº Compuesto	CoN	PC-3		HT-29		MCF7	
	$IC_{50} (\mu M)$ $\pm DS$	$IC_{50} (\mu M)$ $\pm DS$	Índice selectividad	$IC_{50} (\mu M)$ $\pm DS$	Índice selectividad	$IC_{50} (\mu M)$ $\pm DS$	Índice selectividad
84	-	91,9 $\pm$ 12,1	-	21,4 $\pm$ 10,8	-	-	-
86	> 100	> 100	0,8	50,5 $\pm$ 7,7	2,1	-	-
87	> 100	> 100	0,7	33,5 $\pm$ 2,1	4,8	-	-
104	64,2 $\pm$ 6,4	-	-	-	-	-	-
109	-	> 100	-	> 100	-	> 100	-
110	-	-	-	-	-	-	-
111	-	-	-	> 100	-	-	-
112	89,3 $\pm$ 5,1	38,6 $\pm$ 9,2	2,3	83,3 $\pm$ 2,3	1,1	-	-
113	75,2 $\pm$ 3,7	96,3 $\pm$ 5,7	0,8	67,9 $\pm$ 9,9	1,1	-	-

El índice de selectividad fue calculado sólo para los compuestos que presentaron concentraciones de IC_{50} válidas ($R > 0,9$).

Respecto a la línea celular control, sólo los compuestos **86**, **87**, **104**, **112** y **113** entregaron valores de IC_{50} válidos (linealidad de regresión con $R > 0,9$), y de estos compuestos, sólo **104**, **112** y **113** entregaron concentraciones de IC_{50} menores a 100 μM (interpolables en la regresión). La no validez de los valores IC_{50} para los compuestos **84**, **109**, **110** y **111** es importante, ya que impide calcular índice de selectividad de estos compuestos.

Para la línea celular PC-3, los compuestos **84**, **112** y **113** entregaron concentraciones válidas, destacando el compuesto **112** que entregó un valor de IC₅₀ de 38,6 µM. Para la línea celular HT-29, los compuestos **84**, **86**, **87**, **112** y **113** entregaron concentraciones válidas, destacando los compuestos **84** y **87** con valores de IC₅₀ de 21,4 µM y 33,5 µM, respectivamente. La línea MCF7 no entregó ningún valor de IC₅₀ válido, salvo el compuesto **109** con una concentración >100 µM.

Analizando el índice de selectividad de cada una de estas líneas, sólo **112** frente a PC-3, **86**, **87**, **112** y **113** frente a HT-29 mostraron ser más selectivos para su respectiva línea celular tumoral.

Si observamos los 4 compuestos de mayor selectividad frente a HT-29 (Figura 80), se puede destacar una elevada analogía estructural. La presencia de una función lactona en el anillo B y la presencia de funciones oxigenadas (hidroxilo o acetiladas) en C3, C22 y C23 parecen ser claves para la selectividad del compuesto respecto a la línea celular control, lo que es importante para validar la hipótesis de esta investigación.

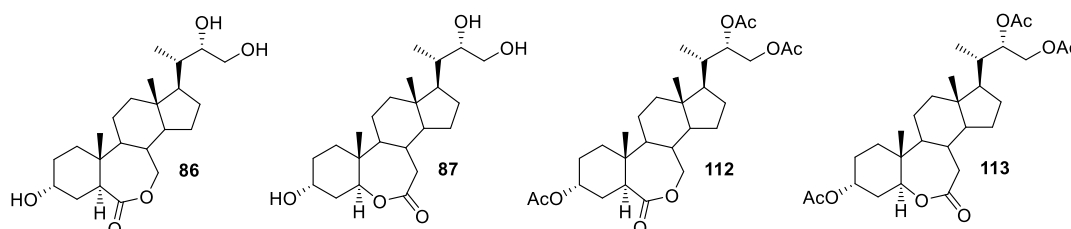


Figura 80. Análogos de BRs que presentaron mayor selectividad frente a línea tumoral HT-29.

En general, la bibliografía sobre los efectos de análogos de BRs sobre líneas celulares cancerígenas es escasa, y en la mayoría de los casos, los compuestos analizados son brasinólido (BL) (**1**), 24-epi-brasinólido (24epiBL) (**2**), 28-homo-castaterona (28homoCS) (**6**) y 24-epi-castaterona (24epiCS) (Figura 81) y sus derivados conjugados [51], [126]. Si bien se ha reportado el efecto de estos compuestos sobre la viabilidad de líneas celulares de diversos orígenes histopatológicos.

Swaczynová *et al.* [126] analizaron el efecto citotóxico de la aplicación de los compuestos BL, 24epiBL y 24epiCS, frente a la línea celular MCF7. Para todas estas

moléculas el valor de IC_{50} mostró ser mayor al rango de concentración analizado (50 μ M), por tanto, no fue reportado como valor específico. Este ensayo cuantificó viabilidad celular mediante el test de calceína.

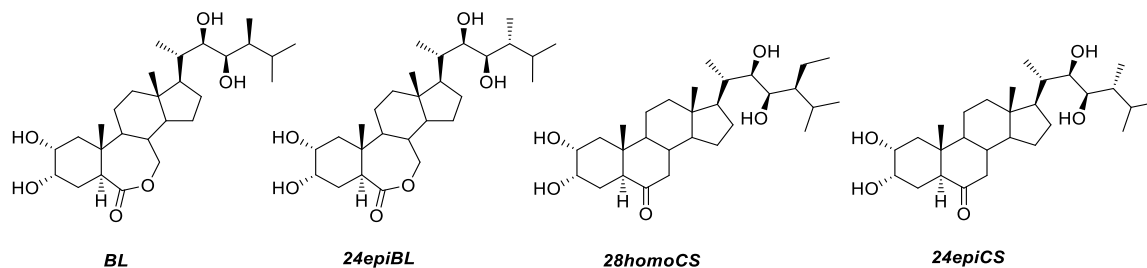


Figura 81. Estructura del brasinólido (BL), y los análogos 24-epi-brasinólido (24epiBL), 28-homo-castaterona (28homoCS) (6) y 24-epi-castaterona (24epiCS).

Por otro lado, Malíkova *et al.* [51] reportaron el efecto de 28homoCS y 24epiBL frente a la misma línea celular, entregando valores de IC_{50} de 40 μ M y 60 μ M, respectivamente, pero sin entregar índices de selectividad respecto al control células normales de fibroblastos. Si bien, tanto 24epiBL como 24epiCS son análogos de BRs, poseen diferencias estructurales significativas respecto a los análogos utilizados en esta investigación, lo que podría explicar, en parte, la marcada diferencia entre los resultados obtenidos y los reportados en bibliografía. Por otra parte, se esperaría que los valores de IC_{50} en líneas celulares sensibles a hormonas esteroidales sean menores a los entregados por líneas celulares insensibles, pero esto no siempre se corresponde.

En el estudio de Steigerová *et al.* [129] el efecto citotóxico de análogos de BRs (24epiBL y 28homoCS) frente a líneas celulares de mismo origen histopatológico, pero con respuesta distinta a hormona estrógeno: MCF7 [(+) ER- α] y MDA-MB-468 [(-) ER- α] entregó valores inversos a los esperados. En este estudio, el compuesto 28homoCS obtuvo un valor de IC_{50} de 13,7 μ M para MCF7 (línea celular hormono-dependiente), mientras que para la línea MDA-MD-468 (línea celular tumoral no hormono-depeniente) se obtuvo un valor de 4,3 μ M.

En general, los compuestos no mostraron tendencias claras respecto a su actividad citotóxica que permitan realizar una relación estructura-actividad evidente, pero los compuestos que entregaron los mejores resultados, **112** (PC-3) y **86, 87, 112, 113** (HT-29), poseen estructuras con cadena lateral del tipo 24-nor, con C22(S) y C23 dihidroxilados, función 3 α -monohidroxilado en anillo A, función 6-oxo-7-oxalactona o 7-oxo-6-oxalactona en anillo B y con fusión de anillos A/B de tipo *trans*, lo que es importante para validar la hipótesis de esta investigación. Se destaca el efecto de los compuestos evaluados contra la línea celular TH-29, la cual mostró mayor sensibilidad y cierta tendencia estructural en los compuestos activos.

CAPÍTULO 5 - Conclusiones

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

1. Mediante diferentes rutas de síntesis, se obtuvo un total de 25 análogos de brasinoesteroides (Figura 82).

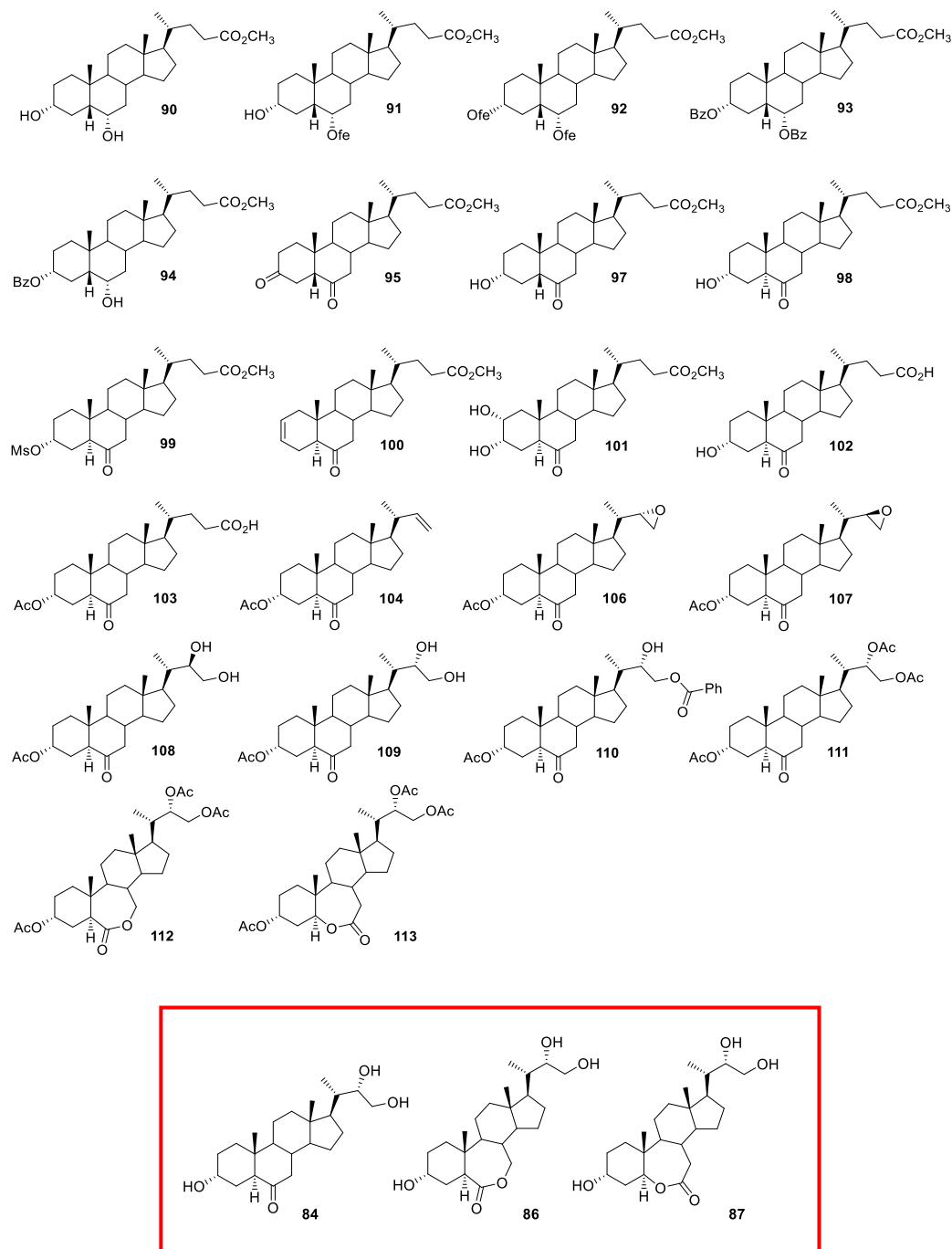


Figura 82. Totalidad de los compuestos sintetizados en esta tesis. En el recuadro se destacan los 3 compuestos análogos objetivos sintetizados.

2. De un total de 6 compuestos planteados como objetivos de esta tesis: análogos con estereoquímica C22(*S*) (**84**, **86**, **87**) y análogos con estereoquímica C22(*R*) (**85**, **88** y **89**), sólo se logró sintetizar la serie de análogos C22(*S*) (Figura 82), debido a que no fue posible separar la mezcla de epóxidos **106** y **107** por los métodos convencionales de purificación disponibles en esta investigación. La separación de la mezcla de epóxidos era el paso clave para la obtención de los precursores sintéticos de la serie C22(*R*). La serie C22(*S*) se obtuvo por síntesis directa, usando la hidroxilación de Upjohn.
3. De los compuestos objetivos de esta tesis, se sintetizó el compuesto triol 3 α , 22*S*, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**84**) con un rendimiento global de 16,9%, además de los análogos lactonas 3 α , 22*S*, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (**86**) y 3 α , 22*S*, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-oxalactona (**87**) con rendimientos globales de 5,1% y 1,9%, respectivamente.
4. En algunas de las reacciones se obtuvieron los productos principales y productos secundarios, sin embargo, utilizando técnicas de separación por CC, con eluciones isocráticas y por gradiente de polaridades, se aisló casi la totalidad de los productos obtenidos. Todos los productos finales e intermedios de síntesis se caracterizaron mediante el uso de técnicas espectroscópicas, tales como ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC, IR y EMAR.
5. Se obtuvo el nuevo análogo benzoilado **110**, el cual no estaba planteado en los objetivos iniciales de esta investigación. El nuevo análogo no ha sido reportado. La estereoquímica absoluta en C22(*S*) de este análogo fue determinada mediante el uso de cristalografía de Rayos X, y por ende se extrapoló a todos los análogos de la serie en C22(*S*).

6. De un total de 14 compuestos evaluados en su actividad antifúngica, los análogos **84** y **112** poseen una alta actividad contra *Botrytis cinerea* (≥ 95 % de inhibición a 100 y 150 ppm), lo cual podría disminuir el estrés biótico de distintos cultivos atacados por la presencia de este patógeno. De estos compuestos, el análogo **84** cumple la hipótesis planteada por esta investigación (1 de los 3 sintetizados), ya que el análogo **84**, con cadena lateral del tipo 24-nor, con C22(S) y C23 dihidroxilados, función 3 α -monohidroxilado en anillo A, función 6-oxo-7-oxalactona en anillo B y con fusión de anillos A/B de tipo *trans*, es capaz de inhibir el crecimiento micelial del hongo *Botrytis cinerea*.
7. Si bien, no fue una evaluación planteada en los objetivos iniciales de esta tesis, se cuantificó la actividad promotora de elongación celular vegetal mediante el test RLIT de inclinación de lámina de arroz (*Oryza sativa* cv. Zafiro), y se asume en la hipótesis como parámetro de actividad biológica asociada a la estructura. De un total de 7 compuestos evaluados, se demostró que los análogos **84**, **111** y **112** promueven la elongación celular vegetal. De estos compuestos, el análogo **84** cumple la hipótesis planteada por esta investigación (1 de los 3 sintetizados), ya que el análogo **84**, con cadena lateral del tipo 24-nor, con C22(S) y C23 dihidroxilados, función 3 α -monohidroxilado en anillo A, función 6-oxo en anillo B y con fusión de anillos A/B de tipo *trans*, es capaz de promover la elongación celular vegetal.
8. Se evaluó la actividad citotóxica de 18 de los análogos sintéticos contra la línea celular tumorales PC-3, utilizando la línea celular no tumoral CoN como control. Los compuestos **84**, **112** y **113** entregaron valores de $IC_{50} \leq 100 \mu M$, y de ellos sólo **112** destaca con valor de $IC_{50} = 38,6 \mu M$. En índice de selectividad, sólo **112** mostró ser mayoritariamente citotóxico contra la línea tumoral, con un índice de selectividad de 2,313. Así, el análogo **84** cumple la hipótesis planteada por esta investigación (1

de los 3 sintetizados), ya que el análogo **84**, con cadena lateral del tipo 24-nor, con C22(S) y C23 dihidroxilados, función 3 α -monohidroxiado en anillo A, función 6-oxo- en anillo B y con fusión de anillos A/B de tipo *trans*.

9. Se evaluó la actividad citotóxica de 18 de los análogos sintéticos contra la línea celular tumorales HT-29, utilizando la línea celular no tumoral CoN como control. Los análogos **84**, **86**, **87** destacaron con valores de IC₅₀ de 21,4 μ M, 50,5 μ M y 33,5 μ M, respectivamente. En índice de selectividad, los análogos **86** y **87** mostraron ser mayoritariamente citotóxicos contra la línea tumoral, con un índice de selectividad de 2,099 y 4,801, respectivamente. Así, ambos análogos cumplen la hipótesis, ya que poseen el requerimiento estructural planteado, con cadena lateral del tipo 24-nor, con C22(S) y C23 dihidroxilados, función 3 α -monohidroxiado en anillo A, función 6-oxo-7-oxalactona y 7-oxo-6-oxalactona en anillo B y fusión de anillos A/B de tipo *trans*.

REFERENCIAS

- [1] S. D. Clouse y J. M. Sasse, "BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 49, no. 1, pp. 427–451, Jun. 1998.
- [2] V. Khripach, "Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century," *Ann. Bot.*, vol. 86, no. 3, pp. 441–447, Sep. 2000.
- [3] C. Vriet *et al.*, "Boosting Crop Yields with Plant Steroids," *Plant Cell*, vol. 24, no. 3, pp. 842–857, Mar. 2012.
- [4] M. D. Grove *et al.*, "Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen," *Nature*, vol. 281, no. 5728, pp. 216–217, Sep. 1979.
- [5] A. Bajguz y A. Piotrowska-Niczyporuk, "Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae)," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 71, pp. 290–297, Oct. 2013.
- [6] A. Bajguz y A. Tretyn, "The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants," *Phytochemistry*, vol. 62, no. 7, pp. 1027–1046, Abr. 2003.
- [7] Q. Wang *et al.*, "Synthesis of brassinosteroids analogues from laxogenin and their plant growth promotion," *Nat. Prod. Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 149–157, Ene. 2015.
- [8] Z.-Y. Wang *et al.*, "BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids," *Nature*, vol. 410, no. 6826, pp. 380–383, Mar. 2001.
- [9] J. Li, "BIN2, a New Brassinosteroid-Insensitive Locus in *Arabidopsis*," *PLANT Physiol.*, vol. 127, no. 1, pp. 14–22, Sep. 2001.
- [10] C. J. Yang *et al.*, "The Mechanisms of Brassinosteroids' Action: From Signal Transduction to Plant Development," *Mol. Plant*, vol. 4, no. 4, pp. 588–600, Jul. 2011.
- [11] S. D. Clouse, M. Langford y T. C. McMorris, "A Brassinosteroid-Insensitive

- Mutant in *Arabidopsis thaliana* Exhibits Multiple Defects in Growth and Development," *Plant Physiol.*, vol. 111, no. 3, pp. 671–678, Jul. 1996.
- [12] Y. Belkhadir y J. Chory, "Brassinosteroid Signaling: A Paradigm for Steroid Hormone Signaling from the Cell Surface," *Science* (80-.), vol. 314, no. 5804, pp. 1410–1411, Dic. 2006.
- [13] Y. Jaillais y G. Vert, "Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting," *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, no. 8, pp. 788–790, Ago. 2012.
- [14] T. Asami *et al.*, "Characterization of Brassinazole, a Triazole-Type Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor," *Plant Physiol.*, vol. 123, no. 1, pp. 93–100, May 2000.
- [15] T. Hartwig *et al.*, "Propiconazole Is a Specific and Accessible Brassinosteroid (BR) Biosynthesis Inhibitor for Arabidopsis and Maize," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e36625, May 2012.
- [16] N. G. Irani *et al.*, "Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 583–589, Jun. 2012.
- [17] J. Li y J. Chory, "A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction," *Cell*, vol. 90, no. 5, pp. 929–938, 1997.
- [18] W. Tang *et al.*, "PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 124–131, 2011.
- [19] L. Hoffmannová *et al.*, *Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health*. Bentham Science Publishers, 2012.
- [20] M. Fellner, "Recent Progress in Brassinosteroid Research: Hormone Perception and Signal Transduction," *Brassinosteroids*, pp. 69–86, 2003.
- [21] Y. Hu, F. Bao y J. Li, "Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis," *Plant J.*, vol. 24, no. 5, pp. 693–701, 2000.
- [22] P. Krishna, "Brassinosteroid-Mediated Stress Responses," *J. Plant Growth Regul.*, vol. 22, no. 4, pp. 289–297, 2003.
- [23] B. Ali, S. Hayat y A. Ahmad, "28-Homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.)," *Environ. Exp. Bot.*, vol. 59, no. 2, pp. 217–223, Mar. 2007.
- [24] V. Khripach, V. Zhabinskii y A. de Groot, "Brassinosteroids, a new class of plant hormones," in *Press, Academic*, A. Press, Ed. 1999.
- [25] J. Schmidt, F. Bohme y G. Adam, "24-Epibrassinolide from *Gypsophila*

- perfoliata," *J. Biosci.*, vol. 51, pp. 897–899, 1996.
- [26] P. Volynets *et al.*, "The nature of protective action of 24-epibrassinolide in barley plants," in *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America*, 1997, pp. 133–137.
- [27] H. Nakashita *et al.*, "Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice," *Plant J.*, vol. 33, no. 5, pp. 887–898, 2003.
- [28] A. Friebe, "Brassinosteroids in induced resistance and induction of tolerances to abiotic stress in plants, in Rimando AM, Duke OM," in *Natural Products for Pest Management (ACS Symposium Series 927)*, A. C. Society, Ed. Washington, 2006, pp. 233–242.
- [29] N. Korableva *et al.*, "Brassinolide effect on growth of apical meristems, ethylene production, and abscisic acid content in potato tubers," *Biol. Plant.*, vol. 45, pp. 39–43, 2002.
- [30] Y. Elad *et al.*, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.
- [31] Y. Elad, "Responses of plants to infection by botrytis cinerea and novel means involved in reducing their susceptibility to infection," *Biol. Rev.*, vol. 72, no. 3, pp. 381–422, Ene. 2007.
- [32] W. R. Jarvis, "The biology of Botrytis.," London: Academic Press, 1980, pp. 219–250.
- [33] I. Muckenschnabel *et al.*, "Oxidative effects in uninfected tissue in leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*) containing soft rots caused by Botrytis cinerea," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 83, no. 6, pp. 507–514, 2003.
- [34] E. Kuźniak y M. Skłodowska, "The effect of Botrytis cinerea infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves," *J. Exp. Bot.*, vol. 55, no. 397, pp. 605–612, 2004.
- [35] P. J. Swarbrick, P. Schulze-Lefert y J. D. Scholes, "Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew," *Plant, Cell Environ.*, vol. 29, no. 6, pp. 1061–1076, 2006.
- [36] X. J. Xia *et al.*, "Brassinosteroids promote metabolism of pesticides in cucumber," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 18, pp. 8406–8413, 2009.
- [37] B. Fisher *et al.*, "Tamoxifen for the prevention of breast cancer: Current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 97, no. 22, pp. 1652–1662, 2005.
- [38] W. Zwart, V. Theodorou y J. S. Carroll, "Estrogen receptor-positive breast

