

Tesis de Posgrado

Síntesis de análogos de Castasterona y ensayos de su actividad biológica

Teme Centurión, Osvaldo Miguel

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Teme Centurión, Osvaldo Miguel. (1997). Síntesis de análogos de Castasterona y ensayos de su actividad biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2948_TemeCenturion.pdf

Cita tipo Chicago:

Teme Centurión, Osvaldo Miguel. "Síntesis de análogos de Castasterona y ensayos de su actividad biológica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2948_TemeCenturion.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**"SINTESIS DE ANALOGOS DE CASTASTERONA Y ENSAYOS DE SU
ACTIVIDAD BIOLÓGICA"**

**Director de Tesis
Dr. Eduardo G. Gros**

**Lugar de trabajo
Departamento de Química Orgánica**

Oswaldo Miguel Teme Centurión

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

- 1997-

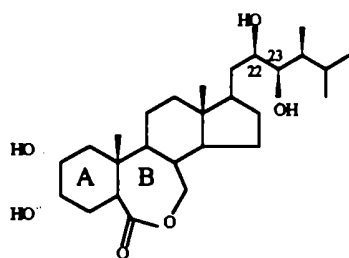
Nº 2948

h^r 2

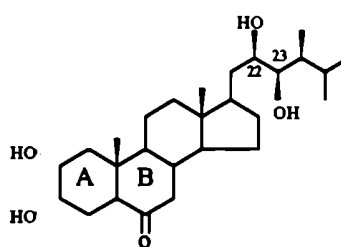
Síntesis de Análogos de Castasterona y Ensayos de su Actividad Biológica.

Los brassinosteroides son un nuevo tipo de hormonas vegetales dueñas de una poderosa actividad promotora del crecimiento, aún a muy bajas concentraciones. Desde el descubrimiento del brassinólido y la castasterona se han realizado denodados esfuerzos para conocer más profundamente este nuevo tipo de fitohormonas, en areas tales como el desarrollo de estudios analíticos, la química, la bioquímica, la fisiología y el modo de acción molecular. Por otro lado, se han encontrado un gran número de otros análogos extraídos de fuentes naturales que se han intentado obtener por síntesis química, así también como diferentes análogos no naturales.

Nosotros desarrollamos la síntesis de diferentes análogos de castasterona y sus correspondientes 22(S),23(S)-isómeros con diferentes modificaciones en los anillos A y B. Además, estudiamos el nivel de bioactividad de estos compuestos utilizando el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz sobre la variedad de arroz local *Chui* en presencia y ausencia de luz. Con los resultados obtenidos en este ensayo establecimos un orden de bioactividad creciente para estos compuestos.



Brassinólido



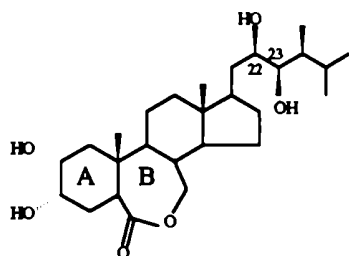
Castasterona

Palabras clave: Brassinosteroides, Brassinólido, Bioactividad, Castasterona, Phytohormonas, Síntesis de factores de crecimiento vegetal.

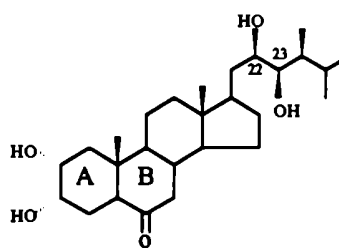
Synthesis and Biological Activity of Castasterone Analogues.

Brassinosteroids represent a new class of plant growth regulators that exhibit powerful plant growth-stimulating-activity at very low concentrations. Since the discovery of brassinolide and castasterone many efforts have been made in different areas such as analytical studies, chemistry, biochemistry, physiology and molecular action in order to broaden the knowledge of this kind of phytohormone. Besides, many efforts have been made to discover new brassinosteroids, to synthesize native members and synthetic analogues, and to get deeper insight in the mode of action of such compounds.

We have carried out a convenient synthesis of different analogues of castasterone and their corresponding 22(S),23(S) isomers with different modifications on A and B rings. We also have studied the level of bioactivity of these compounds by means of a modified rice-lamina inclination test with local variety of seedlings, in presence and absence of light. Finally, with this data, we establish an order of biological activity for those compounds.




Brassinolide




Castasterone

Keywords: Brassinosteroids, Brassinolide, Bioactivity, Castasterone, Phytohormones, Synthesis of plant growth promoting factors.




A Faby, mi mujer, mi amor, mi compañera, mi alegría, mi vida...
Por que es muchas cosas más, porque llena todos los espacios,
por que la quiero y la necesito. Por que a su lado crezco, me
fortalezco, me hago invencible, me completo. Porque me aguanta
y porque me ayuda, por que sabe compartir.
Por que la amo...




A Nené, mi madre. Trabajadora incansable sin reloj ni almanaque.
Sobre sus hombros y sus manos se erige lo que hoy soy y lo que
todos conocen.

A Chana, mi hermana. Televidente silenciosa de tardes enteras de
dibujitos animados sin volúmen.

Por todo el esfuerzo que sólo ellas conocen, y por que las quiero.



A Lydia, mi otra mamá, la que supo estar en todas las etapas. En la del comienzo cuando me hizo falta guía y apoyo constantes, y en las posteriores cuando paulatinamente iba tomando más libertad y vuelo propios. Porque supo transmitir siempre, mágicamente, esa optimista sensación de que todo se puede. Por su cariño, por su constancia y por el amor que pone en las cosas que hace.



Mi más sincero y profundo agradecimiento al Dr. Eduardo G. Gros quien me brindó la oportunidad de poder concretar mis anhelos. Por que fue el primero en ver en mi a alguien capaz de poder transitar este camino, y por que una vez allí me brindó todo su apoyo. Porque hizo que todo el trabajo y el esfuerzo se canalizaran en la concreción de este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por las becas de iniciación y perfeccionamiento otorgadas.

A la UBA por la beca de perfeccionamiento y prórroga otorgadas.

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por las determinaciones instrumentales realizadas:

Al Sr. Jorge Aznárez por los espectros de masa.

Al Dr. Gerardo Caballero y al Sr. Gustavo Arabehty por los espectros de masa de alta resolución.

Al Dr. Gerardo Burton, al Dr. Gerardo Caballero, al Dr. Juan B. Rodriguez, al Dr. Gustavo Revelli, a la Lic. Cristina Tettamanzi y a la Lic. Andrea Bruttomesso por los espectros de RMN.

A la Lic. Marta Marcote por los microanálisis.

Al Dr. Eduardo Gros, el Dr. Gerardo Burton y la Dra. Alicia Seldes por el constante apoyo, la confianza y el respeto manifestados.

Al Dr. Gerardo Burton y al Lic Eduardo Sproviero por la paciencia y amabilidad con que atendieron mis constantes consultas acerca del manejo de distintos programas de computación.

Al Dr. Juan B. Rodriguez, al Dr. Oscar Varela, al Dr. Arturo Vitale, a la Dra. Marta Maier y a la Dra. Rosa Erra Balsells por la amabilidad y buena voluntad con la que contestaron cada vez que debí hacerles una consulta.

A la Dra. Cristina Matulewicz por el asesoramiento en el manejo del polarímetro.

A la Dra Carme Brosa del Institut Quimic Sarrià de Barcelona por su constante asesoramiento para la realización de los ensayos de actividad biológica, y la realización de los ensayos utilizando la variedad catalana de arroz *Bahia*.

A la Dra. Cristina Zaccaro de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su asesoramiento, su participación y el préstamo del lugar físico para realizar los ensayos de actividad biológica.

A Cristina Aguayo por su invaluable ayuda en la realización de los ensayos de actividad biológica.

A la Dra. Marta Carceller de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía por el asesoramiento y lugar físico para la realización de los primeros intentos de poner a punto los ensayos biológicos.

A la Lic. Paula Duek por la realización de los primeros intentos de poner a punto los ensayos biológicos.

A la Jefa del grupo que trabaja en brassinosteroides, la Dra. Lydia Galagovsky, y a los diferentes integrantes que tuvo en distintas épocas: Marcelo Otero, Fabiana Makler y, actualmente, Javier Ramirez.

A mis compañeros y vecinos de laboratorio: Alicia Baldesari, Juan B. Rodriguez, Lydia Galagovsky, Luis Iglesias, Luis D'anna, Andrea Bruttomesso, Amelia Salinas, Judith Schwartzapel, Javier Ramirez, Constanza Mangone, Daniel Murgida y Miriana Biondic.

A los ex-compañeros y vecinos de laboratorio: Marcelo Otero, Fabiana Makler, Alejandra Ponce, Gustavo Revelli, Walter Samaniego, Sergio Bonessi, Cristian Di nardo, Patricia Zunszain y Alejandro Nin.

A Carlos Stortz, Marcelo Cases, Alberto Ghini y Gerardo Caballero por las inigualables charlas futboleras en los pasillos del departamento de Química Orgánica.

A Carlos Stortz, Marcelo Cases, Alberto Ghini, Gerardo Caballero, Alejandro Nin, Oscar Moradei, Jorge Macareno, Hernán Schultz, Mariano Castro, María Joselevich, Jorge Aznárez, Carlos Zomosa, Alejandro Chioconni, Gabriela Naranjo, Daniel Nicoletti, Carola Gallo, Rosalía Agusti y María Laura Uhrig por las divertidísimas charlas de pasillo sobre cualquier tema.

A Kekule (FC) por los logros deportivos alcanzados, por los campeonatos obtenidos y por la gloria cosechada. A sus integrantes, gloriosas huestes de antaño, que con sus conductas intachables e importantes logros personales acrecientan aún más el peso de su historia. Volveremos... es un mandato divino.

A la Sociedad de los Machos integrada por Gerardo Caballero, Marcelo Cases, Alejandro Nin, Jorge Aznárez, y sus nuevos integrantes Oscar Moradei y Adolfo Irribarren. Aunque algunos estén un poco sometidos.

A mis compañeros de docencia, con los que compartimos largas horas de clase y largas horas de cuidar parciales y finales. Por que hicieron que esas horas se pasaran rápido entre chistes y cafés.

A María del Carmen Ares, Olga Fernández ,Rosa Ricarte, Eduardo López, Virginio Pereira, Sergio Jacobo y Mabel Delgado por su diaria inyección de alegría.

A mis amigos Gerardo Caballero, Jorge Aznárez, Gabriela Enterrios, Flavio Etchemendigaray, Marcos Spallone, María Joselevich, Esteban Ravaschino, Claudia Rico y Victor Vélez Machado Sanchez, porque la amistad le da sentido a la vida.

A Diego y Carina, mis cuñados que también son mis amigos, por el apoyo recibido, por la alegría intercambiada, porque es muy importante saber que siempre cuento con ellos. Porque los quiero mucho.

A Saúl y Raquel, mis suegros. Por que me recibieron en el seno de su familia como si fuera un hijo más, por la confianza y el cariño que me demuestran. Porque también los quiero mucho.

INDICE

<u>OBJETIVOS GENERALES.</u>	1
--	---

CAPITULO 1.- INTRODUCCION.

1.1. INTRODUCCION.	2
1.2. ANTECEDENTES.	3
1.3. DISTRIBUCION DE BRASSINOSTEROIDES EN EL REINO VEGETAL.	8
1.4. METODOS DE ANALISIS DE BRASSINOSTEROIDES.	14
1.4.1. Bioensayos.	14
1.4.2. Métodos microanalíticos.	17
1.4.2.1. Cromatografía gas líquido/Espectrometría de masa.	17
1.4.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución.	19
1.4.2.3. Radioinmunoanálisis.	21
1.5. RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.	21
1.6. SINTESIS.	29
1.6.1. Funcionalización de los anillos A y B.	30
1.6.1.1. Obtención del grupo carbonilo en C-6.	30
1.6.1.2. Dihidroxilación del anillo A y lactonización del anillo B.	32
1.6.1.3. Otras funcionalizaciones.	32
1.6.2. Construcción de la cadena lateral.	33
1.6.3. Modificación de la cadena intacta de un esteroide.	37
1.7. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO.	40
1.8. EFECTOS DE BRASSINOSTEROIDES A NIVEL MOLECULAR.	43
1.9. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE BRASSINOSTEROIDES.	44
1.10. APLICACIONES DE BRASSINOSTEROIDES EN LA AGRICULTURA.	45
1.11. BIBLIOGRAFIA.	47

CAPITULO 2.- SINTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-2 α ,3 α ,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA [24(S)-HOMOETILCASTASTERONA].

2.1. INTRODUCCION.	57
2.2. SÍNTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-2α,3α,22,23-TETRAHIDROXI-5α-COLESTAN-6-ONA: COMPUESTO CABEZA DE SERIE.	58
2.2.1. Diferenciación de los dobles enlaces Δ^5 y Δ^{22}.	60
2.2.2. Obtención de la funcionalización Δ^2-6-ceto.	63
2.2.2.1. Intento de obtención de 5β,6β-epoxiestigmasta-2,22-dieno.	63
<i>2.2.2.1.1. Estudio de la estabilidad relativa de los intermediarios de la reacción de eliminación de 5β,6β-epoxiderivados esteroidales con buenos grupos salientes en C-3.</i>	71
2.2.2.2. Apertura reductiva del 5β,6β-epóxido.	82
2.2.2.3. Obtención de la 3β-hidroxiestigmasta-22-en-6-ona.	92
<i>2.2.2.3.1. Oxidación total y reducción regioselectiva del grupo carbonilo en C-3.</i>	92
<i>2.2.2.3.2. Oxidación regioselectiva del grupo hidroxilo en C-6.</i>	93
<i>2.2.2.3.3. Protección regioselectiva del grupo hidroxilo en C-3 y posterior oxidación del grupo hidroxilo en C-6.</i>	94
2.2.2.4. Eliminación del hidroxilo de C-3.	100
<i>2.2.2.4.1. Eliminación directa del hidroxilo de C-3.</i>	101
<i>2.2.2.4.2. Transformación en un buen grupo saliente y eliminación del hidroxilo de C-3.</i>	102
2.2.3. Dihidroxilación de los dobles enlaces Δ^2 y Δ^{22}.	103
2.2.3.1. Generalidades de la reacción de dihidroxilación con OsO₄.	103
2.2.3.2. Dihidroxilación catalítica con OsO₄.	104
2.2.3.3. Dihidroxilación catalítica asimétrica.	107
2.2.3.4. Dihidroxilación de la estigmasta-2,22-dien-6-ona.	107
2.3. RESUMEN.	110
** ESQUEMA 2.1.	112
2.4. BIBLIOGRAFIA.	113

CAPITULO 3.- SINTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-2 α ,3 α ,5,22,23-PENTAHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA [5 α -HIDROXI-24(S)-HOMOETILCASTASTERONA].

3.1. INTRODUCCION.	119
3.2. SÍNTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-2α,3α,5,22,23-PENTAHIDROXI-5α-COLESTAN-6-ONA: COMPUESTO CABEZA DE SERIE.	120

3.2.1. Diferenciación de los dobles enlace Δ^5 y Δ^{22} .	121
3.2.2. Obtención de la función 5 α -hidroxi-2-en-6-ona.	122
3.2.2.1. Obtención del 3 β -tosiloxiestigmasta-22-en-5 α ,6 β -diol.	122
3.2.2.2. Síntesis de la 3 β -tosiloxi-5 α -hidroxiestigmasta-22-en-6-ona.	124
3.2.2.3. Síntesis de la 5 α -hidroxiestigmastan-2,22-dien-6-ona.	125
3.2.3. Dihidroxilación de dobles enlaces Δ^2 y Δ^{22} .	127
3.2.3.1. Dihidroxilación de la 5 α -hidroxiestigmastan-2,22-dien-6-ona.	127
3.3. BIBLIOGRAFIA.	128

CAPITULO 4.- SINTESIS DE ANALOGOS DE 24(S)-HOMOETILCASTASTERONA Y 5 α -HIDROXI-24(S)-HOMOETILCASTASTERONA.

4.1. INTRODUCCION.	129
4.2. SINTESIS DE ANALOGOS 5 α -HIDROGENADOS.	130
4.3. SINTESIS DE ANALOGOS 5 α -HIDROXILADOS.	132
4.3.1. Síntesis de (22R,23R,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestán-6-ona y (22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestán-6-ona.	133
4.3.2. Síntesis de (22R,23R,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestán-6-ona y (22S,23S,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestán-6-ona.	133
4.4. ANALISIS COMPARATIVO DE LAS REACCIONES DE DIHIDROXILACION CATALITICA ASIMETRICA.	134
4.5. RESUMEN.	136
** ESQUEMA 4.1.	138
** ESQUEMA 4.2.	139
4.6. BIBLIOGRAFIA.	140

CAPITULO 5.-DESCRIPCION DE RESULTADOS ESPECTROSCOPICOS.

5.1. INTRODUCCION.	141
5.2. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.	141
5.2.1 Análisis de los espectros de los brassinosteroides sintetizados.	141
5.2.2 Análisis de los espectros de los compuestos intermediarios en la síntesis de brassinosteroides.	147
5.2.2.1 RMN- ¹ H de los intermediarios de síntesis.	153

5.2.2.2 RMN- ¹³ C de los intermediarios de síntesis.-----	159
5.2.2.2.1. <i>Análisis del efecto del sustituyente de C-3 sobre la frecuencia de resonancia de los carbonos del anillo A.</i> -----	159
5.2.2.2.2. <i>Análisis comparativo de las frecuencias de resonancia de los carbonos de los anillos A y B, para la serie 5α-hidrogenada y la serie 5α-hidroxilada.</i> -----	167
5.3. ESPECTROMETRIA DE MASA CON IONIZACION POR BAV (BOMBARDEO CON ATOMOS VELOCES). -----	168
5.3.1. Espectros de masa de iones positivos obtenidos por ionización BAV de los brassinosteroides sintetizados. -----	168
5.3.2. Espectros de masa de iones negativos obtenidos por ionización BAV de los brassinosteroides sintetizados. -----	180
5.4. BIBLIOGRAFIA. -----	186

CAPITULO 6.-ENSAYOS BIOLOGICOS.

6.1. INTRODUCCION. -----	188
6.2. BIOACTIVIDAD DEL BRASSINOSTEROIDE PATRON: (22R,23R,24S)-24-ETIL-2α,3α,22,23-TETRAHIDROXI-5α-COLESTAN-6-ONA. -----	189
6.2.1. Puesta a punto del ensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA). -----	189
6.2.2. Busqueda de variedades locales sensibles al ensayo de inclinacion de la lamina de arroz. -----	193
6.2.3. Curvas de bioactividad en función de la dosis aplicada. -----	196
6.3. BIOACTIVIDAD DE BRASSINOSTEROIDES ANALOGOS. -----	200
6.3.1. Comparación de las bioactividades en condiciones estandard. -----	200
6.3.2. Comparación de las bioactividades en condiciones de mayor sensibilidad del bioensayo ILA. -----	203
6.3.3. Comparación de los resultados obtenidos con las variedades <i>Chui</i> y <i>Bahía</i>. -----	206
6.3.4. Comparación de las curvas de bioactividad en función de la dosis aplicada para brassinosteroides con distinto comportamiento en ILA. -----	209
6.4. OTROS BIOENSAYOS. -----	211
6.4.1. Generalidades sobre ensayos con plantas mutantes. -----	211
6.4.2. Trabajos en colaboración. -----	213
6.5. RESUMEN. -----	214
6.6. BIBLIOGRAFIA. -----	217


CAPITULO 7.-PARTE EXPERIMENTAL.

7.1. GENERALIDADES.	219
7.2. SINTESIS DE ANALOGOS DE CASTASTERONA 5α-HIDROGENADOS (Esquema 2.1 y Esquema 4.1).	221
7.3. SINTESIS DE ANALOGOS DE CASTASTERONA 5α-HIDROXILADOS (Esquema 4.2).	236
7.4. SINTESIS DE COMPUESTOS UTILIZADOS PARA COMPLETAR DATOS DE TABLAS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (Figura 5.2 y Tabla 5.6).	245
7.4.1. Compuestos bromados.	245
7.4.2. Compuestos clorados.	247
7.4.3. Compuestos metoxilados.	249
7.4.4. Compuestos formilados.	251
7.5. OTROS COMPUESTOS.	252
7.6. BIBLIOGRAFIA.	254
RESUMEN DEL TRABAJO REALIZADO.	256

ABREVIATURAS

À	Anstrong
Ac	Acetilo
AcO	Acetato
AcOH	Acido acético
ADN	Acido desoxirribonucleico
AIA	Acido indolacético
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BARC	Beltsville Agricultural Research Center
BAV	Bombardeo de Atomos Veloces
BMB	Bismetanboronato
BR	Brassinólido
BRST	Brassinosteroide
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCP	Clorocromato de piridonio
CGL	Cromatografía Gas/Líquido
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CLB	Clorobenzoato
CS	Castasterona
DAL	Di-<i>iso</i>-propilamiduro de litio
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-eno
DCA	Dihidroxilación Catalítica Asimétrica
DCP	Dicromato de piridonio
DEPT	Distortionless Enhanced Polarization Transfer
DHQ	Dihidroquinina
DHQD	Dihidroquinidina
DMA	Dimetilacetamida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectroscopía de Masa
Em	Emisión
EMAR	Espectroscopía de Masa de Alta Resolución

ERRC	Eastern Regional Research Center
Et	Etilo
Ex	Exitación
FT-IR	Infrarrojo con Transformada de Furier
Hz	Hertz
IE	Impacto Electrónico
ILA	Ensayo de Inclinacion de la Lámina de Arroz
Im	Imidazol
IND	Indoilo
IQ	Ionización Química
IR	Infrarrojo
mCPBA	Acido m-cloroperbenzoico
Me	Metilo
MHz	Megahertz
Ms	Metansulfonilo (mesilo)
MSI	Monitoreo Selectivo de Iones
MsO	Metansulfonato (mesilato)
nm	Nanometros
NMM	N-metilmorfolina
NMO	N-óxido de N-metilmorfolina
NBA	p-Nitrobencilalcohol
NRRC	Northern Regional Research Center
Ph	Fenilo
PHAL	Ftalazina
Py	Piridina
PYR	Piridonio
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
ref.	Reflujo
RIA	Radioinmunoanálisis
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TE	Tiasterona
TBDMSi	ter-Butildimetilsililo
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
Ts	p-Toluensulfonilo (tosilo)
TsO	p-Toluensulfonato (tosilato)



TY	Tifasterol
u.m.	Unidades de masa
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultravioleta



**OBJETIVOS
GENERALES**

Los objetivos generales del presente trabajo de tesis fueron:

- a) La obtención de brassinosteroides por modificación química de esteroides relacionados.
- b) Evaluación de la bioactividad de los brassinosteroides sintetizados.

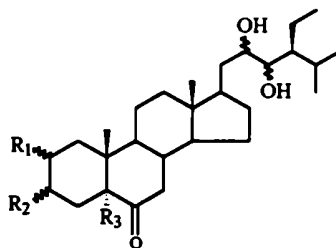
El logro de los objetivos generales demandó la planificación de las siguientes estrategias:

a) Síntesis de (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestán-6-ona (12), brassinosteroide denominado comúnmente 24(S)-homoetilcastasterona, y una serie 5 α -hidrogenada de cinco compuestos análogos a partir de estigmasterol (136).

b) Síntesis de (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestán-6-ona (163), y una serie 5 α -hidroxilada de cinco compuestos análogos, a partir de estigmasterol (136).

c) Puesta a punto del *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz (ILA)* y evaluación de la actividad biológica de los doce brassinosteroides sintetizados.

La estructura de los compuestos sintetizados se resume en la siguiente figura:



12:	R ₁ = α -OH	R ₂ = α -OH	R ₃ = H	22(R),23(R)
55:	R ₁ = α -OH	R ₂ = α -OH	R ₃ = H	22(S),23(S)
159:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = H	22(R),23(R)
160:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = H	22(S),23(S)
161:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = H	22(R),23(R)
162:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = H	22(S),23(S)
163:	R ₁ = α -OH	R ₂ = α -OH	R ₃ = OH	22(R),23(R)
164:	R ₁ = α -OH	R ₂ = α -OH	R ₃ = OH	22(S),23(S)
165:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = OH	22(R),23(R)
166:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = OH	22(S),23(S)
167:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = OH	22(R),23(R)
168:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = OH	22(S),23(S)



CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. INTRODUCCION.

Tanto la ingeniería genética como la utilización de reguladores de crecimiento vegetal representan importantes tecnologías asociadas a la agricultura para el aumento de la producción de cosechas, el mejoramiento de la calidad y facilidad de recolección de frutos y la optimización del uso de recursos limitados.

En 1979 se informó sobre la existencia de una nueva sustancia reguladora del crecimiento vegetal de origen natural¹, extraída de polen de nabo silvestre (*Brassica napus L.*), denominada brassinólido (1) (BR) con estructura de lactona esteroidal polihidroxilada. A partir de ese momento, se aislaron de fuentes vegetales, otros análogos estructurales^{2,3}, lo cual indicaba la ubicuidad de este tipo de compuestos llamados brassinosteroides (BRST).

Los estudios de los efectos de los BRST sobre el crecimiento vegetal⁴ sugerían que estos compuestos podrían actuar independientemente de otras hormonas vegetales endógenas (auxinas, giberelinas, citokininas, ácido abscísico y etileno)⁵⁻¹². Recientemente, ha sido confirmado que los brassinosteroides son hormonas esteroidales vegetales que intervienen en el control del crecimiento de plantas superiores en procesos regulados por luz¹³.

Se ha informado, también, acerca de promisorios resultados al evaluar la acción de los BRST como mejoradores del rendimiento y calidad de cosechas de distintos tipos de plantas, así como del aumento de su tolerancia al estrés causado por frío, salinidad, sequedad y efectos secundarios de herbicidas¹⁴. Los resultados obtenidos en experiencias llevadas a cabo en campo, a gran escala, por el espacio de seis años, con 24-epibrassinólido (2) han demostrado la aplicabilidad de este esteroide para el mejoramiento de la producción de cosechas¹⁵.

Los brassinosteroides son hormonas de crecimiento vegetal mucho más potentes que las demás hormonas vegetales. El desarrollo de una tecnología para adaptar el uso de los BRST a la agricultura permitiría minimizar los riesgos asociados a los agroquímicos por reducción de la contaminación ambiental. Las investigaciones en el campo de los reguladores de crecimiento vegetal podrían acelerar de manera importantísima su aplicación.

Debido a que los BRST existen en los tejidos vegetales en ínfimas cantidades, la necesidad de contar con mayores cantidades para realizar estudios sobre sus efectos en el crecimiento vegetal y evaluarlos en diferentes tipos de cosechas, ha convertido la síntesis química de este tipo de compuestos en un área de intensa actividad^{2,16}.

En este capítulo se resumirá el estado actual de las investigaciones sobre los BRST en distintas áreas como biosíntesis y metabolismo, bioactividad, efectos moleculares y fisiológicos, síntesis química y aplicaciones en la agricultura.

1.2. ANTECEDENTES.

El proceso de reconstrucción mundial y la necesidad de proveer, a la creciente población, de alimentos en cantidad y precios accesibles luego de la Segunda Guerra Mundial, le dio a la industria agroquímica el impulso para un importante desarrollo en los años posteriores. Las investigaciones en ese campo llevaron a contar, hacia mediados de la década del '50, con distintas sustancias --auxinas, giberelinas, citokininas y etileno-- que inducían distintas respuestas deseables en los cultivos, a concentraciones en las cuales no resultaban ser tóxicas y sin dejar residuo alguno. Por ejemplo, el ácido 3-indolacético (AIA), una auxina, se utilizaba para estimular el enraizamiento de transplantes y el ácido giberélico (GA₃), una giberelina, incrementaba el rendimiento de ciertas cosechas como la vid. Esto llevó, en la década del '50, a que varios grupos de investigación se dedicaran a buscar otros compuestos reguladores del crecimiento vegetal. La búsqueda se focalizó, principalmente, en los órganos vegetales encargados del crecimiento tales como semillas y polen.

J. W. Mitchell, científico integrante del Departamento de Agricultura de los EE.UU., se interesó en detectar hormonas vegetales y sustancias reguladoras del crecimiento vegetal en extractos de polen¹⁷ y semillas¹⁸. Mitchell creía que como esos tejidos tenían gran capacidad de crecimiento, era muy probable que en ellos estuvieran las hormonas o factores específicos que estimularan dicho proceso. Para lograr su cometido buscó y desarrolló varios bioensayos para determinar la respuesta específica a cada nueva hormona o factor que pudiera encontrar¹⁹.

En 1970 Mitchell con un grupo de sus colaboradores, trabajando en el Beltsville Agricultural Research Center (BARC), instituto perteneciente al USDA, aisló una fracción extremadamente activa de un extracto etéreo de polen de nabo silvestre (*Brassica napus* L.)²⁰. Esa fracción, denominada "Brassina", que se obtuvo purificando parcialmente un extracto de polen por medio de sucesivas extracciones y cromatografías en capa preparativa, se sometió al ensayo de elongación del 2º entrenudo del poroto¹⁹, en el cual mostró una inusual respuesta consistente en alargamiento, curvatura e hinchazón.

Este particular tipo de respuesta, unido a que se trataba de un compuesto distinto a otros anteriormente hallados, y que causaba efecto en cantidades ínfimas, llevó a Mitchell

a anunciar que se había encontrado un nuevo grupo de fitohormonas. En su artículo del año 1970²⁰ informó sobre el marcado efecto que producían estas hormonas sobre la estimulación del crecimiento en el segundo, tercer y cuarto entrenudo del poroto y enfatizó su tan particular respuesta histológica distinta a la producida por el ácido giberélico.

Entusiasmado por los resultados, empezó un estudio de extractos de polen de diferentes plantas buscando actividad similar, hallándose el mismo tipo de respuesta en muchos casos^{21,22}. En la **Tabla 1.1** se pueden observar algunas de las fuentes investigadas.

Tabla 1.1. Vegetales productores de polen cuyos extractos mostraron actividad en el ensayo de elongación del 2° entrenudo del poroto.

Especie	Nombre común
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Castaña
<i>Alnus glutinosa</i> L.	Aliso europeo
<i>Sinapis arvensis</i> L.	Mostaza
<i>Brassica napus</i> L.	Nabo silvestre
<i>Carduus nutans</i> L.	Cardo colgante
<i>Crataegus</i> sp.	Espino
<i>Echium vulgare</i> L.	Lengua de buey
<i>Pyrus communis</i> L.	Pera
<i>Robinia Pseudoacacia</i> L.	Algarrobo negro
<i>Rhus</i> sp.	Zumaque
<i>Secale cereal</i> L.	Centeno
<i>Sisymbrium irio</i> L.	Jaramago de Londres
<i>Thea sinensis</i> L.	Té
<i>Typha</i> sp.	Espadaña
<i>Alnus</i> sp.	Olmo
<i>Zea mayz</i>	Maíz

A partir de ese momento se empezaron a investigar las propiedades fisiológicas de las brassinas. Se demostró, por ejemplo, que el tipo de respuesta que inducían se debía a

que producían un aumento del alargamiento y división celulares, causando un marcado cambio en la anatomía vascular de las hojas²³.

En 1972 Mitchell y Gregory²⁴ demostraron que las brassinas podían mejorar el rendimiento y la eficiencia de las cosechas, y el vigor de las semillas, proveyendo un posible método de control hormonal de la fertilización.

En 1973 Milborrow formuló críticas a los trabajos mencionados, centradas principalmente en que las brassinas no eran una fracción pura y que no se conocía realmente el componente activo ni su estructura²⁵.

Mitchell se retiró del USDA en 1974, pero previamente sentó las bases de un gran proyecto multidisciplinario para intentar aislar, purificar y dilucidar la estructura del ó de los compuestos activos de las brassinas. En él participaron en forma conjunta tres institutos del USDA: el Northern Regional Research Center (NRRC), Peoria, IL; el Eastern Regional Research Center (ERRC), Philadelphia, PA; y el Beltsville Agricultural Research Center (BARC), Beltsville, MD.

El proyecto cubría principalmente los siguientes aspectos:

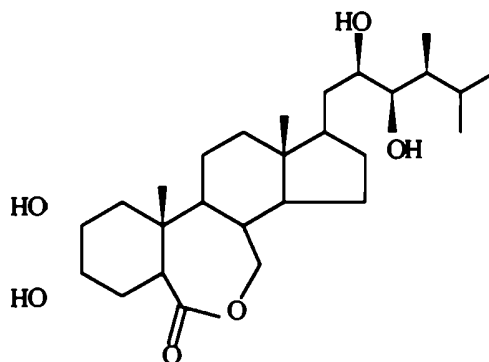
- Coordinación general: G. L. Steffens y M. Jacobson (BARC).
- Extracto del polen en gran escala: M. F. Kozempel (ERRC).
- Obtención de la brassina: N. Mandava (BARC).
- Aislamiento, purificación e identificación de productos activos: M. D. Grove (NRRC) y N. Mandava (BARC).
- Ensayos biológicos: 2º entrenado del poroto: J. F. Worley y D W. Spaulding (BARC).

El proyecto debió llevarse a cabo a gran escala ya que se sabía que el producto activo era muy escaso; por ello, fue necesario conseguir gran cantidad de materia prima que, finalmente, consistió en 227 Kg de polen de nabo silvestre colectado por abejas. Una vez logrado ésto, el primer paso estuvo a cargo del ERRC; allí se lavó el polen con agua para eliminar los azúcares y se liofilizó. Posteriormente, se extrajo el liofilizado con isopropanol, se concentró y se centrifugó. De esta forma se redujeron los 227 Kg iniciales a 16 Kg de un concentrado marrón y viscoso.

El BARC sometió el producto proveniente del ERRC redisuuelto en tetracloruro de carbono, a sucesivas extracciones con metanol. De esa forma, se obtuvieron 7,5 Kg de una sustancia gomosa marrón oscura que se sometió a sucesivas cromatografías en columnas de silicagel, eluyendo con mezclas de benceno/metanol/ácido acético y cloroformo/metanol. Finalmente, se obtuvieron 252 g de una fracción de brassina activa.

En el NRRC, Grove sometió la brassina a una intensiva purificación consistente en varias columnas cromatográficas de sílicagel y de fase reversa, además de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Finalmente logró obtener un producto puro, que en el ensayo del 2° entrenudo del poroto no sólo produjo elongación, curvatura e hinchazón, sino también división del entrenudo. Este último efecto sólo se observó a concentraciones mayores que las aplicadas con anterioridad a la purificación de las fracciones. Grove obtuvo 23 mg de este nuevo producto, cuya concentración, en los 227 Kg de polen iniciales, era de 0,1 ppm.

La estructura del compuesto activo, denominado brassinólido (BR) (1) y determinada totalmente por rayos X¹, resultó ser (22R,23R,24S)-24-metil-22,23,2 α ,3 α -tetrahidroxi-B-homo-7-oxa-5 α -colestán-6-ona (1), una lactona esteroidal polihidroxilada con una fórmula empírica de C₂₈H₄₈O₆ y un peso molecular de 480.



BRASSINOLIDO: (22R,23R,24S)-24-metil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-B-homo-7-oxa-5 α -colestán-6-ona

De esta forma, llegó a buen término un proyecto que costó al USDA más de 1.000.000 u\$s y 10 años de trabajo, y estimuló el interés mundial en la materia. Los principales interesados resultaron ser los japoneses que en el año 1968 ya se habían encontrado, sin saberlo, con este tipo de compuestos. Ellos habían observado que las agallas producidas en plantas por ciertos insectos resultaban ser tejidos vegetales de rápido crecimiento, y supusieron que dicho crecimiento se debía a alguna sustancia estimuladora extremadamente potente. Para intentar aislar dicha sustancia trabajaron con un árbol japonés, llamado comunmente "Isunoki" (*Dystilium racemosum* Sieb. et Zucc), ya que se conocía que el ataque durante la primavera por un pulgón, el *Neothoracaphis Yanonis*, producía rápidamente agallas de 1-2 mm en sus hojas, que en dos o tres meses crecían hasta aproximadamente 1 cm²⁶. Las fracciones neutras, solubles en éter, de los extractos metanólicos de las hojas mostraron potente actividad estimulante del crecimiento vegetal en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz²⁷. Luego de denodados esfuerzos, lograron

obtener tres fracciones semipurificadas que presentaron actividad, y que denominaron A₁, A₂ y B. Años más tarde se encontró que estas fracciones eran mezclas de brassinólido y otros análogos naturales²⁸.

Los japoneses, en aquel momento, no lograron purificar esas fracciones y detuvieron las investigaciones aduciendo que "...las cantidades aisladas resultaron ser muy pequeñas como para continuar en este momento con la elucidación estructural por medio del análisis espectroscópico..."²⁹. Continuaron, sin embargo, buscando el mismo tipo de actividad en otras fuentes vegetales obteniendo los resultados resumidos en la **Tabla 1.2**.

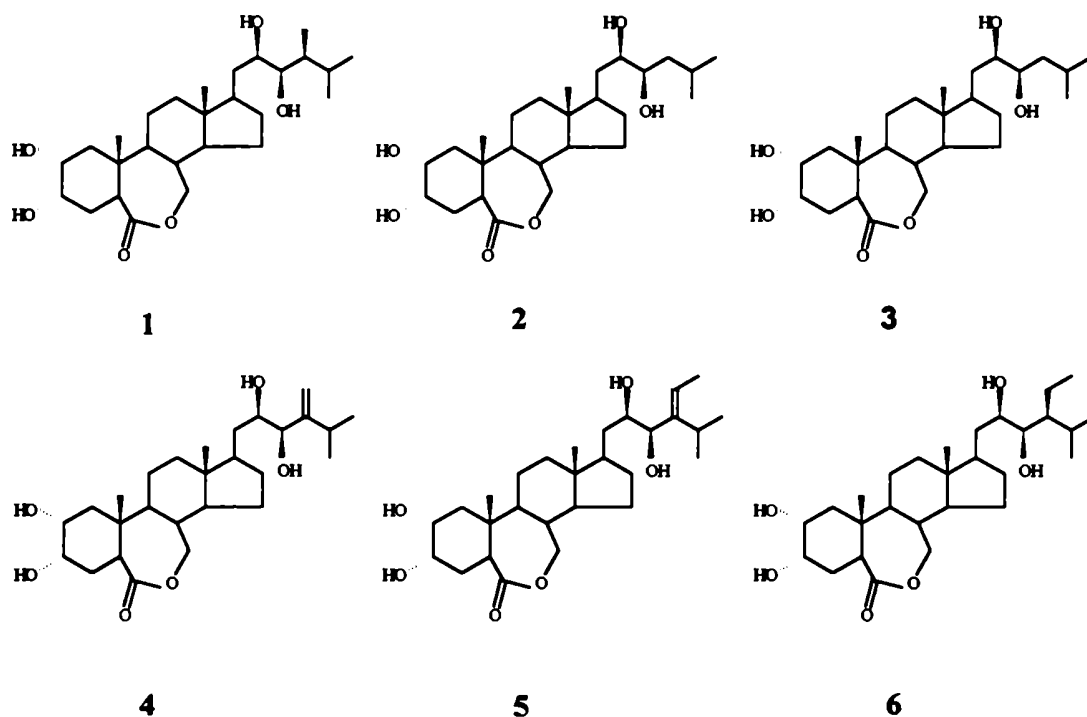
Actualmente, dado el interés que despierta la utilidad de estos compuestos en el mejoramiento del rendimiento de las cosechas, se llevan a cabo investigaciones sobre brassinosteroides en países como Japón, China, Alemania, EEUU, Australia, España, Bielorrusia, Rusia y Cuba.

Tabla 1.2. Fuentes naturales, analizadas por investigadores japoneses, que mostraron contener compuestos activos en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz.

Especie	Tejido
<i>Disanthus cercidifolia</i>	Hojas
<i>Hamamelis japonica</i>	Hojas
<i>Corylopsis glabrescens</i>	Hojas
<i>Pittosporum tobira</i>	Hojas
<i>Camelia sasancua</i>	Hojas
<i>Thea sinensis</i>	Hojas
<i>Cocculus trilobus</i>	Hojas
<i>Viburnum awabuki</i>	Hojas
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tallo
<i>Pisum sativus</i>	Semillas
<i>Vicia faba</i>	Semillas
<i>Dolichos lablab</i>	Semillas
<i>Geycine max</i>	Semillas
<i>Arachis hypogaea</i>	Semillas

1.3. DISTRIBUCION DE BRASSINOSTEROIDES EN EL REINO VEGETAL.

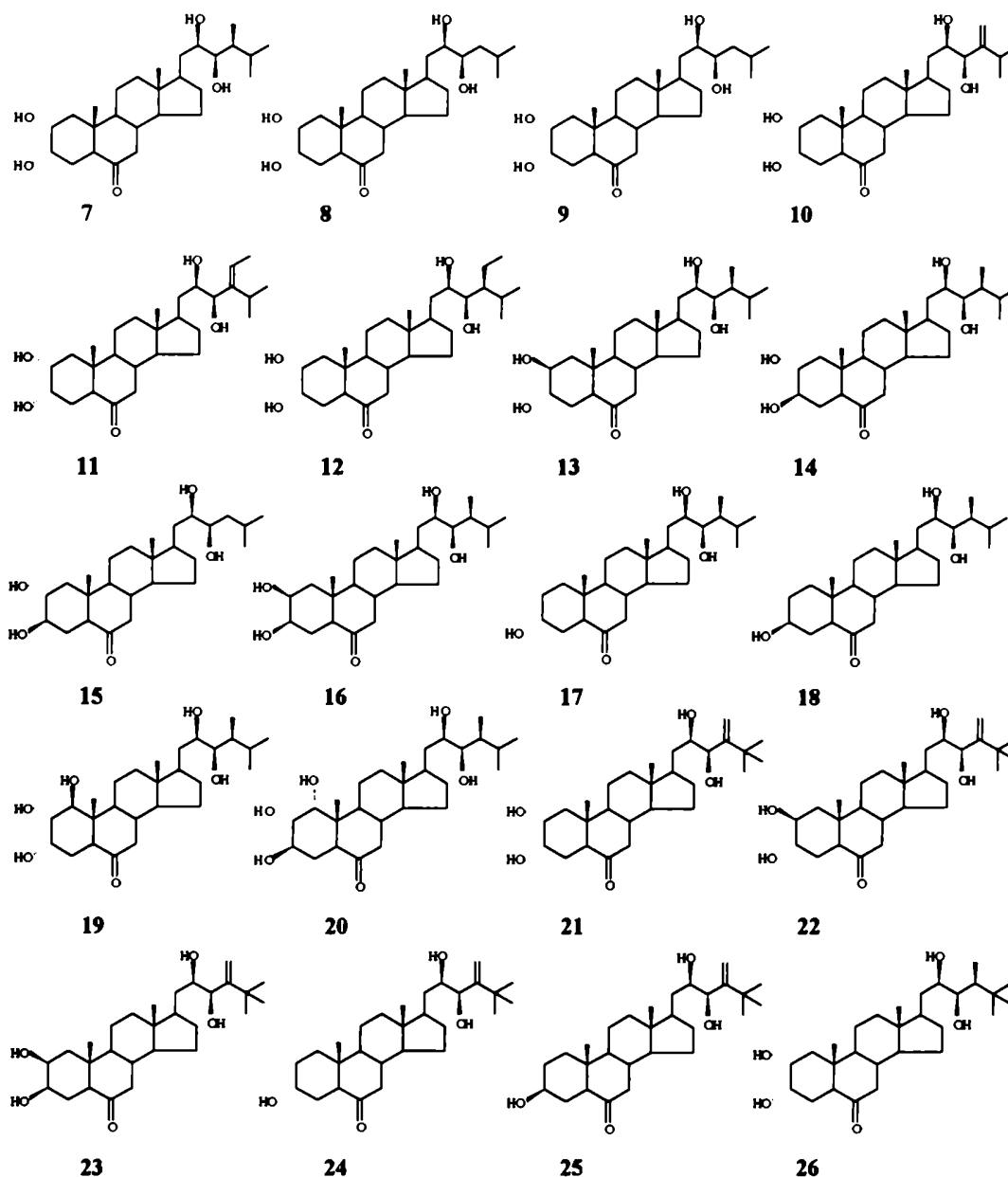
Las brassinas, nombre derivado del género *brassica*, comprenden una mezcla de distintas sustancias parcialmente purificadas del extracto etéreo de polen de nabo silvestre (*Brassica napus* L.). A partir del aislamiento, purificación y determinación estructural del brassinólido (BR) (1), se han encontrado otros análogos de fuentes naturales, que se han dado en llamar genéricamente brassinólidos o brassinosteroides (BRST). En las Figuras 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4 se presentan todos aquellos BRST aislados de fuentes naturales hasta el momento, clasificados según la estructura del anillo B --cetónica, lactónica o desoxigenada-- y presencia de conjugación con hidratos de carbono respectivamente.



1) brassinólido (BR), 2) 24-epibrassinólido, 3) 28-norbrassinólido, 4) dolicólido, 5) homodolicólido, 6) 24-homoetilbrassinólido.

Figura 1.1. Brassinosteroides naturales con el anillo B lactónico.

Además del BR (1), otro de los BRST más difundidos en el reino vegetal es la castasterona (CS) (7), que fue hallada por primera vez en *Castanea crenata* (castañas)³⁰, utilizando el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz para su detección.

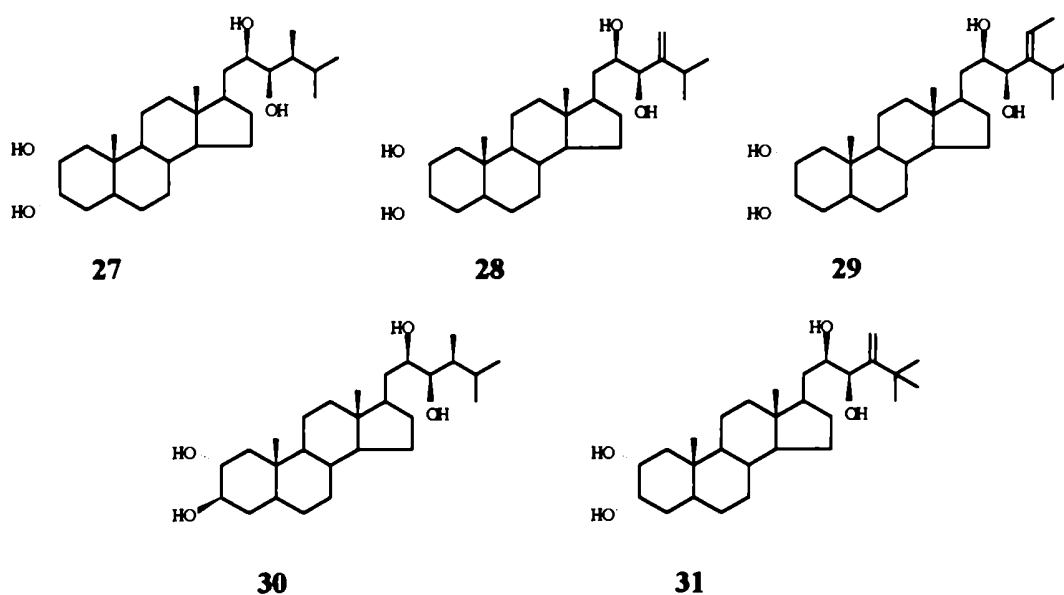


7) *castasterona* (CS) 8) *24-epicastasterona*, 9) *brassinona* (28-*norcastasterona*), 10) *dolicosterona*, 11) *homodolicosterona*, 12) *24-homoetilcastasterona*, 13) *2-epicastasterona*, 14) *3-epicastasterona*, 15) *3,24-diepicastasterona*, 16) *2,3-diepicastasterona*, 17) *tifasterol* (TY), 18) *tiasterona* (TE), 19) *1 β -hidroxicastasterona*, 20) *3-epi-1 α -hidroxicastasterona*, 21) *25-metildolicosterona*, 22) *2-epi-25-metildolicosterona*, 23) *2,3-diepi-25-metildolicosterona*, 24) *2-deoxi-25-metildolicosterona*, 25) *3-epi-2-deoxi-25-metildolicosterona*, 26) *25-metilcastasterona*.

Figura 1.2. Brassinosteroides naturales con el grupo funcional 6-ceto en el anillo B.

La castasterona resultó ser el primer representante natural sin el grupo lactónico en el anillo B (ver **Figura 1.2**). Este hecho, unido a su gran abundancia en el reino vegetal, llevó a los investigadores a postular que la castasterona podría ser el precursor biosintético del brassinólido. Este punto se ampliará en la **sección 1.7** del presente **Capítulo** (pag. 40).

Analizando semillas de *Dolichos lablab*, Yokota y sus colaboradores³¹⁻³⁴ hallaron, además de BR y CS, dos nuevos BRST de C₂₈ con un grupo 24-exometilénico a los que llamaron dolicólido (**4**) y dolicosterona (**10**), otros dos de C₂₉ con un grupo 24(E)-etilidén que denominaron homodolicólido (**5**) y homodolicosterona (**11**) y otros dos 6-deoxobrasinosteroides que llamaron 6-deoxocastasterona (**27**) y 6-deoxodolicosterona (**28**). El más abundante resultó ser el dolicólido (**4**) con una concentración de aproximadamente 200 µg/Kg.



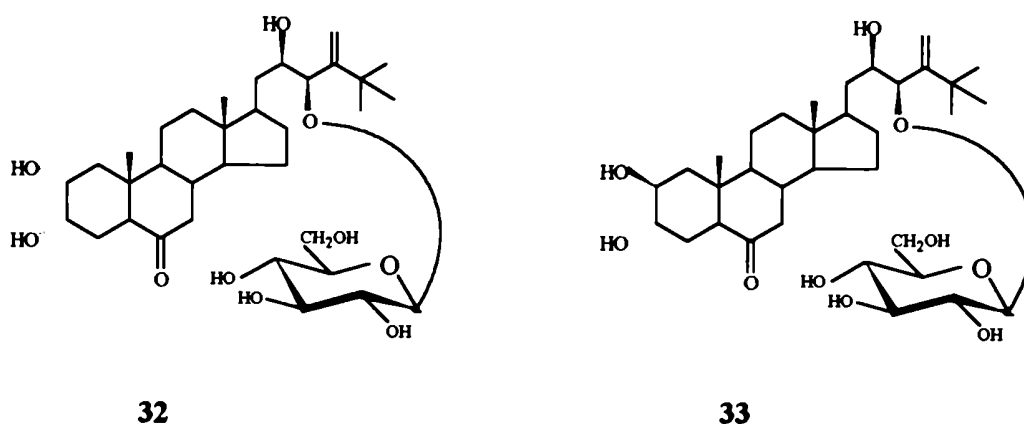
27) 6-deoxocastasterona, 28) 6-deoxodolicosterona, 29) 6-deoxohomodolicosterona, 30) 3-epi-6-deoxodolicosterona, 31) 6-deoxo-25-metildolicosterona.

Figura 1.3. Brassinosteroides naturales sin funcionalización en el anillo B.

En 1982 Takatsuto y sus colaboradores³⁵ diseñaron una técnica de derivatización de BRST como metanboronatos, para posteriormente aplicar métodos de cromatografía gas líquido (CGL) acoplada con espectrometría de masa (EM) y con técnicas de monitoreo selectivo de iones (MSI) en la detección de este tipo de compuestos. De esta forma se hizo más sistemática la tarea de detección e identificación, sin necesidad de aislamiento previo. Con esta metodología se hallaron cuatro nuevos BRST: brassinona (**9**),

24-homoetilcastasterona (12), 28-norbrassinólido (3) y 24-etilbrassinólido (6), en distintos tejidos de repollo chino (*Brassica campestris*), té verde (*Thea sinensis*) y agallas de insectos en castañas (*Dystillium racemosum*)³⁶⁻³⁸.

Con metodología similar, combinada con el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz, se pudo determinar la presencia de BRST por análisis de distintos tejidos de diferentes fuentes naturales: BR (1), 6-deoxocastasterona (27) y brassinona (9) en agallas de insectos de *Castanea crenata*^{37,39}; CS (7) y 6-deoxocastasterona (27) en tallo, hoja y flores de la misma planta³⁹; BR (1), CS (7), tifaesterol (TY) (17) y tiasterona (TE) (18) en hojas de *Thea sinensis*^{28,40,41}; BR (1), CS (7) y 24-epibrassinólido (2) en semillas y polen de *Vicia faba* (porotos gruesos)^{42,43}; BR (1) y CS (7) en *Alnus glutinosa* (alisio europeo)⁴⁴.



32) 23-O- β -D-glucopiranosil-25-metildolicosterona, 33) 23-O- β -D-glucopiranosil-2-epi-25-metildolicosterona.

Figura 1.4. Brassinosteroides naturales conjugados con hidratos de carbono.

En semillas de *Phaseolus vulgaris* (poroto), se trabajó con 136 Kg de semillas, y se identificaron 16 nuevos BRST, cuyas estructuras fueron confirmadas por espectrometría de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) a 400 MHz⁴⁵⁻⁵¹: 2-epicastasterona (13); 3-epicastasterona (14); 2,3-diepicastasterona (16); 3,24-diepicastasterona (15); 1 β -hidroxicastasterona (19); 3-epi-1 α -hidroxicastasterona (20); 3-epi-6-deoxocastasterona (29); 25-metildolicosterona (21); 2-epi-25-metildolicosterona (22); 2,3-diepi-25-metildolicosterona (23); 2-deoxi-25-metildolicosterona (24); 3-epi-2-deoxi-25-

Tabla 1.3. Distribución de brassinosteroides en el reino vegetal.

Especie	Tejido	Compuesto	Referencia
<i>Typha latifolia</i>	polen	17,18	[52,55]
<i>Oryza sativa</i>	tallo	7,10	[53,75]
<i>Zea mays</i>	polen	7,17,18	[54]
<i>Lilium longiflorum</i>	polen	1,7,17	[55,67]
<i>Tulipa gensnerioides</i>	polen	17	[55]
<i>Lilium elegans</i>	polen	1,7,17,18	[68]
<i>Lolium perenne</i>	polen	26	[69]
<i>Brassica napus</i>	polen	1,7	[1,76]
<i>Brassica campestris</i>	semilla y vaina	1,3,6,7,9,12	[36,38]
<i>Raphanus sativus</i>	semilla	1,7,18	[61,71]
<i>Distylium racemosum</i>	agallas y hojas	1,3,7,9	[28,38]
<i>Dolichos lablab</i>	semillas	1,4,5,7,10,11,27,28	[31-34]
<i>Vicia faba</i>	semilla y polen	1,2,7,9	[42,43]
<i>Vigna radiata</i>		1,7	[55]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	semilla	1,4,7,8,10,13,14, 16-18,20-33	[45-51]

<i>Citrus unshiu</i>	polen	1,7,17,18	[55]
<i>Thea sinensis</i>	hojas	1,7,9,12,17,18	[28,38,40,41]
<i>Catharantus roseus</i>	células	1,7	[62]
	cultivadas		
<i>Pharbitis purpurea</i>	semillas	7,9	[63]
<i>Helianthus annuus</i>	polen	1,7,9	[64]
<i>Castanea crenata</i>	agallas	1,7,9,27	[30,37-39]
<i>Ahus glutinosa</i>	polen	1,7	[44]
<i>Fagopirum esculentum</i>	polen	1,7	[65]
<i>Kentucky wonder</i>	semilla	4,7,27,28	[45]
<i>Diospyros Kakythumb</i>	semilla	7	[28,66]
<i>Ornithopus sativus</i>	semilla	7,8	[70]
<i>Beta vulgaris</i>	semilla	7,8	[72]
<i>Cassia tora</i>	semilla	1,7,17,18	[73]
<i>Citrus sinensis</i>	polen	1,7	[74]
<i>Pinus Thumbergii</i>	polen	7,17	[56]
<i>Pinus silvestris</i>	región	1,7	[58]
	cambial		
<i>Picea sitchensis</i>	tallo	7,17	[57]
<i>Hydrodiction reticulatum</i>	colonia	8,12	[59]
<i>Equisatum arvense</i>	estróbilo	3,7,9,10	[60]

metildolicosterona (25); 6-deoxohomodolicosterona (29); 6-deoxo-25-metildolicosterona (31); 23-O- β -D-glucopiranosil-25-metildolicosterona (32) y 23-O- β -D-glucopiranosil-2-epi-25-metildolicosterona (33). Se han encontrado, además, gran cantidad de otros análogos naturales aún no identificados.

También se han encontrado BRST en monocotiledoneas como el caso del TY (17) en polen de espadaña (*Typha latifolia*)⁵², CS (7) y dolicosterona (10) en tallo de arroz (*Oriza sativa*)³⁸ y CS (7), TY (17) y TE (18) en polen de trigo (*Zea mays*)⁵⁴, entre otros⁵⁵.

Hasta el momento, también se han hallado BRST en coníferas, únicas gimnospermas investigadas. Yokota y un grupo de sus colaboradores aislaron TY (17) del polen de pino negro (*Pinus thumbergii*)⁵⁶ e identificó CS (7) y TY (17) en tallos de abeto Sitka (*Picea sitchensis*)⁵⁷. Por otro lado, Kim y colaboradores hallaron BR (1) y CS (7) en el fragmento cambial del pino escocés (*Pinus silverstri*)⁵⁸.

También se encontró 24-epicastasterona (8) y 24-homoetilcastasterona (12) en plantas inferiores como algas verdes (*Hydrodictyon reticulatum*)⁵⁹; y CS (7), brassinona (9), 28-norbrassinólido (3) y dolicosterona (10) en helechos (*Equisentum arvense*)⁶⁰.

En definitiva, hasta el momento, se han encontrado 33 BRST naturales de diferentes fuentes que incluyen angiospermas (mono y dicotiledóneas), gimnospermas, algas y helechos. Esto habla de la ubicuidad diversa de los brassinosteroides en el reino vegetal, que se resume en la **Tabla 1.3**.

También se han realizado estudios que demuestran la ubicuidad de los brassinólidos dentro de una misma planta, encontrándose como es lógico, en mayor cantidad en los tejidos encargados de la reproducción (semillas y polen contienen aproximadamente 1-1000 ng/Kg de tejido; mientras que tallos tienen de 1-100 ng/Kg de tejido; frutas y hojas de 1-10 ng/Kg de tejido). Estos datos coinciden con la conexión que se ha hecho entre los BRST y la fisiología del crecimiento.

Entre todos los BRST hallados, el BR (1) y la CS (7) son considerados los más importantes, por su amplia distribución (ver **Tabla 1.3**) y su potente actividad biológica.

Se ha demostrado que los BRST más activos son aquellos que poseen un sustituyente en C-24(S)-metilo o etilo, aunque en algunos casos el sustituyente de C-24 con configuración R puede presentar alta actividad.

Aunque todos los brassinosteroides naturales poseen un par de hidroxilos con configuración 22(R),23(R) en la cadena lateral, sus diferencias principales corresponden a variaciones en la sustitución del anillo A. La mayoría, posee un par de hidroxilos en C-2 y C-3 con configuración α , pero también existen compuestos con diferentes sustituciones con actividad decreciente según: $2\alpha,3\alpha > 2\alpha,3\beta > 2\beta,3\alpha > 2\beta,3\beta$. Esto sugirió que la orientación α es esencial en ambas posiciones para que el compuesto presentara alta

actividad biológica⁴⁷. Como se verá en la **sección 1.5** del presente **Capítulo** (pag. 21), esta conclusión es actualmente refutada.

Por otro lado, hasta el momento se han detectado cuatro BRST que llevan un sólo hidroxilo en el anillo A (17, 18, 24 y 25), que se consideran precursores biosintéticos de los tetrahidroxibrassinosteroides³; y otros dos que tienen tres hidroxilos en el mismo anillo (19 y 20), que parecen ser sus catabolitos⁴⁷.

Por último, se hallaron dos glucopiranosil éteres (32 y 33) cuya actividad biológica parece depender exclusivamente de sus agliconas⁵¹.

La existencia de una amplia distribución de los BRST en el reino vegetal hace pensar que el número de estos compuestos aumentará, en la medida en que se avance en las investigaciones.

1.4. METODOS DE ANÁLISIS DE BRASSINOSTEROIDES.

Desde la determinación de la estructura del BR (1) y la CS (7), comenzó la búsqueda extensiva e intensiva de otros análogos naturales en el reino vegetal. Para lograrlo, se debieron desarrollar técnicas analíticas sensibles y específicas. Entre ellas, las más usadas fueron los bioensayos que permitieron llevar adelante los primeros trabajos de Mitchell, cuando bioevaluaba las brassinas¹. Más recientemente, se desarrollaron técnicas de cromatografía gas líquido/espectrometría de masa (CGL/EM), cromatografía de alta resolución (CLAR) y radioinmunoanálisis (RIA), para identificar BRST sin necesidad de aislarlos del extracto vegetal.

1.4.1. BIOENSAYOS.

Es fundamental, para llevar a cabo con éxito la detección de principios activos en plantas, contar con ensayos biológicos sensibles y específicos.

La respuesta a los distintos ensayos depende tanto de la concentración como de la estructura de la fitohormona estudiada. En el caso de los BRST los ensayos utilizados fueron diseñados originalmente para auxinas, giberelinas o citokininas. Una vez encontradas las condiciones específicas para BRST, estos bioensayos sirvieron para evaluar actividad de análogos naturales y sintéticos, así como también para estudiar su interacción con otras hormonas de crecimiento.

El ensayo de *curvatura del primer entremudo del poroto*⁷⁷, desarrollado originalmente para auxinas, y basado en la curvatura inducida sobre segmentos de tallo de plántulas de porotos parcialmente etioladas (*Phaseolus vulgaris*), permitió encontrar

respuesta en dosis de hasta 10 ng/planta de BRST⁷⁸. Por otro lado las giberelinas no causaron curvatura, pero sí elongación⁷⁹. La sensibilidad de este bioensayo se pudo aumentar 1000 veces aplicando el esteroide en la zona apical --en lugar de la basal-- del segmento tratado, llegando a detectarse cantidades del orden de los 0,1 pmoles⁸⁰.

En el *ensayo de elongación del segundo entrenudo del poroto*¹⁹, la respuesta consistió en una elongación, curvatura, hinchazón y división del entrenudo tratado con niveles hormonales de 0,01 a 10 µg/planta. También se obtuvo respuesta con auxinas, giberelinas y zeatina, pero sólo el brassinosteroide produjo división del entrenudo, convirtiendo este ensayo en específico para BRST^{78,81}. Se introdujeron mejoras en la sensibilidad modificando las concentraciones del Ca⁺⁺ y el NO₃⁻ de la solución en la que se hicieron crecer las semillas⁸².

Existe una serie de otros bioensayos donde BRST y auxinas presentan similar actividad y/o actúan sinérgicamente⁸³. También se estudió la respuesta a BRST en ensayos específicos para giberelinas y citokininas⁹ observándose en el primer caso una alta actividad en concentraciones entre 0,01 y 10 M. En los ensayos para citokininas se encontró poca o ninguna respuesta, lo cual fue indicativo de su diferente modo de acción. A diferencia del ácido indolacético (AIA), el ácido giberélico (GA₃) no actúa sinérgicamente con los BRST.

La velocidad de crecimiento de epicótilos de *Phaseolus aureus*, también resultó adecuada para determinar la actividad de BRST, y medir su interacción con GA₃⁸. Se detectó una importante curvatura del petiolo de hojas y epicótilo en el rango de concentraciones entre 10⁻⁹ y 10⁻⁷ M, pero a valores más elevados la actividad decreció. Se demostró, además, que los BRST y el GA₃ tienen formas distintas de promover el crecimiento, comportamiento que se asoció al efecto aditivo (no sinérgico), que se produce cuando se aplican simultáneamente.

En el ensayo de *desenrolle de hojas de trigo*⁶, se detectó aditividad en concentraciones del orden de los 0,5 ng/ml de BRST, mientras que las auxinas no presentan actividad. El GA₃ y las citokininas muestran sólo un leve efecto de desenrolle a altas concentraciones.

Existen también ensayos donde se evaluó la actividad de los BRST en plántulas enteras. Estos son los *alargamientos de epicótilo, petiolos, cotiledones y planta entera de rábano (Rhaparum sativus)* y *alargamiento de tallo de tomate (Lycopersicon esculentum)*⁸⁴, que fueron detectados a niveles de 0,01 ppm. Además se encontró curvatura de petiolo del cotiledón e hipocótilo a concentraciones de 0,001 ppm, donde tanto las auxinas como las giberelinas fueron activas sólo a concentraciones de 10 ppm.

El ensayo de la inclinación de la lámina de arroz (*Oryza sativa*), aplicado sobre un segmento de lámina de la hoja, es el más utilizado por su simpleza y alta sensibilidad⁸⁵. Existe una modificación de este ensayo que se realiza sobre plántulas intactas de arroz enano⁸⁶. En estos ensayos el AIA mostró efecto sólo a altas concentraciones, mientras que el ácido absísico (ABA), el GA₃ y las citokininas inhibieron la inclinación¹⁰.

En ambas versiones del bioensayo, el ángulo formado entre las hojas y el tallo se usa para evaluar cuantitativamente la actividad biológica de los BRST.

El ensayo de la inhibición del crecimiento de la arveja, es el único bioensayo conocido basado en inhibición causado por BRST. Se basa en la inhibición de la elongación de tallos de arveja etiolados, probablemente debido a la producción de etileno, mediada por BRST. El efecto es similar al producido por AIA, y pueden detectarse concentraciones del orden de los fmoles⁸².

El desarrollo de bioensayos específicos, que en conjunción con los anteriores ayudaron a determinar el amplio espectro de actividades biológicas de los BRST, y la comparación con la bioactividad de otras hormonas vegetales de crecimiento conocidas, llevó a clasificar a los BRST como un sexto grupo de fitohormonas.

Tabla 1.4. Bioensayos más utilizados para la detección de BRST.

Bioensayo	Límite de detección ^a	Referencias
<i>Curvatura del 1° entrenudo del poroto</i>	3 x 10 ⁻¹⁰	[77,78]
<i>Curvatura del 1° entrenudo del poroto (sensibilizado)</i>	3 x 10 ⁻¹³	[80]
<i>Elongación del 2° entrenudo del poroto</i>	2 x 10 ⁻¹¹	[78,81]
<i>Inclinación de la lámina de arroz</i>	1 x 10 ⁻¹³	[85]
<i>Elongación de plántulas de rábano</i>	8 x 10 ⁻⁹	[84]
<i>Elongación de plántulas de tomate</i>	4 x 10 ⁻⁹	[84]
<i>Desenrolle de hojas de trigo</i>	1 x 10 ⁻¹²	[7]
<i>Inhibición del crecimiento de la arveja</i>	1 x 10 ⁻¹⁴	[82]

^a Concentración molar

En el Capítulo 6 (pag. 188) se detallarán los ensayos utilizados en nuestro laboratorio para la evaluación de la bioactividad de los compuestos sintetizados.

1.4.2. MÉTODOS MICROANALÍTICOS.

La mayor dificultad que presentaba el aislamiento y purificación de los BRST para su posterior identificación y/o determinación estructural, era la cantidad de tiempo consumido y el tedioso trabajo para llevarlas a cabo, debido a la bajísima concentración endógena en vegetales. Para salvar esta dificultad se desarrollaron distintos métodos para identificar BRST en mezclas bioactivas parcialmente purificadas, que consistían en:

- a) Convertirlos en derivados volátiles adecuados para CGL/EM⁸⁷⁻⁹¹.
- b) Derivatizarlos con un producto fluoróforo o electróforo, adecuado para ser utilizado en CLAR⁹²⁻⁹⁶.
- c) En los últimos años se intentó también utilizar métodos de RIA, para la detección e identificación de BRST^{97,98}.

Cada uno de estos métodos se analizará brevemente a continuación.

1.4.2.1. Cromatografía gas líquido/Espectrometría de masa.

La técnica se basa en la derivatización de los BRST convirtiéndolos en productos volátiles, aprovechando los dos pares de hidroxilos vecinales que poseen en la cadena lateral y el anillo A. De esta forma, se preparan los bis-metanboronatos (BMB) de los extractos bioactivos parcialmente purificados, y que se analizan por cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopía de masa^{28,35}.

Los BMB son adecuados para analizar BRST y sus 6-ceto análogos, ya que las mezclas de ellos se separan perfectamente en picos agudos absolutamente distinguibles, utilizando columnas capilares o empacadas.

En los espectros de masa por impacto electrónico (IE) de estos bismetanboronatos, el ión molecular de los derivados lactónicos, sólo aparece como un pico de baja intensidad, mientras que el pico base resulta ser la ruptura entre C₂₀-C₂₂. Además aparecen otros iones producto de la ruptura de la cadena en C₁₇-C₂₀, C₂₃-C₂₄ y C₂₄-C₂₅, y la ruptura del anillo B (ver **Figura 1.5**). Los 6-ceto análogos, además de estos picos tienen otro ión resultante de la fisión simultánea de los enlaces C₁₄-C₁₅ y C₁₃-C₁₇, pero no poseen la ruptura del anillo B.

La ruptura del cicloboronato no se detecta en ningún caso, excepto en los BRST que poseen un doble enlace en C-24^{28,87}.

En el caso de los 2-deoxibrassinosteroides, primero se derivatiza la cadena lateral de la manera anteriormente descrita, y luego se trimetilsilila⁸⁸ el hidroxilo de C-3; convirtiendo el esteroide en un derivado igualmente adecuado para CGL/EM. Utilizando estas técnicas se ha logrado, por ejemplo, identificar BR (1), CS (7) y 28-norcastasterona (9) en polen de girasol (*Heliantus annuus* L.)⁶⁴.

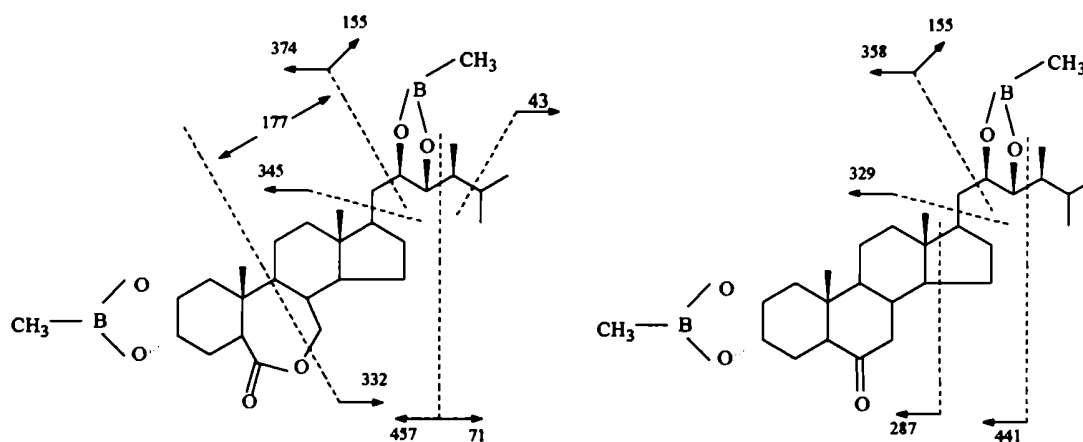


Figura 1.5. Fragmentaciones de bismetánboronatos de brassinólido y castasterona en espectroscopía de masa por impacto electrónico.

Si la muestra cruda tiene mucho menor cantidad de BRST, es más adecuado utilizar CGL/EM(MSI)²⁸. Cuando se utilizan espectros de masa por ionización química (IQ), el pico base resulta ser el ión $M+1$ ^{35,96}, además, aparecen iones resultantes de la escisión de los enlaces $C_{17}-C_{20}$ y $C_{20}-C_{22}$. El hecho que con esta técnica aparezca el ión molecular de los derivados boronados, la convierte en apropiada para realizar detección sistemática en plantas^{28,36,37,40,58}.

También se han registrado espectros de masa por impacto electrónico e ionización química de los BRST previamente purificados sin derivatizar. En este caso, al grupo de picos enumerados anteriormente se le suma la ruptura entre $C_{22}-C_{23}$ ^{87,89-91} (ver **Figura 1.6**).

De la misma forma, se han hecho espectros de masa mediante ionización por bombardeo de átomos veloces (BAV), y se han detectado principalmente los iones $M+1$, $M+1+92$ (glicerina), y las pérdidas de una y dos moléculas de agua^{30,31,90,91} (ver **sección 5.3 del Capítulo 5**, pag. 168).

Se ha trabajado, también, con cromatografía gaseosa combinada con espectroscopía de masa de alta resolución (EMAR), por ejemplo para detectar BRST en polen de poroto grueso (*Vicia faba* L.)⁴³ y trigo sarraceno (*Fagopirum esculentum* M.)⁶⁵. En estos casos, se derivatizaron fracciones bioactivas altamente purificadas con ácido metanborónico, y se analizaron por CGL-EMAR(MSI) en el modo impacto electrónico.

Una alternativa altamente sensible es el tandem CGL/EM/EM, que se utilizó para identificar BRST en polen de alisio europeo (*Alnus glutinosa* L.)⁴⁴.

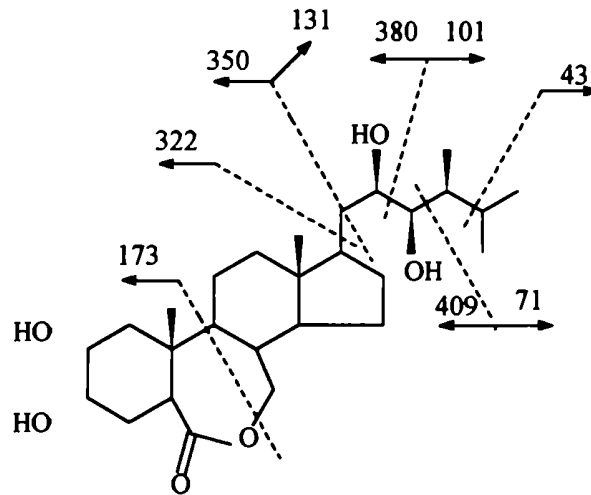


Figura 1.6. Fragmentaciones de brassinólido sin derivatización en espectroscopía de masa por impacto electrónico.

En todos los casos hasta aquí enumerados, fue posible una determinación cuali y semicuantitativa de la proporción de BRST en el extracto bioactivo. Para realizar la determinación cuantitativa se sintetizaron BRST marcados con deuterio, en C-26 y C-28; para utilizarlos como patrones internos en CGL/EM⁸⁹.

En la **sección 5.3 del Capítulo 5** (pag. 168) se presentan los resultados de espectroscopía de masa de BRST cuyas síntesis forman parte de esta tesis, mediante distintas técnicas que no requieren derivatización⁹⁹.

1.4.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución.

La técnica de separación por CLAR se utilizó desde los comienzos para purificar las distintas fracciones prepurificadas de los extractos de BRST. En todos los casos el registro se realizaba con un detector UV a una longitud de onda de 204 nm¹. La posibilidad de utilizar esta técnica como método microanalítico se vió limitada por la ausencia, en estas moléculas, de un grupo cromóforo.

Recién en el año 1988 se desarrolló una técnica de derivatización apropiada para obtener BRST convenientemente sustituido con cromóforos⁹². Se trataba de un naftalenboronato que se detectaba por absorción ultravioleta a 280 nm. A partir de allí se sintetizaron otros derivados con restos fluoróforos⁹³⁻⁹⁵ y electróforos⁹⁶. En la **Figura 1.7** se pueden observar las estructuras de los sustituyentes utilizados. En la **Tabla 1.5** se

Tabla 1.5. Resumen de las principales características de los distintos derivados de BRST utilizados para CLAR.

Derivado	Tipo	Detección	Límite de detección	Referencias
naftalenboronato	absorción UV	280 nm	250 pg	[83]
9-fenantrenboronato	fluorescencia	Ex = 305 nm Em = 375 nm	50 pg	[45,51,52,84]
1-cianoisindol- <i>m</i> -fenilboronato	fluorescencia	Ex = 330 nm Em = 400 nm	25 pg	[85]
dansilaminofenilboronato	fluorescencia	Ex = 345 nm Em = 515 nm	25 pg	[52,86]
ferrocenboronato	electroquímico	+0.6 V vs. Ag ⁰ /AgCl	25 pg	[87]

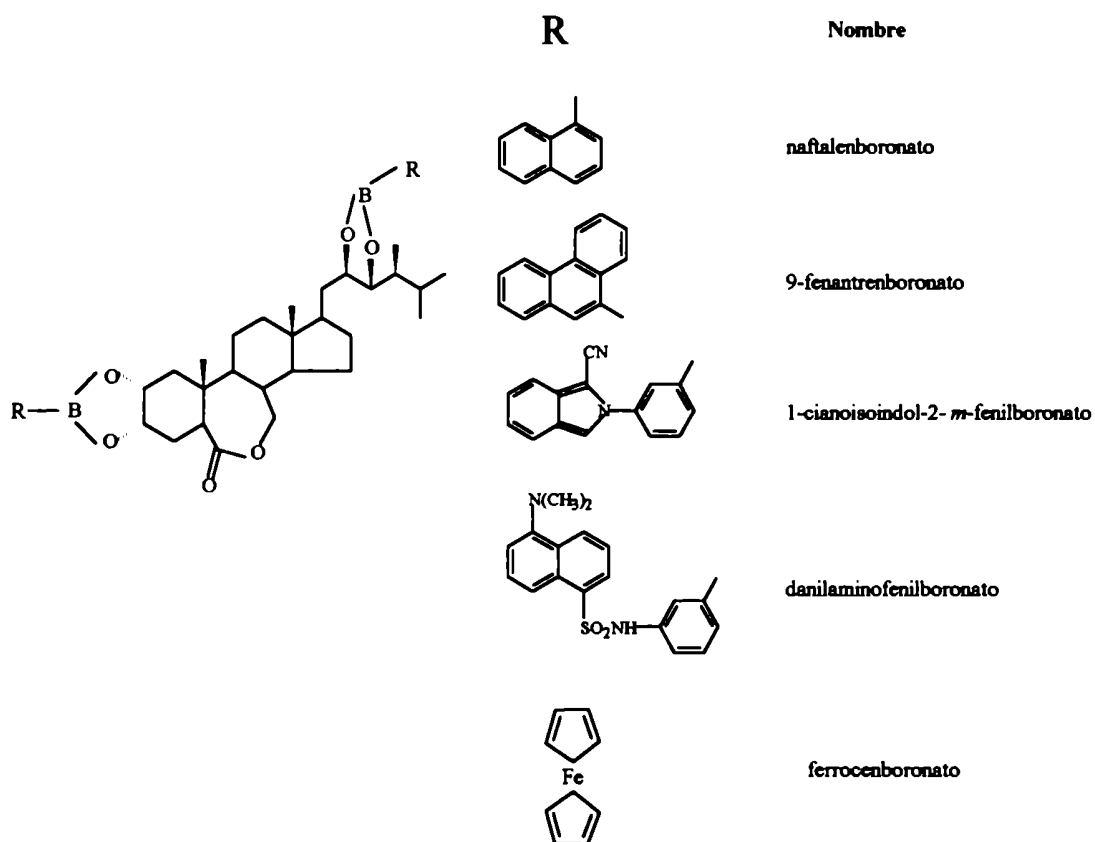


Figura 1.7. Estructura de los distintos derivados de BRST utilizados para CLAR.

señalan los tipos de detección para la cual es apta cada derivado y los límites de detección que varían entre los 20-50 pg.

Estos derivados se usaron en varios casos para identificar BRST en plantas^{60,64,65}, o para confirmar la existencia de ellos con nuevos métodos^{93,95,96}.

Esta técnica analítica cuali y semicuantitativa, parece ser adecuada en cuanto a que pueden detectarse trazas de BRST en plantas gracias a su sensibilidad y su especificidad.

1.4.2.3. Radioinmunoanálisis.

Este método de análisis se ha desarrollado poco hasta el momento y han aparecido sólo dos trabajos al respecto. El primero de ellos que utilizó antisuero generado contra 24-epibrassinólido⁹⁷ mostró ser de muy poca especificidad para BRST. Más tarde, el grupo de Yokota y sus colaboradores de la Universidad de Tokio, analizó el contenido de BRST en *Phaseolus vulgaris* L.⁹⁸ por radioinmunoanálisis. Este mismo grupo desarrolló un antisuero contra castasterona, inmunizando conejos con castasterona-carboximetoxilamino oxima conjugada con albúmina bovina que logró reconocer distintos BRST, con distinta especificidad, logrando un límite de detección del orden de los 0,3 pmoles. Este último método de detección resultó ser superior al del bioensayo de la inclinación de la lámina de arroz y al CGL/EM(MSI).