- cancer: A multidisciplinary challenge," *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 216–230, 2011.
- [39] G. Kuiper *et al.*, "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 12, pp. 5925–5930, 1996.
- [40] E. M. M. Fox, R. J. J. Davis y M. A. A. Shupnik, "ER in breast cancer-Onlooker, passive player, or active protector?," *Steroids*, vol. 73, no. 11, pp. 1039–1051, 2008.
- [41] F. Delaunay *et al.*, "Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta," *Mol. Pharmacol.*, vol. 58, no. 3, pp. 584–590, 2000.
- [42] K. Dahlman-Wright *et al.*, "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors," *Pharmacol. Rev.*, vol. 58, no. 4, pp. 773–781, 2006.
- [43] L. C. Murphy y E. Leygue, "The role of estrogen receptor-B in breast cancer," *Semin. Reprod. Med.*, vol. 30, no. 1, pp. 5–13, 2012.
- [44] C. Thomas y J. Å. Gustafsson, "The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 8, pp. 597–608, 2011.
- [45] E. Leygue *et al.*, "Altered Estrogen Receptor α and β Messenger RNA Expression during Human Breast Tumorigenesis," *Cancer Res*, vol. 58, p. 3197, 1998.
- [46] P. Roger *et al.*, "Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 6, pp. 2537–2541, 2001.
- [47] G. S. Prins y K. S. Korach, "The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease," *Steroids*, vol. 73, no. 3, pp. 233–244, 2008.
- [48] A. Bardin *et al.*, "Loss of ER expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 11, no. 3, pp. 537–551, 2004.
- [49] J. Häring *et al.*, "Role of estrogen receptor β in gynecological cancer," *Gynecologic Oncology*, vol. 127, no. 3, pp. 673–676, 2012.
- [50] F. Franek, T. Eckschlager y L. Kohout, "On steroid. Part CDXVI. 24-epibrassinolide at subnanomolar concentrations modulates growth and production characteristics of a mouse hybridoma," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 68, pp. 2190–2200, 2003.
- [51] J. Malíková *et al.*, "Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids," *Phytochemistry*, vol. 69, no. 2, pp. 418–426, 2008.
- [52] J. Steigerová *et al.*, "Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis

- of prostate cancer cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 11, pp. 4068–4076, 2012.
- [53] J. A. Ramírez *et al.*, "Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs," *Steroids*, vol. 65, no. 6, pp. 329–337, 2000.
- [54] K. Takeno y R. P. R. P. Pharis, "Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf rice seedlings: An auxin-mediated phenomenon," *Plant Cell Physiol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1275–1281, 1982.
- [55] S. Takatsuto *et al.*, "Structure-activity relationship of brassinosteroids," *Phytochemistry*, vol. 22, no. 11, pp. 2437–2441, 1983.
- [56] T. Yokota *et al.*, "Various brassinosteroids from Phaseolus vulgaris seeds: structures and biological activity," in *Proceedings of the 14th Annual Meeting of the Plant Growth Regulator Society of America (Honolulu, HW)*, 1987, pp. 28–29.
- [57] N. B. Mandava, "Plant Growth-Promoting Brassinosteroids," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 23–52, Jun. 1988.
- [58] T. Kishi, K. Wada y S. Marumo, "Synthesis of Brassinolide Analogs with a Modified Ring B and Their Plant Growth-promoting Activity," *1 new prompted*, vol. 50, no. 7, pp. 1821–1830, 1986.
- [59] K. Okada y K. Mori, "Brassinolide and Its Analogs .3. Synthesis of Brassinolide Analogs and Their Plant Growth-Promoting Activity," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 47, no. 1, pp. 89–95, 1983.
- [60] S. Takatsuto *et al.*, "Structure-activity relationship of brassinosteroids with respect to the A/B-ring functional groups," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 35, no. 1, pp. 211–216, 1987.
- [61] M. J. Thompson *et al.*, "Synthesis of Brassino Steroids: New Plant-Growth-Promoting Steroids," *J. Org. Chem.*, vol. 44, no. 26, pp. 5002–5004, 1979.
- [62] H. Seto *et al.*, "Epimerization at C-5 of brassinolide with sodium methoxide and the biological activity of 5-epi-brassinolide in the rice lamina inclination test," *J. Chem. Soc.*, no. Perkin Transactions 1, pp. 3355–3358, 1998.
- [63] H. Seto *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of extra-hydroxylated brassinolide analogs," *Tetrahedron*, vol. 55, no. 28, pp. 8341–8352, 1999.
- [64] K. Mori, "Synthesis of a brassinolide analog with high plant promoting activity," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 44, pp. 1211–1212, 1980.
- [65] V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii y A. E. de Groot, "Bioassays and structure-activity relationships of BS," *Brassinosteroids*, pp. 301–324, 1999.
- [66] M. Romero-Avila *et al.*, "Synthesis and biological activity of furostanic

- analogues of brassinosteroids bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety," *Steroids*, vol. 72, no. 14, pp. 955–959, 2007.
- [67] G. Adam *et al.*, "Aspects of Synthesis and Bioactivity of Brassinosteroids," in *Acs Symposium Series*, vol. 474, no. 1, Washington: American Chemical Society, 1991, pp. 74–85.
- [68] M. F. Coll *et al.*, "Synthesis of spirostanic analogs of brassinosteroids. II. (25R)-5 α -spirostan-2 α ,3 α -diol," *Rev. Cuba. Quim.*, vol. 6, pp. 7–12, 1992.
- [69] M. F. Coll *et al.*, "Polyhydroxyspirostanones as plant growth regulators," PCT Int. Appl. WO 97 13,780, 1995.
- [70] M. A. Iglesias-Arteaga, G. R. Perez y M. Coll, "Natural brassinosteroids and their synthetic analogs," *Rev. CENIC, Cienc. Quim.*, vol. 27, pp. 3–12, 1996.
- [71] M. A. Iglesias-Arteaga *et al.*, "Síntesis de espirobrasinoesteroides análogos de la 6-desoxocastasterona," *Quim. Nova*, vol. 20, no. 4, pp. 361–364, Ago. 1997.
- [72] M. A. Iglesias-Arteaga *et al.*, "Synthesis of (25R)-5 α -Spirostan-2 α ,3 α ,6 β -triol Triacetate," *Synth. Commun.*, vol. 28, no. 1, pp. 75–81, Ene. 1998.
- [73] M. A. Iglesias-Arteaga *et al.*, *Synthesis of (22R, 25R)-2 α ,3 α ,26-Trihydroxy-5 α -furostan-6-one*, vol. 28, no. 10. 1998, pp. 1779–1784.
- [74] C. R. Rodríguez *et al.*, "Synthesis and biological activity of three new 5 α -hydroxy spirostanic brassinosteroid analogues," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 14, no. 3, pp. 466–469, May 2003.
- [75] M. A. Iglesias-Arteaga *et al.*, "Spirostanic analogues of castasterone," *Steroids*, vol. 67, no. 3–4, pp. 159–163, Mar. 2002.
- [76] C. Brosa, J. M. Capdevila y I. Zamora, *Brassinosteroids: A new way to define the structural requirements*, vol. 52, no. 7. 1996, pp. 2435–2448.
- [77] C. Brosa *et al.*, "New Synthetic Brassinosteroids: a 5 Alfa -Hydroxy-6-ketone Analog with Strong Plant Growth Promoting Activity," *Tetrahedron*, vol. 54, pp. 12337–12348, 1998.
- [78] V. Černý, M. Strnad y M. Kamínek, "Preparation of 2alfa, 3alfa-Dihydroxy -7-oxa-6-oxo-23, 24-Dinor-B-Homo-5alfa-Cholanic acid, its esters and amides as brassinolide analogues," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 51, no. 687, 1986.
- [79] S. Hayashi *et al.*, "Preparation of 23-phenylbrassinosteroids as plant growth regulators," Eur. Pat. Appl. EP 282,984 [C. A. 110, 95639], 1987.
- [80] L.-F. Huang y W.-S. Zhou, "Studies on steroidal plant-growth regulators. Part 33. Novel method for construction of the side-chain of 23-arylbrassinosteroids via Heck arylation and asymmetric dihydroxylation as key steps," *J. Chem.*

- Soc. Perkin Trans. 1*, vol. 1, no. 24, p. 3579, 1994.
- [81] B. G. Hazra *et al.*, "Stereoselective synthesis of a new hexanor (C23–C28) castasterone-20,22-ethyl di ether from 16-dehydropregnenolone acetate and its plant growth promoting activity," *Tetrahedron*, vol. 53, pp. 4909–4920, 1997.
- [82] T. G. G. Back y R. P. P. Pharis, "Structure Activity Studies of Brassinosteroids and the Search for Novel Analogues and Mimetics with Improved Bioactivity," *J. Plant Growth Regul.*, vol. 22, no. 4, pp. 350–361, Dic. 2003.
- [83] S. Uesusuki *et al.*, "Synthesis of brassinosteroids of varying acyl side chains and evaluation of their brassinolide-like activity.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 68, no. 5, pp. 1097–1105, 2004.
- [84] M. Šiĉa *et al.*, "Syntheses of new androstane brassinosteroids with 17 β -ester groups—butyrates, heptafluorobutyrate, and laurates," *Steroids*, vol. 70, no. 11, pp. 755–762, 2005.
- [85] M. Šiĉa *et al.*, "Brassinolide activities of 2 α ,3 α -diols versus 3 α ,4 α -diols in the bean second internode bioassay: Explanation by molecular modeling methods," *Steroids*, vol. 72, no. 11–12, pp. 740–750, 2007.
- [86] A. Rosado-Abón *et al.*, "Synthesis and plant growth promoting activity of polyhydroxylated ketones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and cholestane side chain," *Steroids*, vol. 77, no. 5, pp. 461–466, 2012.
- [87] M. Kvasnica *et al.*, "Biological activities of new monohydroxylated brassinosteroid analogues with a carboxylic group in the side chain," *Steroids*, vol. 85, pp. 58–64, 2014.
- [88] B. Jiang *et al.*, "Methods for construction of sidechain of brassinosteroids and application to syntheses of brassinosteroids," *Stud. Nat. Prod. Chem.*, vol. 19, no. C, pp. 245–287, 1996.
- [89] Z. Wei-Shan *et al.*, "Studies on steroidal plant-growth regulator: VII. Synthesis of 2 α , 3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23, 24-dinor-B-homo-5 α -cholanic acid and 2 α , 3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-24-nor-B-homo-5 α -cholanic acid," *Acta Chim. Sin.*, vol. 6, no. 4, pp. 332–340, 1988.
- [90] Y. Wang *et al.*, "Biological activity of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth promoting effects," *Chinese Sci. Bull.*, vol. 39, pp. 1573–1577, 1994.
- [91] W. Zhou, B. Jiang y J. Shen, "Synthesis of cholesteric lactones and analogs as plant growth regulators," Assignee: Shanghai Inst. of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Peop. Rep. China. Patente CN 1184113, 1998.

- [92] Y. Q. Wang *et al.*, "Effect of brassinolide compounds on lowland rice blade incline," *Chinese Sci. Bull. (Chinese Ed.)*, vol. 33, no. 16, pp. 1263–1266, 1988.
- [93] W. Zhou y W. Tian, "The synthesis of steroids containing structural unit of A,B ring of brassinolide and ecdysone from hyodesoxycholic acid," *Acta Chim. Sin.*, vol. 42, no. 11, pp. 1173–1177, 1984.
- [94] Y. X. Yang *et al.*, "Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: Discovery of a novel neuroinflammation inhibitor," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 4, pp. 1222–1227, 2014.
- [95] L. Espinoza y M. Cortes, "Synthesis and biological activity of two novel brassinosteroid analogs functionalized on ring C," *Bol. la Soc. Chil. Quim.*, vol. 47, pp. 335–347, 2002.
- [96] L. Espinoza C y M. Cortes M, "Síntesis y actividad biológica de análogos de brasinoestroides," *Boletín la Soc. Chil. Química*, vol. 47, no. 4, pp. 511–516, Dic. 2002.
- [97] L. Espinoza, "Synthesis of Four New Brassinosteroids Analogues 11-Oxo-Functionalized on C Ring, with 24-Nor Side Chain and Containing 5 β -Cholanic Acid Skeleton," *Org. Chem. Curr. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 156–161, 2016.
- [98] T. Kametani *et al.*, "An improved synthesis of plant-growth regulating steroid brassinolide and its congeners," *J. Org. Chem.*, vol. 53, no. 9, pp. 1982–1991, 1988.
- [99] N. V. Kovganko y S. K. Ananich, "Progress in the chemical synthesis of brassinosteroids," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 38, no. 2, pp. 122–141, 2002.
- [100] J. A. Ramírez, C. Brosa y L. R. Galagovsky, "Synthesis and bioactivity of C-29 brassinosteroid analogues with different functional groups at C-6," *Phytochemistry*, vol. 66, no. 5, pp. 581–587, 2005.
- [101] Z. Wei-Shan, "The synthesis of brassinosteroids," *Pure Appl. Chem.*, vol. 61, no. 3, pp. 431–434, 1989.
- [102] T. Iida *et al.*, "Potential bile acid metabolites. 20. A new synthetic route to stereoisomeric 3,6,-dihydroxy- and 6-hydroxy-5 α -cholanoic acids," *Steroids*, vol. 58, no. 8, pp. 362–369, Ago. 1993.
- [103] T. G. Back *et al.*, "Synthesis and bioactivity of C-2 and C-3 methyl ether derivatives of brassinolide," *Phytochemistry*, vol. 59, no. 6, pp. 627–634, Mar. 2002.
- [104] R. P. Gil, C. S. P. Martínez y F. C. Manchado, "Synthesis of Analogues of Brassinosteroids with 5 β -Cholanic Acid Skeleton," *Synth. Commun.*, vol. 28,

- no. 18, pp. 3387–3396, Sep. 1998.
- [105] D. J. Vanderah y C. Djerassi, "Marine natural products. Synthesis of four naturally occurring 20.beta.-H cholanolic acid derivatives," *J. Org. Chem.*, vol. 43, no. 7, pp. 1442–1448, 1978.
- [106] B. Voigt, J. Schmidt y G. Adam, "Synthesis of 24-epiteasterone, 24-epityphasterol and their B-homo-6a-oxalactones from ergosterol," *Tetrahedron*, vol. 52, no. 6, pp. 1997–2004, Feb. 1996.
- [107] K. Wada y S. Marumo, "Synthesis and Plant Growth-promoting Activity of Brassinolide Analogues," *Agric.Biol.Chem*, vol. 45, no. 11, pp. 2579–2585, 1981.
- [108] M. Duran *et al.*, "Synthesis of Five Known Brassinosteroid Analogs from Hyodeoxycholic Acid and Their Activities as Plant-Growth Regulators," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 3, p. 516, Mar. 2017.
- [109] T. Iida *et al.*, "Potential bile acid metabolites. 13. Improved routes to 3 beta, 6 beta- and 3 beta, 6 alpha-dihydroxy-5 beta-cholanoic acids.," *J. Lipid Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 165–71, Feb. 1988.
- [110] L. Espinoza *et al.*, "Synthesis and Plant Growth-Activity of three New Brassinosteroids Analogues," *Synth. Commun.*, vol. 30, no. 11, pp. 1963–1974, Jun. 2000.
- [111] S. R. Jones *et al.*, "Efficient Route to 7 α -(Benzoyloxy)-3-dioxolane Cholestan-24(R)-ol, a Key Intermediate in the Synthesis of Squalamine," *J. Org. Chem.*, vol. 63, no. 11, pp. 3786–3789, May 1998.
- [112] H. Herrera *et al.*, "Structural modifications of deoxycholic acid to obtain three known brassinosteroid analogues and full NMR spectroscopic characterization," *Molecules*, vol. 21, no. 9, p. 1139, Ago. 2016.
- [113] H. Seto *et al.*, "2,3,5-Tri-epi-brassinolide: preparation and biological activity in rice lamina inclination test," *Phytochemistry*, vol. 52, no. 5, pp. 815–818, Nov. 1999.
- [114] Z. Wei-shan, J. Biao y P. Xin-fu, "Stereoselective synthesis of the brassinolide side chain; novel syntheses of brassinolide and related compounds," *Tetrahedron*, vol. 46, no. 9, pp. 3173–3188, Ene. 1990.
- [115] S. Takatsuto, N. Yazawa y N. Ikekawa, "Synthesis and biological activity of brassinolide analogues, 26,27-bisnorbrassinolide and its 6-oxo analogue," *Phytochemistry*, vol. 23, no. 3, pp. 525–528, Ene. 1984.
- [116] M. A. Iglesias-Arteaga, C. S. P. Martínez y F. C. Manchado, "Synthesis and Characterization of (25R)-2 α ,3 α -Epoxy-5 α -Spirostan-12,23-Dione," *Synth.*

- Commun.*, vol. 29, no. 11, pp. 1811–1818, Jun. 1999.
- [117] R. Kumar, S. Haveli y H. Kagan, "A Mild One-Pot Method for Conversion of Various Steroidal Secondary Alcohols into the Corresponding Olefins," *Synlett*, vol. 2011, no. 12, pp. 1709–1712, Jul. 2011.
- [118] J. D. Bacha y J. K. Kochi, "Alkenes from acids by oxidative decarboxylation," *Tetrahedron*, vol. 24, no. 5, pp. 2215–2226, Ene. 1968.
- [119] A. S. Vaidya, S. M. Dixit y A. S. Rao, "Degradation of bile acid side chain with lead tetraacetate," *Tetrahedron Lett.*, vol. 9, no. 50, pp. 5173–5174, Ene. 1968.
- [120] M. Ishiguro y N. Ikekawa, "Stereochemistry of Electrophilic reactions at the steroidal c-22 double bond," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*, vol. 23, no. 11, pp. 2860–2866, 1975.
- [121] S. Takatsuto *et al.*, "Stereoselective synthesis of plant growth-prompting steroids, brassinolide, castasterone, typhasterol, and their 28-nor analogues," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, p. 139, 1984.
- [122] S. Takatsuto y N. Ikekawa, "Remote substituent effect on the regioselectivity in the baeyer-villiger oxidation of 5 α -cholestan-6-one derivatives," *Tetrahedron Lett.*, vol. 24, no. 9, pp. 917–920, Ene. 1983.
- [123] M. Aburatani, T. Takeuchi, y K. Mori, "Efficient synthesis of (22R,23R,24S)-22,23-isopropylidenedioxy-5 α -ergost-2-en-6-one, a key intermediate in the preparation of brassinolide," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 50, no. 12, pp. 3043–3047, 1986.
- [124] P. Skehan *et al.*, "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82, no. 13, pp. 1107–1112, 1990.
- [125] V. Vichai y K. Kirtikara, "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screenin," *Nat. Protoc.* vol. 1, pp. 1112–1116, 2006.
- [126] J. Swaczynová *et al.*, "Synthesis, biological, immunological and anticancer properties of a new brassinosteroid ligand," *Pol. J. Chem*, vol. 80, no. 4, pp. 629–636, 2006.
- [127] A. H. A. Hamdy *et al.*, "3-Keto-22-epi-28-nor-cathasterone, a brassinosteroid-related metabolite from *Cystoseira myrica*," *Steroids*. vol 74, no. 12, pp. 927–930, 2009.
- [128] A. Y. Misharin *et al.*, "Toxicity of (22R, 23R)-22, 23-dihydroxystigmastane derivatives to cultured cancer cells," *Steroids*. vol 75, no. 3, pp. 287–294, 2010.

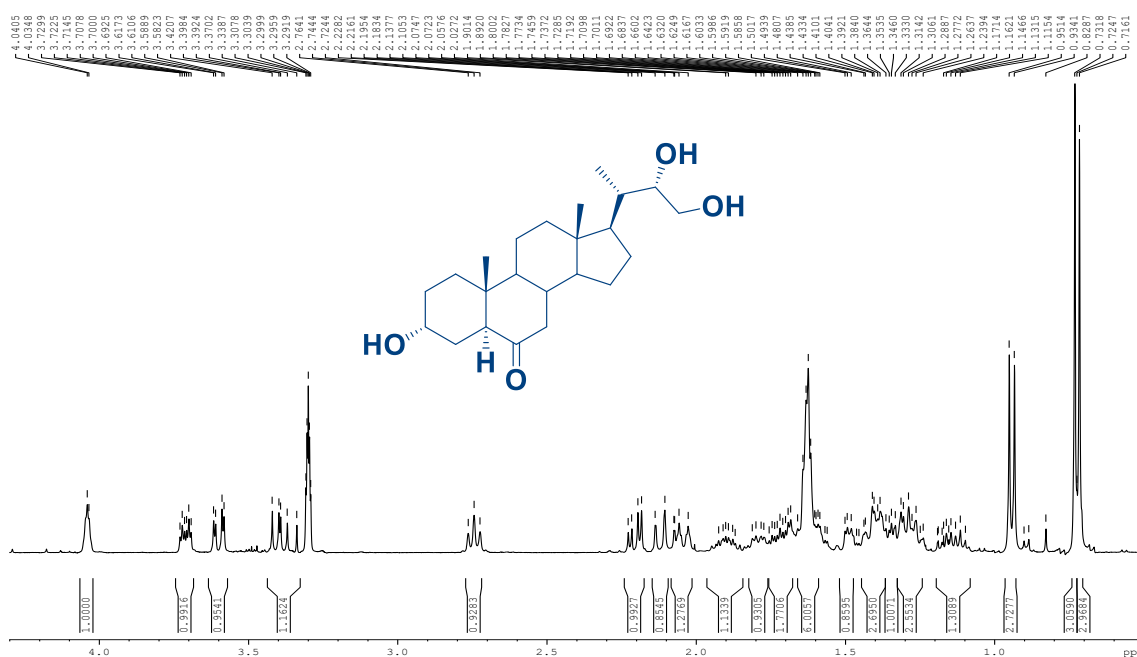
- [129] J. Steigerová *et al.*, "Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells," *Chem.-Biol. Interact.* vol 188, no. 3, pp. 487-496, 2010.
- [130] J. Steigerová *et al.*, "Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells," *Food Chem Toxicol.* vol 50, no. 11, pp. 4068-4076, 2012.

ANEXOS

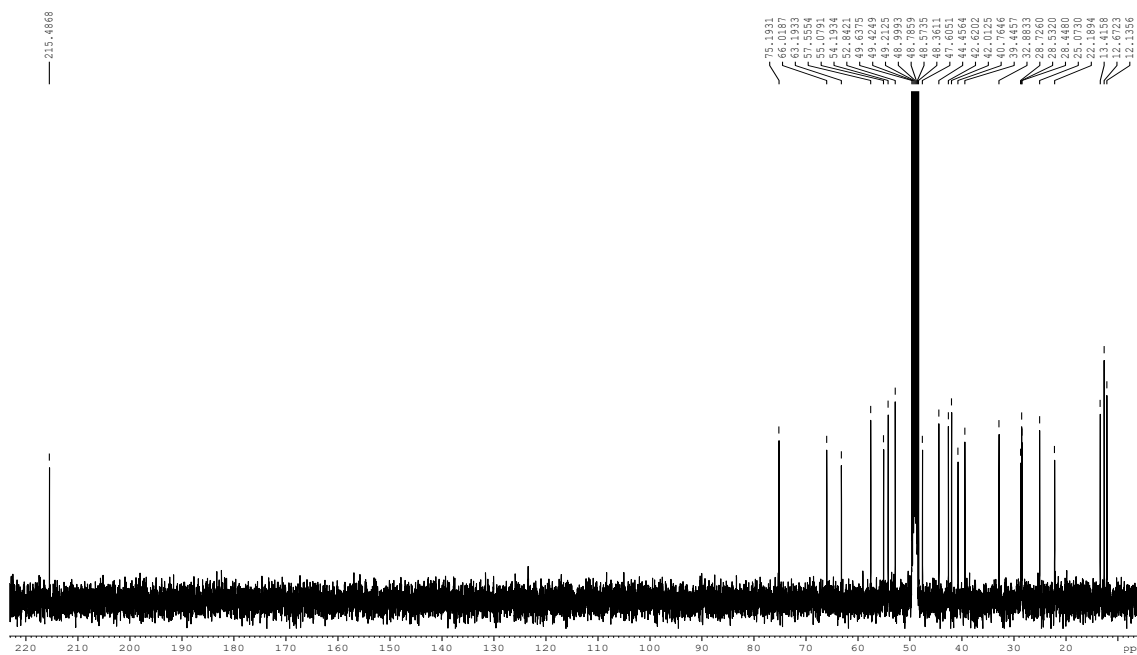
A. Espectroscopía RMN

Espectroscopía RMN de los compuestos: **84**, **86**, **87**, **95**, **97**, **98**, **104**, **109**, **110**, **111**, **112** y **113**.

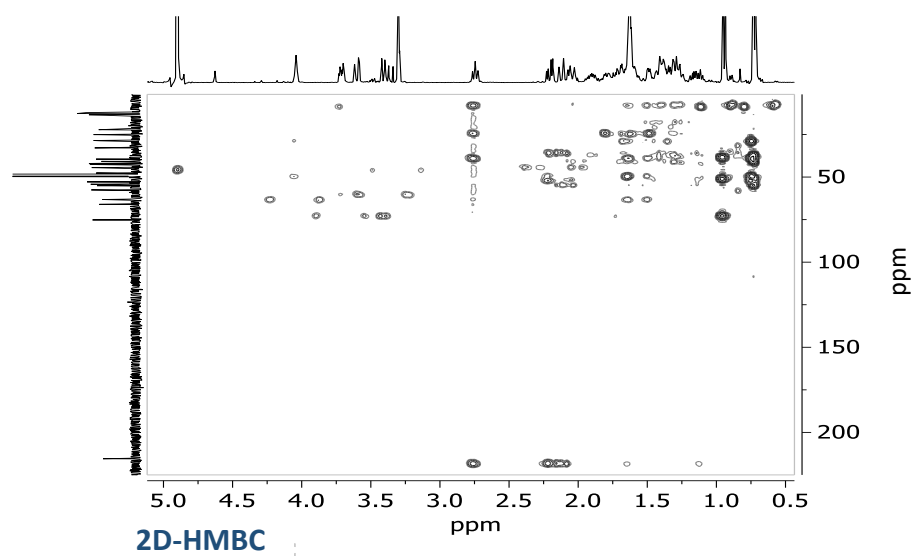
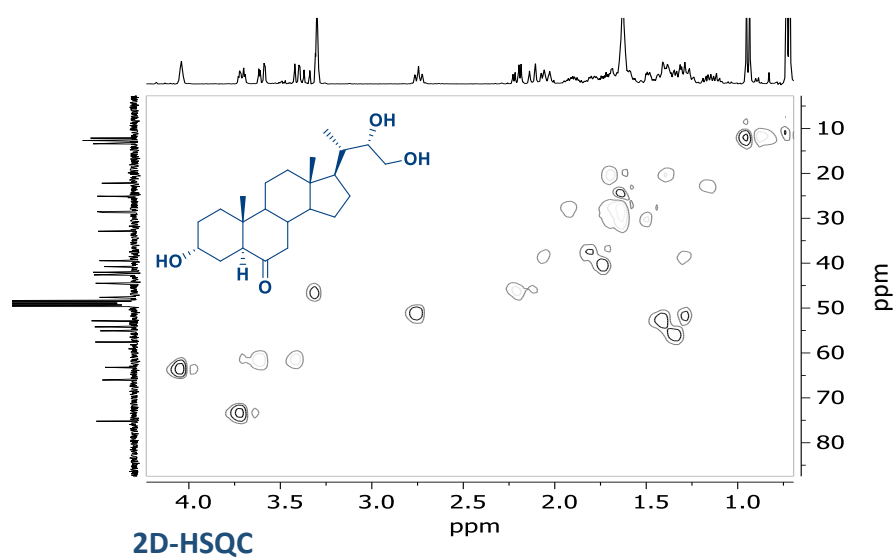
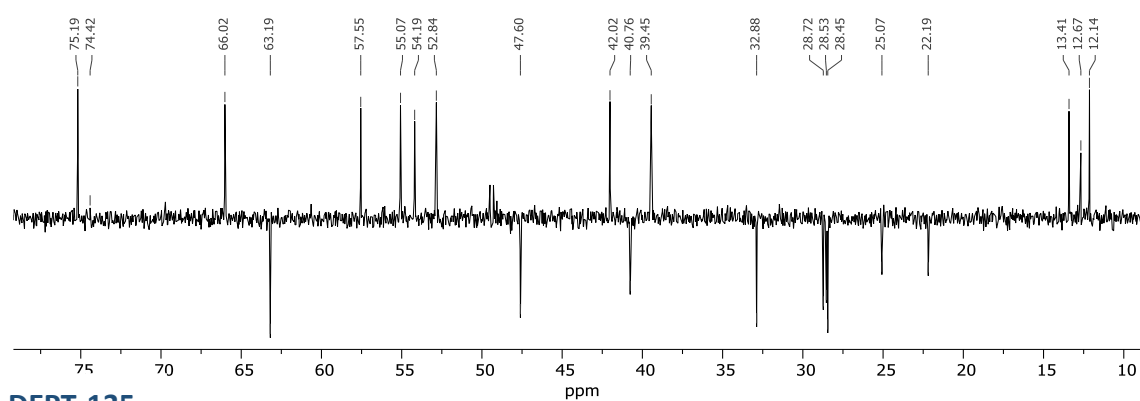
A.1. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto **3 α** , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**84**)



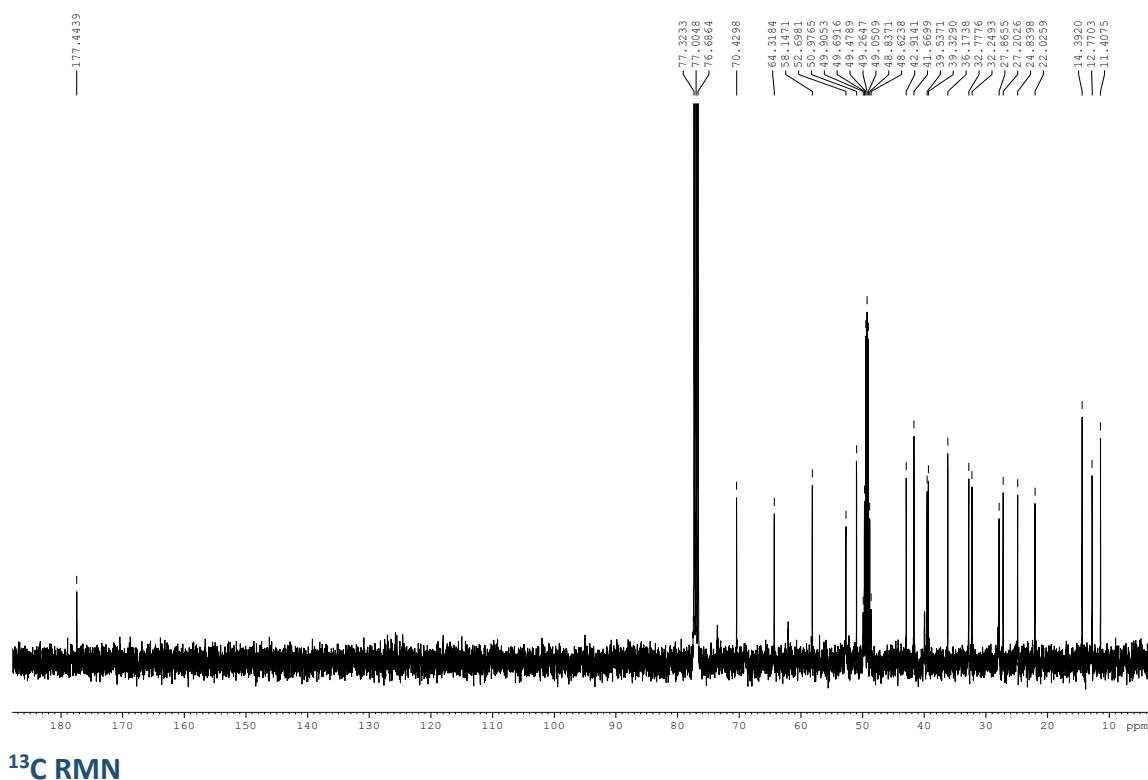
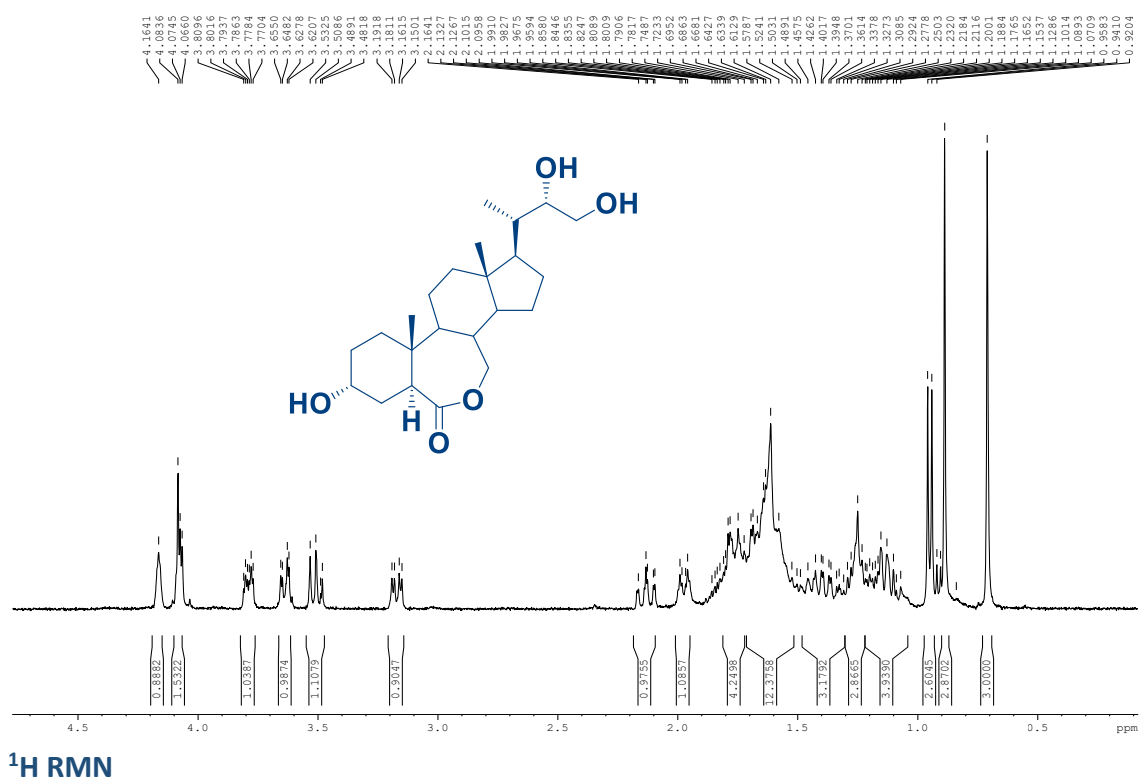
^1H RMN

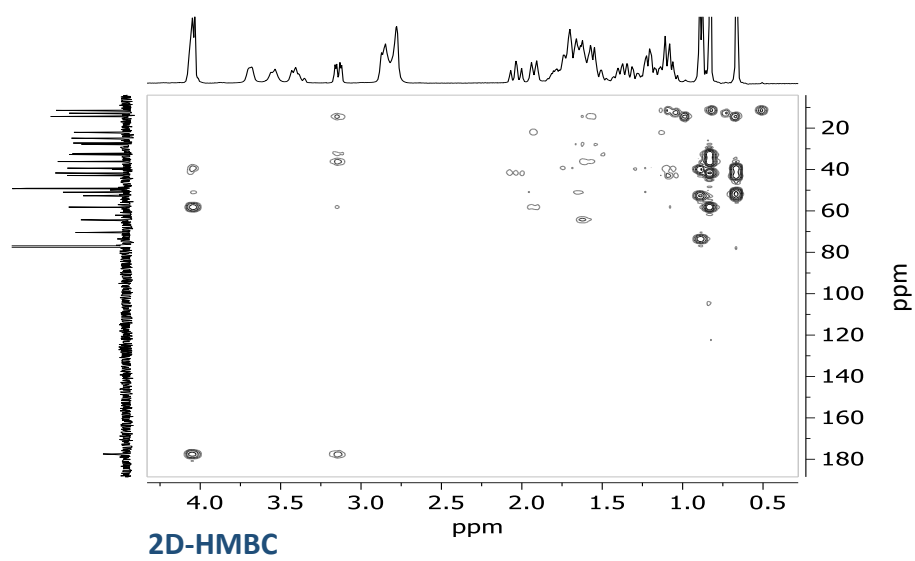
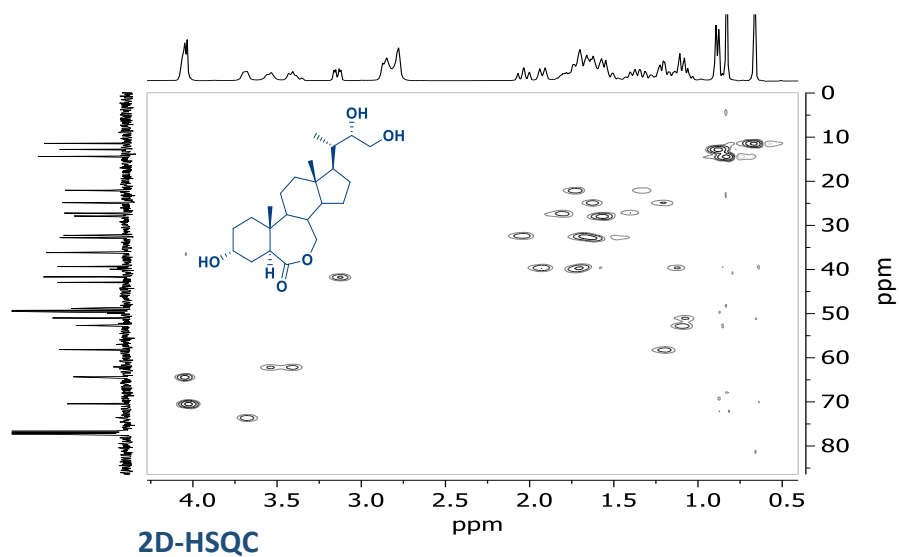
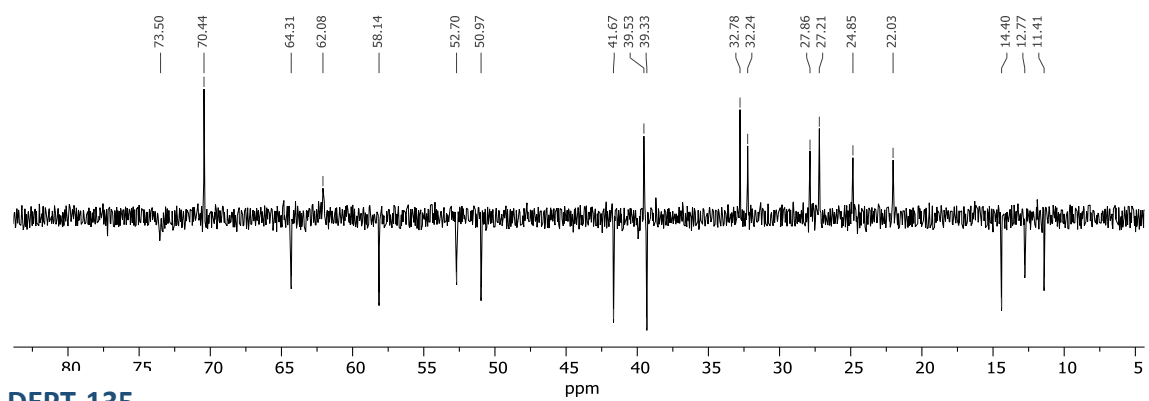


^{13}C RMN

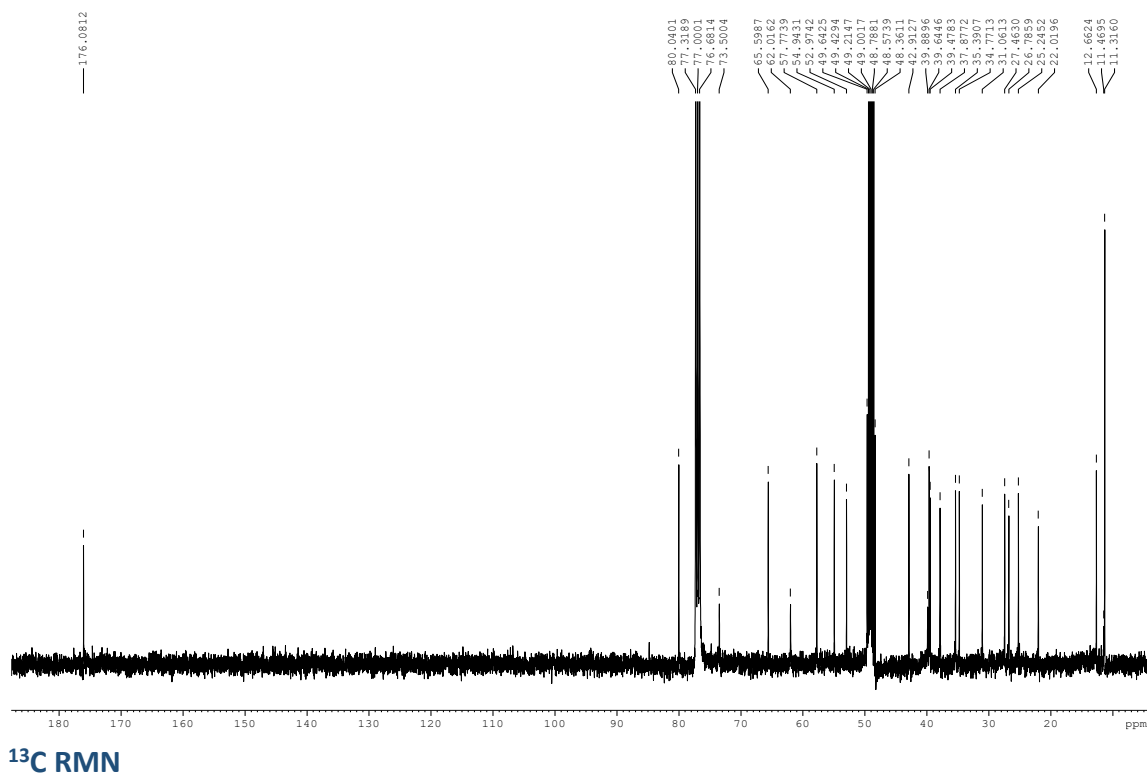
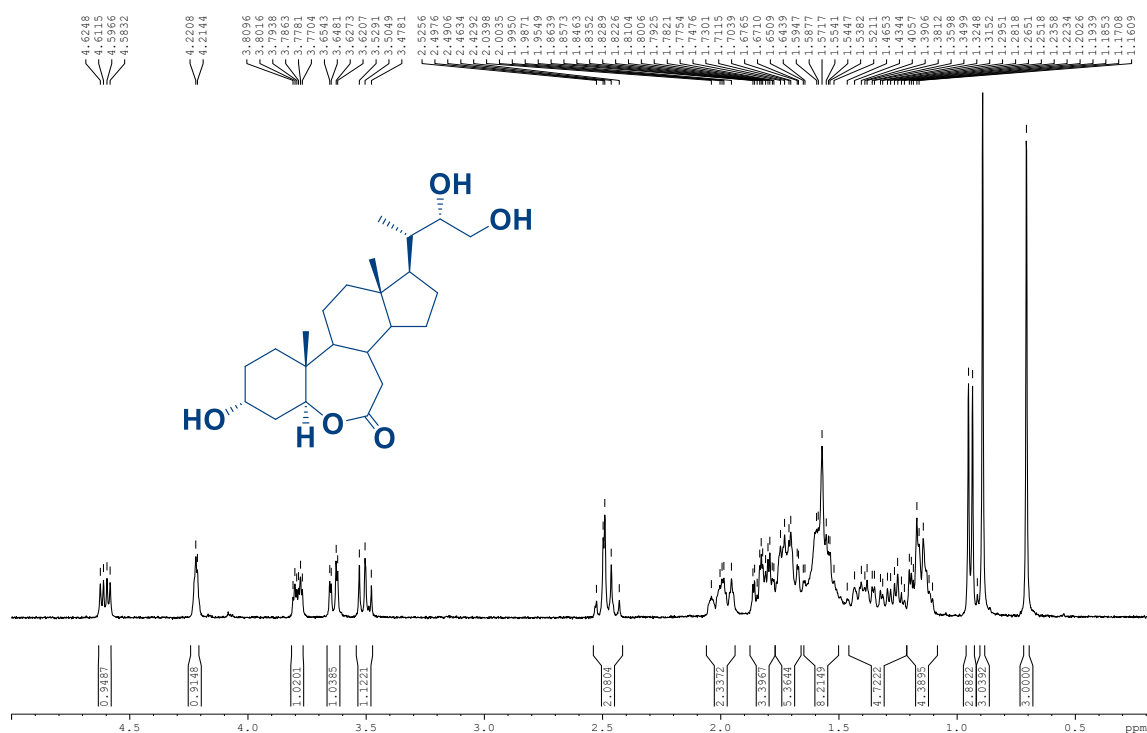


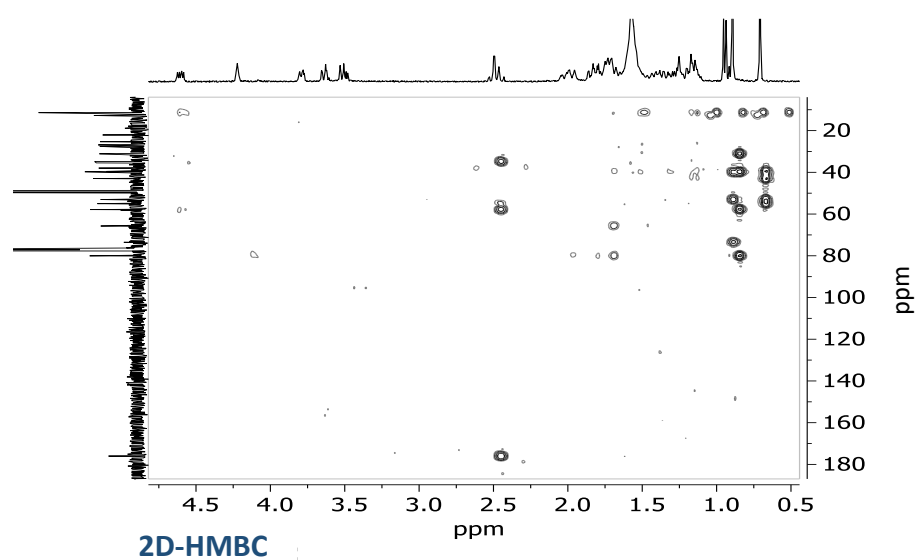
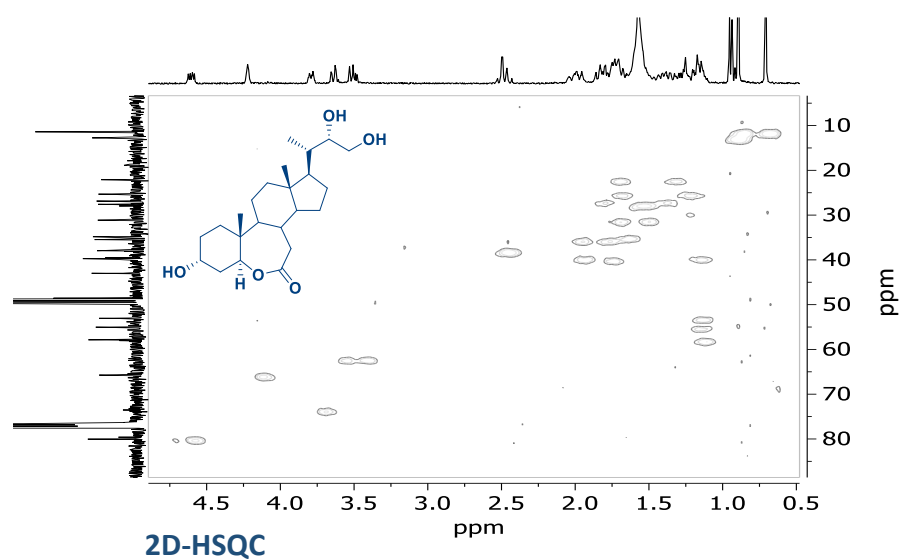
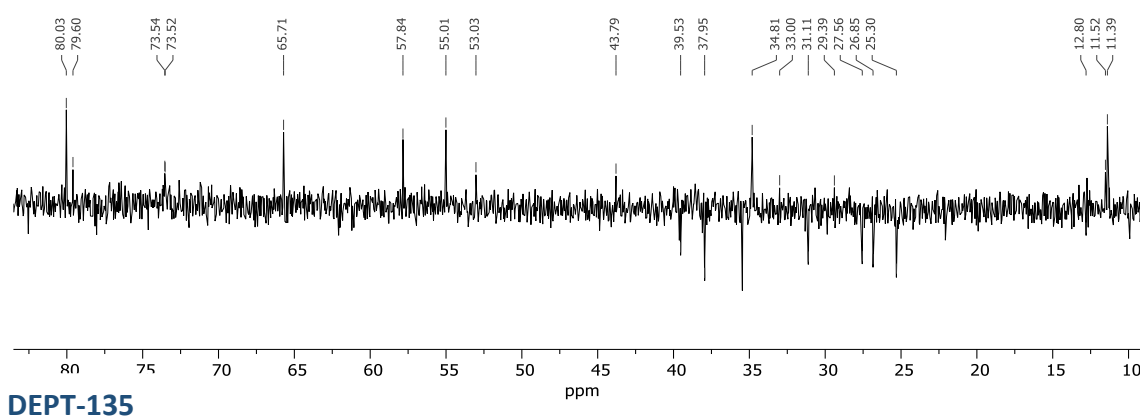
A.2. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxalactona (**86**)