Este mismo tipo de antisuero se generó utilizando anticuerpos policlonales para detectar BRST en centeno (*Lolium perenne* L.), por inmunocitoquímica⁶⁹.

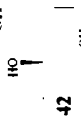
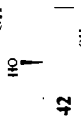
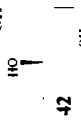
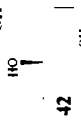
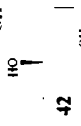
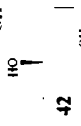
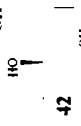
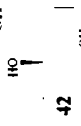
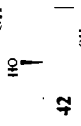
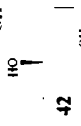
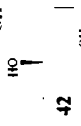
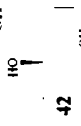
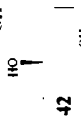
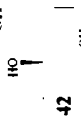
1.5. RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

Una vez logrado el aislamiento, la purificación y la determinación estructural¹ del BR (1) y el hallazgo de sus distintos análogos naturales, surgió el interés por determinar las relaciones entre la estructura y la bioactividad¹⁰⁰⁻¹⁰⁶. Con este fin, se han sintetizado variados análogos, naturales y no naturales, con modificaciones sistemáticas en la cadena lateral y en los anillos A y B. Además, se han puesto a punto diferentes bioensayos para comparar sus bioactividades (ver sección 1.4.1. del presente Capítulo, pag. 14). En las **Tablas 1.6 y 1.7** se detallan las actividades biológicas frente a distintos bioensayos, de distintos compuestos con diferentes cadenas laterales. La **Tabla 1.6** muestra, exclusivamente, los resultados obtenidos con compuestos de estructura lactónica, mientras que la **Tabla 1.7** hace lo propio con compuestos de estructura cetónica.

Tanto en la serie lactónica como en la cetónica, la configuración de los grupos de C-22 y C-23 con estereoquímica (R,R) resultaron ser más activos, en el ensayo de la

Tabla 1.6. Estructuras de análogos lactónicos de BRST, con diferentes cadenas laterales, y sus correspondientes actividades biológicas en distintos bioensayos.

N	cadena lateral(a)	Arroz (b)	1° entren. de poroto(c)	Rábano (b)	Tomate (b)	referencias
1		0,001	---	---	---	[103]
2		2	---	---	---	[103]
3		1-2	0	---	---	[101-103]
4			0	---	---	[102]
5		2	---	1	0,3	[101-103]
6			210	---	---	[102]
7			33	---	---	[102]
8		1	7	10	1	[100-102]
9		5	25	100	10	[100-102]

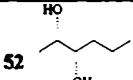
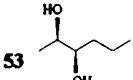
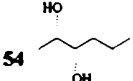
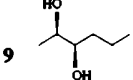
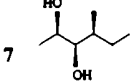
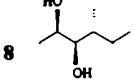
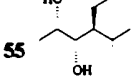
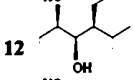
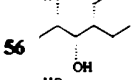
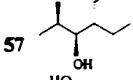
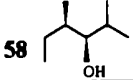
10		0,1	---	1	0,1	[100,101]
11		0,05	---	1	0,5	[100,101]
12		249	---	---	---	[102]
13		100	547	100	100	[100-102]
14		5-10	189	100	3	[100-102]
15		10	198	10	10	[100-102]
16		50	141	3	1	[100-102]
17		100	180	10	1	[100-102]
18		5	---	0,5	1	[100,101]
19		10	---	1	1	[100,101]
20		10	---	---	---	[101]
21		100	---	100	---	[104]
22		---	---	0	0	[103]
23		---	---	0	0	[103]

a- Distintas cadena laterales sustituyentes de C-17 de 2 α ,3 α -dihidroxi-B-homo-5 α -colestan-6-ona. En el ángulo inferior izquierdo se indica el número de compuesto correspondiente.

b Actividad expresada como porcentaje de actividad de brassinólido.

c Actividad expresada como porcentaje de crecimiento respecto del control crecido con auxina (AIA).

Tabla 1.7. Estructuras de análogos cetónicos de BRST, con diferentes cadenas laterales, y sus correspondientes actividades biológicas en distintos bioensayos.

N	Cadena lateral(a)	Arroz (b)	1° entren. de poroto(c)	Rábano (b)	Tomate (b)	referencias
1		---	86	---	---	[102]
2		---	35	---	---	[102]
3		0,1	32	0,3	0,3	[100-102]
4		5	17	3	1	[100-102]
5		50	273	---	---	[100,102]
6		---	216	---	---	[102]
7		0,5	9	0,01	---	[100-102]
8		50	75	1	0,3	[100-102]
9		0,5	---	0,03	---	[100,101]
10		1	---	0,1	---	[100,101]
11		50	---	10	---	[104]

^a Distintas cadena laterales sustituyentes de C-17 de 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona. En el ángulo inferior izquierdo se indica el número de compuesto correspondiente.

^b Actividad expresada como porcentaje de actividad de brassinólido.

^c Actividad expresada como porcentaje de crecimiento respecto del control crecido con auxina (AIA).

*inclinación de la lámina de arroz*¹⁰⁰, que sus isómeros (S,S) (comparar por ejemplo entradas 16 y 17, **Tabla 1.6**). Por otro lado, los diastereómeros (R,S) y (S,R) resultaron ser mucho menos activos aún que los anteriores (ver por ejemplo entradas 11 y 12, **Tabla 1.6**). Sin embargo, en el caso de los análogos lactónicos, este orden se invierte cuando se invierte la configuración del grupo alquilo de C-24 (comparar entradas 16 y 19, **Tabla 1.6**). En cambio, en los derivados cetónicos, parece ser más importante la configuración (R,R) de C-22 y C-23, tal como puede apreciarse en las entradas 7-10 de la **Tabla 1.7**.

Por otro lado, siempre teniendo en cuenta el mismo ensayo, en general los 7-oxa-6-ceto-brassinosteroides poseen mayor actividad que sus 6-ceto análogos¹⁰⁷; este es el caso particular de la castasterona (7) que tiene el 50% de la actividad del brassinólido (1) (comparar entrada 5, **Tabla 1.7** y entrada 13, **Tabla 1.6**). Sin embargo existen excepciones, por ejemplo, el derivado lactónico con cadena 28-nor (entrada 9, **Tabla 1.6**), tiene similar actividad que su análogo no lactónico (entrada 4, **Tabla 1.7**).

En los ensayos del rábano y del tomate también se verifica que los BRST con configuración 22(R),23(R) son generalmente más activos que sus epímeros 22(S),23(S), excepto en el caso de los 24-epi (comparar entradas 14 y 15, **Tabla 1.6**). También se generaliza que los 22(R),23(R) son mucho más activos que los 22(R),23(S) y 22(S),23(S) como se evidencia en el caso de los isómeros 28-nor (entradas 8-11, **Tabla 1.6**).

En los ensayos de rábano y tomate se halló también que los análogos lactónicos presentaban actividad mucho mayor que los correspondientes cetónicos, resultado que coincide con el obtenido para el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz (comparar, por ejemplo, entradas 8 y 9 de la **Tabla 1.6** con entradas 3 y 4 de la **Tabla 1.7**).

La comparación de las bioactividades de los BRST en distintos ensayos¹⁰¹, demostró que no es posible una generalización de la relación estructura-actividad. Algunos de los ejemplos de bioactividades relativas contradictorias son:

1- En todos los bioensayos realizados --rábano, tomate, arroz y poroto-- el brassinólido (1) fue el más activo (entrada 13, **Tabla 1.6**), pero en el ensayo de rábano el isómero 22(S),23(S),24(R) (45) (entrada 14, **Tabla 1.6**), fue tan activo como el brassinólido (1) y más activo que el correspondiente 22(R),23(R),24(R)-epibrassinólido (2) (entrada 15, **Tabla 1.6**). Sin embargo, la actividades relativas entre estos dos últimos (2 y 45) se vieron invertidas en el ensayo del tomate.

2- El 22(R),23(R)-norbrassinólido (9) (entrada 9, **Tabla 1.6**), que tenía una actividad mucho menor que el brassinólido en el ensayo de la *inclinación de la lámina de arroz* resultó ser tan activo como éste en el ensayo del rábano, y sólo tuvo un 10% de su actividad relativa en el ensayo del tomate (ver entradas 9 y 13, **Tabla 1.6**).

3- El 22(R),23(R),24(S)-24-homoetilbrassinólido (6) y el 22(S),23(S),24(S)-24-homoetilbrassinólido (46), que poseen actividad parecida al brassinólido (1) en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz, son muy pocos activos en el ensayo del rábano (1- y 30 veces menor) y del tomate (100 veces menor) (ver entradas 13, 16 y 17, **Tabla 1.6**).

4- Los 24-homoetilbrassinólidos (entradas 16-19, **Tabla 1.6**) muestran actividades comparables en el ensayo del tomate; sin embargo en el del rábano son mucho más activos los que poseen la sustitución 24(S) (entradas 16 y 17, **Tabla 1.6**) que los que poseen la sustitución 24 (R) (entradas 18 y 19, **Tabla 1.6**).

En cuanto a modificaciones sintéticas realizadas, es interesante hacer notar que la introducción de un grupo hidroxilo en C-25 suprime totalmente la actividad (entradas 22 y 23, **Tabla 1.6**), mientras que la introducción de un metilo en dicha posición^{109,110} produce un aumento de la misma. También, se sintetizaron análogos de brassinólido (1) y castasterona (7) con una función éster en la cadena lateral, hallándose que poseían actividad¹¹⁰.

También se sintetizaron análogos con modificaciones en el anillo A y B para estudiar el comportamiento frente al ensayo de la inclinación de la lámina de arroz^{104-106,111-117}. Los BRST que no contienen oxígeno en el anillo B, poseen muy poca o ninguna actividad, como rasgo general en todos los ensayos estudiados.

De todos los estudios realizados surgieron las siguientes conclusiones generales⁷⁶:

1- La remoción de uno o los dos hidroxilos del anillo A, reduce la actividad biológica de los esteroides.

2- Los BRST 7-oxolactónicos resultaron ser mucho más activos que los 6-oxolactónicos (y que los lactámicos y tiolactámicos).

3- Los BRST con configuración A/B *trans* de los anillos resultaron ser mucho más activos que los A/B *cis*.

Como se desprende de los datos presentados, aunque el brassinólido (1) es el más activo de los BRST en los diferentes ensayos, las variaciones de actividad relativa dependen del ensayo utilizado haciendo muy difícil determinar, a ciencia cierta, cuales son los requerimientos para que una estructura determinada posea óptima actividad de brassinosteroide. Sin embargo, las siguientes son las características tradicionalmente aceptadas como requisitos generales indispensables para presentar este tipo de actividad biológica:

1- Poseer un diol vecinal *cis* en C-2 y C-3 en el anillo A. Los compuesto con un sólo hidroxilo en C-2 o C-3 (17 y 18) en configuración α o β , o con los hidroxilos en *trans*, muestran poca o ninguna actividad.

2- Presentar unión A/B *trans* de los anillos.

3- Tener un oxígeno en C-6 en forma cetónica o lactónica. Los que no poseen este oxígeno son poco o nada activos. El reemplazo del grupo 7-oxa-6-cetónico, por otro 6-oxa-7-cetónico; o el reemplazo del oxígeno por nitrógeno suprime todo tipo de actividad.

4- Poseer una cadena del tipo del colesterol con un par de hidroxilos en C-22 y C-23. Todos los BRST naturales poseen configuración R,R para esos hidroxilos. Variaciones en esta configuración disminuyen la actividad.

5- Tener un sustituyente alquílico en C-24. La máxima actividad se obtiene con el C-24(S)-metilo. El orden de actividad decreciente es el siguiente, tanto para lactonas como para cetonas: metilo > etilo > hidrógeno. Los 22(R),23(R),24(S), son más activos que los 22(S),23(S),24(R). Tanto un grupo metilideno como etilideno en C-24 conservan la actividad en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz.

Considerando la disparidad de resultados de relación estructura-bioactividad evidenciados por los mismos compuestos en los diferentes bioensayos, teniendo en cuenta que los estudios han sido elaborados por diferentes grupos de investigación, utilizando diferentes técnicas y/o diferentes variedades de la misma especie vegetal, y ante la falta de un análisis estadístico de muchas de las publicaciones sobre el tema, el grupo de la Dra. C. Brosa, en Barcelona, ha desarrollado un nuevo enfoque para resolver el tema de la relación estructura molecular/bioactividad. Para ello, han considerado que la molécula debe ajustarse a un receptor determinado¹¹⁸ necesitando, por lo tanto, cumplir con una serie de requisitos conformacionales. El objetivo del grupo de investigación es, entonces, realizar un estudio conformacional de los BRST y establecer una relación cuantitativa de estructura actividad (QSAR. Quantitative Structure-Activity Relationship). Para organizar un QSAR fue imprescindible encontrar un bioensayo sensible y, fundamentalmente, reproducible para medir la bioactividad de los análogos de brassinosteroides. Este bioensayo resultó ser el de inclinación de la lámina de arroz, sobre la variedad española Bahía, y en condiciones modificadas respecto de las descriptas¹¹⁸. Este ensayo no puede utilizarse en dosis mayores que 1µg/planta, por problemas de absorción y solubilidad, y aún no se ha encontrado otro bioensayo que permita cuantificar la actividad de los análogos menos bioactivos.

Básicamente, el estudio QSAR consiste en que , habiendo sintetizado un gran número de análogos de BRST¹¹⁸ (ver Figura 1.8) con distintas variaciones en su

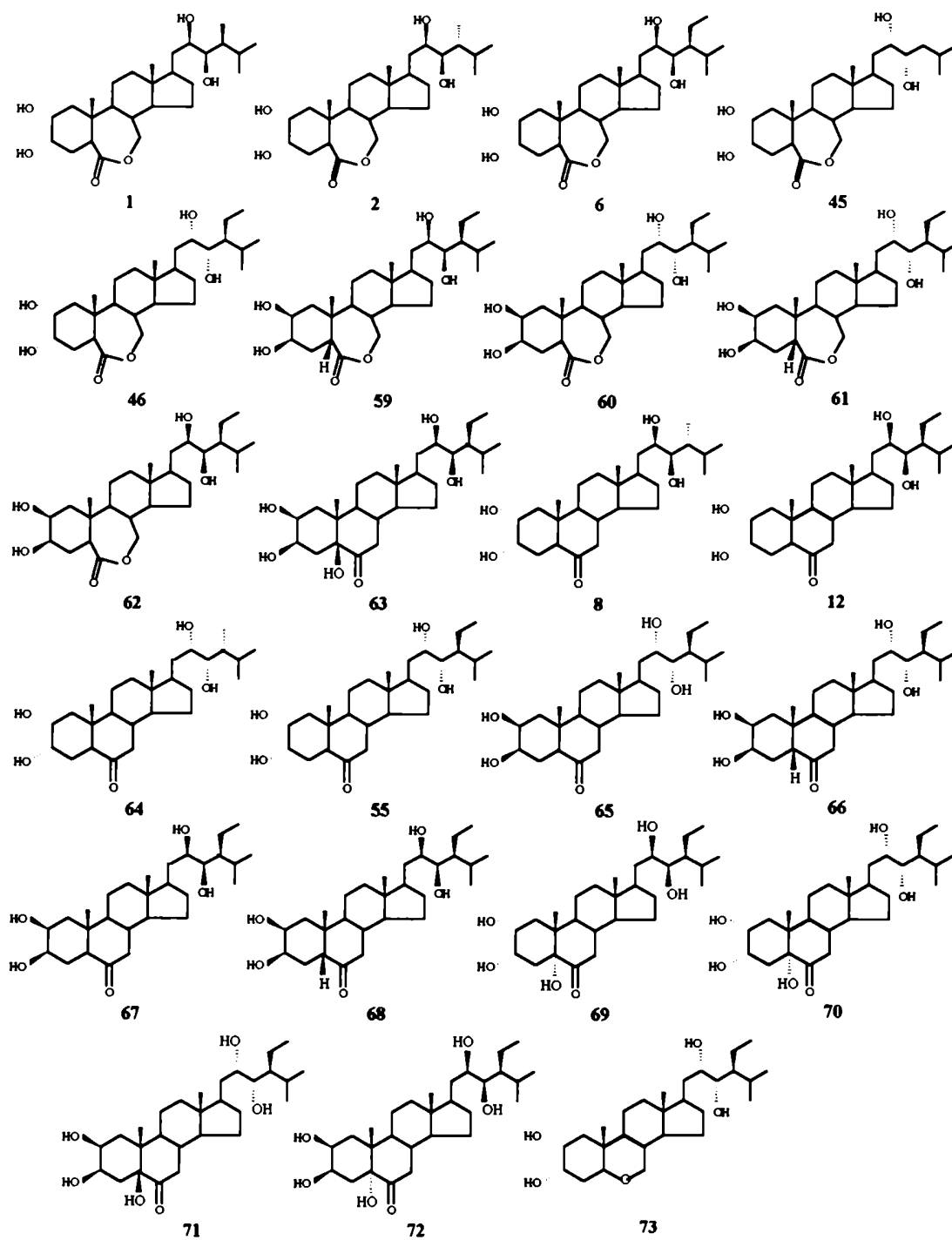


Figura 1.8. Brassinosteroides evaluados con el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz, y utilizados para la correlación cuantitativa de estructura actividad (QSAR)¹¹⁸.

estructura tanto en la cadena lateral como en los anillos A y B, se les determinó la bioactividad con el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz y posteriormente se realizó un estudio sistemático por modelado molecular¹¹⁹, para hallar todas las posibles conformaciones de mínima energía de los BRST, en un rango de 3 Kcal/mol. Una vez completado el trabajo y teniendo en cuenta que los sitios de unión al receptor serían los hidroxilos¹⁰¹, se intentaron determinar los requerimientos estructura-actividad considerando la ubicación relativa de los átomos de oxígeno, en todos los posibles conformeros hallados para los compuestos bioactivos¹¹⁹.

Luego de correlacionar distintos parámetros con la bioactividad evidenciada, se concluyó que ésta dependía de la ubicación espacial relativa entre los oxígenos. Esta ubicación relativa se podía indicar como una distancia entre dichos oxígenos y, de esta forma, podría predecirse que todo compuesto cuyas distancias fueran similares a las del brassinólido sería también bioactivo. En la **Tabla 1.7** se muestran las distancias halladas para el brassinólido, consideradas como ideales.

Tabla 1.7. Distancia en anströng (Å) entre oxígenos para el brassinólido (1).

Distancia	O-2	O-3	O-carb.	O-22	O-23
O-2	---	2,7	6,1	11,1	12,7
O-3	---	---	4,8	11,1	12,9
O-carb.	---	---	---	10,8	12,6
O-22	---	---	---	---	2,4
O-23	---	---	---	---	---

Este tipo de estudios ha permitido realizar interpretaciones muy interesantes como justificar la anormalmente alta actividad biológica, en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz, presentada por la (22R,23R,24S)-24-etil-2 β ,3 β ,5,22,23-pentahidroxi-5 β -colestano-6-ona (59) (ver **Figura 1.8**). Este comportamiento, que echó por tierra los requerimientos aceptados clásicamente como necesarios, dado que en este caso los hidroxilos en C-2 y C-3 estaban beta orientados y existía una fusión A/B *cis* de los anillos, puede explicarse perfectamente por medio de esta nueva teoría, ya que las distancias entre oxígenos coinciden en buena forma con las del brassinólido (1) al variar simultáneamente ambos factores configuracionales¹²⁰.

En la **Tabla 1.9** se muestra la correlación en los parámetros de distancia para el compuesto **59** y puede observarse que no existen grandes desviaciones con respecto a los datos obtenidos para el brassinólido (**1**) (ver **Tabla 1.8**).

Tabla 1.9. Distancia en anstrongs (Å) entre oxígenos para la (22R,23R,24S)-24-etil-2β,3β,5,22,23-pentahidroxi-5β-colestan-6-ona (**59**).

Distancia	O-2	O-3	O-carb.	O-22	O-23
O-2	---	2,8	6,6	10,2	11,8
O-3	---	---	4,9	11,2	13,2
O-carb.	---	---	---	9,9	11,8
O-22	---	---	---	---	2,7
O-23	---	---	---	---	---

1.6. SINTESIS.

Tan pronto como se dilucidó la estructura del brassinólido (**1**)¹, luego de su trabajosa obtención a partir del polen de *Brassica napus L.*, comenzó la competencia por sintetizarlo. Su estructura esteroideal lactónica, sin precedentes hasta ese momento, y su cadena lateral con cuatro centros quirales contiguos, convertían a su síntesis en un atractivo desafío. A esto se sumaba su escasez en fuentes naturales¹ y su promisoría actividad biológica promotora del crecimiento y división celulares²³.

Básicamente los experimentos de síntesis permitieron:

*Confirmar la estructura asignada al brassinólido (**1**) y otros brassinosteroides (BRST) por métodos físicos y espectroscópicos.

*Demostrar que la actividad biológica se debe exclusivamente a los BRST y no a alguna otra sustancia presente en la fuente natural.

*Establecer relaciones estructura-actividad.

*Poder contar con mayor cantidad de compuestos para llevar a cabo distintos estudios sobre bioactividad.

Numerosos son los esquemas sintéticos que se han diseñado para obtener BRST estereoselectiva y estereoespecíficamente, intentando evitar la obtención de isómeros no naturales indeseados.

Para llevar a cabo la síntesis fue necesario:

- a) Funcionalizar los anillos A y B, partiendo de un precursor esteroidal adecuado.
- b) Construir la cadena lateral dihidroxilada con los centros asimétricos en C₂₀, C₂₂, C₂₃ y C₂₄. Esto se solucionó de dos formas diferentes: construyendo la cadena lateral estereoselectivamente o introduciendo el diol 22(R),23(R) deseado sobre un precursor esteroidal con la cadena adecuada

1.6.1. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS ANILLOS A Y B (Esquema 1.1).

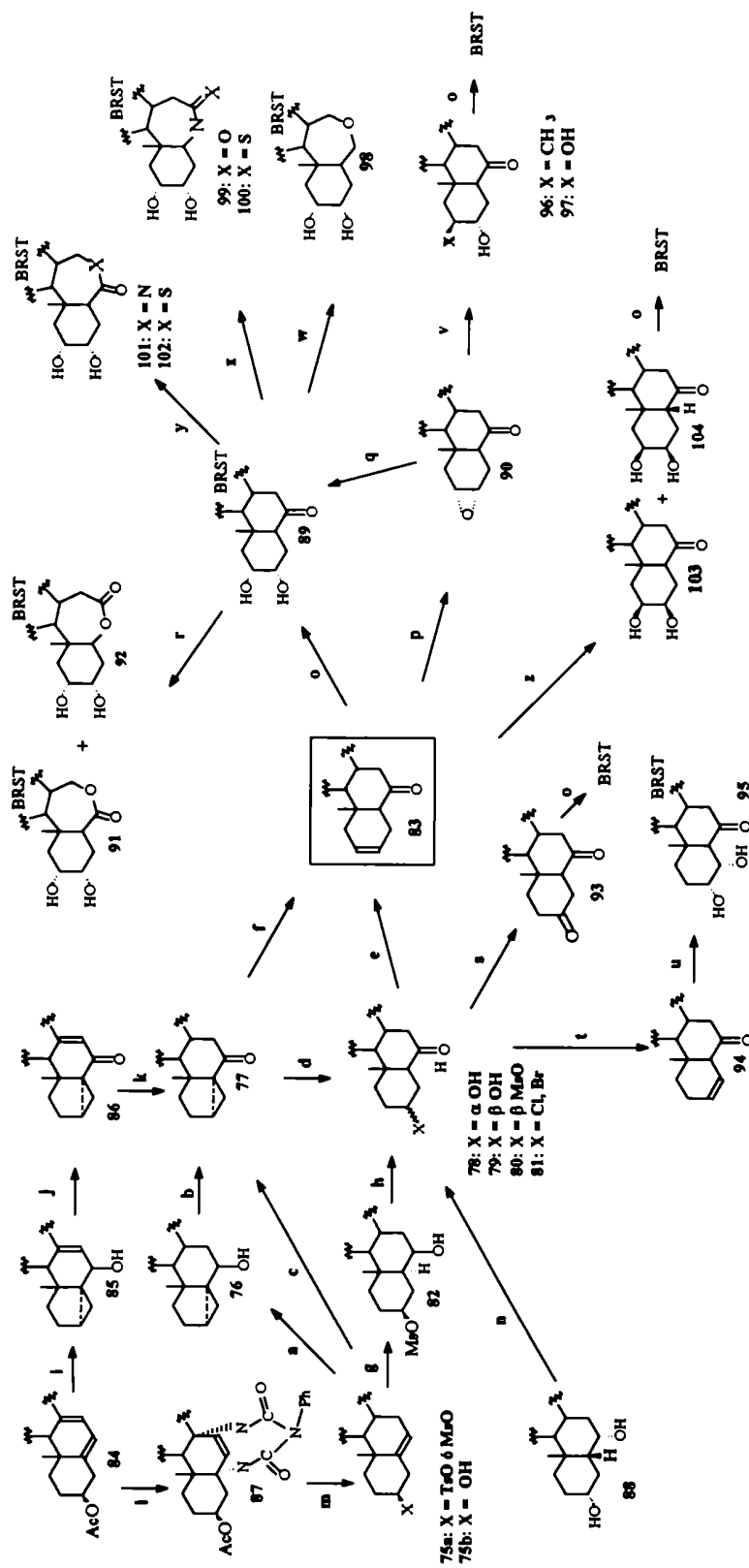
En el **Esquema 1.1** se ilustran las principales estrategias sintéticas seguidas para la obtención de los distintos análogos con variaciones en los anillos A y B.

1.6.1.1. Obtención del grupo carbonilo en C-6.

En prácticamente todas las síntesis publicadas el producto de partida fue un esteroide del tipo Δ^5 adecuadamente funcionalizado en C-3 (compuesto **75**, **Esquema 1.1**) el cual, a través de un intermediario del tipo Δ^2 -6-ceto (compuesto **83**, **Esquema 1.1**), se convierte en un BRST con un grupo 6-ceto o 7-oxa-6-ceto (compuestos **89** y **91**, respectivamente).

Un ejemplo general de esta estrategia consiste en someter un derivado tosilado o mesilado de **75** (compuesto **75a**, **Esquema 1.1**), a un reordenamiento para generar el correspondiente 3,5-cicloesteroide (compuesto **76**, **Esquema 1.1**), el cual posteriormente se oxida con clorocromato de piridonio (CCP) o trióxido de cromo en piridina, para dar el 3,5-ciclo-6-oxocompuesto (compuesto **77**, **Esquema 1.1**)^{30,78,103,109,111,112,116,117,121-136}. Como otra alternativa, el mesilato **75a** se transformó directamente en **77** con acetato de sodio en dimetilsulfóxido, con un 32% de rendimiento¹³⁷. La conversión de **77** en **83** puede realizarse a través de la hidroxicetona **78**^{78,111,116,117,122-124,127,132,133,135,136}, seguido por el tratamiento del correspondiente mesilato (**80**) con carbonato de litio¹³⁸ o bromuro de litio^{78,116,122,135}. Una vía también frecuentemente utilizada, es la conversión de **77** en **81** utilizando un reordenamiento catalizado por un hidrácido y la subsecuente eliminación^{116,117,123,124,132,133,135,136} de ácido clorhídrico o ácido bromhídrico para obtener **83**. Se llevó a cabo, también, un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la conversión de **77** directamente en **83**, dado el bajo rendimiento de las variantes utilizadas, lográndose buenos resultados¹³³.

Otra estrategia sintética abordada para obtener **83**, implica la hidroboración del mesilato de **75**, para obtener el compuesto **82**, seguido de oxidación con reactivo de Jones¹³⁸ o CCP^{104,139-141}, para obtener **80**. La posterior eliminación del grupo de C-3 permite obtener **83**.



- a) $\text{KHCO}_3 / (\text{CH}_3)_2\text{CO} / \text{H}_2\text{O}$; b) CCP; c) $\text{DMSO} / \text{N}(\text{Me})_2 / \text{Ac}_2\text{O}$; d) $\text{AcOH} / \text{H}_2\text{SO}_4$ ó HB / AcOH ó HCl / AcOH ; e) LiCO_3 ó LiBr ; f) P-TsOH ; g) BH_3 / THF ; h) Jones ó CCP
 i) $\text{KHCO}_3 / (\text{CH}_3)_2\text{CO} / \text{H}_2\text{O}$; j) CCP ó Jones; k) Li / NH_3 (liq.); l) 4-ferulil-1,2,4-triazolin-3,5-diona; m) $\text{Li} / \text{Et}_2\text{NH}$; n) 1) CCP 2) HBO^+ ; o) OsO_4 ; p) RCO_3H ; q) [147f]
 r) RCO_3H ; e) CCP; i) KHCO_3 ; n) OsO_4 ; v) $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{SO}_4$ ó H_3O^+ ; w) [114]; x) [112]; y) [114]; z) 1) $\text{Li} / \text{AgAcO} 2\text{KOH}$

BRST indica la presencia de un compuesto con cadena lateral de brassinosteroide.

Esquema 1.1. Síntesis de brassinosteroides naturales y no naturales. Funcionalización de los anillos A y B.

También se utilizó acetato de ergosterol (**84**) como producto de partida para obtener **83** vía **77**¹²². El compuesto **84** se convirtió en el correspondiente 3,5 cicloesteroide derivado de **85**, el cual, luego de ser oxidado al Δ^7 -6-oxo compuesto (**86**) se redujo con litio en amoníaco líquido para obtener **77**. Por último, **83** puede obtenerse vía **80** por reordenamiento en medio ácido¹²² o directamente por tratamiento a reflujo con una mezcla de bromuro de litio y cloruro de piridonio en dimetilacetamida¹³⁵. Otra alternativa que utiliza **84** como producto de partida¹⁴², consiste en su conversión en un 1,4-cicloergosterol (compuesto **87**, **Esquema 1.1**), y la posterior reducción para obtener el 3 β -hidroxi- Δ^5 derivado (compuesto **75b**, **Esquema 1.1**). Este último se convierte en **83** como se indicó anteriormente.

En síntesis más recientes surgió la posibilidad de usar el esqueleto esteroideal del ácido hidioxicólico (**88**) que por poseer una configuración A/B *cis*, requirió de una oxidación con CCP y una posterior isomerización para obtener el compuesto **79**¹⁴³⁻¹⁴⁵.

1.6.1.2. Dihidroxilación del anillo A y lactonización del anillo B.

La dihidroxilación de las posiciones de C-2 y C-3 del anillo A no representó un problema sintético ya que la reacción de **83** con tetróxido de osmio resulta en la obtención estereoselectiva del 2 α ,3 α -dihidroxis derivado correspondiente (**89**). Las condiciones de reacción sencillas y estequiométricas aplicadas inicialmente^{78,111,122,124,138}, dieron lugar, más tarde, a procedimientos catalíticos con tetróxido de osmio y N-óxido de N-metilmorfolina (NMO)^{100,103-105,112,115,123,127,132,133,134,141} (ver **sección 1.6.3** del presente **Capítulo**, pag. 37). El problema en la dihidroxilación del anillo A surgió cuando el sustrato contenía doble enlace entre C-22 y C-23, ya que la dihidroxilación simultánea de ese doble enlace de la cadena lateral conducía a la obtención mayoritaria del isómero con configuración opuesta a la bioactiva. La solución que se utiliza actualmente para solucionar este problema se discutirá en la **sección 2.2.3** del **Capítulo 2** (pag. 103); por otro lado, los primeros intentos por solucionarlo se basaron en la conversión de **83** en el epóxido **90**, y su posterior transformación en **89** (ver **Esquema 1.1**, pasos p y q).

Finalmente la reacción de Baeyer-Villiger sobre **89**, permite obtener la mezcla de la lactona natural **91** y su isómero **92** biológicamente inactivo¹¹⁹⁻¹⁴⁷.

1.6.1.3. Otras funcionalizaciones.

Para llevar a cabo estudios sobre relaciones estructura-actividad, se sintetizaron gran cantidad de análogos con modificaciones en el anillo A. Entre ellos se obtuvieron compuestos con un grupo 3-ceto (**93**), por oxidación de **78** con CCP y 3 α ,4 α -dihidroxis (**95**), por dihidroxilación de un Δ^3 -6-ceto (**94**). Este último se obtuvo como

subproducto de la eliminación en medio básico de **80**, en la síntesis de **83**¹⁰⁵. Además se introdujeron grupos como 2 α ,3 α -epoxi (**90**) y 2 β -metoxi-3 α -hidroxi (**96**)¹¹¹; ó 2 β ,3 α -dihidroxi (**97**)¹¹⁷.

También se lograron modificaciones en la estructura del anillo B entre las que se encuentran la eliminación del grupo ceto (**98**), la lactamización (**99**) y la tiolactamización (**100**)¹¹². También se sintetizaron 6-oxo-7-aza (**101**) y 6-oxo-7-tio (**102**) derivados¹¹⁴ además de 7-oxa-brassinosteroides a partir de compuestos con un grupo 7-ceto en su estructura original¹¹⁵. Se obtuvieron, además, BRST con el grupo funcional 2 β ,3 β -dihidroxi (**103**) y con unión A/B *cis* (**104**), a partir de **83**¹¹⁶.

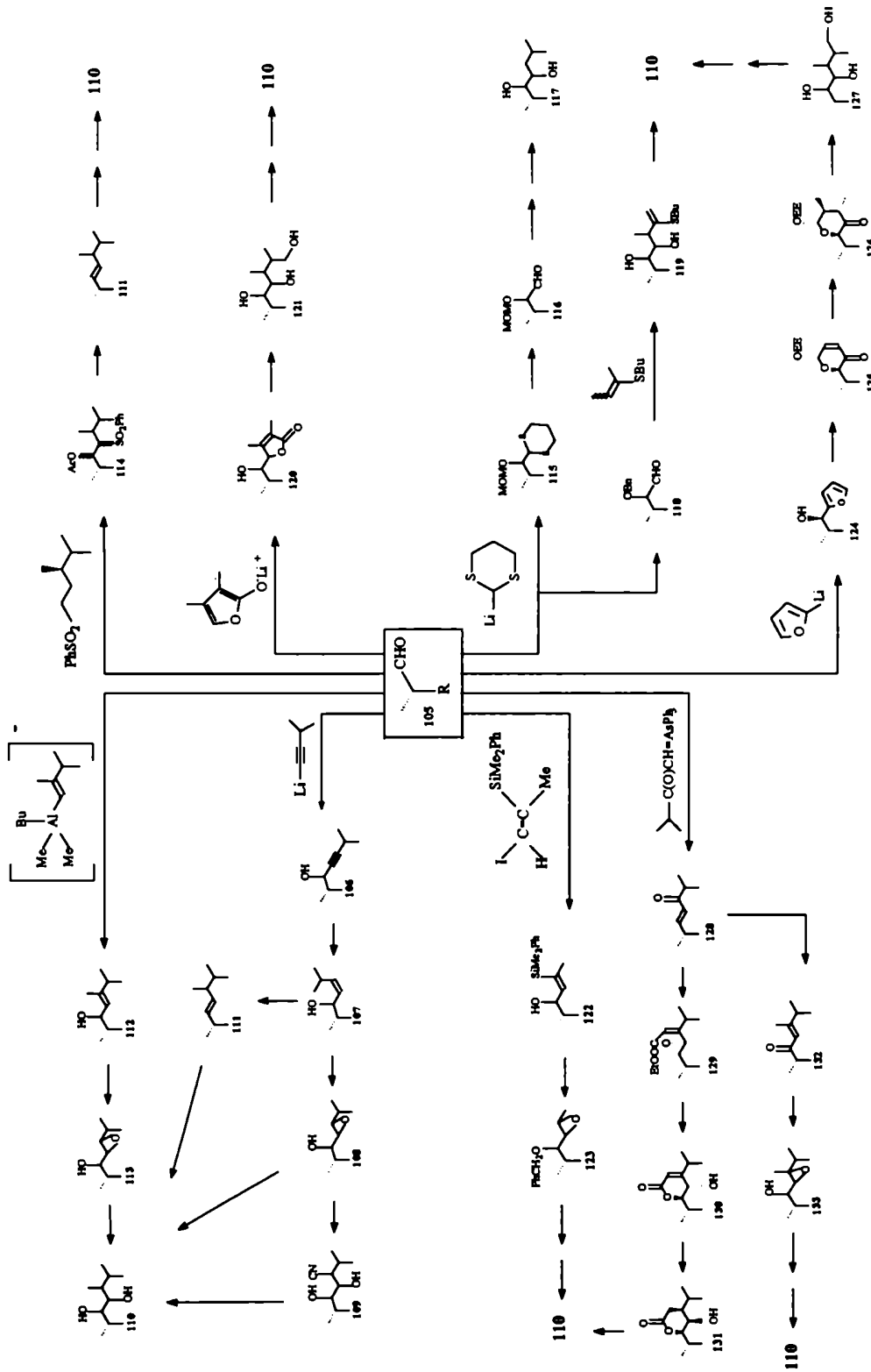
Por último se llevaron a cabo intentos por obtener BRST marcados con tritio y ¹⁴C, con el fin de llevar adelante estudios biosintéticos^{148,149}. Entre otros, se han sintetizado [24,28-³H₂]-brassinólido, [24,28-³H₂]-24-epibrassinólido, [5,7,7-³H₃]-24-epibrassinólido y [4-¹⁴C]-24-epibrassinólido.

1.6.2. CONSTRUCCIÓN DE LA CADENA LATERAL (Esquema 1.2).

En la mayoría de las síntesis de la cadena lateral, se utilizó como producto de partida un compuesto funcionalizado como un aldehído en C-22 (**105**). Este aldehído se obtiene fácilmente a partir del ácido bisnorcolónico¹⁵⁰ o estigmasterol^{125,151-153}. Las estrategias utilizadas a partir de **105** se detallan en el Esquema 1.2.

El 22-aldehído (**105**), adecuadamente funcionalizado en los anillos A y B, se trató con la sal de litio del 3-metil-1-butino^{128,131,139,141}, obteniéndose una mezcla 1:1 de los alcoholes epiméricos. La hidrogenación del isómero 22(R) (**106**), previamente separado, permitió obtener como producto principal el alcohol *cis*-alílico (**107**). La posterior epoxidación con una mezcla de *t*-butilhidroperóxido y acetoacetato de vanadilo (VO(acac)₂) rindió estereoespecíficamente el 22(R),23(R)-epóxido (**108**). Posteriormente, se procedió a la introducción del metilo en C-24; para lo que primero se sintetizó el 24(S)-cianoderivado (**109**), que luego se transformó en el producto metilsustituido^{139,141}, obteniendo la cadena lateral del brassinólido (**110**). Por otro lado, el alcohol *cis*-alílico mencionado (**107**), puede transformarse en presencia de pentametilcuprato de litio (Li₂Cu₂(CH₃)₅)¹⁴³, para dar el compuesto insaturado **111** que puede ser dihidroxilado y convertido en **110** según se discutirá en la sección 1.6.3 del presente Capítulo (pag. 37). Una forma de introducir un grupo metilo directamente, transformando **108** en **110**, es utilizando trimetilaluminio [(CH₃)₃Al] en presencia de *n*-butil litio^{128,131}.

La síntesis de brassinólido (**1**) llevada a cabo por Fung y Sidall¹³⁸, involucró la alquilación estereoselectiva de un 3,5-ciclo-6-metoxi-22-aldehído (**105**) con una sal de litio de un anión organoaluminico que contenía el radical 2,3-dimetil-1-butenilo, fragmento



R: anillos esteroidales adecuadamente funcionalizados omitidos para favorecer una mayor claridad gráfica.

Esquema 1.2. Síntesis de brassinosteroides naturales y no naturales. Construcción de la cadena lateral.

de cadena correspondiente ($\text{Li}[\text{MeBuAlCH}=\text{CMeCHMe}_2]$), para obtener el 22(R) alcohol (112) como producto mayoritario. La epoxidación de 112, para obtener 113, seguida de una reducción anti-Markovnicov con una mezcla de borohidruro de litio y diborano en tetrahidrofurano, permitió obtener por inversión de la configuración del C-24, la cadena del brassinólido (110). Posteriormente se han utilizado otros agentes alquilantes para obtener distintos BRST con distintas cadenas laterales a partir de reactivos organometálicos con los radicales alquílicos correspondientes: 3-metil-1-butenilo ($\text{Me}_2\text{CHC}=\text{CMgBr}$)¹²⁶, 2,3-dimetil-1-butenilo ($\text{Li}^+[\text{Me}_2\text{BuAlCH}=\text{CMeCHMe}_2]^-$)¹²⁹, 2-etil-3-metil-1-butenilo ($\text{Li}^+[\text{Me}_2\text{BuAlCH}=\text{CEtCHMe}_2]^-$)¹³¹ y 2,3,3-trimetil-1-butenilo ($\text{Li}^+[\text{Me}_2\text{BuAlCH}=\text{CMeCMe}_3]^-$)¹²¹.

Otra metodología para obtener la cadena lateral apropiada consistió en la reacción estereoselectiva de la (2R)-(+)-(2,3-dimetil)-pentilfenilsulfona con el 22-aldehído (105)^{112,124}. Una posterior acetilación permitió obtener la mezcla de acetosulfonas (114), que se redujo a la 24(S)- Δ^{22} olefina (111) con amalgama de sodio. La posterior transformación de 111 en 110 se describe en la sección 1.6.3 del presente Capítulo (pag 37).

Otro método muy apropiado resultó ser la reacción del Grignard controlada por quelatos, para introducir estereoselectivamente la función 22(R),23(R)-diol^{104,140,153,154}. De esta forma, a partir de 105 y la sal de litio del 1,3-ditiano se obtuvo el 22(R)-ditiano, cuyo metoximetil éter (115) se trató con una mezcla de óxido mercúrico y trifluoruro de boro para obtener el aldehído 116. La cadena del norbrassinólido (117) se obtuvo por una reacción de Grignard quelato-controlada, entre el compuesto 115 y el bromuro de *iso*-butilmagnesio; seguida de remoción del grupo protector^{140,154}. De igual modo la adición del bromuro de 2-(3-metil-1-butil) magnesio ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{MgBr})\text{CHMe}_2$), permitió la síntesis de dolicólido (4)^{124,153} y dolicosterona (10)¹⁵³. Asimismo se obtuvieron análogos 26,27-bisnorsustituidos en la cadena lateral, por adición de bromuro de *iso*-propilmagnesio¹⁰⁴.

Otra metodología consiste en obtener el butiléter 118, de manera similar a 116, a partir de 105 y la sal de litio del 1,3-ditiano. Así 118 pudo someterse a una reacción del tipo carbonil-eno con un sulfuro vinílico¹⁵⁵, obteniéndose estereoespecíficamente el vinilsulfuro 119. La metilación de este último con un reactivo de Grignard, y posterior reducción catalítica, dio como producto final la cadena del brassinólido (110).

La síntesis desarrollada por Donaubauer y sus colaboradores¹⁵⁶, luego también utilizada por Zhou y colaboradores¹⁴³, involucró la reacción aldólica de 105 con la sal de litio del 2,3-dimetilbutenólido como paso clave. De esta forma, se obtiene el isómero 22(R),23(R)-hidroxibutenólido (120) como producto mayoritario. La hidrogenación, seguida de apertura reductiva de la lactona con hidruro de litio y aluminio, permitió

obtener **121**. La posterior obtención de **110** se logró con una secuencia de eliminación del hidroxilo adicional de C-26. Los mismos autores describieron el uso de 3-isopropil-2-butenólido como alternativa para la construcción de la cadena lateral, en lugar del 2,3-dimetilbutenólido utilizado en el **Esquema 1.2**¹⁵⁶.

Otra ruta estereoselectiva involucró la reacción de la sal de litio del 2-bencildimetilsilil-1-iodo-1-propeno, para dar el alcohol 22(S)-alílico **122**, como producto mayoritario. Una reacción de epoxidación estereodirigida, asistida por el grupo sililo y una posterior eliminación del mismo con fluoruro de n-butilamonio, dio como resultado un epoxialcohol que luego se benzoiló (**123**). La obtención de **110** requirió la alquilación de C-24 con el ciano-di-*iso*-propilcuprato de litio [(*iso*-Pr)₂Cu(CN)Li₂] y posterior desprotección con una mezcla de litio en amoníaco líquido¹⁵⁵.

Una alternativa muy interesante consistió en la construcción, paso a paso, de cada uno de los centros quirales de la cadena^{134,135,157}. La adición de 2-litiofurano al 20-carboxaldehído (**105**), rindió estereoselectivamente el 22(R)-alcohol (**124**). La oxidación del mismo con N-bromosuccinimida y posterior protección con etoxietil éter, permitió obtener el lactol protegido (**125**) como producto mayoritario. Luego, un ataque 1,4 al sistema ceto-enólico anular con metilcuprato de litio, introdujo estereoespecíficamente un metilo en C-25. Posteriormente, se alquiló el C-24, α al carbonilo de la cetona, con ioduro de metilo en di-*iso*-propilamiduro de litio (DAL), para obtener **126**. Seguidamente, se redujo la cetona **126** con borohidruro de sodio obteniéndose selectivamente el 23(R)-alcohol y se desprotegió el alcohol resultante con ácido clorhídrico al 10%. De esta forma, se obtuvo el 27-hidroxiesteroide (**127**) que se convierte fácilmente en **110** eliminando el hidroxilo adicional¹⁴⁷.

Por último, Zhou y sus colaboradores desarrollaron otra interesante estrategia^{143,144} en la cual el 20-carboxaldehído (**105**), se trató con Me₂CHC(O)CH=AsPh₃, un iluro de carbonil arsonio derivado del radical 3-metil-2-oxobutilo, para formar un sistema α,β -insaturado (**128**). El epóxido obtenido a partir de esta enona con agua oxigenada en medio alcalino, se sometió a una reacción de Wittig-Horner, para obtener **129** estereoselectivamente. La lactonización de la misma en condiciones ácidas, permitió obtener como único producto **130**, formado por apertura del epóxido con inversión de la configuración de C-22. Posteriormente, debió invertirse la configuración del 23(S)-hidroxilo de **130**. Para ello se oxidó con CCP, se redujo el doble enlace endocíclico con hidrogenación catalítica y el producto se trató con borohidruro de potasio para obtener la lactona **131** con todos los centros quirales apropiados. Finalmente, se redujo la lactona y eliminó el hidroxilo adicional sobre C-28 para obtener **110**^{143,144}.

Una alternativa a esta metodología, consistió en la conversión de **128** en **132**. Esto se logró mediante la transposición, en un medio oxidante, del alcohol alílico terciario obtenido en C-24, por el tratamiento de **128** con metil litio en una adición 1,2 al carbonilo. Esta cetona β -alquil- α,β -insaturada (**132**), fue el único producto de la transposición¹⁴⁵. Posteriormente se obtuvo **133** por reducción del carbonilo de **132** con diisopropil borohidruro de litio y epoxidación del doble enlace con ácido metacloroperbenzoico. De esta forma, se obtuvo la configuración apropiada de C-22 y C-23 y sólo restó la apertura regio y estereoselectiva del epóxido con inversión de la configuración de C-24, para obtener **110**, tal como se hizo con el compuesto **113**^{138,145}.

Otros investigadores han publicado la síntesis de análogos con un grupo éster en la cadena lateral¹¹⁰, y la síntesis de compuestos marcados con tritio para realizar estudios de biosíntesis y metabolismo¹⁵⁸.

1.6.3. MODIFICACIÓN DE LA CADENA INTACTA DE UN ESTEROIDE

(Esquema 1.3).

Numerosas estrategias sintéticas para obtener la cadena lateral dihidroxilada de los brassinosteroides utilizaron como material de partida esteroides insaturados del tipo $\Delta^{5,22}$ como: 22-dehidrocampesterol (**134**)⁴⁹, brassicasterol (**135**)^{78,137}, estigmasterol (**136**)^{78,105,111-114,116,123,124,128,130-132,135,136,146,159-161}, ergosterol (**137**)^{117,122,133,135,142,162,163}, 22-dehidrocolesterol (**138**)¹⁴⁰ y poriferasterol (**139**)¹⁰⁰ (ver **Figura 1.9**).

En casi todos los casos la introducción del grupo 22(R),23(R)-diol se hizo directamente por reacción con tetróxido de osmio en distintas condiciones, o por epoxidación seguida de apertura. El mayor problema en el diseño de una determinada ruta sintética fue obtener mayoritariamente el isómero biológicamente activo 22(R),23(R). Las diferentes estrategias utilizadas se ilustran en el **Esquema 1.3**.

Se halló que la estereoquímica de la hidroxilación con tetróxido de osmio en piridina o en presencia de N-óxido de N-metilmorfolina (NMO), sobre el doble enlace de la cadena lateral del precursor, resultaba fuertemente dependiente del sustituyente de C-24. Desafortunadamente, la sustitución 24(S)-alquímica, que poseen la mayoría de los esteroides y brassinosteroides naturales, dirige la hidroxilación preferencialmente hacia la obtención del diasterómero biológicamente inactivo (**141**), mientras que el isómero 22(R),23(R) (**142**) se obtiene como producto minoritario^{78,102,111,126,127} y, a veces, ni siquiera se aísla^{113,122,123} (ver **Esquema 1.3**).

La dihidroxilación de las cadenas precursoras 24(R)-alquímicas, dio, en todos los casos, una mezcla de dioles 22(S),23(S) (**143**) y 22(R),23(R) (**144**) en una relación

aproximadamente 1:1^{100,102,122,137,142,162}. En el caso de los 28-norbrassinólidos derivados del 22-dehidrocolesterol (138) los resultados fueron muy variados obteniéndose mezclas de isómeros 22(S),23(S) (145) y 22(R),23(R) (146) que van desde 3:7¹⁰², hasta las muy desfavorables 5:2¹⁴⁰ (ver Esquema 1.3).

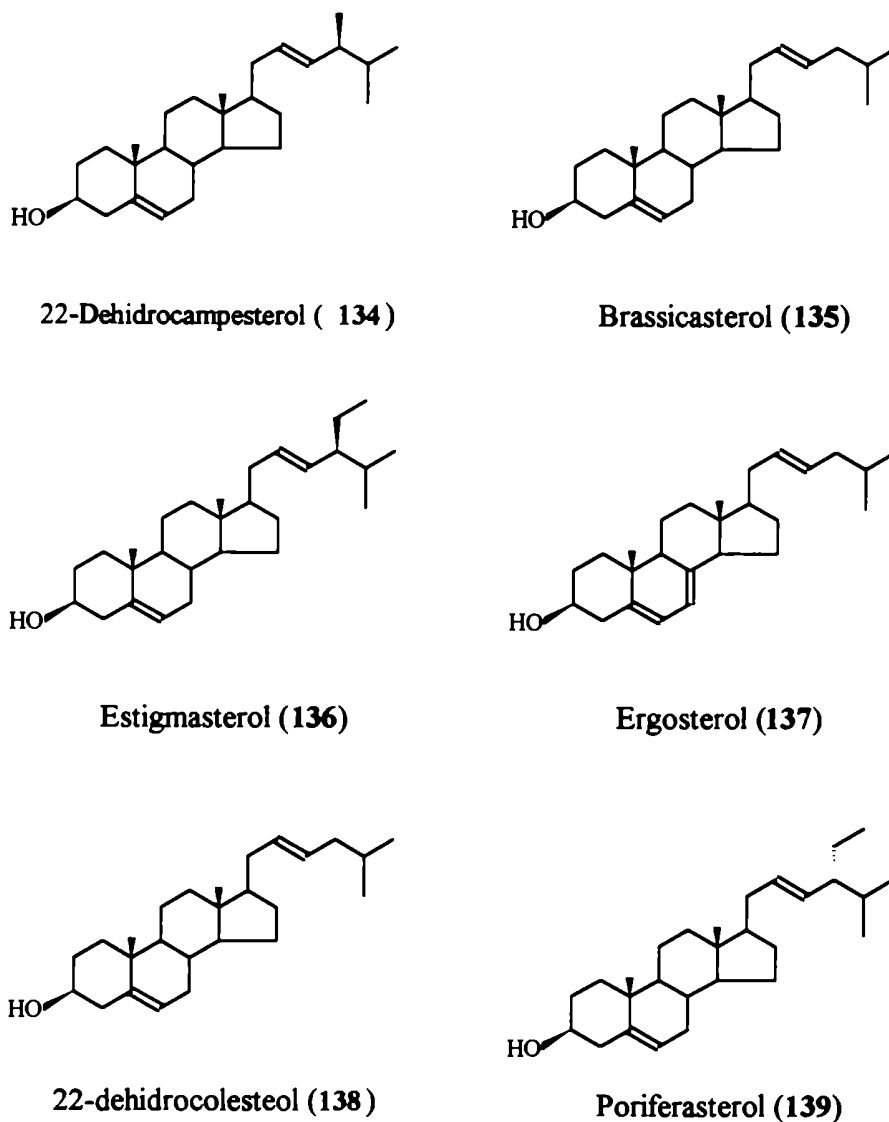
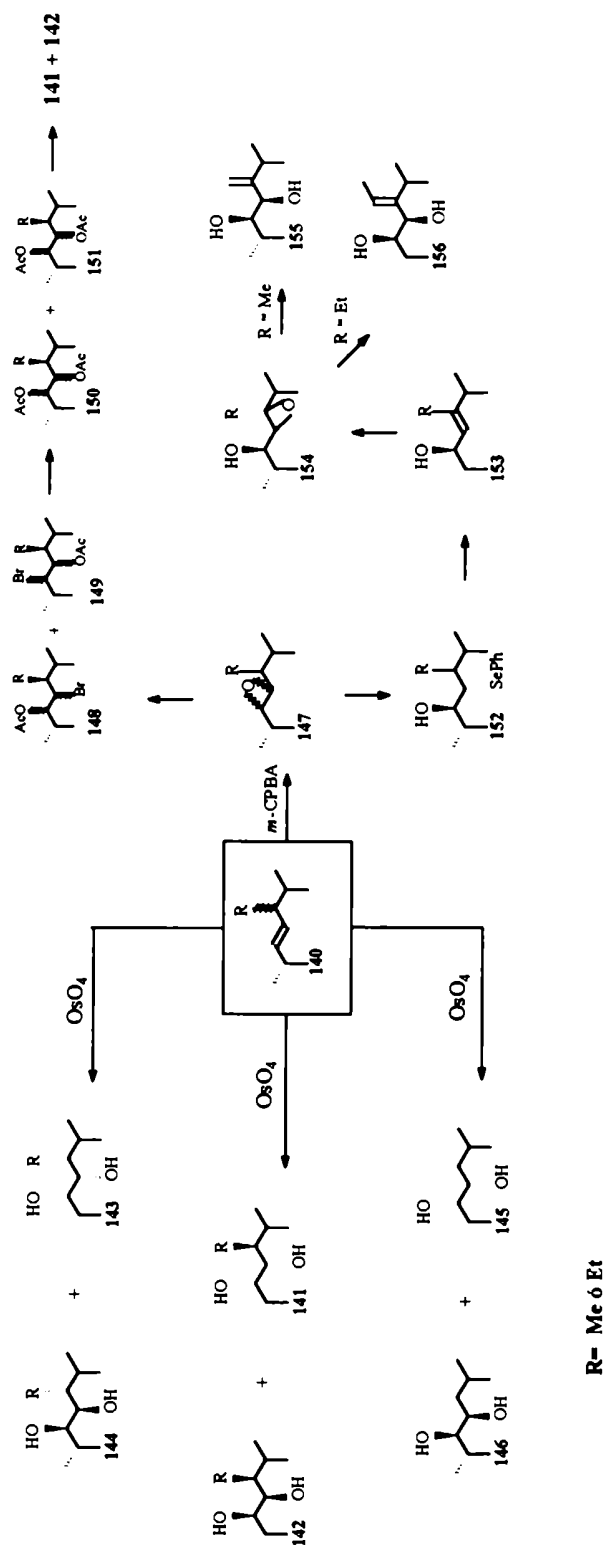


Figura 1.9. Esteroides utilizados comúnmente como producto de partida en la síntesis de brassinosteroides.

Debido a la estereoselectividad desfavorable de la dihidroxilación con osmio, se intentaron rutas alternativas para la obtención del diol 22(R),23(R) en la cadena lateral. Una de ellas consistió en obtener la mezcla de epóxidos (147) por el tratamiento del intermediario 140 con ácido metacloroperbenzoico. La apertura del epóxido con ácido



Esquema 1.3. Síntesis de brassinosteroides naturales y no naturales. Modificación de la cadena lateral.

bromhídrico y posterior acetilación sirve para obtener la mezcla de bromoacetatos **148** y **149**. Posteriormente, por medio de una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (SN_2), se reemplazaron los bromos obteniéndose la mezcla de diacetilos epiméricos **150** y **151** fácilmente separables. Estos finalmente se saponificaron para obtener **141** y **142**^{105,124,125,127,132,154,160}.

Otra opción fue llevar a cabo la apertura de la mezcla estereoisomérica de epóxidos (**147**) con fenilseleniuro en presencia de borohidruro de sodio, para obtener **152**, el cual se transformó con agua oxigenada al 30% en el alcohol alílico (**153**). La epoxidación con ácido metacloroperbenzoico para obtener **154** y el posterior reordenamiento catalizado con isopropóxido de aluminio, permitió obtener, dependiendo del sustituyente alquílico de C-24, el metiléndiol **155** o el etiléndiol **156** en la cadena lateral^{129-131,133,159,161} (ver **Esquema 1.3**).

El bajo rendimiento en la obtención del diol 22(R),23(R) por cualquiera de los métodos descritos, se superó al desarrollarse la dihidroxilación catalítica asimétrica (DCA). Esta técnica utiliza ciertos derivados de la quinidina y la dihidroquinidina como inductores quirales de la reacción con tetróxido de osmio, lográndose la obtención mayoritaria del epímero 22(R),23(R) con valores de hasta 10:1 con respecto al isómero 22(S),23(S)^{136,146}, dependiendo de la configuración del sustituyente de C-24. Esta variante sintética se discutirá en detalle en la **sección 2.2.3 del Capítulo 2** (pag. 103).

1.7. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO.

Con la idea de dilucidar el mecanismo biosintético de los brassinosteroides, se han llevado a cabo varios estudios. El hecho de haber detectado brassinosteroides con un sustituyente 24-alquílico, similar al de los fitosteroles presentes en la misma planta, sugiere que estos últimos podrían ser considerados como precursores biogénicos apropiados¹⁰⁷. Tal situación se verifica en los siguientes ejemplos:

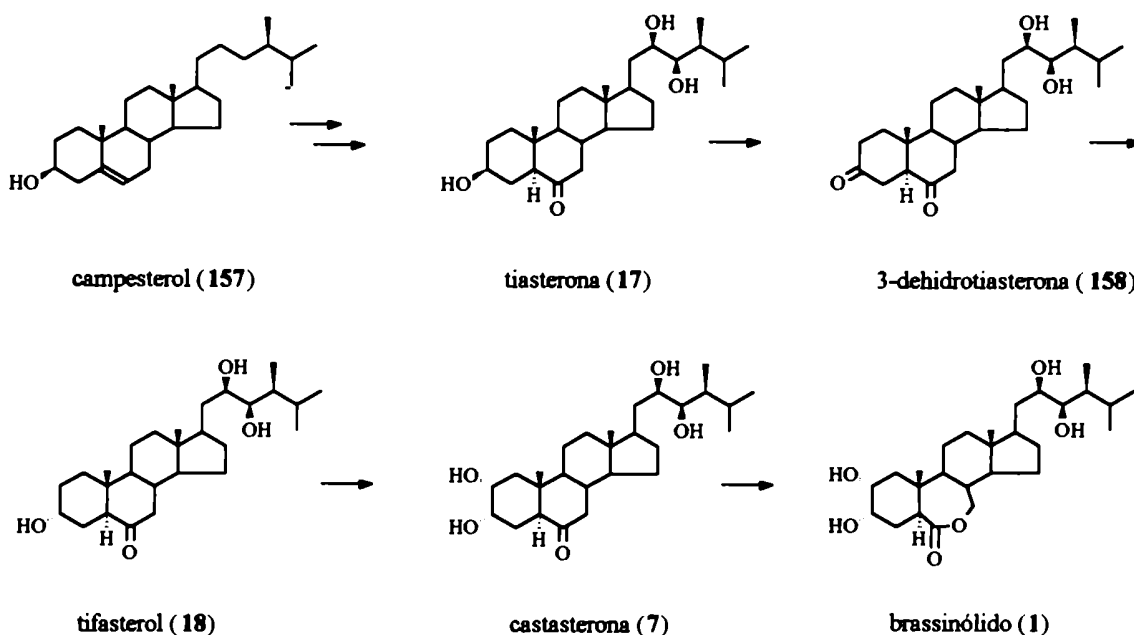
1- En semillas de poroto, se aisló la 25-metildolicosterona^{3,45,46} y, en menor proporción, otros ocho derivados de la misma. También se detectó el 24-metilén-25-metilcolesterol, el fitosterol estructuralmente relacionado a la 25-metildolicosterona¹⁶⁴. Sin embargo, a pesar de que el 88% de los fitosteroles presentes en *Phaseolus vulgaris* poseían un grupo 24-etilo (stigmasterol y sitosterol) ó un grupo 24-etileno (isofucoesterol), los brassinosteroides estructuralmente relacionados sólo se encontraron en baja proporción. Esto sugería que, en estas semillas, la transformación de los fitosteroles

en BRST era más selectiva para aquellos que llevaban un grupo 24-metilo ó 24-metileno, que para los que contaban con uno 24-etilo ó 24-etileno.

2- En el alga verde *Hydrodictyon reticulatum* fueron identificados brassicasterol y sitosterol; y 24-epicastasterona (8) y 28-homocastasterona (12), es decir, los fitosteroles y sus brassinosteroides estructuralmente relacionados⁵⁹.

Estos hechos estan de acuerdo con la hipótesis que los BRST tendrían en los fitosteroles sus precursores biosintéticos, pero hasta el momento no ha podido comprobarse fehacientemente.

Yokota y un grupo de sus colaboradores han propuesto una hipotética ruta biosintética en *Catharansus roseus*, que se ilustra en el Esquema 1.4, para brassinólido (1), partiendo de campesterol o sus análogos¹⁶⁵.



Esquema 1.4. Ruta biosintética propuesta para el brassinólido (1).

Inicialmente, se producirían varias reacciones de oxidación del campesterol (157) para obtener la tiasterona (17), que luego se epimerizaría en el C-3 (vía 158) para dar el tifasterol (18). La subsiguiente hidroxilación de C-2 y reacción de lactonización permitirían obtener brassinólido (1), vía castasterona (7). Existe otra evidencia de que la 3-dehidrotiasterona (158) sería intermediario en la epimerización de tiasterona en tifasterol demostrada en células de *Catharansus roseus* donde se usaron tiasterona (17)¹⁶⁶,

tifasterol (18)^{166,167} y castasterona (7)¹⁶⁸ marcados con tritio o deuterio y se determinó la secuencia 17→18→7→1 (Esquema 1.4). Además, se observó la conversión reversible entre tiasterona (17) y tifasterol (18)¹⁶⁶. Sin embargo, en cortes de garbanzo¹⁶⁵, semillas y explantes de hojas etioladas de arroz^{165,169}, en los cuales la castasterona es endógena⁵³, no se halló indicio de conversión de castasterona (7) en brassinólido (1). Esto corroboraría, además, que la castasterona es por sí misma activa¹⁶⁹.

Por otro lado, llevando a cabo experimentos con 3-dehidrotiasterona (158) tritiada en células cultivadas de *Catharansus roseus* se halló evidencia de su posible papel de intermediario en la conversión biosintética de tiasterona (17) en tifasterol (18)¹⁷⁰. Otras posibles evidencias consisten en la coexistencia de tifasterol (17), tiasterona (18) y 3-dehidrotiasterona (158) en granos de trigo¹⁷¹ (*Triticum aestivum*) y en cultivos de células de lirio¹⁷² (*Distilium racemosum*).

Con respecto a la investigación sobre el catabolismo de los BRST, los estudios publicados son pocos, y los resultados son poco claros. Algunos estudios indican la conjugación por conversión de los brassinosteroides en sus 23 o 25-β-D-glucopiranosido^{173,174}. Estas experiencias se realizaron sobre *Vigna radiata*, *Lycopersicon esculentum* y *Phaseolus vulgaris*. Otros estudios, realizados en arroz y *Lycopersicon esculentum*, señalan la conversión en catabolitos no glicosídicos solubles en agua¹⁶³.

Muy recientemente se hallaron una nueva clase de BRST conjugados con monoglicéridos en semillas de *Cassia tora*⁷³: el monopalmitato y monooleinato de brassinólido (1), castasterona (7), tiasterona (17), tifasterol (18) y 28-norcastasterona (11). Además, se halló el 3-miristato de tiasterona en anteras de *Lilium longiflorum*⁶⁷.

A pesar de todo el esfuerzo realizado al respecto hasta el momento quedan por contestar dos preguntas:

- 1- ¿Por qué los BRST se transforman en diferentes tipos de compuestos, conjugados o no, dependiendo de las semillas en cuestión?
- 2- ¿Estos compuestos conjugados son realmente catabolitos o son parte de distintos mecanismos de transporte y almacenamiento?

Finalmente, el primer estudio donde se observó degradación catabólica de la cadena lateral, se hizo en una suspensión de células de *Ornithopus sativus*. Allí se observó la transformación de la 24-epicastasterona (8) y el 24-epibrassinólido (2) en sus 20-cetopregnan derivados epimerizados en C-3¹⁷⁵.

1.8. EFECTOS DE BRASSINOSTEROIDES A NIVEL MOLECULAR.

Desde el descubrimiento y elucidación estructural del brassinólido (1)¹, comenzó un gran interés por su síntesis y la de sus análogos, y la evaluación de sus actividad fisiológica¹⁰⁰⁻¹⁰⁶. Los estudios tendientes a dilucidar el mecanismo de acción a nivel molecular demoraron en publicarse debido a la necesidad de contar con compuestos marcados.

El hecho de observar los efectos de los BRST a nivel fisiológico y de compararlos con los de las otras hormonas vegetales, conducía a cuestionarse lo siguiente:

- 1- ¿Son realmente un nuevo grupo de hormonas ?
- 2- ¿Difiere su modo de acción del de las otras hormonas?
- 3- ¿Cuál es su mecanismo de acción a nivel molecular?

Algunas de estas preguntas han sido recientemente contestadas y las respuestas nos han ayudado a comprender mejor cómo los BRST regulan el crecimiento, confirmándonos que su modo de acción difiere del de las hormonas reguladoras del crecimiento vegetal ya conocidas.

Desde el punto de vista estructural se ha especulado con que los BRST actúan a través de un mecanismo similar al de las hormonas esteroidales animales, vía un complejo receptor/ligando que, unido a un sitio citoplasmático o nuclear, regula la expresión de genes específicos¹¹⁸.

El crecimiento de tejidos depende de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, esenciales para el continuo crecimiento de las células de la planta¹⁷⁶. Por otro lado, la actividad de la ARN polimerasa se ve aumentada en plantas tratadas con auxinas, giberelinas y citokininas; y más aún, la aplicación de estas dos últimos aumenta el contenido de ARN^{177,178}. También se detectó aumento selectivo de la actividad de peroxidasa, polifenol oxidasa y ATPasa en plantas de garbanzos tratadas con brassinólido¹⁷⁹. Además fue detectado un aumento de la actividad ARN y ADN polimerasa y de los niveles de ARN, ADN y proteínas en poroto pinto y garbanzo tratados con brassinólido¹⁸⁰. Este comportamiento no se repitió en presencia de inhibidores selectivos de la síntesis de ARN y proteínas, afectando la división y elongación celular de los tejidos¹⁸¹.

Kalinich y un grupo de sus colaboradores^{176,182} postularon la existencia de un receptor citoplasmático que luego se encargaría del transporte al núcleo para provocar un efecto sobre la transcripción o la replicación; pero estudios de inmunocitoquímica sobre

polen germinado de *Brassica napus* mostraron alto nivel de marca en el núcleo, lo que sugeriría que existe unión específica de BRST a los componentes nucleares¹⁷⁷.

Clouse y colaboradores han trabajado con dos sistemas modelo para estudiar el efecto de BRST en la expresión de genes de plantas: elongación de tallo y raíz de *Arabidopsis thaliana*⁶, y elongación de tallo de soja^{183,184}. En ambos sistemas los BRST afectan el patrón de expresión de genes en elongación de tejidos, aumentando la abundancia de algunos ARN mensajeros y decreciendo otros.

1.9. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE BRASSINOSTEROIDES.

Aunque alguno de los efectos fisiológicos de los BRST son similares a los de otras hormonas como auxinas, giberelinas y etileno, existen evidencias que indican importantes diferencias en el modo de acción.

La actividad estimuladora de elongación producida por los BRST, es uno de los efectos fisiológicos más estudiados. Este efecto se ha observado en rábano⁸⁴, tomate⁸⁴, hipocótilos de girasol y pepino⁹, guisante enano y normal⁹, garbanzo⁸, epicótilos de poroto Azuki y mesocótilos de maíz⁸³, pedúnculo de *Aradopsis*⁵ y coleótilos de trigo⁶. Trabajando con *Brassica chinensis*, se demostró que el 22(S),23(S)-24-epibrassinólido (45) estimula la elongación de hipocótilos por incremento de la relajación de la pared; pero, contrariamente a lo que ocurría con las auxinas, sin inducir un gran cambio en sus propiedades mecánicas¹⁸⁵. Sin embargo, al producirse un estímulo de elongación similar en soja por aplicación de brassinólido (1), sí se detectó cambio en las propiedades mecánicas de la pared. Hasta el momento se desconoce el mecanismo de elongación producido por brassinosteroides, pero se sabe que no procede vía el camino de transducción de auxinas¹⁸⁶.

Un parámetro fisiológico que se asocia con la elongación celular es la secreción de ácidos. Algunos BRST han mostrado un efecto estimulador de la secreción de H⁺ e hiperpolarización de plasmalema de diferentes tejidos de plantas como raíz de trigo¹⁸⁷, epicótilos de poroto Azuki¹⁸⁸, cotiledones de rábano¹⁸⁹, y hojas de *Egeria densa*^{190,191} y *Vicia fava*¹⁹⁰. Este efecto fue totalmente suprimido por inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas. Sin embargo, se demostró también que tres fitosteroles totalmente inefectivos en la estimulación de la elongación de raíces de trigo, como el estigmasterol, ergosterol y colesterol, también estimularon la secreción de H⁺¹⁸⁷ poniendo en duda la correlación entre este efecto y el crecimiento. Además, por el agregado de eritrosina B, un inhibidor de ATPasa de membrana plasmática, se ha detectado una fuerte reducción de la extrusión

de H⁺ inducida por BRST en hojas de *Vicia faba*. Esto indicaría que los BRST influyen en la bomba de protones dependiente de ATP¹⁹¹.

Los BRST son capaces también de modificar los procesos de desarrollo de raíces a bajas concentraciones. Para investigar tales efectos se han utilizado sistemas tales como cortes de raíces adventicias, raíces intactas de plántulas, segmentos de raíz escindida y escisiones de raíces de cultivos. Los resultados obtenidos fueron contradictorios en algunos casos y han sido recientemente resumidos por Roddick y colaboradores¹⁹². En algunos casos se observó estimulación del crecimiento de las raíces luego del tratamiento con BRST, pero la mayoría de las veces el efecto fue inhibitorio. Recientemente, se ha comprobado un incremento en cortes de raíces adventicias de plantas maduras de abeto Norway¹⁹³, lo cual sugeriría que los BRST pueden actuar como un agente anti-estres mejorando la capacidad de los cortes para resistir el estres causado por el trasplante. De la misma forma se ha encontrado regeneración de raíces en plántulas de *Pinus radiata* luego del trasplante¹⁹⁴.

Otros estudios indicarían también la posibilidad de aplicar BRST para ayudar a los cultivos a sobreponerse a otras condiciones de estrés. Así, por ejemplo, el efecto del 22(S),23(S)-24-epibrassinólido en el incremento del rendimiento de las cosechas de cebada, poroto y lechuga fue más notorio en suelos deficientes en fertilizantes que en aquellos que lo poseían¹⁹⁵. De la misma forma, la aplicación del 22(S),23(S)-24-epibrassinólido (45) a garbanzo de la india (*Cicer arietinum*), aumenta significativamente la resistencia bajo estrés producido por agua¹⁹⁶. De la misma forma, el 22(S),23(S)-24-homoetilbrassinólido (46) contrarresta el efecto del cloruro de sodio en plantas de remolacha azucarera¹⁹⁷, y de cloruro de sodio y herbicidas en arroz aún a bajas temperaturas¹⁹⁸. Se informó además, que el brassinólido mejora la resistencia al frío de arroz, pepino y maíz^{186,199}. Por otro lado, el 24-epibrassinólido (2) y el 22(S),23(S)-24-homoetilbrassinólido (46) protegen las células de las hojas de trigo del estrés salino y por calor²⁰⁰.

1.10. APLICACIONES DE BRASSINOSTEROIDES EN LA AGRICULTURA.

Con la intención de estudiar las posibles aplicaciones prácticas de los BRST, teniendo en cuenta sus prometedores efectos sobre las cosechas, se han llevado a cabo un sinnúmero de investigaciones^{15,201}. La mayoría de los estudios fueron hechos en invernaderos o en superficies limitadas de campo. Ikekawa ha conducido experiencias a

gran escala en China por aplicación de 24-epibrassinólido (2) obteniendo un significativo aumento del rendimiento de las cosechas de trigo, maíz, tabaco y otras plantas¹⁵.

Cabe decir en este punto, que los bioensayos llevados a cabo en laboratorio, para medir bioactividad de BRST (ver sección 1.4.1. del presente Capítulo, Pag. 14), no pueden extrapolarse directamente a su capacidad de estimulación del crecimiento de plantas cuando se aplican en campo. En algunos casos la respuesta encontrada en invernadero y/o campo no se corresponde con la hallada en los bioensayos. Esto ocurre porque el tiempo insumido para llevar a cabo un bioensayo podría no ser el suficiente como para obtener el máximo efecto, mientras que en campo ocurre lo contrario. Por ejemplo, se encontró que la 22(R),23(R),2 α ,3 α -isopropiléndioxi-22,23-epoxi-7-oxa-B-homo-5 α -stigmastán-6-ona no mostró actividad en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz; y sin embargo, aplicada en condiciones de campo se obtenía, un incremento en el rendimiento de las cosechas comparable al del brassinólido (1)²⁰². Otro ejemplo similar al expuesto es el caso del 22(S),23(S)-24-homoetilbrassinólido (46)^{192,197}.

Se sospecha que el mayor problema que afecta la reproducibilidad de los ensayos en campo es la falta de un método seguro y estandarizado para la aplicación de los BRST. Suele hacerse, por ejemplo, por una sola aplicación en forma de *spray* sobre las plántulas; ó, varias veces en distintos estadios del crecimiento (hojas, flores o tallo); o, por inmersión de las semillas en una solución de BRST antes de plantarlas. Sin embargo, la única explicación a la variabilidad de respuestas encontradas en algunos ensayos en campo podría ser la pobre absorción detectada en la planta, ya que su estructura no facilita la penetración. Evidentemente, es necesario continuar en el estudio de las condiciones óptimas de aplicación de BRST.

Una importante propiedad de los BRST, que aumenta aún más el interés en ellos, es la capacidad como factor anti-estrés. Se han encontrado resultados alentadores en condiciones climáticas desfavorables como sequía¹⁹⁶, temperaturas extremas (frío y calor)^{8,199,200}, salinidad²⁰⁰ y presencia de herbicidas¹⁹⁸. En todos los casos estudiados los efectos de los BRST son más notorios en suelos sin fertilizar que en aquellos que lo están¹⁹⁵.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, aún quedan por investigar varios parámetros tales como formulación, tiempo y método de aplicación, para utilizar en forma óptima la capacidad fitohormonal de los BRST.

1.11. BIBLIOGRAFIA.

- 1- M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. B. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen, G. L. Steffens, J. L. Flippen-Anderson, J. C. Cook; *Nature*, **281**, 216 (1979).
- 2- G. Adam, V. Marquardt; *Phytochemistry*, **25**, 1787 (1986).
- 3- a. S. Kim; Natural occurrence of brassinosteroids, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991. b. A. Sakurai, S. Fujioka; *Plant Growth Regulation*, **13**, 147 (1993).
- 4- J. M. Sasse; The case for brassinosteroids as endogenous plant hormones, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 5- S. D. Clouse, A. F. Hall, M. Langford, T. C. McMorris, M. E. Baker; *J. Plant Growth Regul.*, **12**, 61 (1993).
- 6- K. Wada, H. Kondo, S. Marumo; *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2249 (1985).
- 7- M. Katsumi; Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 8- L. E. Gregory, N. B. Mandava; *Physiol. Plant.*, **54**, 239 (1982).
- 9- N. B. Mandava, J. M. Sasse, J. H. Yopp; *Physiol. Plant.*, **53**, 453 (1981).
- 10- K. Wada, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita, K. Nakamura, M. Uchiyama, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 719 (1984).
- 11- C. D. Schlagnhauser, R. N. Arteca; *Plant. Physiol.*, **78**, 300 (1986).
- 12- R. N. Arteca, D. Tsai, N. B. Mandava; *J. Plant. Physiol.*, **139**, 52 (1991).
- 13- a. D. W. Russel; *Science*, **272**, 370 (1996). b. J. Li, P. Nagpal, V. Vitart, T. C. McMorris, J. Chory; *Science*, **272**, 398 (1996).
- 14- H. G. Clutter, T. Yokota, G. Adam; **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 15- N. Ikekawa, Y. Zhao; Applications of 24-epibrassinolide in agriculture, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 16- V. Marquardt, G. Adam; Recent advances in brassinosteroid research, in **Chemistry of plant protection 7. Herbicide resistance-brassinosteroids, gibberellins, plant growth regulators**. W. Ebing Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1991.
- 17- J. W. Mitchell, M. R. Whitehead; *Bot. Gaz.*, **102**, 770 (1941).

- 18- J. W. Mitchell, D. P. Sliaggs, W. P. Anderson; *Science*, **114**, 159 (1951).
- 19- J. W. Mitchell, G. A. Livingston; **Methods of studying plant hormones and growth regulating substances**. US Dept. Agric., Agric. Handb. N° 336. Washington D.C., GPO. 1968.
- 20- J. W. Mitchell, N. Mandava, J. F. Worley, J. R. Plimmer, M. V. Smith; *Nature*, **225**, 1065 (1970).
- 21- J. W. Mitchell, N. Mandava, J. F. Worley, M. E. Drowne; *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 391 (1971).
- 22- N. Mandava, J. W. Mitchell; *Indian Agric.*, **15**, 19 (1971).
- 23- J. F. Worley, J. W. Mitchell; *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **96**, 270 (1971).
- 24- J. W. Mitchell, L. E. Gregory; *Nature-New Biol.*, **239**, 253 (1971).
- 25- B. W. Milborrow, R. J. Pryce; *Nature*, **243**, 46 (1973).
- 26- S. Marumo, H. Hotori, H. Abe, y. Nonoyama, K. Munakata; *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 528 (1968).
- 27- E. Maeda; *Physiol. Plant*, **18**, 813 (1965).
- 28- N. Ikekawa, S. Takatsuto, T. Kitsuma, H. Saito, T. Morishita, H. Abe; *J. Chromatography*, **290**, 289 (1984).
- 29- H. Abe, S. Marumo; Brassinosteroids in leaves of *Distylium racemosum Sieb. et Zucc.*: The beginning of brassinosteroid research in Japan, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 30- T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi; *Tetrahedron Lett.*, **23**, 1275 (1982).
- 31- T. Yokota, J. Baba, N. Takahashi. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4965 (1982).
- 32- J. Baba, T. Yokota, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 659 (1983).
- 33- T. Yokota, J. Baba, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1409 (1983).
- 34- T. Yokota, J. Baba, S. Koba, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2529 (1984).
- 35- S. Takatsuto, B. Ying, M. Morisaki, N. Ikekawa. *J. Chromatography*, **239**, 233 (1982).
- 36- H. Abe, M. Morishita, M. Uchiyama, S. Marumo, K. Minakata, S. takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2609 (1982).
- 37- M. Ikeda, S. takatsuto, T. Sassa, M. Ikekawa, M. Nukima. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 655 (1983).
- 38- H.Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Ikeda, T. Sassa, T. Kutsima, S. Marumo. *Experientia*, **39**, 351 (1983).
- 39- M. Arima, T. Yokota, N. Takahashi. *Phytochemistry*, **23**, 1587 (1984).

- 40- T. Morishita, H. Abe, M. Uchiyama, S. Marumo, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Phytochemistry*, **22**, 1051 (1983).
- 41- H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2171 (1984).
- 42- K.-H. Park, T. Yokota, A. sakura, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3081 (1987).
- 43- N. Ikekawa, F. Nishiyama, Y. Fujimoto. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 405 (1988).
- 44- R. D. Plattner, S. L. Taylor, M. D. Grove. *J. Nat. Prod.*, **49**, 540 (1986).
- 45- T. Yokota, M. Morita, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2149 (1983).
- 46- T. Yokota, S. Koba, S.-K. Kim, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Sakakibara, K. Okada, K. Mori, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1625 (1987).
- 47- S. -K. Kim. In **Study of Bio-Organic Chemistry of Naturally-Occurring Brassinosteroids** (en japonés). Ph. D Thesis, the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. 1988.
- 48- T. Yokota, S.-K. Kim, N. Takahashi. In *13th Int. Conf. on Plant Growth Substances*. Abstr. N° 168, Calgary, Canada. 1988.
- 49- S.-K. Kim, T. Yokota, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2303 (1987).
- 50- T. Yokota, S.-K. Kim, Y. Kosaka, Y. Ogino, N. Takahashi. In **Conjugate Plant Hormone, Structure, Metabolism and Function**. K. Schreiber; H. E. Schutte; G. Sembder, Eds. VEG Deucher Verlag der Wissenchaffen. Pgs. 286-296. 1987.
- 51- S.-K. Kim, T. Yokota, Y. Ogino, N. Takahashi. In *13th Int. Conf. on Plant Growth Substances*. Abstr. N° 401, Calgary, Canada. 1988.
- 52- J. A. Schneider, K. Yoshihara, K. Nakanishi, N. Kato. *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3859 (1983).
- 53- H. Abe, K. Nakamura, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1103 (1984).
- 54- Y. Susuki, I. Yamaguchi, T. Yokota, N. Yakahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3133 (1986).
- 55- H. Abe.; Rice-lamina inclination, endogenous level in plant tissues and accumulation during polen development of brassinosteroids, in **Brassinosteroids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS Washinton DC. 1991.
- 56- T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi, S. Yakatsuto, N. Ikekawa, T. Takematsu. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2419 (1983).
- 57- T. Yokota, M. Amina, N. Takahashi, A. Crozier. *Phytochemistry*, **24**, 1333 (1985).
- 58- S.-K. Kim, H. Abe, C. H. A. Little, R. P. Pharis. *Plant Physiol.*, **94**, 1709 (1990).
- 59- T. Yokota, S. -K. Kim, Y Fukui, N. Yakahashi, Y. Takeuchi, T. Takematsu; *Phytochemistry*, **26**, 503 (1987).

- 60- S. Takatsuto, H. Abe, K. Gamoh. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1057 (1990).
- 61- J. Schmidt, T. Yokota, G. Adam, N. Takahashi. *Phytochemistry*, **30**, 364 (1991).
- 62- K. H. Park, H. Saimoto, S. Nakagawa, A. Sakurai, T. Yokota, N. Takahashi, K. Syōno. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 805 (1989).
- 63- Y. Susuki, I. Yamaguchi, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 49 (1985).
- 64- S. Takatsuto, T. Yokota, K. Omote, K. Gamoh, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2177 (1989).
- 65- S. Takatsuto, K. Omote, K. Gamoh, M. Ishibashi. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 757 (1990).
- 66- N. Ikekawa, S. Takatsuto, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita. *Proc. Jpn. Acad.*, **59**, 9 (1983).
- 67- S. Asakawa, H. Abe, Y. Kyokawa, S. nakamura, M Natsume; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 219 (1994).
- 68- H. Susuki, S. Fujioka, T. Yokota, N. Murofushi, A. Sakurai; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 2075 (1994).
- 69- P. E. Taylor, K. Spuck, P. M. Smith, J. M. Sasse, T. Yokota, P. G. Griffiths, D. W. Cameron; *Planta*, **189**, 91 (1993).
- 70- J. Smidth, B. Splenger, T. Yokota, G. Adam; *Phytochemistry*, **32**, 1614 (1993).
- 71- J. Smidth, T. Yokota, B. Splenger, G. Adam; *Phytochemistry*, **34**, 391 (1993).
- 72- J. Smidth, C. Kuhnty, G. Adam; *Phytochemistry*, **36**, 175 (1994).
- 73- K. H. Park, J. D. Park, K. H. Hyun, M. Nasayama, T. Yokota; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 1343 (1994).
- 74- C. Motegi, S. Takatsuto, K. Gamoh; *J. Chromatography*, **658**, 27 (1994).
- 75- H. Abe, S. Takatsuto, M. Nakayama, T. Yokota; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 176 (1995).
- 76- N. B. Mandava; *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **39**, 23 (1988).
- 77- W. J. Meudt, H. W. Bennet; *Physiol. Plant.*; **44**, 422 (1978).
- 78- M. J. Thompson, N. B. Mandava, W. J. Meudt, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **38**, 567 (1981).
- 79- W. J. Meudt; Chemical and biological aspect of brassinolide, in **Ecology and Metabolism of Plant Lipids**. ACS Symposium Series N° 325. ACS, Washinton DC. 1987.
- 80- M. Strnad, M. Kaminek; *Biol. Plant.*, **27**, 209 (1985).
- 81- G. L. Steffens; U. S. Departament of agriculture Brassins project: 1970-1980, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.

- 82- L. Kohout, M. Strnad, M. Kaminek; Types of brassinosteroids and their bioassays, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 83- J. H. Yopp, N. B. Mandava, J. M. Sasse; *Physiol. Plant.*, **53**, 445 (1981).
- 84- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Takematsu, Y. Takeuchi, M. Koguchi; *Phytochemistry*, **22**, 2437 (1983).
- 85- K. Wada, S. Marumo, N. Ikekawa, M. Morisaki, K. Mori; *Plant Cell Physiol.*, **22**, 323 (1981).
- 86- K. Takeno, R. P. Pharis; *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1275 (1982).
- 87- N. Ikekawa; *Trends in Analitical Chemistry*, **9**, 337 (1990).
- 88- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3435 (1986).
- 89- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4045 (1986).
- 90- N. Ikekawa, S. Takatsuto; *Mass Spectrosc.*, **32**, 55 (1984).
- 91- J. Baba, T. Yokota, N. Takahashi; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 659 (1983).
- 92- K. Gamoh, T. Kitsuya, S. Takatsuto, Y. Fujimoto, N. Ikekawa; *Anal. Sci.*, **4**, 533 (1988).
- 93- K. Gamoh, K. Omote, N. Okamoto, S. Takatsuto; *J. Chromatography*, **469**, 424 (1989).
- 94- K. Gamoh, S. Takatsuto; *Anal. Chim. Acta*, **222**, 201 (1989).
- 95- K. Gamoh, N. Okamoto, S. Takatsuto, I. Tejima; *Anal. Chim. Acta*, **228**, 101 (1990).
- 96- K. Gamoh, H. Sawamoto, S. Takatsuto, Y. Watanabe, H. Arimoto; *J. Chromatography*, **515**, 227 (1990).
- 97- P. A. Horgan, C. H. Nakagowa, R. T. Irwin; *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 715 (1984).
- 98- T. Yokota, S. Watanabe, Y. Ogino, I. Yamaguchi, N. Takahashi; *J. Plant. Growth Regul.*, **9**, 151 (1990).
- 99- G. M. Caballero, O. M. Teme Centurión, L. R. Galagovsky, E. G. Gros; *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, **8**, 270 (1997).
- 100- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe; *Phytochemistry*, **22**, 1393 (1983).
- 101- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Takematsu, Y. Takeuchi, M. Koguchi; *Phytochemistry*, **22**, 2437 (1983).
- 102- M. J. Thompson, W. J. Meudt, N. B. Mandava, S. R. Dutky, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **39**, 89 (1982).
- 103- M. Kondo, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 97 (1983).
- 104- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa; *Phytochemistry*, **23**, 525 (1984).

- 105- S. Takatsuto, N. Ikekawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 439 (1984).
- 106- S. Takatsuto, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe; *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 211 (1987).
- 107- N. Ikekawa; **Brassinosteroids**, in **Physiology and biochemistry of sterols**. American Oil Chemists Society. G. W. Patterson, W. D. Nes Eds. Champaign, Illinois. 1991.
- 108- T. Yokota, Y. Ogino, N. Takahashi, H. Saimoto, S. Fujioka, A. Sakurai. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1107 (1990).
- 109- M. Tsubuki, K. Keinu, T. Honda; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2643 (1992).
- 110- L. Kohout, M. Strnad; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **57**, 1731 (1992).
- 111- K. Wada, S. Marumo; *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2579 (1981).
- 112- K. Okada, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 89 (1983).
- 113- M. Anastasia, P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Fiecchi, A. Scala; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2117 (1986).
- 114- T. Kishi, K. Wada, S. Marumo, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1821 (1986).
- 115- L. Kohout; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **59**, 1219 (1994).
- 116- C. Brosa, R. Peracaula, S. Nusimovich; *Steroids*, **59**, 463 (1994).
- 117- E. E. Levinston, N. A. Kutnetsova, N. Y. Podkhalyusina, V. F. Traven; *Mendeleev Commun.*, 96 (1994).
- 118- C. Brosa; **Biological effects of brassinosteroids**, in **Biochemistry and functions of sterols**. E. J. Parish, D. Nes Eds. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1997.
- 119- C. Brosa, J. M. Capdevilla, I. Zamora; *Tetrahedron*, **52**, 2435 (1996).
- 120- C. Brosa, J. C. Ferrer, R. Puig, R. Peracaula, L. Soca, J. M. Capdevilla, C. Rodriguez, E. Terricabras, I. Zamora; Resumen de la XV Reunión Bienal de Química Orgánica, pags. 51- 54. Pletoria - Asturias. 4-6 de abril de 1995.
- 121- K. Mori, T. Takeuchi; *Liebigs Ann. Chem.*, 815 (1988).
- 122- M. J. Thompson, N. Mandava, J. L. Flippen-Anderson, J. F. Worley, S. R. Dutky, W. E. Robins, W. Lubby; *J. Org. Chem.*, **44**, 5002 (1979).
- 123- K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1211 (1980).
- 124- K. Mori, M. Sakakibara, Y. Ichikawa, H. Ueda, K. Okada, T. Umemura, G. Yabuta, S. Kuwahara, H. Kondo; *Tetrahedron*, **38**, 2099 (1982).
- 125- M. Sakakibara, K. Okada, Y. Ichikawa, K. Mori; *Heterocycles*, **17**, 301 (1982).
- 126- M. Anastasia, P. Ciuffreda, M. del Puppo, A. Fiecchi; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 383 (1983).
- 127- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4181 (1982).
- 128- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 663 (1983).
- 129- K. Okada, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 925 (1983).

- 130- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1407 (1983).
- 131- K. Mori, M. Sakakibara, K. Okada; *Tetrahedron*, **40**, 1767 (1984).
- 132- K. Mori; *Rev. Latinoam. Quim.*, **16**, 55 (1985).
- 133- S. Takatsuto; *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2361 (1988).
- 134- T. Honda, K. Keino, M. Tsubuki; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 650 (1990).
- 135- T. Mc Morris, P. A. Patil; *J. Org. Chem.*, **58**, 2338 (1993).
- 136- T. Mc Morris, P. A. Patil, R. G. Chavez, M. E. Baker, S. D. Clouse; *Phytochemistry*, **36**, 585 (1994).
- 137- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2001 (1984).
- 138- S. Fung, J. B. Sidall; *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6580 (1980).
- 139- M. Ishiguro, S. Takatsuto, M. Morisaki, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 962 (1980).
- 140- S. Takatsuto, B. Ying, M. Morisaki, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 903 (1981).
- 141- S. Takatsuto, N. Yasawa, M. Ishiguro, M. Morisaki, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 139 (1984).
- 142- a. M. Anastasia, P. Ciuffreda, A. Fiechi; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 379 (1983),
b. D. H. R. Barton, T. Shiori, D. A. Widdowson; *J. Chem. Soc.*, 1968 (1971).
- 143- W. Zhou; *Pure & Appl. Chem.*, **61**, 431 (1989).
- 144- W. Zhou, B. Jiang, X. Pou; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 612 (1989).
- 145- Z. Sheu, W. Zhou; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1765 (1990).
- 146- C. Brosa, R. Peracaula, R. Puig, M. Ventura; *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7057 (1992).
- 147- V. Cerný; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **54**, 2211 (1989).
- 148- S. Seo, T. Nagasaki, Y. Katsuyama, F. Matsubara, T. Sakada, M. Yoshioka, Y. Makisumi; *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **27**, 1383 (1989).
- 149- A. Kolbe, V. Marquardt, G. Adam; *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **31**, 801 (1992).
- 150- J. E. Edwards, J. S. Mills, J. Sundeen, J. H. Freed; *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1248 (1969).
- 151- R. F. Hutchins, M. J. Thompson, J. A. Svodoba; *Steroids*, **15**, 113, (1970).
- 152- W. G. Salmond, M. C. Sobala; *Tetrahedron Lett.*, **16**, 1695 (1977).
- 153- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2133 (1983).
- 154- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Tetrahedron Lett.*, **24**, 773, (1983).
- 155- a. H. Hayami, M. Sato, S. Kanemoto, Y. Morizawa, K. Oyima, H. Nozaki; *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4491 (1983), b. K. Mikani, I. Sakuda; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 710 (1993).

- 156- a. J. R. Donaubaer, A. M. Greaves, T. C. Mc Morris; *J. Org. Chem.*, **49**, 2833 (1984), b. T. C. Mc Morris, R. C. Chavez, P. A. Patil; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 295 (1996).
- 157- T. Kametani, K. Keino, M. Kigawa, M. Tsubuki, T. Honda; *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3141 (1989).
- 158- T. Yokota, S. Watanabe, Y. Ogino, I. Yamaguchi, N. Takahashi; *J. Plant. Growth Regul.*, **9**, 151 (1990).
- 159- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 745 (1984).
- 160- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2769 (1982).
- 161- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1405 (1983).
- 162- M. Anastasia, P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Fiechi, A. Sacca; *J. Org. Chem.*, **50**, 321 (1985).
- 163- M. Anastasia, P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Fiechi, A. Sacca; *J. Org. Chem.*, **49**, 4297 (1984).
- 164- S. Kim, T. Akihisha, T. Tamura, T. Matsumoto, T. Yokota, N. Takahashi; *Phytochemistry*, **27**, 629 (1988).
- 165- T. Yokota, Y. Ogino, H. Suzuki, N. Takahashi, H. Saimoto, S. Fujioka, A. Sakurai; **Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids, in *Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.**
- 166- H. Suzuki, S. Fujioka, S. Takatsuto, T. Yokota, N. Murofushi, A. Sakurai; *J. Plant Growth Regul.*, **13**, 21 (1994).
- 167- S. Fujioka, H. Suzuki, A. Sakurai, N. Murofushi, T. Yokota; *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, **19**, 169 (1992).
- 168- H. Suzuki, S. Fujioka, S. Takatsuto, T. Yokota, N. Murofushi, A. Sakurai; *J. Plant Growth Regul.*, **12**, 101 (1993).
- 169- T. Yokota, K. Higuchi, Y. Kosaka, N. Tajahashi; **Transport and metabolism of brassinosteroids in rice, in *Progress in Plant Growth Regulation*. C. M. Karssen, L. C. Van Loon y D. Vreugdenhil Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1992.**
- 170- H. Suzuki, T. Inoue, S. Fujioka, S. Takatsuto, T. Yanasigawa, T. Yokota, N. Murofushi, A. Sakurai; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 118 (1994).
- 171- T. Yokota, M. Nakayama, T. Wakisaka, J. Smidth, G. Adam; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1183 (1994).
- 172- H. Abe, C. Honjo, Y. Kyokawa, S. Asakawa, M. Natsume, M. Narushima; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 986 (1994).

- 173- H. Suzuki, S. Kim, N. Takahashi, T. Yokota; *Phytochemistry*, **13**, 1361 (1993).
- 174- C. D. Schlagnhauser, R. N. Arteca; *J. Plant Physiol.*, **138**, 191 (1991).
- 175- A. Kolbe, B. Schneider, A. Porzel, B. Voigt, G. Krauss, G. Adam; *Phytochemistry*, **36**, 671 (1994).
- 176- J. F. Kalinich, N. B. Mandava, J. A. Todhunter; *J. Plant Physiol.*, **120**, 207 (1985).
- 177- C. T. Duda; *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **27**, 119 (1976).
- 178- B. B. Biswas, A. Ganguly, A. Das; *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.*, **15**, 145 (1975).
- 179- W. H. Egbert, J. D. Lauren, M. D. David; *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, **8**, 146 (1981).
- 180- N. B. Mandava, M. J. Thompson, J. H. Yopp; *J. Plant Physiol.*, **128**, 53 (1987).
- 181- P. M. Smith, P. E. Taylor, J. M. Sasse, T. Yokota; *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, **19**, 93 (1992).
- 182- J. F. Kalinich, N. B. Mandava, J. A. Todhunter; *J. Plant Physiol.*, **125**, 345 (1986).
- 183- S. D. Clouse, D. M. Zurec, T. C. McMorris, M. E. Baker; *Plant Physiol.*, **100**, 1377 (1992).
- 184- S. D. Clouse, D. M. Zurec; Molecular analysis of brassinolide action, in plant growth and development, **in Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 185- T. Wang, D. J. Cosgrove, R. N. Arteca; *Plant Physiol.*, **101**, 965 (1993).
- 186- D. M. Zurec, D. L. Rayle, T. C. McMorris, S. D. Clouse; *Plant Physiol.*, **104**, 505 (1994).
- 187- R. Cerana, P. Lado, M. Anastasia, P. Ciuffreda, P. Allevi; *Z. Pflanzenphysiol.*, **114**, 221 (1984).
- 188- R. Cerana, A. Bonetti, M. T. Marre, G. Romani, P. Lado, E. Marre; *Physiol. Plant*, **59**, 23 (1983).
- 189- M. I. De Michelis, P. Lado; *Physiol. Plant*, **68**, 603 (1986).
- 190- I. Dahse, H. Sack, M. Bernstein, U. Petzold, E. Müller, H. M. Vorbrodt, G. Adam; *Plant Physiol.*, **93**, 1268 (1990).
- 191- I. Datse, U. Petzold, C. M. Willmer, E. Grimm; Brassinosteroids-induced changes of plasmalemma energization and transport and of assimilate uptake by plant tissue, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.

- 192- J. G. Roddick, M. Guan; Brassinosteroids and root development, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 193- H. Rönsh, G. Adam, J. Matschke, G. Schachler; *Tree Physiology*, **12**, 71 (1993).
- 194- J. M. Sasse, R. Sands; *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, **19**, 135 (1992).
- 195- W. J. Meudt, M. J. Thompson, H. W. Bennet; *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, **10**, 312 (1983).
- 196- J. Singh, S. Nakamura, Y. Ota; *Indian Journal of Agricultural Sciences*, **63**, 395 (1993).
- 197- G. Schilling, C. Schiller, O. Steffan; Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 198- T. Takematsu, Y. Takeuchi; *Proc. Japan Acad.*, **65**, Ser. B, 149 (1989).
- 199- R. He, G. Wang, X. Wang; Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 200- O. N. Kulaeva, E. A. Burkhanova, A. B. Fedina, V. A. Khokhlova, G. A. Bokebayeva, H. M. Vorbrodt, G. Adam; Effects of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 201- Y. Takeuchi, M. Ogasawara, M. Konnai, T. takematsu; *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, **19**, 343 (1992).
- 202- Y. Karumo, S. Takatsuto; Captability for, and problems of practical uses of brassinosteroids, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.

CAPITULO 2

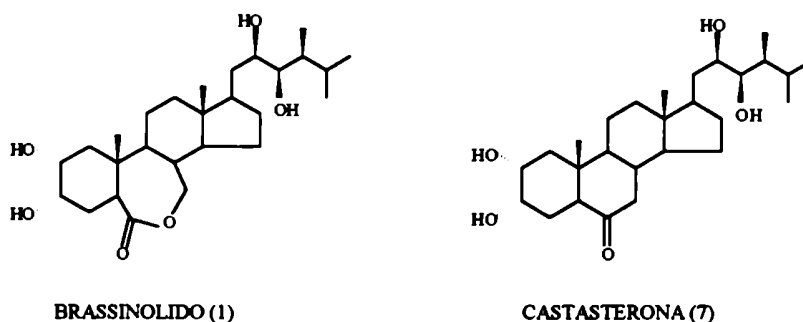
SINTESIS DE

**(22R,23R,24S)-24-ETIL-
2 α ,3 α ,22,23-TETRAHIDROXI-
5 α -COLESTAN-6-ONA**

[24(S)-HOMOETILCASTASTERONA]

2.1. INTRODUCCION.

Desde los comienzos de la década del '90, se conocen unos 30 diferentes análogos naturales de brassinólido (1) y castasterona (7)¹⁻⁴⁶, cuya diferencia radica en que los primeros cuentan con un anillo B expandido formando una lactona de siete miembros, mientras que los últimos, que tienen un grupo 6-ceto en la misma posición, se consideran sus precursores biosintéticos⁴⁷. Los brassinosteroides naturales descritos son estructuras polihidroxiladas con un número variable de carbonos en su fórmula molecular dependiendo del sustituyente de C-24 y/o C-25, con configuración 20(S),22(R),23(R),24(S) en la cadena lateral, y un número y orientación de hidroxilos variables en el anillo A.

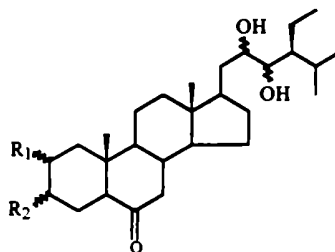


Todos los brassinosteroides naturales encontrados poseen fusión *trans* de los anillos A y B, con configuración 5 α .

En el presente **Capítulo** se relatarán las estrategias empleadas para sintetizar el compuesto cabeza de serie, la (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestán-6-ona [24(S)-homoetilcastasterona] (12) y su diastéromero la (22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestán-6-ona (55) (ver **Figura 2.1**). Por otro lado, en el **Capítulo 3** se describirán las síntesis de sus análogos 5 α -hidroxilados: la (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestán-6-ona (163) y la (22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestán-6-ona (164) (ver **Figura 3.1**, pag 119).

Finalmente, en el **Capítulo 4**, se describirán las síntesis de los análogos de 12 y 55 --cabezas de serie de los compuestos 5 α -hidrogenados-- y de 163 y 164 --cabezas de serie de los compuestos 5 α -hidroxilados--; con distintos sustituyentes sobre C-3 (ver **Figura 4.1**, pag. 129).

Las estructuras de los compuestos cabeza de serie de los brassinosteroides 5 α -hidrogenados (12 y 55) y del resto de sus análogos se muestran en la **Figura 2.1**:



12: R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	22(R),23(R) (24-homoetilcastasterona)
55: R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	22(S),23(S)
159: R ₁ = H	R ₂ = β-Br	22(R),23(R)
160: R ₁ = H	R ₂ = β-Br	22(S),23(S)
161: R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	22(R),23(R)
162: R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	22(S),23(S)

Figura 2.1. Análogos de castasterona 5α-hidrogenados sintetizados. La síntesis de los compuestos **12** y **55** se detallan en el presente **Capítulo**, mientras que los restantes se tratan en el **Capítulo 4**.

Al final de este capítulo, en el **Esquema 2.1** (pag. 112), se resumen las diferentes alternativas sintéticas ensayadas para arribar a los productos deseados **12** y **55**.

2.2. SÍNTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-2α,3α,22,23-TETRAHIDROXI-5α-COLESTAN-6-ONA (**12**): COMPUESTO CABEZA DE SERIE.

La primera síntesis de una mezcla de 22(R),23(R),24(S) y 22(S),23(S),24(S)-homoetilcastasterona (**12** y **55**) fue realizada en el año 1980 por el grupo de K. Mori⁴⁸, como precursor en la síntesis del análogo 24(S)-homoetilsustituido del brassinólido a partir de estigmasterol (**136**). Posteriormente, se comprobó que se trataba de un análogo natural de castasterona detectándose por primera vez, en el año 1982, por S. Takatsuto y N. Ikekawa, en *Thea sinensis* (te verde) y *Brassica campestris* (repollo chino)⁶, donde se encontraba en una proporción de 0,46 y 0,13 ng/Kg respectivamente^{8,49}, comprobándose que su bioactividad, evaluada con el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz, era un 50% de la del brassinólido en las condiciones ensayadas⁵⁰.

La primera síntesis del producto puro, fue realizada en el año 1982, por el grupo de Thompson⁵¹, y a partir de allí, se llevaron a cabo muchas otras síntesis del mismo

compuesto con estigmasterol como producto de partida⁵²⁻⁵⁸, salvo algunas excepciones⁵⁹.

Con el objetivo de proponer una síntesis original, para obtener la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**), se elaboró la estrategia retrosintética que se ilustra en la **Figura 2.2**.

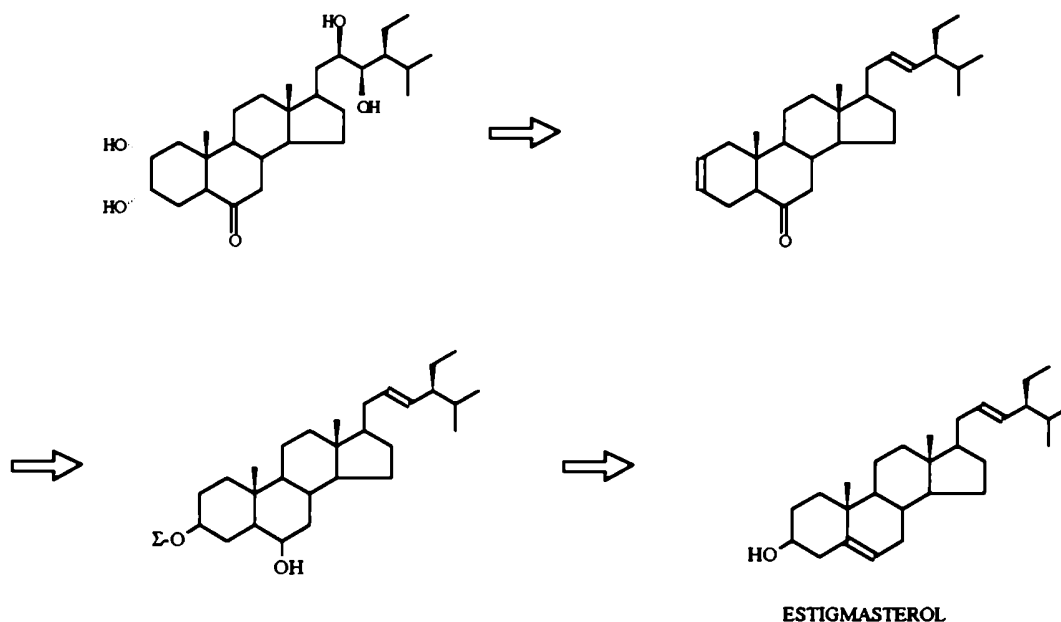
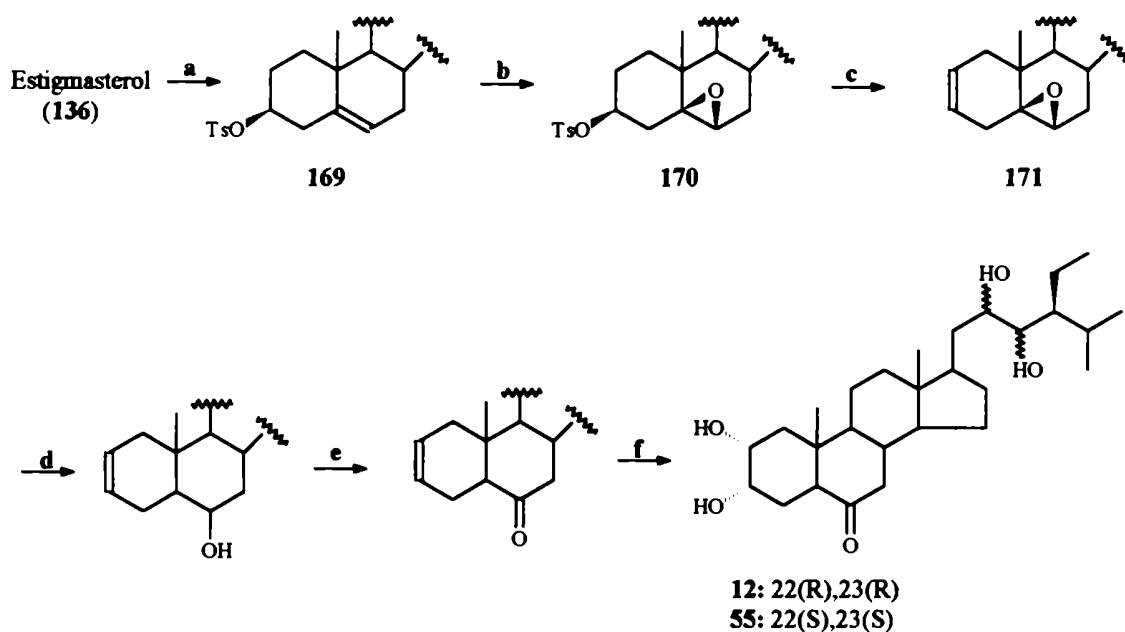


Figura 2.2. Estrategia retrosintética para obtener la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**).
 Σ = grupo protector.

El esquema sintético que se construyó en base a la retrosíntesis planteada consta fundamentalmente de las siguientes etapas:

- 1- Diferenciación de los dobles enlaces Δ^5 y Δ^{22} .
- 2- Obtención de la función Δ^2 -6-ceto.
- 3- Dihidroxilación de los dobles enlaces Δ^2 y Δ^{22} .

En la **Figura 2.3** se detalla la secuencia de reacciones planificadas para llevar a cabo la síntesis de la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**).



a. TsCl/Py b. CrO₃/(AcO)₂O/AcOH c. base/Δ d. LiAlH₄ e. DCP f. OsO₄/NMO

Figura 2.3. Estrategia propuesta para la síntesis de la 24(S)-homoetilcastasterona (12).

A continuación se detallan las reacciones llevadas a cabo para el logro de cada una de las etapas sintéticas planteadas.

2.2.1. DIFERENCIACIÓN DE LOS DOBLES ENLACES Δ^5 Y Δ^{22} (paso b, Figura 2.3).

La intención fue, por un lado, conservar el doble enlace de la cadena lateral (Δ^{22}) para realizar la dihidroxilación en C-22 y C-23, en el último paso sintético (paso f, Figura 2.3). Por otro lado, la adecuada funcionalización del anillo B, exigía la transformación del doble enlace de C-5 (Δ^5) en una cetona (pasos d y e, Figura 2.3). Ambos factores nos llevaron a la necesidad de utilizar una reacción que diferenciara ambas insaturaciones, funcionalizándolas adecuadamente. Decidimos emplear una reacción estereo y regioselectiva de epoxidación del doble enlace del anillo B que permitía obtener exclusivamente el epóxido 5 β ,6 β (Paso b, Figura 2.3)^{60,61}. Tal reacción, que había sido recientemente desarrollada en nuestro laboratorio, requería la protección previa del hidroxilo de C-3 para evitar su oxidación. Los correspondientes derivados 3 β -acetilados y el 3 β -tosilados de estigmasterol resultaron ser buenos sustratos para la reacción de epoxidación.

Se utilizó inicialmente el derivado tosilado en C-3 (169) porque era factible eliminarlo posteriormente para obtener el 5 β ,6 β -epoxiestigmasta-2,22-dieno (171) (paso c, **Figura 2.3**). La reacción de tosilación se llevó a cabo en las condiciones convencionales⁶², utilizando cloruro de p-toluensulfonilo y piridina.

Una vez protegido el sustrato se procedió a la diferenciación de las insaturaciones del compuesto 169. Se preparó el reactivo epoxidante, consistente en una solución de trióxido de cromo en anhídrido acético, que diluida en cloruro de metileno, se agregó lentamente a una solución a -78°C fuertemente agitada de 169 en el mismo solvente⁶³. Esta reacción presentaba distintos subproductos, los cuales derivaban principalmente de la sobreoxidación. El subproducto más abundante era el de oxidación alílica, la 3 β -tosiloxiestigmasta-5,22-dien-7-ona (172) (ver **Figura 2.4**). En esta reacción el porcentaje de β -epóxido (170) variaba entre un 65 y 70 %, mientras que el α -epóxido (173) se obtenía con un porcentaje que oscilaba entre 0 y 5 %. La distinción entre el α y el β -epóxido se hacía fácilmente por el análisis de los espectros de RMN-¹H comparando la señal del H-6: El isómero β (170) presenta un doblete a 3 ppm con una constante de partición (J) de 2 Hz, mientras que el isómero α (173) presenta un doblete a 2.9 ppm con un J= 4 Hz⁶⁴.

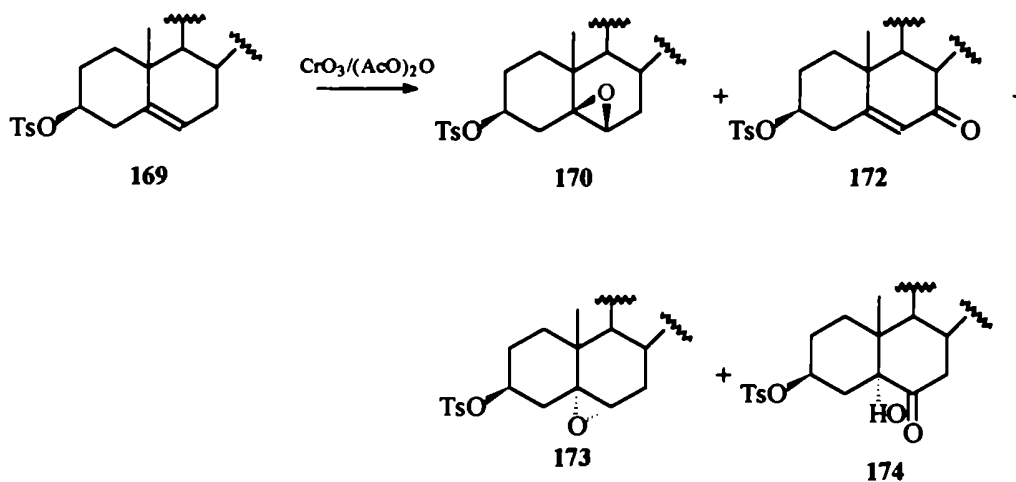


Figura 2.4. Productos de la reacción de epoxidación de 169 con acetato de cromilo.

La relación óptima de oxidante a sustrato resultó ser 6:1, ya que una mayor proporción de oxidante resultaba en un aumento de la obtención del producto de oxidación alílica (172) hasta en un 20%. Este efecto se veía más pronunciado en caso de

elevar la temperatura de reacción⁶³ apareciendo además un nuevo subproducto, la 3 β -tosiloxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (174). Si la relación era menor a 6:1 la reacción permanecía sin completarse.

Aunque esta reacción precisaba de condiciones de reacción controladas y se obtenían distintos subproductos, se convertía en clave para llevar adelante la estrategia sintética elegida ya que permitía la epoxidación regioselectiva del doble enlace Δ^5 dejando intacta la cadena lateral. La utilización de otros reactivos epoxidantes como el ácido m-cloroperbenzoico (mCPBA)⁶⁵ conducía, dependiendo de la temperatura, a una mezcla equimolecular de 5 β ,6 β y 5 α ,6 α epóxidos, además de epoxidación parcial en la cadena lateral.

Para explicar la estereoselectividad de la epoxidación con acetato de cromilo se propuso un mecanismo según el cual la aproximación del reactivo de Cr^{VI} al doble enlace del anillo era fundamental. Este ataque sería por la cara α del esqueleto esteroideal, debido al impedimento que representa el metilo angular ubicado en la cara contraria (Ver Figura 2.5). La nueva unión se formaría entre el doble enlace y el átomo metálico del CrO₂(AcO)₂ formado *in situ*⁶⁶, ya que la especie A posee estructuras de resonancia del tipo B y C, donde el átomo metálico actuaría como aceptor de electrones (ver Figura 2.6).

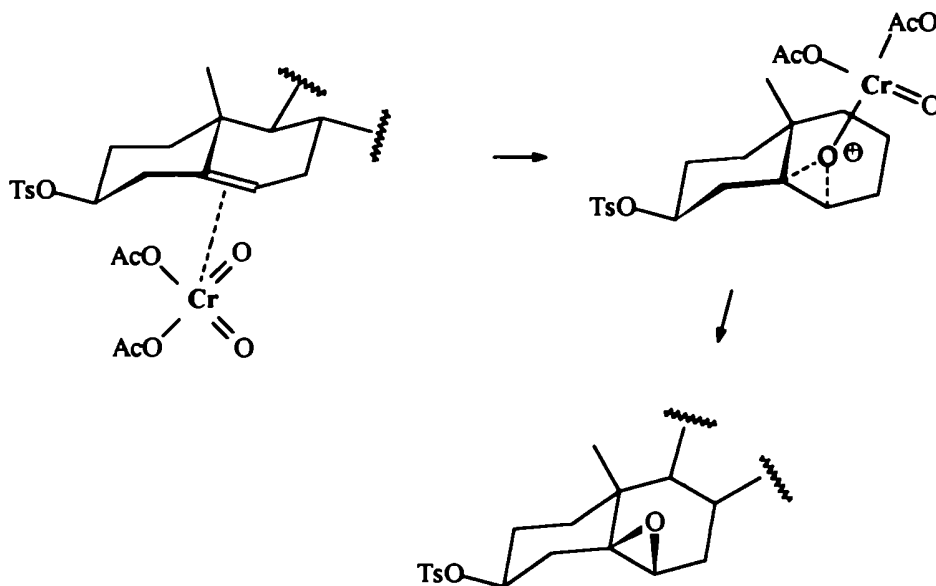


Figura 2.5. Mecanismo propuesto para la reacción de epoxidación con acetato de cromilo.

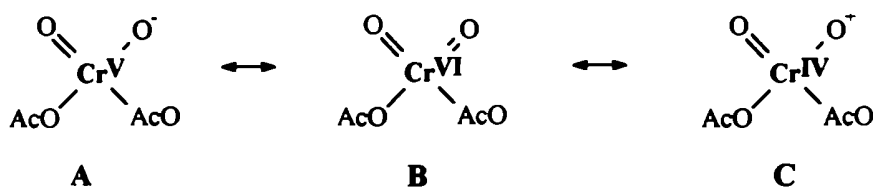


Figura 2.6. Estructuras de resonancia del acetato de cromilo ($\text{CrO}_2(\text{AcO})_2$).

Una vez producido el bloqueo de la cara α , un oxígeno nucleofílico del reactivo podría acercarse por el lado contrario, para obtener el epóxido β (ver **Figura 2.5**). Estos hechos explicarían, además, porqué es necesario un exceso de reactivo de cromo.

2.2.2. OBTENCIÓN DE LA FUNCIONALIZACIÓN Δ^2 -6-CETO.

Una vez obtenido el 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (170) el siguiente paso era obtener la adecuada funcionalización de los anillos A y B. Se debía eliminar el grupo tosiloxi para obtener el 5 β ,6 β -epoxiestigmasta-2,22-dieno (171), tal como se mostró en el paso c de la **Figura 2.3** (pag. 60). Sin embargo, es necesario aclarar que este intento no culminó exitosamente; es decir, el compuesto 171 de la **Figura 2.3** no pudo ser obtenido. Por lo tanto, para lograr la función Δ^2 -6-ceto, debió cambiarse la estrategia sintética pensada inicialmente como pasos c, d y e de la **Figura 2.3** (pag. 60) por los pasos c, d y e de la **Figura 2.22** (pag. 82).

A continuación, en la sección 2.2.2.1 se relatarán los intentos infructuosos realizados para sintetizar el compuesto 171. En las secciones 2.2.2.2, 2.2.2.3 y 2.2.2.4 se detallará la estrategia que finalmente se utilizó para obtener la función Δ^2 -6-ceto deseada.

2.2.2.1. Intento de obtención de 5 β ,6 β -epoxiestigmasta-2,22-dieno (171) (paso c, **Figura 2.3**).

Los primeros ensayos llevados a cabo con distintas bases y distintos solventes (entradas 1-5, **Tabla 2.1**), permitieron observar que, en condiciones muy suaves, no ocurría alteración alguna del sustrato 170; por otro lado, en condiciones drásticas desaparecía totalmente el epóxido obteniéndose una gran variedad de productos difíciles de identificar.

Por ejemplo, al utilizar carbonato de litio⁶⁷ como base (entradas 1 y 2, **Tabla 2.1**), los resultados variaban considerablemente si se usaba como solvente tetrahidrofurano (THF) (p. eb. 65-67°) ó dimetilformamida (DMF) (p. eb. 153°C). En condiciones de mayor temperatura se obtuvieron una gran variedad de productos no identificados, además del producto de formilación en C-3: el

Tabla 2.1. Reactividad de derivados esteroideos epoxidados.

N	substrato	Medio de reacción	tiempo (h)	temperatura (°C)	producto	% de conversión	referencias
1	170	Li ₂ CO ₃ /DMF	1	reflujo	175+otros	60	67
2	170	Li ₂ CO ₃ /THF	10	reflujo	ninguno	0	67
3	170	Colidina	2	reflujo	varios	92	---
4	170	<i>t</i> -BuOK/DMSO	2	t.a.	ninguno	0	69
5	170	DBU/tolueno	2	reflujo	ninguno	0	70
6	170	DMA	0.5	reflujo	178,179+otros	1	---
7	170	LiBr/DMF	1-5	reflujo	175+otros	60	71
8	170	LiBr/DMSO	1	reflujo	varios	100	71
9	170	LiBr/DMA	1	> 110	177-181	100	71
10	170	LiBr/DMA	1	< 110	182,183	100	71
11	170	LiCl/DMA	0.5	reflujo	178,179+otros	100	71
12	182,183	LiBr/DMA	1	> 110	177-181	100	71
13	182,183	DMA	0.5	reflujo	177-181	100	---
14	182,183	LiCl/DMA	0.5	reflujo	177-181	100	---
15	184	DMA	0.5	reflujo	ninguno	0	---
16	184	LiBr/DMA	0.5	reflujo	185	100	---
17	184	LiCl/DMA	0.5	reflujo	185	100	---
18	186	DMA	0.5	reflujo	ninguno	0	---
19	186	LiBr/DMA	0.5	reflujo	187	50	---

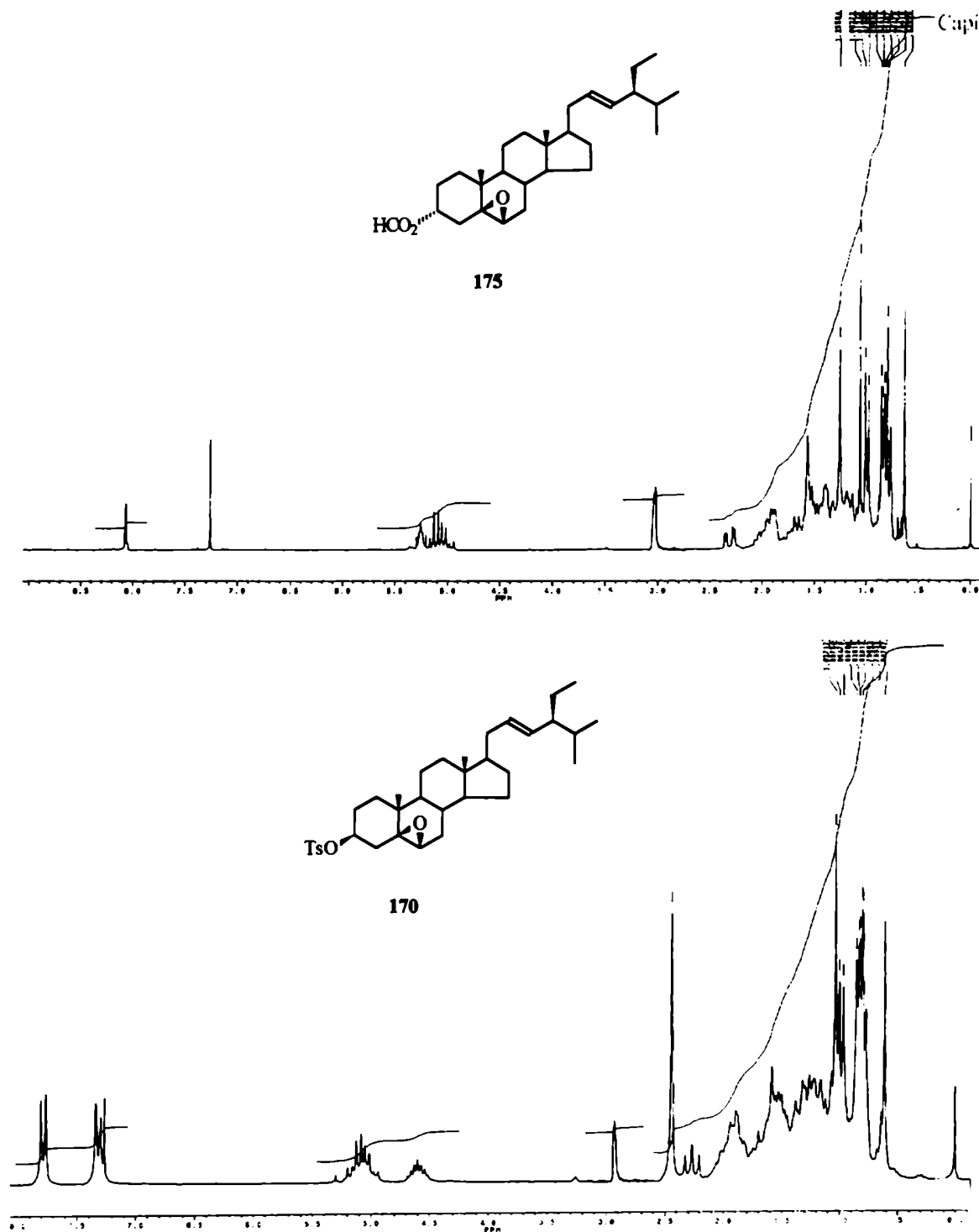


Figura 2.8. Espectros de resonancia magnética nuclear protónica de : a) 3 α -formiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (175); b) 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (170). Puede observarse el angostamiento de la señal centrada a 4,60 ppm, correspondiente al H3 α axial de 170, al convertirse en el H3 β ecuatorial de 175 (5,25 ppm). Dicho angostamiento es propio de la ausencia de interacciones 1,3-diaxiales.

3 α -formiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (175) que se obtenía siempre que se utilizaba DMF como solvente a una temperatura mayor a los 120°C (ver entradas 1 y 7, **Tabla 2.1** y **Figura 2.7**).

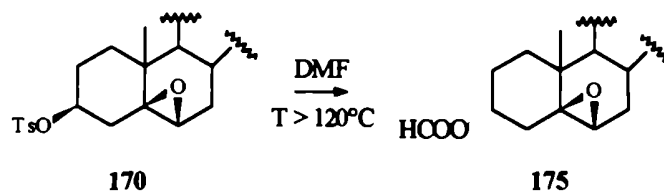


Figura 2.7. Condiciones de formilación en presencia de dimetilformamida.

La estructura de 175 se determinó por su espectro de masa que confirmó el peso molecular del compuesto y mostró la señal [M-HCOOH], por pérdida de ácido fórmico. Además la aparición de la señal de formilo a 8.1 ppm en espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica, y la señal a 160.5 ppm en la de carbono-13 apoyaban la asignación estructural. La inversión en la configuración del C-3 se confirmó por la modificación de la señal ancha del H-3 α axial del tosilato (170), convertida en una señal aguda en el formilo (175), indicando una configuración H β ecuatorial (ver **Figura 2.8**)⁶⁸.

Al utilizar colidina (p. eb. 171-172°C), diluida en distintas proporciones en THF no se producía alteración alguna en el sustrato de partida; pero, a reflujo sin solvente, en poco tiempo se obtenía una gran cantidad de productos no identificados con un alto porcentaje de conversión (entrada 3, **Tabla 2.1**).

En el caso de las bases voluminosas como *t*-butóxido de potasio⁶⁹ o 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-eno⁷⁰ (DBU) (entradas 4 y 5, **Tabla 2.1**), no se apreciaba reacción alguna, aún a altas temperaturas.

Aquellos casos en que el sustrato 5 β ,6 β -epoxidado estaba impurificado con 172, se obtenía, aún en condiciones suaves, un producto de eliminación (176) muy característico por su intensa fluorescencia observada bajo luz ultravioleta (ver **Figura 2.9**).

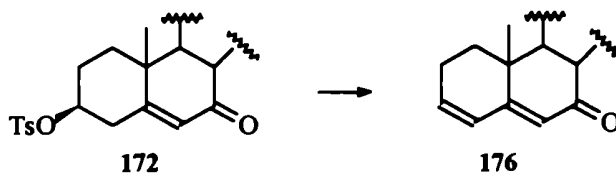


Figura 2.9. Producto de eliminación del 3 β -tosiloxiestigmasta-5,22-dien-7-ona (172).

Por otro lado se utilizó bromuro de litio⁷¹ como catalizador de la eliminación, en solventes como dimetilsulfóxido (DMSO) ó dimetilformamida (DMF) (entradas 7 y 8, **Tabla 2.1**). Con dimetilacetamida (DMA) (entradas 9-19, **Tabla 2.1**) se evitaba la formilación del C-3 y los porcentajes de conversión llegaban a ser del 100% (entradas 9-14, **Tabla 2.1**). Además, la ausencia de bromuro de litio se traducía en una falta de reactividad (entrada 6, **Tabla 2.1**).

Bajo estas condiciones de reacción, con bromuro de litio como catalizador y DMA a reflujo, se obtuvo una mezcla de productos que fue posible separar e identificar (entradas 9 y 10, **Tabla 2.1**). Por un lado, se halló que, a temperaturas superiores a los 110°C, se obtenía una serie de productos de eliminación, en proporciones similares que pudieron identificarse completamente (entrada 9, **Tabla 2.1** y **Figura 2.10**) que fueron, en su mayoría, identificados por comparación de sus puntos de fusión, espectroscopia de RMN-¹H y espectroscopia infrarroja, con datos obtenidos de bibliografía⁷². Por otro lado, la presencia de estigmasta-2,4,6,22-tetraeno (**180**) se confirmó tanto por su espectro de RMN-¹H, como por su espectro ultravioleta⁷³; además existen referencias bibliográficas que dan cuenta de eliminaciones a dienos por sometimiento de epóxidos a condiciones alcalinas⁷⁴. También, en esas mismas condiciones, se informan casos de migraciones del C-19 acompañados de aromatización del anillo A para dar 1-metilestigmasta-1,3,5(10),22-tetrateno (**181**)⁷⁵. En todos los casos es difícil asegurar si se obtiene el producto **181** o su isómero de posición, el 4-metilestigmasta-1,3,5(10),22-tetrateno. Además, puede concluirse que los productos **180** y **181** derivan de una reacción paralela a la de formación de las olefinas **177-179**; ya que, al someter los alquenos a reflujo con bromuro de litio en DMA, en ningún caso se detectó cambio alguno ni aparición de **180** ó **181**.

Por otro lado, a temperaturas menores a los 110°C sólo se obtenían el 3 α y 3 β -bromo-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**182** y **183**) (ver **Figura 2.10** y entrada 10, **Tabla 2.1**). Estas estructuras fueron confirmadas por sus espectros de masa que mostraban la serie de picos dobles correspondientes a ambos isótopos de bromo. También se confirmaron por sus espectros de RMN-¹H que presentaban, por un lado, la señal característica del β -epóxido⁶⁴, y por el otro, la de los H-3 β -ecuatorial y H-3 α -axial de los compuestos **182** y **183** respectivamente (ver **Figura 2.11**)⁷⁶.

La obtención de ambos productos (**182** y **183**), a menor temperatura, haría pensar un mecanismo donde los epóxidos bromados serían intermediarios de reacción. Para intentar confirmar esta idea se sometió la mezcla de bromuros (**182** y **183**) a reflujo en DMA en presencia y ausencia de bromuro de litio (entradas 12 y 13, **Tabla 2.1**), obteniéndose, efectivamente, los productos de eliminación **177-181**.

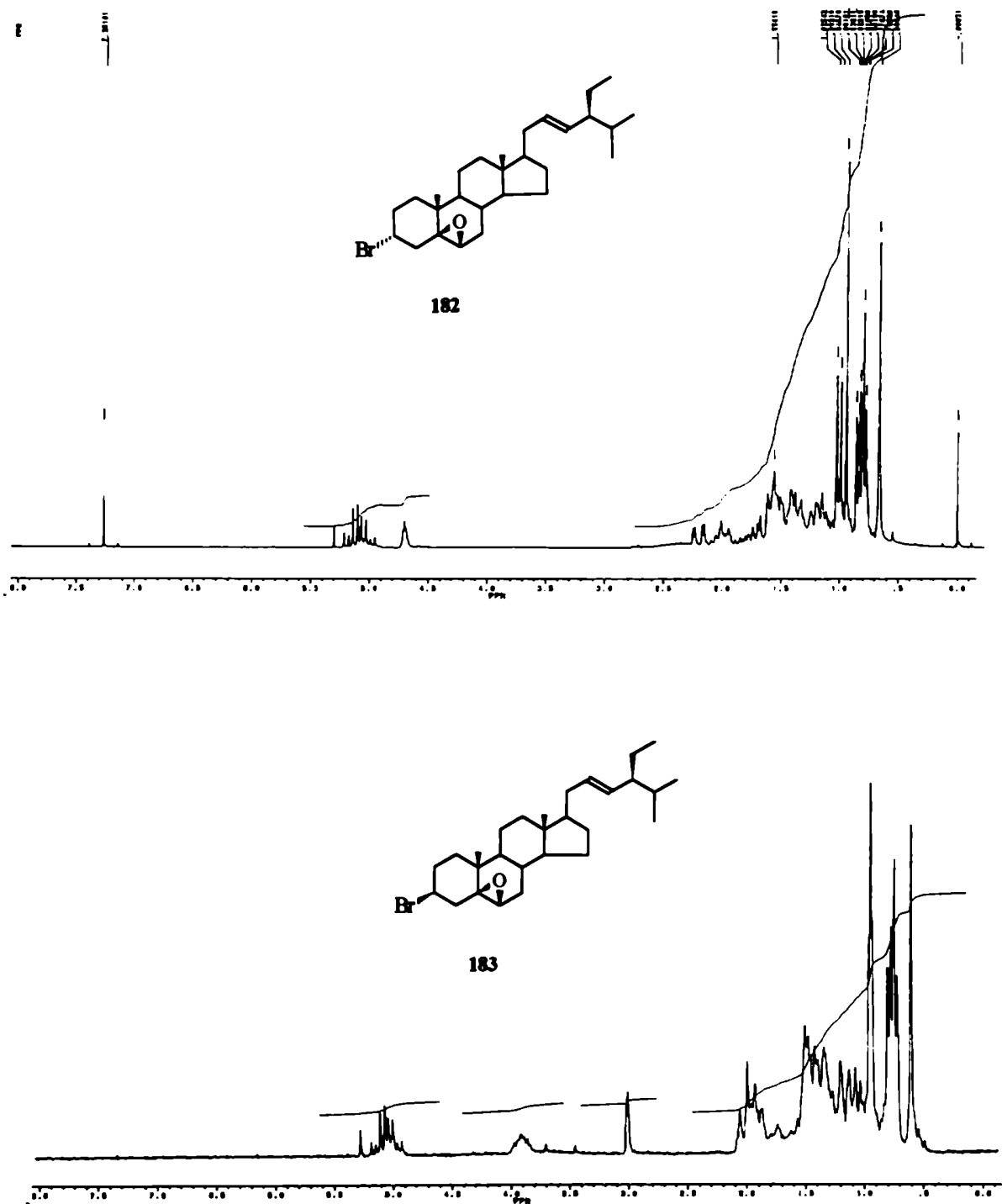


Figura 2.11. Espectros de resonancia magnética nuclear protónica de : a) 3 α -bromo-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (182); b) 3 β -bromo-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (183). La señal correspondiente al H3 β -ecuatorial de 182 se ubica a campos más bajos (4,66 ppm) que la correspondiente al H3 α -axial de 183 (4,00 ppm). Además, se produce un ensanchamiento de la señal, efecto producido por la presencia de interacciones 1,3-diaxiales.

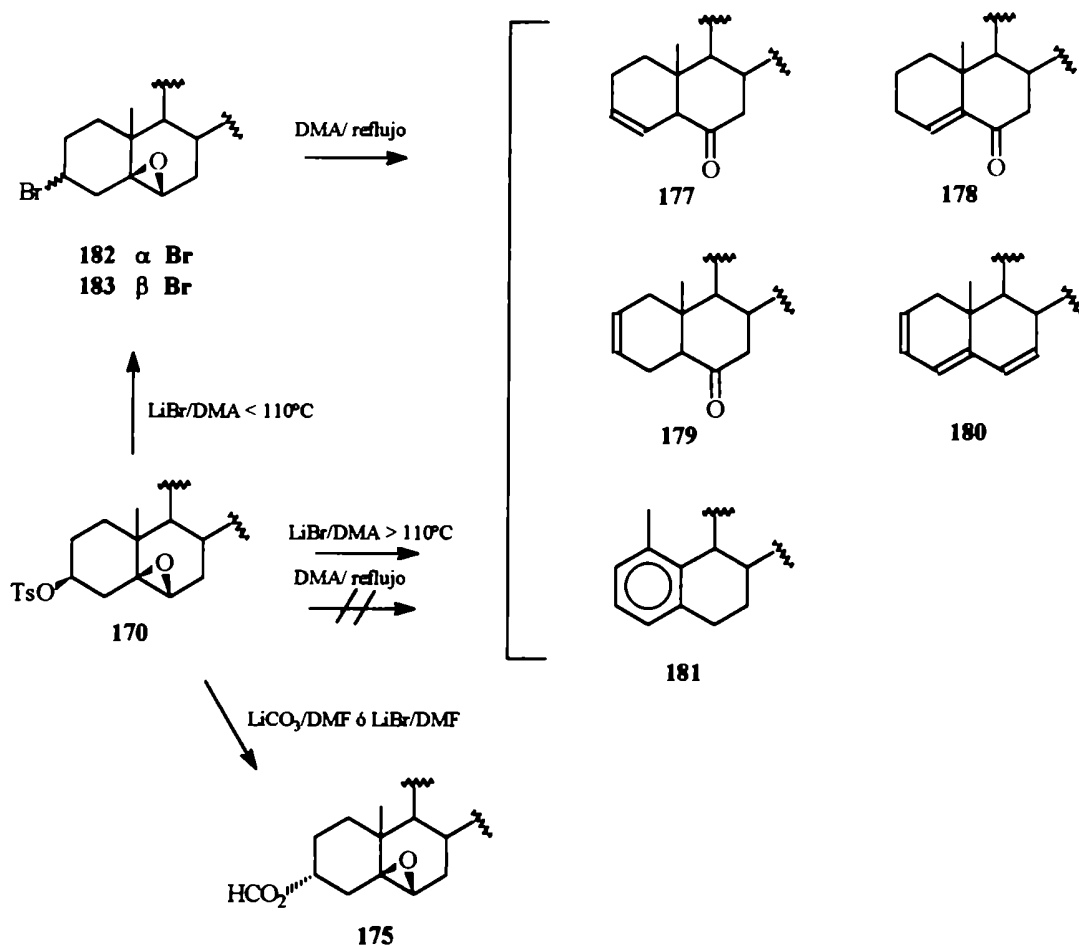


Figura 2.10. Resultados del intento de eliminación de sustituyentes de C-3, sobre sustratos esteroidales $5\beta,6\beta$ -epoxidados.

Para explicar la obtención de los productos mencionados (ver **Figura 2.10**) se propuso el mecanismo⁷⁷ que se ilustra en la **Figura 2.12a**. Los resultados indicarían que la formación del carbocatión en C-3 por eliminación de un buen grupo saliente, la ausencia de un nucleófilo apropiado y la alta temperatura, inducirían eliminaciones y migraciones intramoleculares durante la apertura del epóxido $5\beta,6\beta$. La migración intramolecular del hidruro de C-6 para dar la cetona parece ser el principal tipo de reordenamiento y parecería suceder antes de la pérdida del protón del anillo A. El catión Li^+ asistiría la apertura del epóxido actuando como un ácido de Lewis. Para confirmar la importancia de dicho catión en el medio de reacción se reemplazó el bromuro de litio por cloruro de litio (entradas 11 y 14, **Tabla 2.1**), obteniéndose resultados que apoyan el mecanismo propuesto.

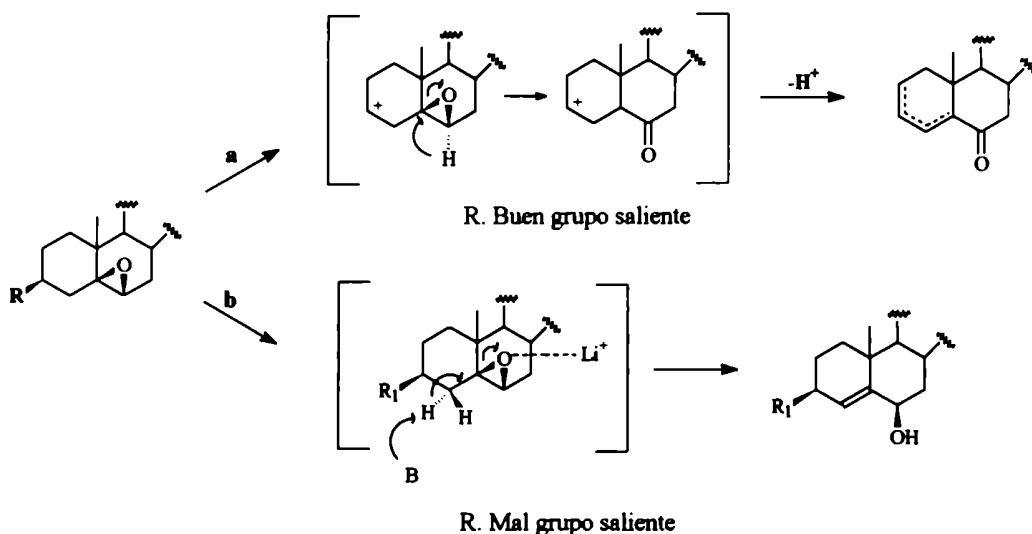


Figura 2.12. Mecanismos de reordenamiento del 5 β ,6 β -epóxido en distintas condiciones.

Por otro lado, resultó muy interesante someter sustratos incapaces de formar el carbocación en C-3, a esas mismas condiciones de eliminación. Se trató el 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxistigmast-22-eno (**184**) y el 5 β ,6 β -epoxistigmast-22-en-3 β -ol (**186**) con bromuro de litio en dimetilacetamida a reflujo, obteniéndose el 3 β -acetoxiestigmasta-4,22-dien-6 β -ol (**185**) y el estigmasta-4,22-dien-3 β ,6 β -diol (**187**) respectivamente (entradas 16 y 19, **Tabla 2.1**) (ver **Figura 2.13**). La reacción se produciría por un mecanismo de β -eliminación (ver **Figura 2.12b**) asistida electrofílicamente por el catión litio, para obtener los alcoholes alílicos correspondientes. Este tipo de reordenamiento ya era conocido en un medio básico fuerte (*t*-butóxido de potasio, diisopropilamido de litio, dietilamido de litio, etc.)⁷⁸, donde el epóxido sufría la abstracción de un hidrógeno para dar un alcohol, pero se desconocía que tal reordenamiento podía ocurrir en un medio alcalino débil donde el bromuro actuaría como base en un medio neutro.

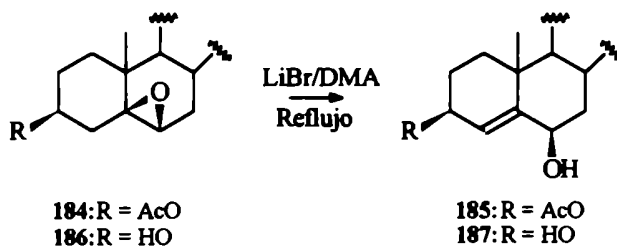


Figura 2.13. Productos de reordenamiento y β -eliminación de un 5 β ,6 β -epóxido derivado esteroide con un mal grupo saliente en C-3.

En cuanto a la confirmación de las estructuras, los espectros de RMN-¹H de **185** y **187** mostraban una señal a 5,4 ppm que integraba para un sólo hidrógeno, lo que aseguraba la presencia de la insaturación en C-4 y C-5 (ver **Figura 2.14**). La señal aguda del H-6 a 4,2 ppm, indicaba en ambos casos una configuración 6 β -axial para el hidroxilo⁶⁸. A la misma conclusión se arriba observando la señal del Me-19, que muestra un desplazamiento a campos más bajos por la presencia del hidroxilo β -axial en C-6⁷⁹. El espectro de masa de **185** muestra las señales de [M-H₂O] y [M-AcOH], mientras que el de **187** presenta las de [M-H₂O] y [M-2H₂O] (ver **Figura 2.15**).

Como resultado de los estudios realizados sobre 5 β ,6 β -epóxidos esteroidales portadores de sustituyentes en C-3 con características de buenos o malos grupos eliminables, se generalizó la reactividad de los mismos tal como se indica en la **Figura 2.12**. Esta reactividad diferencial consiste en una β -eliminación en el caso de ser difícil la formación del carbocatión en C-3; y, una serie de reordenamientos simultáneos a la apertura del epóxido, en caso de que dicho carbocatión se formara previamente. En nuestro caso, la formación del carbocatión en C-3, proveniente de la eliminación del grupo tosiloxi de **170** ó bromuro de **182** y **183**, se ve favorecida por las condiciones E₁ de la reacción, consistentes en la presencia de una base débil como el bromuro, la alta temperatura y un solvente de relativamente alta constante dieléctrica ($\epsilon=38$)⁷¹.

Para confirmar la mayor estabilidad relativa de la especie carbocatómica cetónica frente a la epoxidada, es decir la factibilidad del reordenamiento propuesto, se realizó un estudio conformacional. Para llevar a cabo dicho estudio se buscaron las estructuras de mínima energía de los reactivos, productos e intermediarios de reacción (ver **Figura 2.16**).

2.2.2.1.1. Estudio de la estabilidad relativa de los intermediarios de la reacción de eliminación de 5 β ,6 β -epóxiderivados esteroidales con buenos grupos salientes en C-3.

Para la optimización de las estructuras⁸⁰ se utilizó primeramente mecánica molecular, aplicando el campo de fuerzas mm+ considerado apropiado para el tipo de moléculas en cuestión, logrando obtener de esta forma una correlación considerada "buena". Luego de haber preoptimizado la geometría hasta un gradiente de 0,05 Kcal/mol, utilizando el método de minimización de segundo orden desarrollado por Newton-Raphson⁸¹, se concluyó la optimización utilizando el grupo de parámetros semiempíricos AM1⁸². Ambas metodologías se consideraron apropiadas para las estructuras en cuestión por tratarse de ecuaciones parametrizadas con moléculas similares.

Para iniciar el estudio asumimos las siguientes consideraciones:

- 1- Como mencionamos anteriormente las condiciones de reacción son tales que favorecen la formación del carbocatión en C-3 (E₁).

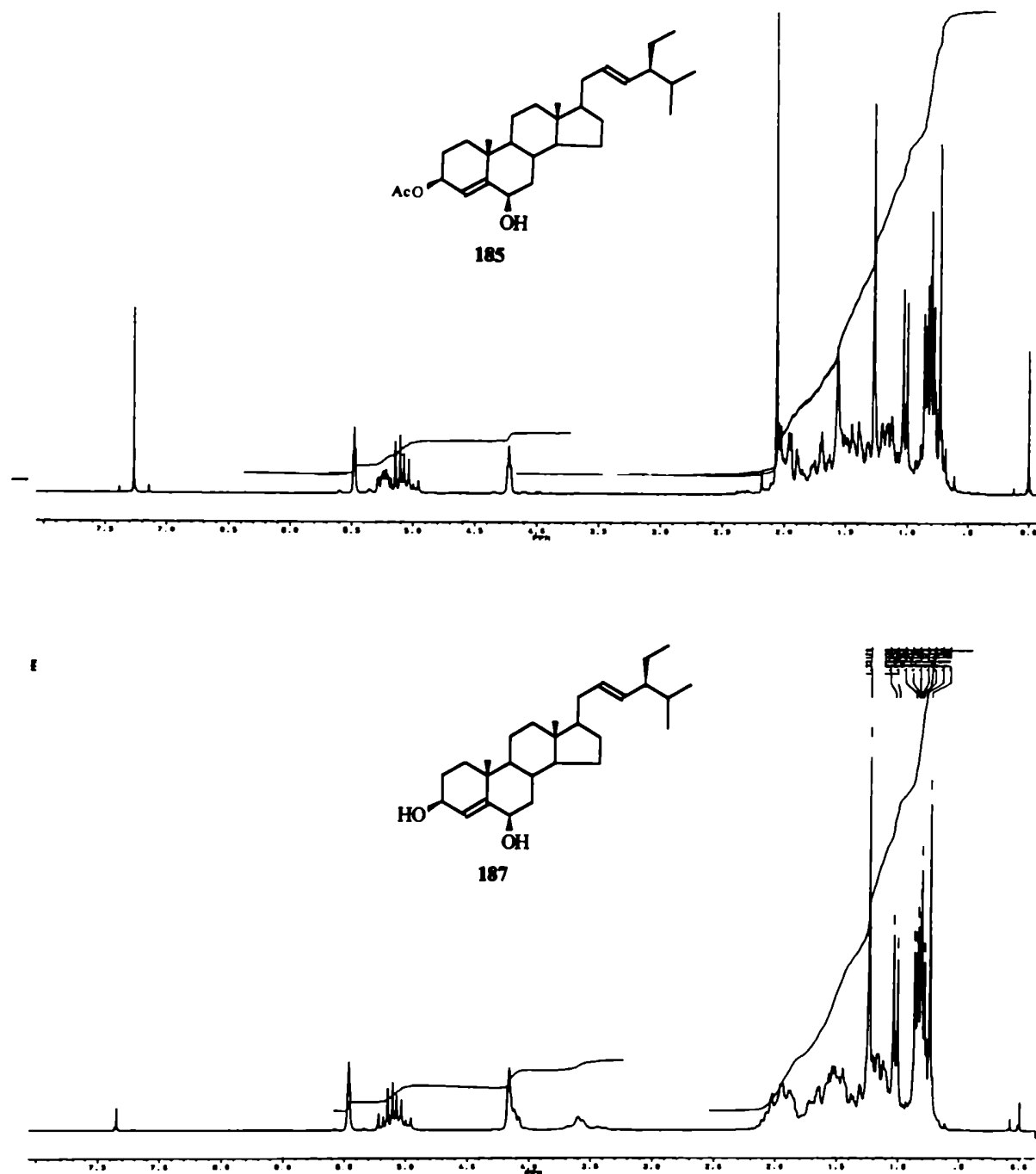


Figura 2.14. Espectros de resonancia magnética nuclear protónica de: a) 3β-acetoxiestigmasta-4,22-dien-6β-ol (185); b) estigmasta-4,22-dien-3β,6β-diol (187). En ambos espectros se observa una señal angosta a 4,2 ppm correspondiente al H-6. Dicha señal indica una sustitución 6βOH-axial, confirmada por la señal significativamente desprotegida del Me-19 (1,28 ppm).

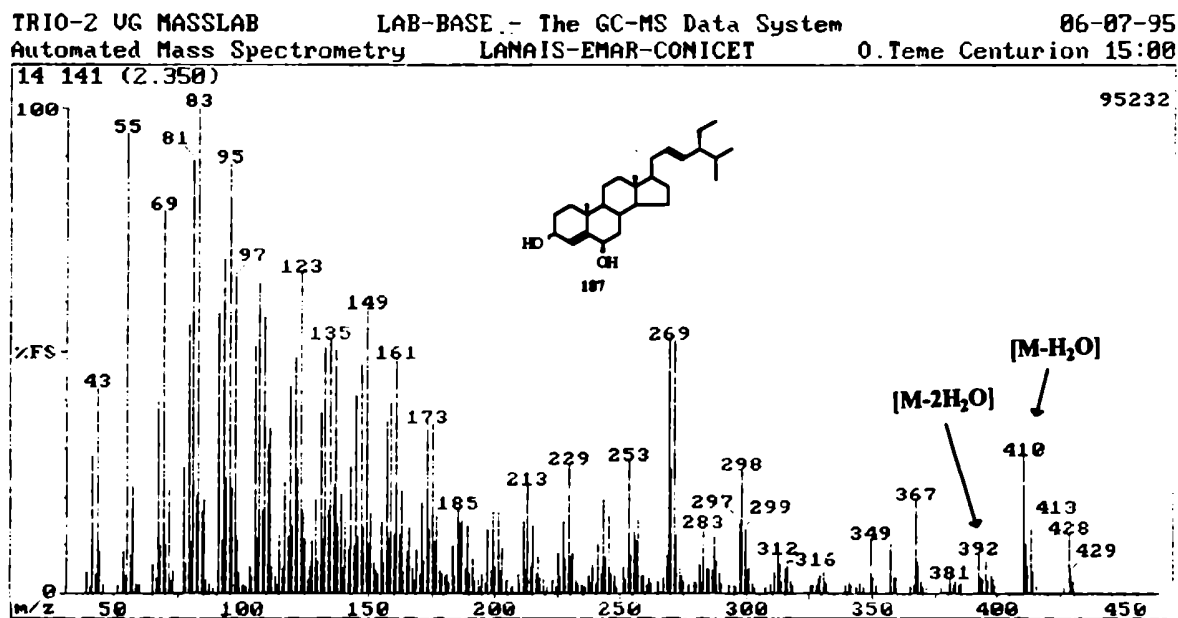
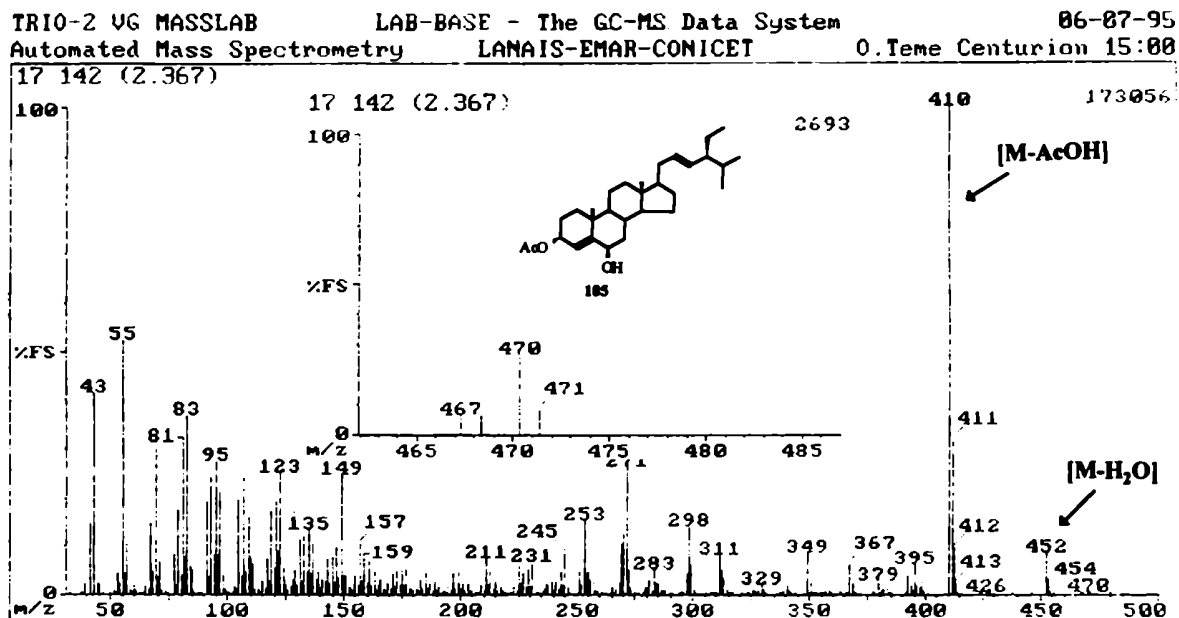


Figura 2.15. Espectros de masa por impacto electrónico de: a) 3β-acetoxiestigmasta-4,22-dien-6β-ol (185) (m/z 470); b) estigmasta-4,22-dien-3β,6β-diol (187) (m/z 428). Pueden apreciarse las pérdidas [M-AcOH] (m/z 410) y [M-H₂O] (m/z 452) de 185; y [M-H₂O] (m/z 410) y [M-2H₂O] (m/z 392) de 187.

- 2- El carbocatión se forma antes del reordenamiento, y éste ocurre antes de la eliminación.
- 3- La cadena lateral unida al esqueleto esteroidal está lo suficientemente lejos como para no afectar los centros estudiados.
- 4- El campo de fuerzas mm^+ y el grupo de parámetros semiempíricos AM_1 son apropiados para estudiar este tipo de moléculas.

Cabe señalar, antes de iniciar cualquier análisis, que al hacer referencia a "familias de compuestos" se estará haciendo referencia a dos de ellas: por un lado, a la "familia de los epoxidados" que incluye los compuestos con la función $5\beta,6\beta$ -epóxido (170, 188 y 171, **Figura 2.16**; y columnas 1, 2 y 3, **Tabla 2.2** respectivamente); y por otro lado, a la "familia de los cetónicos" que incluye los compuestos con la función 6-ceto (190, 189 y 179, **Figura 2.16**; y columnas 4, 5 y 6, **Tabla 2.2** respectivamente). Por otro lado, haremos referencia a "pares" cuando se quiera comparar un derivado epoxidado y su correspondiente derivado cetónico (columnas 1 y 4; 2 y 5; 3 y 6, **Tabla 2.2**).

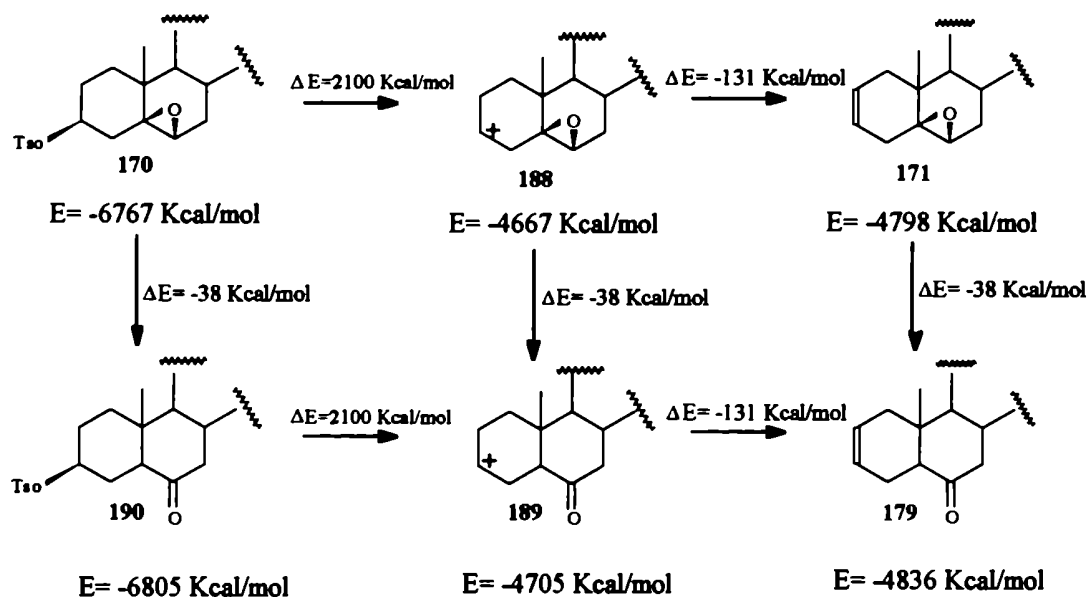


Figura 2.16. Diferencias y valores absolutos de energía⁸⁰ para las conformaciones de mínima energía de los compuestos 170, 171, 190 y 179, y para los intermediarios 188 y 189.