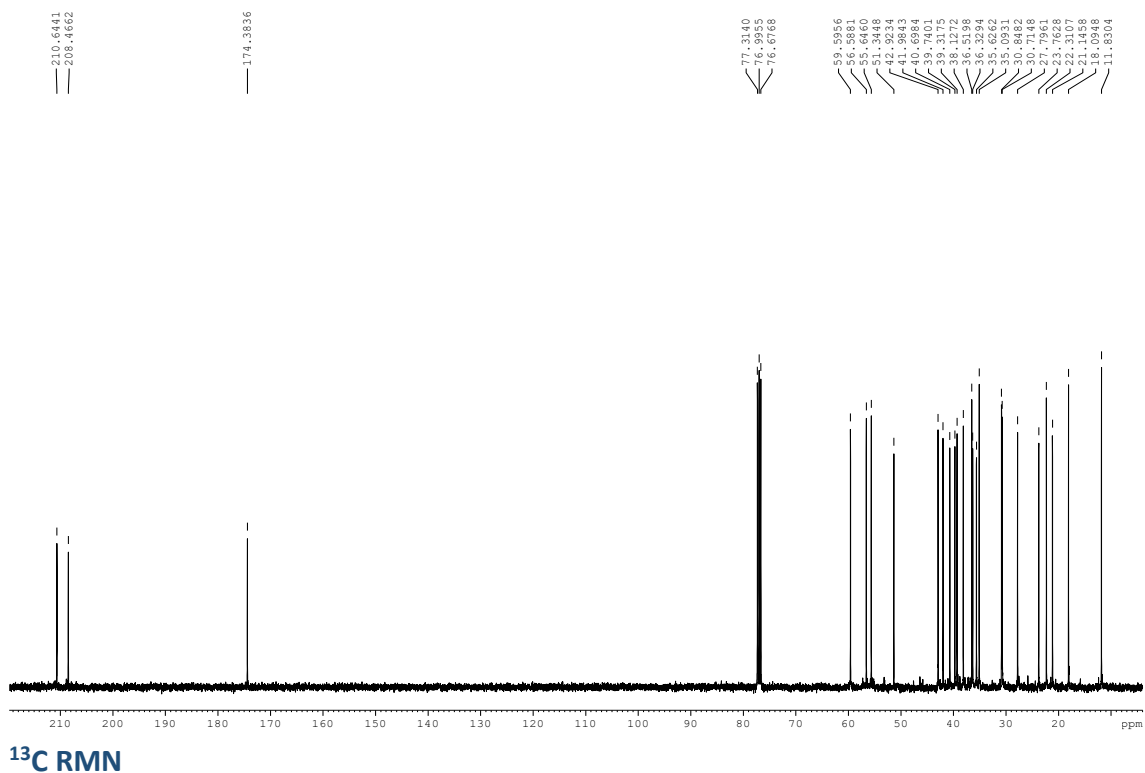
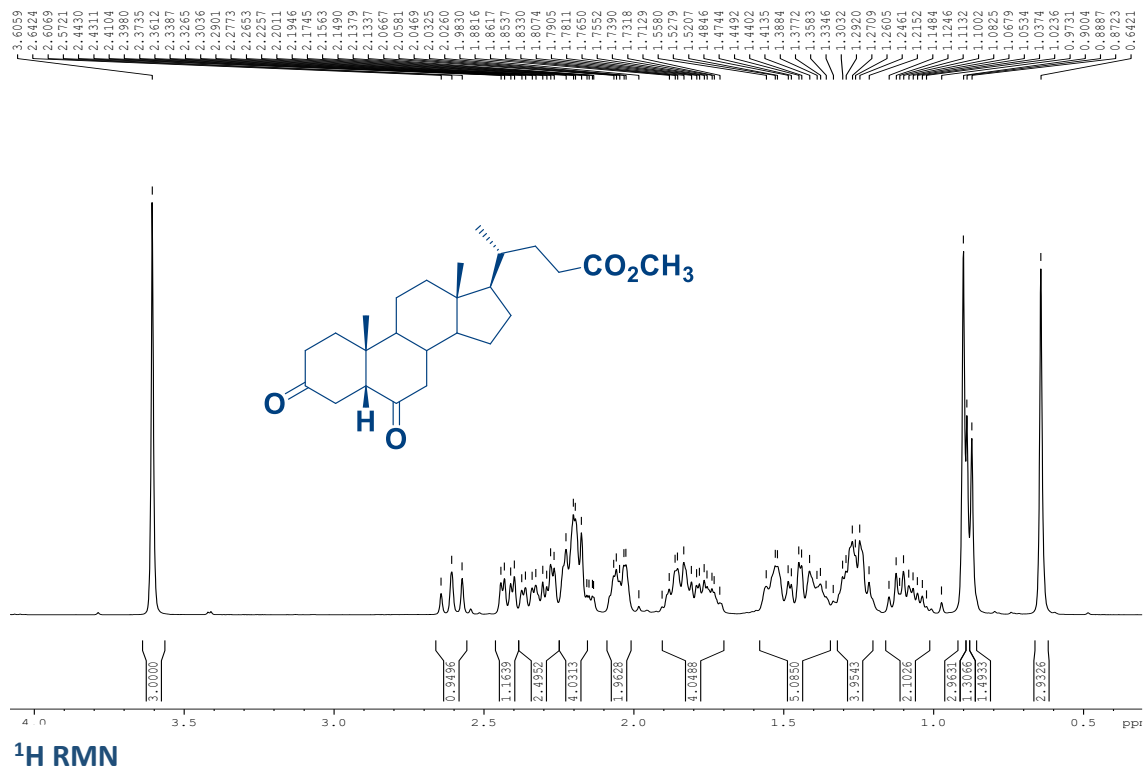


A.3. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxo-6-oxalactona (**87**)

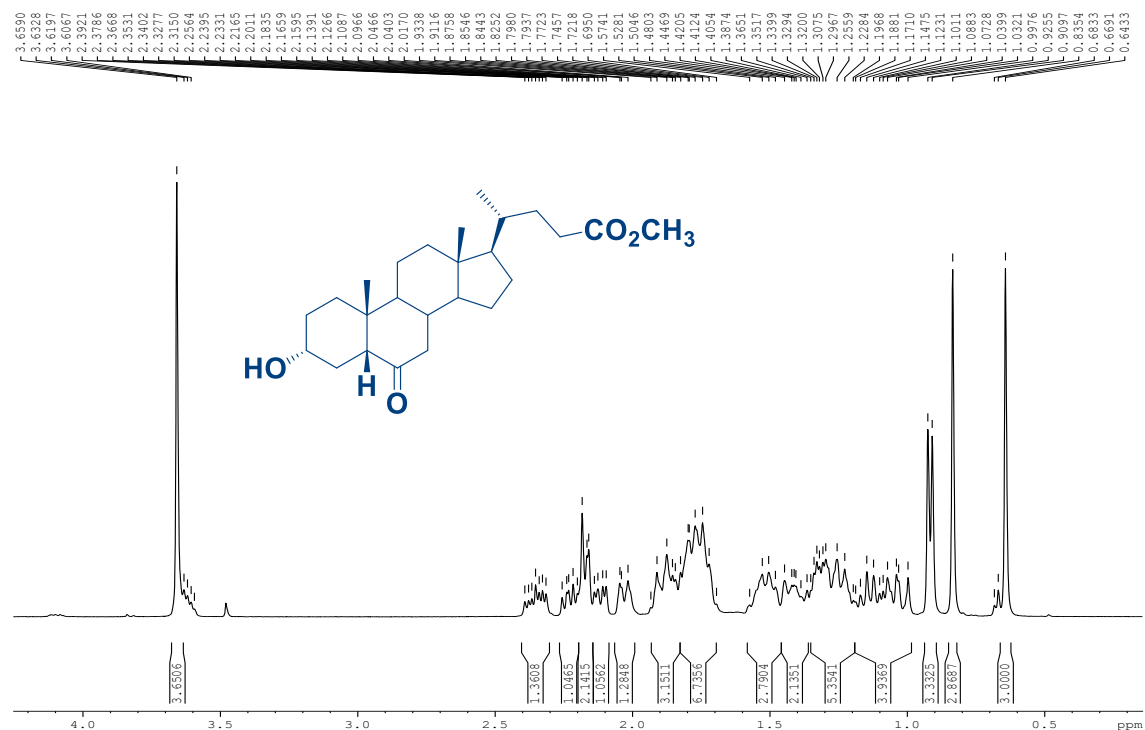




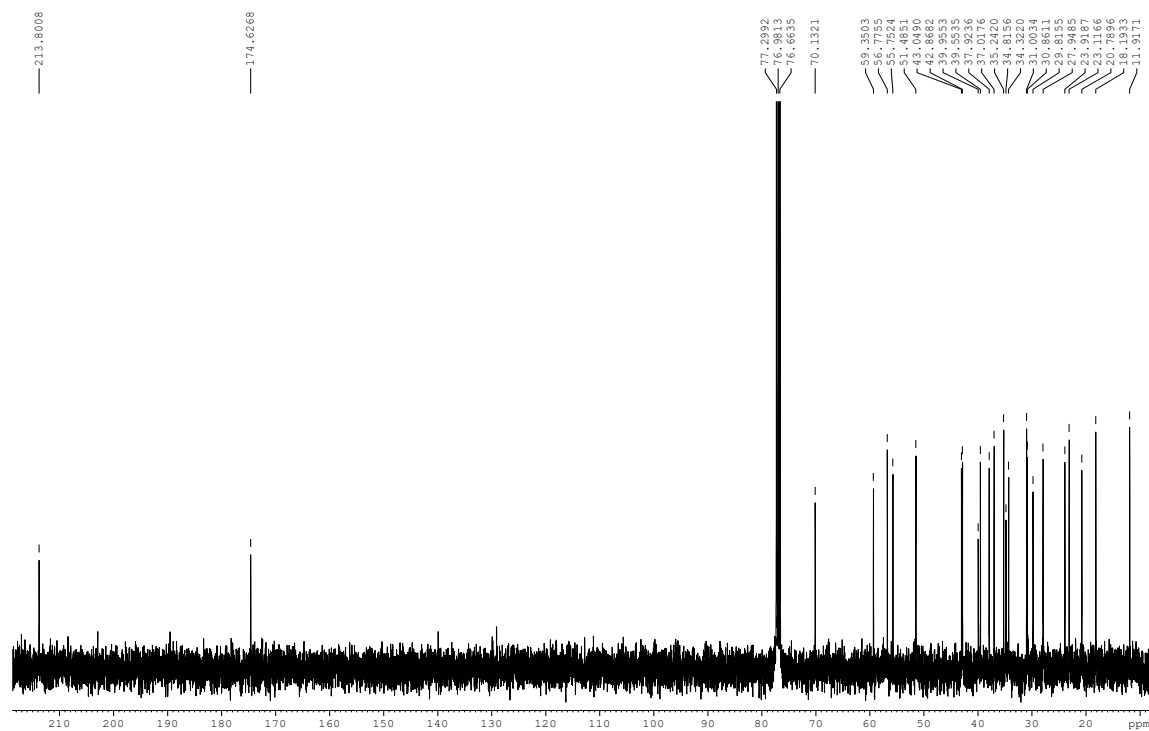
A.4. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN del compuesto 3,6-dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (95)



A.5. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN del compuesto 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (**97**)

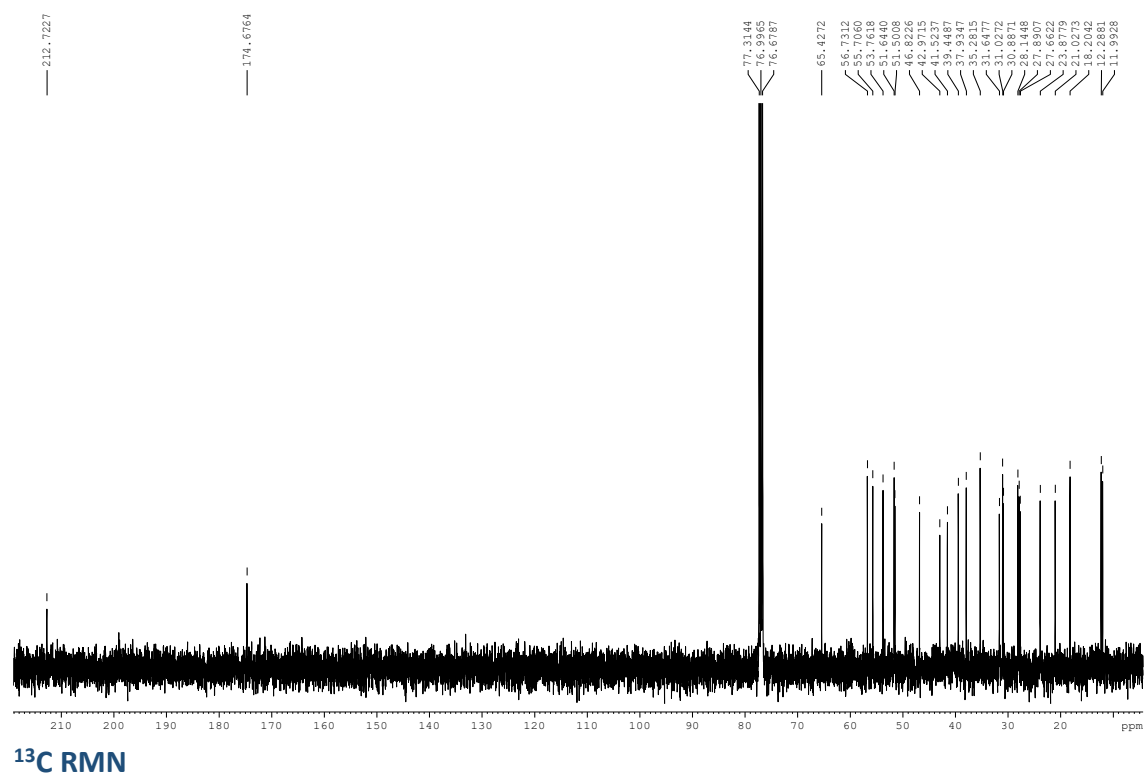
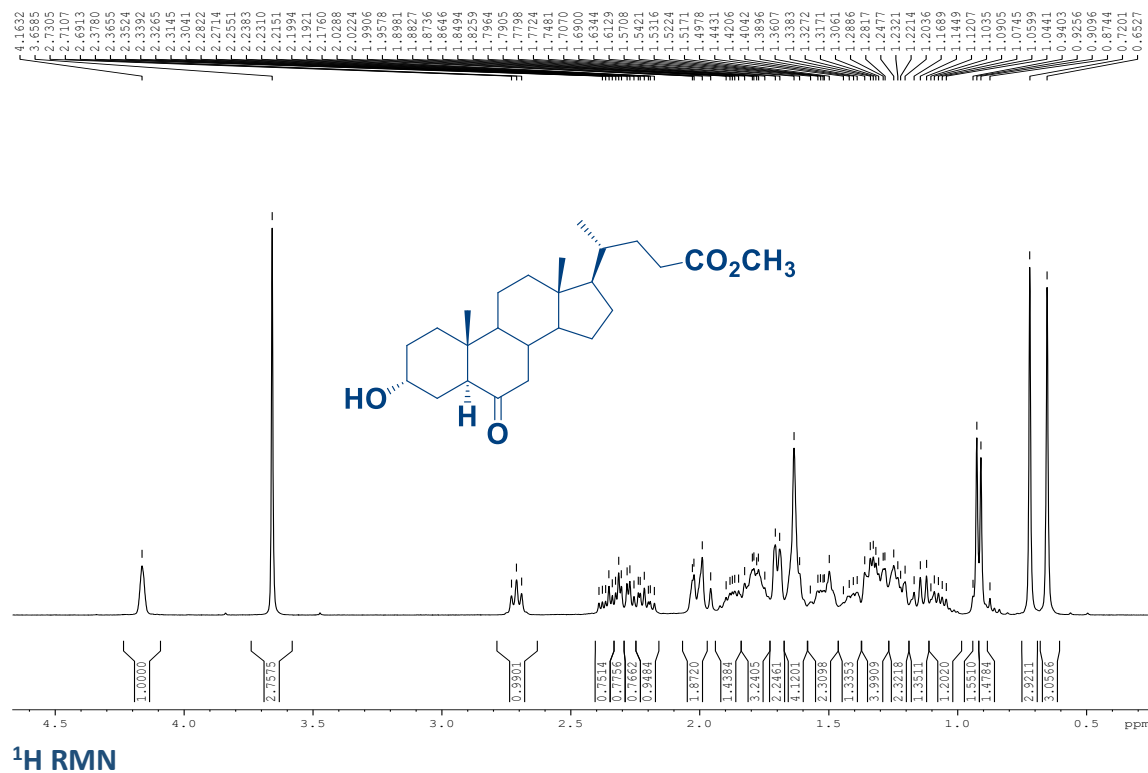


^1H RMN

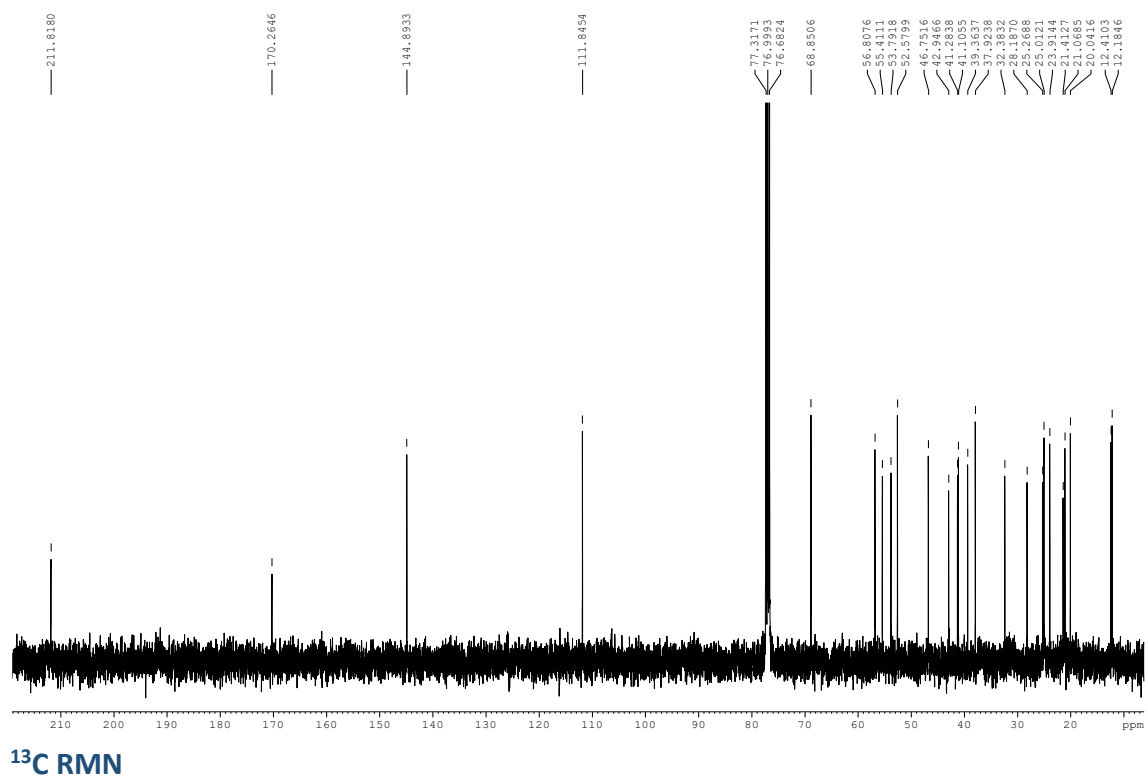
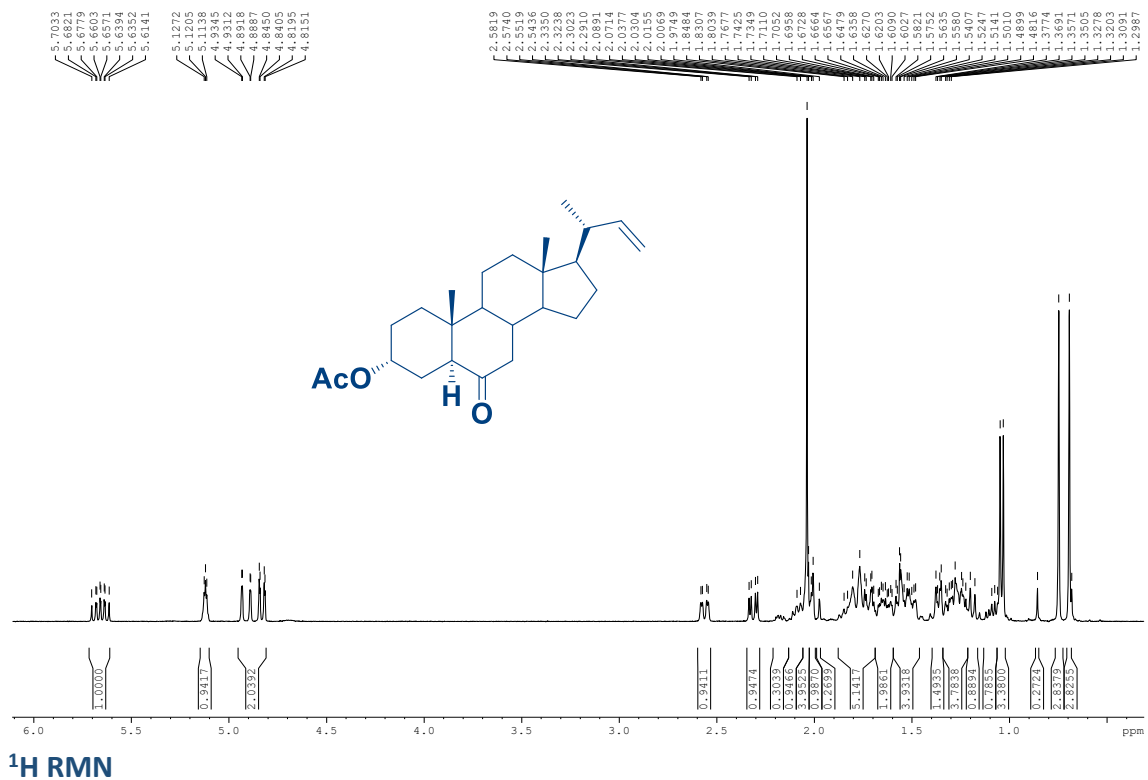