Tabla 2.2. Ángulos diedros y de enlace de las moléculas estudiadas.

	Columna	Familia de los epoxidados			Familia de los cetónicos		
		1	2	3	4	5	6
	Ángulos ^a	170	188	171	190	189	179
A N I L L O A	1-2-3	109	113	121	110	116	123
	2-3-4	112	122	122	110	124	123
	3-4-5	113	117	115	108	116	112
	4-5-10	119	118	119	113	113	113
	5-10-1	111	109	110	108	108	109
	10-1-2	115	112	113	113	113	114
	1-2-3-4	64	16	1	57	8	1
	2-3-4-5	-53	15	15	-59	-11	-16
	3-4-5-10	39	-9	3	59	36	46
	4-5-10-1	-33	-25	-32	-55	-57	-59
A N I L L O B	5-10-1-2	43	56	46	52	55	43
	10-1-2-3	-60	-53	-34	-55	-31	-16
	10-5-6	121	122	121	110	110	111
	5-6-7	122	120	121	113	114	115
	6-7-8	112	112	111	112	112	112
	7-8-9	110	111	110	111	112	111
	8-9-10	113	112	113	111	111	111
	9-10-5	111	111	112	107	107	110
	10-5-6-7	-2	-4	-3	-57	-57	-54
	5-6-7-8	24	21	26	51	51	51
B	6-7-8-9	-54	-50	-55	-49	-50	-51
	7-8-9-10	65	64	63	56	57	58
	8-9-10-5	-42	-45	-38	-60	-61	-60
	9-10-5-6	11	15	8	60	60	57

^aEn esta columna se señalan los ángulos -nombrando los carbonos que lo forman- cuyos valores se explicitan (en grados) en las sucesivas columnas.

Lo primero que se observa es que existe una diferencia de energía constante de 38 Kcal/mol entre ambas "familias" (Figura 2.16), lo cual estaría muy relacionado con las tensiones que se originan en el anillo B de la "familia de los epoxidados" debido a los ángulos de enlace de los C-5 y C-6. Estos ángulos tienden a aproximarse a 118°, propio de un epóxido, alejándose de 111° valor del ángulo en un esqueleto carbonado de seis miembros (ver ángulos 10-5-6 y 5-6-7 del anillo B, columnas 1, 2 y 3, Tabla 2.2, y comparar con los correspondientes en las columnas 4, 5 y 6). Por otro lado, esto afecta los ángulos diedros de todo el anillo deformándolo, pero principalmente el 10-5-6-7 que

tiende a ponerse plano (ver ángulos 10-5-6-7, 5-6-7-8 y 9-10-5-6 del anillo B, columnas 1, 2 y 3, **Tabla 2.2** y comparar con los correspondientes en las columnas 4, 5 y 6). Además, el sustituyente de C-6 está *cuasi*-ecuatorial lo que denuncia una rotación del enlace entre C₅-C₆ al formar el epóxido (ver **Figura 2.17**). Todos estos factores, que introducen tensiones y deforman el anillo B de la "familia de los epoxidados", son prácticamente inexistentes en la "familia de los cetónicos", observándose que tanto los ángulos de enlace como los diedros se mantienen en valores cercanos a los correspondientes a un esqueleto carbonado de seis miembros (ver anillo B, columnas 4,5 y 6, **Tabla 2.2**). Esta diferencia conformacional se observa gráficamente en las **Figuras 2.18 y 2.19**, donde se muestran las estructuras de mínima energía de ambas familias. Comparando la **Figuras 2.18 y 2.19** se observan dos cosas: la primera es que la silla del anillo B de la "familia de los cetónicos" no se deforma mucho a pesar del carbonilo. La segunda es que, dentro de cada una de las "familias", la forma del anillo B no varía mayormente.

Observemos ahora los valores de los ángulos para el anillo A. Este se deforma principalmente sobre el C-3 de ambas familias al convertirse primero en un carbocatión (**188 y 189**) y luego en una olefina (**171 y 179**), haciendo que su ángulo de enlace tienda a 120° (ver ángulo 2-3-4 del anillo A comparando la columna 1 con la 2 y 3, y la columna 4 con la 5 y 6; **Tabla 2.2**). El aplanamiento de ese lado del anillo se confirma por el valor que toman los ángulos 1-2-3-4 y 2-3-4-5 del anillo A dentro de cada "familia" (ver **Tabla 2.2**). Al comparar las **Figuras 2.20 y 2.21** se observa que los cambios estructurales del anillo A durante las transformaciones del tosilato (**170 y 190**) al carbocatión (**188 y 189**), y de éste al producto de eliminación (**171 y 179**), son similares para ambas "familias".

En definitiva llegamos a la siguiente conclusiones:

1- La deformación del anillo B producida por la presencia del epóxido aumenta la energía de la "familia de los epoxidados", en 38 Kcal/mol respecto de la "familia de los cetónicos" (ver **Figura 2.16**). Esta diferencia es constante debido a que las modificaciones en el anillo A no alteran sustancialmente la forma del anillo B.

2- La diferencia de energía de 2100 kcal/mol que existe para la obtención de la especie carbocatónica y de 131 kcal/mol para obtener la olefina, se repite para cada "familia" (ver **Figura 2.16**). Esto indicaría que tales diferencias se deben exclusivamente a las transformaciones sufridas por el anillo A, ya que dentro de cada "familia" la forma del anillo B no se modifica.

Para confirmar totalmente el mecanismo ilustrado en la **Figura 2.12**, debería incluirse un estudio de los estados de transición entre los intermediarios de reacción planteados (**188 y 189**) para obtener la barrera de energía de cada transformación. El

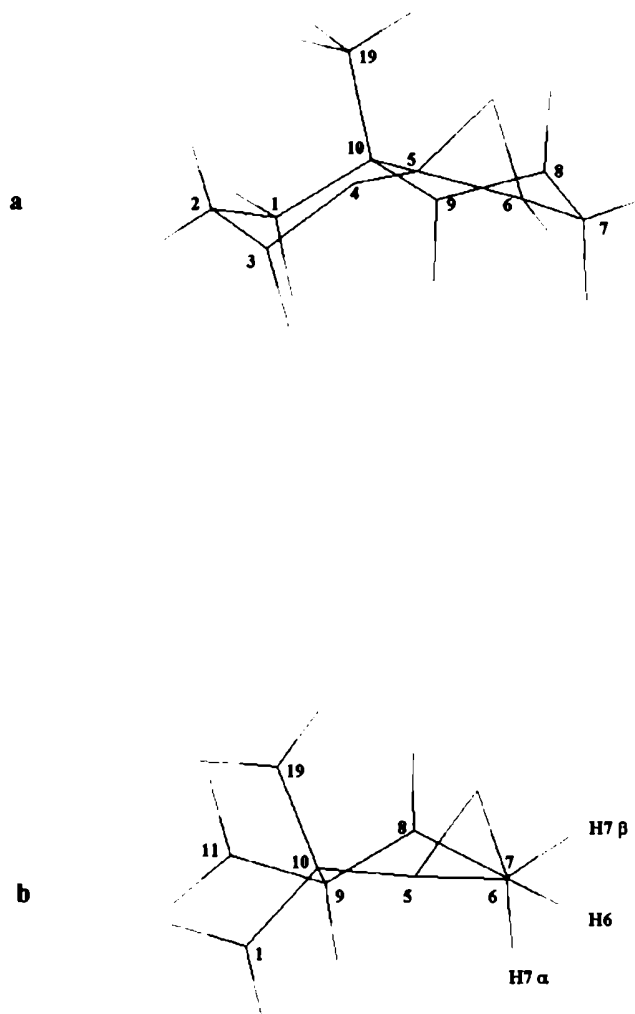


Figura 2.17. Cortes parciales del anillo B del 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (170). **a)** Vista del ángulo diedro 10-5-6-7 donde puede apreciarse su planaridad. **b)** Vista de frente del enlace entre C-6 y C-7 donde puede apreciarse la posición *cuasi*-ecuatorial del H-6 entre los H-7 α y H-7 β , axial y ecuatorial respectivamente.

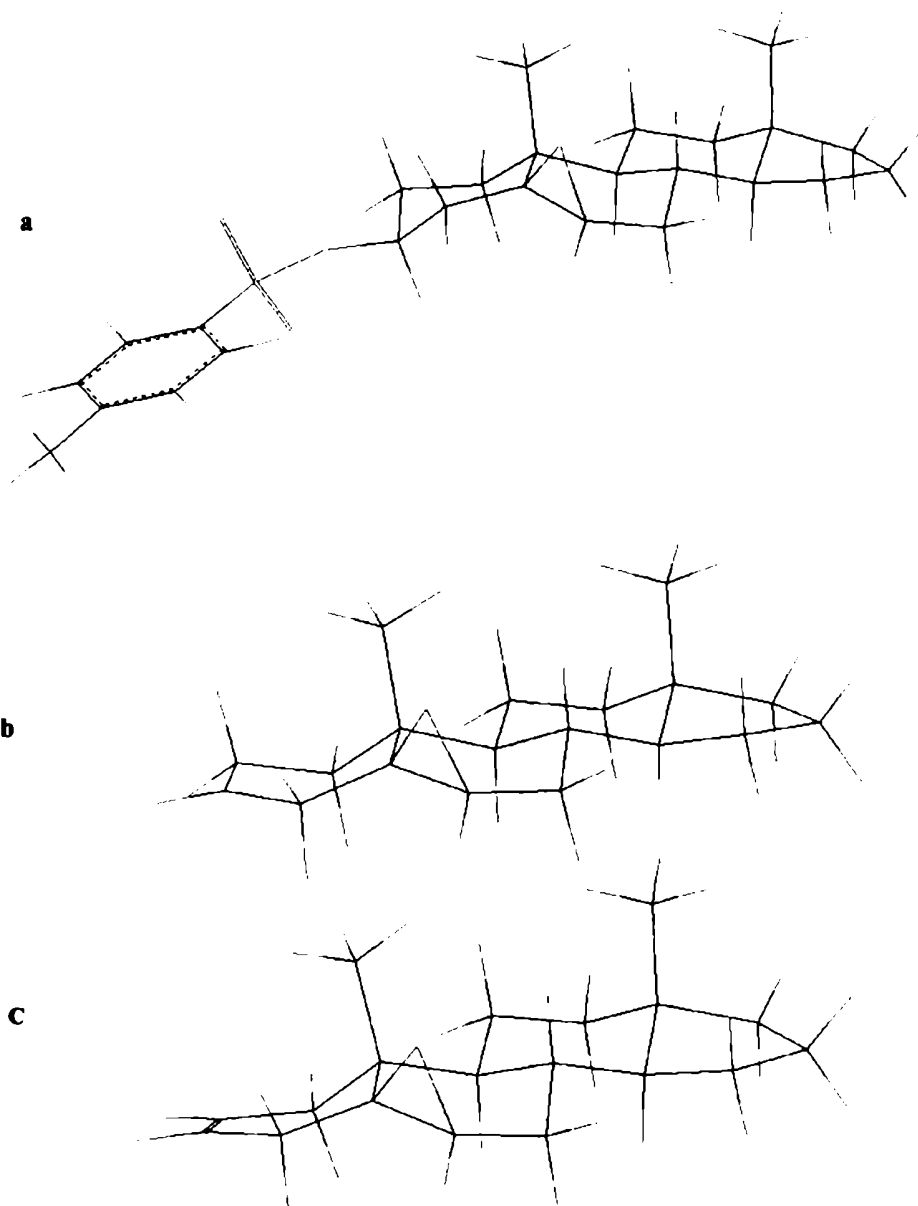


Figura 2.18. Estructuras de mínima energía de la "familia de los epoxidados": **a)** 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmasta-22-eno (**170**); **b)** carbocatión 5 β ,6 β -epoxidado intermedio (**188**); **c)** 5 β ,6 β -epoxiestigmast-2,22-dieno (**171**). Se puede observar que la forma del anillo B prácticamente no varía. Además, se aprecia la diferencia con el anillo B de la familia de los cetónicos ilustrados en la **Figura 2.19**.

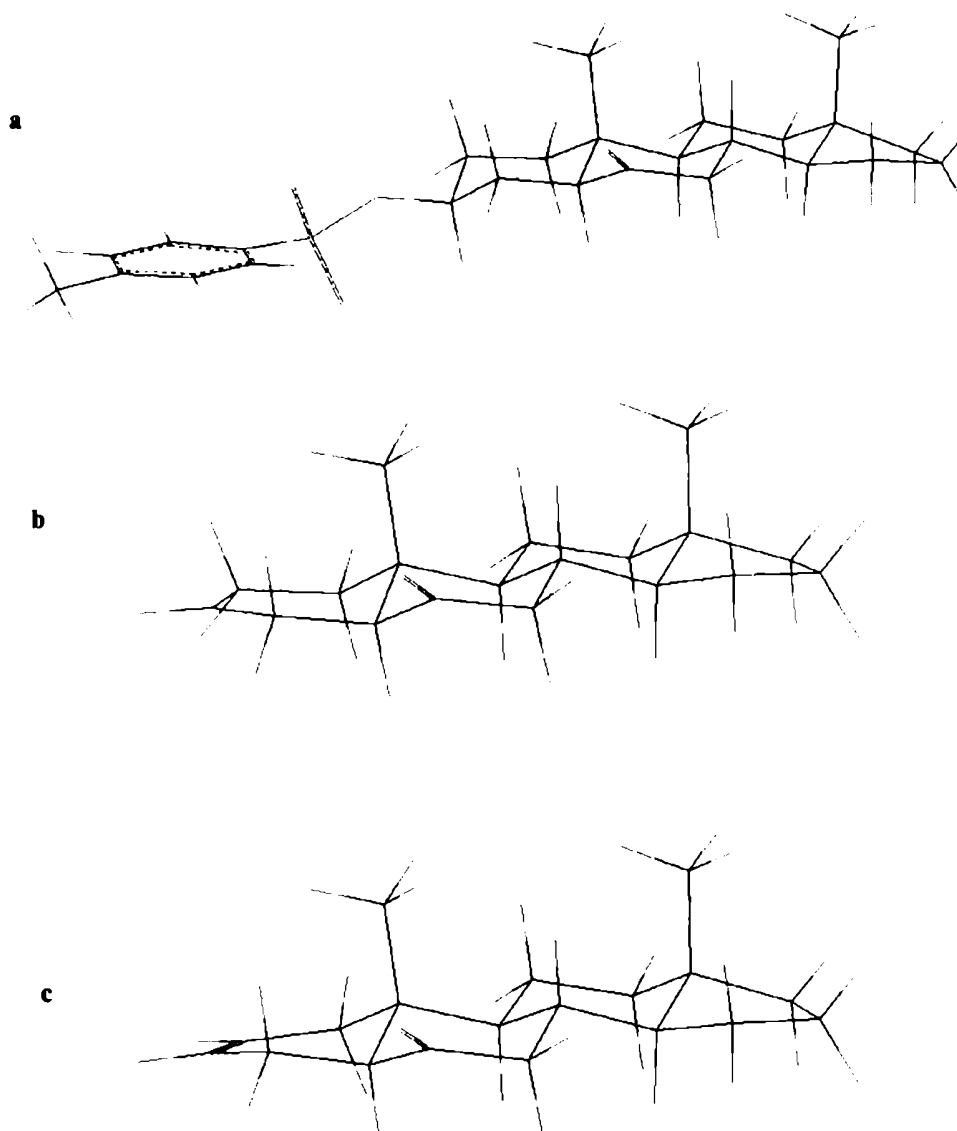


Figura 2.19. Integrantes de la "familia de los cetónicos". a) 3β -tosiloxiestigmast-22-en-6-ona (190); b) carbocatión cetónico intermediario (189); c) estigmasta-2,22-dien-6-ona (179). Puede notarse la escasa deformación en el anillo B, que introduce el carbonilo en C-6 respecto de la silla. Además, se aprecia la diferencia con el anillo B de la familia de los epoxidados ilustrados en la **Figura 2.18**.

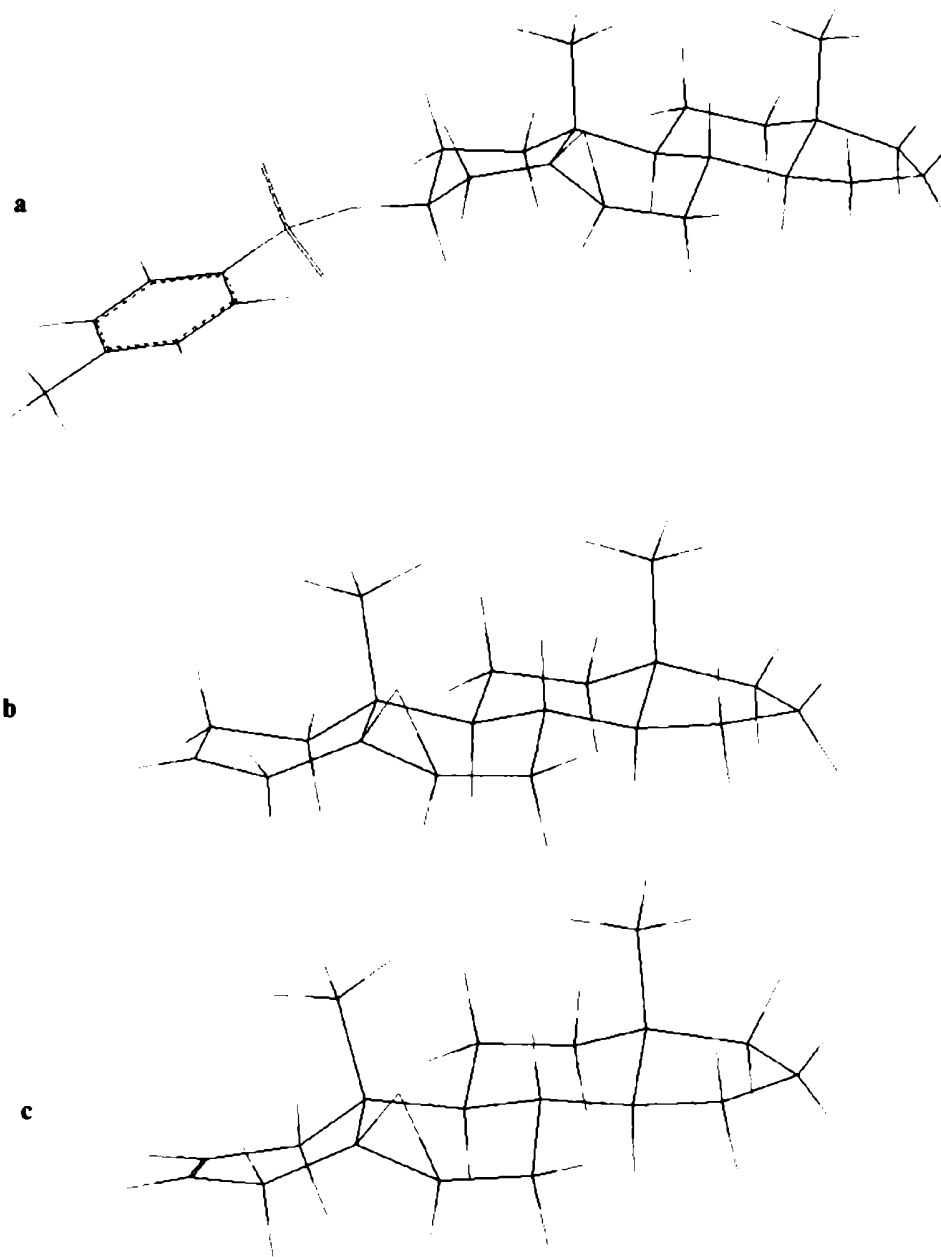


Figura 2.20. Estructuras de mínima energía de la "familia de los epoxidados": **a)** 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**170**); **b)** carbocatión 5 β ,6 β -epoxidado intermediario (**188**); **c)** 5 β ,6 β -epoxiestigmast-2,22-dieno (**171**). Se aprecian los cambios en el anillo A consistentes en el aplanamiento sucesivo del ángulo de enlace del C-3.

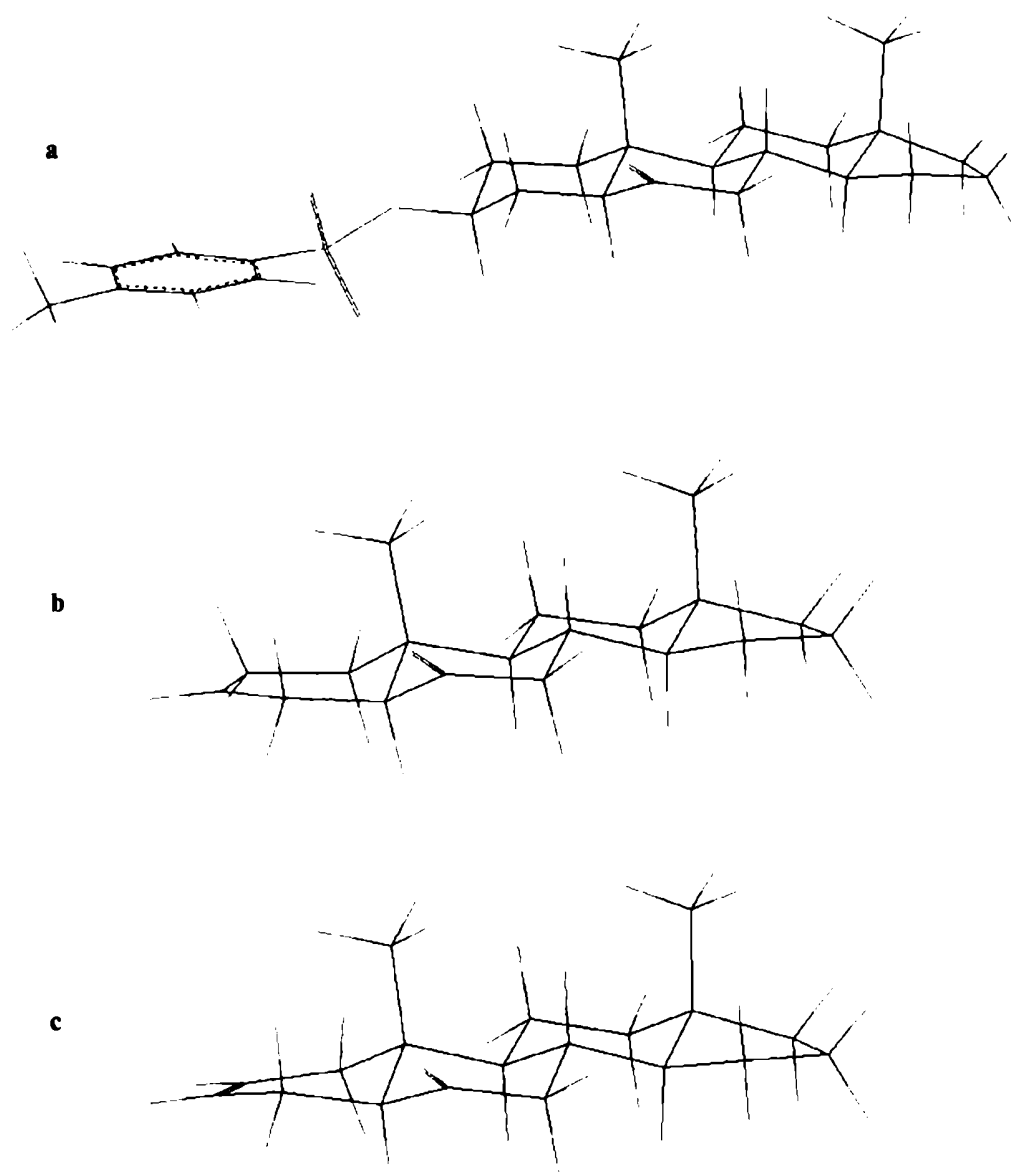
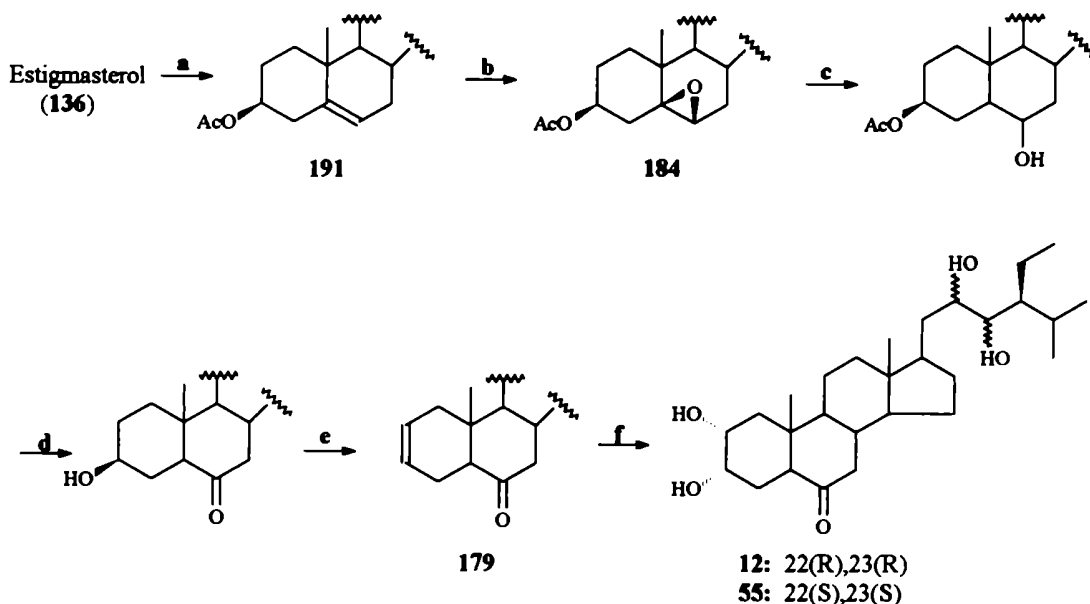


Figura 2.21. Integrantes de la "familia de los cetónicos". a) 3β-tosiloxiestigmasta-22-en-6-ona (190); b) carbocatión cetónico intermediario (189); c) estigmast-2,22-dien-6-ona (179). Los cambios son similares a los de la "familia de los epoxidados".

presente estudio constituye, entonces, un estudio preliminar que apoya el mecanismo de reordenamiento intramolecular, propuesto en la **Figura 2.12**, entre una especie de mayor energía (**188**) y otra más estable (**189**). Sin embargo, no se puede con estos únicos elementos confirmar dicho mecanismo.

2.2.2.2. Apertura reductiva del 5 β ,6 β -epóxido (paso c, **Figura 2.22**).



a. (AcO)₂/Py b. CrO₃/(AcO)₂O c. hidruro d. 1-CCP; 2-KOH/etanol e. base/ Δ f. OsO₄/NMO.

Figura 2.22. Nueva estrategia propuesta para la síntesis de la 24-homoetilcastasterona (**12**).

Ante la imposibilidad de llevar a cabo la reacción de eliminación deseada bajo las condiciones ilustradas en el **Figura 2.3** (pag. 60), se decidió cambiar el enfoque sintético del problema. Se propuso una nueva estrategia que se muestra en la **Figura 2.22** respetando el esquema retrosintético original (ver **Figura 2.2**, pag. 59) y manteniendo las mismas etapas clave. La diferencia fundamental con la primer estrategia sintética consistió en que una vez obtenido el epóxido éste debería transformarse en el grupo 6-ceto, y posteriormente, se eliminaría el grupo de C-3 para obtener el Δ^2 según se muestra en la **Figura 2.22**. Se requería, entonces, encontrar un método apropiado para abrir el epóxido reductivamente y obtener el derivado 5 α -H-6-hidroxilado (ver paso c, **Figura 2.22**),

correspondiente, que luego se transformaría el grupo 5 α -H-6-ceto (ver paso d, Figura 2.22 y Figura 2.23).

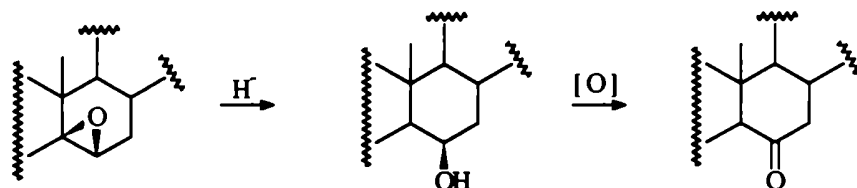


Figura 2.23. Secuencia de apertura reductiva y oxidación para obtener el grupo 6-ceto.

La apertura reductiva de un epóxido ocurre generalmente por medio de un mecanismo *trans-diaxial*. En el caso de la apertura reductiva del β -epóxido, la obtención de un β -hidroxilo axial en C-6 sería resultado del ataque de un hidruro sobre el C-5 del β -epóxido. Sin embargo, la existencia de antecedentes de apertura de epóxidos que no transitan este mecanismo⁸³ nos llevó a un exhaustivo estudio de las condiciones de reacción. Por otro lado, el 5 β ,6 β -epóxido de partida debía estar libre de contaminación con α -epóxido, ya que la apertura reductiva de éste daría como resultado un 5 α -hidroxi-compuesto, producto de la apertura *trans-diaxial* por el ataque de un hidruro sobre C-6, según se muestra en la Figura 2.24.

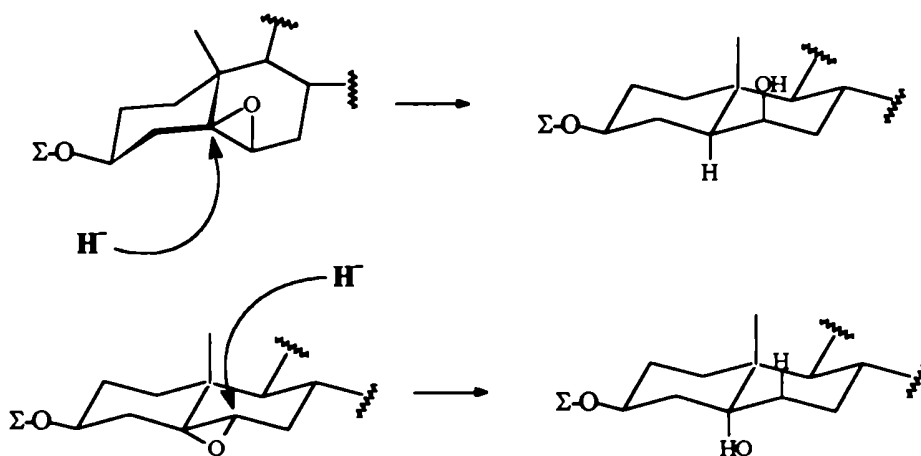


Figura 2.24. Productos de apertura *trans-diaxial* de α y β epóxidos esteroidales.

El 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (170) no podía ser utilizado como sustrato debido a la labilidad del tosilo frente a condiciones nucleofílicas reductivas

fuertes. Debido a que la β -epoxidación directa sobre el estigmasterol daba muy bajos rendimientos, se utilizó, entonces, el 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**) obtenido por epoxidación regioselectiva del derivado acetilado del estigmasterol (**191**), según se relató anteriormente en la sección 2.2.1 del presente Capítulo (pag. 60). En la Figura 2.25 se muestran los distintos productos de epoxidación obtenidos sobre el sustrato acetilado, con sus correspondientes rendimientos.

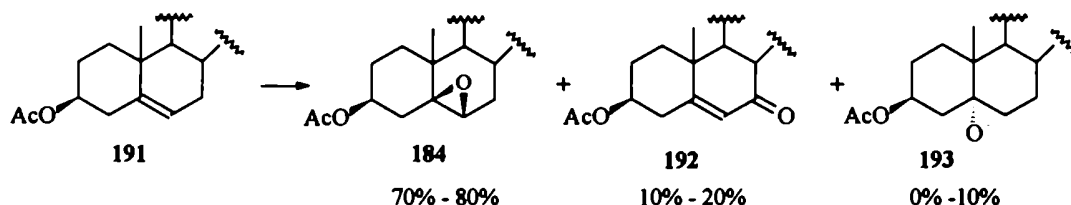


Figura 2.25. Productos de epoxidación del acetato de estigmasterol (**191**) con acetato de cromilo.

Posteriormente, la aparición en literatura de otra reacción de epoxidación estereo y regioselectiva que utilizaba una mezcla de sulfato de cobre y permanganato de potasio como reactivos, en una reacción en fase heterogénea con *t*-butanol como agente de transferencia de fase⁸⁴ y agua en cantidades catalíticas, permitió obtener rendimientos similares a los obtenidos con acetato de cromilo, con la ventaja de no generar los subproductos de oxidación alílica. Estos factores unidos a su mayor facilidad operativa hicieron que se utilizara preferentemente como método de epoxidación.

Al utilizar **184** como sustrato de la apertura reductiva se esperaba obtener el 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (**186**) como producto previo a la apertura reductiva del epóxido (ver Figura 2.26). Una vez detectadas las condiciones de apertura reductiva del epóxido se buscaría un grupo protector más apropiado que el acetato, que luego pudiera ser eliminado fácilmente (ver sección 2.2.2.3.3 del presente Capítulo, pag. 94).

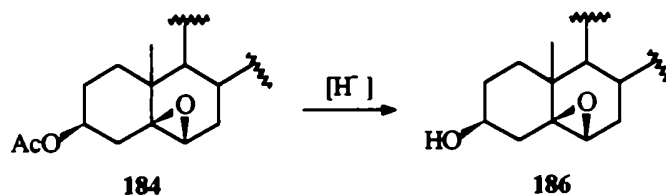


Figura 2.26. Reducción del acetilo de C-3 con hidruro.

Los primeros ensayos se realizaron con trietilborohidruro de litio (superhidruro[®]-LiB(Et)₃)⁸⁵ en tetrahidrofurano anhidro a distintas temperaturas, en distintas proporciones y con distintos catalizadores (ver **Tabla 2.3**).

Inicialmente se trabajó a temperatura ambiente, observándose inmediatamente la reducción del grupo acetilo, dejando libre el hidroxilo de C-3 (entrada 1, **Tabla 2.3**). Aumentando el tiempo de reacción y el número de equivalentes de hidruro los resultados obtenidos fueron los mismos (entradas 2 y 3, **Tabla 2.3**). Se decidió aumentar la temperatura, pero no se observó ningún cambio aún con largos tiempos de reacción (entradas 4 y 5, **Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Condiciones de apertura del 5 β ,6 β -epóxido con trietilborohidruro de lito.

N	nº equivalentes de. H ⁻	Temperatura (°C)	tiempo (h)	producto	catalizador
1	2	t. a.	1.5	186	ninguno
2	4	t. a.	1	186	ninguno
3	4	t. a.	18	186	ninguno
4	4	Reflujo	2	186	ninguno
5	6	Reflujo	20	186	ninguno
6	6	Reflujo	3.5	186	I ₂ /Zn
7	10	Reflujo	12	186	I ₂ /Zn

Finalmente, se agregó ioduro de zinc, un ácido de Lewis, para intentar facilitar la apertura del epóxido, de manera tal que actuara como catalizador electrofilico debilitando el enlace C-O⁸⁶. Ni aún a reflujo y con largos tiempos de reacción se obtuvo otro producto distinto al de reducción del acetato (entradas 6 y 7, **Tabla 2.3**).

La conformación *cuasi* ecuatorial de los sustituyentes de C-5 y C-6 hacen que el anillo A se repliegue sobre la cara α de tal forma que cualquier reactivo que se acercarse al C-5 por la cara inferior se encontraría con el impedimento estérico que representa el anillo A por un lado, y los C-7 y C-9 por el otro. La **Figura 2.27** ilustra la conformación de mínima energía del 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiandrostando estructura esteroideal que representa perfectamente la situación presentada con el compuesto **184**.

Seguidamente, se realizaron intentos de apertura con hidruro de litio y aluminio como agente reductor menos voluminoso⁸⁷. Los resultados se resumen en la **Tabla 2.4**. A temperatura ambiente y sin catalizador sólo se redujo el acetilo de C-3 (**186**) (entrada 1,

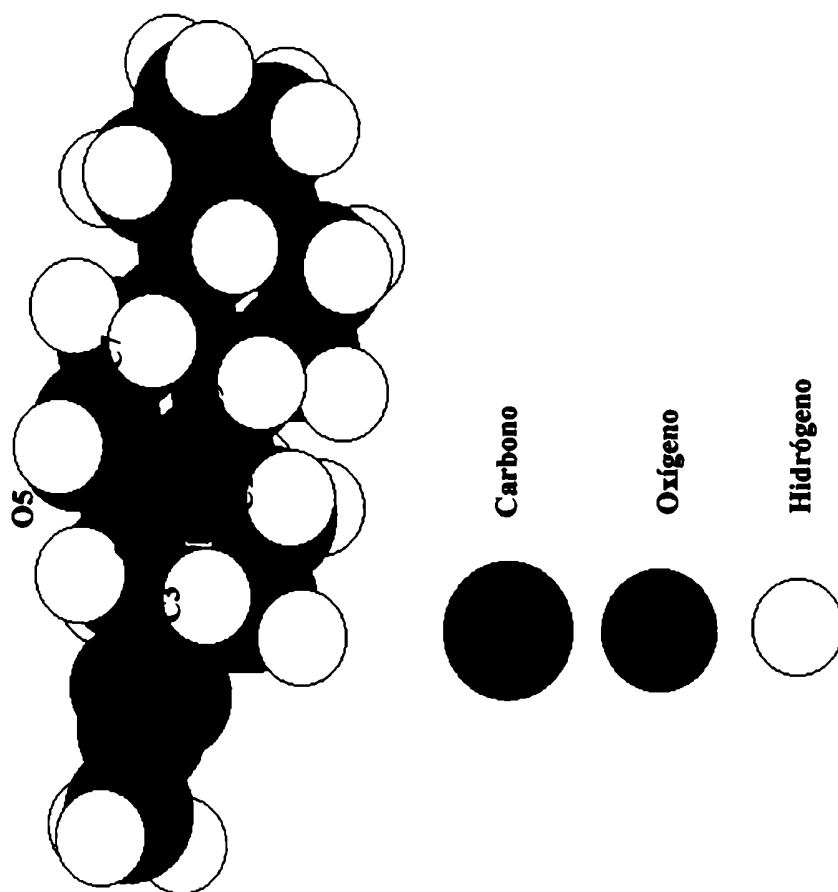


Figura 2.27. Molécula de 3β-acetoxi-5β,6β-epoxiandrostanol observada desde la cara α. Los C-1, C-3 y C-4 del anillo A y los C-6, C-7 y C-9 del anillo B, rodean al C-5 bloqueando el acceso a cualquier grupo que se acercase por la cara α.

Tabla 2.4). Pero al someter la mezcla de reacción a condiciones más energéticas, aumentando la temperatura y el tiempo de reacción, se obtuvo una mezcla 1:1 de estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (**194**) y estigmast-22-en-3 β ,5 β -diol (**195**), resultado del ataque del hidruro a C-5 y C-6 respectivamente (ver **Figura 2.28**).

Tabla 2.4. Condiciones de apertura del epóxido con hidruro de litio y aluminio.

N	catalizador	tiempo (h)	temperatura (°C)	productos	% de conversión
1	ninguno	5	t. a.	186	100
2	ninguno	18	reflujo	194,195 (1:1)	100
3	I ₂ /Zn	5	reflujo	194,195 (2.5:1)	100
4	I ₂ /Zn	18	reflujo	194,195 (1:1)	100
5	AlCl ₃ ^a	2	0	194,195 (2.5:1)	60
6	AlCl ₃ ^a	3	t. a.	194,195 (3:1)	100
7	AlCl ₃ ^a	2	reflujo	194,195 (2.5:1)	100

^a LiAlH₄: AlCl₃ (1:2).

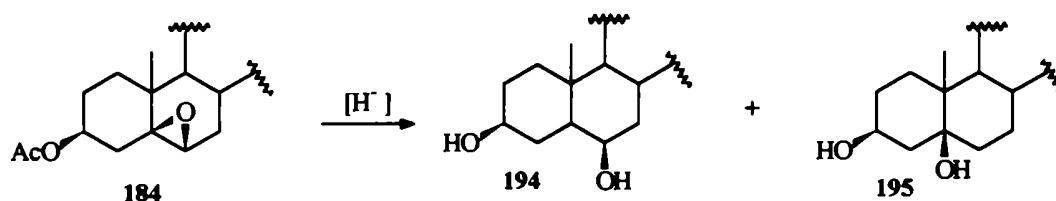


Figura 2.28. Productos de reacción **184** con hidruro de litio y aluminio.

El espectro de masa del compuesto **194** confirma su peso molecular y muestra la señal correspondiente a la pérdida de una molécula de agua $[M-H_2O]$. Por otra parte, la posición del Me-19 muy desprotegido, en el espectro de RMN-¹H, sugiere la existencia de

un 6β -hidroxilo⁷⁹, hecho que se confirma por la señal aguda del $H-6\alpha$ indicando interacciones propias de un hidrogeno ecuatorial⁶⁸.

El espectro de masa de 195 permite determinar que se trata de un diol de peso molecular 430. Por otro lado, la comparación de sus espectros de RMN-¹³C común y DEPT indica que uno de sus hidroxilos se encuentra sustituyendo carbono cuaternario (C-5). Además, su espectro de RMN-¹H muestra una única señal de protón geminal a hidroxilo perteneciente al de C-3, por lo tanto el hidroxilo restante sólo puede estar en C-5 (ver **Figura 2.29**). La confirmación de la configuración 5β se realizó en base a las siguientes observaciones:

1- En el espectro de RMN-¹H la señal del H-3 se presenta como una banda aguda, propia de una conformación ecuatorial⁶⁸, hecho que corresponde a un esqueleto esteroidal con fusión A/B cis.

2- El espectro de IR indica que el par de hidroxilos de C-3 y C-5 están formando un puente de hidrógeno intramolecular ya que su señal de estiramiento O-H está desplazada hacia números de onda menores (3300 cm^{-1})⁸⁸. Conocida la configuración β del hidroxilo de C-3, esta situación sólo puede darse tratándose de una estructura 5β -hidroxilada, tal como se confirma posteriormente por modelado molecular (ver **Figura 2.30**).

3- La asignación de las señales del espectro de RMN-¹³C también aporta datos que apoyan esta estructura⁸⁹. En literatura se indica que la configuración A/B cis produce una interacción del hidrógeno de C-9 con los hidrógenos axiales de C-2 y C-4 produciendo un corrimiento en la señal de C-9 de aproximadamente 14 ppm a campos más altos (ver **Figura 2.31**). Por otro lado, el hidrógeno axial de C-7 interacciona con el hidrógeno axial de C-4, lo que también protege al C-7 en aproximadamente 7 ppm. Ambos efectos se verifican en el espectro de RMN-¹³C de 195.

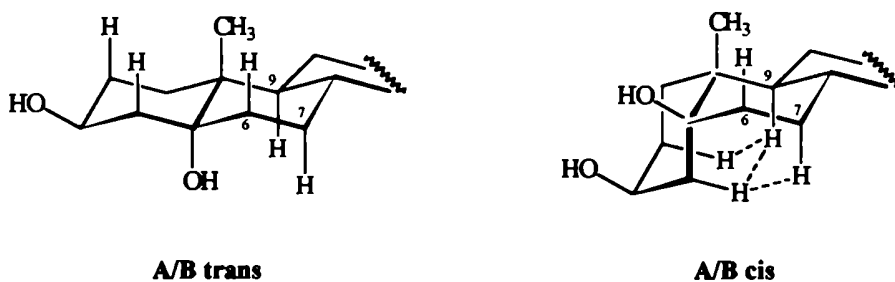


Figura 2.31. Comparación de las interacciones de los hidrógenos de C-7 y C-9 para los $3\beta,5\alpha$ y $3\beta,5\beta$ -dihidroxi esteroides.

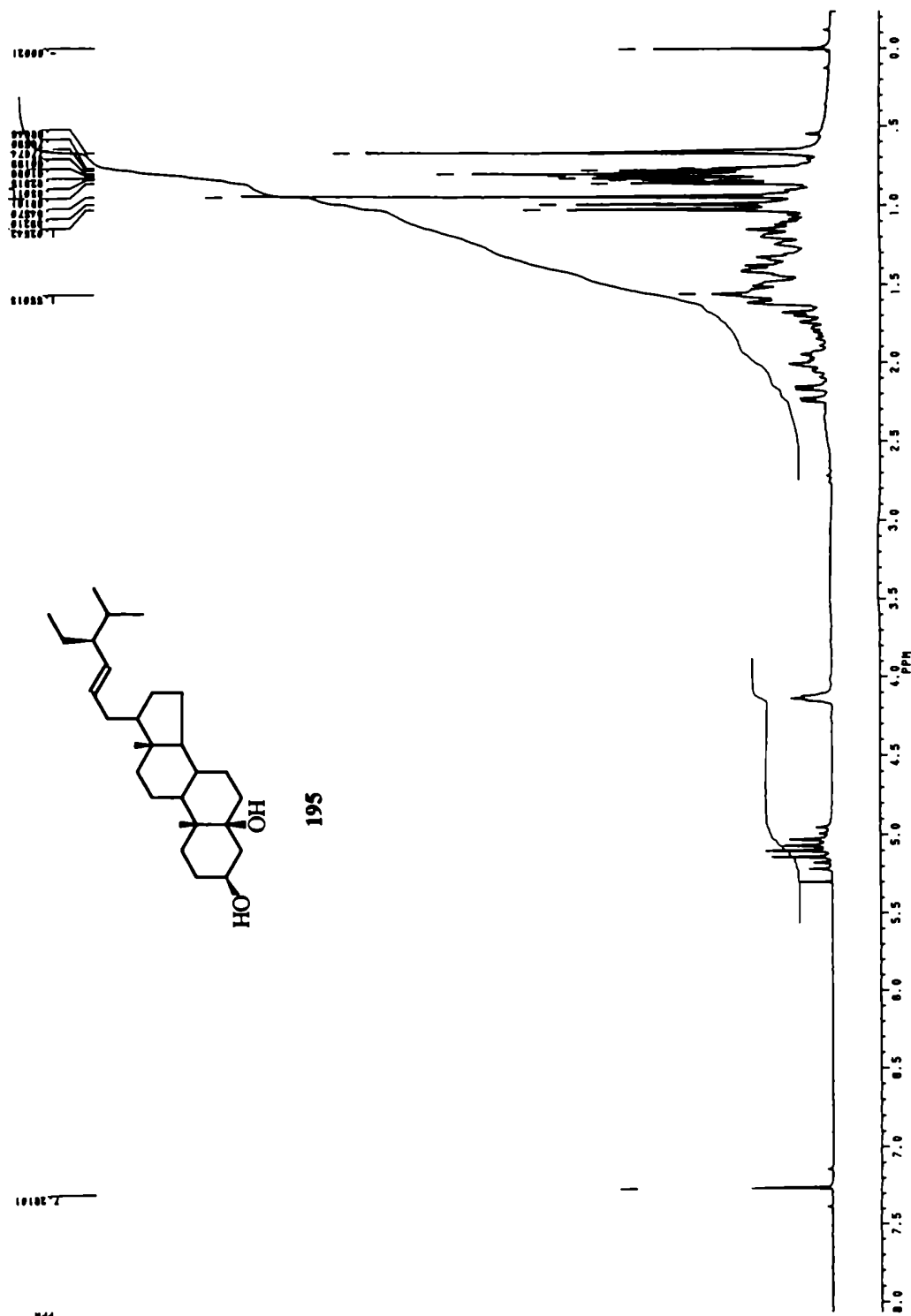


Figura 2.29. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica del estigmast-22-en-3β,5β-diol (195). Se observa una única señal de protón geminal a hidroxilo, perteneciente a H3α-ecuatorial (4,1 ppm), hecho que sólo puede corresponder a un esqueleto esterooidal 5β (A/B-*cis*).

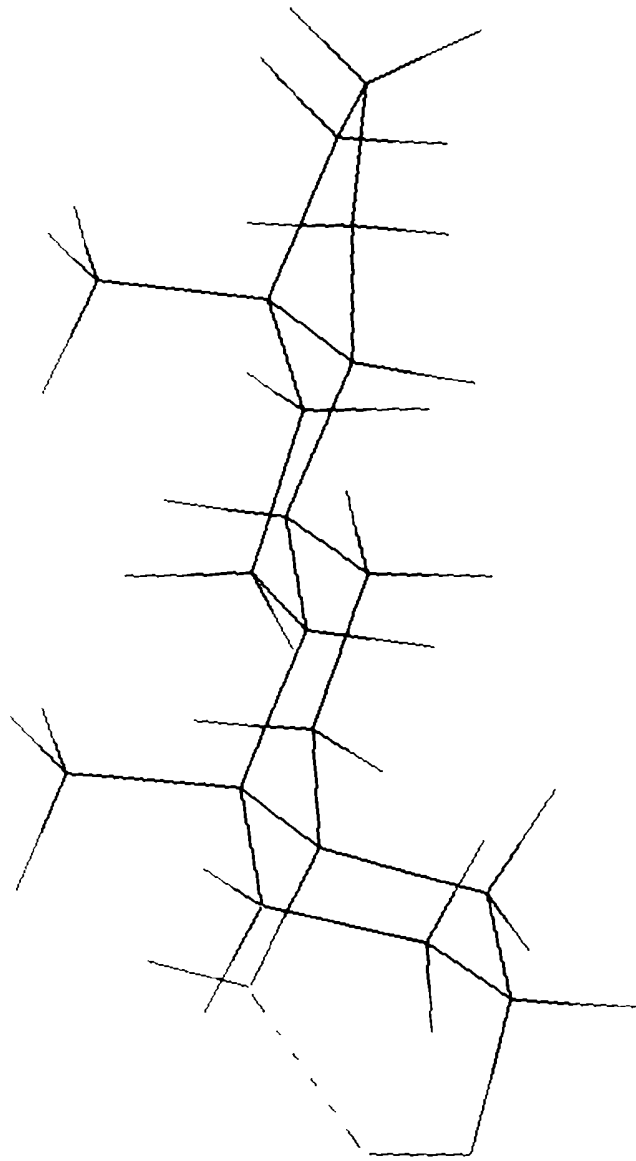


Figura 2.30. Estructura de mínima energía del androstan-3β,5β-diol. Puede apreciarse la proximidad entre el H-3 y el O-5, formando puente de hidrógeno intramolecular. Situación similar se daría en el compuesto 195.

4- Existen además, antecedentes de la obtención del isómero 5 β -hidroxi (A/B cis) en este tipo de reacciones a pesar de la clara violación a la regla de apertura *trans-diaxial* de epóxidos⁸³.

El agregado de ácidos de Lewis⁹⁰ permitió facilitar el ataque del hidruro al C-5 más sustituido y realizar la reacción en condiciones más suaves ya que la catálisis electrofílica debilita la unión C-O del epóxido (ver Figura 2.32). El agregado de ioduro de zinc⁸⁴ permitió llevar la proporción de isómeros 6 β :5 β -hidroxilados de 1:1 a 2,5:1 (entrada 3, Tabla 2.4). Al prolongar el tiempo de reacción se obtuvo el efecto contrario al buscado, es decir la disminución de la proporción de 194 (entrada 4, Tabla 2.4).

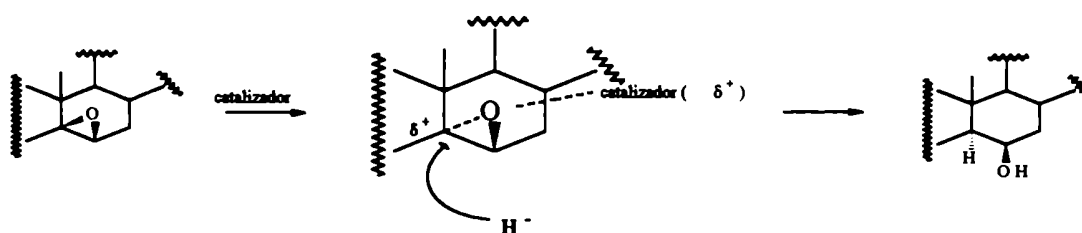


Figura 2.32. Efecto catalítico y regiodirector de un catalizador electrofílico frente a la apertura reductiva del 5 β ,6 β -epóxido.

Se decidió utilizar otro ácido de Lewis, el tricloruro de aluminio (AlCl_3), porque en presencia de hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), forma *in situ* AlH_3 (alano)⁹¹, reactivo reductor que por sus características electrofílicas favorece la formación del alcohol menos sustituido^{91,92}. La siguiente ecuación ilustra la reacción de formación del alano.



La reacción de 184 con $\text{LiAlH}_4:\text{AlCl}_3$ en una relación molar de 3:1 dio sólo el producto 186 de reducción del acetilo de C-3. Se pensó, entonces, agregar un exceso de AlCl_3 a la mezcla de reacción, ya que existía un antecedente de apertura de epóxidos en condiciones similares donde se utilizaba $\text{AlH}_3/2\text{AlCl}_3$ como reactivo para obtener el alcohol sobre el carbono menos sustituido⁹³. Se llevó adelante la reacción a 0°C hallándose que se repetían los resultados que se obtenían con ioduro de zinc como catalizador (entrada 5, Tabla 2.4), pero con bajos porcentajes de conversión recuperándose un 40% del reactivo de partida. Al aumentar la temperatura se obtuvieron mejores resultados, encontrándose que, a

temperatura ambiente, la relación de isómeros 6 β :5 β -hidroxilados era similar pero con un mayor porcentaje de conversión (entradas 6 y 7, **Tabla 2.4**).

Finalmente las mejores condiciones de apertura reductiva resultaron ser las indicadas en la entrada 6 de la **Tabla 2.4**, utilizando un exceso de AlCl₃ y en condiciones suaves de temperatura. Afortunadamente, como se verá en la **sección 2.2.2.3.3** del presente **Capítulo** (pag. 94), el reemplazo del grupo acetilo de C-3 por un grupo *t*-butildimetilsililo permitió obtener **194**, en las mismas condiciones, como único producto.

2.2.2.3. Obtención de la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (197) (paso d, **Figura 2.22).**

La obtención del compuesto **194** como producto de la apertura del epóxido del 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**), demandaba la búsqueda de un grupo protector más apropiado para el hidroxilo de C-3 de **184** (ver **Figura 2.28**, pag. 87). Por otro lado, se desarrollaron alternativas que permitían utilizar el estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (**194**) para proseguir la síntesis, a pesar de la dificultad que constituía el par de hidroxilos indiferenciados en C-3 y C-6 (notar que en el **Figura 2.22**, pag.82, los sustituyentes de C-3 y C-6 están siempre diferenciados).

Los caminos alternativos abordados frente a la necesidad de obtener la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**) (ver **Figura 2.22**, pag 82), a partir del estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (**194**), se detallan en las siguientes secciones.

2.2.2.3.1. Oxidación total y reducción regioselectiva del grupo carbonilo de C-3
(ver **Figura 2.33**, pag. 93).

2.2.2.3.2. Oxidación regioselectiva del grupo hidroxilo en C-6 (ver **Figura 2.34**, pag. 93).

2.2.2.3.3. Protección regioselectiva del grupo hidroxilo en C-3 y posterior oxidación del grupo hidroxilo en C-6 (ver **Figura 2.35**, pag. 94).

2.2.2.3.1. Oxidación total y reducción regioselectiva del grupo carbonilo en C-3.

Esta alternativa consistía en oxidar los dos grupos hidroxilo de **194** para obtener la estigmast-22-en-3,6-diona (**196**) y transformarla en la estigmasta-2,22-dien-6-ona (**179**) directamente⁹⁴ (ver **Figura 2.33**).

La oxidación de **194** con el reactivo de Jones para obtener la dicetona **196** se llevó a cabo sin dificultades. Posteriormente, se convirtió la cetona de C-3 en el doble enlace Δ^2 , por reacción con amalgama de zinc en presencia de cloruro de trimetilsililo (TMSCl)⁹⁴. El rendimiento fue del 50% y no pudo ser mejorado.

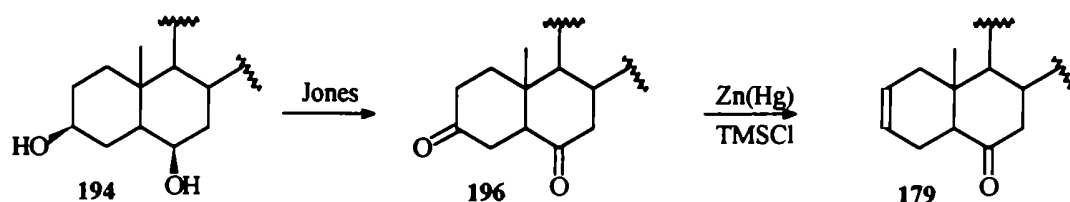


Figura 2.33. Conversión de 194 en 179 por oxidación total de dioles y reducción regioselectiva de C-3.

2.2.2.3.2. Oxidación regioselectiva del grupo hidroxilo en C-6.

Estaba descrita la oxidación mayoritaria del hidroxilo de C-6 de un esteroide 3,6-dihidroxi funcionalizado⁹⁵. Las condiciones que se utilizaron fueron suaves y controladas, obteniéndose los productos ilustrados en el **Figura 2.34**.

El reactivo utilizado para encontrar las condiciones óptimas fue el dicromato de piridonio (DCP) en cloruro de metileno⁹⁶. Con una relación de DCP/esteroide de 1:1 quedaba siempre esteroide de partida sin reaccionar; por otro lado, con una relación de 2:1 la 6 β -hidroxiestigmast-22-en-3-ona (198) desaparecía a expensas de una mayor proporción de estigmast-22-en-3,6-diona (196), permaneciendo prácticamente inalterada la proporción de la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (197). Finalmente, se encontró que la relación óptima DCP/esteroide era de 1,2:1.

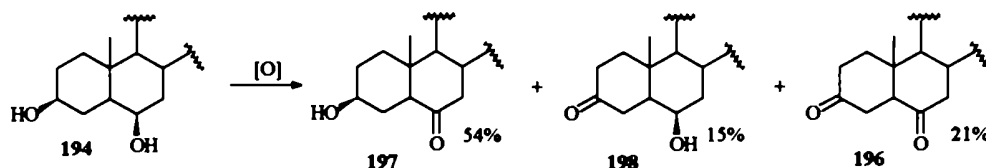


Figura 2.34. Productos de oxidación del 3 β ,6 β -dihidroxiestigmastan-22-eno (194).

No se encontró efecto de importancia al variar el solvente⁹⁷. Finalmente, bajo las condiciones óptimas encontradas la proporción de productos 197:198:196 resultó ser 3,6/1/1,4, con un porcentaje de conversión del 100%.

El rendimiento de la reacción y la obtención de subproductos en cantidades importantes nos llevaron a buscar otras estrategias que permitieran obtener la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (197) con mejores resultados.

2.2.2.3.3. Protección regioselectiva del grupo hidroxilo en C-3 y posterior oxidación del grupo hidroxilo en C-6.

En este caso teníamos dos opciones: proteger el hidroxilo de C-3 antes de la apertura o hacerlo *a posteriori* de esta reacción haciendo uso de una reacción de protección regioselectiva del hidroxilo de C-3 (ver Figura 2.35).

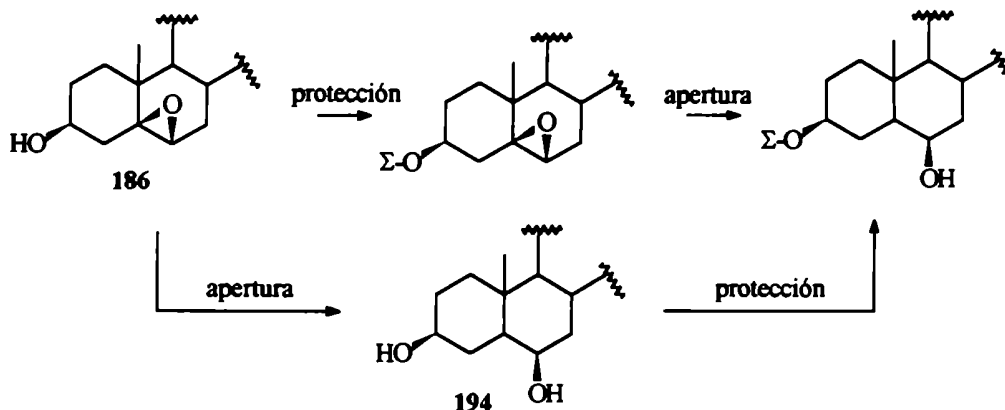


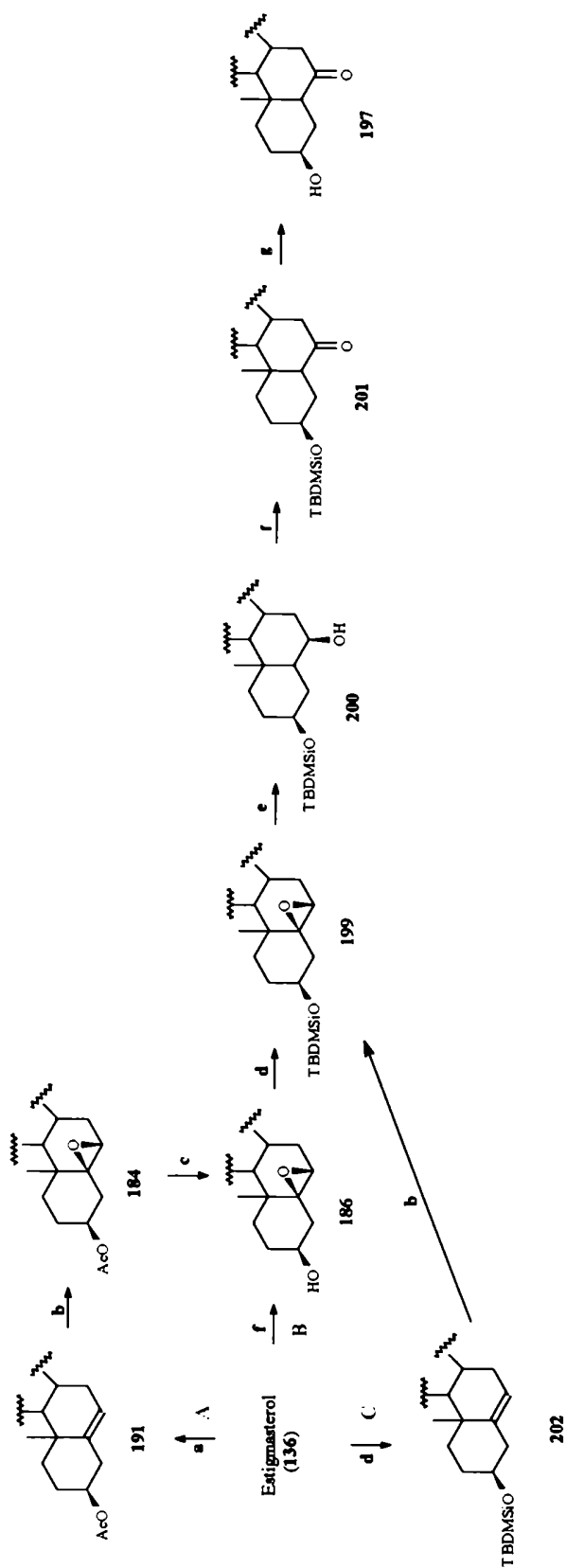
Figura 2.35. Distintas alternativas para la obtención del estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (194) protegido en C-3.

Pasaremos a detallar entonces, las alternativas ilustradas en el Figura 2.35, denominándolas: *i) secuencia protección/apertura* y *ii) secuencia apertura/protección*.

i) Secuencia protección/apertura:

Como mencionamos anteriormente se realizó un estudio para determinar el grupo protector más apropiado que resistiera las condiciones de apertura reductiva del β -epóxido y que luego pudiera ser eliminado para obtener el enlace olefinico en el anillo A. Asumiendo que los éteres de silicio serían los más apropiados por su resistencia a condiciones nucleofílicas de reacción y su relativa facilidad de remoción, se eligió el cloruro de *t*-butildimetilsililo (TBDMSiCl) como grupo protector⁹⁸. Este grupo podía ser luego fácilmente removido con sales de flúor o ácido acético diluido⁹⁹.

La estrategia seguida se ilustra en la Figura 2.36 (parte A). La idea consistía en sintetizar el 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxistigmast-22-eno (184) y posteriormente cambiar el grupo protector del hidroxilo de C-3, por un grupo TBDMSiloxi. Para ello se eliminó el grupo acetato de 184 reductivamente con una conversión del 100% (ver Figura 2.36 parte A y Tabla 2.4, entrada 1, pag. 87). Estas condiciones fueron preferidas frente al método clásico de saponificación con hidróxido de potasio al 2%, que presentaban



a. (AcO)₂O/Py **b.** CrO₃/(AcO)₂O **c.** LiAlH₄ **d.** TBDMSOTf/DMF **e.** LiAlH₄/AlCl₃ **f.** KMnO₄/CuSO₄ **g.** PCC **h.** (Bu)₄N⁺F⁻/THF

Figura 2.36. Estrategias de protección del hidroxilo de C-3 antes de la apertura reductiva del 5β,6β-epóxido.

rendimientos del 50%. Una vez obtenido el compuesto **186** se trataba con TBDMSiCl/Imidazol/DMF⁹⁸ a temperatura ambiente por 24 hs, obteniéndose exclusivamente el producto **199**, con un 100% de conversión. Así protegido el hidroxilo de C-3, se procedió a la apertura del epóxido como se indicó anteriormente (entrada 7, **Tabla 2.4**, pag. 87) obteniéndose el 3 β -*t*-butildimetilsiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (**201**) como único producto. En este caso, el voluminoso grupo *t*-butildimetilsililo forzaría el ataque del hidruro exclusivamente hacia el C-5, minimizando las interacciones repulsivas del tipo 1,3-transdiaxiales en el producto final. En las **Figuras 2.37** y **2.38** se ilustran, sobre compuestos modelo, las interacciones repulsivas para las dos alternativas de reacción.

La apertura del sustrato acetilado (**184**), bajo esas mismas condiciones daba como producto final una mezcla resultante del ataque del hidruro en C-5 y C-6 debido al tamaño más pequeño del grupo acetilo (ver **Tabla 2.4**, **Figura 2.28**, pag. 86).

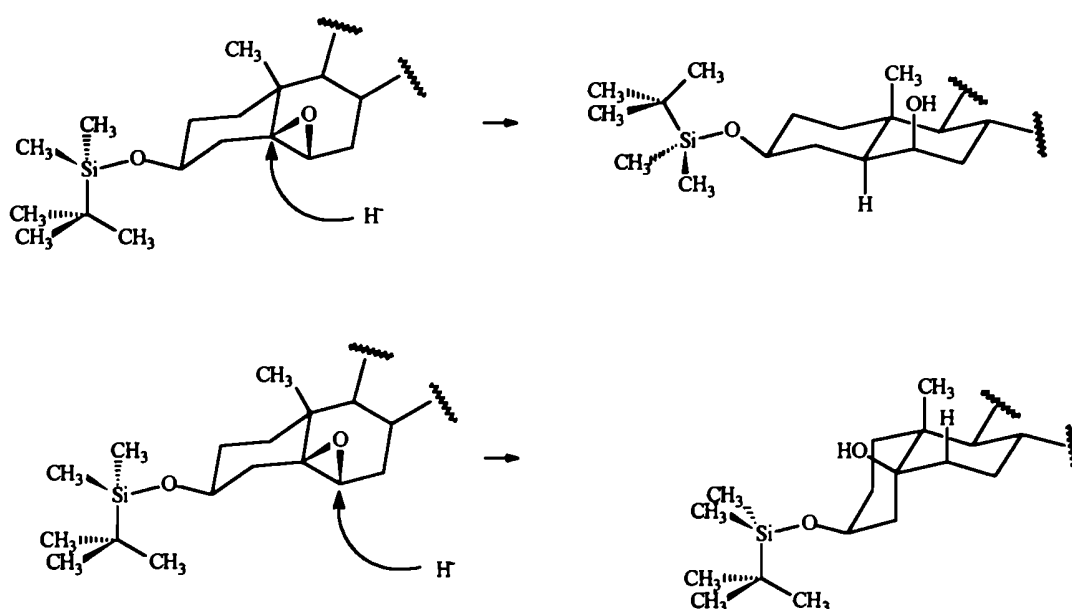


Figura 2.37. Distintas alternativas de ataque del hidruro en la apertura del 5 β ,6 β -epóxido de una estructura esteroidal con el voluminoso *t*-butilidimetilsililo en C-3 β .

Otra alternativa consistía en epoxidar directamente el estigmasterol (**136**) (parte **B**, **Figura 2.36**). Para evitar un gran número de subproductos derivados de la oxidación del hidroxilo de C-3 con CrO₂(AcO)₂⁶¹ se utilizó la reacción en fase heterogénea, con

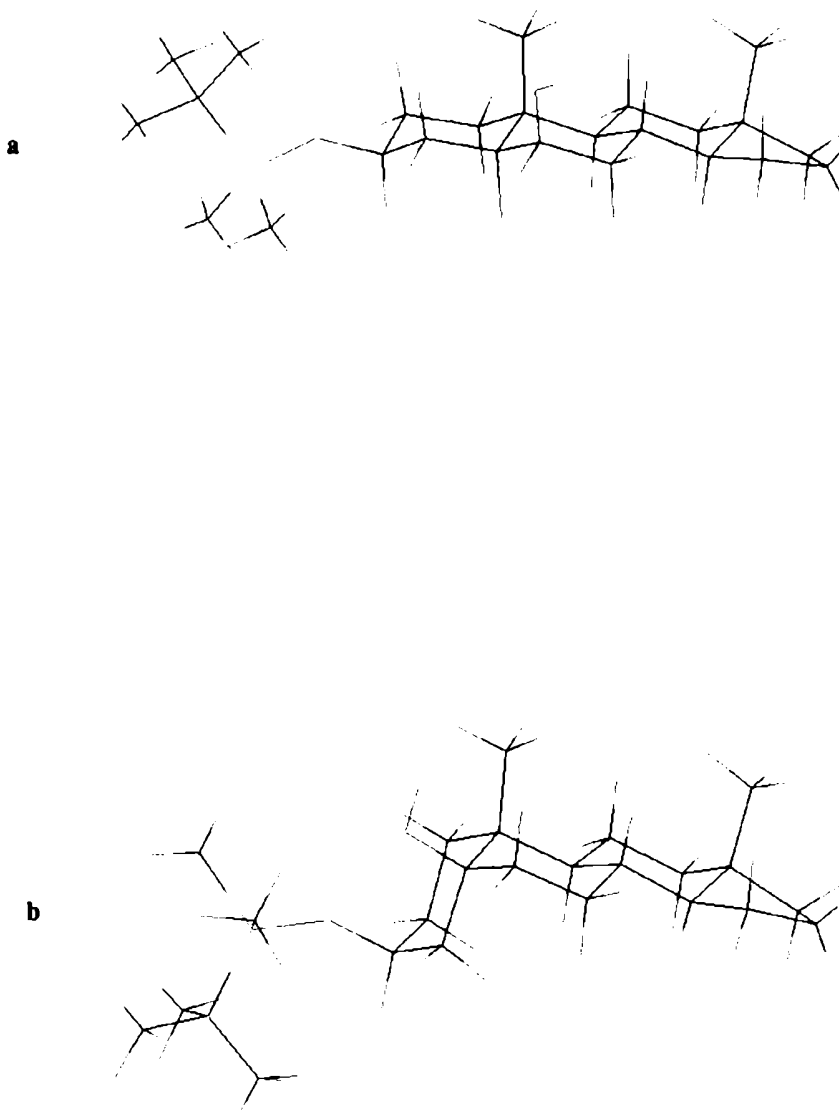


Figura 2.38. Estructura de mínima energía de los análogos androstánicos de: **a)** 3β-*t*-butyldimethylsilyloxyandrostane-6β-ol y **b)** 3β-*t*-butyldimethylsilyloxyandrostane-5β-ol. Pueden apreciarse las distintas conformaciones e interacciones 1,3-diaxiales entre los sustituyentes de C-3 y C-5 ó C-6.

permanganato de potasio y sulfato de cobre⁸⁴ en cloruro de metileno como solvente y *t*-butanol como agente de transferencia de fase. En este caso, el epóxido **186** fue el único producto pero los rendimientos no resultaron ser reproducibles variando entre el 20-70%. Otra posibilidad consistía en proteger el hidroxilo de C-3 con un grupo siloxi antes de realizar la epoxidación (ver Figura 2.36, parte C), ya que éste era capaz de resistir condiciones oxidantes. De esta forma se ahorraban los pasos de síntesis que se insumían en cambiar el grupo protector del C-3. Al utilizar acetato de cromilo el rendimiento no superó el 20%; además, se obtuvieron los subproductos de sobreoxidación (ver Figura 2.39). Con el reactivo de epoxidación de permanganato de potasio y sulfato de cobre, no se obtuvieron mejores resultados.

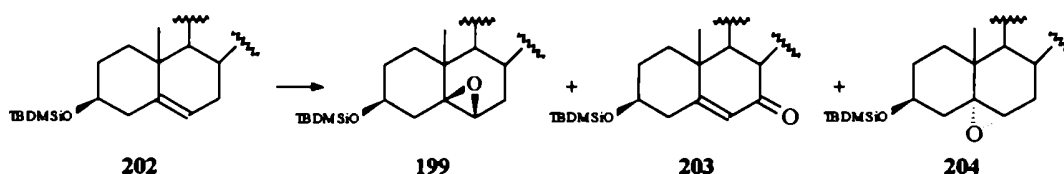


Figura 2.39. Productos de epoxidación del 3β -siloxiestigmast-5,22-dieno (**202**).

Una vez obtenida la diferenciación de ambos hidroxilos de la estructura esteroidal, compuesto **200** (ver Figura 2.36, pag. 95), los pasos siguientes eran oxidar el hidroxilo de C-6 con clorocromato de piridonio⁹⁶ para obtener **201**, y desproteger el de C-3⁹⁹ para obtener la 3β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**). Ambas reacciones fueron cuantitativas y rindieron los productos esperados.

Esta secuencia (parte A, Figura 2.36, pag. 95) resultó ser la más conveniente para la obtención de la 3β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (197**).**

ii) Secuencia apertura/protección:

Según se ha indicado en la Figura 2.35 (pag.94) esta secuencia implica la apertura reductiva del epóxido y posterior protección regioselectiva del hidroxilo de C-3 en presencia del de C-6. Por modelado molecular pudo observarse que, en la conformación de mínima energía del estigmast-22-en- $3\beta,6\beta$ -diol (**194**), el hidroxilo de C-6 se encuentra en un entorno altamente impedido mientras que el de C-3 ecuatorial, se encuentra más expuesto (ver Figura 2.40). El Me-19, en una posición relativa 1,3-diaxial al hidroxilo de C-6, representa una gran obstrucción para cualquier reactivo voluminoso que pudiera utilizarse. Esto hizo pensar que era posible proteger selectivamente el hidroxilo de C-3 con algún reactivo voluminoso como el cloruro de *t*-butildimetilsililo o de *p*-toluensulfonilo.

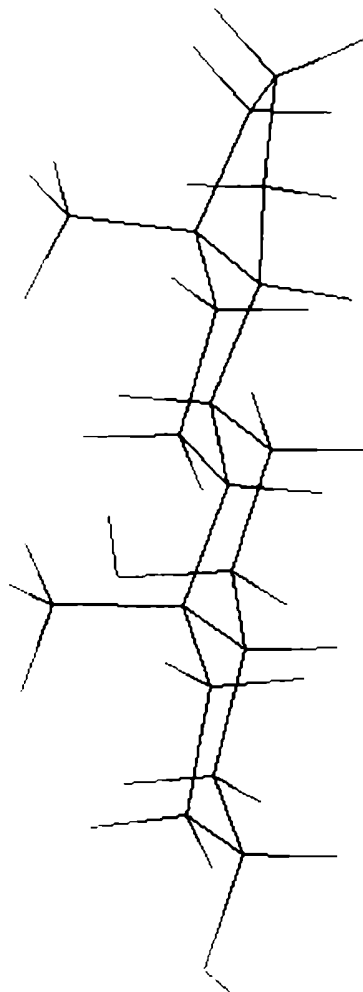
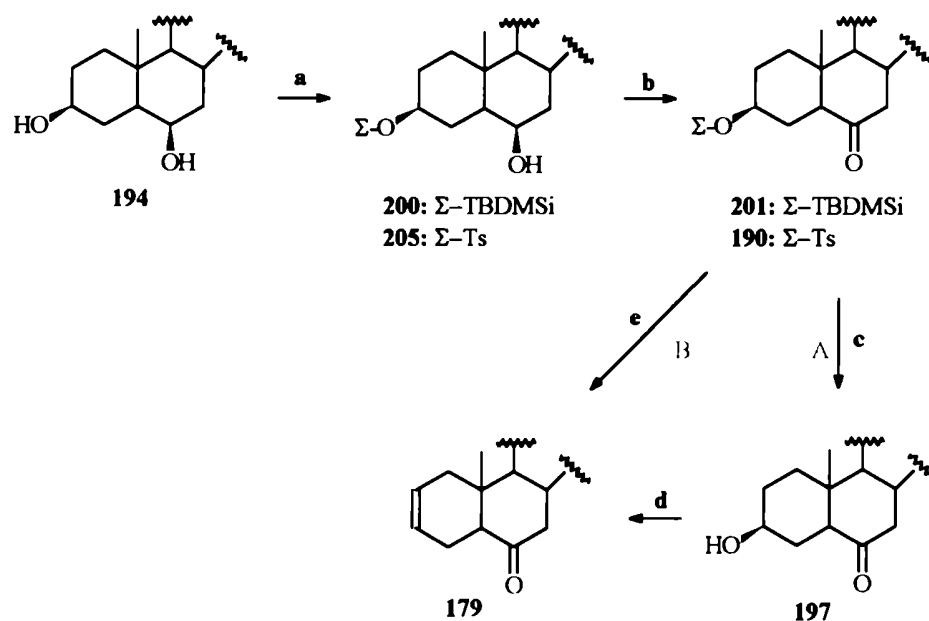


Figura 2.40. Análisis del impedimento estérico diferencial en el entorno de los hidroxilos de C-3 y C-6 sobre el androstan-3β,6β-diol. Situación similar se daría en el compuesto 195.

Por tratamiento del estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (**194**) con TBDMSiCl/Imidazol se pudo obtener el 3 β -*t*-butildimetilsiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (**200**) como único producto, cuya identidad se confirmó por comparación con el obtenido anteriormente (ver Figura 2.36, pag. 95). Luego se oxidó el hidroxilo desprotegido con clorocromato de piridonio (CCP)⁹⁶, y procedió a obtener la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**) (ver parte A, Figura 2.41).

Por otro lado, la tosilación de **194**, para obtener el 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (**205**), y la posterior oxidación con CCP permitió obtener la 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6-ona (**190**). Este producto permitía la obtención directa del compuesto **179** por eliminación del tosilato de C-3, sin tener que obtener el compuesto **197** como precursor (ver parte B, Figura 2.41), estrategia que permitió acortar la síntesis conducente a la obtención de la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**), tal como se ilustra en la Figura 2.22 (pag. 82).



a. TBDMSiCl/Im ó TsCl/Py b. CCP c. Bu₄N⁺F⁻/THF d. 1-MsCl/Py 2-LiBr/DMA/ref. e. LiBr/DMA/ref.

Figura 2.41. Secuencia sintética: estrategia apertura protección.

2.2.2.4. Eliminación del hidroxilo de C-3 (paso e, Figura 2.22).

Una vez obtenida la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**) sólo restaba eliminar el hidroxilo de C-3 para obtener el estigmasta-2,22-dien-6-ona (**179**). Este último era el

precursor inmediatamente anterior del patrón de bioactividad que se deseaba obtener: la 24(S)-homoetilcastasterona (12).

Para llevar a cabo tal objetivo se estudiaron dos posibles alternativas que se analizarán a continuación:

2.2.2.4.1. Eliminación directa del hidroxilo de C-3.

2.2.2.4.2. Transformación en un buen grupo saliente y eliminación del hidroxilo de C-3.

2.2.2.4.1. Eliminación directa del hidroxilo de C-3.

Los métodos utilizados para la transformación de un alcohol secundario en un enlace olefínico son variados. De los más suaves^{100,101} el tratamiento con sulfato de cobre anhidro representa un tipo de reacción muy sencilla en fase heterogénea. El inconveniente de aplicar este tipo de eliminación reside en la presencia de isómeros de posición del doble enlace en el producto final. Algunas alternativas a este tipo de reacciones utilizan un soporte sólido sobre el cual se produce la reacción. A este grupo pertenecen las reacciones en fase seca con cloruro férrico sobre sílica gel¹⁰², y otras en fase líquida como las que utilizaban ácido p-toluensulfónico¹⁰³ o sulfato de cobre sobre el mismo soporte¹⁰⁴. Finalmente, se utilizó sulfato de cobre adsorbido sobre sílica gel (230-400 mesh) en una relación 1:3, que debía activarse en estufa a 240°C por el lapso de 1 hora antes de su utilización⁹⁷. La reacción se llevó a cabo durante diferentes tiempos, en distintos solventes a reflujo y con fuerte agitación. Se probó con cloroformo (entrada 1, **Tabla 2.5**) pero no se detectó cambio alguno en el producto de partida aún luego de 4 horas de reacción. Se procedió entonces a realizar la reacción en tolueno, solvente que permitiría elevar considerablemente la temperatura de reacción (entrada 2, **Tabla 2.5**). En este último caso, la reacción no se completaba totalmente, pero se obtuvo el producto deseado con un 20% de rendimiento.

Los resultados no pudieron mejorarse variando la proporción CuSO₄ a silicagel (entrada 3, **Tabla 2.5**).

Tabla 2.5. Condiciones de eliminación ensayadas para la eliminación directa del hidroxilo de C-3, del 3β-hidroxistigmast-22-en-6-ona (197).

N	reactivo	solvente	tiempo (h)	temp. (°C)	% de 179
1	CuSO ₄ /silicagel (1:3)	cloroformo	4	reflujo	0
2	CuSO ₄ /silicagel (1:3)	tolueno	11	reflujo	20
3	CuSO ₄ /silicagel (1:2.5)	tolueno	10	reflujo	20

2.2.2.4.2. Transformación en un buen grupo saliente y eliminación del hidroxilo de C-3.

La conversión del hidroxilo de C-3 de 197 en un buen grupo saliente --tanto un tosilato (190) (ver Figura 2.41B, pag. 100) como un mesilato (206)-- y el posterior tratamiento con bromuro de litio en dimetilacetamida a reflujo, permitió convertir cuantitativamente el sustrato inicial obteniendo como únicos productos la mezcla de olefinas esteroideas ilustradas en el Figura 2.42. En dicho esquema pueden apreciarse, también, los porcentajes de cada uno de los productos obtenidos.

Es interesante comparar los porcentajes relativos de estas olefinas con la proporción --aproximadamente equimolecular--- en que se obtenían las mismas olefinas en la eliminación de un buen grupo saliente sobre un $5\beta,6\beta$ -epóxido (sección 2.2.2.1, Figura 2.10, pag 68). Dado que no existen mayores diferencias experimentales entre ambas situaciones, cabría suponer que las proporciones indicadas en la Figura 2.42 corresponden a las de equilibrio termodinámico de la eliminación del sustituyente de C-3; mientras que la situación de eliminación mediada con migraciones intramoleculares muestra un perfil de equilibrio diferente y más complejo.

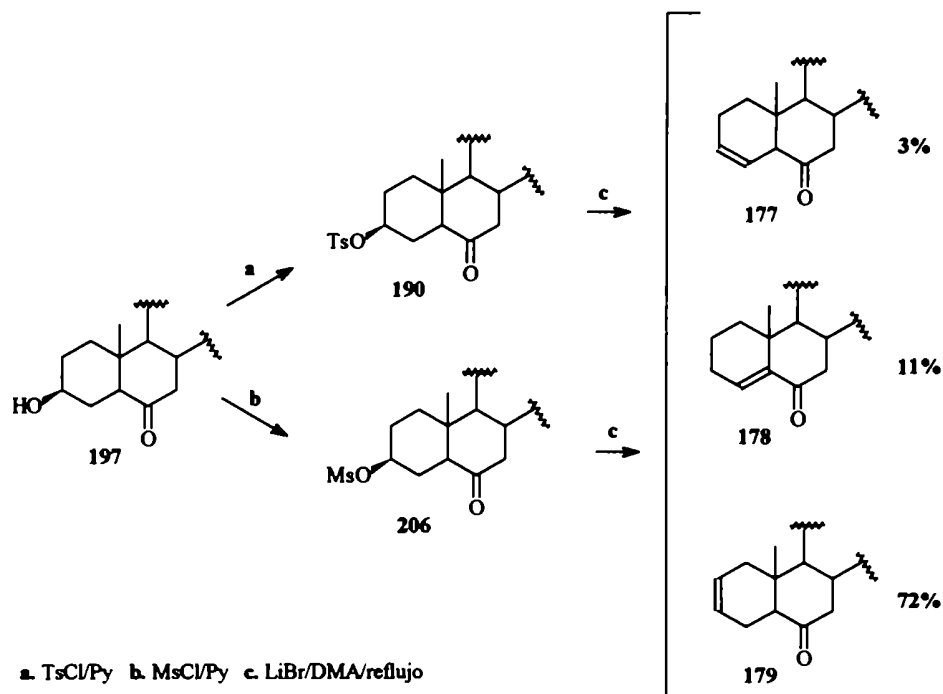


Figura 2.42. Eliminación del hidroxilo de C-3 de 197.

Esta secuencia (parte B, Figura 2.41, pag. 100 y Figura 2.42), resultó ser la más conveniente para la obtención de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (179).

2.2.3. DIHIDROXILACIÓN DE LOS DOBLES ENLACES Δ^2 Y Δ^{22} (paso f, Figura 2.22).

La dihidroxilación de olefinas mediante la utilización de OsO_4 puede llevarse a cabo bajo cuatro diferentes condiciones experimentales:

- 1) Dihidroxilación estequiométrica de olefinas.
- 2) Dihidroxilación catalítica de olefinas.
- 3) Dihidroxilación estequiométrica asimétrica de olefinas.
- 4) Dihidroxilación catalítica asimétrica de olefinas.

A continuación se resumirán brevemente las características más sobresalientes de la reacción de **dihidroxilación catalítica asimétrica** que se utilizó para llevar a cabo la dihidroxilación de los dobles enlaces de **179** (Figura 2.43). Posteriormente se describirán los experimentos realizados tendientes a optimizar la obtención del producto deseado, la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**).

La cis-dihidroxilación de los dos pares de dobles enlaces de **179** mediante dihidroxilación catalítica asimétrica (DCA) se resume en la Figura 2.43.

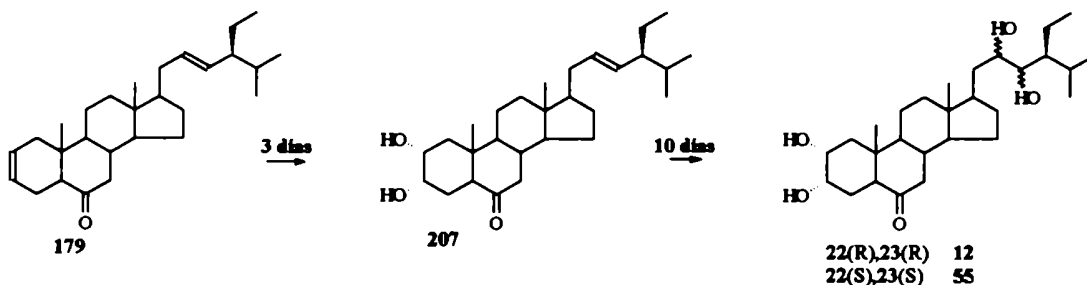


Figura 2.43. Dihidroxilación de ambos dobles enlaces de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (**179**) para obtener la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**) y su diastereómero **55**.

2.2.3.1. Generalidades de la reacción de dihidroxilación con OsO_4 .

El paso clave de las reacciones de dihidroxilación con tetróxido de osmio (OsO_4), válido para cualquiera de las cuatro condiciones experimentales planteadas, es la formación del glicolato II, que en presencia de piridina se acelera considerablemente¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ (ver Figura 2.44). Los mecanismos propuestos para explicar la transformación del enlace olefínico en un diol vecinal en presencia de OsO_4 son dos: originalmente, Böseken y Criegee, propusieron un mecanismo de adición [3 + 2] concertado entre el OsO_4 y la olefina¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ (ver Figura 2.44). Por otro lado, Sharpless y un grupo de sus colaboradores sugirieron una reacción cuyo paso inicial sería la formación reversible de un

osmaoxetano intermediario (I), producto de una adición [2 + 2], seguida de un reordenamiento del mismo para dar el glicolato final (II)^{110,111} (ver Figura 2.44). En ambos casos la hidrólisis del glicolato resultaría en la obtención del diol.

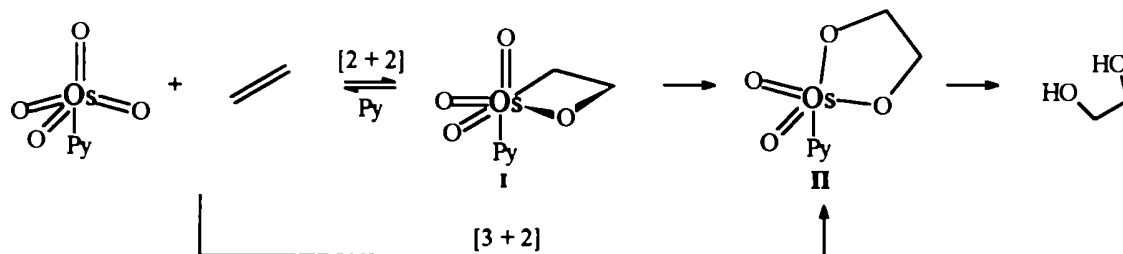


Figura 2.44. Mecanismo de dihidroxilación de dobles enlaces con OsO₄/Piridina¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

Recientes observaciones han aportado evidencias termodinámicas¹¹² que favorecerían el mecanismo de adición [2 + 2] propuesto por Sharpless. Por otro lado, se han realizado cálculos *ab initio* que demuestran que los osmaoxetanos (I) son mínimos energéticamente accesibles en la superficie de energía potencial^{113,114}.

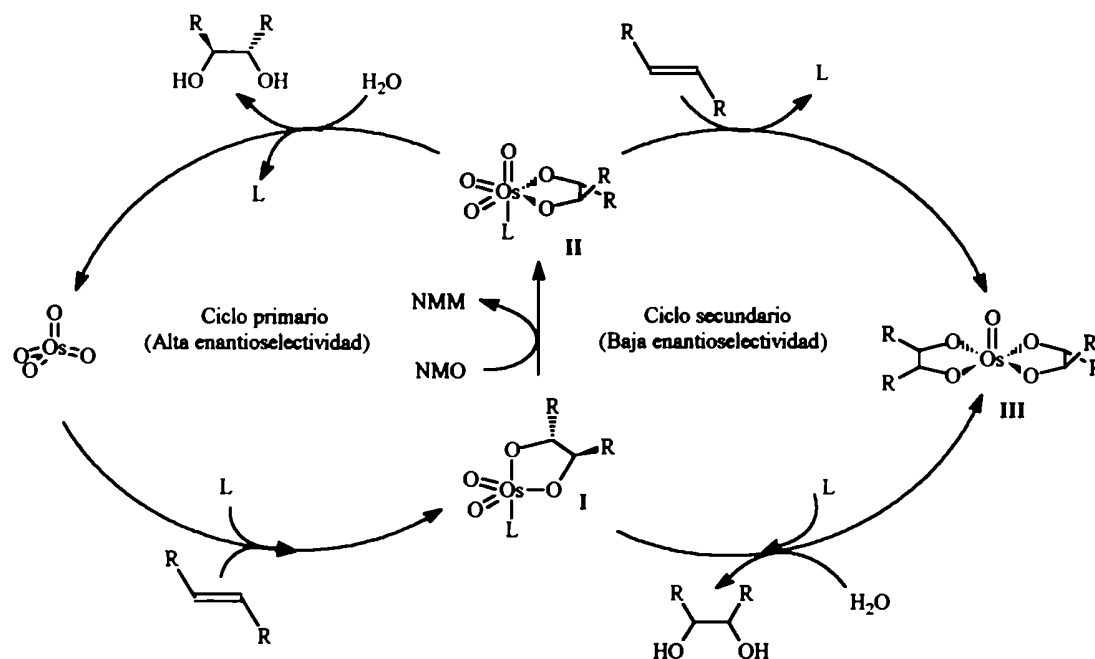
La posterior hidrólisis del glicolato libera el diol correspondiente y una especie reducida de osmio (Os^{VI}).

2.2.3.2. Dihidroxilación catalítica con OsO₄.

Tal como se mencionó anteriormente existe la posibilidad de llevar a cabo la dihidroxilación en forma catalítica. Para tal fin se requiere introducir en el medio de reacción algún co-oxidante que permita regenerar la especie oxidante, el Os^{VIII}, y así reiniciar el ciclo. Los primeros co-oxidantes en ser utilizados fueron el clorato de potasio y el clorato de sodio¹¹⁵ y el agua oxigenada en *t*-butanol^{116,117}; sin embargo la utilización de estos reactivos conducía a sobreoxidaciones, hecho que constituía una grave limitación a dichos métodos. Otros co-oxidantes diseñados para evitar la sobreoxidación son el *t*-butilhidroperóxido¹¹⁸ y óxidos de aminas terciarias como el N-óxido de N-metilmorfolina (NMO)¹¹⁹. Recientemente, se ha añadido a esta lista el ferricianuro de potasio [K₃Fe(CN)₆]¹²⁰.

Otro punto importante en una reacción de dihidroxilación catalítica es la elección del solvente de reacción, lo que determina el co-oxidante a utilizar y las características del ciclo catalítico involucrado. La utilización de NMO como co-oxidante lleva a la

utilización de un sistema homogéneo de reacción, con el tipo de ciclo catalítico que se ilustra en la **Figura 2.45**.



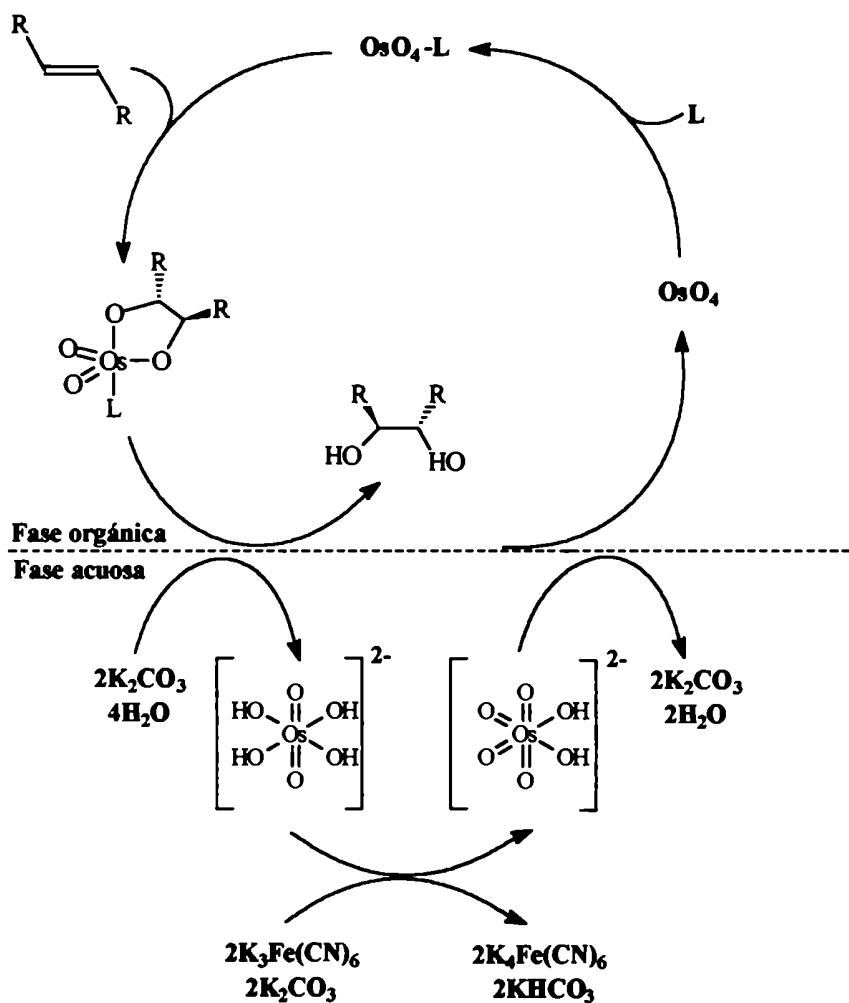
L= ligando; NMM= N-metilmorfolina; NMO= N-óxido de N-metilmorfolina

Figura 2.45. Ciclo catalítico de la dihidroxilación catalítica en fase homogénea.

El primer paso es la formación del éster glicolato (I) de Os^{VI} , que reacciona oxidándose reversiblemente con una molécula de NMO para formar el trioxoglicolato (II) (ver **Figura 2.45**). Posteriormente, este trioxoglicolato (II) especie de Os^{VIII} , se hidroliza para regenerar OsO_4 y liberar el diol correspondiente. Esta secuencia constituye un ciclo catalítico primario altamente enantioselectivo siempre que el ligando L sea un inductor de quiralidad. Dicha inducción quiral fracasa si el trioxoglicolato (II) tiene una vida media tal que le permita la complejación con otra molécula de olefina. Si esto ocurre se forma un bistrioxoglicolato (III) tal como se ilustra en la **Figura 2.45**. La formación de este bisglicolato (III) implica la pérdida del inductor quiral produciendo una pérdida de la enantioselectividad. El ciclo secundario se completa con la hidrólisis de una molécula de diol y la posterior reoxidación del osmio. De esta explicación se desprende que la única forma de lograr reacciones enantioselectivas con esta metodología es minimizando la proporción del ciclo secundario. Para ello es necesario maximizar la velocidad de hidrólisis del trioxoglicolato (II), minimizar la concentración de olefina que tiende a formar el bistrioxoglicolato (III) y minimizar la velocidad de formación de este último. En este sentido

la principal modificación experimental tendiente a solucionar el problema consiste en agregar lentamente la olefina al medio de reacción manteniendo siempre baja su concentración. Otra manera de solucionar dichos problemas es utilizar ciclos catalíticos en fase heterogénea¹²¹.

La utilización de $K_3Fe(CN)_6/K_2CO_3$ como co-oxidantes implica la utilización de una mezcla *t*-butanol/agua (1:1) como solventes separados en dos fases. La secuencia de reacciones que se postulan ocurren en estas condiciones se ilustran en la **Figura 2.46**.



L= ligando.

Figura 2.46. Ciclo catalítico de la dihidroxilación catalítica en fase heterogénea.

En ella puede apreciarse el rol que cumple cada fase en el sistema de solventes. Inicialmente, en la fase orgánica donde todas las especies involucradas son solubles, se forma el glicolato entre la olefina y el complejo $OsO_4 \cdot L$ (Donde L puede ser cualquier amina, que en caso de ser un inductor quiral permite obtener el diol en forma

enantioselectiva). Posteriormente, en la interfase, se hidroliza dicho glicolato liberando el diol a la fase orgánica y la sal de Os^{VI} a la acuosa. En dicha fase se produce la reoxidación del osmio a Os^{VIII} por acción del K₃Fe(CN)₆, convirtiéndolo en una especie de perosmato que finalmente libera el OsO₄ a la fase orgánica, regenerando el ciclo (ver **Figura 2.46**)¹²².

2.2.3.3. Dihidroxilación catalítica asimétrica.

Aprovechando la afinidad que tiene la molécula de OsO₄ por aminas se reemplazó la piridina por otras bases con centros asimétricos en sus estructura. Las más apropiadas resultaron ser derivados de dihidroquinina (DHQ) y dihidroquinidina (DHQD) derivatizados en C-9, de los cuales los más usados pueden verse en la **Figura 2.47**¹²³⁻¹²⁶.

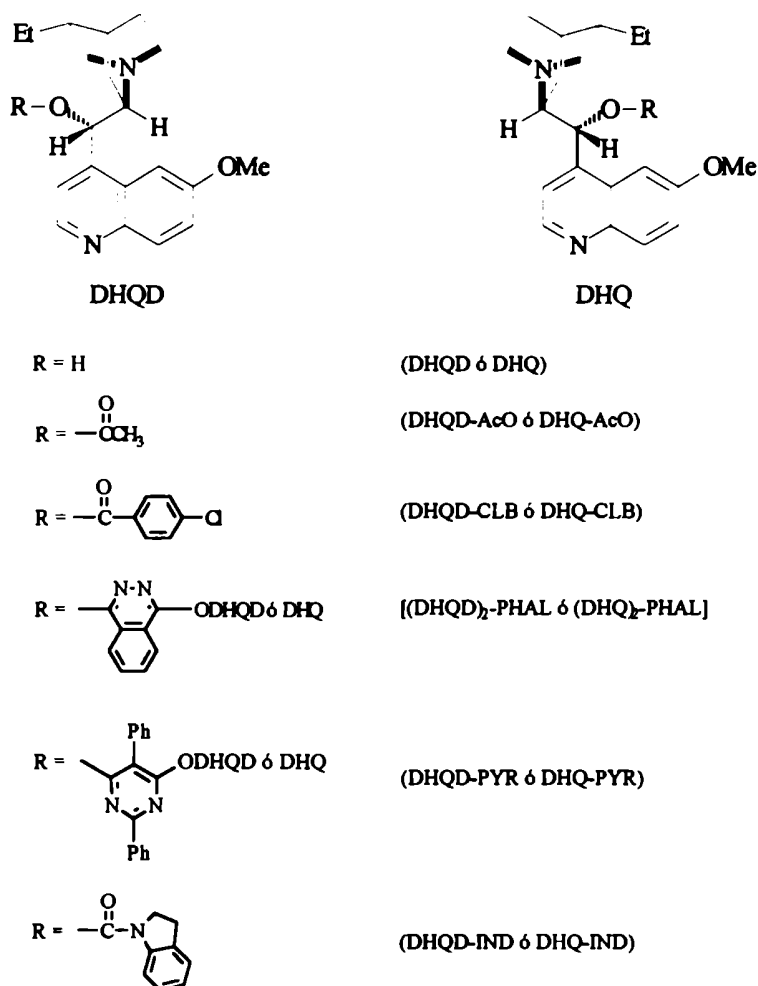
Tanto los acetatos como los *p*-clorobenzoatos fueron los primeros derivados utilizados¹²⁷. Actualmente los más utilizados son los derivados de ftalazina¹²⁸, piridilo¹²⁹ e indoilo¹³⁰.

A continuación se detallarán las diferentes condiciones experimentales ensayadas aplicando la dihidroxilación catalítica asimétrica sobre el sustrato **179**.

2.2.3.4 Dihidroxilación de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (179).

Al realizar la reacción de dihidroxilación de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (**179**) con el reactivo de osmio, debe tenerse en cuenta la reactividad diferencial de ambos dobles enlaces: por un lado, la dihidroxilación del enlace olefínico del anillo A permite obtener estereoselectivamente el compuesto 2 α ,3 α -dihidroxisustituido deseado; por otra parte, la estereoquímica de la dihidroxilación de la cadena lateral es fuertemente dependiente del sustituyente de C-24 (ver **sección 1.6.3, Capítulo 1, pag. 37**). Desafortunadamente, la sustitución 24(S)-alquílica, que posee nuestro sustrato, favorece la dihidroxilación no deseada ya que rinde mayoritariamente el diasterómero de menor bioactividad¹³¹⁻¹³⁸. Esta dificultad se salvó utilizando la reacción de dihidroxilación catalítica asimétrica mencionada en las secciones anteriores.

Brosa y colaboradores⁵⁶, informaron la reacción de dihidroxilación catalítica asimétrica en fase homogénea sobre el sustrato **179**. La relación diasteromérica 22(R),23(R)/22(S),23(S) obtenida, resultó ser de 2,6/1, con un rendimiento de 58% del isómero deseado (entrada 1, **Tabla 2.6**). Estas condiciones de reacción, si bien permiten obtener excelentes resultados, implican el uso de 1 equivalente de ligando quiral con lo que la reacción ya no es catalítica respecto de este costoso reactivo; además, requiere la



DHQD - dihidroquinidina, DHQ - dihidroquinina, AcO - acetato, CLB - p-clorobenzoato, PHAL - ftalazina, PYR - piridilo, IND - indoilo.

Figura 2.47. Distintos derivados de dihidroquinina y dihidroquinidina utilizados como ligandos quirales en las reacciones de dihidroxilación catalítica asimétrica de Sharpless.

Tabla 2.6. Distintas condiciones de reacción ensayadas para la dihidroxilación catalítica asimétrica de 179.

N	solvente	Tiempo (d)	equivalentes de ligando	Equivalentes de metansulf.	% conv.	% de 207	% 12a	RR/SSb
1	<i>t</i> -butanol/agua /THF (4:1,1:7,2) ⁵⁶	4-5	1	0	----	----	58	2,6/1
2	<i>t</i> -butanol/agua (1:1) ⁵⁴	6	0,04	2:1	100	45	27,5	1.5/1
3	<i>t</i> -butanol/agua (1:1)	10	0,05	1:1	93	72	0-2	---
4	<i>t</i> -butanol/agua (1:1)	10	0,2	2:1	100	81	0-2	---
5	<i>t</i> -butanol/agua/tolueno (7:7:6)	10	0,2	2:1	100	31	13,8	2/3
6	<i>t</i> -butanol/agua /THF (4:5:1)	10	0,2	2:1	100	53	18,2	1,2/1
7	<i>t</i> -butanol/agua/THF (2:2:1)	10	0,2	2:1	100	30	34	2/1

^a Calculados sobre la masa inicial de olefina.

^b Proporción de isómeros 22(R),23(R):22(S),23(S).

utilización de OsO_4 , compuesto volátil de riesgosa manipulación.

McMorris y colaboradores⁵⁴, realizaron la reacción de dihidroxilación en fase heterogénea sobre el mismo sustrato (179), obteniendo un rendimiento del 27,5 % del isómero 22(R),23(R) y un 18% de su diasterómero 22(S),23(S) y recuperando un 45% del producto con dihidroxilación del anillo A únicamente (207) (entrada 2, **Tabla 2.6**).

En nuestro caso, la reacción de dihidroxilación catalítica asimétrica se llevó a cabo en fase heterogénea, utilizando osmato de potasio dihidrato ($\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$) como agente oxidante, además de una mezcla $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_2\text{CO}_3$ como co-oxidantes en una proporción de 3:1 con respecto a la cantidad de equivalentes de esteroide (ver **Figura 2.45**). Se utilizó la dihidroquinidinftalazina [(DHQD)₂-PHAL] como ligando quiral en cantidades catalíticas (ver **Figura 2.47**, pag. 108) y se agregó metansulfonamida como un acelerador de la reacción^{139,140}.

Las diferentes condiciones de dihidroxilación catalítica asimétrica ensayadas en nuestro laboratorio se detallan en la **Tabla 2.6**, entradas 3-7. En tales ensayos se dejaron fijas las cantidades de osmato (0,05 eq/eq de olefina), y de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y K_2CO_3 (3 eq/eq de olefina). Inicialmente se varió solamente la cantidad de metansulfonamida (entrada 3, **Tabla 2.6**), pero aún aumentando el tiempo de reacción sólo se logró obtener el 2 α ,3 α -dihidroiestigmast-22-en-6-ona (207), producto de dihidroxilación parcial del sustrato (ver **Figura 2.43**, pag. 103). Se aumentaron las cantidades de ligando quiral y metansulfonamida, pero sólo se logró mejorar la obtención de 207 (entrada 4, **Tabla 2.6**).

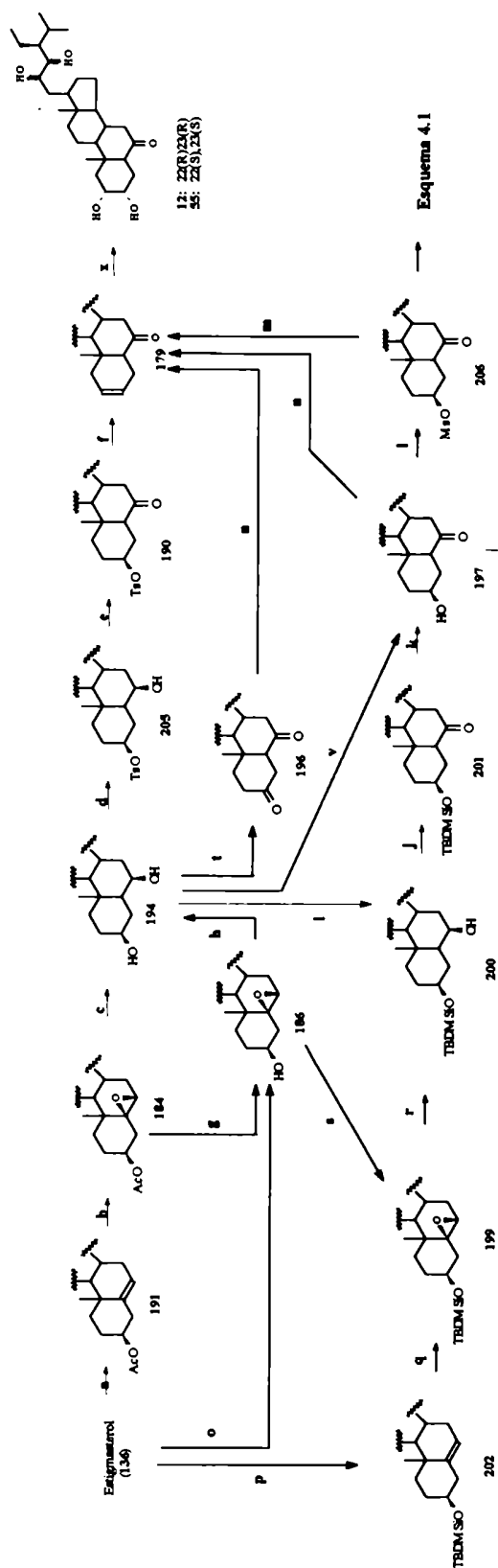
Se decidió, entonces, cambiar la mezcla de solventes para aumentar la solubilidad de los sustratos que resultó ser baja en *t*-butanol-agua (1:1). Utilizando una mezcla que contenía tolueno se obtuvo el producto tetrahidroxilado con una relación 3:2 a favor del 22(S),23(S) (12) con un rendimiento del 13,8% (entrada 5, **Tabla 2.6**). El reemplazo del tolueno por tetrahidrofurano mejoró el rendimiento y la relación de diasterómeros (entradas 6 y 7, **Tabla 2.6**).

4.3. RESUMEN.

En el **Esquema 2.1** se detallan todas secuencias sintéticas realizadas para obtener la 24(S)-homoetilcastasterona (12) y que han sido detalladas en el presente capítulo. En dicho esquema se indican como notas al pie los rendimientos de cada una de las reacciones. La estrategia más conveniente se encuentra marcada con las flechas de color

rojo y constituye una alternativa sintética diferente de todas las publicadas hasta el presente.

El rendimiento global para la obtención de la (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (12), a partir de estigmasterol (136) fue de 6% en siete pasos de síntesis.



Esquema 4.1

a. $(AcO)_2/Py$ (100%) b. $CrO_3/(AcO)_2$ ó $KMnO_4/CuSO_4$ (70%) c. $AlCl_3/LiAlH_4$ (44%) d. $TscI/Py$ (94%) e. PCC (82%) f. $LiBr/DMA$ (70%) g. $LiAlH_4$ (80%) h. $AlCl_3/LiAlH_4$ (44%)
 i. $TBDMSiCl/im$ (100%) j. PCC (95%) k. $(nBu)_4N^+F^-/THF$ (100%) l. $MsCl/Py$ (100%) m. $LiBr/DMA$ (73%) n. $CuSO_4/silica$ (20%) o. $KMnO_4/CuSO_4$ (59%) p. $TBDMSiCl/im$ (91%)
 q. $CrO_3/(AcO)_2$ ó $KMnO_4/CuSO_4$ (25%) r. $AlCl_3/LiAlH_4$ (54%) s. $TBDMSiCl/im$ (70%) t. Jones (100%) u. $Zn(Hg)/TMSiCl$ (50%) v. PCC (55%) x. $(DHQD)_2-PHAL/K_2OsO_2(OH)_4$ (34%)

Esquema 2.1. Distintas estrategias sintéticas ensayadas para la obtención de la 24(S)-homoetilcaasterona (12). Las flechas rojas indican la secuencia sintética que conduce al mayor rendimiento global.

2.4. BIBLIOGRAFIA.

- 1- T. Yokota, J. Baba, N. Takahashi. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4965 (1982).
- 2- J. Baba, T. Yokota, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 659 (1983).
- 3- T. Yokota, J. Baba, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1409 (1983).
- 4- T. Yokota, J. Baba, S. Koba, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2529 (1984).
- 5- S. Takatsuto, B. Ying, M. Morisaki, N. Ikekawa. *J. Chromatography*, **239**, 233 (1982).
- 6- H. Abe, M. Morishita, M. Uchiyama, S. Marumo, K. Minakata, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2609 (1982).
- 7- M. Ikeda, S. Takatsuto, T. Sassa, M. Ikekawa, M. Nukima. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 655 (1983).
- 8- H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Ikeda, T. Sassa, T. Kutsima, S. Marumo. *Experientia*, **39**, 351 (1983).
- 9- M. Arima, T. Yokota, N. Takahashi. *Phytochemistry*, **23**, 1587 (1984).
- 10- T. Morishita, H. Abe, M. Uchiyama, S. Marumo, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Phytochemistry*, **22**, 1051 (1983).
- 11- H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2171 (1984).
- 12- K.-H. Park, T. Yokota, A. Sakura, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3081 (1987).
- 13- N. Ikekawa, F. Nishiyama, Y. Fujimoto. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 405 (1988).
- 14- R. D. Plattner, S. L. Taylor, M. D. Grove. *J. Nat. Prod.*, **49**, 540 (1986).
- 15- T. Yokota, M. Morita, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2149 (1983).
- 16- T. Yokota, S. Koba, S.-K. Kim, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Sakakibara, K. Okada, K. Mori, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1625 (1987).
- 17- S.-K. Kim. In **Study of Bio-Organic Chemistry of Naturally-Occurring Brassinosteroids** (en japonés). Ph. D Thesis, the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. 1988.
- 18- T. Yokota, S.-K. Kim, N. Takahashi. In **13th Int. Conf. on Plant Growth Substances**. Abstr. N° 168, Calgary, Canadá. 1988.
- 19- S.-K. Kim, T. Yokota, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2303 (1987).
- 20- T. Yokota, S.-K. Kim, Y. Kosaka, Y. Ogino, N. Takahashi. In **Conjugate Plant Hormone, Structure, Metabolism and Function**. K. Schreiber; H. E. Schutte; G. Sembder, Eds. VEG Deucher Verlag der Wissenchaffnen. Pgs. 286-296. 1987.
- 21- S.-K. Kim, T. Yokota, Y. Ogino, N. Takahashi. In **13th Int. Conf. on Plant Growth Substances**. Abstr. N° 401, Calgary, Canadá. 1988.
- 22- J. A. Schneider, K. Yoshihara, K. Nakanishi, N. Kato. *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3859 (1983).

- 23- H. Abe, K. Nakamura, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1103 (1984).
- 24- Y. Susuki, I. Yamaguchi, T. Yokota, N. Yakahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3133 (1986).
- 25- H. Abe. Rice-Lamina Inclination, Endogenous Levels in Plant Tissues and Accumulation During Pollen Development of Brassinosteroids, in **Brassinosteroids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. *ACS Symposium Series N° 474*. ACS Washinton DC. Pgs. 200-207. 1991.
- 26- T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi, S. Yakatsuto, N. Ikekawa, T. Takematsu. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2419 (1983).
- 27- T. Yokota, M. Amina, N. Takahashi, A. Crozier. *Phytochemistry*, **24**, 1333 (1985).
- 28- S.-K. Kim, H. Abe, C. H. A. Little, R. P. Pharis. *Plant Physiol.*, **94**, 1709 (1990).
- 29- T. Yokota, S. -K. Kim, Y Fukui, N. Yakahashi, Y. Takeuchi, T. Takematsu; *Phytochemistry*, **26**, 503 (1987).
- 30- S. Takatsuto, H. Abe, K. Gamoh. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1057 (1990).
- 31- T. Yokota, Y. Ogino, N. Takahashi, H. Saimoto, S. Fujioka, A. Sakurai. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1107 (1990).
- 32- S. -K. Kim. Natural Occurence of Brassinosteroids, in **Brassinosteroids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. *ACS Symposium Series N° 474*. ACS Washinton DC. 1991.
- 33- J. Schmidt, T. Yokota, G. Adam, N. Takahashi. *Phytochemistry*, **30**, 364 (1991).
- 34- K. H. Park, H. Saimoto, S. Nakagawa, A. Sakurai, T. Yokota, N. Takahashi, K. Syōno. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 805 (1989).
- 35- Y. Susuki, I. Yamaguchi, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 49 (1985).
- 36- S. Takatsuto, T. Yokota, K. Omote, K. Gamoh, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2177 (1989).
- 37- S. Takatsuto, K. Omote, K. Gamoh, M. Ishibashi. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 757 (1990).
- 38- N. Ikekawa, S. Takatsuto, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita. *Proc. Jpn. Acd.*, **59**, 9 (1983).
- 39- S. Asakawa, H. Abe, Y. Kyokawa, S. Nakamura, M Natsume; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 219 (1994).
- 40- H. Susuki, S. Fujioka, T. Yokota, N. Murofushi, A. Sakurai; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 2075 (1994).
- 41- P. E. Taylor, K. Spuck, P. M. Smith, J. M. Sasse, T. Yokota, P. G. Griffiths, D. W. Cameron; *Planta*, **189**, 91 (1993).
- 42- J. Smidth, B. Splenger, T. Yokota, G. Adam; *Phytochemistry*, **32**, 1614 (1993).

- 43- J. Smidth, T. Yokota, B. Splenger, G. Adam; *Phytochemistry*, **34**, 391 (1993).
- 44- J. Smidth, C. Kuhnty, G. Adam; *Phytochemistry*, **36**, 175 (1994).
- 45- K. H. Park, J. D. Park, K. H. Hyun, M. Nasayama, T. Yokota; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1343 (1994).
- 46- C. Motegi, S. Takatsuto, K. Gamoh; *J. Chromatography*, **658**, 27 (1994).
- 47- T Yokota, Y. Ogino, H. Suzuki, N. Takahashi, H. Saimoto, S. Fujioka, A. Sakurai. Metabolism and Biosynthesis of Brassinosteroids, in **Brassinosteroids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. *ACS Symposium Series N° 474*. ACS Washinton DC. 1991.
- 48- K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1211 (1980).
- 49- N. Ikekawa, S. Takatsuto, T. Kitsuma, H. Saito, T. Morishita, H. Abe; *J. Chromatography*, **290**, 289 (1984).
- 50- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe; *Phytochemistry*, **22**, 1393 (1983).
- 51- M. J. Thompson, W. J. Meudt, N. B. Mandava, S. R. Dutky, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **39**, 89 (1982).
- 52- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm Bull.*, **30**, 4181 (1982).
- 53- K. Mori; *Rev. Latinoam. Quim.*, **16**, 55 (1985).
- 54- T. McMorris, P. A. Patil, R. G. Chavez, M. E. Baker, S. D. Clouse; *Phytochemistry*, **36**, 585 (1994).
- 55- S. Takatsuto, N. Yasawa, M. Ishiguro, M. Morisaki, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 139 (1984).
- 56- C. Brosa, R. Peracaula, R. Puig, M. Ventura; *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7057 (1992).
- 57- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2769 (1982).
- 58- C. Brosa, J. M. Capdevila, I. Zamora; *Tetrahedron*, **52**, 2435 (1996).
- 59- W. Zhou, B. Jiang, X. Pou; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 612 (1989).
- 60- L. R. Galagovsky, G. Burton, E. G. Gros; *Z. Naturforsch*, **44b**, 806 (1989).
- 61- L. R. Galagovsky, E. G. Gros; *J. Chem. Research*, 366 (1990).
- 62- J. A. Steel, E. Moseyigg; *J. Org. Chem.*, **28**, 571 (1963).
- 63- L. R. Galagovsky, E. G. Gros; *J. Chem. Research*, 137 (1993).
- 64- K. Tori, T. Komeno, T. Nakagawa; *J. Org. Chem.*, **29**, 1136 (1964).
- 65- F. S. Alvarez, A. N. Watt; *J. Org. Chem.*, **33**, 2143 (1968).
- 66- K. B. Sharpless, A. Y. Teranashi, J. E. Bäckvall; *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3120 (1977).
- 67- S. Fung, J. B. Sidall; *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6580 (1980).

- 68- N. S. Bhacca, D. H. Williams. Alcohols and Acetals, in **Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry**. Holden-Day Inc. San Francisco, California. 1966.
- 69- J. G. Traynham, D. B. Stone, J. L. Couvillion; *J. Org. Chem*, **32**, 510 (1967).
- 70- M. W. Williams, L. K. Maruyama; *J. Org. Chem*, **52**, 4044 (1987).
- 71- H. Maskill. Catalysis, in **The Fisical Basis in Organic Chemistry**. Oxford University Press, Oxford, New York. Pags 315-365. 1985.
- 72- R. B. Mitra, V. M. Kapoor; *Synthetic Commun.*, **15**, 1087 (1985).
- 73- S. Akagi, K. Tsuda; *Chem. Pharm. Bull.*, **9**, 459 (1961).
- 74- I. Stoilov, R. Shetty, J. St. Pirek, S. L. Smith, W. J. Layton, D. S. Watt; *J. Org. Chem.*, **59**, 926 (1994).
- 75- A. G. Ogilvie, J. R. Hanson; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1981 (1972).
- 76- N. S. Bhacca, D. H. Williams. Difference in Chemical Shift Between Axial and Equatorial Protons, in **Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry**. Holden-Day Inc. San Francisco, California. 1966.
- 77- O. Teme Centurión, L. R. Galagovsky, E. G. Gros; *Steroids*, **60(7)**, 434 (1995).
- 78- H. L. Holland; *Can. J. Chem*, **61**, 2165 (1983).
- 79- N. S. Bhacca, D. H. Williams. C-18 and C-19 Methyl Resonances, in **Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry**. Holden-Day Inc. San Francisco, California. 1966.
- 80- Se utilizó el programa HyperChem® for Windows.
- 81- D. M. Hirst. **A Computational Approach to Chemistry**. Blackwell Scientific Publication Oxford London. John P. Simons Ed. Nottingham 1990.
- 82- M. J. S. Dewar, E. G. Zebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart; *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902 (1985).
- 83- A. S. Hallworth, H. B. Henbest; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 4605 (1957).
- 84- M. S. Syamala, J. Das, S. Baskaran, S. Chandrasekaran; *J. Org. Chem.*, **57**, 1928 (1992).
- 85- S. Krishnamurthy, R. M. Schubert, H. C. Brown; *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 8486 (1973).
- 86- A. L. Brachet-Cota. **Síntesis y análisis conformacional de 6,19 oxido y 11,19 -óxidopregnanos**. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 1989.
- 87- B. Rickborn, W. E. Lamke; *J. Org. Chem.*, **32**, 537 (1967).
- 88- L. M. Harwood, C. J. Moody. **Experimental Organic Chemistry Principles and Practice**. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. 1989.
- 89- D. Leibfritz, J. D. Roberts; *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4996 (1973).

- 90- H. O. House. Metal Hydride Reductions and Related Reactions, in **Modern Synthetic Reactions**. W. A. Benjamin Inc. Merlo Park, California. 1972.
- 91- U. Sankawa, T. Sato; *Tetrahedron Lett.*, **11**, 981 (1978).
- 92- M. Mark, N. Rerick, E. L. Eliel; *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2356 (1962).
- 93- H. C. Brown, N. M. Yoon; *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2688 (1968).
- 94- W. B. Motherwell; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 935 (1973).
- 95- W. Zhou; *Pure & Applied Chem.*, **61**, 431 (1989).
- 96- E. J. Corey, G. Schmidt; *Tetrahedron Lett.*, **5**, 399 (1979).
- 97- G. M. Caballero. **Síntesis de Esteroides Simples y Doblemente Marcados con Carbono-13 en la Cadena Lateral**. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina. 1992.
- 98- E. J. Corey, A. Venkateswarlu; *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6191 (1972).
- 99- H. Hosoda, D. K. Fikushina, J. Fishman; *J. Org. Chem.*, **38**, 4209 (1973).
- 100- M. Kawanishi, S. Arimatsu, R. Yamaguchi, K. Kimoto; *Chemistry Lett.*, 881 (1972).
- 101- G. W. Francis, J. F. Berg; *Acta Chem. Scand.*, **B31(8)**, 721 (1977).
- 102- E. Keinan, Y. Mazur; *J. Org. Chem.*, **43**, 1020 (1978).
- 103- F. D'Onofrio, A. Scetti; *Synthesis*, 1159 (1985).
- 104- T. Nishiguchi, N. Machida, E. Yamamoto; *Tetrahedron Lett.*, **28**, 4565 (1987).
- 105- J. Böseken; *J. Recl. Trav. Chim.*, **41**, 199 (1922).
- 106- R. Criegee; *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **75**, 522 (1936).
- 107- R. Criegee; *Angew. Chem.*, **50**, 153 (1937).
- 108- R. Criegee; *Angew. Chem.*, **51**, 519 (1938).
- 109- R. Criegee, B. Marchand, H. Wannowias; *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **99**, 550 (1942).
- 110- K. B. Sharpless, A. Y. Teranashi, J. -E. Backwall; *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3120 (1977).
- 111- K. A. Jorgensen, B. Schiott; *Chem Rev.*, **90**, 1483 (1990).
- 112- T. Golbe, K. B. Sharpless; *Angew. Chem.*, **32**, 1329 (1993).
- 113- P. -O. Norrby, H. C. Kolb, K. B. Sharpless; *Organometallics*, **13**, 344 (1994).
- 114- A. Veldkamp, G. Frenking; *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4937 (1994).
- 115- K. A. Hofmann; *Chem. Ber.*, **45**, 3329 (1912).
- 116- N. A. Milas, S. J. Sussman; *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 1302 (1936).
- 117- N. A. Milas, J. H. Trepagnier, J. T. Nolan Jr., M. I. Iliopoulos; *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4730 (1959).
- 118- K. B. Sharpless, K. Akashi; *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1986 (1976).
- 119- V. VanRheenen, R. C. Kelly, D. Y. Cha; *Tetrahedron Lett.*, 1973 (1976).

- 120- M. Minato, K. Yamamoto, J. Tsuji, *J. Org. Chem.*, **55**, 766 (1990).
- 121- J. S. Wai, I. Markó, J. S. Svendsen, M. G. Finn, E. N. Jacobsen, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1123 (1989).
- 122- Y. Ogino, H. Chen, H. -L Kwong, K. B. Sharpless, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 3965 (1991).
- 123- S. G. Hentges, K. B. Sharpless; *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4263 (1980).
- 124- E. N. Jacobsen, I. Marko, W. S. Mungall, G. Schröder, K. B. Sharpless; *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1968 (1988).
- 125- H. -l. Kwong, C. Sorato, Y. Ogino, H. Chen, K. B. Sharpless; *Tetrahedron Lett.*, **31**, 2999 (1990).
- 126- K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. -S. Jeong, H. -L. Kwong, K. Morikawa, Z. -M. Wang, D. Xu, X. -L. Zhang; *J. Org. Chem.*, **57**, 2768 (1992).
- 127- S. G. Hentges, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, 4263 (1980).
- 128- K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. -S. Jeong, H. -L. Kwong, K. Morikawa, Z. -M. Wang, D. Xu, X. -L. Zhang, *J. Org. Chem.*, **57**, 2768 (1992).
- 129- G. A. Crispino, K. -S. Jeong, H. C. Kolb, Z. M. Wang, D. Xu, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.*, **58**, 3785 (1993).
- 130- L. Wang, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7568 (1992).
- 131- M. J. Thompson, N. B. Mandava, W. J. Meudt, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **38**, 567 (1981).
- 132- M. J. Thompson, W. J. Meudt, N. B. Mandava, S. R. Dutky, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **39**, 89 (1982).
- 133- K. Wada, S. Marumo; *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2579 (1981).
- 134- M. Anastasia, P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Fiecchi, A. Scala; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2117 (1986).
- 135- M. J. Thompson, N. Mandava, J. L. Flippen-Anderson, J. F. Worley, S. R. Dutky, W. E. Robins, W. Lubby; *J. Org. Chem.*, **44**, 5002 (1979).
- 136- K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1211 (1980).
- 137- M. Anastasia, P. Ciuffreda, M. del Puppo, A. Fiechi; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 383 (1983).
- 138- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4181 (1982).
- 139- H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze, K. B. Sharpless; *Chem. Rev.*, **94**, 2483 (1994).
- 140- R. A. Johnson, K. B. Sharpless. **Catalytic Asymmetric Dihydroxilation, in Catalytic Asymmetric Synthesis**. J. Ojima Eds, New York. 1993.

CAPITULO 3

SINTESIS DE

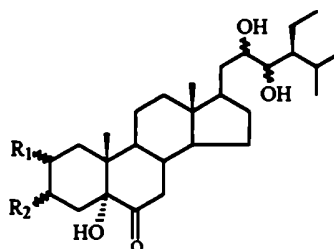
**(22R,23R,24S)-24-ETIL-
2 α ,3 α ,5,22,23-PENTAHIDROXI-5 α -
COLESTAN-6-ONA**

[5 α -HIDROXI-24(S)-HOMOETILCASTASTERONA]

3.1. INTRODUCCION.

Como mencionamos anteriormente la síntesis de análogos de brassinosteroides tiene un doble objetivo: por un lado, encontrar algún análogo que supere la actividad de los compuestos naturales; y por otro, realizar estudios de estructura-actividad¹⁻⁷.

La mayor parte de las publicaciones sobre síntesis de análogos se centran en modificaciones de la cadena lateral, ya que en el intento de arribar a la cadena del brassinólido se obtuvieron gran cantidad de brassinosteroides modificados. Son muy escasos los ejemplos de cambios de funcionalización en los anillos A y B. Existen muy pocos trabajos que investiguen, en particular, el efecto de la modificación del sustituyente de C-5, posición muy importante por determinar el tipo de fusión de ambos anillos. Recientemente se estudió el efecto del cambio de una configuración 5α por una 5β ⁸. Nuestra idea fue sintetizar una serie de análogos de castasterona 24(S)-homoetilsustituidos, homólogos a los descritos en el capítulo anterior, con la particularidad de que poseen un hidroxilo en la posición 5α . En la **Figura 3.1** se muestran los seis análogos de castasterona 5α -hidroxilados, sintetizados.



163:	$R_1 = \alpha\text{-OH}$	$R_2 = \alpha\text{-OH}$	22(R),23(R)
164:	$R_1 = \alpha\text{-OH}$	$R_2 = \alpha\text{-OH}$	22(S),23(S)
165:	$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \beta\text{-Br}$	22(R),23(R)
166:	$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \beta\text{-Br}$	22(S),23(S)
167:	$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \beta\text{-AcO}$	22(R),23(R)
168:	$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \beta\text{-AcO}$	22(S),23(S)

Figura 3.1. Análogos de castasterona, 5α -hidroxilados, sintetizados. La síntesis de los compuestos 163 y 164 se detallan en el presente capítulo, mientras que los restantes se tratan en el **Capítulo 4**.

A continuación se relatará la síntesis de la (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestán-6-ona (163), considerado el compuesto 5 α -hidroxilado cabeza de serie, y su diastereómero la (22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestán-6-ona (164). Las síntesis del resto de los análogos 5 α -hidroxilados se detallarán en el **Capítulo 4**.

3.2. SÍNTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-2 α ,3 α ,5,22,23-PENTAHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA (163): COMPUESTO CABEZA DE SERIE.

Para llevar a cabo la síntesis de la (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestán-6-ona (163), se elaboró la siguiente estrategia retrosintética:

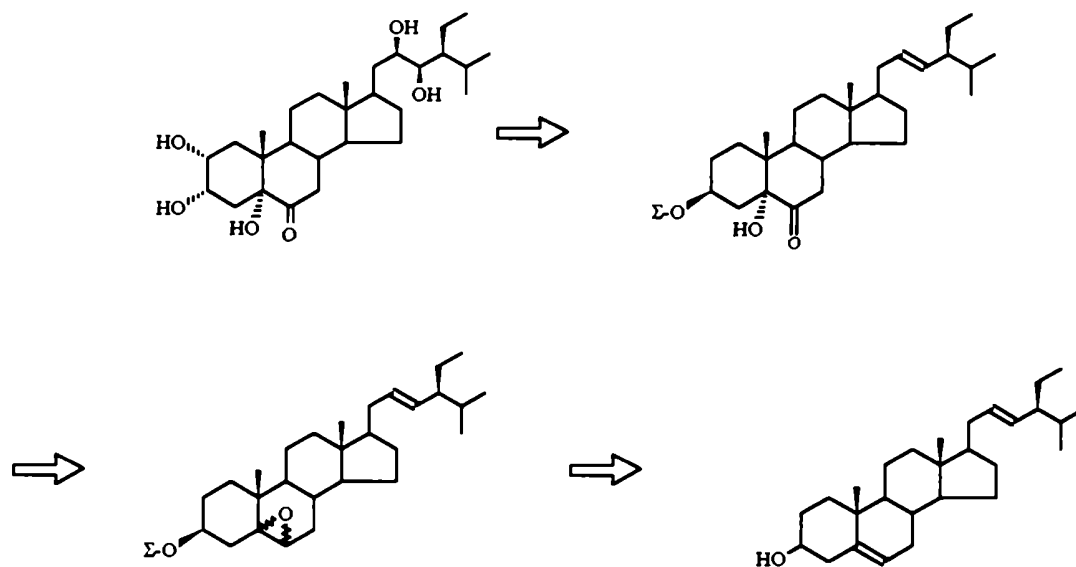


Figura 3.2. Estrategia retrosintética para obtener 5 α -hidroxi-24(S)-homoetilcastasterona (163) (Σ = grupo protector).

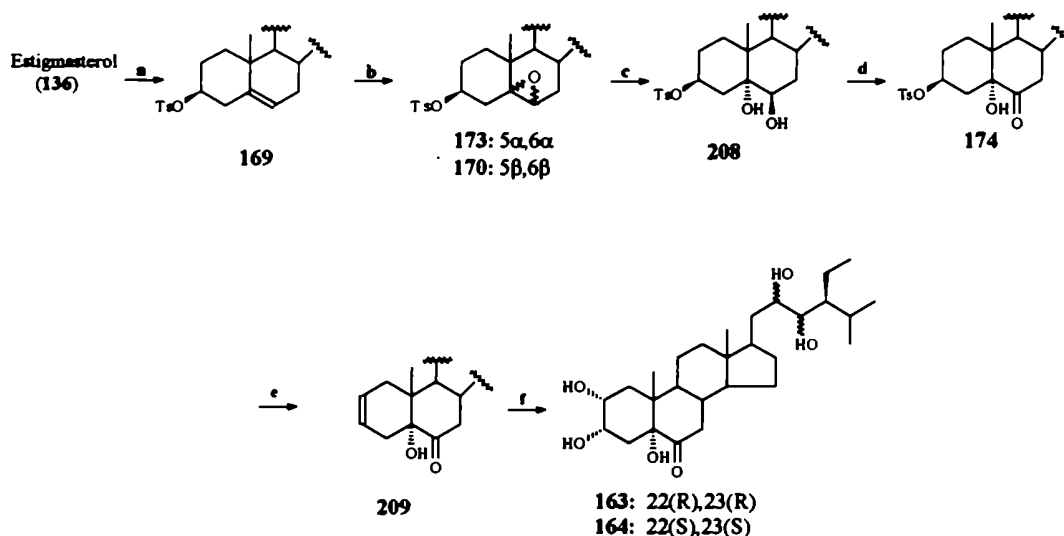
Teniendo en cuenta el esquema retrosintético de la **Figura 3.2** se elaboraron las estrategias sintéticas ilustradas en la **Figura 3.3**, utilizando estigmasterol (136) como producto de partida.

Las estrategias sintéticas implican etapas similares a las tenidas en cuenta para las síntesis de análogos 5 α -hidrogenados, relatadas en el **Capítulo 2**. Dichas etapas son:

2.1. Diferenciación de los dobles enlaces Δ^5 y Δ^{22} .

2.2. Obtención de la función 5 α -hidroxi-2-en-6-ona.

2.3. Dihidroxilación de dobles enlaces.



a. TsCl/Py b. mCPBA -78 °C c. HClO₄ d. CCP e. LiCO₃/DMA f. K₂OsO₂(OH)₄/(DHQD)₂-PHAL.

Figura 3.3. Estrategia utilizada para la síntesis de (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colest-6-ona (163) y de (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colest-6-ona (164).

3.2.1. DIFERENCIACIÓN DE LOS DOBLES ENLACES Δ^5 Y Δ^{22} (paso b, Figura 3.3).

Para la diferenciación de las insaturaciones de C₅-C₆ y C₂₂-C₂₃ se utilizó la reacción de epoxidación regioselectiva del doble enlace endocíclico con ácido *m*-cloroperbenzoico⁹ a -78°C. Aunque esta reacción conduce a una mezcla de los epóxidos α y β , no complica el esquema sintético, pues la posterior apertura hidrolítica de ambos epóxidos permite obtener el producto 5 α ,6 β -dihidroxilado (208) como único compuesto (ver Figura 3.3, paso c). La epoxidación requiere proteger previamente el hidroxilo de C-3 del estigmasterol para evitar sobreoxidaciones¹⁰. La elección del tosilato como grupo protector de C-3 tuvo una doble finalidad: por un lado, el tosilato poseía la capacidad de soportar las condiciones de reacción posteriores –epoxidación, hidrólisis y

oxidación--; y por otro lado, constituía un sustrato adecuado para la reacción de eliminación favoreciendo la obtención del precursor 209 (ver Figura 3.3, paso e).

3.2.2. OBTENCIÓN DE LA FUNCIÓN 5 α -HIDROXI-2-EN-6-ONA (pasos c, d y e, Figura 3.3)

3.2.2.1. Obtención del 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (208) (paso c, Figura 3.3).

La presencia del grupo tosiloxi como protector del hidroxilo de C-3 requirió encontrar las condiciones óptimas de apertura hidrolítica de la mezcla de epóxidos 5 α ,6 α y 5 β ,6 β previamente obtenidos (170 y 173, Figura 3.3). Para llevar a cabo la búsqueda de dichas condiciones se trabajó con el epóxido 5 β ,6 β previamente aislado (170).

Se eligieron medios ácidos acuosos para la obtención del 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (208), ya que un medio alcalino nucleofílico podría conducir a la eliminación o sustitución del grupo 3 β -tosiloxi. Al utilizar ácido sulfúrico 1,5N en distintos co-solventes, con el objeto de aumentar la dilución del ácido y realizar la reacción en fase homogénea, no se obtuvieron resultados satisfactorios. La reacción llevada a cabo en tetrahidrofurano¹¹ (entrada 1, Tabla 3.1) dio como producto indeseado el estigmast-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol (210) (ver Figura 3.4). Tampoco se obtuvieron buenos resultados utilizando mezclas acetona/dioxano¹², obteniéndose rendimientos menores al 25% y gran cantidad de subproductos no identificados (entradas 2 y 3, Tabla 3.1).

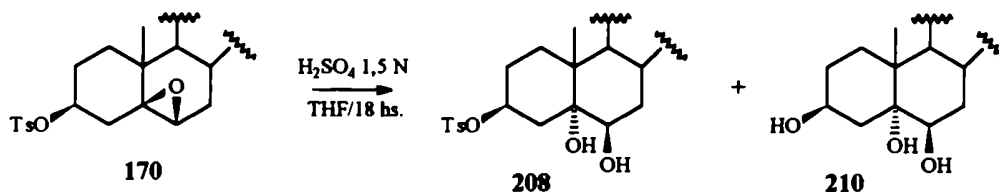


Figura 3.4. Productos de apertura hidrolítica de 170 (entrada 1, Tabla 3.1).

El ácido fórmico¹³ resultó ser demasiado nucleofílico en las condiciones ensayadas a distintas concentraciones, en todos los casos, el principal producto era el resultante del ataque del grupo formiloxi sobre C-6, obteniéndose el 6 α -formiloxi-3 β -tosiloxiestigmast-22-en-5 β -ol (211) hasta en un 80% (entradas 4 y 5, Tabla 3.1 y Figura 3.5).

Cuando se utilizó ácido perclórico diluido¹⁴ no se obtuvo reacción alguna, aún a concentraciones crecientes (entradas 6-8, Tabla 3.1); sin embargo, el agregado de

Tabla 3.1. Distintas condiciones de reacción ensayadas para la apertura hidrolítica del β -epóxido en medio ácido.

N	reactivo ^a	solvente ^a	tiempo	temperatura	producto	rendimientos	Referencias
1	0.6 ml H ₂ SO ₄ 1.5N	9 ml THF	18 hs.	temp. amb.	208 y 210	40% y 5% respectivamente	[11]
2	2.3 ml H ₂ SO ₄ 1.5N	5 ml acetona/dioxano (2:3)	24 hs.	temp. amb.	208 y otros	25%	[12]
3	2.3 ml H ₂ SO ₄ 1.5N	5 ml acetona/dioxano (1:5)	4 hs.	temp. amb.	208 y otros	22%	[12]
4	6 ml HCOOH 85%	—	2 hs.	60 °C	208 y 211	20% y 80% respectivamente	[13]
5	8 ml HCOOH 90%	—	2 hs.	temp. amb.	208 y 211	20% y 80% respectivamente	[13]
6	10 ml HClO ₄ 6%	—	2 hs.	temp. amb.	NR	—	[14]
7	15 ml HClO ₄ 20%	—	2 hs.	temp. amb.	NR	—	[14]
8	20 ml HClO ₄ 30%	—	2 hs.	temp. amb.	NR	—	[14]
9	2.5 ml HClO ₄ 28%	10 ml dioxano	3 hs.	temp. amb.	208	98%	[14]

^aValores para 100 mg de sustrato.

NR. no reacciona.

dioxano como co-solvente permitió obtener **208** como único producto (entrada 9, **Tabla 3.1**). Este último resultado se repitió al realizar la reacción sobre la mezcla de epóxidos $5\alpha,6\alpha$ y $5\beta,6\beta$ (**173** y **170**).

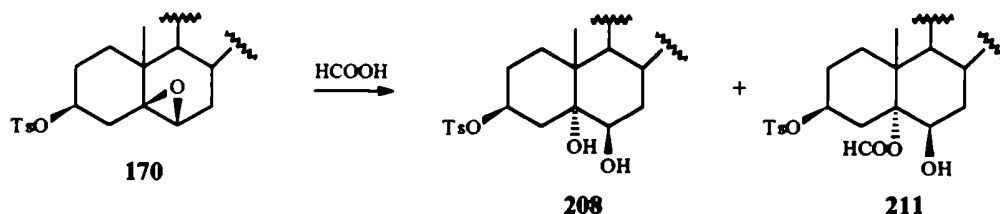


Figura 3.5. Productos de apertura nucleofílica de **170** con ácido fórmico.

3.2.2.2. Síntesis de la 3β -tosiloxi- 5α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**174**) (paso d, **figura 3.3**).

La oxidación del hidroxilo *axial* secundario del C-6 de **208**, en presencia del doble enlace C₂₂-C₂₃, un hidroxilo terciario y un grupo tosiloxi, podía realizarse mediante reactivos suaves de Cr^{VI}. Los ensayos realizados se resumen en la **Tabla 3.2**.

De los métodos más tradicionales que utilizan CrO₃/Py¹⁵, CrO₃/CH₂Cl₂^{16,17} o CrO₃/H₂SO₄¹⁸, se eligió este último por ser el más sencillo y rápido de utilizar. La oxidación con el reactivo de Jones tuvo la ventaja de ser rápida, pero el rendimiento nunca superó el 66% (entrada 1, **Tabla 3.2**). Las pruebas realizadas con dicromato de piridonio (DCP)¹⁹ dieron rendimientos más bajos, con largos tiempos de reacción (entrada 2, **Tabla 3.2**). En cambio, con clorocromato de piridonio (CCP)²⁰ se lograron muy buenos resultados en tiempos razonables de reacción (entradas 3 y 4, **Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Condiciones de reacción ensayadas para la oxidación del hidroxilo de C-6.

N	reactivo	Relación oxidante/ Esteroides ^a	solvente	tiempo (horas)	temperatura (°C)	producto	rendimiento	Referencias
1	Jones	6:1	acetona	1	0	174	66%	[18]
2	DCP	1,5:1	CH ₂ Cl ₂	22	25	174	50%	[19]
3	CCP	1,5:1	CH ₂ Cl ₂	23	0-25	174	85%	[20]
4	CCP	2,5:1	CH ₂ Cl ₂	4	0-25	174	94%	[20]

^aEquivalente/equivalente.

3.2.2.3. Síntesis de la 5 α -hidroxiestigmasta-2,22-dien-6-ona (209) (paso e, Figura 3.3).

Los intentos de eliminación del grupo 3 β -tosiloxi del 3 β -tosiloxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (174) para obtener el compuesto 209 se resumen en la **Tabla 3.3**.

En las primeras condiciones experimentales ensayadas, con carbonato de litio y dimetilformamida (DMF) como solvente, se observaba que a 120°C no se producía reacción alguna, mientras que a 140°C la reacción ya comenzaba a dar numerosos productos indeseados²¹ (entradas 1 y 2, **Tabla 3.3**). El siguiente paso fue transformar el tosilato en un mejor grupo saliente convirtiendo el grupo tosiloxi de 174 en un yoduro, utilizando una reacción de sustitución nucleofílica en presencia de yoduro de potasio y acetona, obteniéndose un compuesto (212) que, sin aislamiento, se utilizó como sustrato en los ensayos de eliminación (entradas 3-11, **Tabla 3.3**; **Figura 3.6**)²².

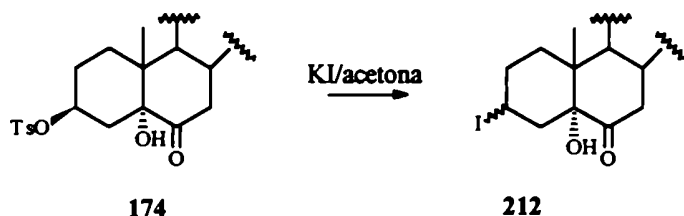


Figura 3.6. Obtención de la 3 β -iodo-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (212).

Utilizando DMA como solvente y diferentes bases se obtuvieron distintos porcentajes de conversión dependiendo del reactivo utilizado, pero en ninguno de los casos se pudo evitar la presencia de subproductos indeseados (entrada 3 y 4, **Tabla 3.3**). Utilizando DMF como solvente y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU)^{23,24} como base no se logró superar el 60% de rendimiento en una reacción con varios productos no identificados (entradas 5 y 6, **Tabla 3.3**); mientras que en dioxano, con el mismo reactivo, no se registró reacción alguna (entrada 7, **Tabla 3.3**).

Al llevar a cabo la reacción en DMSO como único reactivo se obtuvo un bajo porcentaje de conversión y rendimiento, pero se obtuvo 209 como único producto (entrada 8, **Tabla 3.3**). El agregado de DBU mejoró los rendimientos pero nuevamente se registró la presencia de subproductos (entrada 9, **Tabla 3.3**). Las mejores condiciones se obtuvieron con carbonato de litio^{21,22} en DMSO (entrada 10, **Tabla 3.3**), ya que se obtuvo el producto deseado 209 puro, con un rendimiento del 74%.

Tabla 3.3. Distintas condiciones de eliminación ensayadas para la obtención de **209** a partir de **174**.

N	sustrato	reactivo ^a	solvente	temperatura (°C)	tiempo (horas)	producto	conversión %	producto ^b %	referencias
1	174	12 eq. LiCO ₃	DMA	120	1	NR	0	—	[21]
2	174	12 eq. LiCO ₃	DMA	140	1	209 + otros	80	60	[21]
3	212 ^c	20 eq. LiCO ₃	DMA	130	6,5	209 + otros	80	60	[21,22]
4	212 ^c	1,5 eq. DBU	DMA	120	1	209 + otros	100	60	[23,24]
5	212 ^c	1,5-4,5 eq. DBU	DMF	80	2-4	209 + otros	80	59	[23,24]
6	212 ^c	4 eq. DBU	DMF	reflujo	4	209 + otros	100	55	[23,24]
7	212 ^c	1,5 eq. DBU	dioxano	80	0	NR	0	—	[23,24]
8	212 ^c	—	DMSO	110	1,5	209	53	53	[23,24]
9	212 ^c	1,5 eq. DBU	DMSO	120	2	209 + otros	100	74	[23,24]
10	212 ^c	20 eq. LiCO ₃	DMSO	110	1	209	74	74	[21,22]

^aEquivalentes de reactivo por equivalente de sustrato.

^bPorcentaje obtenido de **209**.

^cSe trata, en todos los casos, del compuesto crudo obtenido por el tratamiento de **174** con yoduro de potasio en acetona.

3.2.3. DIHIDROXILACIÓN DE LOS DOBLES ENLACES Δ^2 Y Δ^{22} .

3.2.3.1. Dihidroxilación de la 5α -hidroxiestigmasta-2,22-dien-6-ona (209) (paso f, Figura 3.3).

La dihidroxilación catalítica asimétrica sobre 209 se lleva a cabo en condiciones similares a las utilizadas para el sustrato 5α -hidrogenado (179) (ver Capítulo 2, sección 2.3, pag 103), ya que el doble enlace del anillo A reacciona más rápidamente, permitiendo aislar una mezcla de $2\alpha,3\alpha,5\alpha$ -trihidroxiestigmast-22-en-6-ona (213) luego de 2 días de reacción (ver Figura 3.7).

La dihidroxilación del doble enlace de la cadena lateral requirió 8 días más de reacción para dar una relación de diastereómeros 22(R),23(R)/22(S),23(S) de 2,4/1. En la Tabla 4.2 del Capítulo 4 (pag. 135) se comparan las reacciones de dihidroxilación catalítica asimétrica sobre todos los sustratos estudiados.

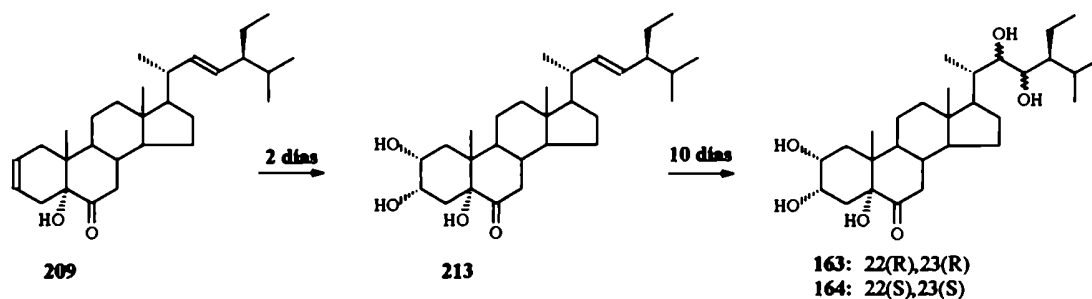


Figura 3.7. Tetrahidroxilación de la 5α -hidroxiestigmasta-2,22-dien-6-ona (209) para obtener la 5α -hidroxi-24(S)-homoetilcastasterona (163).

3.3. BIBLIOGRAFIA.

- 1- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe; *Phytochemistry*, **22**, 1393 (1983).
- 2- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Takematsu, Y. Takeuchi, M. Koguchi; *Phytochemistry*, **22**, 2437 (1983).
- 3- M. J. Thompson, W. J. Meudt, N. B. Mandava, S. R. Dutky, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **39**, 89 (1982).
- 4- M. Kondo, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 97 (1983).
- 5- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa; *Phytochemistry*, **23**, 525 (1984).
- 6- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 439 (1984).
- 7- S. Takatsuto, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe; *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 211 (1987).
- 8- T. Yokota, S. -K. Kim, Y. Fukui, N. Yakahashi, Y. Takeuchi, T. Takematsu; *Phytochemistry*, **26**, 503 (1987).
- 9- F. S. Alvarez, A. N. Watt; *J. Org. Chem.*, **33**, 2143 (1968).
- 10- a. L. R. Galagovsky, G. Burton, E. G. Gros; *Z. Naturforsch*, **44b**, 806 (1989). b. L. R. Galagovsky, E. G. Gros; *J. Chem. Research*, 366 (1990).
- 11- A. L. Brachet-Cota. **Síntesis y análisis conformacional de 6,19 oxido y 11,19 -óxidopregnanos**. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 1989.
- 12- H. B. Henbest, M. Smith, A. Thomas; *J. Chem. Soc.*, 3293 (1958).
- 13- a. F. Cortese, L. Bauman; *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 1393 (1935). b. Becke, Flieg, Passler; *Liebigs. Ann. Chem.*, **749**, 198 (1971). c. J. March. The effect of the leaving group, in **Advanced Organic Chemistry. Reaction, Mechanism and Structure**. 4^o Ed, John Wiley & sons. NY 1992.
- 14- M. L. Rueppel, H. Rapoport; *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 3877 (1972).
- 15- G. I. Poos, G. E. Arth, R. E. Beyler, L. H. Sarret; *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 422 (1953).
- 16- R. Ratcliffe, R. Rodehorst; *J. Org. Chem.*, **35**, 4000 (1970).
- 17- J. C. Collins; *T. Letters*, **30**, 3363 (1968).
- 18- H. C. Brown, C. P. Garg, K. -T. Liu; *J. Org. Chem.*, **36**, 387 (1971).
- 19- E. Corey, T. L. Schmidt; *T. Letters*, **20**, 399 (1979) y **21**, 731 (1980).
- 20- G. Piancatelli, A. ScettriM. D'Auria; *Synthesis* 245 (1982).
- 21- S. Fung, S.B. Sidall; *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6580 (1980).
- 22- D. T. Longone; *J. Org. Chem.*, **28**, 1770 (1963).
- 23- S. Wolff, M. E. Huecas, W. C. Agosta; *J. Org. Chem.*, **47**, 4358 (1982).
- 24- H. Oediger, R. Moller y K. Eifer; *Synthesis*, 591 (1972).

CAPITULO 4

SINTESIS DE ANALOGOS DE 24(S)-HOMOETILCASTASTERONA Y 5 α -HIDROXI-24(S)- HOMOETILCASTASTERONA

4.1. INTRODUCCION.

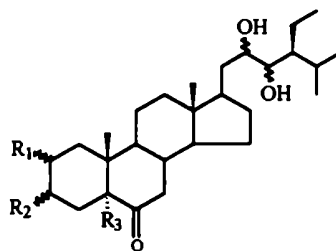
Con los objetivos de encontrar análogos sintéticos de mayor bioactividad que los brassinosteroides naturales, y de realizar estudios sobre la relación estructura química-bioactividad de brassinosteroides, se emprendió la síntesis de compuestos análogos de los dos compuestos considerados cabeza de serie:

1- (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -coleston-6-ona (12) (cabeza de la serie 5 α -hidrogenada), cuya síntesis se describió en el **Capítulo 2**.

2- (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -coleston-6-ona (163) (cabeza de la serie 5 α -hidroxilada), cuya síntesis se describió en el **Capítulo 3**.

Los análogos, cuyas síntesis se describen en este capítulo, resultan de modificaciones en el anillo A respecto de cada uno de los compuestos cabeza de serie.

En la **Figura 4.1** se muestran las estructuras de los análogos sintetizados.



159:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = H	22(R),23(R)
160:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = H	22(S),23(S)
161:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = H	22(R),23(R)
162:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = H	22(S),23(S)
165:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = OH	22(R),23(R)
166:	R ₁ = H	R ₂ = β -Br	R ₃ = OH	22(S),23(S)
167:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = OH	22(R),23(R)
168:	R ₁ = H	R ₂ = β -AcO	R ₃ = OH	22(S),23(S)

Figura 4.1. Análogos de (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -coleston-6-ona (12) (cabeza de la serie 5 α -hidrogenada) y de (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -coleston-6-ona (163) (cabeza de la serie 5 α -hidroxilada), cuyas síntesis se describen en el presente capítulo.

4.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS 5 α -HIDROGENADOS.

Los análogos 5 α -hidrogenados sintetizados (ver **Figura 4.1**) son los siguientes:

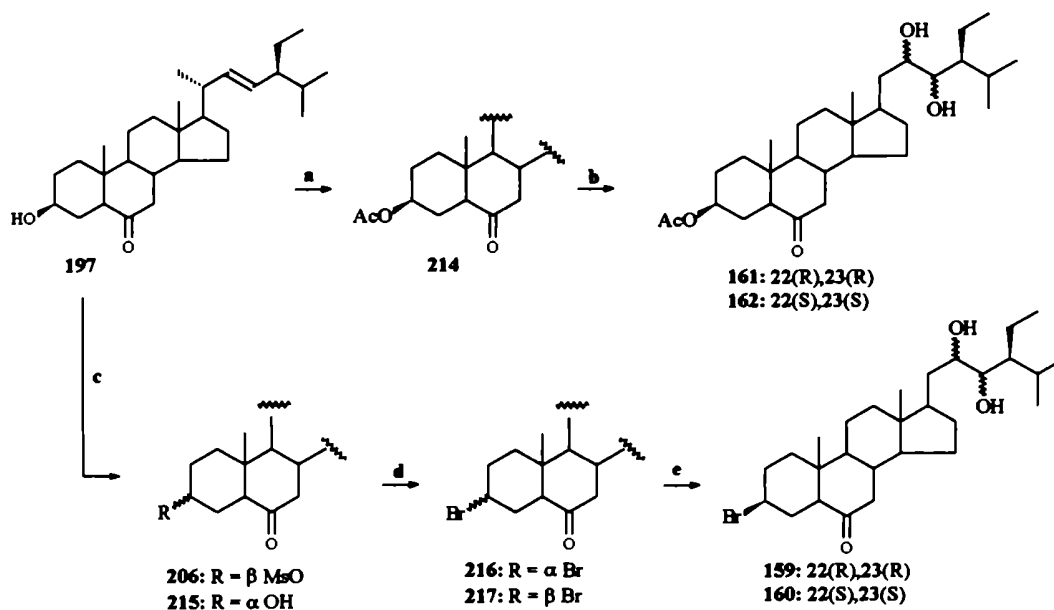
(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**159**).

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**160**).

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**161**).

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**162**).

Como puede apreciarse en la **Figura 4.2**, la síntesis de este grupo de análogos se llevó a cabo utilizando la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**) como materia prima, obtenida como se describió en la **sección 2.2.2.3.3i** del **Capítulo 2** (pag. 93) (ver **Esquema 2.1**, pag. 112). La acetilación del hidroxilo de C-3 de **197** para obtener el compuesto **214** y la posterior dihidroxilación del doble enlace de la cadena lateral permitió sintetizar los compuestos **161** y **162**. Estos compuestos se obtuvieron en condiciones similares a las utilizadas para la dihidroxilación de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (**179**) (ver **Capítulo 2**, **sección 2.2.3**, pag. 103), con un rendimiento del 22% y 17% respectivamente a partir de **214** y con una recuperación del 46% del producto de partida (ver **Tabla 4.2**, pag. 135).



a. (AcO)₂O/Py b y e. K₂O₈O₂(OH)₄/(DHQD)₂-PHAL c. 1. MsCl/Py; 2. DMF/H₂O/105° d. Br₂C/Ph₃P ó LiBr/acetona

Figura 4.2. Estrategia sintética para la obtención de los distintos análogos de castasterona 5 α -hidrogenados.

La síntesis de los análogos bromados no resultó ser tan sencilla. Como era de esperar, la sustitución del hidroxilo de C-3 del compuesto **197**, utilizando reactivos de conocido mecanismo SN_2 (Br_4C/Ph_3P)¹, nos llevó a obtener exclusivamente el análogo 3α -bromado (**216**) (entrada 1, **Tabla 4.1**). La dihidroxilación del compuesto **216** conduciría a la obtención de otro análogo de brassinosteroide que quedó fuera de los previstos para este trabajo de tesis.