^{13}C RMN

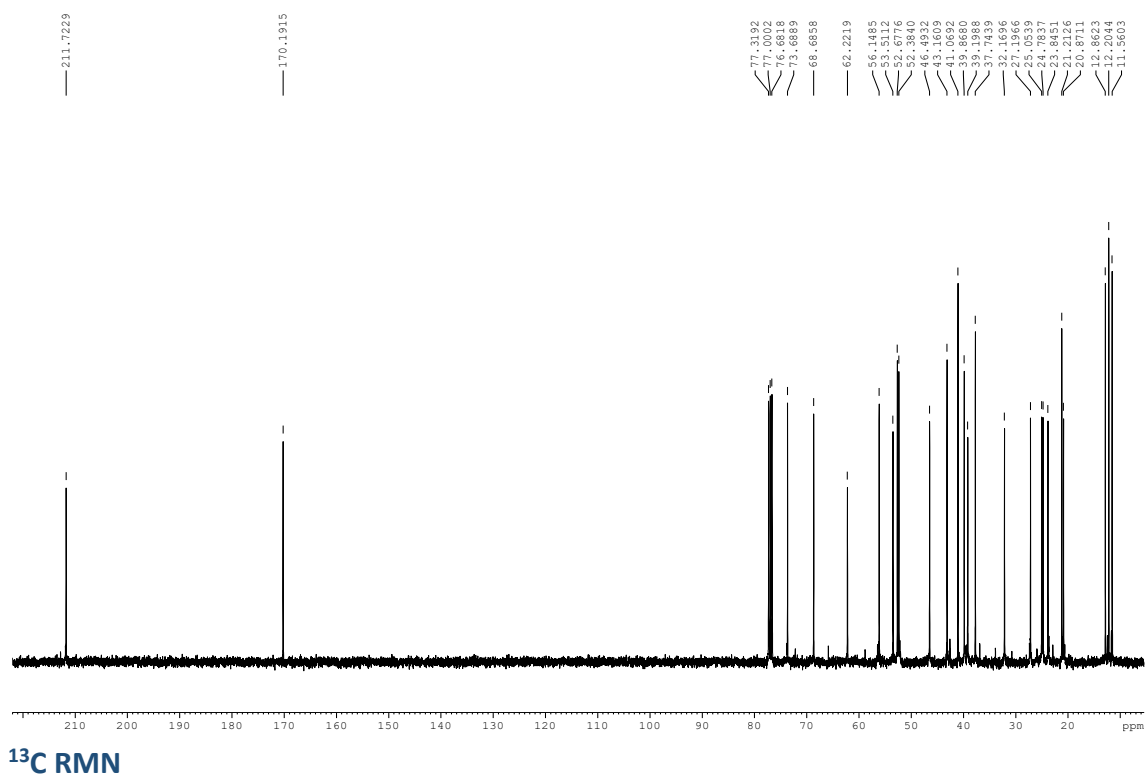
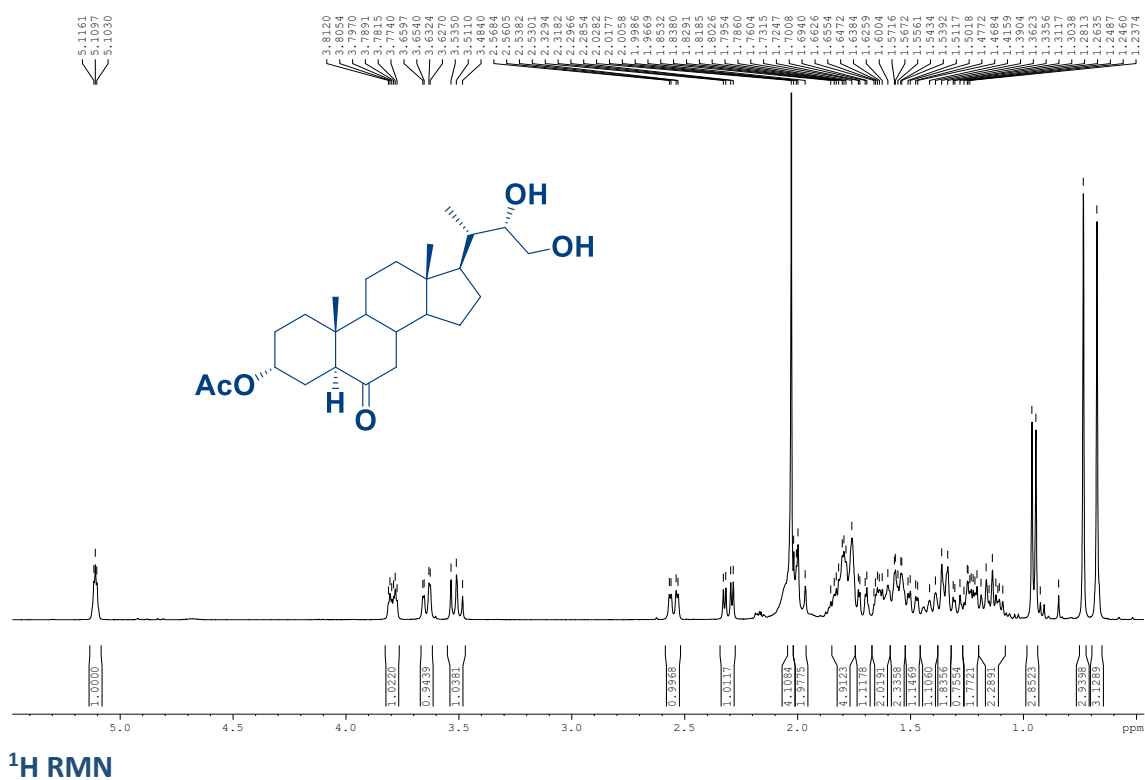
A.6. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN del compuesto 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (**98**)

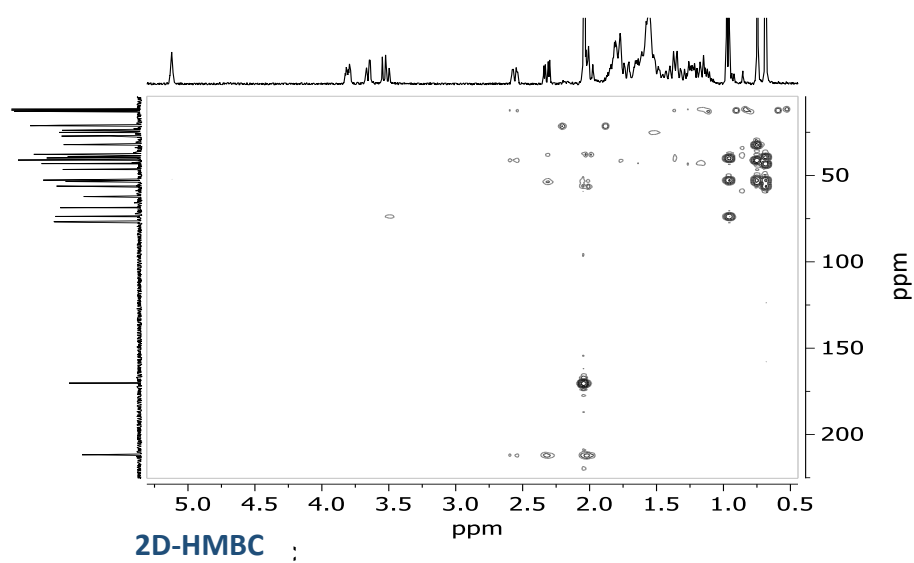
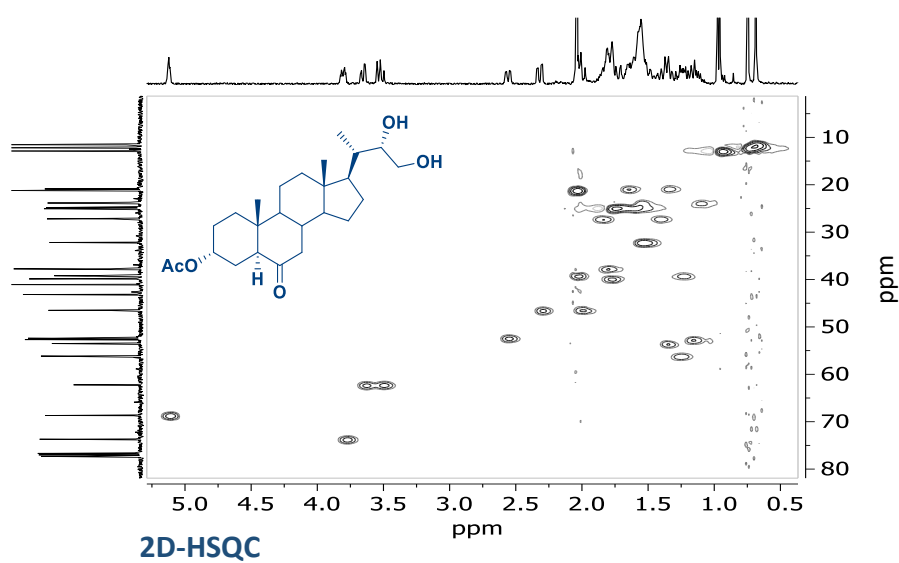
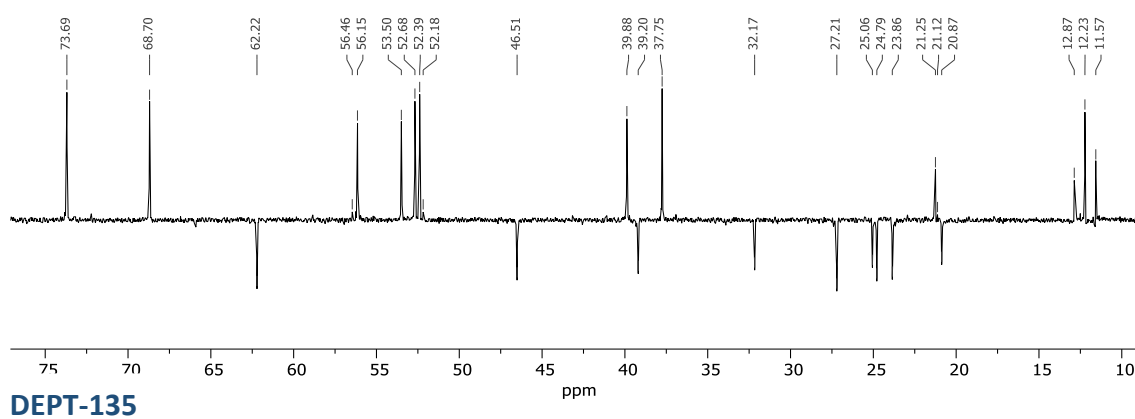


A.7. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN del compuesto 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona (**104**)

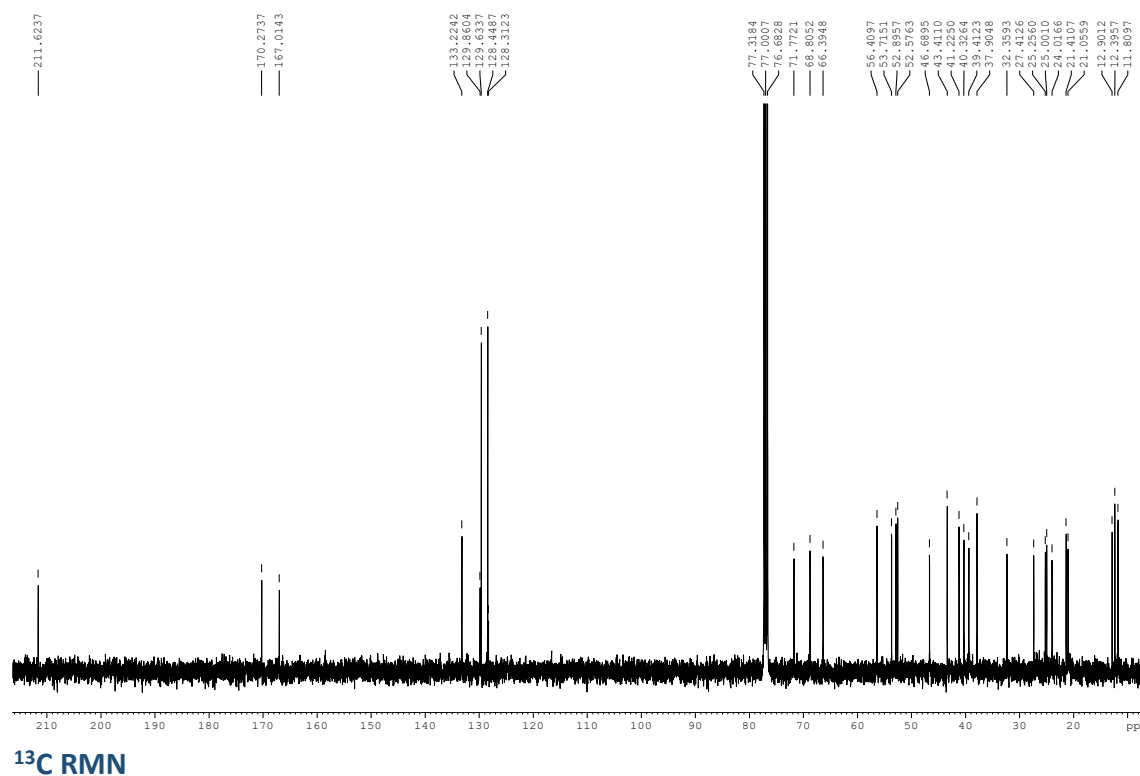
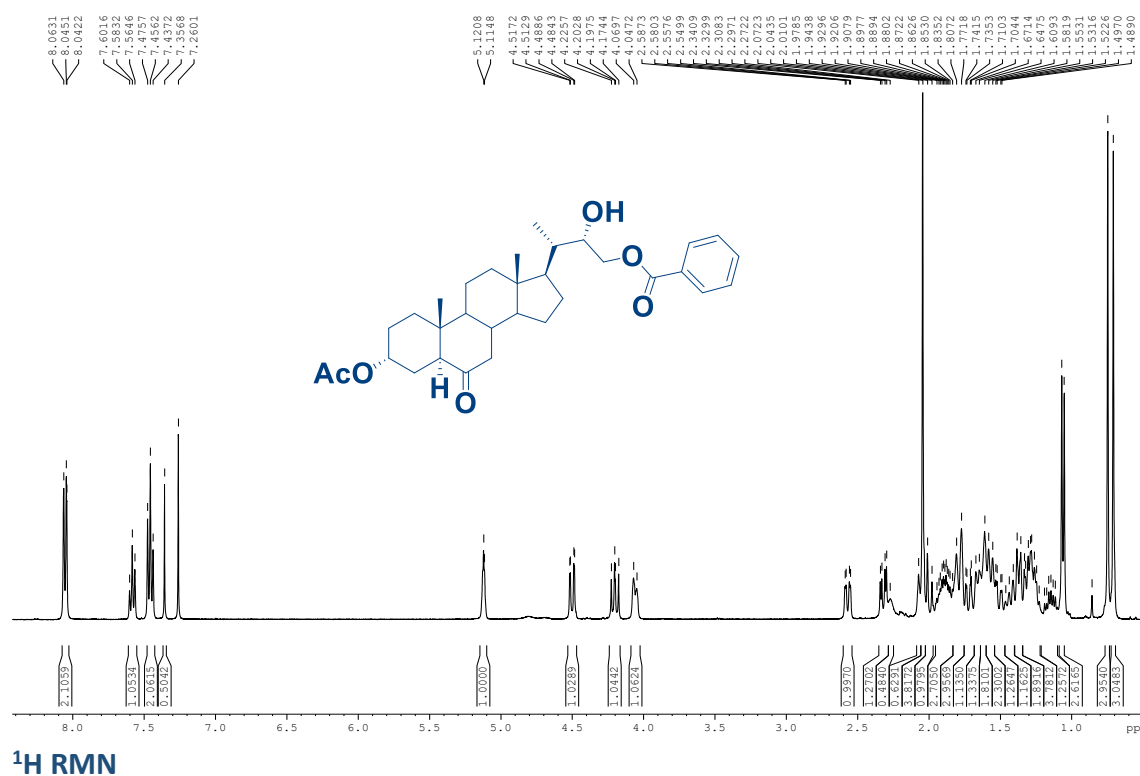


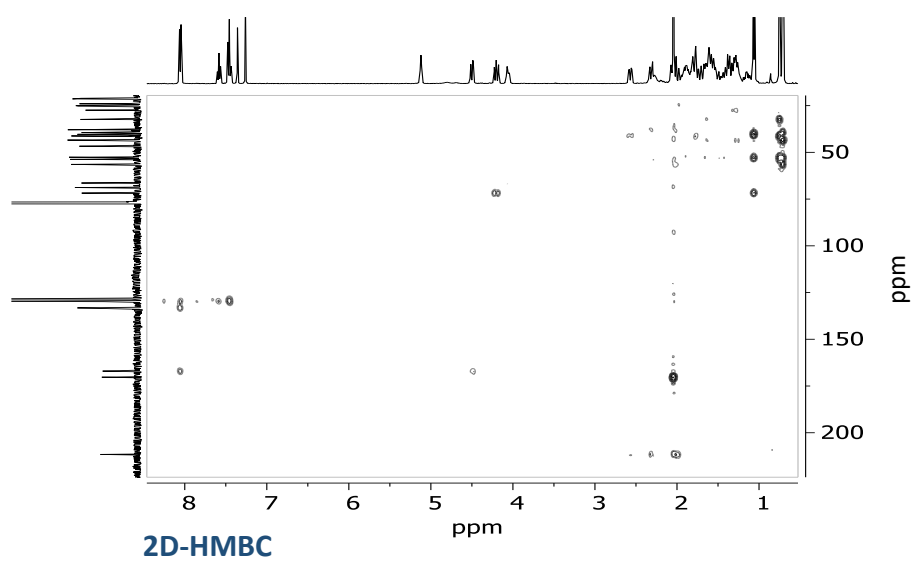
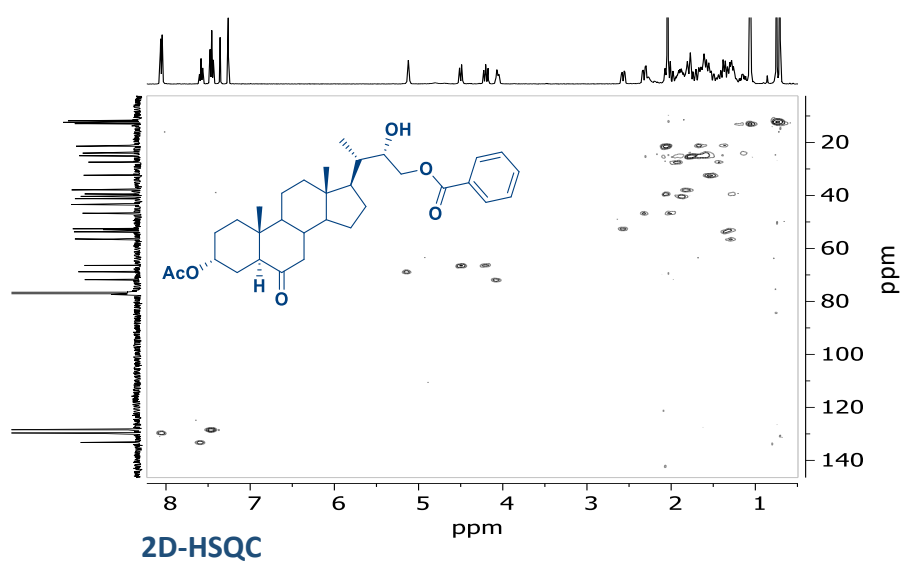
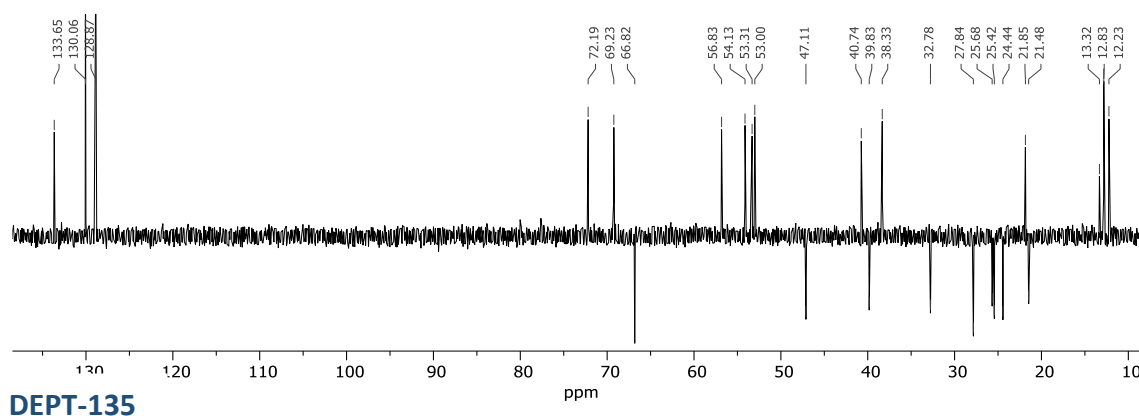
A.8. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 22S, 23-dihidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**109**)



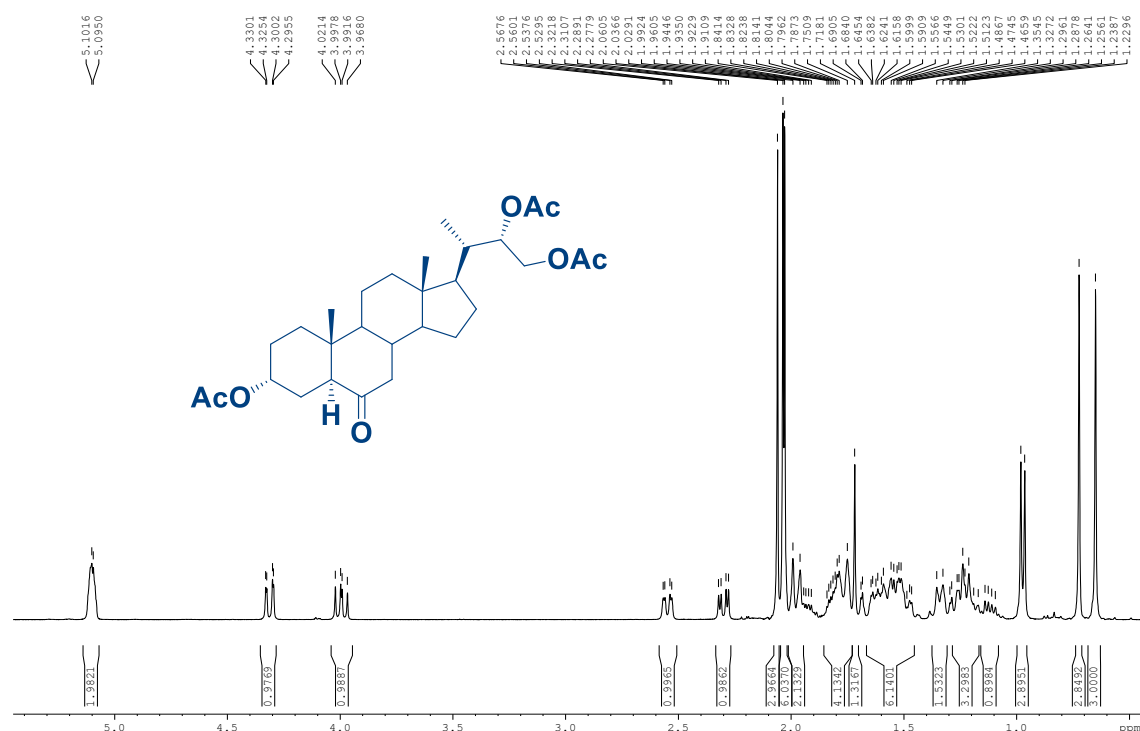


A.9. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 23-benzoiloxi-22S-hidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**110**)