Para obtener **217** debió utilizarse la 3α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**215**) como producto de partida, y tratarlo con Br_4C/Ph_3P (entrada 2, **Tabla 4.1**). El compuesto **215** se obtuvo mediante inversión de la configuración del hidroxilo de C-3 de **197**, por mesilación y posterior sustitución de la 3β -mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (**206**), mediante una reacción a $105^\circ C$ en una mezcla de DMF/agua. El rendimiento global para la obtención de **217**, fue del 27% a partir de **197** (entrada 2, **Tabla 4.1**).

Con el objeto de mejorar este rendimiento se intentó la sustitución directa del grupo 3β -mesilo de **206** por el grupo 3β -bromo. Los mejores resultados se obtuvieron tratando el derivado mesilado **206**, con bromuro de litio en distintos solventes. En acetona a reflujo² dio como resultado una mezcla de los isómeros $3\alpha:3\beta$ -bromados (**216** y **217**) en relación 6:1 (entrada 3, **Tabla 4.1**). En cambio llevando a cabo la reacción en metanol y etanol, solventes más favorables para una reacción del tipo SN_1 ³, se obtuvieron mezclas que contenían mayoritariamente el isómero 3β -bromado permitiendo obtener el compuesto **217** con un 64% de rendimiento (entradas 4 y 5, **Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Condiciones de reacción ensayadas para la obtención de **216** y **217**.

N	sustrato	reactivo	solvente	temperatura	α/β	217 ^a
1	197	Br_4C/Ph_3P	cloroformo	t. a.	sólo α	0
2	215	Br_4C/Ph_3P	cloroformo	t. a.	sólo β	27
3	206	LiBr	acetona	reflujo	6:1	14
4	206	LiBr	metanol	reflujo	1:2	64
5	206	LiBr	etanol	reflujo	1:2	64

^a Rendimiento porcentual calculado a partir de **197**.

Finalmente, se sometió el compuesto **217** a dihidroxilación de su doble enlace de $C_{22}-C_{23}$ para obtener **159** y **160**. Estos compuestos se obtuvieron en condiciones similares a las utilizadas para la dihidroxilación de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (**179**) (ver **Capítulo**

2, sección 2.2.3, pag. 103), con un rendimiento del 18% y 17% respectivamente a partir de 217. Además, se recuperó un 22 % de producto de partida (ver **Tabla 4.2**, pag. 135).

4.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS 5 α -HIDROXILADOS.

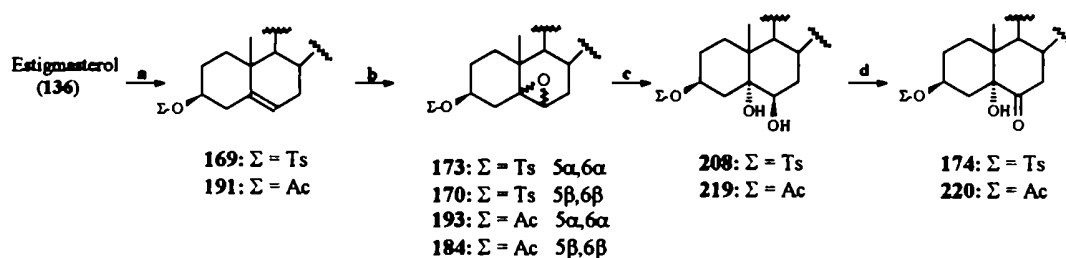
Los análogos 5 α -hidroxilados sintetizados (ver **Figura 4.1**) son los siguientes :

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestan-6-ona (**165**).

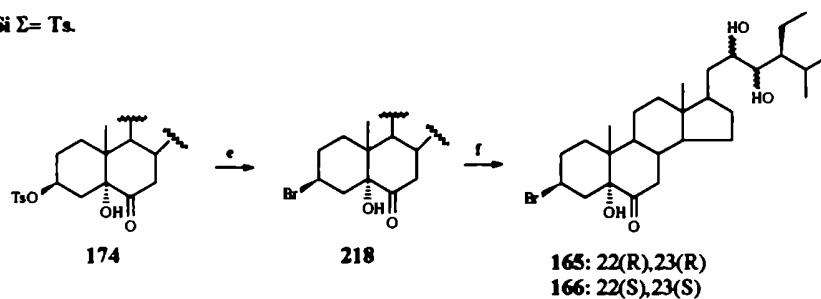
(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestan-6-ona (**166**).

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestan-6-ona (**167**).

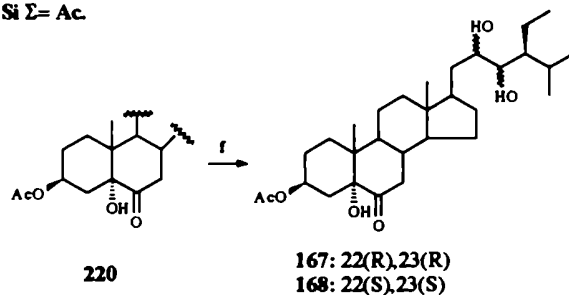
(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestan-6-ona (**168**).



Si $\Sigma = \text{Ts}$.



Si $\Sigma = \text{Ac}$.



a. TsCl ó (AcO)₂O/Py **b.** mCPBA -78 °C **c.** HClO₄ **d.** CCP **e.** LiBr/acetona **f.** K₂OsO₂(OH)₄/(DHQD)₂-PHAL.

Figura 4.3. Estrategia sintética para la obtención de los distintos análogos de castasterona 5 α -hidroxilados.

En la **Figura 4.3** se muestra la secuencia sintética de este grupo de análogos que se llevó a cabo de manera similar a lo establecido en la **Figura 3.3** del **Capítulo 3** (pag. 121), al describir la síntesis del compuesto cabeza de serie (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestano-6-ona (163).

4.3.1. SÍNTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-3 β -BROMO-5,22,23-TRIHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA (165) Y (22S,23S,24S)-24-ETIL-3 β -BROMO-5,22,23-TRIHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA (166).

Utilizando la secuencia sintética mostrada en la **Figura 4.3** se partió del estigmasterol (136) y, mediante tosilación, epoxidación del doble enlace C₅-C₆ y posterior apertura hidrolítica y oxidación del hidroxilo de C-6, se obtuvo el compuesto 174. Las reacciones mencionadas se discutieron en las secciones 3.2.1 y 3.2.2 del **Capítulo 3** (pags. 121 y 122 respectivamente). La obtención de la 3 β -bromo-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (218) se realizó por sustitución nucleofílica del grupo tosiloxi de 174, en una reacción llevada a cabo en presencia de bromuro de litio en acetona, con un 54 % de rendimiento (**Figura 4.3**, parte A). El compuesto 218 se sometió a reacción de dihidroxilación catalítica asimétrica obteniéndose la mezcla de los diastereómeros (22R,23R,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestano-6-ona (165) y (22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestano-6-ona (166) con un rendimiento de 19 % en ambos casos.

Las condiciones utilizadas fueron similares a las de la dihidroxilación de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (179) (ver **Capítulo 2**, sección 2.2.3, pag. 103), y se muestran en la **Tabla 4.2** (pag. 135).

4.3.2. SÍNTESIS DE (22R,23R,24S)-24-ETIL-3 β -ACETOXI-5,22,23-TRIHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA (167) Y (22S,23S,24S)-24-ETIL-3 β -ACETOXI-5,22,23-TRIHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA (168).

Si bien la estrategia utilizada para llevar a cabo la síntesis del compuesto 220 es similar a la utilizada para la obtención de 174 (ver **Figura 4.3**), existen algunas diferencias en las condiciones óptimas finalmente utilizadas.

Una vez obtenido el compuesto 184 como se detallara en el **Capítulo 2** (sección 2.2.2.2, pag 82), se procedió a llevar a cabo la apertura hidrolítica del epóxido para obtener el 3 β -acetoxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (219). Las condiciones óptimas requirieron disminuir la concentración del sustrato esteroidal y diluir el ácido utilizado, respecto a las condiciones para la obtención de 208 (**Capítulo 3**, sección 3.2.2.1, pag 122).

Por último se llevó a cabo la oxidación del hidroxilo de C-6 de **219** para obtener la 3 β -acetoxiestigmast-22-en-6-ona (**220**) con un rendimiento global del 52% a partir de estigmasterol. Para ello se utilizó una relación CCP/esteroide de 1,5:1 en cloruro de metileno.

Finalmente el compuesto **220** se sometió a dihidroxilación de su doble enlace para obtener **167** y **168** con un rendimiento del 12% y 9% respectivamente. Las condiciones utilizadas fueron similares a las de la dihidroxilación de la estigmasta-2,22-dien-6-ona (**179**) (ver **Capítulo 2**, sección 2.2.3, pag. 103), y se muestran en la **Tabla 4.2** (pag. 135).

4.4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS REACCIONES DE DIHIDROXILACIÓN CATALÍTICA ASIMÉTRICA.

Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de solventes consistente en *t*-butanol/agua/THF en distintas proporciones y la concentración del esteroide en el medio de reacción variaron entre 1,3% y 1,9% peso/volumen según el caso (ver **Tabla 4.2**).

En base a los resultados obtenidos, se pueden realizar las siguientes acotaciones:

1- En el caso de los sustratos sustituidos en C-3 (**214**, **217**, **218** y **220**) siempre se obtuvo una mezcla del producto de partida y los isómeros 22(R),23(R):22(S),23(S) en proporciones cercanas a la equimolecular, con rendimientos globales que en ningún caso superaron el 20%. En el caso de los sustratos doblemente insaturados (**179** y **209**), debido a que el doble enlace del anillo A resulta más reactivo, se aisló una mezcla de los productos derivados de la 2 α ,3 α -dihidroxiestigmast-22-en-6-ona (**207** y **213** respectivamente) (ver **Figuras 2.43** y **3.7**, pags. 103 y 127 respectivamente) y los isómeros 22(R),23(R):22(S),23(S) en una proporción aproximada de 2:1, con rendimientos de la reacción rondantes en el 30%.

2- El porcentaje de conversión varía entre el 50% y 70% según el caso, y puede recuperarse material de partida. Estos resultados coinciden con los publicados por otros grupos de trabajo⁴ en condiciones similares para el caso de la obtención de la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**) (ver **Tabla 2.6**, pag. 109).

3- Los sustratos bromados presentan los más bajos cocientes RR/SS, mientras que los mejores resultados se presentan en la obtención de los compuestos cabeza de serie.

4- Los rendimientos con sustratos 5 α -hidroxilados son mucho más bajos que los obtenidos para la síntesis de los análogos 5 α -hidrogenados, posiblemente debido a la descomposición de los productos de polihidroxilación durante la purificación. La presencia del hidroxilo terciario en C-5 convierte a estas moléculas en sustratos sensibles a condiciones de eliminación con la consiguiente baja del rendimiento.

5- En cuanto al porcentaje de conversión, la cantidad de sustrato recuperada, en la síntesis de análogos 5 α -hidroxilados es mayor, obteniéndose una alta recuperación de los productos de partida. Esto podría deberse a su menor solubilidad en el medio de reacción lo cual explicaría también su menor rendimiento global.

Tabla 4.2. Resultados de la reacción de dihidroxilación catalítica asimétrica sobre los distintos precursores de análogos de castasterona.

Sustrato	solvente ^a	% sustrato	% RR	% SS	RR/SS
Análogos 5α-hidrogenados					
179	(2:2:1) [1,5%]	30% ^b	34%	17%	2:1
217	(2:2:1) [1,7%]	21,6%	18,3%	17,1%	1:1
214	(2:2:1) [1,9%]	46%	22,3%	16,8%	1,3:1
Análogos 5α-hidroxilados					
209	(1,4:1,4:1) [1,3%]	24% ^b	12,6%	5,3%	2,4:1
218	(3:3:2) [1,7%]	61%	18,7%	19,5%	1:1
220	(3:3:1) [1,5%]	64%	12%	9%	1,3:1

^at-butanol:agua:THF. El valor entre corchetes indica la concentración p/v de sustrato, utilizada para realizar la reacción.

^bEn estos casos sustrato se refiere al producto de dihidroxilación parcial (207 y 213) (ver Figuras 2.43 y 3.7, pags. 103 y 127 respectivamente)

4.5. RESUMEN.

Los Esquemas 2.1 y la Figura 3.3 de los Capítulos 2 y 3 respectivamente (pags. 112 y 121), muestran las estrategias seguidas para la obtención de los compuestos cabeza de serie 12 y 163, y sus diastereómeros:

(22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (12).

(22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (55).

(22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestano-6-ona (163).

(22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestano-6-ona (164).

Los Esquemas 4.1 y 4.2 (pags. 138 y 139 respectivamente) detallan reactivos y rendimientos de las reacciones utilizadas en las diferentes estrategias sintéticas relatadas en este capítulo para la obtención de los análogos 5 α -hidrogenados y 5 α -hidroxilados de la 24(S)-homoetilcastasterona (12). La ruta más conveniente se encuentra indicada con las flechas en color rojo.

El rendimiento global referido a estigmasterol (136) de cada uno de los análogos sintetizados es el siguiente:

(22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (12): 6% en siete pasos de síntesis.

(22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (55): 3% en siete pasos de síntesis.

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (159): 3,4% en nueve pasos de síntesis.

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (160): 3,4% en nueve pasos de síntesis.

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (161): 6,4% en ocho pasos de síntesis.

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (162): 5,0% en ocho pasos de síntesis.

(22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestano-6-ona (163): 6,9% en seis pasos de síntesis.

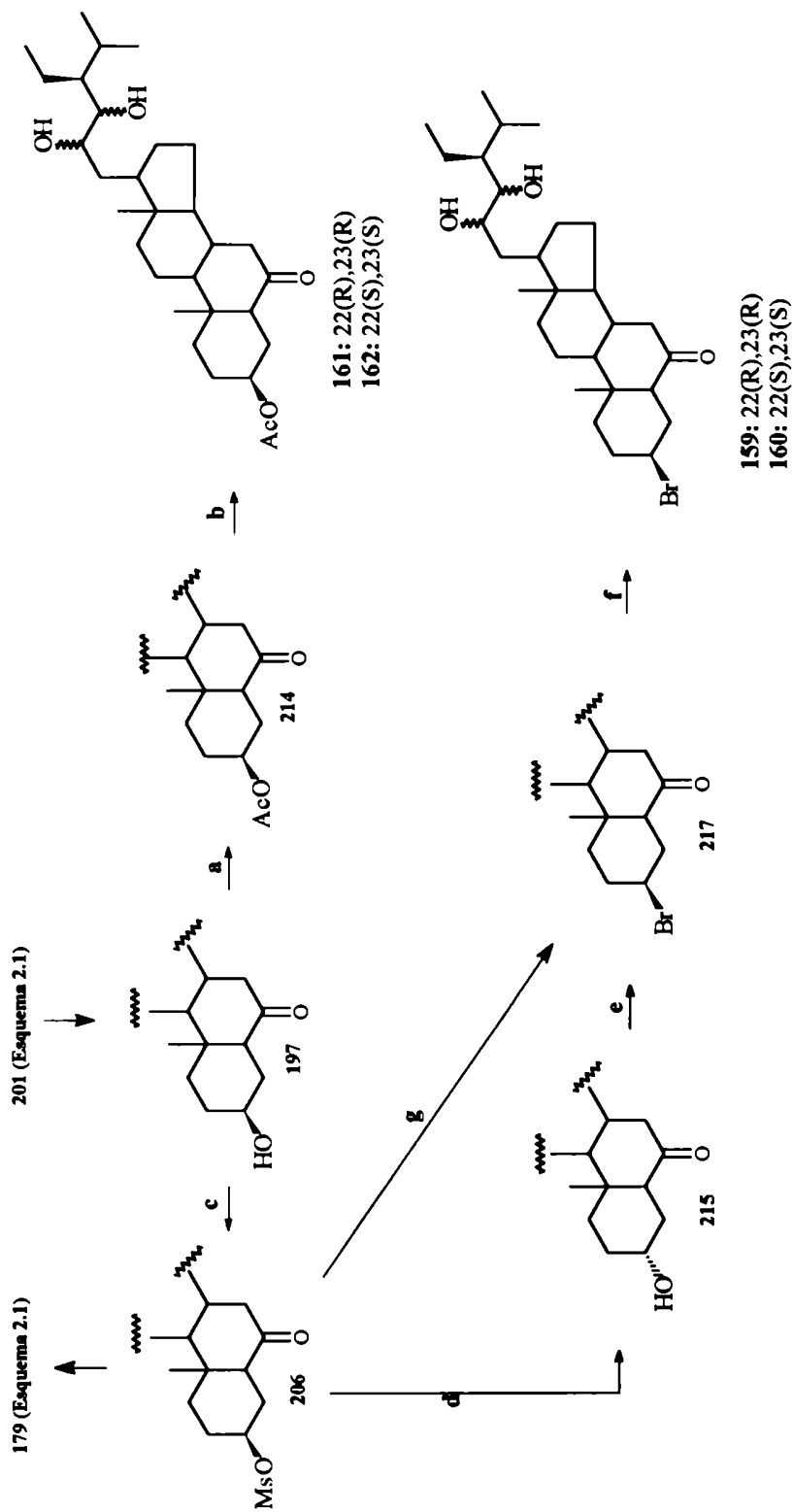
(22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestano-6-ona (164): 2,9% en seis pasos de síntesis.

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestano-6-ona (165): 7,3% en seis pasos de síntesis.

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-5,22,23-trihidroxi-5 α -colestano-6-ona (166): 7,3% en seis pasos de síntesis.

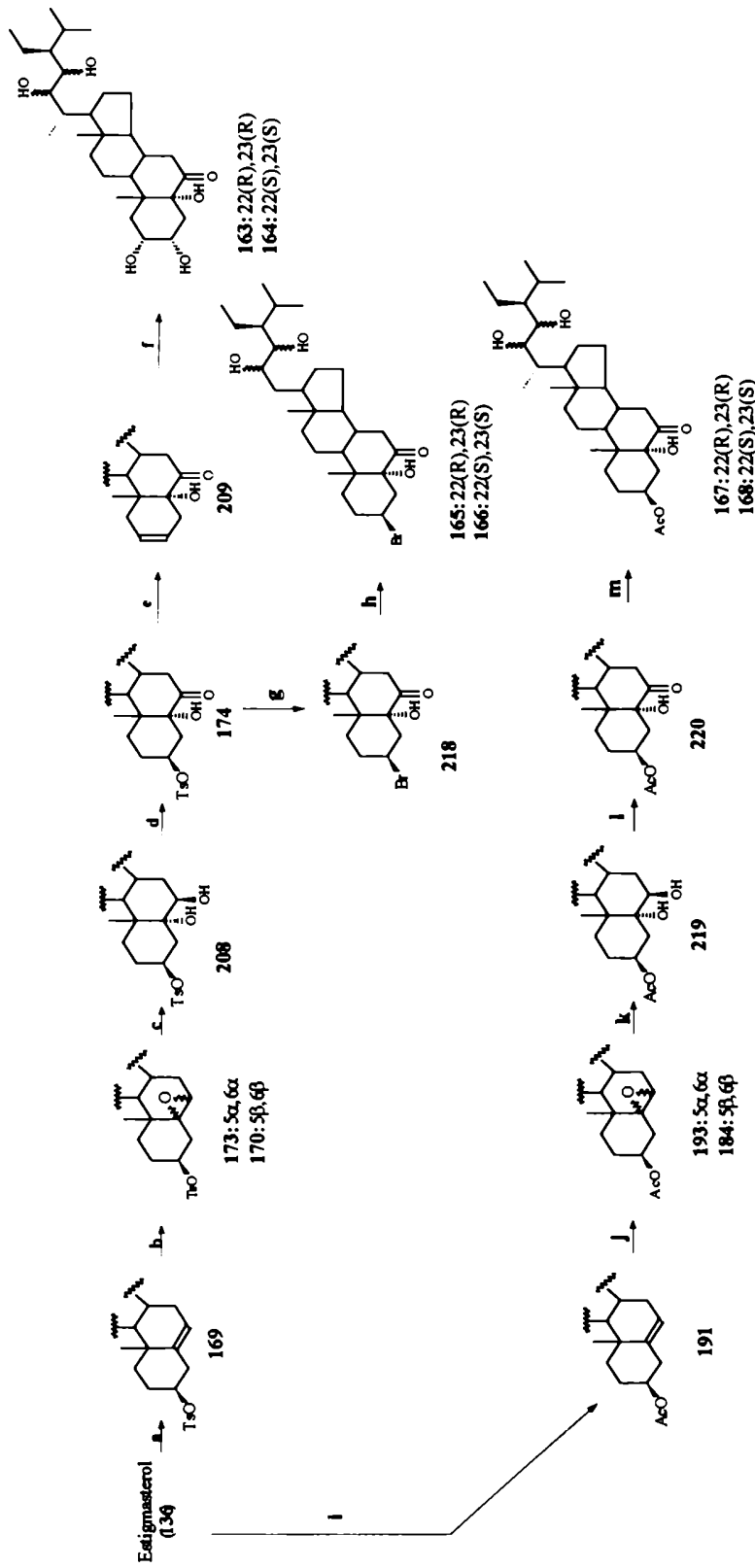
(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**167**): 6,2%
en cinco pasos de síntesis.

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**168**): 5%
en cinco pasos de síntesis.



- a. $(\text{AcO})_2\text{Py}$ (100%) b. $(\text{DHQD})_2\text{-PHAL}/\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ (22,3%) c. MsCl/Py (100%) d. $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}/105^\circ\text{C}$ (33%)
 e. $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CBr}_4/\text{Cl}_3\text{CH}$ (83%) f. $(\text{DHQD})_2\text{-PHAL}/\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ (18,3%) g. LiBr/MeOH (64%).

Esquema 4.1. Estrategias sintéticas ensayadas y rendimientos obtenidos en la síntesis de análogos 5 α -hidrogenados de 24(S)-homoetilcastasterona (12). La ruta más conveniente se encuentra indicada con las flechas en color rojo.



a. TsCl/Py (100%) **b.** mCPBA/C₁₂H₂₂/-78°C (80%) **c.** HClO₄ (98%) **d.** CCP (94%) **e.** LiCO₃/DMSO (74%)
f. (DHQD)₂-PHAL/K₂OsO₂(OH)₄ (13%) **g.** LiBr/acetona (54%) **h.** (DHQD)₂-PHAL/K₂OsO₂(OH)₄ (19%) **i.** (AcO)₂O/Py
 (100%) **j.** mCPBA/C₁₂H₂₂/-78°C (70%) **k.** HClO₄ (82%) **l.** CCP (82%) **m.** (DHQD)₂-PHAL/K₂OsO₂(OH)₄ (12%).

Esquema 4.2. Estrategias sintéticas ensayadas y rendimientos obtenidos en la síntesis de análogos de 5 α -hidroxilados de 24(S)-homocasticasterona (12).

4.6. BIBLIOGRAFIA.

- 1- J. P. Schaefer, J. G. Higgins, P. K. Shenoy; *Org. Synth.*, 249 (1973).
- 2- K. B. Wiberg, B. R. Lowry; *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3188 (1963).
- 3- H. Maskill. Catalysis, in **The Fisical Basis in Organic Chemistry**. Oxford University Press, Oxford, New York. Pgs 315-365. 1985.
- 4- T. Mc Morris, P. A. Patil, R. G. Chavez, M. E. Baker, S. D. Clouse; *Phytochemistry*, **36**, 585 (1994).



CAPITULO 5

DESCRIPCION DE RESULTADOS ESPECTROSCOPICOS

5.1. INTRODUCCION.

El brassinólido (1) y la castasterona (7) son los más abundantes brassinosteroides encontrados en la naturaleza. La primer determinación estructural de brassinólido, fue realizada en 1979 por Grove utilizando espectroscopia de rayos X, inmediatamente después de aislarlo de polen de *Brassica napus*¹. A partir de allí y hasta el momento, los métodos más utilizados de identificación y determinación estructural de brassinosteroides resultaron ser la espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono²⁻⁹, y la espectrometría de masa tanto de brassinosteroides libres⁹⁻¹² como derivatizados¹³⁻¹⁶.

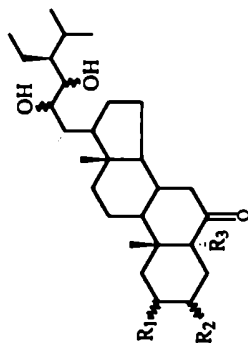
A continuación se presentan datos de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono, y de espectrometría de masa de los compuestos sintetizados durante este trabajo de tesis.

5.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

5.2.1. ANALISIS DE LOS ESPECTROS DE LOS BRASSINOSTEROIDES SINTETIZADOS.

En las **Tablas 5.1 a 5.3** se muestran datos de los espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C de los brassinosteroides sintetizados (ver **Figura 5.1**). Los valores presentados para los análogos originales fueron asignados en base a determinaciones previas realizadas por otros grupos de trabajo sobre brassinosteroides naturales^{2,3}. Los espectros de RMN-¹H fueron realizados a 200 MHz y los de RMN-¹³C a 50 MHz con secuencias de pulso normal y DEPT (Distortionless Enhanced Polarization Transfer).

En la **Tabla 5.1** se describen las señales relevantes del RMN-¹H, de los brassinosteroides sintetizados, tanto de la serie 5 α -hidrogenada como de la serie 5 α -hidroxilada, con funcionalización idéntica a la natural: 22(R),23(R). En la **Tabla 5.2** se describen las señales relevantes de RMN-¹H, de los brassinosteroides sintetizados, tanto de la serie 5 α -hidrogenada como de la serie 5 α -hidroxilada con funcionalización 22(S),23(S). La espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica permite distinguir entre los isómeros 22(R),23(R) y 22(S),23(S) debido a la diferente forma de las señales de H-22 y H-23 para ambos isómeros. Las señales consisten en un par de dobletes a 3,5 ppm (J= 8 Hz) y 3,7 ppm (J= 8 Hz) para los isómeros 22(R),23(R) mientras que, para el isómero 22(S),23(S) esas señales se superponen formando una banda ancha centrada en 3,6 ppm ($W_{1/2}$ = 12 Hz) (comparar **Tablas 5.1 y 5.2**). Esta diferencia en las formas de las señales se debe, a la diferente conformación que adopta la cadena lateral, para uno u otro isómero, variando el entorno estereoelectrónico de los H-22 e H-23¹⁷.



12:	R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = H	22(R),23(R)
55:	R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = H	22(S),23(S)
159:	R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = H	22(R),23(R)
160:	R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = H	22(S),23(S)
161:	R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = H	22(R),23(R)
162:	R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = H	22(S),23(S)
163:	R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = OH	22(R),23(R)
164:	R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = OH	22(S),23(S)
165:	R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = OH	22(R),23(R)
166:	R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = OH	22(S),23(S)
167:	R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = OH	22(R),23(R)
168:	R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = OH	22(S),23(S)

Figura 5.1. Brassinosteroides sintetizados, cuyos espectros se describen. Excepto los compuestos **12** y **55**, el resto son análogos originales no existentes previamente en la literatura.

Tabla 5.1. Señales relevantes de los espectros de RMN-1H [cloroformo-d₃/metanol-d₄ (95:5)] de los brassinosteroides sintetizados con configuración 22(R),23(R) en la cadena lateral.

H	COMPUESTO					
	5 α -hidrogenados		5 α -hidroxilados			
	12	159	161	163	165	167
H-2	-----	-----	-----	4,00 (m, W _{1/2} = 24 Hz, 1H)	-----	-----
H-3	4,00 (m, W _{1/2} = 8,6 Hz, 1H)	3,93 (m, 1H)	4,68 (m, 1H)	4,15 (m, W _{1/2} = 8,6 Hz, 1H)	4,35 (m, 1H)	5,02 (m, 1H)
H-5^a	2,70 (dd, 1H)	2,25 (dd, 1H)	2,25 (dd, 1H)	-----	-----	-----
H-7^b	2,15-2,22 (dd, 2H)	2,30-2,37 (dd, 2H)	2,28-2,35 (dd, 2H)	----- ^e	----- ^e	----- ^e
H-18	0,69 (s, 3H)	0,70 (s, 3H)	0,68 (s, 3H)	0,67 (s, 3H)	0,66 (s, 3H)	0,67 (s, 3H)
H-19	0,76 (s, 3H)	0,82 (s, 3H)	0,78 (s, 3H)	0,77 (s, 3H)	0,85 (s, 3H)	0,81 (s, 3H)
H-22^c	3,60 (d, 1H)	3,60 (d, 1H)	3,60 (d, 1H)	3,57 (d, 1H)	3,57 (d, 1H)	3,55 (d, 1H)
H-23^c	3,70 (d, 2H) ^d	3,73 (d, 1H)	3,73 (d, 1H)	3,70 (d, 1H)	3,73 (d, 1H)	3,67 (d, 1H)

^a J = 4 Hz y 12,8 Hz

^b J = 6 Hz y 12,8 Hz

^c J = 8 Hz

^d Señal correspondiente a H-2 y H-23 superpuestas.

^e Señal no distinguible, se encuentra en la zona de los metileno del esqueleto esteroide.

Tabla 5.2. Señales relevantes de los espectros de RMN-1H [cloroforno-d₃/metanol-d₄ (95:5)] de los brassinosteroides sintetizados con configuración 22(S),23(S) en la cadena lateral.

H	COMPUESTO					
	5 α -hidrogenados		5 α -hidroxilados			
	55	160	162	164	166	168
H-2	3,70 (m, W _{1/2} = 24 Hz, 1H)	----	----	3,77 (m, W _{1/2} = 24 Hz, 1H)	----	----
H-3	4,00 (m, W _{1/2} = 8,6 Hz, 1H)	3,93 (m, 1H)	4,68 (m, 1H)	4,12 (m, W _{1/2} = 8,6 Hz, 1H)	4,37 (m, 1H)	5,02 (m, 1H)
H-5^a	2,65 (dd, 1H)	2,25 (dd, 1H)	2,25 (dd, 1H)	----	----	----
H-7^b	2,25-2,30 (dd, 2H)	2,30-2,37 (dd, 1H)	2,30-2,37 (dd, 1H)	----	----	----
H-18	0,68 (s, 3H)	0,70 (s, 3H)	0,71 (s, 3H)	0,62 (s, 3H)	0,70 (s, 3H)	0,69 (s, 3H)
H-19	0,73 (s, 3H)	0,78 (s, 3H)	0,77 (s, 3H)	0,70 (s, 3H)	0,87 (s, 3H)	0,82 (s, 3H)
H-22 y	3,60	3,60	3,60	3,53	3,62	3,60
H-23	(m, W _{1/2} = 12 Hz, 2H)	(m, W _{1/2} = 12 Hz, 2H)	(m, W _{1/2} = 12 Hz, 2H)	(m, W _{1/2} = 12 Hz, 2H)	(m, W _{1/2} = 12 Hz, 2H)	(m, W _{1/2} = 12 Hz, 2H)

^a J = 4 Hz y 12,8 Hz.

^b J = 6 Hz y 12,8 Hz.

^c Señal no distinguible, se encuentra en la zona de los metileno del esqueleto esteroide.

Tabla 5.3. Espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C [cloroformo- d_3 /metanol- d_4 (95:5)] de los brassinosteroides sintetizados.

C	COMPUESTO														
	12	55	159	160	161 ^a	162 ^a	163	164	165	166	167 ^a	168 ^a			
C-1	39,8	39,9	39,2	39,1	36,2	36,3	30,3	30,2	32,7	32,7	29,3	29,3			
C-2	67,9	68,0	32,3	32,3	25,9	26,0	69,5	69,4	31,9	31,9	26,1	26,1			
C-3	67,4	68,0	50,5	50,4	72,9	72,7	67,4	67,2	48,4	49,4	71,1	71,2			
C-4	26,2	26,2	33,4	33,3	26,7	26,8	34,1	34,0	38,2	38,2	31,7	31,8			
C-5	50,7	50,7	59,0	59,0	56,4	56,4	79,5	79,5	80,2	80,1	79,5	79,6			
C-6	213,1	212,7	206,6	209,5	210,9	210,1	212,1	212,1	213,4	213,3	209,0	213,2			
C-7	46,6	46,5	46,5	46,5	46,4	46,5	42,8	43,4	41,5	41,5	41,4	41,5			
C-8	37,8	37,5	37,0	37,7	38,0	37,8	37,2	37,3	37,3	37,2	37,3	37,2			
C-9	53,6	53,5	53,8	53,8	53,6	53,7	45,3	45,2	44,1	44,1	43,9	44,0			
C-10	42,5	42,0	40,7	40,6	40,9	40,8	44,4	44,3	42,0	42,0	42,3	42,1			
C-11	21,1	21,7	21,3	21,7	21,4	21,7	21,0	21,6	21,0	21,6	21,1	21,6			
C-12	39,4	39,2	39,4	39,3	39,3	39,3	39,5	39,3	39,4	39,3	39,4	39,4			
C-13	42,7	43,3	42,8	43,5	42,7	43,4	41,3	41,2	42,7	43,4	42,7	42,3			
C-14	56,5	56,1	56,6	56,3	56,3	56,2	56,1	55,7	56,0	55,8	56,0	55,8			
C-15	23,7	24,0	23,8	24,1	23,7	24,1	23,7	23,9	23,6	23,9	23,6	24,0			
C-16	27,5	27,7	27,6	27,8	27,4	27,8	27,4	27,7	27,3	27,7	27,3	27,7			
C-17	52,4	52,4	52,5	52,6	52,4	52,5	52,4	52,3	52,3	52,3	52,9	52,4			

C-18	11,8	11,8	11,9	11,7	11,8	11,7	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	11,7
C-19	13,5	13,4	13,1	12,9	12,9	13,4	14,4	13,4	13,6	13,5	13,6	13,6
C-20	36,9	42,4	37,8	36,8	42,2	36,9	42,1	36,8	42,0	36,8	42,0	43,4
C-21	11,7	14,0	11,9	11,7	14,0	11,7	13,5	11,6	13,6	11,6	13,6	13,8
C-22	74,2	72,0	74,5	74,2	72,1	74,2	71,7	74,2	71,7	74,1	71,7	72,0
C-23	72,4	70,3	72,8	72,3	70,4	72,3	70,0	72,2	70,0	72,1	70,0	70,3
C-24	46,4	49,4	46,5	46,4	49,6	46,4	49,4	46,3	48,4	46,4	48,4	49,4
C-25	28,9	26,7	28,9	28,9	26,8	28,9	26,6	28,8	26,6	28,8	26,6	26,7
C-26^b	19,3	17,5	19,4	19,3	17,7	19,3	17,3	19,2	17,3	19,2	17,3	17,5
C-27^b	21,0	21,7	21,2	21,0	21,4	21,0	20,9	20,9	21,0	20,8	21,0	21,2
C-28	18,8	18,4	18,8	18,8	18,5	18,8	18,4	18,7	18,3	18,7	18,3	18,4
C-29	13,4	14,3	13,5	13,4	14,3	13,4	14,0	13,6	14,1	13,3	14,1	14,2

^a CH₃CO 170,5 ppm, CH₃CO 21,2 ppm.

^b Señales intercambiables.

En cuanto a las señales de H-5 e H-7, estas son perfectamente distinguibles en la serie de los brassinosteroides 5α -hidrogenados^{2,3}, mientras que en la serie de los análogos 5α -hidroxilados se produce un desplazamiento a campos más altos de la señal de H-7 a valores menores de los 2,0 ppm, lo que ocasiona la superposición con los hidrógenos del esqueleto esteroideal.

En la **Tabla 5.3** se describen los espectros de RMN-¹³C de los brassinosteroides sintetizados pertenecientes a la serie 5α -hidrogenada y la serie 5α -hidroxilada, con funcionalización 22(R),23(R) y 22(S),23(S).

Al comparar los datos de desplazamientos de las señales de RMN-¹³C de los compuestos con configuración 22(R),23(R) con respecto a los de configuración 22(S),23(S), se observa un efecto protector de aproximadamente 2 ppm sobre los C-22, C-23, C-25 y C-26 (sobre el C-28 el efecto es mucho menos intenso) (ver **Tabla 5.4**). Este efecto de desplazamiento sobre C-22 y C-23 permite utilizar el RMN-¹³C para distinguir rápidamente entre el isómero 22(R),23(R) y el 22(S),23(S). Por ejemplo la 24(S)-homoetilcastasterona (**12**) presenta los valores de 74,2 ppm (C-22) y 72,4 ppm (C-23), mientras que la 22(S),23(S),24(S)-homoetilcastasterona (**55**) presenta los valores 72,2 ppm (C-22) y 70,2 (C-23) ppm (ver **Tabla 5.3**). El pasaje de la serie 22(R),23(R) a la serie 22(S),23(S) induce un efecto desprotector para los C-20, C-21, C-24 y C-29 de la cadena lateral, cuyo valor varía según el carbono en el orden de 0,5-5,5 ppm.

Tabla 5.4. Diferencias de desplazamientos de las señales de los carbonos de la cadena lateral, entre la serie de configuración 22(R),23(R) y la de configuración 22(S),23(S), calculadas como Δ (δ de los isómeros RR - δ de los isómeros SS) ppm^a.

	$\Delta(12-55)$	$\Delta(159-160)$	$\Delta(161-162)$	$\Delta(163-164)$	$\Delta(165-166)$	$\Delta(167-168)$
C-20	-5,5	-4,4	-5,4	-5,2	-5,2	-6,6
C-21	-2,3	-2,2	-2,3	-1,8	-2,0	-2,2
C-22	2,2	2,3	2,1	2,5	2,5	2,1
C-23	2,1	2,2	1,9	2,3	2,2	1,8
C-24	-3,0	-3,0	-3,2	-3,0	-2,1	-3,0
C-25	2,2	2,0	2,1	2,3	2,2	2,1
C-26	1,8	1,7	1,6	2,0	1,9	1,7
C-28	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3
C-29	-0,9	-0,9	-0,9	-0,6	-0,5	-0,9

^a La señal del C-27, intercambiable con C-26, no sufre desplazamiento.

Por otro lado, es interesante analizar el efecto que causa la presencia de un 5 α -hidroxilo, sobre los carbonos vecinos. En la **Tabla 5.5** se muestran los desplazamientos sufridos por las señales de los carbonos de los anillos A y B por la presencia de un hidroxilo en C-5.

Tabla 5.5. Desplazamientos, calculados como diferencia entre la señal de carbonos individuales de los anillos A y B de la serie 5 α -hidrogenada y la señal de los carbonos correspondientes en la serie 5 α -hidroxilada [$\Delta(5\alpha\text{H} - 5\alpha\text{OH})$] ppm.

	2 α ,3 α -dihidroxiados		3 β -bromados		3 β -acetilados	
	$\Delta(12-163)$	$\Delta(55-164)$	$\Delta(159-165)$	$\Delta(160-166)$	$\Delta(161-167)$	$\Delta(162-168)$
C-1	9,5	9,7	6,5	6,4	6,9	7,0
C-4	-7,9	-7,8	-4,8	-4,9	-5,0	-5,0
C-7	3,8	3,1	5,0	5,0	5,0	5,0
C-9	8,3	8,3	9,7	9,7	9,7	9,7
C-10	-1,9	-2,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,3

La presencia del hidroxilo en C-5 causa un desplazamiento a campos altos de los C-1, C-7 y C-9, ubicados en γ al oxígeno. La magnitud de dicho efecto depende de la sustitución del anillo A. El efecto desprotector del grupo 5 α -hidroxilo se manifiesta sobre los C-4 y C-10, ubicados en β al oxígeno, y también presenta distinta magnitud según la sustitución del anillo A.

5.2.2. ANALISIS DE LOS ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIARIOS DE LAS SINTESIS DE BRASSINOSTEROIDES.

A partir de la utilización de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear en forma rutinaria para la determinación y la elucidación estructural de compuestos orgánicos, han aparecido numerosos trabajos sistemáticos estudiando efectos de sustituyente, según su posición y estereoquímica¹⁸⁻²³. Estos trabajos han dejado como consecuencia, numerosas fuentes de consulta de datos espectroscópicos en todas las ramas de la Química Orgánica, y en particular en el campo de los esteroides.

En esta sección se presentan las señales relevantes de los espectros de RMN-¹H y la asignación completa de los espectros de RMN-¹³C de los compuestos intermediarios que

forman parte de esta tesis. Además, se han sintetizado algunos compuestos (221 al 237) con el fin de completar los datos de las tablas comparativas de señales.

En la **Figura 5.2** y la **Tabla 5.6** se presentan los compuestos descritos en las **Tablas 5.7-5.21**, agrupados según su núcleo esteroidal, para facilitar la lectura y posterior comparación en las discusiones. Los espectros de todos estos compuestos, sintetizados según se describió en los **Capítulos 2, 3, 4 y 7**, se asignaron utilizando datos de literatura¹⁸, espectros de rutina de RMN-¹H y ¹³C, y técnicas espectroscópicas especiales tales como transferencia de polarización de comportamiento distorsionado (DEPT) y desacople retardado de pulso único (SPDD).

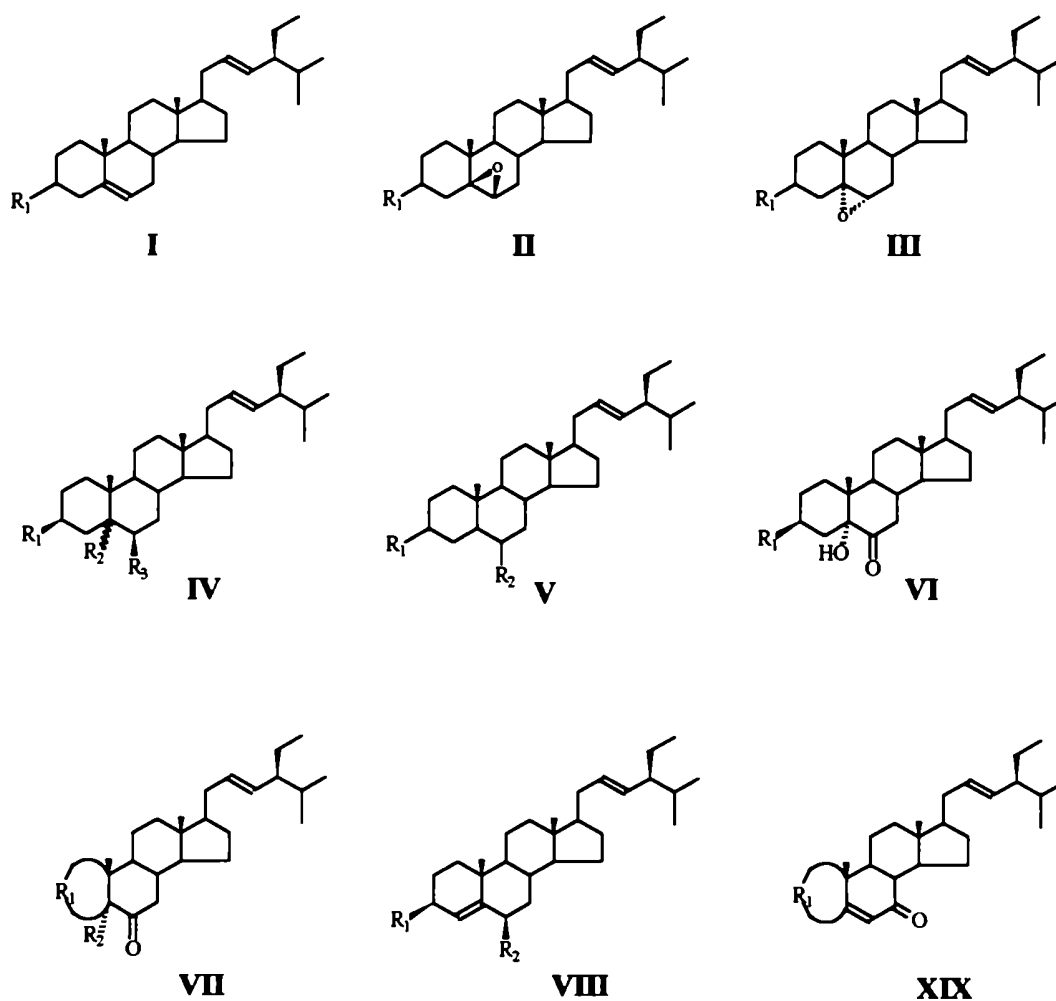













Figura 5.2. Esqueletos esteroidales de los compuestos presentados en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6. Estructuras de los compuestos descritos en el presente capítulo, correspondientes a los esqueletos esteroidales de la **Figura 5.2**.

N	estructura base	R ₁	R ₂	R ₃	número de compuesto ^a
1	I	β-OH	—	—	136
2	I	β-TsO	—	—	169
3	II	β-TsO	—	—	170
4	XIX		—	—	172
5	III	β-TsO	—	—	173
6	VI	TsO	—	—	174
7	II	α-HCOO	—	—	175
8	XIX		—	—	176
9	VII		H	—	177
10	VII		H	—	178
11	VII		H	—	179
12	II	β-Br	—	—	182
13	II	α-Br	—	—	183

14	II	β -AcO	---	---	184
15	VIII	AcO	---	---	185
16	II	β -OH	---	---	186
17	VIII	OII	---	---	187
18	V	β -TsO	=O	---	190
19	I	β -AcO	---	---	191
20	III	β -AcO	---	---	193
21	IV	OH	α -H	OH	194
22	IV	OH	β -OH	H	195
23	V	=O	=O	---	196
24	V	β -OH	=O	---	197
25	V	=O	β -OH	---	198
26	II	β -TBDMSi	---	---	199
27	IV	TBDMSi	α -H	OH	200
28	V	β -TBDMSi	=O	---	201
29	I	β -TBDMSi	---	---	202
30	XIX		---	---	203

31	III	β -TBDMSi	—	—	204
32	IV	TsO	α -H	OH	205
33	V	MsO	=O	—	206
34	VII		H	—	207
35	IV	TsO	α -OH	OH	208
36	VII		OH	—	209
37	IV	TsO	α -HCOO	OH	211
38	VII		OH	—	213
39	V	β -AcO	=O	—	214
40	V	α -OH	=O	—	215
41	V	α -Br	=O	—	216
42	V	β -Br	=O	—	217
43	VI	Br	OH	—	218
44	IV	AcO	α -OH	OH	219
45	VI	AcO	OH	—	220
46	I	α -Br	—	—	221
47	I	β -Br	—	—	222

48	I	α -Cl	—	—	223
49	I	β -Cl	—	—	224
50	I	β -CH ₃ O	—	—	225
51	I	α -HCOO	—	—	226
52	III	α -HCOO	—	—	227
53	II	α -Cl	—	—	228
54	II	β -Cl	—	—	229
55	II	β -CH ₃ O	—	—	230
56	IV	Br	α -OH	OH	231
57	IV	Cl	α -OH	OH	232
58	IV	CH ₃ O	α -OH	OH	233
59	VI	Cl	—	—	234
60	VI	CH ₃ O	—	—	235
61	XIX		—	—	236
62	XIX		—	—	237

^a Los compuestos con número 221-237 no formaron parte de las estrategias sintéticas, y se sintetizaron especialmente para completar la presente tabla. Su síntesis se describe en la sección 7.4 del Capítulo 7 (pag. 245).

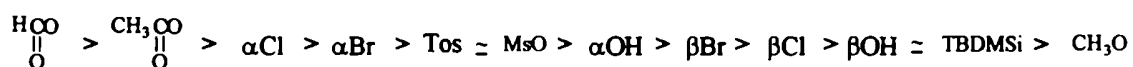
5.2.2.1. RMN-¹H de intermediarios de síntesis.

Todos los espectros de RMN-¹H fueron realizados en cloroformo deuterado y a una concentración de 10-15 mg/0,4 ml de solvente, para evitar las incongruencias surgidas de comparar señales de espectros realizados en diferentes condiciones. En las condiciones empleadas, y dado que no fueron determinados a temperatura constante, no es apropiado expresar los datos con una precisión mayor a 0,01 ppm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica de este tipo de esteroides (ver **Figura 5.2**) presentan dos zonas perfectamente delineadas: la primera se encuentra en el rango de 0-2,5 ppm, donde es muy difícil distinguir señales útiles operando a 200 MHz, a excepción de las señales de CH₃-18 y CH₃-19 que, en general, dan idea de la sustitución en los distintos anillos. Por otro lado, la zona por encima de los 2,5 ppm proporciona la mayor información a favor de la forma, integración y constantes de partición de las señales de C-2, C-3 y C-6. En las **Tablas 5.7-5.14** se muestran los datos relevantes de los espectros de RMN-¹H de los diferentes intermediarios de síntesis obtenidos y a continuación se comentan los aspectos más interesantes.

La identidad del sustituyente de C-3 no afecta mucho la posición de las señales de CH₃-18 y CH₃-19; sin embargo, la forma y ubicación de la señal de H-3 da idea del tipo y configuración de dicho sustituyente. En cuanto a la forma, en general para un par de anillos *trans*-fusionados, un multiplete con un ancho de base de aproximadamente 25 Hz, indica que el sustituyente de C-3 tiene configuración β, mientras que una banda con un ancho a media altura de 6-8 Hz indica que dicho sustituyente posee una configuración α²⁴.

El efecto del sustituyente de C-3 sobre el desplazamiento de la señal del H-3 varía según la identidad del mismo. En el **Esquema 5.1** se muestra un orden de los sustituyentes de acuerdo al efecto desprotector decreciente que ejercen sobre dicha señal.



Esquema 5.1. Sustituyentes sobre C-3 ordenados de acuerdo a su efecto desprotector decreciente sobre la señal de H-3.

Como puede apreciarse en las **Tablas 5.7-5.14**, este ordenamiento se repite sin variación independientemente de las distintas estructuras del resto de la molécula. En general, se verifica que a mayor electronegatividad del sustituyente, mayor es el efecto desprotector, y además, se comprueba que los sustituyente halógeno e hidroxilo poseen mayor efecto desprotector al presentar configuración α²⁴.

Cuando el esqueleto esteroidal posee un epóxido en C5-C6 (esqueletos **II** y **III** de la **Figura 5.2**), la consideración más importante involucra la señal de H-6 que presenta un aspecto diferente si se trata de un α ó un β epóxido. En el primer caso se trata de un doblete $J=4$ Hz a $\delta=2,95$ ppm, y en el segundo se trata de un doblete con $J=2$ Hz a $\delta=3,15$ ppm²⁵. La diferencia de 0,2 ppm entre ambas señales permite establecer proporciones en mezclas de ambos isómeros.

Los efectos más importantes que causa la presencia de un hidroxilo en C-6 obtenido en la apertura reductiva del β -epóxido (ver **Tabla 5.10**) son, por un lado, la desprotección del CH₃-19 de aproximadamente 0,2 ppm²⁶, y por el otro el cambio del aspecto de la señal de H-6. Esta se desproteje 0,6-0,7 ppm, y se convierte en una banda ancha con un $W_{1/2}=8$ Hz debido a que el H-6 α no presenta interacciones 1,3-diaxiales²⁴. Por otro lado, la apertura hidrolítica del epóxido (ver **Tabla 5.10**) produce una desprotección de la señal de H-6 de 0,5 ppm y se convierte, por el mismo motivo que en el caso anterior, en una banda ancha con un $W_{1/2}=4,5$ Hz.

Existen otros casos de señales que, presentando acoplamiento con otros protones, se presentan como una banda ancha para la potencia del equipo de resonancia magnética nuclear utilizado (200 MHz). Esto ocurre, en general, con las señales de los hidrógenos, que, hallándose en posición ecuatorial no presentan interacciones 1,3-diaxiales²⁴. Este es el caso del H-3 β de la 3 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**215**) (ver **Tabla 5.11**) que se presenta como una banda ancha con un $W_{1/2}=8$ Hz. Un caso interesante es el de los compuestos 2 α ,3 α -dihidroxilados (**163** de la **Tabla 5.1**, **164** de la **Tabla 5.2**, y **207** y **213** de la **Tabla 5.12**), ya que poseen el H-2 β axial y el H-3 β ecuatorial. El primero presenta interacciones 1,3 diaxiales y tiene un $W_{1/2}=24$ Hz, mientras que el segundo tiene un $W_{1/2}=8,6$ Hz.

La oxidación del hidroxilo de H-6 de los compuestos 5 α -hidroxilados ocasiona una protección de la señal de CH₃-19 en aproximadamente 0,3 ppm (comparar, por ejemplo, **208** de la **Tabla 5.10** y **174** de la **Tabla 5.12**).

La eliminación del sustituyente de C-3 para obtener un enlace olefinico en el anillo A, produce diferentes efectos sobre el desplazamiento del CH₃-19 según se trate de un Δ^2 , un Δ^3 o un Δ^4 . En el primer caso la señal permanece en los 0,72 ppm, mientras que en los dos últimos casos se encuentra más desprotegida, presentando valores de alrededor de 1,00 ppm (ver **Tabla 5.13**).

Tabla 5.7. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de estigmast-5,22-dieno^a (I) con distintos sustituyentes en C-3.

H	136	169 ^c	191 ^d	202 ^e	221	222	223	224	225 ^f	226 ^g
H-3	3,45 (m,1H)	4,30 (m,1H)	4,60 (m,1H)	3,42 (m,1H)	3,94 (m,1H)	4,34 (m,1H)	3,70 (m,1H)	4,48 (m,1H)	3,06 (m,1H)	4,75 (m,1H)
H-6 ^b	5,30 (d,1H)	5,30 (d,1H)	5,40 (d,1H)	5,30 (d,1H)	5,38 (d,1H)	5,38 (d,1H)	5,34 (d,1H)	5,34 (d,1H)	5,35 (d,1H)	5,40 (d,1H)
CH ₃ -18	0,70 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,72 (s,3H)	0,69 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,74 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,72 (s,3H)
CH ₃ -19	1,01 (s,3H)	0,96 (s,3H)	1,04 (s,3H)	1,00 (s,3H)	1,06 (s,3H)	1,10 (s,3H)	1,04 (s,3H)	1,04 (s,3H)	1,01 (s,3H)	1,04 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bJ= 4 Hz ^cCH₃-Tos 1,44 (s,3H), CH₃-Tos 7,26 y 7,72 (dd,4H) J= 9 Hz
^dCH₃CO 2,40 (s,3H). ^eCH₃Si 0,40 (s,3H), (CH₃)₃CSi 0,88 (s,9H). ^fCH₃O 3,36 (s,3H). ^gHCOO 8,10 (s,1H).

Tabla 5.8. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de 5β,6β-epoxiestigmast-22-eno^a (II) con distintos sustituyentes en C-3.

H	186	170 ^c	184 ^d	199 ^e	183	182	229	228	230 ^f	175 ^g
H-3	3,63 (m,1H)	4,60 (m,1H)	4,75 (m,1H)	3,65 (m,1H)	4,00 (m,1H)	4,66 (m,1H)	3,84 (m,1H)	4,50 (m,1H)	3,28 (m,1H)	5,25 (m,1H)
H-6 ^b	3,02 (d,1H)	2,95 (d,1H)	3,05 (d,1H)	3,05 (d,1H)	3,10 (d,1H)	3,10 (d,1H)	3,06 (d,1H)	3,10 (d,1H)	2,05 (d,1H)	3,10 (d,1H)
CH ₃ -18	0,66 (s,3H)	0,61 (s,3H)	0,66 (s,3H)	0,66 (s,3H)	0,65 (s,3H)	0,67 (s,3H)	0,66 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,66 (s,3H)	0,64 (s,3H)
CH ₃ -19	1,00 (s,3H)	1,03 (s,3H)	1,09 (s,3H)	0,98 (s,3H)	1,02 (s,3H)	1,00 (s,3H)	1,02 (s,3H)	1,00 (s,3H)	1,00 (s,3H)	1,06 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bJ= 2 Hz ^cCH₃-Tos 1,44 (s,3H), CH₃-Tos 7,26 y 7,72 (dd,4H) J= 9 Hz
^dCH₃CO 2,40 (s,3H). ^eCH₃Si 0,40 (s,3H), (CH₃)₃CSi 0,88 (s,9H). ^fCH₃O 3,36 (s,3H). ^gHCOO 8,10 (s,1H).

Tabla 5.9. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de 5α,6α-epoxiestigmast-22-eno^a (III) con distintos sustituyentes en C-3.

H	173 ^s ^c	193 ^d	204 ^e	227 ^f
H-3	4,60 (m,1H)	4,75 (m,1H)	3,85 (m,1H)	5,25 (m,1H)
H-6 ^b	2,80 (d,1H)	2,90 (d,1H)	2,85 (d,1H)	2,80 (d,1H)
CH ₃ -18	0,63 (s,3H)	0,63 (s,3H)	0,62 (s,3H)	0,64 (s,3H)
CH ₃ -19	1,00 (s,3H)	1,00 (s,3H)	1,05 (s,3H)	1,06 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bJ= 4 Hz ^cCH₃-Tos 1,44 (s,3H), CH₃-Tos 7,26 y 7,72 (dd,4H) J= 9 Hz
^dCH₃CO 2,40 (s,3H). ^eCH₃Si 0,40 (s,3H), (CH₃)₃CSi 0,88 (s,9H). ^fHCOO 8,10 (s,1H).

Tabla 5.10. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de 5X,6Y-estigmast-22-eno^a (IV) con distintos sustituyentes en C-3.

H	194	195	205 ^b	200 ^c	208 ^b	219 ^d	231	232	233 ^e	211 ^b ^f
H-3	3,60 (m,1H)	4,15 (ba, W _{1/2} = 8 Hz, 1H)	4,50 (m,1H)	3,60 (m,1H)	4,90 (m,1H)	5,02 (m,1H)	4,50 (m,1H)	4,30 (m,1H)	3,62 (m,1H)	4,90 (m,1H)
H-6	3,75 (ba, W _{1/2} = 8 Hz, 1H)	—	3,73 (ba, W _{1/2} = 8 Hz, 1H)	3,75 (ba, W _{1/2} = 5,6Hz, 1H)	3,52 (ba, W _{1/2} = 4,5Hz, 1H)	3,35 (ba, W _{1/2} = 4,5Hz, 1H)	3,53 (ba, W _{1/2} = 4,5Hz, 1H)	3,53 (ba, W _{1/2} = 4,5Hz, 1H)	3,54 (ba, W _{1/2} = 4,5Hz, 1H)	3,75 (ba, W _{1/2} = 5 Hz, 1H)
CH ₃ -18	0,68 (s,3H)	0,67 (s,3H)	0,69 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,72 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,77 (s,3H)
CH ₃ -19	1,00 (s,3H)	0,95 (s,3H)	1,00 (s,3H)	1,03 (s,3H)	1,16 (s,3H)	1,19 (s,3H)	1,22 (s,3H)	1,14 (s,3H)	1,18 (s,3H)	1,12 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bCH₃-Tos 1,44 (s,3H), CH₃-Tos 7,26 y 7,72 (dd,4H) J= 9 Hz ^cCH₃Si 0,40 (s,3H),
 (CH₃)₃CSi 0,88 (s,9H). ^dCH₃CO 2,40 (s,3H). ^eCH₃O 3,36 (s,3H). ^fHCOO 8,10 (s,1H).

Tabla 5.11. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de estigmast-22-en-6-ona^a (V) con distintos sustituyentes en C-3.

H	197	215	190 ^b	206 ^c	214 ^d	201 ^e	217	216	196	198
H-3	3,54 (m,1H)	4,17 (ba,W _{1/2} = 8 Hz, 1H)	4,67 (m,1H)	4,65 (m,1H)	4,67 (m,1H)	3,52 (m,1H)	3,92 (m,1H)	4,69 (ba,W _{1/2} = 8,4Hz, 1H)	—	—
H-6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,75 (ba,W _{1/2} = 8 Hz, 1H)
CH ₃ -18	0,67 (s,3H)	0,75 (s,3H)	0,67 (s,3H)	0,69 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,67 (s,3H)	0,61 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,75 (s,3H)
CH ₃ -19	0,77 (m,3H)	0,81 (s,3H)	0,73 (s,3H)	0,79 (s,3H)	0,77 (s,3H)	0,75 (s,3H)	0,79 (s,3H)	0,66 (s,3H)	1,00 (s,3H)	0,82 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bCH₃-Tos 1,44 (s,3H), CH₃-Tos 7,26 y 7,72 (dd,4H) J= 9 Hz ^cCH₃-SO₂ 2,98 (s,3H).
^dCH₃CO 2,40 (s,3H). ^eCH₃Si 0,40 (s,3H), (CH₃)₂CSi 0,88 (s,9H).

Tabla 5.12. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de 5α-hidroxiestigmast-22-en-6-ona^a (VI) con distintos sustituyentes en C-3.

H	174 ^b	220 ^c	218	234	235 ^d	207	213
H-2	—	—	—	—	—	3,75 (ba,W _{1/2} = 24 Hz, 1H)	3,95 (ba,W _{1/2} = 24 Hz, 1H)
H-3	4,42 (m,1H)	5,00 (m,1H)	4,32 (m,1H)	4,18 (m,1H)	3,44 (m,1H)	4,05 (ba,W _{1/2} = 8,6 Hz, 1H)	4,20 (ba,W _{1/2} = 8,6 Hz, 1H)
CH ₃ -18	0,67 (s,3H)	0,66 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,68 (s,3H)	0,76 (s,3H)	0,67 (s,3H)
CH ₃ -19	0,73 (s,3H)	0,80 (s,3H)	0,86 (s,3H)	0,84 (s,3H)	0,82 (s,3H)	0,81 (s,3H)	0,79 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bCH₃-Tos 1,44 (s,3H), CH₃-Tos 7,26 y 7,72 (dd,4H) J= 9 Hz ^cCH₃CO 2,40 (s,3H).
^dCH₃O 3,36 (s,3H).

Tabla 5.13. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de estigmast-22-eno^a (VII) y de estigmasta-4,22-dien-6β-ol (VIII) con distinta funcionalización en el anillo A.

H	179	177	178	209	185	187
H2-H3	5,63 (m,2H)	—	—	5,65 (m,2H)	—	—
H-3	—	—	—	—	5,25 (m,1H)	4,00 (m,1H)
H3-H4	—	5,65 (ba, W _{1/2} = 6 Hz, 2H)	—	—	—	—
H-4	—	—	6,40 (t,1H) ^b	—	5,45 (s,1H)	5,45 (s,1H)
H-6	—	—	—	—	4,20 (s,1H)	4,05 (s,1H)
CH ₃ -18	0,70 (s,3H)	0,69 (s,3H)	0,72 (s,3H)	0,67 (s,3H)	0,73 (s,3H)	0,66 (s,3H)
CH ₃ -19	0,72 (s,3H)	1,01 (s,3H)	0,97 (s,3H)	0,71 (s,3H)	1,27 (s,3H)	1,15 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bJ= 6 Hz

Tabla 5.14. Datos relevantes de RMN-¹H (cloroformo-d₃) de derivados de estigmasta-5,22-dien-7-ona^a (XIX) con distinta funcionalización en el anillo A.

H	172 ^b	203 ^c	237	176
H-3	4,30 (m,1H)	3,90 (m,1H)	3,80 (m,1H)	—
H3-H4	—	—	—	6,13 (m, W _{1/2} = 4,2 Hz, 2H)
H-6	5,50 (s,1H)	5,65 (s,1H)	5,68 (s,1H)	5,60 (s,1H)
H-18	0,60 (s,3H)	0,66 (s,3H)	0,70 (s,3H)	0,72 (s,3H)
CH ₃ -19	1,10 (s,3H)	0,80 (s,3H)	1,24 (s,3H)	1,12 (s,3H)

^aH-22 e H-23 5,10 (m,2H) J= 8 Hz ^bCH₃-Tos 1,44 (s,3H), CH₃-Tos 7,26 y 7,72 (dd,4H) J= 9 Hz ^cCH₃Si 0,40 (s,3H), (CH₃)₃CSi 0,88 (s,9H).

5.2.2.2. RMN-¹³C de intermediarios de síntesis.

En las **Tablas 5.15 a 5.21** se muestran los datos de RMN-¹³C de los compuestos sintetizados, ordenados en forma idéntica a la efectuada para la presentación de los datos de RMN-¹H. Todos los RMN-¹³C fueron realizados en cloroformo deuterado y a una concentración entre 30-60 mg/0,4 ml de solvente para evitar las incongruencias surgidas de comparar señales de espectros realizados en diferentes condiciones. En las condiciones empleadas, y dado que no se operó a temperatura constante, no es apropiado expresar los datos con una precisión mayor a 0,1 ppm.

Observando las **Tablas 5.15-5.21**, existen dos tipos de análisis posibles de hacer sobre los datos recogidos:

5.2.2.2.1. Análisis del efecto del sustituyente de C-3 sobre la frecuencia de resonancia de los carbonos del anillo A.

5.2.2.2.2. Análisis comparativo de las frecuencias de resonancia de los carbonos de los anillos A y B, para la serie 5 α -hidrogenada y la serie 5 α -hidroxilada.

5.2.2.2.1. Análisis del efecto del sustituyente de C-3 sobre la frecuencia de resonancia de los carbonos del anillo A.

El cambio de sustituyentes de C-3 sólo afecta la frecuencia de resonancia de los C-1, C-2, C-3 y C-4. Según se muestra en el **Esquema 5.2**, dichos sustituyentes pueden ordenarse de acuerdo al efecto desprotector decreciente que ejercen sobre el carbono al que están directamente unidos.



Esquema 5.2. Efecto desprotector decreciente de los distintos sustituyentes sobre el desplazamiento químico de la señal de C-3, en RMN-¹³C.

Teniendo en cuenta este ordenamiento, el tosiloxi, el mesiloxi, el metoxi y el acetiloxi son desprotectores respecto del hidroxilo; mientras que el cloruro y el bromuro son protectores desplazando las señales a campos más altos.

El efecto del sustituyente de C-3 sobre la señal de C-1 es prácticamente nulo y sólo tiene alguna importancia en el caso de los halógenos, que causan una desprotección de aproximadamente 2 ppm.

El sustituyente de C-3 afecta las señales de C-2 y C-4. En general, los halógenos y el *t*-butildimetilsililoxi son desprotectores respecto del hidroxilo; mientras que el formiloxi, tosiloxi, metoxi, mesiloxi y acetoxi son protectores de dicha señal. La magnitud del desplazamiento suele ser mayor, en estos ejemplos, sobre el C-4 que sobre el C-2.

Tabla 5.15. Espectros de RMN-¹³C (cloroformo-d₃) de derivados de estigmasta-5,22-dieno (I) con distintos sustituyentes en C-3.

N	136	169 ^a	191 ^b	202 ^c	221	222	223	224	225 ^d
C-1	37,3	37,0	37,0	37,4	39,7	39,7	39,3	39,2	37,3
C-2	29,7,	28,5	27,7	32,1	34,5	34,5	33,5	33,5	28,1
C-3	71,8	82,3	73,8	72,6	52,3	52,5	60,1	59,9	80,3
C-4	42,2	38,9	38,1	42,9	44,4	44,4	43,5	43,5	38,8
C-5	140,8	138,8	139,4	141,5	141,5	141,5	140,7	140,7	140,7
C-6	121,7	123,4	122,4	121,1	122,3	122,3	123,5	122,4	121,5
C-7	31,9	31,9	31,8	32,1	31,9	31,9	31,7	30,8	37,3
C-8	31,9	31,9	31,8	31,9	32,0	31,9	32,0	32,3	32,0
C-9	50,2	50,0	50,0	50,3	50,3	50,3	50,2	50,1	50,3
C-10	36,5	36,4	36,5	36,6	36,5	36,5	36,8	36,6	37,0
C-11	21,2	21,1	21,0	21,1	21,3	21,2	21,2	21,3	21,4
C-12	39,8	39,6	39,6	39,7	39,7	40,5	39,8	39,6	39,8
C-13	42,3	42,2	42,2	42,2	42,3	42,3	42,3	42,3	42,3
C-14	56,9	58,0	56,7	56,9	57,0	56,9	56,9	56,8	57,0
C-15 ^o	24,4	24,4	24,3	24,4	24,5	24,4	24,5	24,4	24,5
C-16	28,9	28,7	28,9	28,9	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0
C-17	56,1	56,8	55,9	56,0	56,1	56,1	56,1	56,0	56,1
C-18 [‡]	12,0	12,1	12,0	12,0	12,4	12,3	12,4	12,4	12,4
C-19 [#]	19,0	19,2	19,3	19,4	19,2	19,1	19,2	19,1	19,1
C-20	40,5	40,5	40,5	40,5	40,6	40,5	40,6	40,5	40,6
C-21 [‡]	21,2	21,7	21,3	21,2	21,1	21,3	21,1	21,0	21,4
C-22	138,3	138,1	138,1	138,3	138,2	138,1	138,2	138,2	138,2
C-23	129,3	129,3	129,1	129,3	129,3	129,4	129,3	129,2	129,2
C-24	51,2	51,3	51,2	51,3	51,3	51,3	51,3	51,2	51,3
C-25	31,7	31,9	31,8	31,9	31,8	31,9	32,0	31,8	31,9
C-26 [#]	18,9	19,1	19,0	19,4	19,4	19,3	19,2	19,4	19,1
C-27 [‡]	21,1	21,1	21,0	21,1	21,4	21,1	21,4	21,3	21,4
C-28 ^o	25,4	25,4	25,4	25,4	25,6	25,5	25,5	25,5	25,5
C-29 [‡]	12,2	12,3	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,1	12,2

^a CH₃Tos 21,5 ppm; CH₃Tos 144,2 ppm, 134,7 ppm, 129,6 ppm y 127,5 ppm.

^b CH₃CO 21,2 ppm; CH₃CO 170,5 ppm.

^c CH₃Si -4,6 ppm; (CH₃)₃CSi 18,2 ppm; (CH₃)₃CSi 25,9 ppm.

^d CH₃O 55,5 ppm.

[#], [‡], ^o, [°] Corresponden a señales de carbonos intercambiables.

Tabla 5.16. Datos relevantes de RMN-¹³C (cloroformo-d₃) de derivados de 5β,6β-epoxiestigmast-22-eno (II) con distintos sustituyentes en C-3.

N	186	170 ^a	184 ^b	199 ^c	204 ^c	175 ^d	182	183	228	229	230 ^e
C-1	37,2	36,1	36,6	37,3	----	35,4	39,9	39,8	39,1	39,1	36,8
C-2	31,6	27,9	27,1	31,4	31,7	28,7	33,6	33,2	34,4	34,1	27,2
C-3	69,2	79,3	71,2	70,1	69,4	70,6	53,4	49,2	56,8	60,3	77,8
C-4	42,1	38,5	37,9	42,3	40,5	36,6	44,3	—	43,3	43,3	38,8
C-5	63,0	62,2	62,4	63,1	65,0	61,4	68,2	61,7	61,3	66,9	65,5
C-6	63,7	63,3	63,3	63,7	59,2	63,4	63,4	64,3	64,2	63,6	63,4
C-7	32,6	32,2	32,4	32,7	32,5	32,3	32,8	32,4	32,4	32,7	32,7
C-8	30,9	29,5	29,7	29,8	29,8	29,8	30,0	30,8	30,1	29,9	29,8
C-9*	51,3	51,0	50,8	51,3	42,7	50,3	51,3	51,3	51,3	51,3	51,3
C-10	34,8	34,7	35,0	34,9	34,9	33,7	35,4	35,6	34,4	34,9	35,4
C-11	21,0	21,1	20,9	21,1	21,1	21,1	20,9	21,3	21,3	21,3	21,3
C-12	39,7	39,5	39,6	39,9	39,4	39,7	40,1	39,8	39,8	39,8	39,8
C-13	42,1	42,0	42,6	42,0	42,2	42,2	42,5	42,3	42,3	42,3	42,3
C-14 ^o	56,3	56,1	55,3	56,4	57,0	56,0	56,4	56,5	56,3	56,4	56,1
C-15 [#]	24,2	24,1	24,4	25,3	24,1	24,2	24,3	24,2	24,4	24,4	24,3
C-16	28,8	28,7	29,1	29,0	28,9	28,8	29,7	30,2	29,5	29,8	28,9
C-17 ^o	55,9	55,8	55,3	56,0	55,7	56,4	56,5	56,4	56,1	56,1	55,6
C-18 [§]	11,9	11,8	11,6	11,9	12,0	11,9	12,1	12,1	12,4	12,1	12,0
C-19 [¶]	17,0	16,8	16,5	17,0	15,9	17,0	16,9	17,4	17,1	17,0	17,2
C-20	40,4	40,4	40,4	40,5	40,4	40,4	40,3	40,6	40,5	40,4	40,5
C-21 [£]	21,9	21,8	21,8	22,0	21,7	21,7	22,0	21,9	21,8	22,0	22,1
C-22	138,1	138,1	138,1	138,2	138,2	138,2	137,9	138,2	138,1	138,0	138,1
C-23	129,3	129,3	129,3	129,4	123,3	129,4	129,7	129,6	129,3	129,4	129,3
C-24*	51,2	51,1	51,0	51,5	51,2	51,2	51,8	51,6	51,3	51,6	51,1
C-25	31,8	31,8	32,4	31,9	31,8	31,9	31,9	31,9	32,0	32,0	31,9
C-26 [¶]	18,9	18,9	19,3	19,0	18,9	19,0	19,1	19,2	19,1	19,1	19,1
C-27 [£]	21,1	21,0	20,9	21,2	21,1	21,2	21,2	21,2	21,2	21,1	21,1
C-28 [#]	25,3	25,3	25,3	25,4	25,4	25,5	25,3	25,5	25,5	29,5	25,5
C-29 [§]	12,2	12,2	11,6	12,2	12,2	12,2	12,1	12,4	12,1	12,3	12,3

^a $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{Tos}$ 21,5 ppm; CH_3Tos 144,2 ppm, 134,7 ppm, 129,6 ppm y 127,5 ppm.

^b $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$ 21,2 ppm; CH_3CO 170,5 ppm.

^c $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{Si}$ -4,6 ppm; $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ 18,2 ppm; $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{CSi}$ 25,9 ppm.

^d HCOO 160,5 ppm.

^e $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$ 55,5 ppm.

^o, [#], [§], [£], [¶] Corresponden a señales de carbonos intercambiables.

Tabla 5.17. Datos relevantes de RMN-¹³C (cloroformo-d₃) de derivados de 5X,6Y-estigmast-22-eno (IV) con distintos sustituyentes en C-3.

N	194	195	205 ^a	200 ^b	208 ^a	219 ^c	231	232	233 ^d	211 ^{a,e}
C-1	38,4	37,2	38,2	38,7	32,3	32,1	33,4	32,5	32,2	31,8
C-2	31,0	----	28,3	32,0	27,7	26,7	23,0	30,2	27,0	27,6
C-3	71,6 [*]	68,2	82,6	72,5 [*]	80,5	71,2	49,5	57,1	76,5	79,5
C-4	34,8	----	32,3	35,8	38,2	37,0 [*]	35,0 [*]	34,8 [*]	37,5	38,2
C-5	47,4	75,5	47,3	47,6	75,3	75,7	75,9	76,3	76,0	75,6
C-6	71,2 [*]	----	71,3	72,3 [*]	75,8	76,2	76,8	75,9	75,9	75,0
C-7	39,3	----	39,7	39,5	34,6	34,6 [*]	34,9 [*]	34,0 [*]	34,5	34,3
C-8	31,7 ^o	----	31,8	31,9	31,9	31,9	32,0	32,0	32,0	31,3
C-9	54,2	43,3	54,0	54,4	45,7	45,5	49,3	46,0	46,0	45,1
C-10	35,2	40,5	35,1	34,0	37,1	38,3	38,4	38,3	38,6	37,8
C-11	21,2	21,2	20,9	21,2	21,1	21,1	21,3	21,3	21,2	21,0
C-12	39,7	40,0	39,7	39,9	39,8	39,8	39,9	39,9	40,0	39,7
C-13	42,4	42,5	42,5	42,6	42,5	42,6	42,8	42,5	42,7	42,6
C-14 [#]	56,2	56,9	56,1	56,4	56,1	55,9	56,1	56,1	56,1	55,7
C-15	24,1	24,3	24,2	24,3	24,2	24,2	24,3	24,3	24,3	24,1
C-16	28,8	28,7	28,8	28,9	28,9	28,9	29,0	29,0	29,0	28,8
C-17 [#]	56,0	56,1	56,0	56,1	56,0	56,0	56,1	56,1	55,7	56,0
C-18 [‡]	12,0	12,3	12,2	12,3	12,3	12,2	12,4	12,5	12,5	12,3
C-19	15,5	17,1	15,5	15,8	16,7	16,7	17,0	17,0	16,9	16,3
C-20	40,3	40,6	40,4	40,5	40,5	40,5	40,5	40,6	40,6	40,4
C-21 [‡]	21,1	21,6	21,0	21,1	21,2	21,2	21,1	21,2	---	21,2
C-22	138,2	138,3	138,2	138,3	138,3	138,3	138,1	138,2	138,2	138,1
C-23	129,2	129,4	129,3	129,3	129,4	129,3	129,3	129,4	129,2	129,5
C-24	51,1	51,3	51,2	51,3	51,3	51,2	51,3	51,3	51,3	51,2
C-25	30,3 ^o	32,0	30,2	30,4	30,2	30,2	30,2	30,3	30,3	30,5
C-26	18,8	19,1	18,9	19,0	19,1	19,0	19,2	19,2	19,1	19,0
C-27 [‡]	20,9	21,2	21,1	21,1	21,2	21,1	21,3	21,2	21,2	21,0
C-28	25,2	25,5	25,3	25,4	25,4	25,4	25,5	25,5	25,5	25,4
C-29 [‡]	12,1	12,3	12,2	12,2	12,4	12,3	12,5	12,5	12,4	12,2

^a $\underline{\text{CH}}_3\text{Tos}$ 21,5 ppm; CH_3Tos 144,2 ppm, 134,7 ppm, 129,6 ppm y 127,5 ppm.

^b $\underline{\text{CH}}_3\text{Si}$ -4,6 ppm; $(\text{CH}_3)_3\underline{\text{C}}\text{Si}$ 18,2 ppm; $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{CSi}$ 25,9 ppm.

^c $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$ 21,2 ppm; $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{O}$ 170,5 ppm.

^d $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$ 55,5 ppm.

^e HCOO 160,5 ppm.

^o, [#], [‡], ^{*} Corresponden a señales de carbonos intercambiables.

Tabla 5.18. Datos relevantes de RMN-¹³C (cloroformo-d₃) de derivados de estigmast-22-en-6-ona (V) con distintos sustituyentes en C-3.

N	197	215	198	196	190 ^a	214 ^b	201 ^c	206 ^d	217
C-1	36,8	31,7	38,2	38,1	36,4	36,1	36,9	36,0	39,0
C-2	30,8	28,2	30,9	37,4 [§]	28,0	25,8	31,3 [£]	27,9	32,3 [£]
C-3	70,8	65,5	207,0	209,2	81,5	72,5	71,5	80,9	50,5
C-4	30,1	27,8	49,0	41,3	26,9	26,6	30,3 [£]	27,0	33,3 [£]
C-5	57,0	51,7	42,1	57,5	56,8	56,5	56,0	56,4	58,8
C-6	206,0	206,0	70,8	211,2	209,3	209,6	211,1	208,8	209,3
C-7	46,8	46,9	39,7	46,6	46,5	46,3	46,8	46,1	46,4
C-8	38,0	38,8	31,9	38,0	37,8	37,6	37,9	37,5	37,6
C-9	54,0	54,0	53,8	53,5	53,7	53,5	54,1	53,2	53,7
C-10	41,0	41,6	36,7	37,0 [§]	40,6 [¥]	40,1 [¥]	41,0 [¥]	40,1 [¥]	40,5
C-11 [#]	21,2	21,2	21,1	21,1	21,1	20,9	21,2	20,9	21,1
C-12	39,5	39,5	39,9	39,3	39,3	39,1	39,5	39,0	39,2
C-13	43,0	42,9	42,6	42,9	42,8	42,6	42,9	42,5	42,7
C-14 [*]	56,9	57,0	56,1	56,7	55,9	56,1	57,0	55,9	56,7
C-15	24,1	24,0	24,4	24,0	24,0	23,7	24,1	23,7	23,9
C-16	28,8	28,7	28,9	28,7	28,7	28,4	28,7	28,4	28,6
C-17 [*]	56,0	56,0	56,1	56,0	56,4	56,6	57,0	55,6	55,8
C-18 [°]	12,3	12,2	12,3	12,2	12,2	12,0	13,2	12,0	12,1
C-19	13,2	12,3	15,0	12,6	12,9	12,7	18,2	12,6	12,6
C-20	40,4	40,4	40,5	40,4	40,3 [¥]	40,6 [¥]	40,4 [¥]	40,2 [¥]	40,2
C-21	21,6	21,2	21,2	21,7	21,6	21,2	21,5	21,1	21,2
C-22	138,0	138,0	138,2	137,8	137,9	137,6	138,0	137,6	137,8
C-23	129,7	129,6	129,4	129,7	129,8	129,3	129,6	129,3	129,5
C-24	51,3	51,3	51,3	51,2	51,2	50,9	51,2	50,9	51,1
C-25	31,9	31,9	30,2	31,8	31,8	31,5	31,9	31,5	31,7
C-26	19,0	19,0	19,0	19,0	19,0	18,7	19,0	18,7	18,9
C-27 [#]	21,1	21,2	21,1	21,2	21,4	20,8	21,1	20,8	21,0
C-28	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,1	25,4	25,1	25,2
C-29 [°]	12,3	12,2	12,3	12,2	12,2	11,9	12,2	11,9	12,1

^a $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{Tos}$ 21,5 ppm; $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{Tos}$ 144,2 ppm, 134,7 ppm, 129,6 ppm y 127,5 ppm.