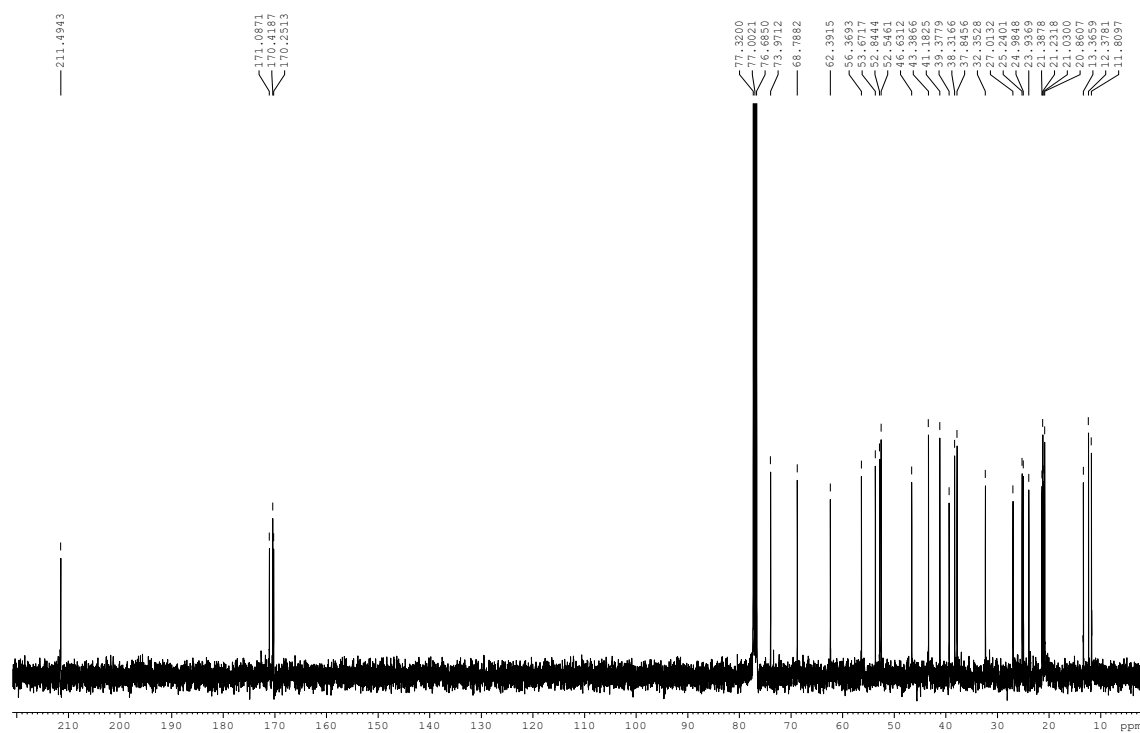




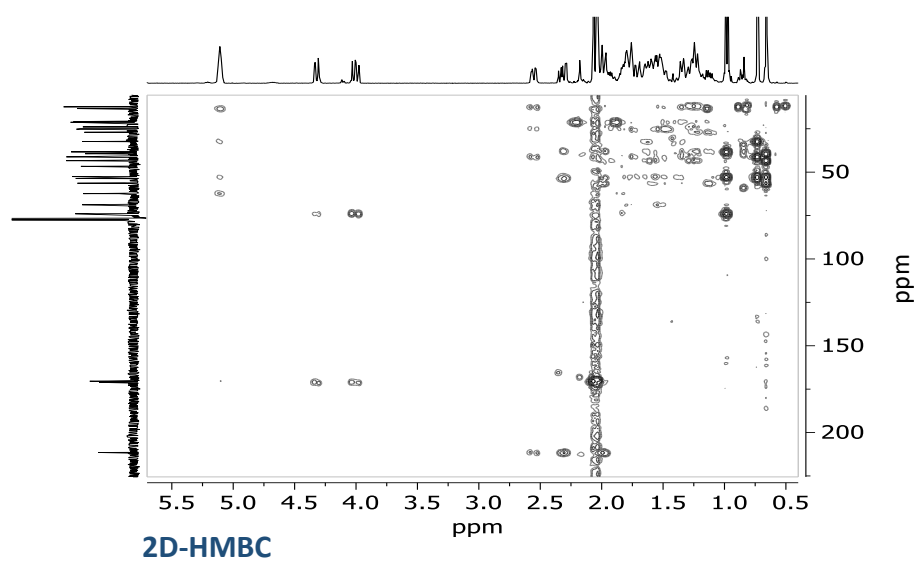
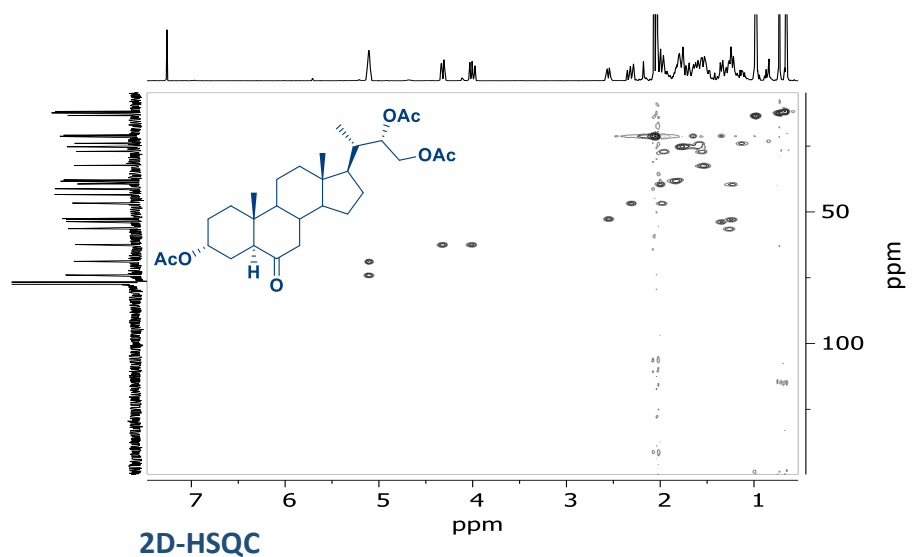
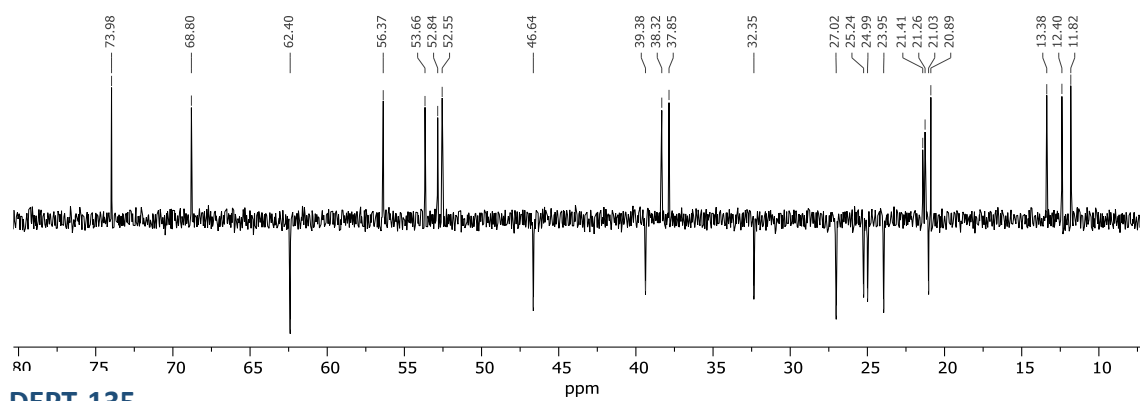
A.10. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α , 22S , 23 -triacetoxi- 24 -nor- 5β -colan- 6 -ona (**111**)

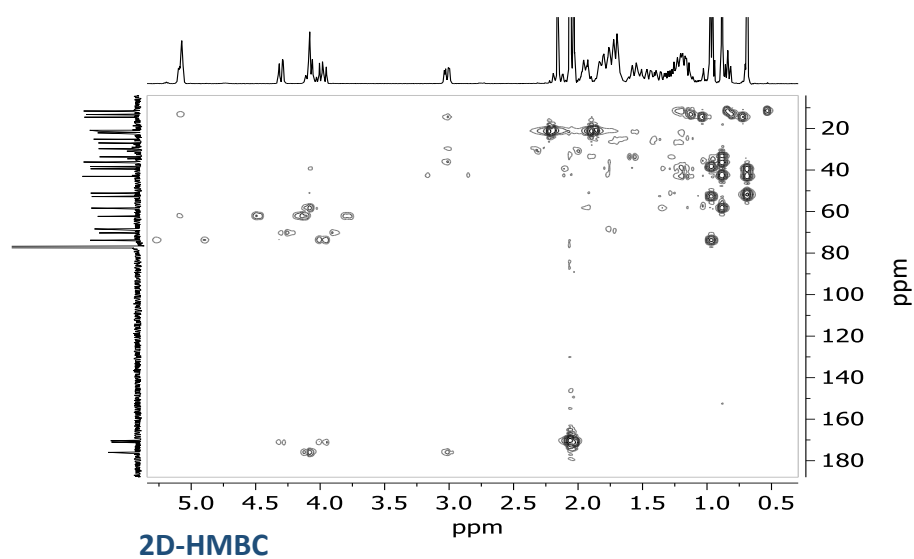
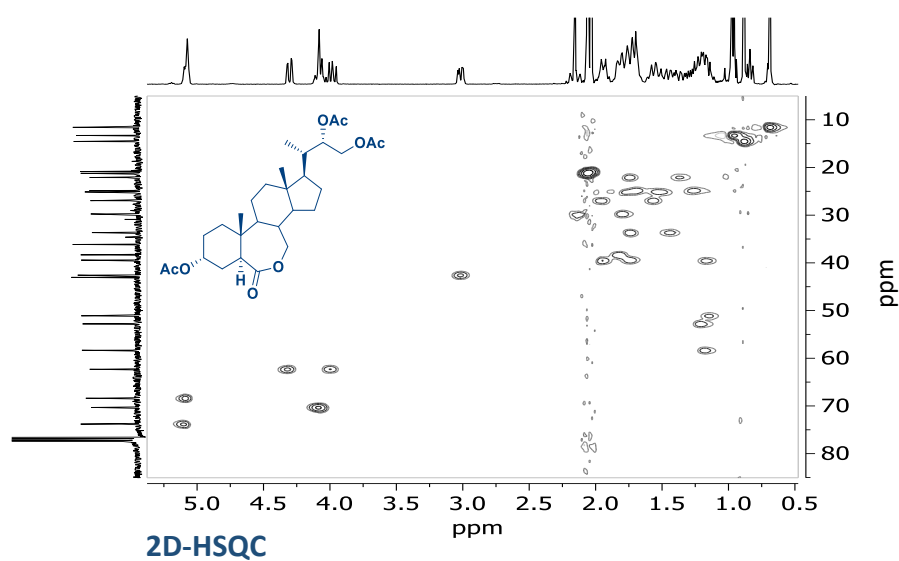
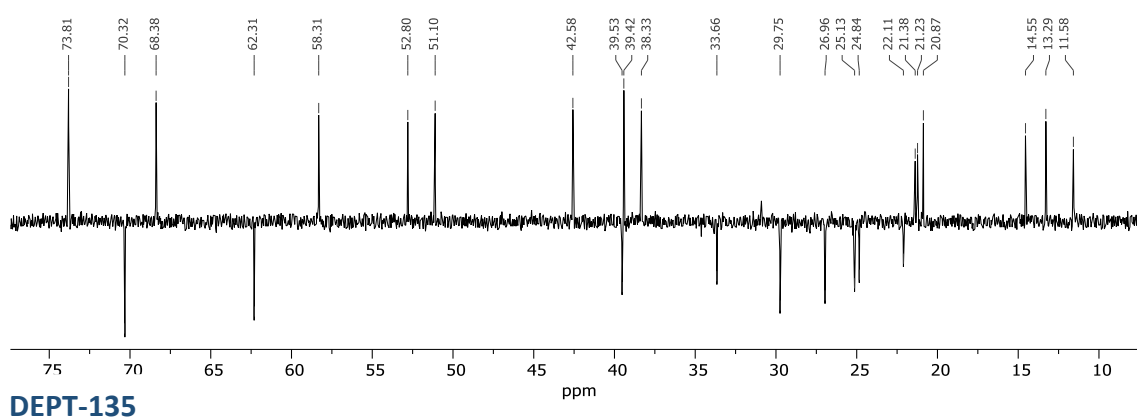


^1H RMN

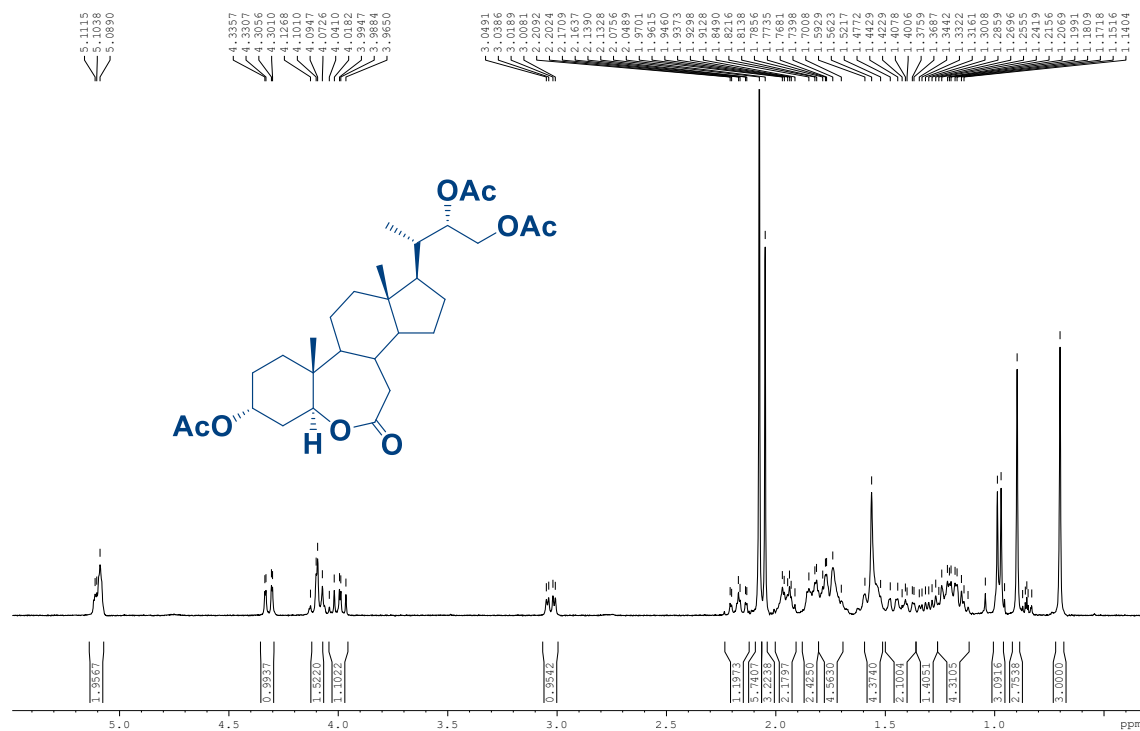


^{13}C RMN

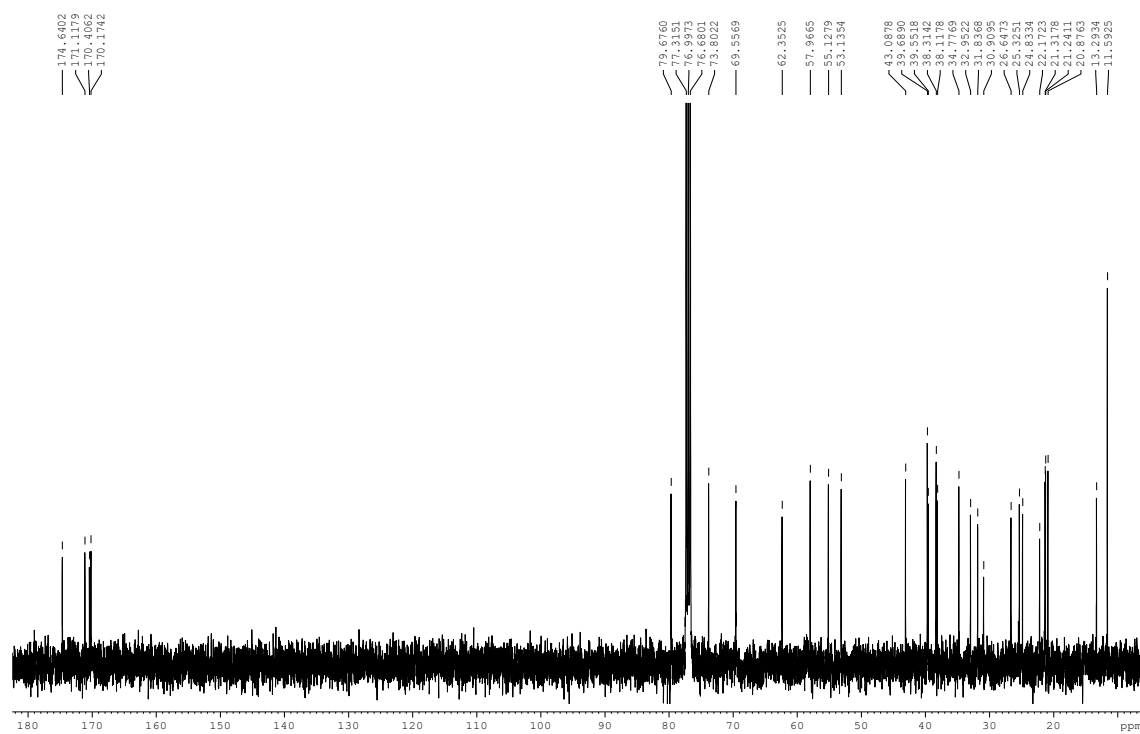




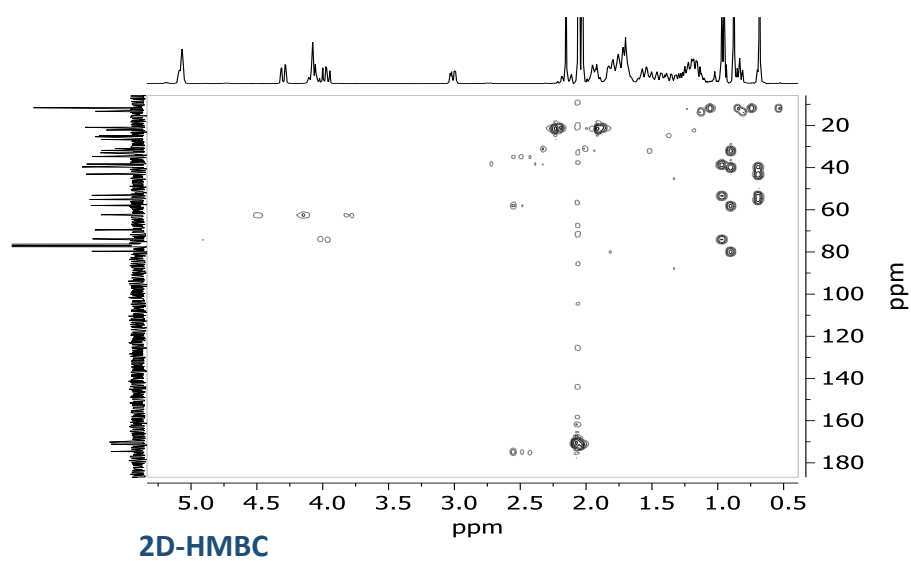
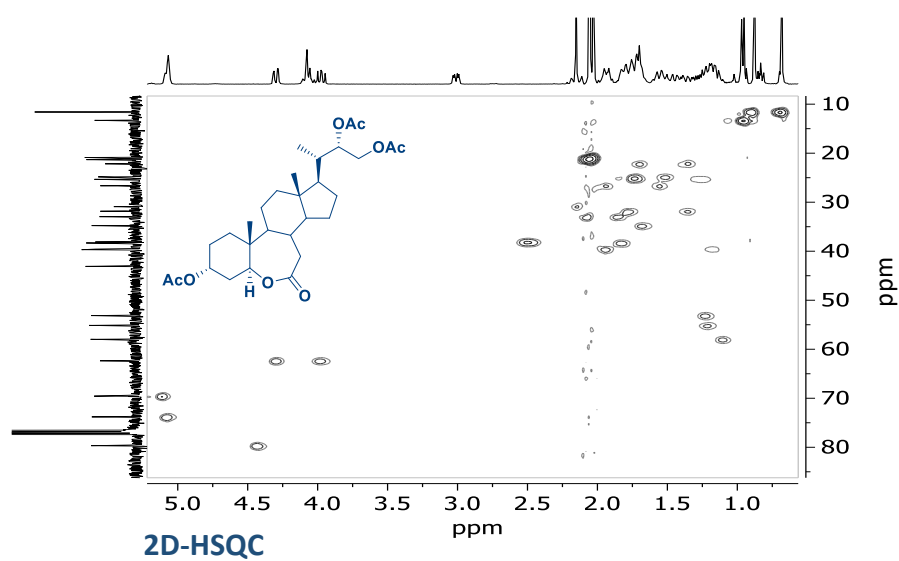
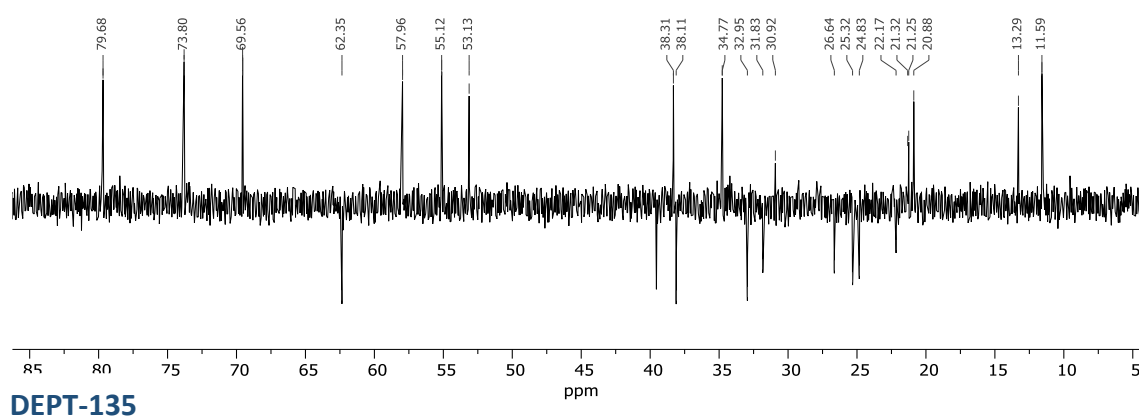
A.12. Espectroscopía ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C RMN DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC del compuesto 3α , 22 S , 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-7-oxo-6-oxalactona (**113**)



^1H RMN



^{13}C RMN



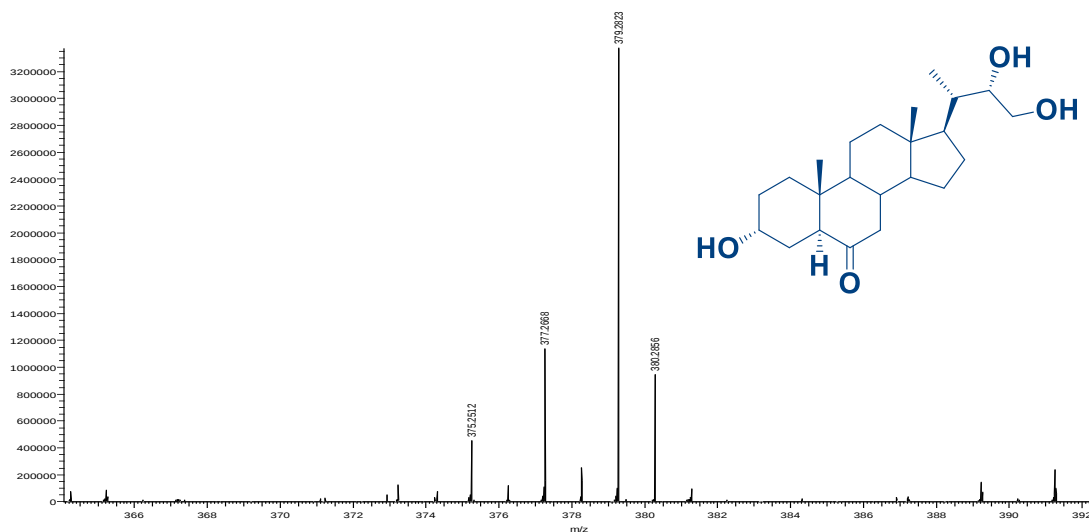
B. Espectrometría de masas

B.1. Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**84**)

D:\Tunes\2017\Mayo\08.05.17\Triol

05/08/17 09

Triol #3 RT: 0.03 AV: 1 NL: 3.37E6
T: FTMS + p ESI Full ms [278.0000-478.0000]

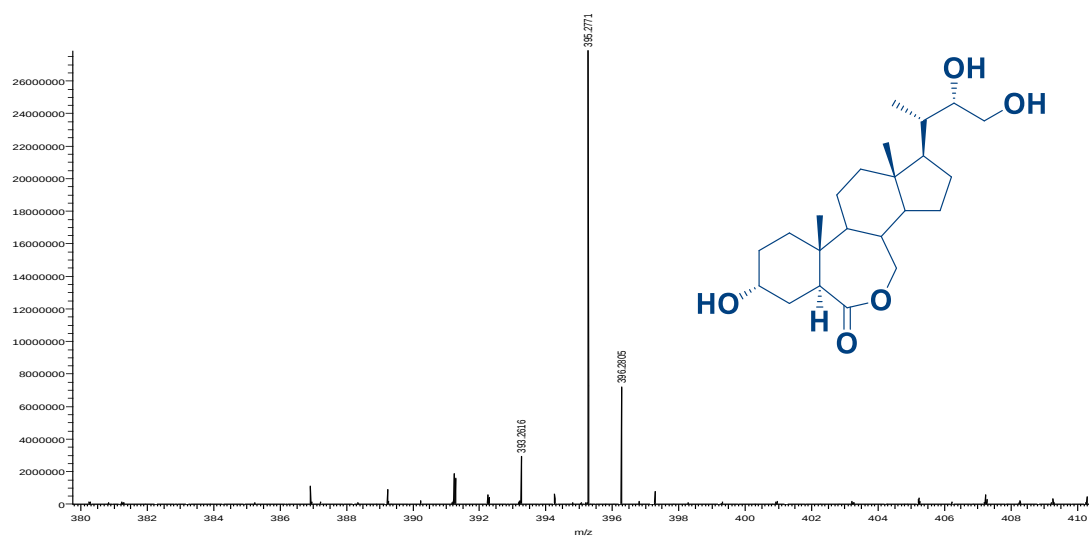


B.2. Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-oxo-7-oxalactona (**86**)

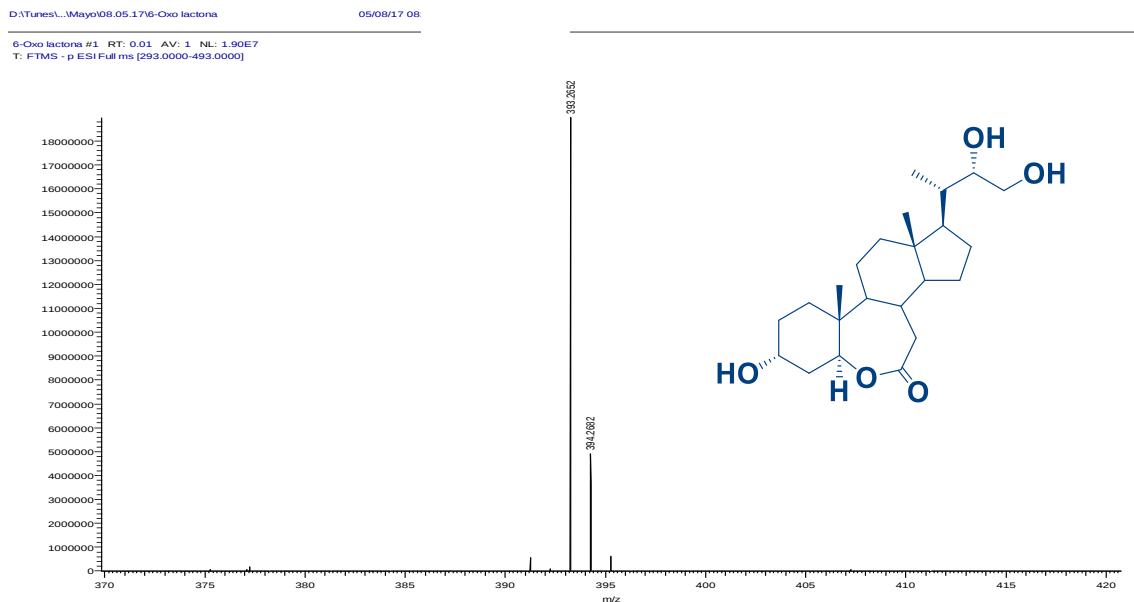
D:\Tunes\...Mayo\08.05.17\7-Oxo lactona

05/08/17 09

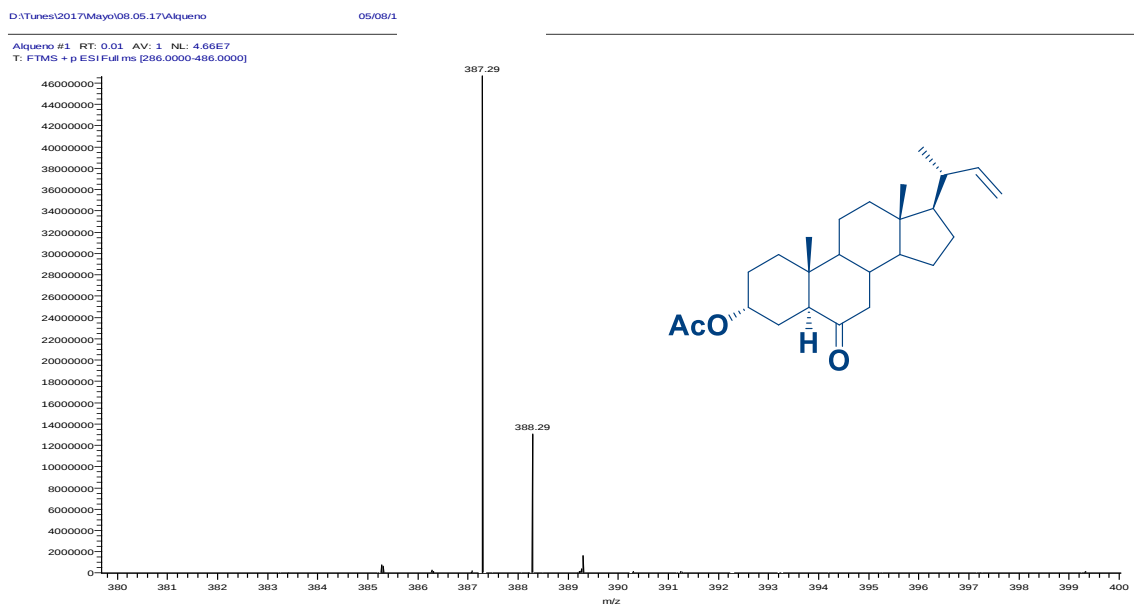
7-Oxo lactona #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 2.79E7
T: FTMS + p ESI Full ms [294.0000-494.0000]



B.3. Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-7-oxo-6-oxalactona (**87**)



B.4. Espectrometría de masas del compuesto 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona (**104**)

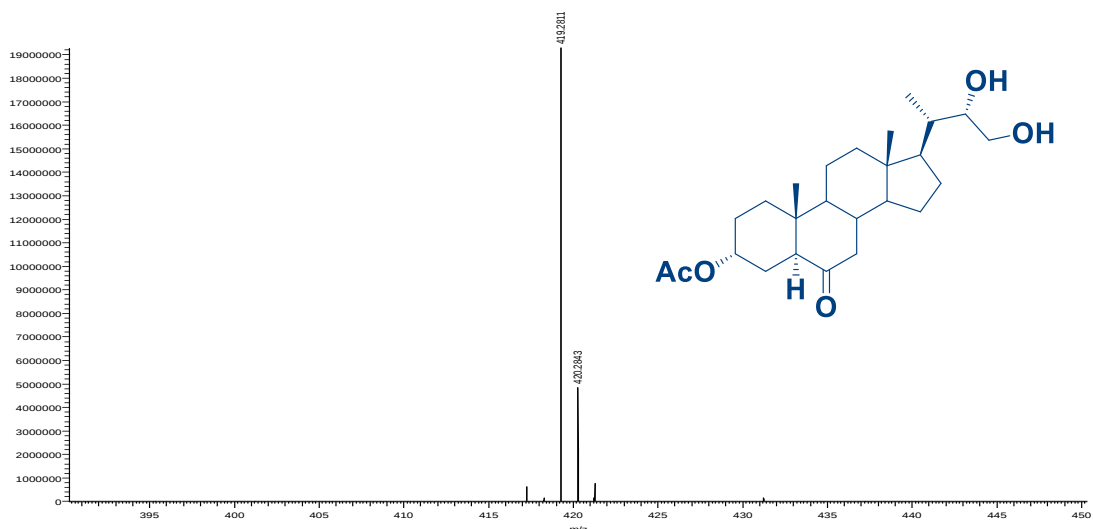


B.5. Espectrometría de masas del compuesto 22S, 23-dihidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**109**)

D:\Tunes\...08.05.17\Glicol acetilado

05/08/17 09

Glicol acetilado #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.93E7
T: FTMS - p ESI Full ms [320.0000-520.0000]

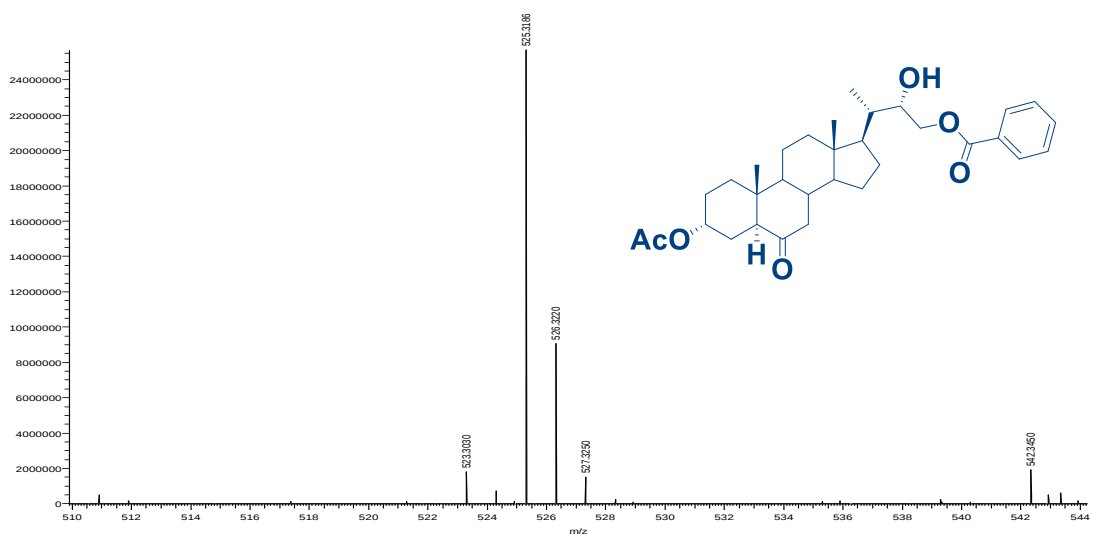


B.6. Espectrometría de masas del compuesto 23-benzoiloxi-22S-hidroxi-3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**110**)

D:\Tunes\2017\Mayo\08.05.17\Benzoilado

05/08/17 09

Benzoilado #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 2.57E7
T: FTMS - p ESI Full ms [424.0000-624.0000]

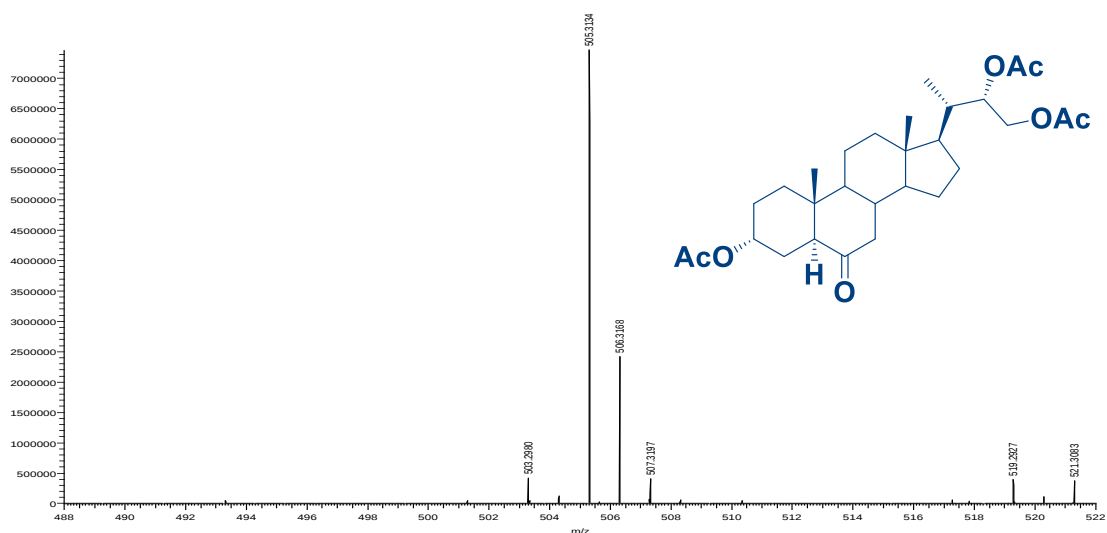


B.7. Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 β -colan-6-ona (**111**)

D:\Tunes\2017\Mayo\08.05.17\Triacetilado

05/08/17 10

Triacetilado #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 7.47E6
T: FTMS + p ESI Full ms [405.0000-605.0000]

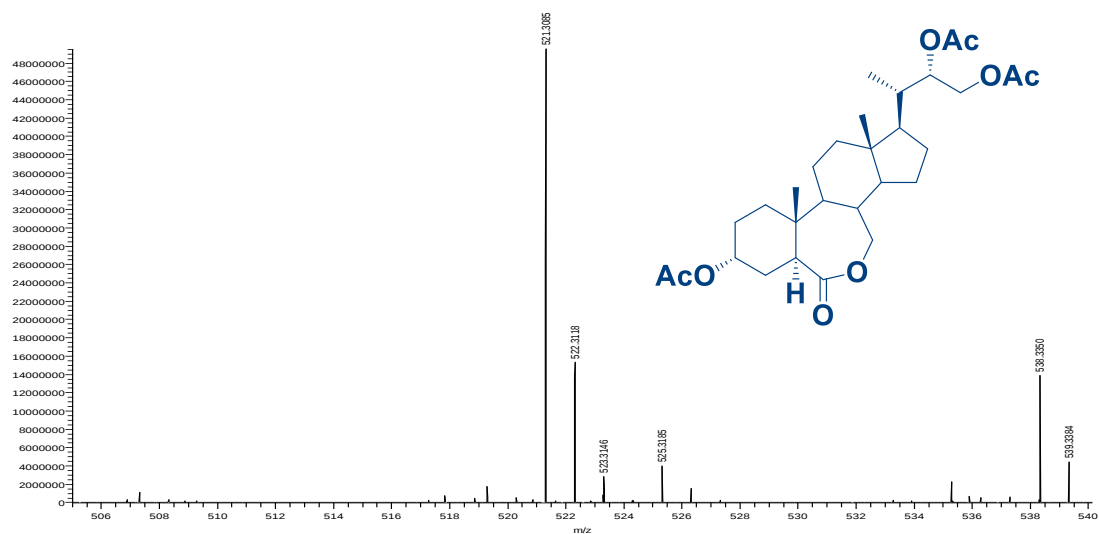


B.8. Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-6-oxo-7-oxalactona (**112**)

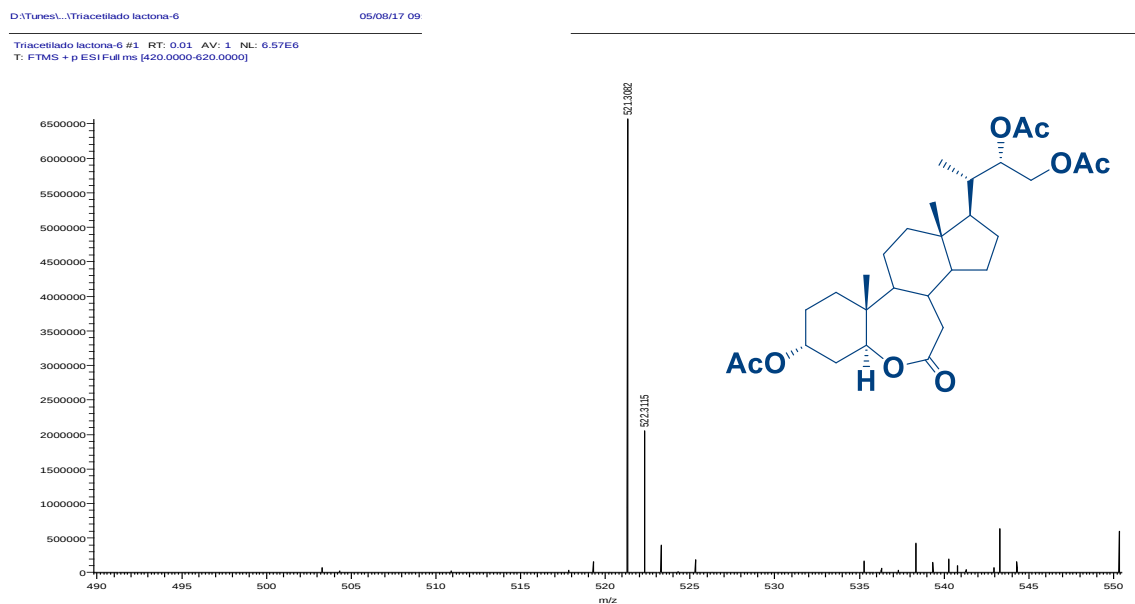
D:\Tunes\...\Triacetilado lactona 7

05/08/17 09

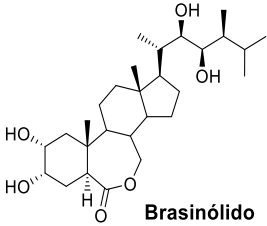
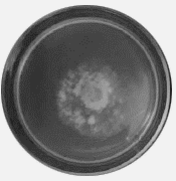
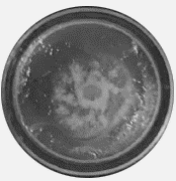
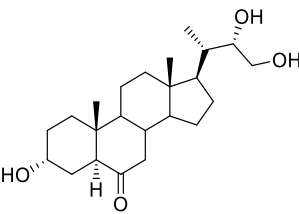
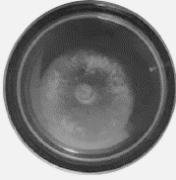
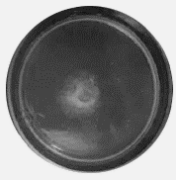
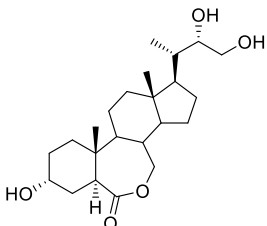
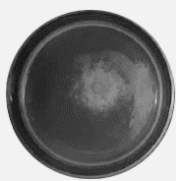
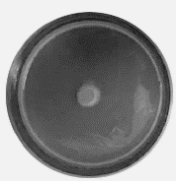
Triacetilado lactona 7 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 4.95E7
T: FTMS + p ESI Full ms [421.0000-621.0000]



B.9. Espectrometría de masas del compuesto 3 α , 22S, 23-triacetoxi-24-nor-5 α -colan-7-oxo-6-oxalactona (**113**)

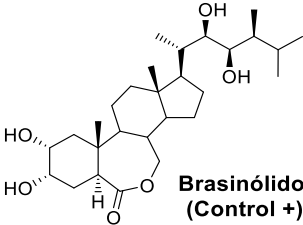
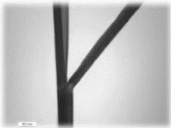
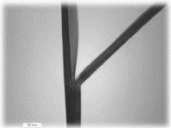
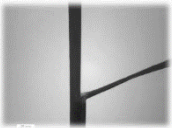
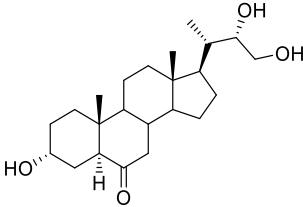
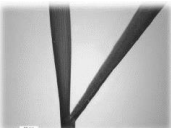
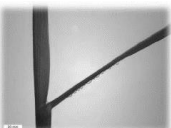
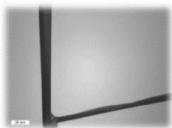
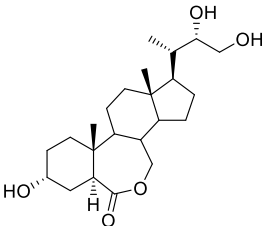
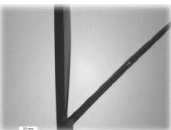
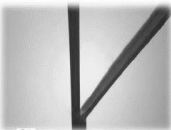
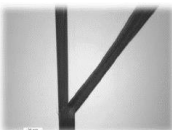
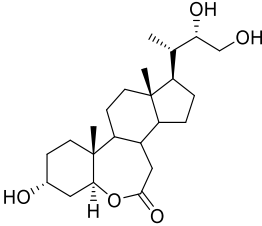
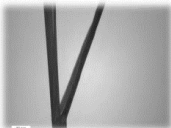
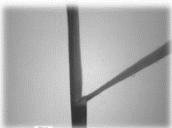
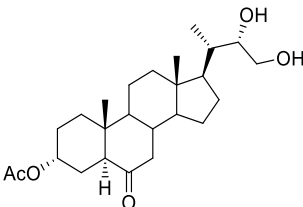
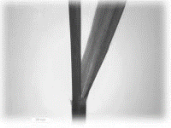
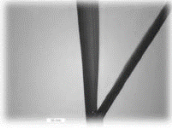


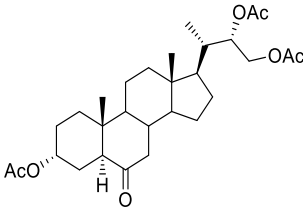
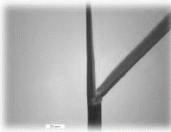
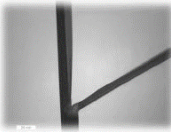
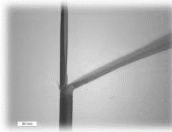
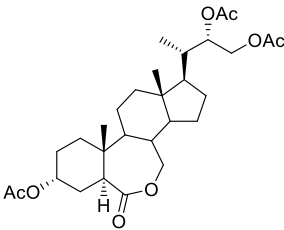
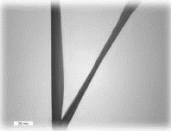
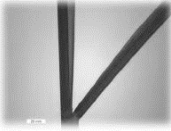
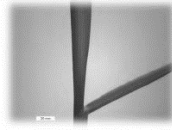
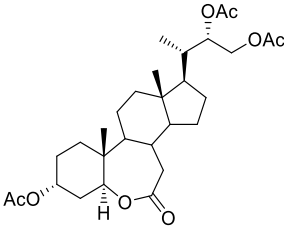
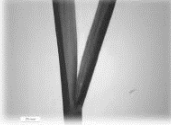
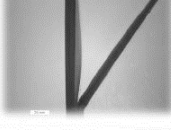
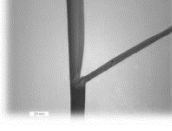
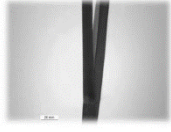
C. Imágenes del ensayo de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* *in vitro* (compuestos más activos)

Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (ppm)		
		50	100	150
BL	 Brasinólido			
84				
112				
Control (+)				
Control (-)				

Registro visual del efecto de la aplicación de los compuestos: brasinólido, **84** y **112** sobre la propagación del hongo *Botrytis cinerea* *in vitro*. Para la cuantificación se utilizó el antifúngico Captan como control (+).