^b $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$ 21,2 ppm; $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CO}$ 170,5 ppm.

^c $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{Si}$ -4,6 ppm; $(\text{CH}_3)_3\underline{\text{C}}\text{Si}$ 18,2 ppm; $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{CSi}$ 25,9 ppm.

^d $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{SO}_2$ 38,5 ppm.

^{*}, [°], [#], [§], [£], [¥] Corresponden a señales de carbonos intercambiables.

Tabla 5.19. Datos relevantes de RMN-¹³C (cloroformo-d₃) de derivados de 5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (VI) con distintos sustituyentes en C-3.

N	174 ^a	220 ^b	218	234	235 ^c	207	213
C-1	29,8	29,5	32,9 [§]	32,1	29,7	39,5	30,3
C-2	27,4	26,3	32,2 [§]	31,3	26,8	67,8	69,5
C-3	79,9	70,8	48,0	55,9	75,9	67,9	67,4
C-4	33,6	32,3	39,5	37,8	32,8	26,1	34,2
C-5	80,4	80,2,	81,0	80,5	80,6	50,6	79,5
C-6	212,2	212,4	211,7	212,5	212,2	213,7	212,0
C-7	41,7	41,7	42,0	42,0	42,0	46,3	42,9 [§]
C-8	37,4	37,3	37,4	37,4	37,4	37,5	37,1
C-9	44,2	44,3	44,7	44,5	44,7	53,4	45,3
C-10	43,1	43,0	43,1	43,1	43,1	42,4	44,5
C-11 [#]	21,4	21,2	21,1	21,2	21,3	20,7	20,9
C-12	39,5	39,5	38,8	39,6	39,6	39,0	39,3
C-13	42,4	42,5	42,3	42,4	42,7	42,6	41,4 [§]
C-14 [*]	56,0	56,4	56,5	56,5	56,5	56,4	56,3
C-15	24,1	24,0	24,0	24,1	24,1	23,7	23,8
C-16	28,9	28,8	28,7	28,8	28,8	28,4	28,6
C-17 [*]	56,4	56,0	56,0	56,4	55,9	55,6	55,8
C-18 [°]	12,3	12,2	12,3	12,4	12,4	11,8	12,0
C-19	13,9	13,9	14,1	14,1	14,1	13,1	14,5
C-20	40,5	40,4	40,4	40,5	40,4	40,1	40,3
C-21	21,3	21,3	21,3	21,5	21,5	20,9	21,0
C-22	138,0	138,1	138,9	138,0	138,0	137,7	137,9
C-23	129,5	129,6	129,6	129,5	129,5	129,3	129,4
C-24	51,3	51,2	51,3	51,3	51,3	50,9	51,1
C-25	32,0	31,8	32,0	32,0	32,0	31,5	31,7
C-26	19,1	19,0	19,1	19,1	19,1	18,6	18,8
C-27 [#]	21,3	21,1	21,2	21,2	21,3	20,6	20,9
C-28	25,5	25,4	25,4	25,5	25,5	25,0	25,2
C-29 [°]	12,3	12,2	12,3	12,4	12,3	14,7	12,0

^a $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{Tos}$ 21,5 ppm; CH_3Tos 144,2 ppm, 134,7 ppm, 129,6 ppm y 127,5 ppm.

^b $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$ 21,2 ppm; CH_3CO 170,5 ppm.

^c $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$ 55,5 ppm.

^{*}, [°], [#], [§] Corresponden a señales de carbonos intercambiables.

Tabla 5.20. Datos relevantes de RMN-¹³C (cloroformo-d₃) de derivados de estigmast-22-eno (VII) y de estigmasta-4,22-dieno-6β-ol (VIII) con distinta funcionalización en el anillo A.

N	179	177	178	209	185 ^a	187
C-1	39,4	41,8	35,5	34,6	36,7	37,8
C-2	124,4	26,7 [§]	---	125,4	25,4 [§]	28,3
C-3	124,9	124,7	---	122,4	70,7	67,2
C-4	21,7	123,7	132,4	34,6	124,3	128,0
C-5	53,8	57,1 [£]	145,8	78,1	149,2	146,8
C-6	211,7	214,3	203,1	211,2	74,0	73,3
C-7	47,0	46,8	46,0	42,4 [§]	39,1	38,8
C-8	37,7	37,0	33,7	37,5	31,9 [£]	31,6 [£]
C-9	53,4	51,2	51,2	45,3	54,1	54,0
C-10	40,3	39,6	39,4	42,9 [§]	36,6	36,6
C-11 [#]	21,1	21,2	21,2	21,3	21,1	20,8
C-12	39,4	39,4	39,4	39,5	39,7	39,5
C-13	42,7	42,6	42,4	42,7 [§]	42,4	42,1
C-14 [*]	56,9	56,5 [£]	55,8	56,9	56,0	55,7
C-15	24,0	24,0	25,4	24,1	24,2	23,9
C-16	28,7	28,9	28,7	28,8	28,9	28,6
C-17 [*]	55,9	56,0 [£]	56,9	56,6	56,2	55,9
C-18 [°]	12,2	11,7	12,2	12,4	12,3	11,8
C-19	13,4	19,7	20,4	14,6	19,0	20,6
C-20	39,9	40,4	40,3	40,5	40,5	40,2
C-21	21,2	21,9	20,1	21,1	21,2	20,1
C-22	138,0	138,0	137,8	137,9	138,1	138,0
C-23	129,6	129,6	129,4	129,5	129,2	129,0
C-24	51,2	51,3	51,2	51,3	51,2	51,1
C-25	31,8	32,0	31,8	32,0	30,2 [£]	30,0 [£]
C-26	18,9	19,0	19,0	19,1	20,9	18,6
C-27 [#]	21,1	21,1	21,2	21,3	21,1	20,6
C-28	25,3	25,4 [§]	25,5	25,5	25,0 [§]	25,1
C-29 [°]	12,1	12,2	12,2	12,4	12,3	11,8

^a CH₃CO 21,2 ppm; CH₃CO 170,5 ppm.

^{*}, [°], [#], [§], [£] Corresponden a señales de carbonos intercambiables.

Tabla 5.21. Datos relevantes de RMN-¹³C (cloroformo-d₃) de derivados de estigmasta-5,22-dien-7-ona (XIX) con distinta funcionalización en el anillo A.

N	172 ^a	236	237	176
C-1	35,8	33,0	32,9	32,8
C-2	28,3	26,7	26,5	23,3
C-3	79,7	51,3	57,8	136,4
C-4	38,1	36,4	38,6	127,5
C-5	162,1	160,9	163,7	160,6
C-6	126,8	127,7	126,2	130,0
C-7	201,1	202,0	201,6	201,9
C-8	45,3	46,1	46,6	45,9
C-9	50,0	49,8	49,9	49,6
C-10	38,4	39,0	38,2	36,3
C-11 ^o	21,1	21,6	21,6	21,4
C-12	38,3	38,9	38,2	38,7
C-13	42,9	43,5	42,7	43,4
C-14	49,9	50,9	50,0	50,7
C-15	25,3	23,5	23,8	25,3
C-16	28,9	29,2	29,1	29,0
C-17	54,6	54,9	54,8	54,7
C-18*	12,0	12,4	17,4	12,2
C-19	17,1	16,7	12,4	16,5
C-20	40,1	40,3	40,3	40,2
C-21	21,3	21,3	21,2	21,1
C-22	137,8	138,0	138,1	137,9
C-23	129,4	129,5	129,5	129,2
C-24	51,1	51,3	51,3	51,1
C-25	31,8	32,0	32,0	31,8
C-26	19,0	19,2	19,1	19,0
C-27 ^o	21,0	21,2	21,2	21,0
C-28	26,3	25,5	25,5	26,5
C-29*	12,2	12,4	12,4	12,2

^a CH₃Tos 21,5 ppm; CH₂Tos 144,2 ppm, 134,7 ppm, 129,6 ppm y 127,5 ppm.

* Corresponden a señales de carbonos intercambiables.

5.2.2.2. Análisis comparativo de las frecuencias de resonancia de los carbonos de los anillos A y B, para la serie 5 α -hidrogenada y la serie 5 α -hidroxilada.

Las diferentes funcionalizaciones que poseen los anillos A y B surgidas durante el desarrollo de las estrategias sintéticas utilizadas para la obtención de los precursores de los diferentes brassinosteroides, se ejemplifican en la **Figura 5.3**, para el caso de un sustituyente tosiloxi en C-3.

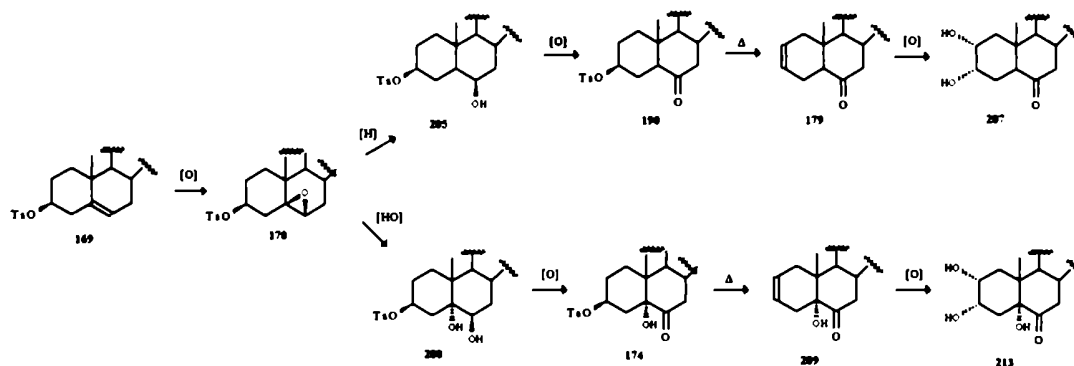


Figura 5.3. Diferente funcionalización de los anillo A y B, en compuestos intermediarios de la síntesis de brassinosteroides.

El análisis comparativo de los desplazamientos producidos por la diferentes funcionalizaciones, entre la serie 5 α -hidrogenada y la serie 5 α -hidroxilada se resume en la **Tabla 5.22**.

Tabla 5.22. Desplazamientos, calculados como $\Delta(\text{serie } 5\alpha\text{H} - \text{serie } 5\alpha\text{OH})$ ppm, de los anillos A y B al pasar de una estructura 5 α -hidrogenada a una 5 α -hidroxilada.

	$\Delta(205-208)$	$\Delta(190-174)$	$\Delta(179-209)$	$\Delta(207-213)$
C-1	5,9	6,6	9,2	9,2
C-2	0,6	0,6	-1,1	-1,7
C-3	2,1	1,6	2,5	0,5
C-4	-5,9	-6,7	-12,9	-8,1
C-5	-28,0	-23,6	-24,3	-28,9
C-6	-4,5	-2,8	0,5	1,7
C-7	5,1	4,8	4,5	3,4
C-8	-0,1	0,4	0,2	0,6
C-9	8,3	10,7	8,2	8,1
C-10	-2,0	-2,4	-2,6	-2,1

Los carbonos más afectados son el C-1, C-4, C-5, C-7 y C-9. La presencia del hidroxilo en C-5 causa un desplazamiento a campos altos de los C-1, C-7 y C-9 en un rango de 5,9 a 10,7 ppm, y un efecto desprotector muy importante sobre los C-4 y C-5. Tales resultados coinciden con las observaciones realizadas en la **sección 5.2.1** del presente **Capítulo**, **Tabla 5.5** (pag. 147) donde se realizó un análisis similar sobre los brassinosteroides sintetizados.

5.3. ESPECTROMETRÍA DE MASA CON IONIZACION POR BAV (BOMBARDEO CON ATOMOS VELOCES).

5.3.1. ESPECTROS DE MASA DE IONES POSITIVOS OBTENIDOS POR IONIZACION BAV DE LOS BRASSINOSTEROIDES SINTETIZADOS.

Los espectros de masa de iones positivos de los compuestos presentados en la **Figura 5.1** (pag. 142) se realizaron utilizando nitrobenzilalcohol (NBA) como matriz. En los primeros intentos se trabajó sobre matrices de glicerol y tioglicerol¹¹ sin obtener buenos resultados. Las observaciones realizadas se complementaron con técnicas de detección de iones precursores (B^2/E) y técnicas de detección de iones derivados (B/E).

La mínima concentración detectable de brassinosteroide se determinó realizando gráficos de abundancia relativa del ión $[M+H]^+$, obtenida por comparación con los picos cercanos de la matriz *versus* distintas concentraciones del mismo. Así se halló que si bien el límite de detección ronda los 100 ng/ μ l, es necesaria una concentración del orden de los 500 μ g/ μ l para obtener un buen espectro. La técnica de espectrometría de masa con ionización por BAV (BAV/EM), al requerir una concentración 500 ng/ μ l, no puede competir en sensibilidad con la de CGL-espectrometría de masa en la detección de brassinosteroides ya que su límite de detección es del orden de los picogramos¹³. Sin embargo, la técnica BAV-masa posee la ventaja de permitir la rápida determinación del peso molecular de un brassinosteroide desconocido sin necesidad de derivatización (ver **Capítulo 1**, **sección 1.4.2.1**, pag. 17).

Esta última afirmación se ve avalada por lo informado por Schmidt y Vorbrodt¹⁰, quienes hallaron que los brassinosteroides sin derivatizar no presentaban el ión molecular al realizar espectros con técnicas de impacto electrónico (IE) o ionización química (IQ).

Por el contrario, utilizando la técnica de BAV-masa el ión $[M+H]^+$ se detectó en todos los casos, y en algunos de ellos, como puede verse en la **Tabla 5.23**, resultó ser el pico base. El análisis de los espectros permite efectuar algunas observaciones interesantes: por un lado, la intensidad del pico base parece relacionarse con la polaridad

Tabla 5.23. Abundancias relativas de los iones de masas altas obtenidos en los espectros de masa de iones positivos con ionización por BAV.

Ión	COMPUESTO					
	12	55	159	160	161	162
[M+Na] ⁺	501 (21)	501 (8)	----	----	527 (3)	527 (2)
[M+H] ⁺	479 (100)	479 (70)	525 (100)	525 (5)	505 (6)	505 (22)
[(M+H)-H ₂ O] ⁺	461 (69)	461 (100)	507 (18)	507 (2)	487 (3)	487(21)
[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	443 (24)	443 (17)	489 (9)	489 (17)	469 (2)	469 (5)
[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	425 (3)	425 (3)	----	----	----	----

Ión	COMPUESTO					
	163	164	165	166	167	168
[M+Na] ⁺	517 (28)	517 (4)	----	----	543 (19)	543 (4)
[M+H] ⁺	495 (51)	495 (14)	541 (9)	541 (4)	521 (18)	521 (3)
[(M+H)-H ₂ O] ⁺	477 (63)	477 (30)	523 (32)	523 (2)	503 (43)	503 (25)
[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	459 (47)	459 (21)	505 (19)	505 (9)	485 (20)	485 (10)
[(M+H)-3H ₂ O] ⁺	441 (37)	441 (2)	487 (10)	----	467 (4)	----

Tabla 5.24. Abundancias relativas de los iones relacionados con pérdidas de fragmentos de cadena lateral, obtenidos en los espectros de masa de iones positivos con ionización por BAV..

Ión	COMPUESTO						
	5α-hidrogenados						
	12	55	159	160	161	162	
$[(M+H)-(b-H)]^+$	365 (2)	365 (2)	----	----	----	391 (9)	
$[(M+H)-b]^+$	364 (8)	364 (8)	----	----	----	390 (2)	
$[(M+H)-(b+H)]^+$	363 (15)	363 (16)	409 (18)	409 (10)	----	389 (3)	
$[(M+H)-(b+H)-H_2O]^+$	345 (13)	345 (18)	391 (13)	391 (6)	----	----	
$[(M+H)-(c+H)]^+$	333 (3)	333 (3)	379 (15)	379 (5)	359 (1)	359 (5)	
$[(M+H)-(c+H)-H_2O]^+$	----	----	----	----	----	----	
$[(M+H)-(d+H)-H_2]^+$	303 (24)	303 (25)	349 (27)	349 (17)	----	----	

Ión	COMPUESTO						
	5α-hidroxilados						
	163	164	165	166	167	168	
$[(M+H)-(b-H)]^+$	381 (16)	----	----	----	407 (36)	407 (17)	
$[(M+H)-b]^+$	380 (33)	380 (17)	----	----	406 (15)	406 (9)	
$[(M+H)-(b+H)]^+$	379 (17)	379 (6)	425 (3)	----	405 (7)	405 (3)	
$[(M+H)-(b+H)-H_2O]^+$	361 (66)	361 (11)	407 (13)	407 (10)	387 (6)	387 (2)	
$[(M+H)-(c+H)]^+$	349 (14)	----	----	----	----	----	
$[(M+H)-(c+H)-H_2O]^+$	331 (30)	331 (6)	377 (17)	377 (5)	----	----	
$[(M+H)-(d+H)-H_2]^+$	319 (41)	----	365 (29)	365 (7)	----	----	
$[(M+H)-(d+H)-H_2O]^+$	----	----	349 (22)	349 (4)	----	----	

Tabla 5.25. Abundancias relativas de iones correspondientes a fragmentos de cadena lateral, obtenidos en los espectros de masa de iones positivos con ionización por BAV.

Ión	COMPUESTO					
	S α -hidrogenados					
	12	55	159	160	161	162
[d+2H] ⁺	175 (9)	175 (7)	175 (12)	175 (7)	175 (8)	175 (9)
d ⁺	173 (11)	173 (7)	173 (11)	173 (10)	173 (6)	173 (6)
[c+2H] ⁺	147 (12)	147 (13)	147 (18)	147 (25)	147 (10)	147 (15)
c ⁺	145 (10)	145 (14)	145 (18)	145 (17)	145 (5)	145 (13)
[b+2H] ⁺	117 (5)	117 (6)	117 (15)	117 (13)	----	117 (5)
[a+2H] ⁺	85 (50)	85 (38)	85 (78)	85 (100)	85 (24)	85 (31)
a ⁺	83 (30)	83 (32)	83 (43)	83 (61)	83 (9)	83 (43)

Ión	COMPUESTO					
	S α -hidroxilados					
	163	164	165	166	167	168
[d+2H] ⁺	175 (17)	----	175 (11)	175 (3)	175 (18)	175 (18)
d ⁺	173 (34)	173 (8)	173 (13)	173 (10)	173 (21)	173 (23)
[c+2H] ⁺	147 (22)	----	147 (23)	147 (34)	147 (27)	147 (34)
c ⁺	145 (37)	145 (2)	145 (25)	145 (22)	145 (23)	145 (32)
[b+2H] ⁺	117 (12)	----	----	117 (3)	117 (5)	117 (10)
[a+2H] ⁺	85 (95)	85 (58)	85 (100)	85 (100)	85 (100)	85 (100)
a ⁺	83 (100)	83 (100)	83 (49)	83 (58)	83 (77)	83 (81)

Tabla 5.26. Abundancias relativas de los iones del tipo [(M+H)-HX]⁺ (X = Br, AcO) y fragmentos relacionados, obtenidos en los espectros de masa de iones positivos con ionización por BAV..

Ión	COMPUESTO									
	5α-hidrogenados					5α-hidroxiolados				
	159	160	161	162	165	166	167	168		
[(M+H)-HX] ⁺	445 (13)	445 (10)	445 (100)	445 (100)	---	---	---	---	---	---
[(M+H)-HX-H ₂ O] ⁺	---	---	427 (12)	427 (15)	---	---	---	---	---	---
[(M+H)-HX-2H ₂ O] ⁺	---	---	409 (5)	409 (5)	---	---	425 (40)	425 (19)	---	---
[(M+H)-HX-(b+H)] ⁺	---	---	329 (29)	329 (39)	---	---	345 (46)	345 (26)	---	---
[(M+H)-HX-(b+H)-H ₂ O] ⁺	---	---	311 (3)	311 (3)	---	---	327 (49)	327 (17)	---	---
[(M+H)-HX-(c+H)] ⁺	---	---	299 (17)	299 (19)	---	---	315 (14)	315 (12)	---	---
[(M+H)-HX-(d+H)] ⁺	---	---	271 (9)	271 (21)	---	---	---	---	---	---

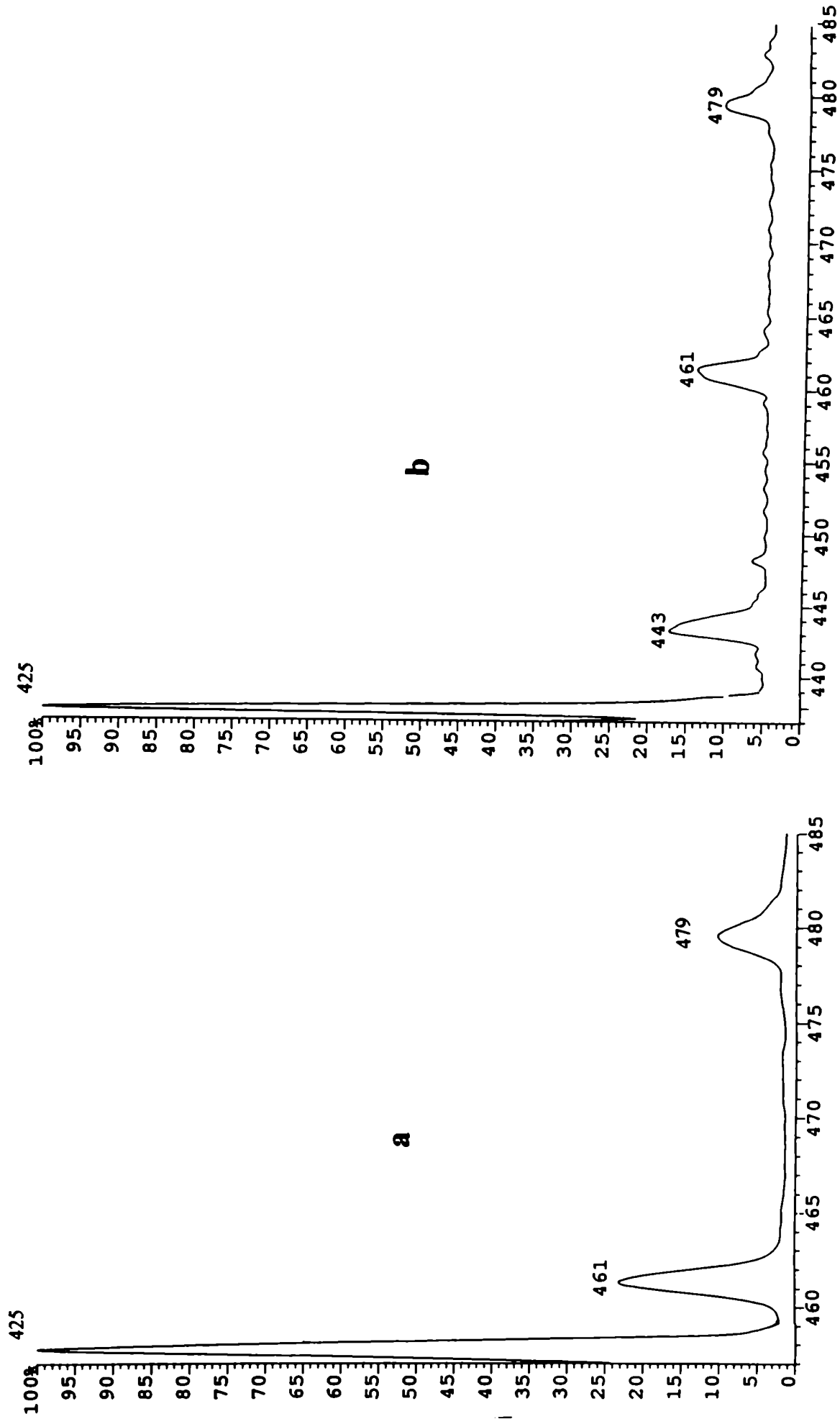


Figura 5.4. Espectros con barrido B²/E de distintos iones del compuesto 12, **a**) [(M+H)-2H₂O]⁺ (m/z 443) y **b**) [(M+H)-3H₂O]⁺ (m/z 425). Se aprecia que el ión m/z 443 proviene de los iones m/z 461 y 479, mientras que el ión m/z 425 proviene de los iones m/z 443, 461 y 479.

de la molécula; así, a mayor polaridad el pico resulta ser más intenso (ver **Tabla 5.23**). Además, los picos de pérdida de agua $[(M+H)-nH_2O]^+$ ($n= 1, 2, 3$), tienen una tendencia similar, ya que los pentahidratados presentan picos más intensos que los tetrahidratados, y estos que los tri y dihidroxilados (ver **Tabla 5.23**). Por otro lado, utilizando un barrido del tipo B^2/E se demostró que los iones $[(M+H)-nH_2O]^+$ ($n= 2, 3$) poseen diferentes precursores; por ejemplo se determinó, para el compuesto **12**, que el ión $[(M+H)-2H_2O]^+$ se origina directamente del ión $[M+H]^+$ y además del ión $[(M+H)-H_2O]^+$ (ver **Figura 5.4**).

Otra observación importante que puede hacerse en base a los picos de pérdida de agua consiste en tener en cuenta el valor de m/z de cada uno de ellos, ya que, una diferencia de 16 u.m. sirve para distinguir la serie 5α -hidrogenada de la 5α -hidroxilada (ver **Tabla 5.23**). Esto constituye una gran ventaja, al comparar la técnica de BAV con la de IE o IQ, ya que estas últimas no detectan las señales correspondientes a pérdidas de moléculas de agua de los brassinosteroides derivatizados¹⁵.

Las fragmentaciones características de la cadena lateral se ilustran en la **Figura 5.5** y se detallan en las **Tablas 5.24** y **5.25**. Las rupturas entre los enlaces $C_{17}-C_{20}$, $C_{20}-C_{22}$, $C_{22}-C_{23}$ y $C_{23}-C_{24}$, coinciden con las obtenidas para brassinólido¹⁰ y castasterona¹¹ por técnicas de IE (ver **Capítulo 1, sección 1.4.2.1, pag 17**); sin embargo, no se detecta la ruptura del anillo D entre los enlaces $C_{14}-C_{15}$ y $C_{13}-C_{17}$.

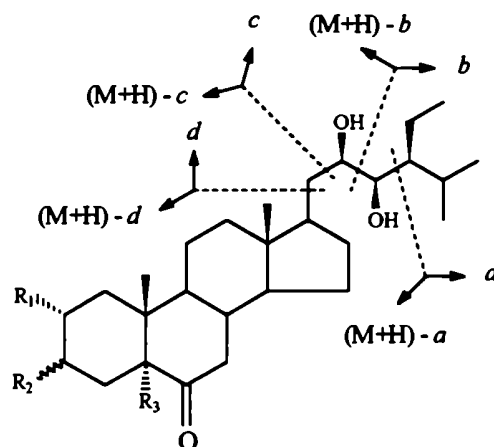


Figura 5.5. Rupturas de cadena lateral obtenidas por espectroscopía de BAV-masa de iones positivos. R_1 , R_2 y R_3 corresponden a los distintos sustituyentes ilustrados en la **Figura 5.1**; a , b , c y d corresponden a las distintas rupturas características de la cadena lateral y detalladas en las **Tablas 5.24** y **5.25**.

Los iones provenientes de la ruptura de la cadena lateral son independientes de las distintas modificaciones del anillo A. Por otro lado, coincidentemente con lo informado por

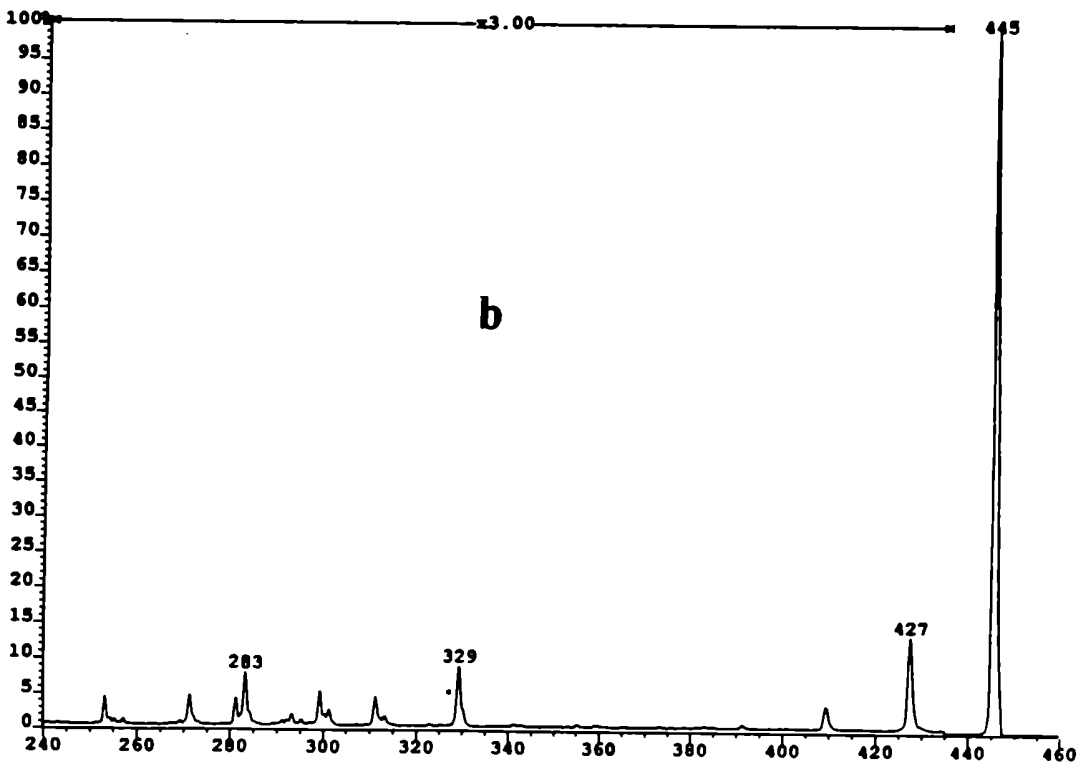
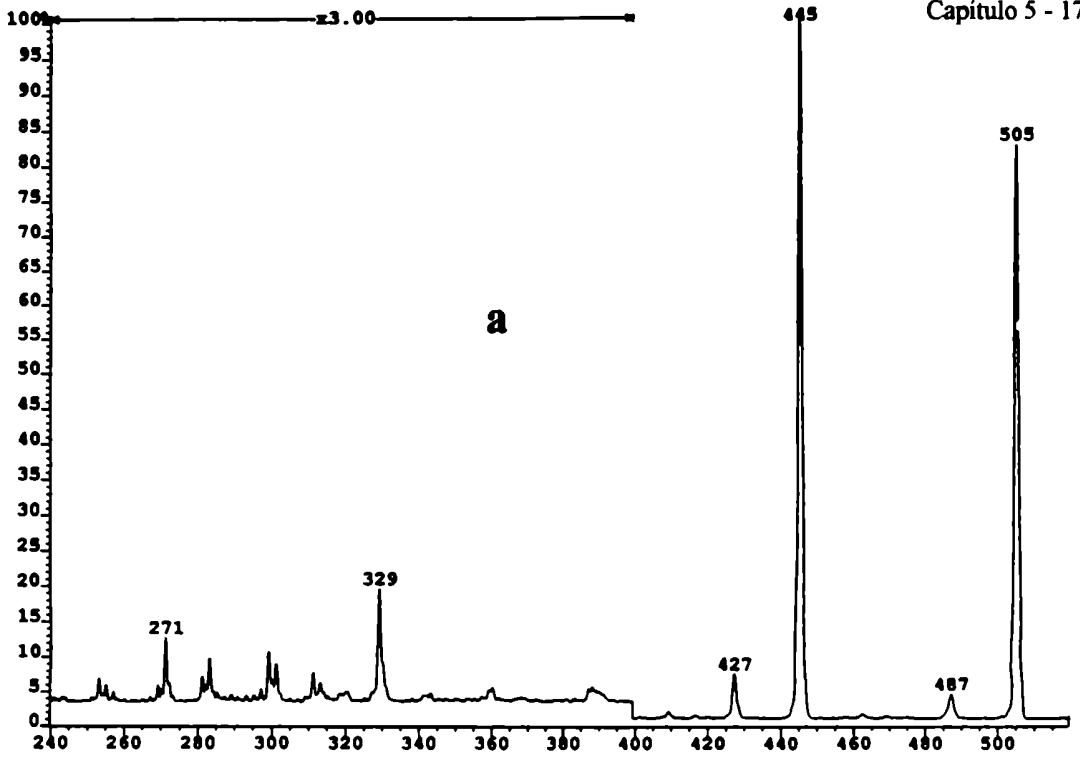


Figura 5.6. Espectros con barrido B/E de distintos iones del compuesto 162, a) $[M+H]^+$ (m/z 505) y b) $[(M+H)-AcOH]^+$ (m/z 445). Se aprecian ambos precursores y los demás iones del espectro originados a partir de ellos.

G. Adam utilizando técnicas de IE de iones positivos¹⁰, tampoco se observan diferencias entre los isómeros 22(R),23(R) y 22(S),23(S).

La mayor importancia de los fragmentos derivados de las rupturas de la cadena lateral radica en su masa nominal mucho más que en su abundancia relativa, ya que sirven para detectar diferentes sustituyentes sobre la cadena natural, tales como 24-metiliden, 24-etiliden, y derivados 25-hidroxilados²⁷. En este sentido, la ruptura C₂₃-C₂₄, fragmento α^+ de m/z 83, sirve para confirmar la sustitución 24-etil de nuestros análogos (ver **Tabla 5.25**).

Los fragmentos más importantes, en el caso de los análogos acilados, resultaron ser los relacionados con la pérdida de ácido acético (ver **Tabla 5.26**) a partir de la molécula protonada. Como pudo comprobarse realizando experimentos con barrido B/E (ver **Figura 5.6**) todos los iones del espectro provienen de [(M+H)-AcOH]⁺ y [M+H]⁺.

En las **Figuras 5.7 a 5.9** se pueden apreciar los espectros de BAV-masa de iones positivos de los brassinosteroides sintetizados con estereoquímica 22(R),23(R) (ver **Figura 5.1**), realizados a una concentración aproximada de 500 ng/ μ l.

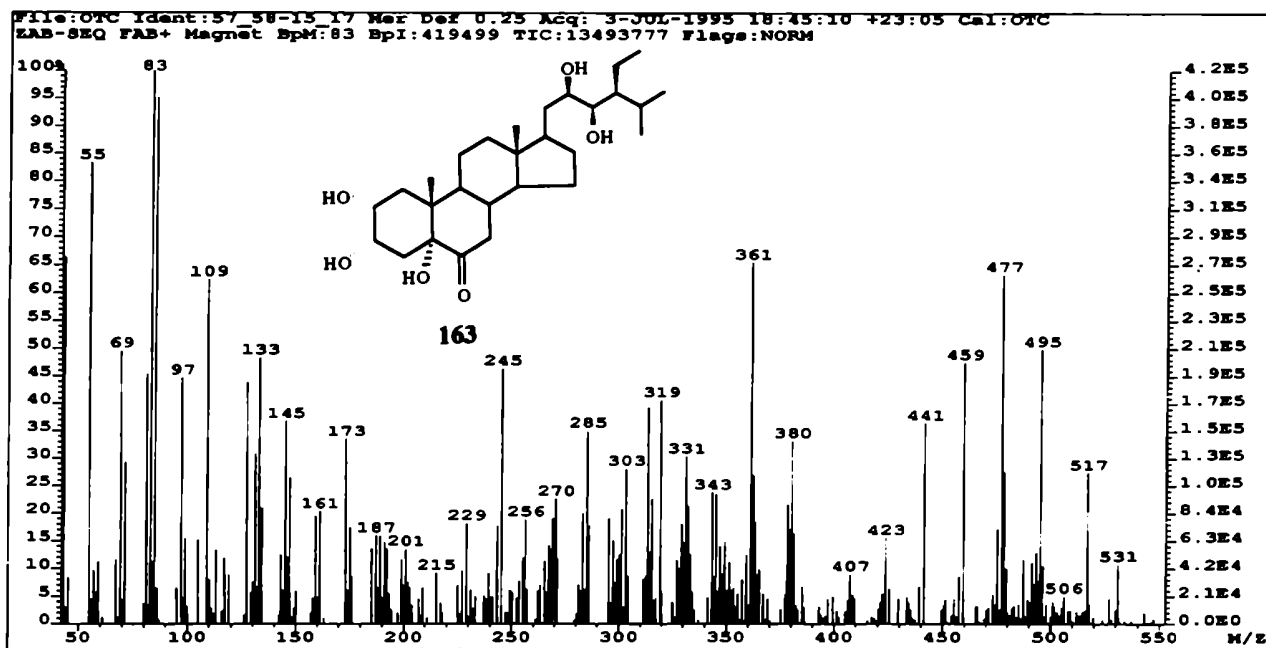
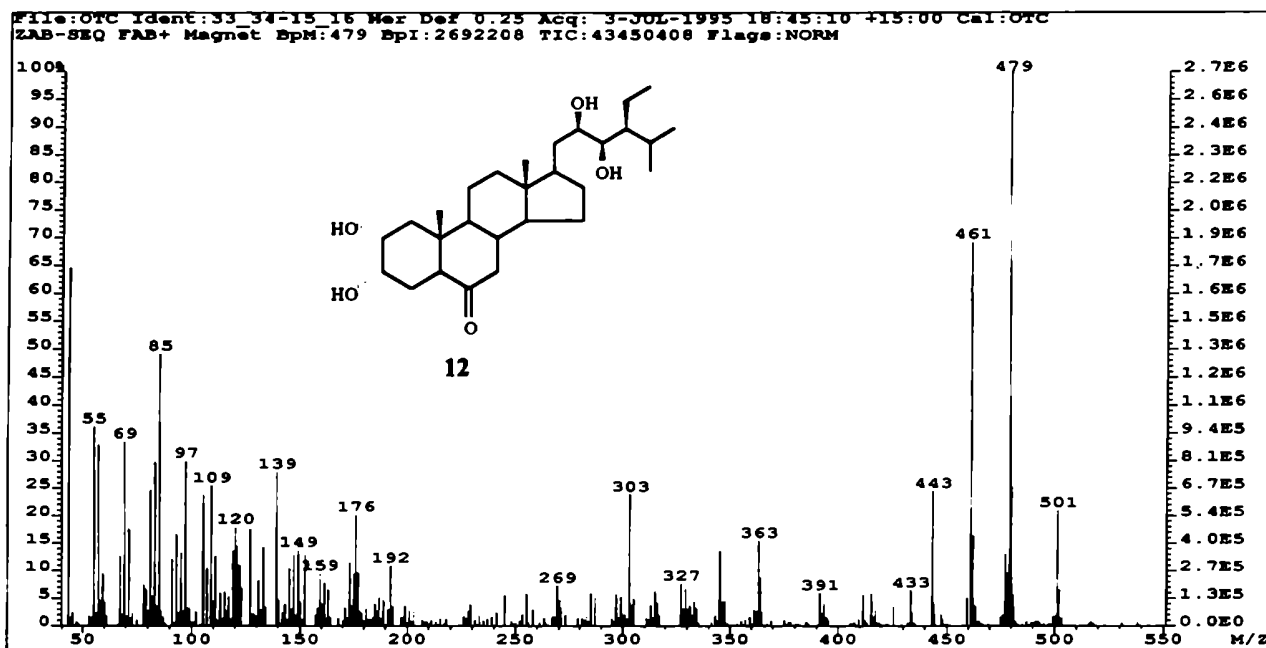


Figura 5.7. Espectros de masa de iones positivos de los compuestos 12 (M^+ 478) y 163 (M^+ 494), obtenidos con ionización por BAV.

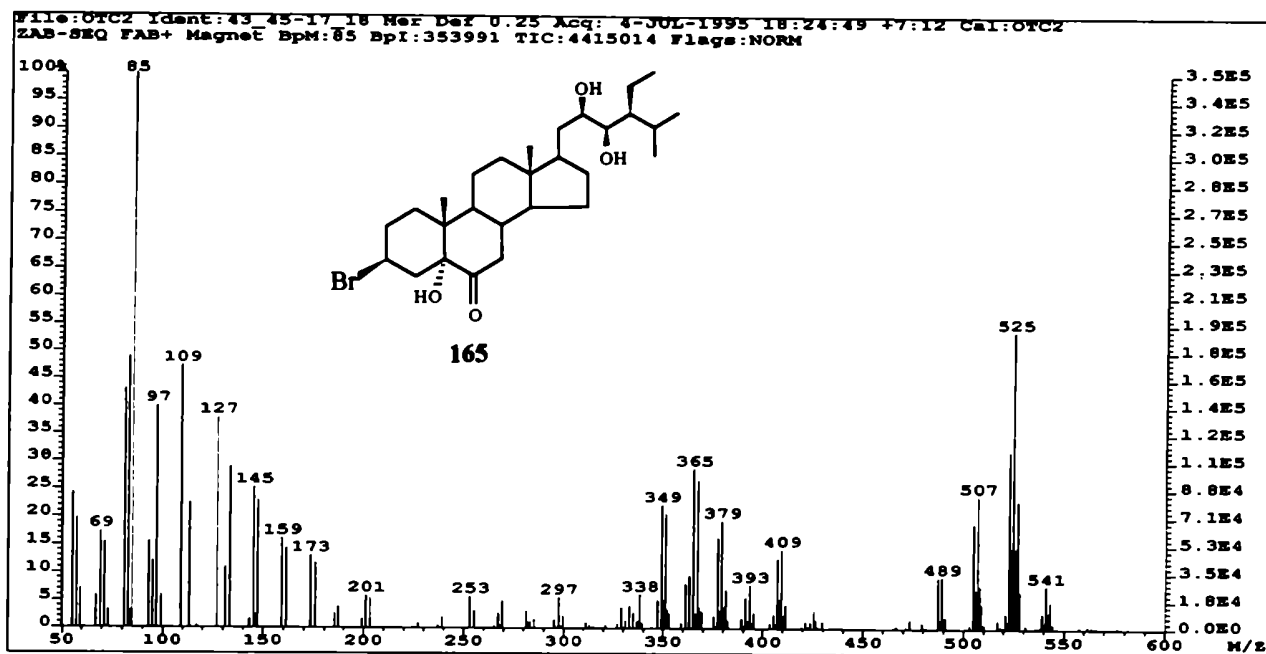
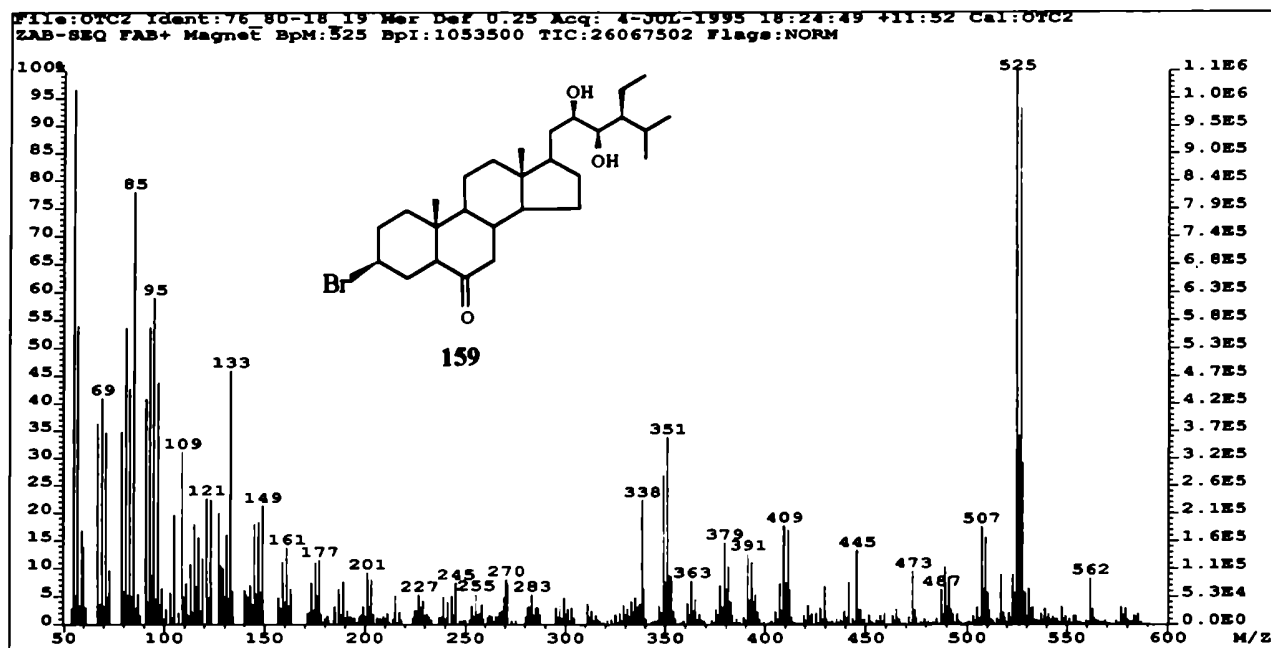


Figura 5.8. Espectros de masa de iones positivos de los compuestos 159 (M^+ 524) y 165 (M^+ 540), obtenidos con ionización por BAV.

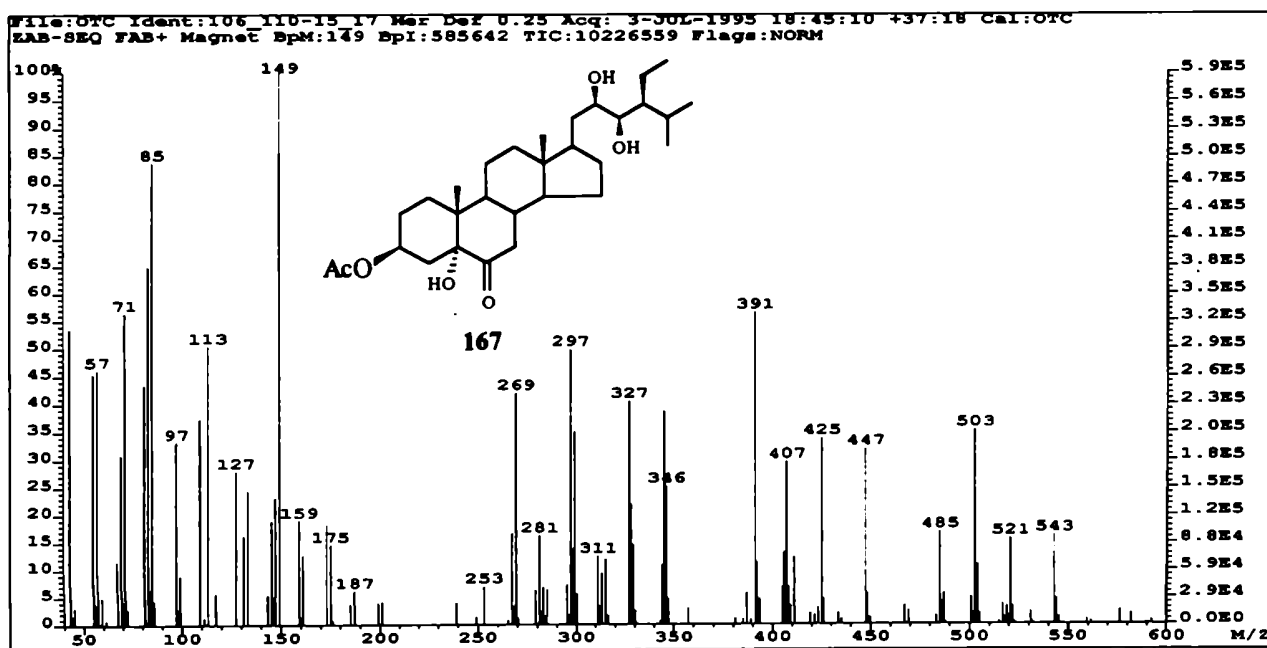
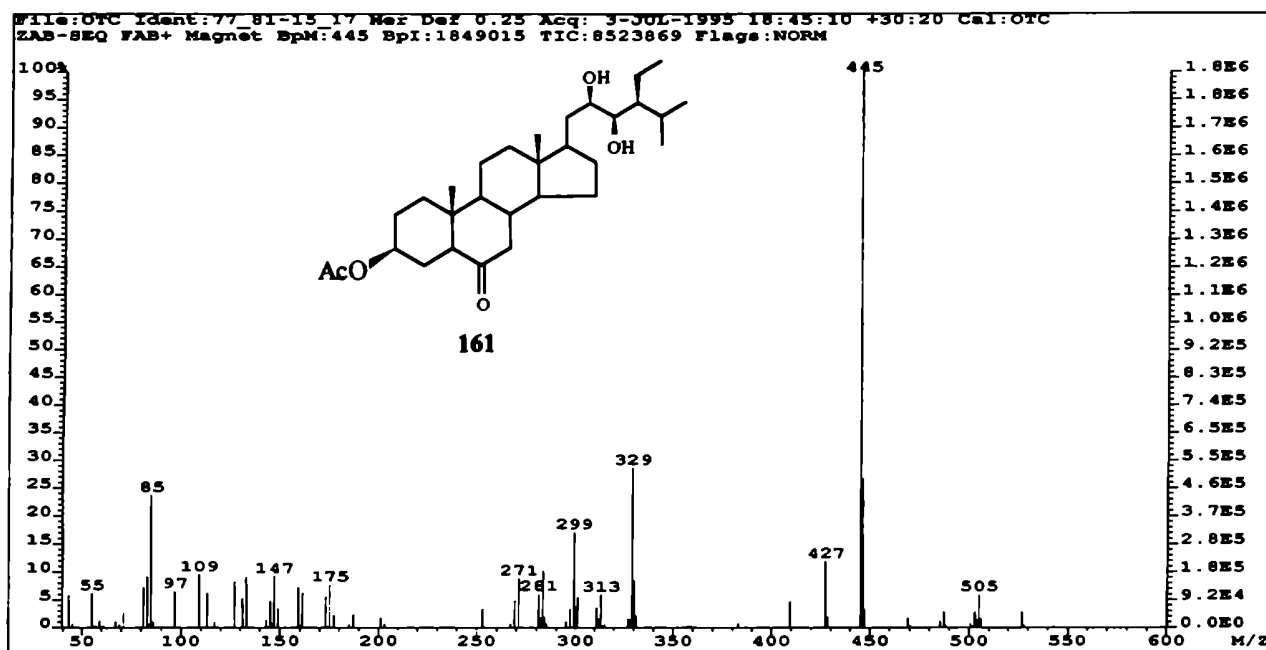


Figura 5.9. Espectros de masa de iones positivos de los compuestos 161 ($M^+ 504$) y 167 ($M^+ 520$), obtenidos con ionización por BAV.

5.3.2. ESPECTROS DE MASA DE IONES NEGATIVOS OBTENIDOS POR IONIZACIÓN BAV DE LOS BRASSINOSTEROIDES SINTETIZADOS.

Los espectros de masa de iones negativos con ionización BAV de los compuestos presentados en la **Figura 5.1** (pag. 142) se realizaron utilizando una mezcla de nitrobenzilalcohol/trietilamina (3:1) como matriz. La intensidad y abundancia escasas de los picos presentados en este tipo de espectros, se debe a que, para compuestos del tipo hidrocarbonado polihidroxiado, es relativamente difícil formar un ión negativo.

Los espectros de masa de iones negativos con ionización BAV de brassinosteroides, realizados anteriormente utilizando técnicas de IE¹⁰, se caracterizan por presentar el ión [M-4]⁻. Este se debe a la eliminación de cuatro hidrógenos provenientes de los hidroxilos de la cadena lateral y de los C-22 y C-23 del anión radical M⁻. Sin embargo, posiblemente debido al diferente mecanismo de ionización involucrado en las técnicas de BAV, estos iones no se observan en este caso.

En las **Tablas 5.27 a 5.29** se detallan los principales fragmentos obtenidos en espectroscopía de masa de iones negativos con ionización BAV de los brassinosteroides sintetizados (ver **Figura 5.1**, pag. 142).

Tabla 5.27. Abundancias relativas de los iones importantes obtenidos en los espectros de masa de iones negativos obtenidos por ionización BAV para los brassinosteroides 2 α ,3 α -dihidroxiados.

N	Ión	COMPUESTO			
		5 α -hidrogenados		5 α -hidroxiados	
		12	55	163	164
1	[M-1] ⁻	477 (100)	477 (100)	493 (100)	493 (100)
2	[(M-1)-H ₂] ⁻	475 (5)	475 (6)	491 (4)	491 (6)
3	[(M-1)-H ₂ O] ⁻	459 (2)	459 (3)	475 (4)	475 (5)
4	[(M-1)-2H ₂ O] ⁻	441 (<1)	441 (<1)	457 (4)	457 (2)
5	[(M-1)-aH] ⁻	391 (1)	391 (1)	407 (3)	407 (2)
6	[(M-1)-aH-H] ⁻	390 (<1)	390 (<1)	406 (3)	406 (<1)
7	[(M-1)-bH] ⁻	361 (2)	361 (2)	377 (3)	377 (3)
8	[(M-1)-(c-H)] ⁻	333 (<1)	333 (1)	---	---
9	[(M-1)-dH] ⁻	---	---	319 (7)	319 (1)

Los espectros se caracterizan por presentar un intenso ión *quasi*-molecular $[M-H]^-$ que se convierte en pico base en el caso de los compuestos **12**, **55**, **161**, **162**, **163** y **164** (ver entrada 1, **Tabla 5.27** y **5.29**, y entrada 2, **Tabla 5.28**). Las fragmentaciones más importantes provienen de la cadena lateral o de la pérdida del sustituyente de C-3. Con respecto al tipo de fragmentaciones de la cadena lateral, se observa que son idénticas a las ilustradas en la **Figura 5.5** (pag. 174) correspondientes a iones positivos. En general, estas rupturas son muy escasas y de baja intensidad. Puede concluirse, además, que la estereoquímica de la cadena lateral no influye en las rupturas del ión $[M-H]^-$, hecho coincidente con lo observado para la técnica de iones positivos (comparar entradas 6-9, **Tabla 5.27** con entradas 5 y 6, **Tabla 5.28** y entradas 6-10, **Tabla 5.29**).

Tabla 5.28. Abundancias relativas de los iones importante obtenidos en los espectros de masa de iones negativos obtenidas por ionización BAV, para los brassinosteroides 3β -bromados.

N	Ión	COMPUESTO			
		5α -hidrogenados		5α -hidroxilados	
		159	160	165	166
1	$[(M+2)-1]^-$	525 (75)	525 (3)	541 (14)	541 (23)
2	$[M-1]^-$	523 (72)	523 (4)	539 (13)	539 (22)
3	$[(M-1)-H_2]^-$	521 (1)	521 (<1)	537 (<1)	537 (1)
4	$[(M-1)-HBr]^-$	443 (3)	---	459 (12)	459 (8)
5	$[(M-1)+2-cH-H_2O]^-$	---	---	377 (3)	377 (12)
6	$[(M-1)-cH-H_2O]^-$	---	---	375 (3)	375 (11)
7	$^{81}Br^-$	81 (88)	81 (95)	81 (97)	81 (96)
8	$^{79}Br^-$	79 (100)	79 (100)	79 (100)	79 (100)

Con respecto al sustituyente de C-3 se observa que, los compuestos del tipo 5α -hidroxi- 3β -X (X=AcO o Br) (**165-168**), pierden una molécula de XH más fácilmente que sus análogos 5α -hidrogenados (**159-162**). Este hecho es opuesto al registrado para técnicas de iones positivos --allí los 5α -hidrogenados perdían una molécula de XH mucho más fácilmente-- y podría deberse a la pérdida preferencial del ión X^- , a partir del ión $[M-H]^-$, antes que el ión XH (ver **Tablas 5.28** y **5.29**).

Tabla 5.29. Abundancias relativas de los iones importantes obtenidos en los espectros de masa de iones negativos obtenidas por ionización BAV, para los brassinosteroides 3 β -acetilados.

N	Ión	COMPUESTO			
		5 α -hidrogenados		5 α -hidroxilados	
		161	162	167	168
1	[M-1] ⁻	503 (100)	503 (100)	519 (57)	519 (44)
2	[(M-1)-H ₂] ⁻	501 (13)	501 (7)	517 (2)	517 (5)
3	[(M-1)-H ₂ O] ⁻	485 (3)	485 (2)	501 (2)	501 (2)
4	[(M-1)-CH ₃ CO] ⁻	461 (5)	461 (2)	477 (2)	477 (2)
5	[(M-1)-AcOH] ⁻	443 (<1)	443 (<1)	459 (3)	459 (3)
6	[(M-1)-aH] ⁻	417 (3)	417 (2)	----	433 (<1)
7	[(M-1)-bH] ⁻	387 (1)	387 (1)	403 (<1)	403 (<1)
8	[(M-1)-(c-H)] ⁻	359 (<1)	359 (1)	----	----
9	[(M-1)-cH] ⁻	----	----	373 (<1)	373 (<1)
10	[(M-1)-dH] ⁻	329 (1)	329 (<1)	----	----
11	[CH ₃ CO ₂] ⁻	59 (96)	59 (58)	59 (100)	59 (100)

En las Figuras 5.10-5.12 se muestran los espectros de masa de iones negativos obtenidos por ionización BAV de los brassinosteroides sintetizados con estereoquímica 22(R),23(R) (ver Figura 5.1), realizados a una concentración aproximada de 500 ng/ μ l.

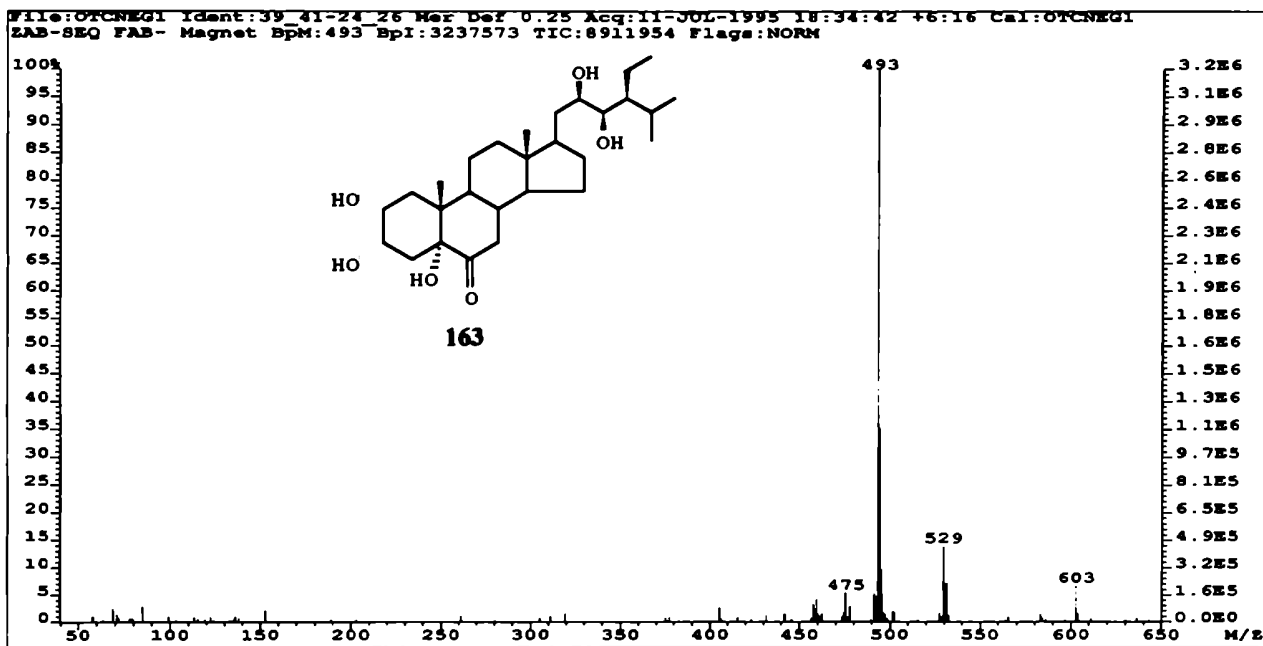
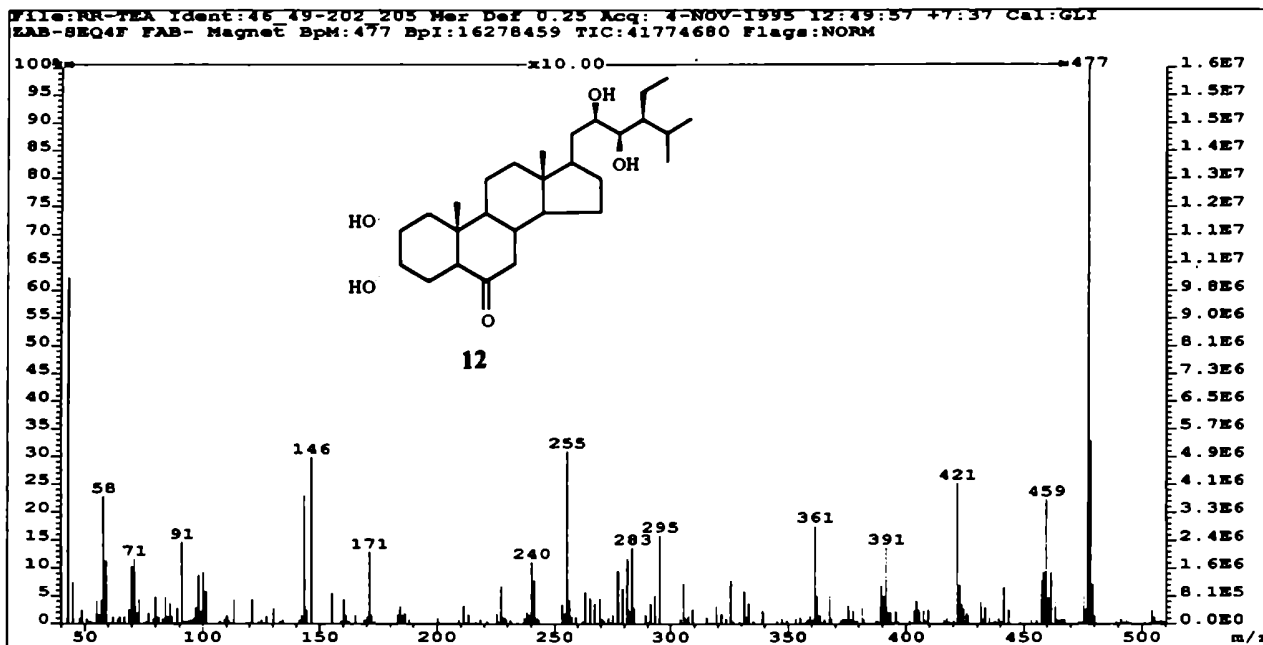


Figura 5.10. Espectros de masa de iones negativos de los compuestos 12 (M^+ 478) y 163 (M^+ 494), obtenidos con ionización por BAV.

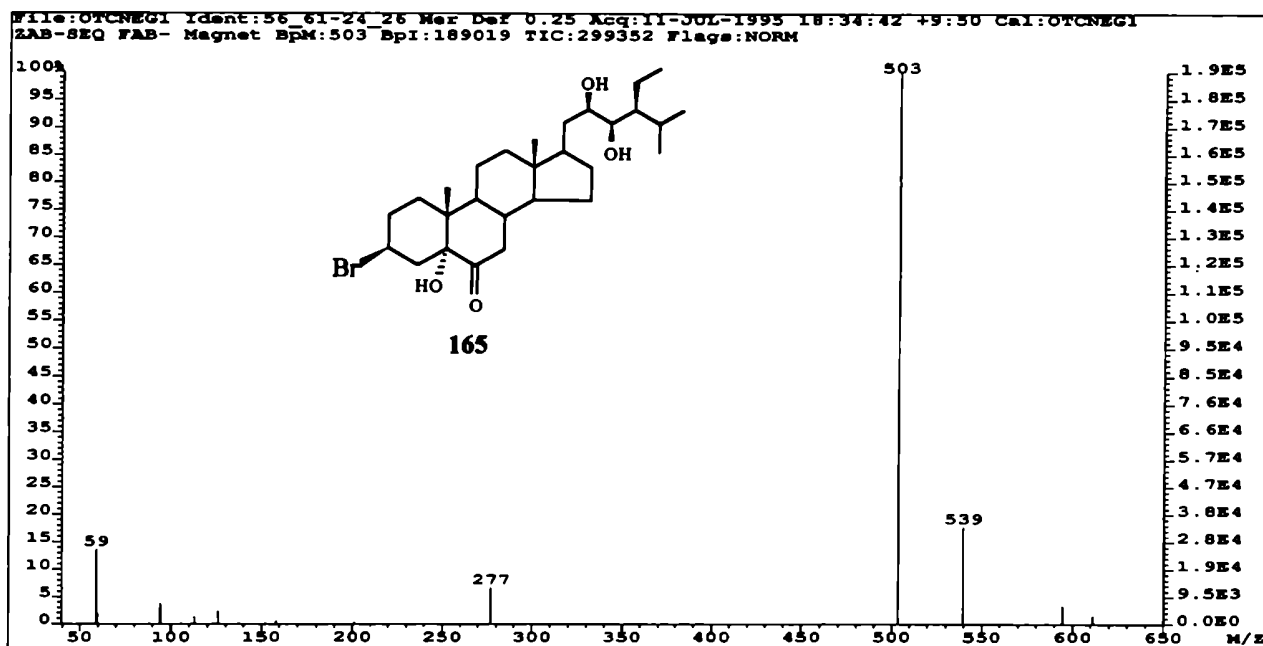
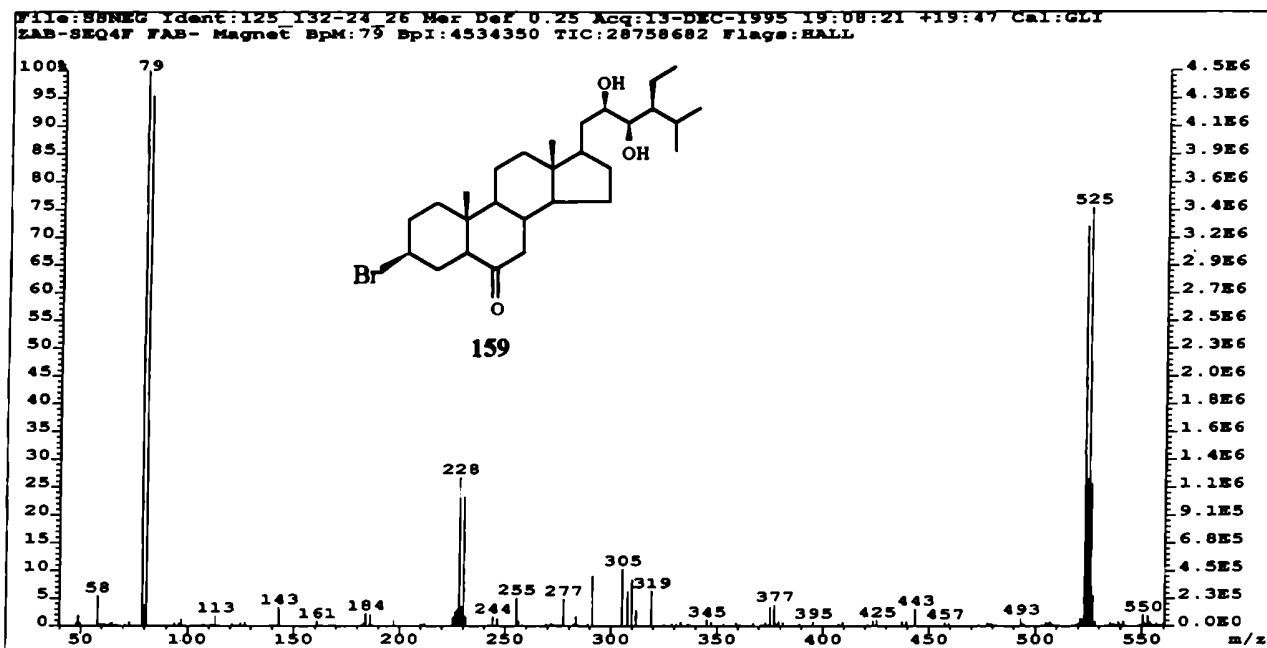


Figura 5.11. Espectros de masa de iones negativos de los compuestos 159 (M^+ 524) y 165 (M^+ 540), obtenidos con ionización por BAV.

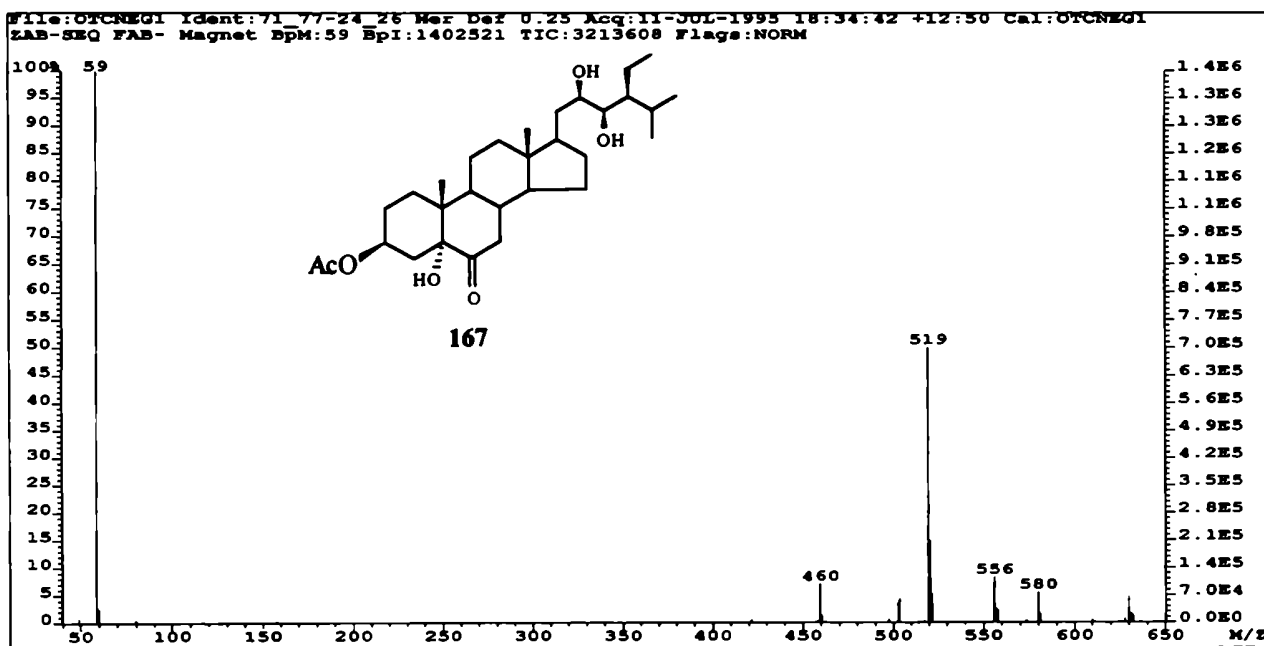
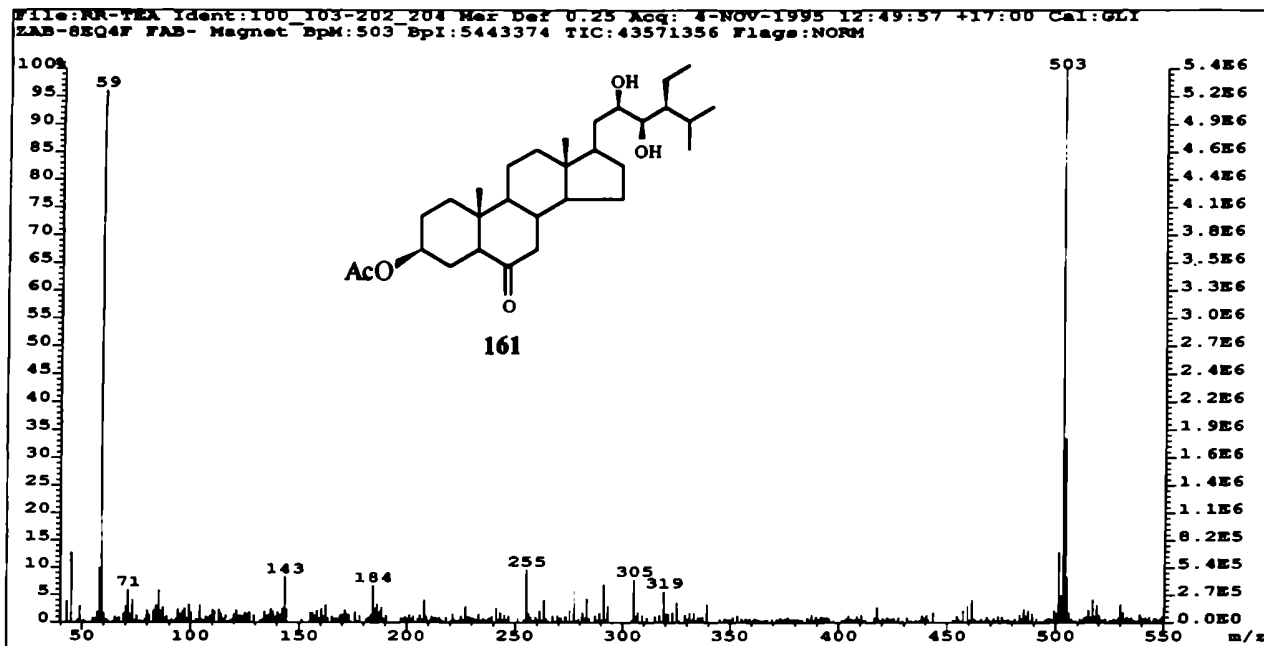


Figura 5.12. Espectros de masa de iones negativos de los compuestos 161 (M^+ 504) y 167 (M^+ 520), obtenidos con ionización por BAV.

5.4. BIBLIOGRAFIA.

- 1- M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. B. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen, G. L. Steffens, J. L. Flippen-Anderson, J. C. Cook; *Nature*, **281**, 216 (1979).
- 2- T. Ando, M. Abutarami, N. Koseki, S. Asakawa, T. Mouri, H. Abe; *Magn. Res. Chem.*, **31**, 94 (1993).
- 3- A. Porzel, V. Marquardt, G. Adam, G. Massiot, D. Zeigan, *Magn. Res. Chem.*, **30**, 651 (1992).
- 4- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa; *Phytochemistry*, **23**, 525 (1984).
- 5- M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio, J. -S. Lee, T. Yasumoto; *J. of Natural Products*, **51**, 1098 (1988).
- 6- C. Brosa, R. Peracaula, R. Puig, M. Ventura; *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7057 (1992).
- 7- T. C. McMorris, P. A. Patil, R. G. Chavez, M. E. Baker, S. D. Clouse; *Phytochemistry*, **36**, 585 (1994).
- 8- T. C. McMorris, R. G. Chavez, P. A. Patil; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 295 (1996).
- 9- J. Baba, T. Yokota, N. Takahashi; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 659 (1983).
- 10- J. Schmidt, H. -M. Vorbrodt, G. Adam; *Biom. Env. Mass Spectrom.*, **13**, 663 (1986).
- 11- T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi; *Tetrahedron Lett.*, **23**, 1275 (1982).
- 12- T. Yokota, J. Baba, N. Takahashi; *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4965 (1982).
- 13- S. Takatsuto, B. Ying, M. Morosaki, N. Ikekawa; *Journal of Chromatography*, **239**, 233 (1982).
- 14- N. Ikekawa, S. Takatsuto, T. Kitsuwu, H. Saito, T. Morishita, H. Abe; *Journal of Chromatography*, **290**, 289 (1984).
- 15- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3435 (1986).
- 16- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4045 (1986).
- 17- V. Khripach; en **Brassinosteroids**. Academia de Ciencias de Bielorrusia, Minsk. 1993.
- 18- J. W. Blunt, J. B. Stothers, *Org. Magn. Res.*, **9**, 439 (1977).
- 19- E. Breitmaier, W. Voelter, en **Carbon-13 NMR Spectroscopy**, VCH, Weinheim-New York. 1987.
- 20- H. Eggert, C. L. VanAntverp, N. S. Bhacca, C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **41**, 71 (1976).
- 21- H. L. Holland, P. R. P. Diakow, G. R. Taylor, *Can. J. Chem.*, **56**, 3121 (1978).
- 22- J. M. Coxon, J. R. Gibson, *Aust. J. Chem.*, **34**, 1451 (1981).
- 23- H. Eggert, C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **46**, 5399 (1981).

- 24- N. S. Bhacca, D. H. Williams. Difference in Chemical Shift Between Axial and Equatorial Protons, in **Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry**. Holden-Day Inc. San Francisco, California. 1966.
- 25- K. Tori, T. Komeno, T. Nakagawa; *J. Org. Chem.*, **29**, 1136 (1964).
- 26- N. S. Bhacca, D. H. Williams. C-18 and C-19 Methyl Resonances, in **Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry**. Holden-Day Inc. San Francisco, California. 1966.
- 27- T. Hai, B. Schneider, A. Porzel, G. Adam; *Phytochemistry*, **41**, 197 (1996).



CAPITULO 6

ENSAYOS BIOLÓGICOS

6.1. INTRODUCCION.

Es fundamental contar con uno o varios ensayos biológicos sencillos, sensibles y específicos para determinar la actividad biológica relativa de los distintos brassinosteroides. En el **Capítulo 1, sección 1.4.1** (pag. 14), se ha presentado un panorama de los ensayos más utilizados.

Para evaluar la bioactividad de los brassinosteroides sintetizados, presentados en este trabajo de tesis, se eligió el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz (Oryza sativa)*, aplicado sobre plántulas intactas de arroz¹ (ver sección 1.4.1, **Capítulo 1**, pag. 14). Dicho ensayo permite evaluar cuantitativamente la actividad biológica de los distintos brassinosteroides midiendo el ángulo formado entre la lámina de la segunda hoja y la vaina de la plántula (ver **Figura 6.1**).

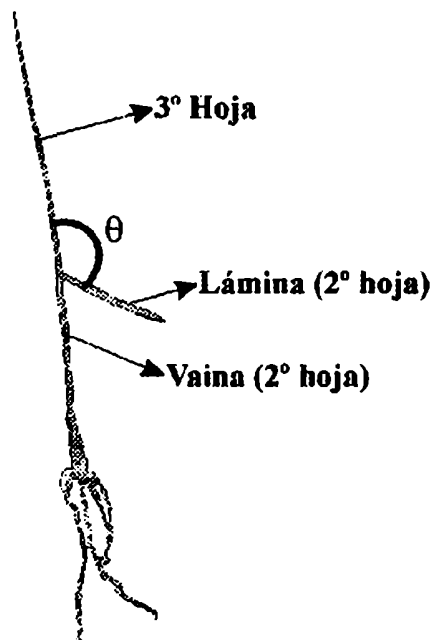


Figura 6.1. Partes de una plántula entera de arroz. El ángulo medido para cuantificar la bioactividad de los brassinosteroides (θ) es el formado entre la vaina y la lámina de la segunda hoja.