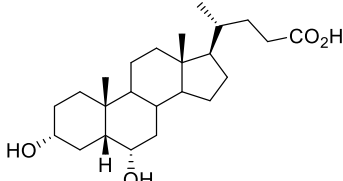
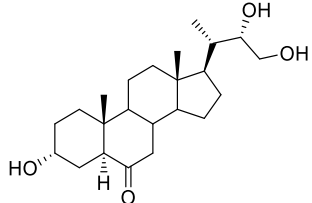
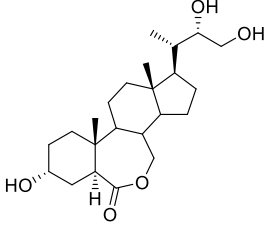
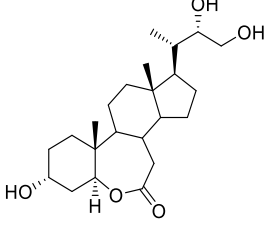
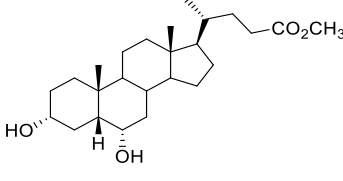
D. Imágenes del test de inclinación de la lámina de arroz (RLIT)

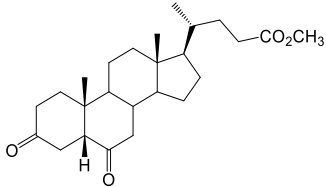
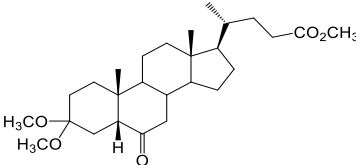
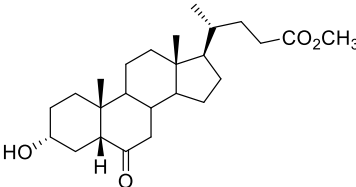
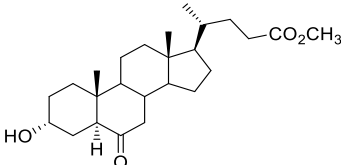
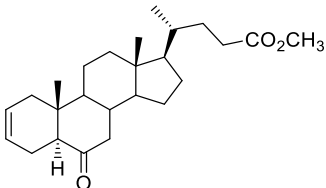
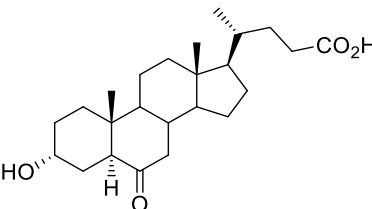
Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (M)		
		1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}
BL	 Brasinólido (Control +)			
84				
86				
87				
109				

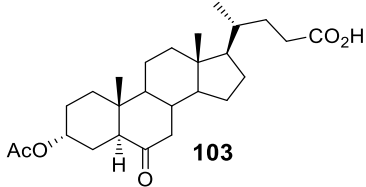
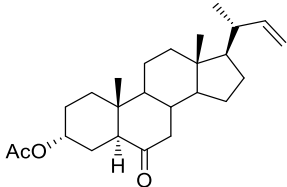
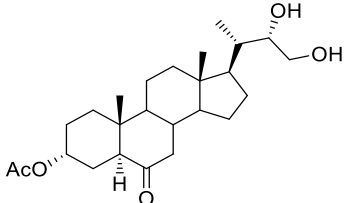
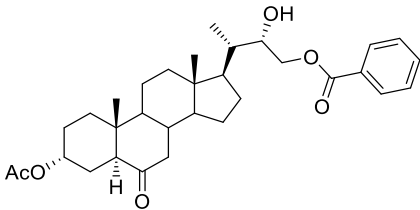
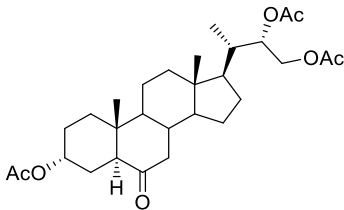
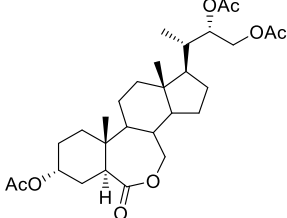
111				
112				
113				
Control (-)				

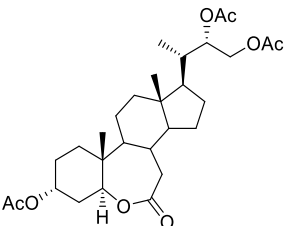
Registro visual del efecto de la aplicación de los compuestos: **84, 86, 87, 109, 111, 112 y 113** en el test RLIT, 72 h después de la exposición. Para la cuantificación se utilizó **brasinólido** como control (+).

E. Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular no tumoral CoN (% de viabilidad celular)

Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (μM)		
		25	50	100
53			110,5 ± 8,3	95,9 ± 5,1
84		100,9 ± 16,2	99,4 ± 6,1	88,6 ± 5,8
86		88,4 ± 4,3	62,3 ± 18,7	51,5 ± 2,4
87		72,8 ± 13,3	69,7 ± 16,2	60,1 ± 31,6
90			46,2 ± 7,4	15,9 ± 14,5

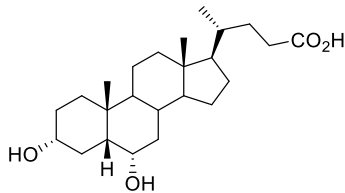
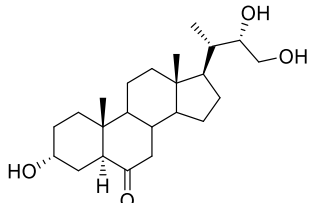
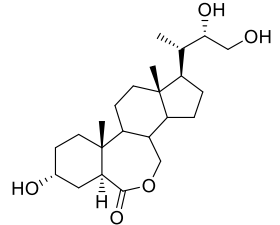
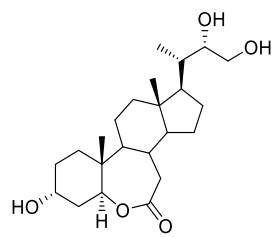
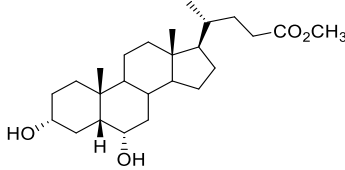
95			$72,7 \pm 10$	$33 \pm 1,3$
96			$64,6 \pm 29,1$	$37,8 \pm 4,7$
97			$73,8 \pm 36,9$	$53,1 \pm 28,8$
98			$102,6 \pm 22,5$	$59,5 \pm 10,9$
100			$100,5 \pm 9,2$	$48,6 \pm 16,8$
102			$103,1 \pm 2,6$	$82,8 \pm 2$

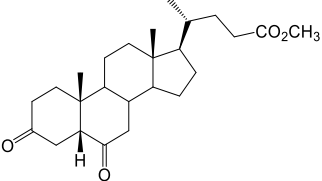
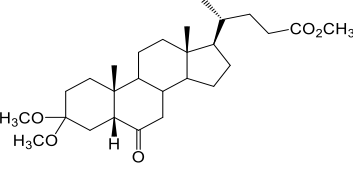
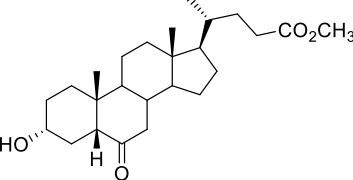
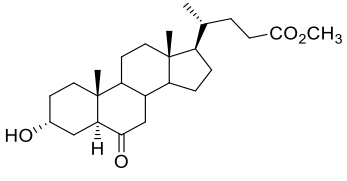
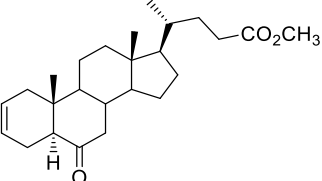
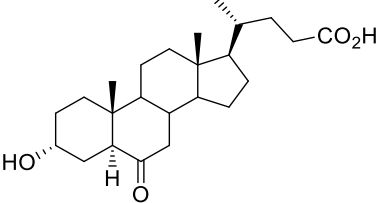
103			$92,8 \pm 14,8$	$43,1 \pm 15,6$
104		$78,7 \pm 14,3$	$57,7 \pm 12,8$	$38,2 \pm 3,3$
109		$94,3 \pm 6,1$	$92,1 \pm 9,4$	$88,4 \pm 24,4$
110		$118 \pm 12,2$	$101,8 \pm 22,2$	$108,7 \pm 10,9$
111		$99,2 \pm 7,5$	$99,4 \pm 8,6$	$92,1 \pm 18,8$
112		$81,2 \pm 11,3$	$78,6 \pm 21,6$	$41,9 \pm 3,9$

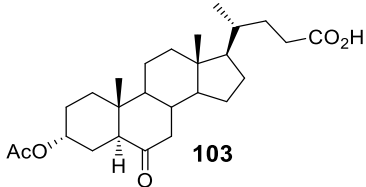
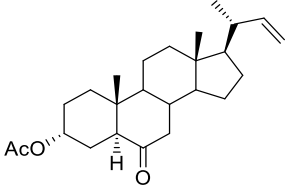
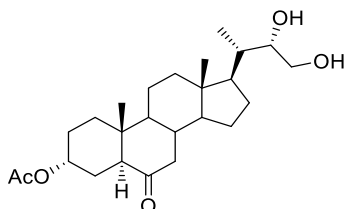
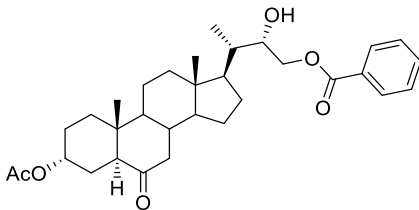
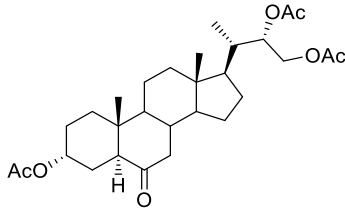
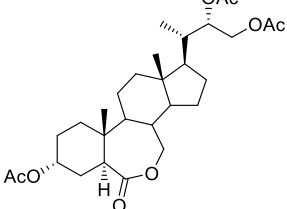
113		87,1 ± 12,6	69,1 ± 6,6	32,1 ± 0,4
-------------------	---	--------------------	-------------------	-------------------

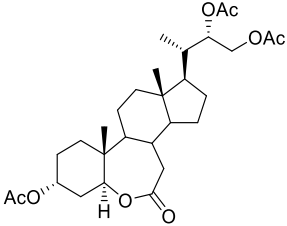
En la tabla se presentan los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones: 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Los valores corresponden al promedio $\pm$ DS.

F. Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular tumoral PC-3 (% de viabilidad celular)

Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (μM)		
		25	50	100
53			106,1 ± 17,3	113,8 ± 8,3
84		82,3 ± 16,7	61,7 ± 12,8	49,3 ± 3,3
86		74,2 ± 27,7	64,3 ± 23,9	58 ± 18,3
87		88,6 ± 12,3	88,7 ± 1,3	74,3 ± 6,3
90			67,5 ± 42,6	12,2 ± 3,7

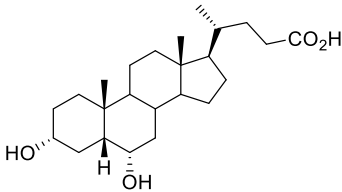
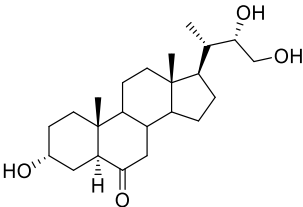
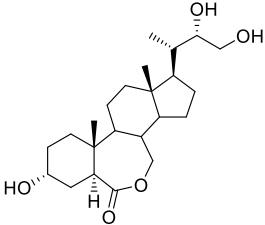
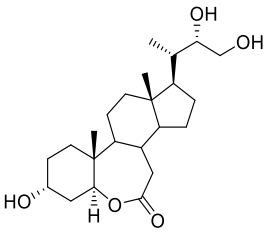
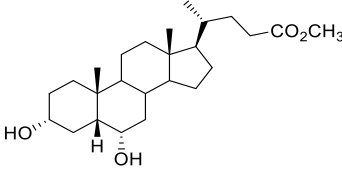
95			$83 \pm 31,8$	$57,3 \pm 46,8$
96			$43,9 \pm 0,7$	$63,2 \pm 36,1$
97			$88,9 \pm 12,4$	$55,5 \pm 5,4$
98			$98,8 \pm 14$	$78,3 \pm 2,7$
100			$90,7 \pm 19,4$	$65,4 \pm 25,5$
102			$99,9 \pm 18,3$	$91,3 \pm 7,8$

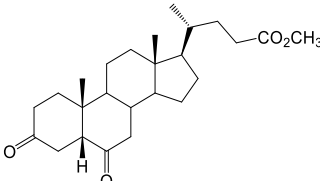
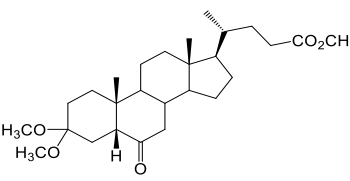
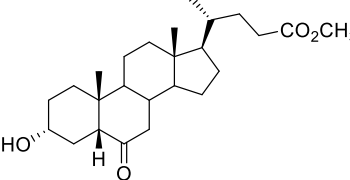
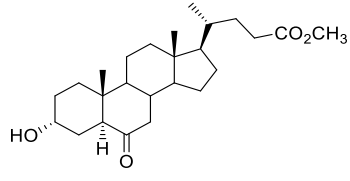
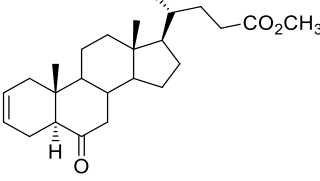
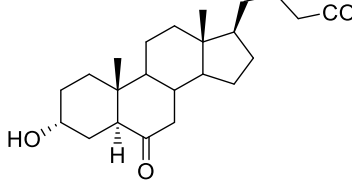
103			$86,3 \pm 6,5$	$37,8 \pm 7,8$
104		$110,3 \pm 9,3$	$99,4 \pm 0,9$	$97,3 \pm 25,5$
109		$65,2 \pm 11,5$	$57,3 \pm 11,8$	$52,5 \pm 11,9$
110		$87,1 \pm 2,6$	$78,1 \pm 12,6$	$89,1 \pm 6,5$
111		$71,3 \pm 7,9$	$48,3 \pm 22,6$	$72 \pm 7,3$
112		$63,8 \pm 11,3$	$41,3 \pm 17,3$	$18,3 \pm 4,6$

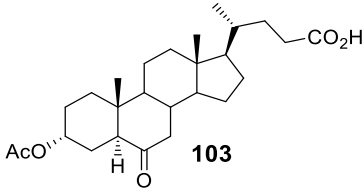
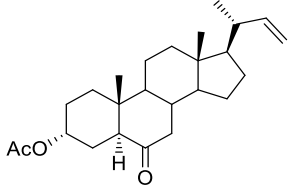
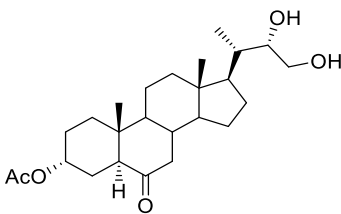
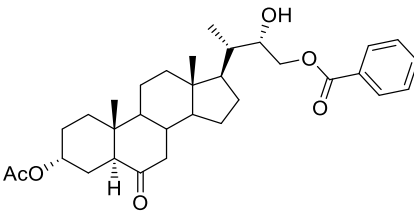
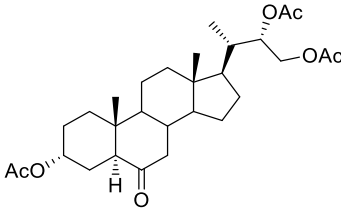
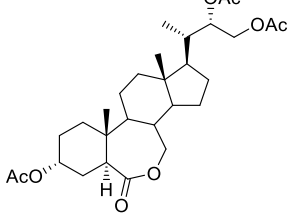
113		82,9 ± 10,9	79,3 ± 4,3	47,3 ± 19,1
-------------------	---	--------------------	-------------------	--------------------

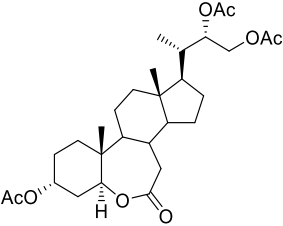
En la tabla se presentan los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones: 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Los valores corresponden al promedio $\pm$ DS.

G. Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular tumoral HT-29 (% de viabilidad celular)

Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (μM)		
		25	50	100
53			90,8 ± 12	77,5 ± 12
84		40,9 ± 1,9	38,3 ± 5,5	18,3 ± 0,7
86		62,3 ± 8,8	55,1 ± 1,4	27,3 ± 6,4
87		55,1 ± 12,6	42,3 ± 10,6	20,2 ± 18
90			36,9 ± 7,3	8 ± 1,3

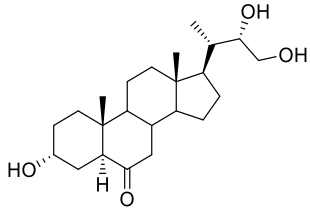
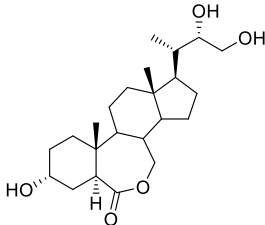
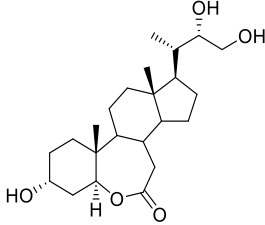
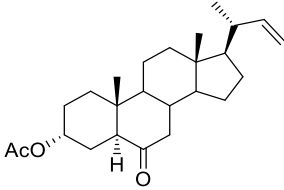
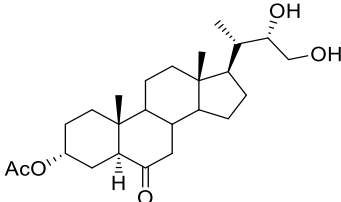
95			$82,2 \pm 6,3$	$85,4 \pm 5,7$
96			$92,7 \pm 12,2$	$88,1 \pm 14,8$
97			$53,4 \pm 11$	$29,9 \pm 13,2$
98			$77,3 \pm 8,5$	$79,1 \pm 4,6$
100			$71,6 \pm 6,7$	$68,4 \pm 4,4$
102			$95,8 \pm 6,5$	$82,4 \pm 1,6$

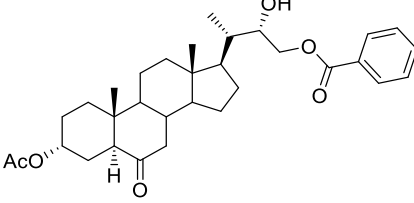
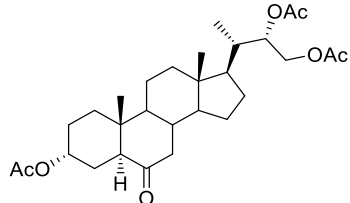
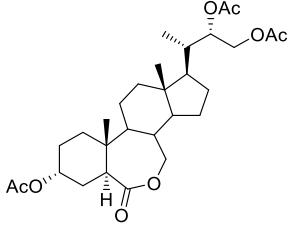
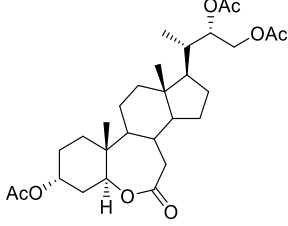
103			$102,7 \pm 2,3$	$68,5 \pm 11,8$
104		$100,9 \pm 10,8$	$101,1 \pm 11,8$	$108,3 \pm 11,4$
109		$99,5 \pm 6,3$	$88,4 \pm 12,2$	$65,9 \pm 2,2$
110		$105,3 \pm 7,2$	$110,9 \pm 12,3$	$99,7 \pm 10,9$
111		$88,3 \pm 1,1$	$71,3 \pm 5,9$	$55,5 \pm 2,8$
112		$87,3 \pm 8,1$	$79,3 \pm 4,4$	$33,8 \pm 12,8$

113		74,9 ± 12,9	69,2 ± 10,8	25,4 ± 18,8
-----	---	-------------	-------------	-------------

En la tabla se presentan los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones: 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Los valores corresponden al promedio $\pm$ DS.

H. Evaluación de actividad la citotóxica de análogos de BRs sintetizados frente a línea celular tumoral MCF7 (% de viabilidad celular)

Compuesto (Código)	Estructura de los análogos de BRs	Concentración del compuesto (μM)		
		25	50	100
84		66,8 ± 28,3	72,9 ± 46,3	96,2 ± 10,3
86		73,3 ± 12,6	73,4 ± 20,3	68,2 ± 7,2
87		100,9 ± 11,6	91,2 ± 36,7	92,5 ± 14,4
104		98,3 ± 2,9	110,6 ± 13,1	91,3 ± 16
109		72,5 ± 23,8	68,1 ± 27,9	62,4 ± 8,4

110		$76,2 \pm 1,2$	$52,3 \pm 15,3$	$72,3 \pm 26,3$
111		$99,4 \pm 19,7$	$105,3 \pm 0,4$	$91,3 \pm 5,3$
112		$74,3 \pm 17$	$68,2 \pm 10,9$	$74,5 \pm 25,4$
113		$86,4 \pm 2,8$	$94,3 \pm 11,8$	$101,8 \pm 16,2$

En la tabla se presentan los porcentajes de viabilidad celular después de 72 h de exposición a cada compuesto para las concentraciones: 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Los valores corresponden al promedio $\pm$ DS.