6.2. BIOACTIVIDAD DEL BRASSINOSTEROIDE PATRÓN: (22R,23R,24S)-24-ETIL-2 α ,3 α ,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -COLESTAN-6-ONA (12).

6.2.1. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA)².

La acción de los diferentes brassinosteroides sobre las distintas variedades de arroz puede ser diferente; además, el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz* (ILA), puede verse afectado por varios factores ambientales controlables tales como temperatura, humedad, intensidad de luz, fotoperíodo, etc. Por ello, para determinar y optimizar las condiciones del bioensayo fue necesario, primero, ajustar las condiciones experimentales con una variedad de arroz de respuesta conocida, y luego, seleccionar una variedad local de arroz apropiada. Para llevar a cabo estos bioensayos se utilizó la (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -coleston-6-ona (12) brassinosteroide patrón de bioactividad conocida y, contamos además, con semillas de la variedad *Bahía*, oriundas de Cataluña (España), facilitadas por el grupo de la Dra Carme Brosa. Las primeras experiencias para estandarizar las condiciones experimentales del bioensayo, requirieron ajustes en las condiciones de esterilización, germinación, siembra, crecimiento y aplicación del brassinosteroide.

El *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz* (ILA) dura 8 días desde su iniciación hasta la lectura de los resultados. En nuestra cámara de crecimiento pudimos hacer crecer hasta un máximo de 300 plántulas. En cada experiencia la población de plántulas se dividió en tres subgrupos:

a) Plántulas destinadas a ser testigos sin aplicación de sustancia alguna (blancos): sirven para verificar que las condiciones de cultivo no afectan el crecimiento normal de la plántula ni la medición.

b) Plántulas destinadas a ser testigos con aplicación de etanol (controles): sirven para ver en qué medida el solvente induce la inclinación de la lámina de la segunda hoja.

c) Plántulas destinadas a ser inyectadas con la solución de brassinosteroide patrón en una dosis de 0,2 μ g/plántula.

La técnica empleada para realizar el bioensayo consta de los siguientes pasos:

- a) Esterilización de semillas.
- b) Germinación.
- c) Siembra.
- d) Crecimiento.
- e) Aplicación del brassinosteroide.
- f) Lectura de resultados.

Las semillas se **esterilizaron** con etanol, y unas 300 se **germinaron** colocándolas en remojo en agua durante 48 hs a 30°C, con un fotoperíodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad en una cámara de crecimiento cerrada, con paredes reflectantes del lado interior, con posibilidades de mantener temperatura constante y de establecer fotoperíodos fijos a una intensidad de luz también constante. Luego de la aparición de una pequeña raíz (1 mm), aquellas que no germinaron se descartaron. Las semillas germinadas se **sembraron** en cristalizadores, sobre agar estéril sin nutrientes, colocadas de tal forma que las radículas quedaron en forma vertical. Dichos cristalizadores se colocaron en recipientes de vidrio transparente con agua hasta una altura de de 3-4 cm, cerradas herméticamente en su parte superior; de esta forma, se mantiene un nivel de humedad constante durante el crecimiento. Este factor de humedad, si es variable, altera la homogeneidad del crecimiento. Una forma de comprobar humedad constante es la observación de que, durante todo el experimento, una gota de agua pende del extremo distal de la plántula (gutación). Los recipientes se colocaron en la cámara de crecimiento por el espacio de 4 días, y las plántulas se **crecieron** bajo condiciones de temperatura y fotoperíodo similares a las utilizadas durante el período de germinación (ver **Foto 6.1**).



Foto 6.1. Plántulas de arroz en crecimiento en cámara de cultivo.

Pasado el período de crecimiento la parte aérea de las plántulas miden aproximadamente 4-5 cm de longitud (ver **Foto 6.2**). Antes de la inyección del brassinosteroide se descartan por raleo aproximadamente un 10% debido a su escaso o excesivo crecimiento, quedando sólo aquellas con una altura de $4,5 \pm 0,5$ cm.



Foto 6.2. Aspecto de las plántulas luego de cuatro días de crecimiento controlado, antes del raleo y de la aplicación del brassinosteroide.

En cada experiencia se **aplicaron** $0,5 \mu\text{l}$ de una solución de concentración $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de (22R,23R,24S)-24-etil- $2\alpha,3\alpha,22,23$ -tetrahidroxi- 5α -coleston-6-ona (**12**) por planta del grupo c y $0,5 \mu\text{l}$ de etanol por planta control del grupo b. Para ello, se utilizó



Foto 6.3. Aguja capilar utilizada para la inyección del brassinosteroide. La aplicación se realiza 2-3 mm por debajo de la zona ligular.

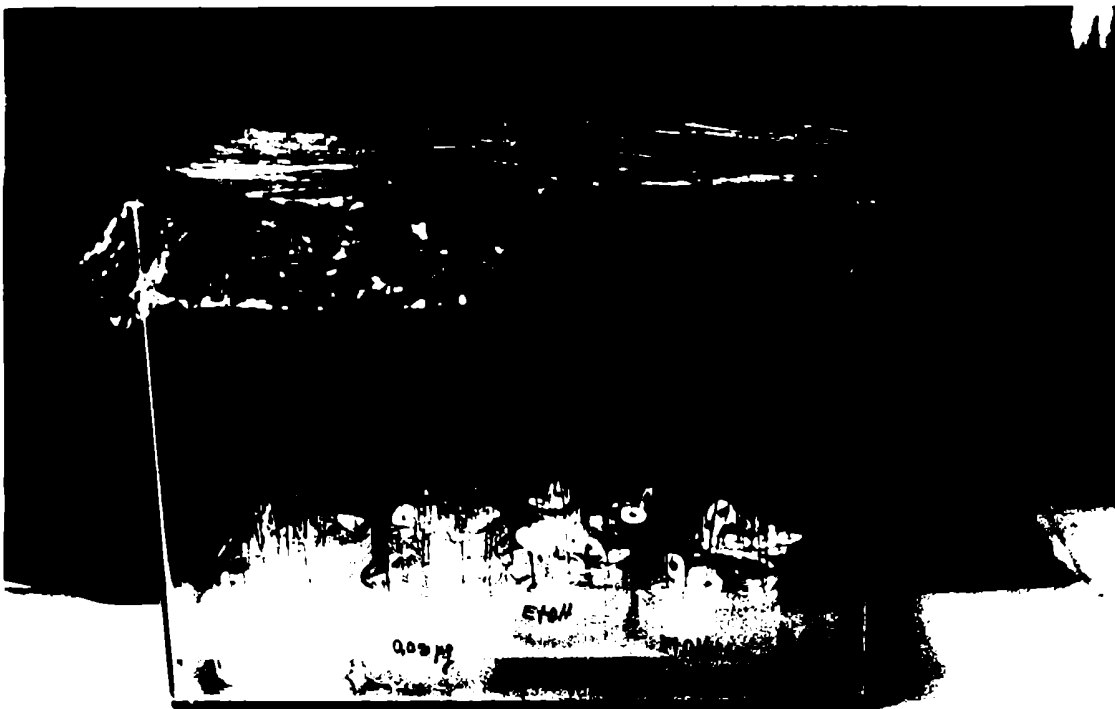


Foto 6.4. Aspecto de las plántulas 48 hs después de la aplicación del brassinosteroide.

una microjeringa con una aguja capilar (ver Foto 6.3) que se insertó cuidadosamente 2-3 mm por debajo de la zona ligular de la segunda hoja de la plántula (ver Figura 6.1), teniendo cuidado de no atravesar el tallo de lado a lado y de que la solución de brassinosteroide sea absorbida.

Una vez inyectadas las plántulas, se las colocó nuevamente dentro de los recipientes en la cámara de crecimiento, en condiciones de temperatura y fotoperíodo idénticas a las utilizadas durante el período de crecimiento, por un lapso de 48 hs.

La lectura del ángulo inducido θ (ver Figura 6.1, pag. 188) se realizó sacando cada plántula del agar, apoyándola sobre un papel milimetrado, y marcando sus dimensiones (longitudes de la vaina, lámina, segunda y tercera hoja y vástago, y ángulo generado). Se obtuvo de esta forma, un registro gráfico de los resultados de cada experiencia. En la Foto 6.4. se muestra el aspecto que presentan las plántulas control y tratadas con brassinosteroide en el momento de la recolección de resultados.

Una vez registrados gráficamente los valores medidos para cada plántula se realizó el tratamiento estadístico. El valor del ángulo de inclinación de la lámina se obtuvo restando el promedio de los ángulos inducidos en las plántulas control (etanol), al promedio de los ángulos inducidos en las plántulas tratadas con brassinólido.

6.2.2. BUSQUEDA DE VARIEDADES LOCALES SENSIBLES AL ENSAYO DE INCLINACION DE LA LAMINA DE ARROZ.

Una vez halladas las condiciones óptimas para llevar a cabo el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz* con la variedad *Bahía*, oriunda de la zona de Cataluña, España, el siguiente paso fue encontrar una variedad autóctona de arroz adecuada para realizar el bioensayo. La variedad apropiada se eligió utilizando el siguiente criterio: a) facilidad para conseguirla, b) crecimiento parejo, c) facilidad para inyectar (dureza y diámetro del vástago, y adecuada exposición de la ligula), d) sensibilidad (diferencia entre el promedio del ángulo inducido por el brassinosteroide y el promedio del ángulo inducido por el etanol en los controles) y e) reproducibilidad de los resultados.

Las variedades se consiguieron por solicitud a agencias regionales del INTA y arroceras privadas. Los lotes conseguidos pertenecían a la última cosecha de las variedades:

*FORTUNA	*CHUI
*TAIM	*IRGA 410-B
*PASO 144	*CT 6919
*IRGA 409	*YERUA

En las experiencias para seleccionar la variedad más sensible al bioensayo no se tuvo en cuenta la altura de cada plántula al momento de la inyección y se trabajó sobre toda la población apta; es decir, no se realizó raleo por altura.

Cada una de estas variedades se ensayó por inyección de 0,5 µl de solución etanólica de (22R,23R,24S)-24-etil-2α,3α,22,23-tetrahidroxi-5α-colestan-6-ona (**12**) de concentración 0,4 µg/µl. Como se mencionó anteriormente, en cada experiencia se dejaron plántulas de blanco sin inyectar y controles inyectados con 0,5 µl etanol. Además, se agregaron testigos de variedad *Bahia* (y sus respectivos controles y blancos) para comparar el crecimiento y respuesta de la variedad de arroz local respecto de la variedad española, que tomamos como modelo (ver **Foto 6.5**).



Foto 6.5. En este caso pueden verse los resultados de un experimento ILA comparativo llevado a cabo con la variedad local *Fortuna* (extremo derecho) y la variedad española *Bahia* (en el centro), tomada como modelo (controles del lado izquierdo).

Los experimentos permitieron descartar la variedad *Paso 144* porque presentaba un crecimiento muy desparejo, con plántulas de distintas alturas, muchas de ellas con la zona ligular oculta bajo la vaina imposibilitando la inyección. La variedad *Irga 410-B* se descartó por su crecimiento excesivamente lento, evidenciado por la presencia de plántulas muy poco

desarrolladas al momento de inyectar. En la variedad *CT 6919* la lígula no se distinguía claramente para inyectar, su tallo era muy duro (lo que dificultaba la microinyección) y presentaba escasa sensibilidad. La variedad *Yerua* presentaba un crecimiento totalmente despajeado. Las variedades *Fortuna*, *Taim*, *Irga 409* y *Chui* parecieron ser, en principio, las más apropiadas por su crecimiento parejo y oportuno, su sensibilidad y reproducibilidad en los experimentos.

Se repitieron los experimentos con las variedades *Fortuna*, *Taim*, *Irga 409* y *Chui* sobre poblaciones más numerosas, con la intención de realizar un análisis estadístico de los resultados. En la **Tabla 6.1** se presentan los ángulos obtenidos y la desviaciones estandar (DESVST) corregidas respecto de los controles³, calculadas según:

$$DESVST = \sqrt{\left(\frac{Desvst^2_{BR}}{N_{BR}} + \frac{Desvst^2_{ctrl}}{N_{ctrl}} \right)} \quad [1]$$

Donde, $Desvst_{BR}$ es la desviación estandar del promedio del ángulo inducido por el brassinosteroide, $Desvst_{ctrl}$ es la desviación estandar del promedio del ángulo registrado en los controles inyectados con etanol, N_{BR} es el número de plantas inyectadas con brassinosteroide y N_{ctrl} es el número de plantas inyectadas con etanol.

Tabla 6.1. Resultados estadísticos obtenidos con las distintas variedades de arroz locales sometidas al *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz*.

Variedad	<i>Irga 409</i>	<i>Taim</i>	<i>Fortuna</i>	<i>Chui</i>	<i>Bahía</i>
ángulo*	69,13	70,14	122,13	84,64	95,05
DESVST#	5,03	3,07	2,87	3,93	1,76

*ángulo: diferencia entre el promedio del ángulo inducido por el brassinosteroide y el promedio del ángulo registrado en los controles inyectados con etanol (en grados).

#DESVST: desviación estandar de la diferencia entre el promedio del ángulo inducido por el brassinosteroide y el promedio del ángulo registrado en los controles inyectados con etanol (en grados).

De los datos de la **Tabla 6.1** se deduce que la variedad *Fortuna* es la más sensible y con menor dispersión; lamentablemente, esta variedad crecía en forma muy despajeada en cuanto a alturas; y el raleo previo a la inyección (mediante el cual se seleccionaban plántulas de altura semejante) resultaba ser demasiado grande para nuestra capacidad de cultivo. La variedad *Taim* se descartó por su dificultad para ser inyectada debido a que su tallo muy fino

se quebraba fácilmente y ocasionaba desbordes de solución. La variedad *Irga 409* presentaba también un crecimiento muy desparejo. La variedad *Chui* resultó ser la más apropiada por su crecimiento parejo, buena sensibilidad y facilidad para inyectar.

6.2.3. CURVAS DE BIOACTIVIDAD EN FUNCION DE LA DOSIS APLICADA.

Una vez determinadas las condiciones más apropiadas para realizar el bioensayo y elegida la variedad de arroz *Chui* como la más conveniente, se procedió a cuantificar la actividad biológica del patrón de bioactividad conocida, el (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (12) en función de distintas concentraciones del mismo. Se realizó el experimento inyectando dosis crecientes de 12 que oscilaban entre 0,002 $\mu\text{g/planta}$ y 15,2 $\mu\text{g/planta}$. El límite máximo estuvo condicionado a la solubilidad del brassinosteroide en etanol y a la capacidad de la plántula para absorber el volumen inyectado (0,5 μl).

Se midieron distintas variables con la intención de detectar cualquier variación del crecimiento causada por la aplicación del brassinosteroide tales como longitudes de vaina, láminas de segunda hoja y tercera hoja, vástago, y ángulo inducido entra la vaina y la lámina. En la **Tabla 6.2** se muestra un ejemplo de los datos recogidos para cada variable, sobre una población de 26 plántulas a las que se les inyectó 0,5 μl de una solución de 12 de concentración 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (dosis = 0,2 $\mu\text{g/plántula}$).

Tabla 6.2. Mediciones resultantes del *ensayo de inclinación de la lámina de arroz* sobre 26 plántulas de la variedad *Chui*. Datos obtenidos inyectando una dosis de 0,2 $\mu\text{g/planta}$ de una solución de brassinosteroide patrón (12)*.

N	Vaina	Lámina	2ª hoja	3ª hoja	Vástago	Angulo
1	2,6	2,5	5,1	6,4	6,4	78
2	2,6	3,0	5,5	6,0	6,0	96
3	2,8	2,1	4,9	6,6	6,6	88
4	2,4	1,3	3,7	6,3	6,2	84
5	2,8	2,5	5,3	7,3	7,3	69
6	2,5	2,2	4,7	6,2	6,2	98
7	3,0	3,2	6,2	7,1	7,1	79
8	2,7	2,5	5,2	6,8	6,8	93
9	2,6	2,6	5,0	5,7	5,7	90

10	2,5	2,5	6,2	5,3	5,3	104
11	3,0	3,2	5,3	7,1	7,1	90
12	2,9	2,4	5,1	5,8	5,8	112
13	2,5	2,6	5,7	4,8	5,1	95
14	2,9	2,8	6,0	7,4	7,4	92
15	3,5	2,5	6,1	5,7	5,7	104
16	3,1	3,0	4,7	7,2	7,2	60
17	2,5	2,2	5,4	7,6	7,6	117
18	2,8	2,6	4,2	5,8	5,8	70
19	2,5	1,7	4,7	6,2	6,2	90
20	2,7	2,0	5,1	5,4	5,4	47
21	2,5	2,6	4,7	5,7	5,7	78
22	2,6	2,1	4,9	7,2	7,2	76
23	2,5	2,4	5,0	4,7	4,9	53
24	2,6	2,4	5,4	4,1	5,0	106
25	2,7	2,7	5,0	7,2	7,2	107
26	2,8	2,2	5,0	7,3	7,3	135

*Los ángulos se midieron en grados y el resto de las variables en centímetros.

En una tabla similar se registraron los valores correspondientes a los controles inyectados con etanol. Con este grupo de datos, luego de ser procesados estadísticamente³, se constuyó la **Tabla 6.3**.

Posteriormente, se construyeron tablas similares a la **Tabla 6.3** para cada una de las dosis aplicadas. Los valores finales de $(X_{BR}-X_{ctrl})$ y **DESVST** registrados para cada una de las dosis aplicadas se presenta en la **Tabla 6.4**.

De la observación detenida de los datos registrados en la **Tabla 6.4** se pueden deducir fundamentalmente dos hechos importantes:

1) Los valores medio (X_{BR}) registrados para las longitudes de vaina, lámina, segunda hoja, tercer hoja y vástago para cada una de las dosis aplicadas son prácticamente iguales entre sí y a los del control (X_{ctrl}), por ello los valores de $(X_{BR}-X_{ctrl})$ son muy cercanos a cero. Esto indicaría que, a las dosis aplicadas bajo las condiciones de este bioensayo el brassinosteroide 12 no induce cambios importantes en dichas variables.

En el **Gráfico 6.1** se ilustra el cambio de cada una de las variables medidas $(X_{BR}-X_{ctrl})$, para cada una de las dosis aplicadas.

Tabla 6.3. Resultados estadísticos calculados a partir de los datos obtenidos en el *ensayo de inclinación de la lámina de arroz*, inyectando 0,2 µg/planta, sobre la variedad *Chui**.

	Vaina	Lámina	2ª hoja	3ª hoja	Vástago	Angulo
\bar{X}_{BR}	2,69	2,47	5,18	6,30	6,32	91,7
S_{BR}	0,18	0,33	0,47	0,81	0,76	19,8
\bar{X}_{ctrl}	2,98	2,48	5,41	5,77	5,96	4,2
S_{ctrl}	0,35	0,51	0,62	0,81	0,68	5,6
$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	-0,29	-0,01	-0,23	0,53	0,36	82,9
DESVST	0,07	0,11	0,12	0,20	0,17	4,3

* Los ángulos se midieron en grados y el resto de las variables en centímetros.

\bar{X}_{BR} Promedio de las mediciones realizadas en las plántulas tratadas con brassinosteroide.

S_{BR} Desviación estandar de las mediciones realizadas en las plántulas tratadas con brassinosteroide.

\bar{X}_{ctrl} Promedio de las mediciones realizadas en las plántulas control tratadas con etanol.

S_{ctrl} Desviación estandar del promedio de las mediciones realizadas en las plántulas control tratadas con etanol.

$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$ Diferencia entre promedio de las mediciones realizadas en las plántulas tratadas con brassinosteroide, y el promedio de las mediciones realizadas en las plántulas control tratadas con etanol.

DESVST Desviación estandar de la diferencia entre promedio de las mediciones realizadas en las plántulas tratadas con brassinosteroide, y el promedio de las mediciones realizadas en las plántulas control tratadas con etanol, calculada como en la fórmula [1].

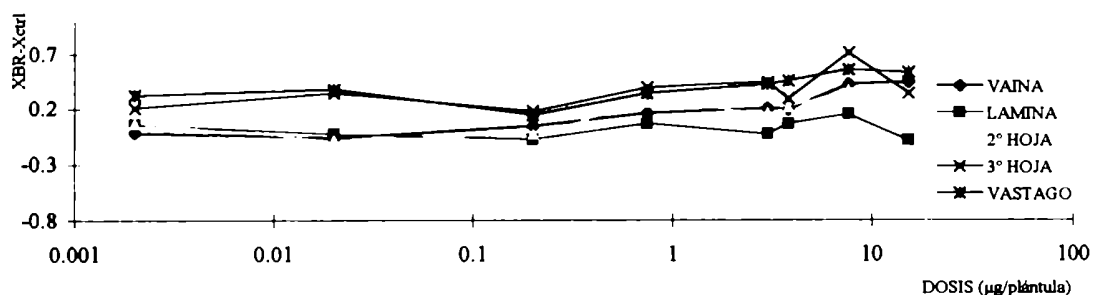


Gráfico 6.1. Representación de los valores registrados de las distintas variables en función de la concentración creciente de brassinosteroide patrón sobre plántulas de la variedad *Chui*.

Tabla 6.4. Valores estadísticos de las mediciones, obtenidos en el *ensayo de inclinación de la lámina de arroz sobre la variedad Chui en función de las dosis de 12**.

Dosis en µg/planta	Vaina		Lámina		2ª hoja	
	$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	DESVST	$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	DESVST	$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	DESVST
0,002	-0,01	0,07	0,06	0,08	0,07	0,11
0,02	-0,06	0,07	-0,02	0,07	-0,08	0,11
0,2	0,29	0,07	-0,01	0,11	-0,23	0,12
0,75	0,17	0,13	0,07	0,12	0,26	0,20
3,0	0,21	0,08	-0,02	0,08	0,17	0,13
3,8	0,20	0,10	0,07	0,09	0,22	0,14
7,6	0,41	0,08	0,16	0,08	0,38	0,13
15,2	0,45	0,09	-0,08	0,10	0,18	0,16

Dosis en µg/planta	Angulo		3ª hoja		Vástago	
	$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	DESVST	$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	DESVST	$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	DESVST
0,002	10,3	2,1	0,21	0,25	0,33	0,21
0,02	67,4	4,0	0,35	0,22	0,38	0,20
0,2	82,9	4,3	0,53	0,20	0,36	0,17
0,75	72,3	4,2	0,40	0,30	0,35	0,26
3,0	74,9	4,6	0,45	0,29	0,43	0,24
3,8	78,2	4,8	0,30	0,31	0,46	0,25
7,6	85,8	3,9	0,72	0,29	0,56	0,25
15,2	85,9	6,0	0,35	0,31	0,54	0,26

*Los ángulos se medieron en grados y el resto de las variables en centímetros.

$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$ Diferencia entre promedio de las mediciones realizadas en las plántulas tratadas con brassinosteroide, y el promedio de las mediciones realizadas en las plántulas control tratadas con etanol.

DESVST Desviación estandar de la diferencia entre promedio de las mediciones realizadas en las plántulas tratadas con brassinosteroide, y el promedio de las mediciones realizadas en las plántulas control tratadas con etanol, calculada como en la fórmula [1].

2) El valor promedio del ángulo inducido (θ) entre el vástago y la lámina de la segunda hoja aumenta sensiblemente respecto del promedio inducido en los controles. Se observa que dicho ángulo tiene un límite inferior de respuesta con $0,002 \mu\text{g/plántula}$ y una capacidad de respuesta máxima que prácticamente no varía por encima de los $0,2 \mu\text{g/plántula}$ (ver Gráfico 6.2).

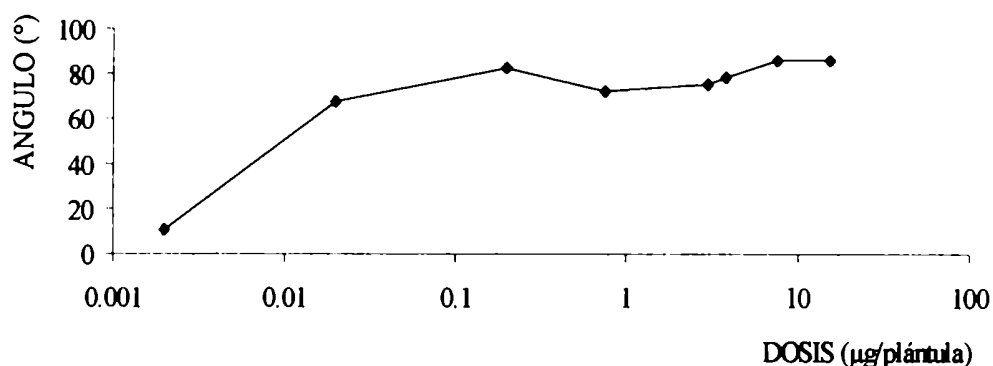


Gráfico 6.2. Valores de ángulo de inclinación de la lámina de arroz en el bioensayo ILA, en función de la dosis aplicada de (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestan-6-ona (12).

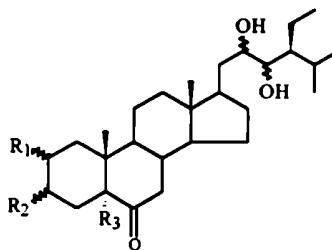
6.3. BIOACTIVIDAD DE BRASSINOSTEROIDES ANALOGOS.

6.3.1. COMPARACION DE LAS BIOACTIVIDADES EN CONDICIONES ESTANDARD.

Una vez puesto a punto el bioensayo ILA sobre la variedad de arroz *Bahía* (española), habiendo encontrado una variedad de arroz local apropiada --*Chui*-- y conociendo la dosis mínima que muestra óptima bioactividad -- $0,2 \mu\text{g/plántula}$ -- para el compuesto considerado como nuestro patrón de bioactividad, el (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestan-6-ona (12), emprendimos el estudio comparativo de las bioactividades de los 11 brassinosteroides análogos sintetizados restantes.

Con el objetivo de simplificar la lectura de tablas y gráficos siguientes, establecimos un código para cada uno de los compuestos sintetizados, que intenta representar sus grupos funcionales y estereoquímica distintivas. Estos códigos se muestran en la Figura 6.2

Una copia de la Figura 6.2 se encuentra adosada a la parte interior de la contratapa del presente ejemplar).



12 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = H	22(R),23(R)	2,3-(R,R)
55 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = H	22(S),23(S)	2,3-(S,S)
159 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = H	22(R),23(R)	3B-(R,R)
160 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = H	22(S),23(S)	3B-(S,S)
161 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = H	22(R),23(R)	3A-(R,R)
162 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = H	22(S),23(S)	3A-(S,S)
163 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = OH	22(R),23(R)	2,3,5-(R,R)
164 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = OH	22(S),23(S)	2,3,5-(S,S)
165 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = OH	22(R),23(R)	3B,5-(R,R)
166 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = OH	22(S),23(S)	3B,5-(S,S)
167 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = OH	22(R),23(R)	3A,5-(R,R)
168 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = OH	22(S),23(S)	3A,5-(S,S)

Figura 6.2. Brassinosteroides sintetizados y la nomenclatura utilizada en este capítulo.

Se inyectaron 0,5 µl de soluciones etanólicas de concentraciones entre 4-10 µg/µl, equivalentes a una dosis de 2-5 µg/plántula. Se eligió este rango por estar dentro del de óptima bioactividad para el compuesto patrón (12). Los resultados obtenidos, luego de un tratamiento estadístico similar al indicado en la **sección 6.2.3** del presente **Capítulo** (pag. 196), se muestran en la **Tabla 6.5** y se ilustran en el **Gráfico 6.3**.

Coincidentemente con informes presentados por otros grupos de trabajo⁴ se observa que los análogos con el anillo A 2α,3α-dihidroxiado (entradas 1-4, **Tabla 6.5**), presentan una actividad de entre 2,5-5 veces mayor que el resto de los análogos sin dicha funcionalización. Otra observación importante es que los análogos 5α-hidroxiados poseen una bioactividad de entre 60-90 % de la de los 5α-hidrogenados, en el caso de los compuestos de alta actividad (comparar entradas 1 y 3 y entradas 2 y 4, **Tabla 6.5**). Dicha diferencia desaparece en el caso de los compuestos menos activos. Por ejemplo, en el caso de los brassinosteroides bromados, el análogo 5α-hidroxiado [3B,5-(S,S)] posee una bioactividad relativa del 19%, mientras que el 5α-hidrogenado [3B-(S,S)] posee una bioactividad relativa del 22% (comparar entradas 6 y 8, **Tabla 6.5**).

Tabla 6.5. Resultados estadísticos obtenidos en la cuantificación de la bioactividad de los brassinosteroides sintetizados.

N	compuesto	dosis en $\mu\text{g/planta}$	ángulo (θ) ^a	DESVST ^b	Bioactividad % ^c
1	2,3-(R,R)	2	88,2	8,0	100
2	2,3-(S,S)	3,5	85,7	4,3	97,0
3	2,3,5-(R,R)	2	79,4	5,5	90,0
4	2,3,5-(S,S)	3	55,2	6,2	62,6
5	3B-(R,R)	3	20,0	2,7	22,7
6	3B-(S,S)	5	19,1	2,6	21,7
7	3B,5-(R,R)	3,5	10,9	2,1	12,4
8	3B,5-(S,S)	3,5	16,8	2,8	19,0
9	3A-(R,R)	2	12,3	1,7	14,0
10	3A-(S,S)	3,5	23,1	3,8	26,2
11	3A,5-(R,R)	2	11,0	2,1	12,5
12	3A,5-(S,S)	4	16,6	3,6	18,1

^a Calculado como $(X_{BR} - X_{ctrl})$ (en grados).

^b Calculado según la fórmula [1] (en grados).

^c Actividad biológica porcentual respecto del 2,3-(R,R).

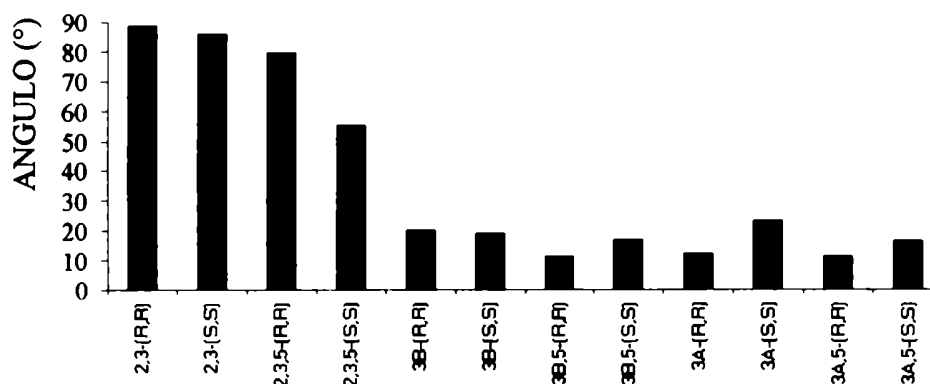


Gráfico 6.3. Representación gráfica del ángulo inducido en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz para cada brassinosteroide sintetizado, utilizando la variedad de arroz local *Chui*.

Otro factor a tener en cuenta es la influencia de la configuración de la cadena lateral. Se observa que los análogos más bioactivos poseen mayor actividad si la configuración de la cadena lateral es 22(R),23(R) que si es 22(S),23(S) (entradas 1-4, **Tabla 6.5**). Sin embargo, en los compuestos con escasa bioactividad dichas diferencias se achican y llegan a invertirse. Un ejemplo es el caso de los 3 β -acetilados-5 α -hidroxisustituidos en el cual el 3A,5-(S,S) tiene una actividad una vez y media mayor que la del 3A,5-(R,R) (ver entradas 11 y 12, **Tabla 6.5**).

Las inversiones encontradas en las bioactividades relativas cuando los valores absolutos de bioactividades son bajos, podrían deberse al hecho de realizar el ensayo en el límite de respuesta de la planta, por lo cual, cualquier error sistemático en el análisis (como volúmen inyectado, concentración, variaciones de luz y humedad, etc.) podría inducir mediciones erróneas.

Para poder hacer una comparación más rigurosa de bioactividades fue necesario aumentar el umbral de sensibilidad del bioensayo. Esto se logró modificando las condiciones experimentales de tal forma de mantener un período de 48 hs de oscuridad luego de la inyección del brassinosteroide. Este aumento de la sensibilidad se logra porque en condiciones de oscuridad, en general, se incrementa la potencialidad de las fitohormonas que inducen crecimiento vegetal.

6.3.2. COMPARACION DE LAS BIOACTIVIDADES EN CONDICIONES DE MAYOR SENSIBILIDAD PARA EL BIOENSAYO ILA.

Una vez determinadas las actividades de los distintos brassinosteroides utilizando el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz*, y habiendo detectado muy baja bioactividad para algunos de los brassinosteroides sintetizados se decidió realizar la incubación de las plantas, en oscuridad, luego de la aplicación del brassinosteroide. La falta de luz provoca la inhibición de la síntesis de etileno, un regulador del crecimiento vegetal. De esta forma, las plantas crecen más pudiendo presentar una sensibilidad mayor a la acción de los brassinosteroides.

Los resultados obtenidos y las dosis aplicadas de cada uno de los compuestos, se muestran en la **Tabla 6.6** y se ilustran en el **Gráfico 6.4**.

Se pudo comprobar nuevamente que la actividad biológica de los análogos con configuración 22(R),23(R) en la cadena lateral fue mayor que la de sus diasterómeros 22(S),23(S) (comparar entradas 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8, 9 y 10; y 11 y 12, **Tabla 6.5**).

La influencia del grupo 5 α -hidroxilo en la bioactividad queda mucho mejor determinada en este ensayo debido al aumento absoluto y relativo de bioactividades de los brassinosteroides menos activos: existe un aumento en la respuesta absoluta y relativa en

Tabla 6.6. Resultados estadísticos obtenidos con el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz*, modificado con fase oscuridad y comparación con los resultados obtenidos en el ensayo realizado en las condiciones originales.

N	compuesto	dosis en $\mu\text{g/planta}$	ángulo (θ) ^a	DESVST (b)	bioactividad % ^c	incremento bioactividad ^d
1	2,3-(R,R)	2	117,0	6,4	100	32,7
2	2,3-(S,S)	3,5	63,8	5,5	54,5	-25,6
3	2,3,5-(R,R)	2	95,8	7,2	81,9	20,7
4	2,3,5-(S,S)	3	74,8	5,4	63,9	35,5
5	3B-(R,R)	3	55,8	5,7	47,7	179,0
6	3B-(S,S)	5	38,4	5,7	32,8	101,0
7	3B,5-(R,R)	3,5	47,6	6,8	40,7	336,7
8	3B,5-(S,S)	3,5	2,8	1,3	2,4	-83,3
9	3A-(R,R)	2	58,3	5,6	49,8	374,0
10	3A-(S,S)	3,5	27,4	4,1	23,4	18,6
11	3A,5-(R,R)	2	16,4	3,3	14,0	49,0
12	3A,5-(S,S)	4	1,9	1,3	1,6	-88,6

^a Calculado como $(X_{BR} - X_{ctrl})$ (en grados).

^b Calculado según fórmula[1] (en grados).

^c Actividad biológica porcentual respecto del 2,3-(R,R).

^d Incremento porcentual del ángulo inducido (θ) respecto del 2,3-(R,R), comparando el ensayo original (Tabla 6.5) y el modificado (Tabla 6.6).

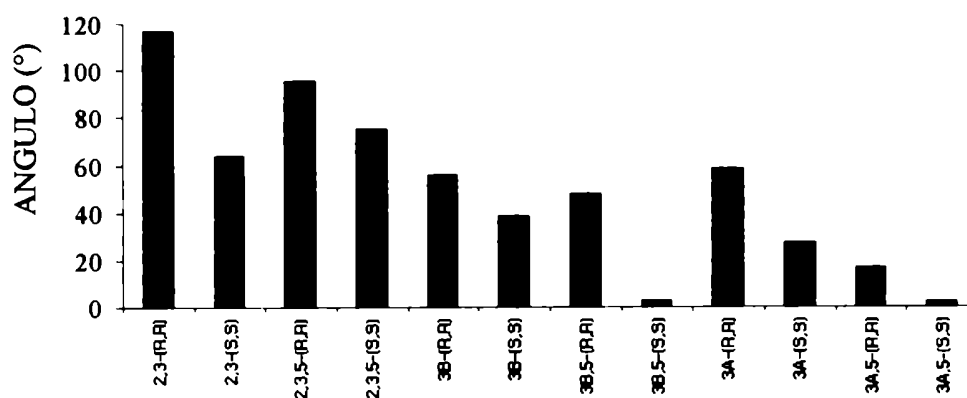


Gráfico 6.4. Representación gráfica del ángulo inducido en el *ensayo modificado de la inclinación de la lámina de arroz* para cada brassinosteroide utilizando la variedad de arroz local *Chui*.

el caso de los análogos con configuración 22(R),23(R) en la cadena lateral, hasta el punto de superar la actividad biológica de los 5 α -hidrogenados con configuración 22(S),23(S) en la cadena lateral (comparar entradas 2 y 3 y 6 y 7, **Tabla 6.5**). Sin embargo, este efecto no se aprecia en los análogos 5 α -hidroxilados con configuración 22(S),23(S) en la cadena lateral, entre los que se encuentran los de menor bioactividad (entradas 8 y 12, **Tabla 6.6**).

Es interesante comparar los resultados de los *ensayos de inclinación de la lámina de arroz*, con y sin modificación, según puede observarse en el **Gráfico 6.5**.

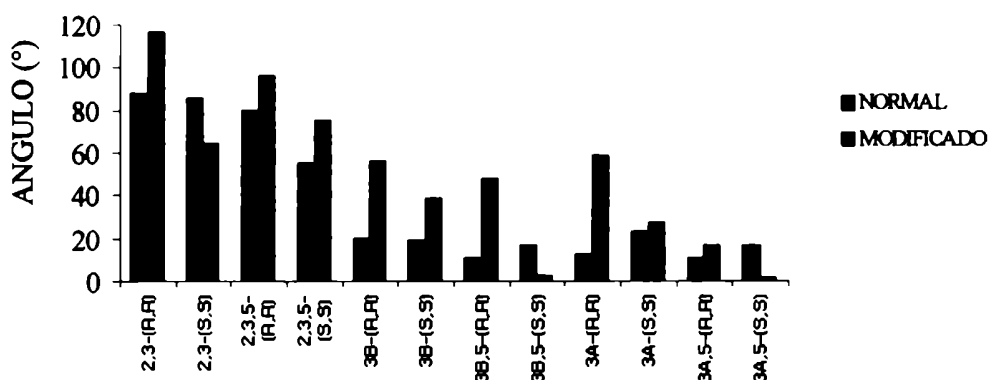


Gráfico 6.5. Bioactividad comparada, de los análogos de brassinosteroides sintetizados, obtenidas con los *ensayos normal y modificado de inclinación de la lámina de arroz* utilizando la variedad de arroz local *Chui*.

La realización del *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz (ILA) modificado*, condujo a tres categorías de resultados:

- * Compuestos cuya bioactividad se vio reducida (entradas 2, 8 y 12, **Tabla 6.6**).
- * Compuestos cuya bioactividad se vio incrementada entre 20-50% (entradas 1, 3, 4, 10 y 11, **Tabla 6.6**).
- * Compuestos cuya bioactividad se vio incrementada entre 100-400% (entradas 5, 6, 7 y 9, **Tabla 6.6**).

Los compuestos más activos en el ensayo ILA (entradas 1-4, **Tabla 6.5**) también fueron los más activos en el ensayo ILA-modificado, aunque sus incrementos oscilaron entre -25 % y 36 %.

Los compuestos menos activos en el ensayo ILA (entradas 7, 9 y 11, **Tabla 6.5**) mostraron un incremento de la actividad biológica del orden de entre el 330 % y el 400 % para los compuestos 3B,5-(R,R) y 3A-(R,R) (entradas 7 y 9, **Tabla 6.6**), y del 50% para el compuesto 3A,5-(R,R) (entrada 11, **Tabla 6.6**).

Los compuestos con configuración 22(S),23(S) en la cadena, que presentaban un nivel de actividad media en el ensayo ILA (entradas 6, 8, 10 y 12, **Tabla 6.5**), también mostraron respuestas muy discímiles frente al ILA-modificado con incrementos que oscilan entre el 100% (entrada 6, **Tabla 6.6**) y valores bajos o negativos (entradas 8, 10 y 12, **Tabla 6.6**).

6.3.3. COMPARACION ENTRE LOS DATOS OBTENIDOS CON LAS VARIEDADES *CHUI* Y *BAHIA*.

Una comparación de nuestros resultados de bioactividad en función de la dosis aplicada del brassinosteroide patrón (12) sobre la variedad *Chui*, con los resultados informados por el grupo de la Dra. Carme Brosa realizados sobre la variedad *Bahia*³, mostró que ambas curvas poseen forma similar. Los resultados indican, también, que la concentración mínima para realizar el ensayo ronda el orden del microgramo por plántula para la variedad *Bahía* y de 0,2 $\mu\text{g/plántula}$ para la variedad *Chui*. Estos datos evidencian la mayor sensibilidad de la variedad *Chui* a las condiciones del bioensayo (ver **Gráfico 6.6**).

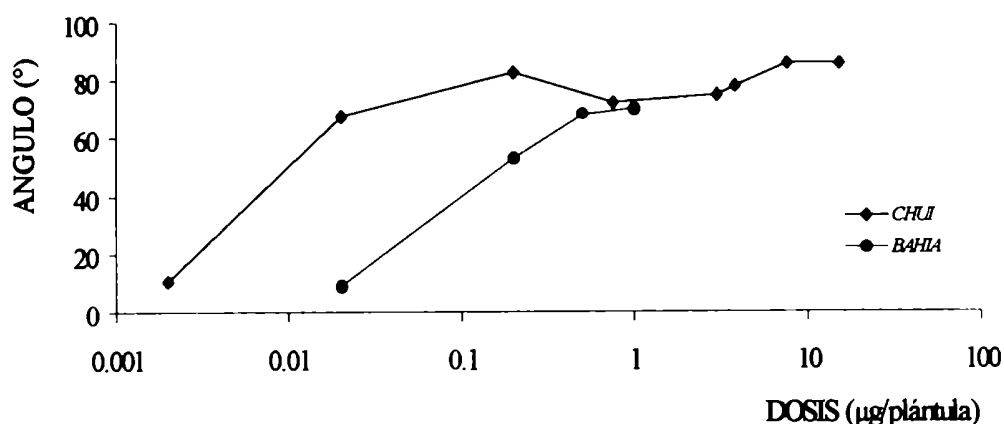


Gráfico 6.6. Comparación entre las curvas de actividad de las variedades *Bahía* y *Chui*.

También fue interesante comparar los resultados de bioactividad que obtuvimos para nuestros análogos sobre la variedad *Chui*, con los obtenidos por la Dra. Carme Brosa

(Barcelona, España), sobre la variedad *Bahia*, utilizando nuestros análogos sintéticos. Para realizar dichos ensayos, la Dra. Brosa, utilizó el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz* con y sin modificación⁵, inyectando para cada brassinosteroide una dosis de 1 µg/planta, excepto en el caso del 3A-(R,R) cuya dosis fue de 0,1µg/planta⁶. Los resultados obtenidos por la Dra. Brosa se muestran en la **Tabla 6.7** y el **Gráfico 6.7**.

Las primeras observaciones que surgen del **Gráfico 6.7** y las **Tablas 6.5, 6.6 y 6.7** son:

1) La variedad *Chui* es, en general, entre 2-3 veces más sensible que la variedad *Bahia*.

2) El ensayo realizado en condiciones de oscuridad aumenta la sensibilidad del ensayo en 2-3 veces para ambas variedades de arroz con la excepción de los brassinosteroides 3A,5-(S,S) y 3B,5-(S,S) que, utilizando la variedad *Chui*, presentan una mayor respuesta al ensayo realizado en condiciones de luz (comparar entradas **8** y **12**, **Tabla 6.5**; con entradas **8** y **12**, **Tabla 6.6**). Esta inversión de la sensibilidad no se detecta utilizando la variedad *Bahia*.

3) Los compuestos más activos son el 2,3-(R,R) y el 2,3,5-(R,R), además de sus estereoisómeros de cadena los 2,3-(S,S) y 2,3,5-(S,S), aún cambiando la variedad de arroz y las condiciones del ensayo (ver **Tablas 6.5-6.7**).

La modificación del ILA incluyendo una fase de oscuridad, permite establecer un ordenamiento según bioactividad decreciente de brassinosteroides, teniendo en cuenta los valores registrados sobre la variedad *Chui* (ver **Tabla 6.8**)⁷. Este mismo ordenamiento podría establecerse con los datos informados para la variedad *Bahia*, aunque, debido a los pequeños valores absolutos de los ángulos inducidos (θ) en esta variedad de arroz, las conclusiones podrían no ser rigurosas.

Estas conclusiones son válidas para una dosis de 1 µg/plántula aplicada sobre la variedad *Bahia* y una dosis de 2-4 µg/plántula aplicada sobre la variedad *Chui*, bajo las condiciones de este bioensayo. Sin embargo, debería realizarse un análisis del comportamiento a distintas concentraciones antes de poder generalizar esta comparación de bioactividades. Esto sería importante, fundamentalmente para los casos en que las diferencias de bioactividades relativas son mínimas (por ejemplo ver entradas **2** y **9**, **Tabla 6.6**).

Tabla 6.7. Resultados estadísticos obtenidos por la Dra. Brosa con los *ensayos normal y modificado de la inclinación de la lámina de arroz* sobre la variedad *Bahía*, utilizando los brassinosteroides sintetizados en este trabajo de tesis.

N	compuesto	θ ILA (%) ^a	DESVST ILA ^b	θ ILA modificado (%) ^a	DESVST ILA modificado ^b
1	2,3-(R,R)	87,5 (100)	4,7	98,1 (100)	4,5
2	2,3-(S,S) ^c	----	----	----	----
3	2,3,5-(R,R) ^c	----	----	----	----
4	2,3,5-(S,S) ^c	----	----	----	----
5	3B-(R,R)	7,0 (8)	1,4	41,9 (42,7)	5,7
6	3B-(S,S)	-0,4 (0) ^d	1,2	9,2 (9,4)	1,6
7	3B,5-(R,R)	3,7 (4)	1,5	23,5 (24)	4,2
8	3B,5-(S,S)	1,7 (1,9)	1,6	4,4 (4,5)	1,6
9	3A-(R,R)	1,6 (1,8)	1,6	7,1 (7,2)	1,9
10	3A-(S,S)	1,3 (1,5)	1,5	11,3 (11,5)	2,2
11	3A,5-(R,R)	2,8 (3,2)	1,3	9,3 (9,5)	1,8
12	3A,5-(S,S)	2,6 (3)	1,6	4,4 (4,5)	1,6

^a El ángulo se mide en grados. Entre paréntesis se dan las actividades porcentuales respecto del valor para el patrón 2,3-(R,R)

^b Calculado según la fórmula [1] (en grados).

^c Datos no suministrados.

^d El valor del promedio del ángulo inducido (θ) por el brassinosteroide, es menor al promedio del ángulo inducido por el etanol en los controles.

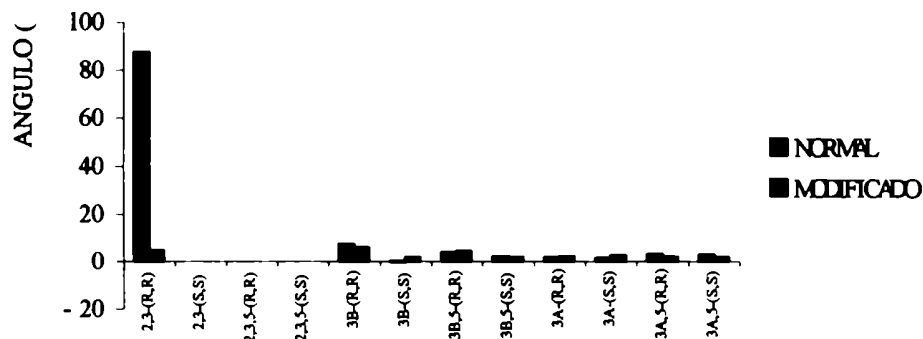


Gráfico 6.7. Bioactividad comparada, de los análogos sintetizados, utilizando los *ensayos ILA normal y modificado* utilizando la variedad de arroz española Bahía.

Tabla 6.8. Orden de bioactividad relativa respecto del brassinólido⁷, obtenida con el *ensayo modificado de la inclinación de la lámina de arroz*, utilizando la variedad *Chui*.

N	compuesto	bioactividad porcetual
1	Brassinólido (1)	100
2	2,3-(R,R)	96
3	2,3,5-(R,R)	78,6
4	2,3,5-(S,S)	61,3
5	2,3-(S,S)	52,3
6	3A-(R,R)	47,8
7	3B-(R,R)	45,8
8	3B,5-(R,R)	39,1
9	3B-(S,S)	31,5
10	3A-(S,S)	22,5
11	3A,5-(R,R)	13,4
12	3B,5-(S,S)	2,3
13	3A,5-(S,S)	1,5

6.3.4. COMPARACION DE LAS CURVAS DE BIOACTIVIDAD EN FUNCION DE LA DOSIS APLICADA, PARA BRASSINOSTEROIDES CON DISTINTO COMPORTAMIENTO EN ILA.

La diferente bioactividad presentada por los análogos de brassinosteroides puede provenir de diferentes causas; algunas de ellas pueden ser:

- 1) Falta de complementación estereoeléctrica entre el receptor y el brassinosteroide.
- 2) Alta actividad de mecanismos degradativos del brassinosteroide durante el bioensayo.
- 3) Imposibilidad de metabolizar los análogos y transformarlos en metabolitos más activos.

Con el objeto de verificar si la dosis de 0,2 $\mu\text{g/planta}$ --reconocida como la mínima concentración óptima para el brassinólido patrón el 2,3-(R,R)-- era apropiada para otros

análogos, se realizó la curva de dosis/respuesta para otros dos análogos con cadena lateral perteneciente a la serie natural [22(R),23(R)], de reconocida bioactividad extrema (entradas 3 y 9, **Tabla 6.5**).

a) (22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestano-6-ona (163) [2,3,5-(R,R)].

b) (22R,23R,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (161) [3A-(R,R)].

Los resultados obtenidos se resumen en las **Tablas 6.9** y **6.10**, y se muestran en el **Gráfico 6.8**. El significado de las variables expresadas en ambas tablas, puede leerse en la nota al pie de la **Tabla 6.3** (pag. 198).

Tabla 6.9. Datos estadísticos obtenidos de mediciones del ángulo inducido en ILA (en grados), para distintas dosis aplicadas de 2,3,5-(R,R) sobre la variedad local *Chui*.

dosis en $\mu\text{g/planta}$	0,0005	0,001	0,01	0,1	1,0	4,5
\bar{X}_{BR}	17,3	18,4	27,3	68,0	88,2	79,4
S_{BR}	5,9	6,5	15,7	33,5	32,8	33,7
\bar{X}_{ctrl}	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8
S_{ctrl}	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	8,5	9,6	18,5	59,2	79,4	70,6
DESVST	1,7	1,4	2,3	4,6	4,9	4,5

Las curvas de concentración para los compuestos más activos muestran un perfil similar aunque la sensibilidad en el rango de concentraciones menores a $1\mu\text{g/plántula}$ es menor para el compuesto 2,3,5-(R,R) que para el patrón 2,3-(R,R). El compuesto 3A-(R,R) es escasamente activo en el rango de concentraciones ensayado. Las concentraciones máximas analizadas estuvieron condicionadas por la solubilidad de cada brassinosteroide y la tolerancia máxima de cada plántula de absorber el volumen inyectado.

El hecho de que la modificación del bioensayo ILA permitió aumentar la sensibilidad, induce a seguir investigando la acción de los brassinosteroides en el campo de la fisiología vegetal, y de su desconocida interacción con otras fitohormonas.

Tabla 6.10. Datos estadísticos obtenidos de mediciones del ángulo inducido en ILA (en grados), para distintas dosis aplicadas de 3A-(R,R) sobre la variedad local *Chui*.

dosis en $\mu\text{g/planta}$	0,00013	0,0013	0,013	0,13	1,25
\bar{X}_{BR}	13,6	10,4	13,0	18,3	21,1
\bar{S}_{BR}	4,7	7,4	3,6	4,7	5,7
\bar{X}_{ctrl}	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8
\bar{S}_{ctrl}	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
$(\bar{X}_{BR} - \bar{X}_{ctrl})$	4,8	1,6	4,2	9,5	12,3
DESVST	1,2	1,6	1,2	1,2	1,8

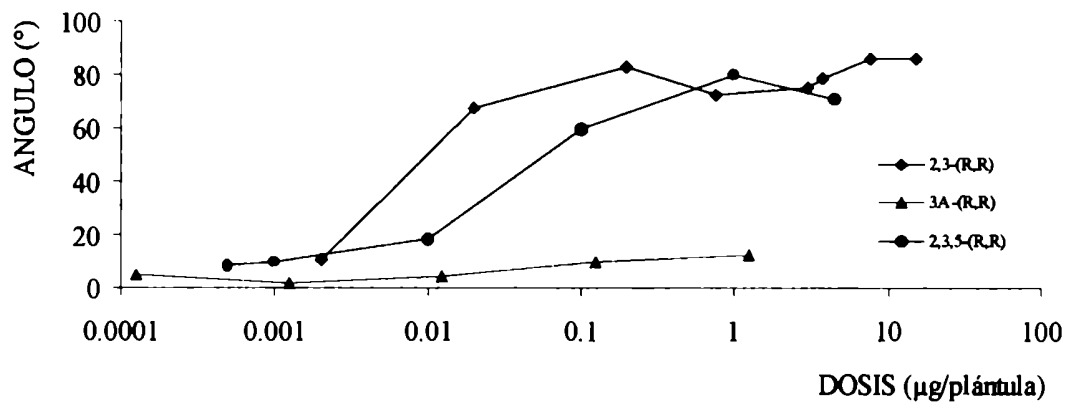


Gráfico 6.8. Curvas de concentración de 2,3-(R,R), 2,3,5-(R,R) y 3A-(R,R).

6.4. OTROS BIOENSAYOS.

6.4.1. GENERALIDADES SOBRE BIOENSAYOS CON PLANTAS MUTANTES.

Aunque las hormonas esteroidales son muy importantes para el desarrollo de animales, el papel fisiológico de los fitorreguladores esteroidales es aún desconocido⁸.

El crecimiento y desarrollo de las plantas están gobernados por complejas interacciones entre señales externas y factores internos. La luz regula muchos procesos de desarrollo durante el ciclo de vida de las plantas, desde la germinación de la semilla, hasta la

inducción floral^{9,10}, y causa profundos cambios morfológicos a nivel de plántulas. En presencia de luz se inhibe el crecimiento de los hipocótilos, se expanden los cotiledones, se desarrollan las hojas, se diferencian los cloroplastos, se produce clorofila y se induce la expresión de muchos genes-luz dependientes.

Se ha sugerido que las hormonas vegetales que inducen división, elongación y diferenciación celular están involucradas directamente en la acción de la luz sobre las plantas^{11,12}. Sin embargo, aún no se comprenden las interacciones entre ellas y los pasos de la fotoinducción. Actualmente, para encarar trabajos de investigación en este área se trabaja con plantas modelo como *Arabidopsis Thaliana*, y sus mutantes. Para investigar cómo la luz interacciona con programas de desarrollo interno en plantas jóvenes, se aíslan mutantes que tienen las características de una planta crecida en la luz, aunque fueron crecidas en la oscuridad. Luego se analiza su mapa genético y las proteínas para las cuales codifican los genes diferenciales.

Las plantas mutantes que perdieron la función del gen *DET2* tienen efectos pleiotrópicos¹³. En la oscuridad, las mutantes *det2* son cortas, tienen hipocótilos gordos, acumulan antocianinas, tienen los cotiledones abiertos y expandidos y desarrollan pimpollos de hojas primarias. Crecidas en luz, las mutantes *det2*, además de otras particularidades, son más pequeñas y oscuras, y muestran tamaño celular menor que los tipos silvestres de *Arabidopsis*. Mediante mapeo de los genes de la mutante *Arabidopsis DET2*, se mostró que el gen *DET2* codifica para una proteína que comparte una secuencia significativamente idéntica (38-42%) con la enzima reductasa para 5α -esteroides de mamíferos.

La enzima 5α -reductasa de esteroides de mamíferos facilita la conversión de testosterona en dihidrotestosterona, que es un paso clave del metabolismo de esteroides y es esencial para el desarrollo embriogénico de la próstata y genitales masculinos externos. Se ha encontrado que en las familias con problemas hereditarios que involucran la 5α -reductasa está afectada la posición que en el gen codifica para la posición 204 de la enzima, que debería codificar para un glutámico. Dado que se ha encontrado también, que una mutación del glutamato 204 inhibe la actividad in vivo del *DET2* y conduce a defectos en el desarrollo regulado por luz, que pueden ser aminorados por aplicación de brassinólido a la planta, se sugiere, entonces, que el gen *DET2* codificaría para una enzima clave del camino biosintético de brassinosteroides.

Esta conclusión abrió las posibilidades para la investigación en este campo de la relación entre mutantes, genes, enzimas y biosíntesis de estas nuevas hormonas vegetales esteroidales.

Uno de los aspectos más ríspidos de esta rama de la investigación es la caracterización de nuevas variedades de mutantes, y la decisión de si un experimento de mutación condujo o no a la obtención de una variedad mutante nueva.

6.4.2. TRABAJOS EN COLABORACIÓN.

Desde fines del año 1995 se estableció contacto con el Laboratorio de Biologie Cellulaire de Versailles, Cedex, Francia, a cargo del Dr. Michel Caboche, quien trabaja con mutantes de *Arabidopsis* enana, y quería probar la actividad de nuestros compuestos en la reversión de las características fenotípicas de la mutante a aquéllas del tipo silvestre.

El equipo del Dr. Caboche encontró mutantes afectadas en el desarrollo temprano, más específicamente en la elongación del hipocótilo. Los primeros ensayos realizados con algunos de nuestros compuestos no pudieron ser correctamente interpretados porque no se tenían buenos controles. Actualmente, el Dr. Caboche, está trabajando en Japón en el Instituto RIKEN, con dos mutantes deficientes en la biosíntesis de brassinólido, que claramente restauran su fenotipo por agregado de brassinólido y algunos de sus precursores biosintéticos.

Cuando estas mutantes enanas crecen en la oscuridad tienen alrededor de 2,2 mm de largo, mientras que el tipo silvestre tiene 19 mm. A dosis relativamente bajas de brassinólidos (30 nM), ya no es posible diferenciar entre el tipo salvaje y la mutante, lo que sugiere una verdadera reversión de la deficiencia. En la **Tabla 6.11** se muestran las dosis que revierten en un 50% la deficiencia en la elongación estudiadas sobre brassinólido (1) y castasterona (7), y sobre algunos de los brassinosteroides sintetizados en nuestro laboratorio.

Los resultados obtenidos en estos ensayos con nuestros análogos sintéticos, muestran un perfil similar de actividad respecto de los resultados en el *ensayo de inclinación de la lámina de arroz*. Este hecho es muy alentador, por cuanto se trata de dos sistemas vegetales diferentes, con pruebas diferentes, infiriéndose una posible generalización para un ordenamiento general de la actividad de estos compuestos.

Un estudio que está recién en sus comienzos, intenta verificar una posible acción antagonista de los brassinosteroides, utilizando los análogos que resultaron menos activos en la reversión al tipo salvaje. Los primeros ensayos mostraron un leve carácter antagonista para 3B,5-(R,R) y 3A,5-(R,R).

Tabla 6.11. Dosis aplicadas de distintos brassinosteroides que, sobre la mutante de *Arabidopsis*, revierten en un 50% la deficiencia en la elongación con respecto a la especie silvestre.

Brassinosteroide	Concentración de la dosis activa que induce un 50% de reversión a la especie silvestre.
Brassinólido (1)	4-10 nM
Castasterona (7)	25 nM
2,3-(R,R)	150 nM
2,3,5-(R,R)	700 nM
3B-(R,R)	mayor a 1000 nM o no activa
3B,5-(R,R)	mayor a 1000 nM o no activa
3A-(R,R)	actividad apenas detectable a 500 nM
3A,5-(R,R)	mayor a 1000 nM o no activa

6.5. RESUMEN.

Como mencionamos anteriormente en la **sección 1.4.1 del Capítulo 1** (pag. 14) para llevar a cabo con éxito la detección de principios activos en plantas es fundamental, contar con ensayos biológicos sensibles y específicos. En el caso de los brassinosteroides los ensayos utilizados fueron diseñados originalmente para auxinas, giberelinas o citokininas, los cuales en condiciones diferenciales específicas sirven para evaluar su bioactividad.

Los ensayos más utilizados para evaluar la actividad biológica de brassinosteroides son el *ensayo de curvatura del primer entremudo del poroto*¹⁴, el *ensayo de elongación del segundo entremudo del poroto*¹⁵⁻¹⁷, el *ensayo de desenrolle del hojas de trigo*¹⁸, los *ensayos de alargamientos de epicótilo, petiolos, cotiledones y planta entera de rábano y alargamiento de tallo de tomate*¹⁹, el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz*^{20,21}, el *ensayo de inhibición del crecimiento de la arveja*¹⁷, etc. (ver **Capítulo 1, sección 3.1**, pag. 14). En cada uno de estos bioensayos el brassinólido (1) es el brassinosteroide más activo, sin embargo la bioactividad del resto de ellos varía según el ensayo y la variedad utilizada para la evaluación (ver **Tabla 1.6, Capítulo 1**, pag. 22)^{22,17}.

En este trabajo de tesis se han realizado dos tipos de ensayos: el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz normal (ILA)* y el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz modificado con fase oscuridad*. El valor de bioactividades encontradas con el ensayo ILA modificado utilizando la variedad de arroz *Chui*, permite inferir un orden de

actividades decrecientes de los brassinosteroides sintetizados según se expresó en la **Tabla 6.8**, y según se muestra en el **Gráfico 6.9**.

Pudimos, además, verificar la influencia de la variedad de arroz sobre los resultados del ensayo, demostrando que, la variedad *Chui* es la más sensible. El bioensayo permitió inferir diferencias en las respuestas de acuerdo al brassinosteroides aplicado.

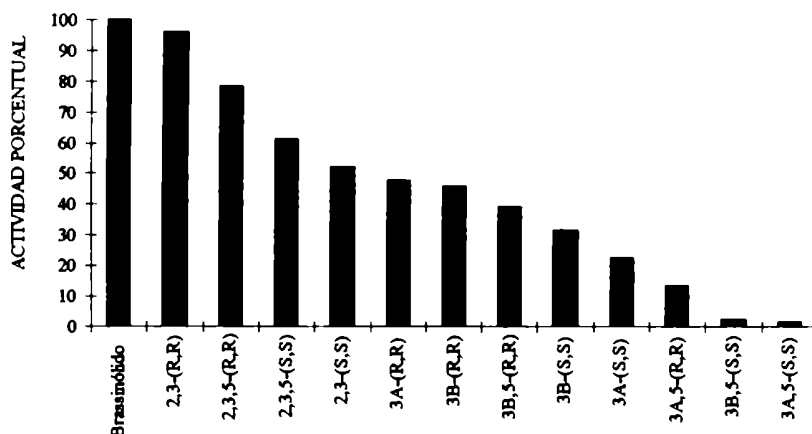


Gráfico 6.9. Gráfico de barras que representa el orden de bioactividad relativa obtenida con el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz modificado con fase oscuridad, utilizando la variedad de arroz local *Chui*.

De estos resultados surgen algunas conclusiones respecto a relaciones estructura-bioactividad, entre las cuales algunas son coincidentes con resultados informados previamente en bibliografía⁴.

1- Los brassinosteroides con sustitución $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi en el anillo A, resultaron ser los más activos.

2- Los brassinosteroides con sustitución 22(R),23(R) en la cadena lateral son los que presentan mayor respuesta al ensayo.

3- Los brassinosteroides con sustitución 5α -hidrógeno son más activos que los que poseen sustitución 5α -hidroxilo.

4- Los brassinosteroides 5α -hidroxilados con sustitución 22(R),23(R) poseen bioactividades del orden de las de los compuestos 5α -hidrogenados respectivos con sustitución 22(S),23(S), excepto para los que poseen sustitución $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi en el anillo A.

5- Los brassinosteroides 5α -hidroxilados con sustitución 22(S),23(S) poseen escasa bioactividad.

6.6. BIBLIOGRAFIA.

- 1- K. Takeno, R. P. Pharis; *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1275 (1982).
- 2- Los experimentos se realizaron en colaboración con la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.
- 3- C. Brosa; Biological effects of brassinosteroids, in **Biochemistry and functions of sterols**. E. J. Parish, D. Nes Eds. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1995.
- 4- N. B. Mandava; *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **39**, 23 (1988).
- 5- Comunicación personal de los ensayos llevados a cabo por el grupo de la Dra. Carme Brosa de Institut Quimic Sarrià de Barcelona, utilizando la variedad de arroz *Bahia*, sobre los brassinosteroides sintetizados en nuestro laboratorio.
- 6- El compuesto 3A-(R,R) es el más insoluble de todos en etanol. En nuestros ensayos, para poder incrementar la solubilidad, se agregaron 100-300 µl de acetonitrilo por cada mililitro de etanol. Las plántulas control inyectadas con similar solvente no mostraron variación respecto de los controles inyectados con etanol.
- 7- Para obtener dichos valores, se consideran válidos los resultados obtenidos realizando el bioensayo sobre la variedad *Bahia*, en condiciones de luz; que determinan que el brassinosteroide 2,3-(R,R) posee el 96% de la actividad del brassinólido (1)³.
- 8- J. Li, P. Nagpal, V. Vitart, T.c. McMorris, J. Chory; *Science*, **272**, 398 (1996).
- 9- J. Chory; *Trends. Genet.*, **9**, 167 (1993)
- 10- T. W. McNellis, X. -W. Deng; *Plant Cell*, **7**, 1749 (1995).
- 11- P. J. Davies; **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and molecular Biology**. Kluwer Academic, Dordrecht, Boston. 1995.
- 12- J. A. DeGreef, H. Frédéricq; **Photomorphogenesis**. W. Shropshire Jr. and H. Morh, Eds. Springer-Verlag, Berlin. 1993.
- 13- J. Chory, P. Nagpal, C. A. Peto; *Plant Cell*, **3**, 445 (1991).
- 14- W. J. Meudt, H. W. Bennet; *Physiol. Plant.*; **44**, 422 (1978).
- 15- M. J. Thompson, N. B. Mandava, W. J. Meudt, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **38**, 567 (1981).
- 16- G. L. Steffens; U.S. Department of agriculture brassins project: 1970-1980, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 17- L. Kohout, M. Strnad, M. Kaminek; Types of brassinosteroids and their bioassays, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.

- 18- M. Katsumi; Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 19- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Takematsu, Y. Takeuchi, M. Koguchi; *Phytochemistry*, **22**, 2437 (1983).
- 20- K. Wada, S. Marumo, N. Ikekawa, M. Morisaki, K. Mori; *Plant Cell Physiol.*, **22**, 323 (1981).
- 21- K. Takeno, R. P. Pharis; *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1275 (1982).
- 22- K. Wada, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita, K. Nakamura, M. Uchiyama, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 719 (1984).



CAPITULO 7

PARTE EXPERIMENTAL

7.1. GENERALIDADES.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no han sido corregidos.

Los espectros de absorción infrarroja (IR) se realizaron en un Spectrometer 550 Nicolet Magna -IR™ equipado con transformada de Fourier (FT-IR), en pastilla de bromuro de potasio, y graficados con un plotter Hewlett-Packard Color Pro.

Los espectros de absorción ultravioleta (UV) se hicieron en un espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett-Packard modelo 8451A, acoplado a una computadora Hewlett-Packard 98155A con una unidad de disco Hewlett-Packard 9121. En todos los casos se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

Los poderes rotatorios específicos se midieron en un polarímetro automático Perkin-Elmer modelo 343, en una celda de 1 dm de longitud y a una longitud de onda de 589 nm. Las mediciones se realizaron a una concentración de 1g/100ml (aprox. 0,02 M), utilizando cloroformo como solvente en todos los casos.

Para los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica y de carbono se utilizó un espectrómetro Varian XL-100-15 a 100.1 y 25.2 MHz respectivamente, acoplado a una computadora Varian 620/L-100; o un espectrómetro Bruker AC 200 a 200 y 50 MHz respectivamente, en ambos casos utilizando experimentos de pulsos y transformada de Fourier. Se utilizó cloroformo deuterado como solvente salvo en los casos que se indican otros solventes. Los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm), utilizando como referencia interna (0,00 ppm) el tetrametilsilano (TMS). Las constantes de acoplamiento (J) se midieron en Hertz. Las señales se describieron en cada caso como singulete (s), doblete (d), triplete (t), doble doblete (dd), multiplete (m) o banda ancha (ba). Los experimentos RMN-¹³C-DEPT se hicieron con el software standard de Bruker (DEPT-135: Distortionless Enhanced Polarization Transfer).

Los espectros de masa (EM) directo se hicieron en espectrómetros Varian CH-7 A (VARIAN-MAT), VG-TRIO2 (MASSLAB) o Shimadzu QP-5000 con ionización por impacto electrónico (EI) a 70 eV. Los espectros de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CGL/EM) se hicieron utilizando el sistema VG-TRIO2 con cromatógrafo Hewlett-Packard 5898 Serie II. Los espectros de masa de alta resolución y de ionización por BAV se realizaron en un espectrómetro de masa híbrido de configuración BEqQ (ZAB-VSEQ), VG.

Las cromatografías gas-líquido (CGL) fueron realizadas en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 A, con detector de ionización de llama, unido a un integrador Hewlett-Packard 3392A.

Las cromatografías en columna se realizaron con silicagel S (sílica flash) Riedel-de Haën tamaño de partícula 32-63 μm (230-400 mesh) aplicando presión de nitrógeno para acelerar la elución. La silicagel D utilizada fue Riedel-de Haën tamaño de partícula 30 μm (400 mesh). Los solventes utilizados para la elución se indican en cada caso.

Las cromatografías en capa delgada analíticas se hicieron sobre placas de silicagel 60 con indicador de fluorescencia a 254 nm, tamaño de partícula 25 μm , tamaño de poro 60Å espesor de la capa 250 μm . Los solventes utilizados para la elución se indican en cada caso. El revelado de las placas se hizo por inmersión en una solución de H_2SO_4 5% en etanol y posterior calentamiento en estufa a 120°C. El revelado de los productos polihidroxilados derivados de las osmilaciones se hizo por inmersión en una solución acuosa de ácido fosfomolibdico/sulfato cérico y posterior calentamiento en estufa a 120°C.

Las cromatografías preparativas se hicieron sobre silicagel 150 con indicador de fluorescencia a 254 nm, espesor de capa 1 mm. Los solventes utilizados para la elución y los reveladores se indican en cada caso.

Los solventes utilizados para cromatografía en capa delgada o preparativa se purificaron por destilación fraccionada.

Los solventes anhidros se prepararon según las siguientes técnicas:

Cloruro de metileno: se trató con pentóxido de fósforo, se hizo una destilación simple y se almacenó sobre tamices moleculares de 4Å.

Tetrahidrofurano (THF): se pasó por una columna de alúmina básica, y se almacenó sobre cinta de sodio durante 18 hs, tapado con una trampa de cloruro de calcio. Se reflujó en presencia de benzofenona hasta coloración azul y se almacenó para destilar en el momento de usar.

Tolueno: se almacenó sobre cinta de sodio por 18 hs tapado con una trampa de cloruro de calcio. Se reflujó en presencia de benzofenona hasta coloración azul y se almacenó para destilar en el momento de usar.

Dimetilformamida (DMF) y Dimetilacetamida (DMA): Se mantuvo por 18 horas sobre hidruro de calcio, se filtró y se destiló al vacío, y se almacenó sobre tamices moleculares de 3Å.

Dimetilsulfóxido (DMSO): Se almacenó sobre hidruro de calcio.

Piridina (Py): Se almacenó sobre hidróxido de sodio.

A continuación se presentarán los detalles experimentales de cada una de las síntesis de los compuestos descritos, ordenados de acuerdo al Esquema o Figura en el que fueron presentados (Una copia de cada Esquema se encuentra adosada a la parte interior de la contratapa del presente ejemplar).

7.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE CASTASTERONA 5 α -HIDROGENADOS (Esquema 2.1 y Esquema 4.1).

3 β -Acetoxiestigmast-22-eno (191) (paso a, Esquema 2.1).

Se colocaron 10,0 g de estigmasterol (136) en un balón de 300 ml y se agregaron 200 ml de piridina seca. Luego de completada la disolución se adicionaron 100 ml anhídrido acético. La mezcla se protegió de la luz y se dejó con agitación por 18 horas, al cabo de lo cual se vertió sobre una mezcla hielo/HCl 5% contenida en un vaso de precipitados de 500 ml. Se dejó cristalizando toda la noche, se filtró y se lavó con HCl 5% y agua, obteniéndose el 3 β -acetiloxiestigmast-22-eno (191) con rendimiento cuantitativo. Solvente para CCD: hexano/cloruro de metileno (7:3), R_f= 0,50. Se recrystalizó de metanol obteniéndose un producto blanco de p.f. 141-142°C (lit. 141-142°C)^{1,2}.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.7.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.15.

3 β -*t*-Butildimetilsililoxiestigmast-22-eno (202) (paso p, Esquema 2.1).

Se colocaron 500 mg de estigmasterol (136) en un balón de 100 ml y se agregaron 40 ml de dimetilformamida anhidra. Una vez producida la disolución se agregaron 210 mg de imidazol y 220 mg de cloruro de *t*-butildimetilsililo, y se dejó con agitación por un período de 18 hs. Se evaporó el solvente y se extrajo, para obtener el 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-eno (202) con un rendimiento del 91%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (1%), R_f= 0,57. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 123-124°C

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.7.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.15.

EM: *m/z* (%), 469 (M⁺-[(CH₃)₃C-], 30); 385 (1); 331 (6); 83 (100).

3 β -Acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (184) (paso b, Esquema 2.1).

Técnica a) Se colocaron 800 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-eno (191) en un balón de 500 ml sumergido en un baño a -78°C (acetona/hielo seco), y se agregaron, manteniendo agitación, 250 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, una solución de 429 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico disuelto en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de terminado el agregado se retiró el baño y se permitió reaccionar con agitación durante 24 hs más. Pasado este período se lavó hasta neutralidad con una solución saturada de bicarbonato de sodio. La solución se secó, y se eliminó el solvente para obtener una mezcla de 5 α ,6 α y 5 β ,6 β -epóxidos en proporción 5:1 que se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/hexano (4:1) como solvente, obteniéndose las siguientes fracciones:

3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (193) con un rendimiento del 58 %. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0,50. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 192-193°C³⁻⁵

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.9.**

3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (184) con un rendimiento del 12 %. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0.35. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 138-139°C (lit. 139-140°C)⁵.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16.**

Técnica b) Se molieron en un mortero 1,35 g de permanganato de potasio y 680 mg de sulfato de cobre, hasta lograr una mezcla uniforme. Se agregaron 70 μ l de agua y se continuó la molienda.

Por otra parte, en un balón de 50 ml se disolvieron 300 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-eno (191) en 7,0 ml de cloruro de metileno recién destilado, al cual se agregó con agitación el contenido del mortero. Se permitió homogeneizar la suspensión y se agregaron 0,7 ml de *t*-butanol. Se dejó reaccionar 4 hs y se filtró a través de un lecho de Celite. El rendimiento de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (184) fue del 70 %.

Técnica c) Se disolvieron 500 mg de trióxido de cromo en 2,0 ml de ácido acético o en 1,5 ml de una mezcla (1:1) de anhídrido acético y ácido acético, y se permitió la disolución con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Por otra parte, se disolvieron 454 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-eno (191) en 150 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 300 ml, que posteriormente fue sumergido en un baño a -78°C (hielo seco/acetona). Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, la solución de

trióxido de cromo diluida en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Al finalizar el agregado se dejó reaccionar 20 minutos y se virtió el contenido del balón a un vaso de precipitados de 500 ml conteniendo una solución de hidróxido de sodio al 10%. Posteriormente se extrajo con cloruro de metileno. Se procedió a purificar por medio de una columna de sílica flash con hexano/acetato de etilo (9:1) como solvente obteniéndose las siguientes fracciones:

3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (**193**) en un 10% de rendimiento.

3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**) en un 70% de rendimiento.

3 β -acetoxiestigmasta-5,22-dien-7-ona (**192**) en un 15% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,45. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 186-187°C (lit. 185°C)⁶.

EM: *m/z* (%), 468 (M⁺, 1); 408 (M⁺- AcOH, 12); 296 (10); 269 (10); 83 (100).

5 β ,6 β -Epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (**186**).

a) Partiendo del 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (184**) (paso g, Esquema 2.1).**

Técnica a). Se colocaron 500 mg de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**) en un balón de 100 ml, y se agregaron 50 ml de una solución de hidróxido de potasio 2% en etanol. Se reflujo por 15 minutos, se evaporó el solvente, se extrajo con cloruro de metileno. Se purificó por medio de una columna de sílica flash, utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo (3:2) como solvente, obteniéndose el 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (**186**) con un 52% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (7:3), R_f= 0,30. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 163-164°C (lit. 149-150°C)⁷.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16**.

EM: *m/z* (%), 428 (M⁺, 9); 410 (M⁺- H₂O, 3); 55 (100); 43 (66).

Técnica b) Se colocaron 500 mg de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**) en un balón de 50 ml, y se disolvieron en 25 ml de tetrahydrofurano anhidro recién destilado. Una vez terminada la disolución se agregaron 100 mg de hidruro de aluminio y litio, y se permitió reaccionar con agitación por el lapso de 2 hs. Se extrajo y se purificó por medio de una columna de sílica flash, utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (3:2) como solvente, obteniéndose el 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (**186**) con un rendimiento del 80%.

b) Partiendo de estigmasterol (136) (paso o, Esquema 2.1).

Se molieron en un mortero 1,35 g de permanganato de potasio y 680 mg de sulfato de cobre, hasta lograr una mezcla uniforme. Se agregaron 70 μl de agua y se continuó la molienda.

Por otra parte, se colocaron 300 mg de estigmasterol (136) en un balón de 25 ml, y se disolvieron en 7,0 ml de cloruro de metileno recién destilado. Una vez producida la disolución completa del reactivo, se agregó el contenido del mortero. Se permitió homogeneizar la suspensión y se agregaron 0,7 ml de *t*-butanol. Se permitió que la reacción continuara por el lapso 4 hs y se filtró a través de un lecho de Celite, obteniéndose el 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (186) con un 59% de rendimiento.

3 β -*t*-Butildimetilsililoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (199).**a) Partiendo del 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (186) (paso s, Esquema 2.1).**

Se colocaron 500 mg de 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (186) en un balón de 50 ml y se agregaron 10 ml de dimetilformamida anhidra. Una vez disuelto el sustrato se agregaron 318 mg de imidazol y 350 mg de cloruro de *t*-butildimetilsililo, y se dejó reaccionando con agitación por el lapso de 18 hs. Se evaporó el solvente y se extrajo con cloruro de metileno para obtener el 3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (199) con un rendimiento del 70%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (3%), R_f= 0,35. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 147-148°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.8.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.16.

EM: *m/z* (%), 485 (M⁺ - [(CH₃)₃C-], 4); 469 (2); 83 (100); 55 (51).

b) Partiendo de 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-eno (202) (paso q, Esquema 2.1).

Técnica a) Se molieron en un mortero 1,49 g de permanganato de potasio y 743 mg de sulfato de cobre, hasta lograr una mezcla uniforme. Se agregaron 75 μl de agua y se continuó la molienda.

Por otra parte, se colocaron 383 mg de 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-eno (202) en un balón de 25 ml, y se disolvieron en 5,0 ml de cloruro de metileno recién destilado. Una vez disuelto el reactivo se agregó, con agitación, el contenido del mortero. Se permitió homogeneizar la suspensión y se agregaron 0,75 ml de *t*-butanol. Se dejó reaccionar por el lapso de 3 hs y se filtró a través de un lecho de Celite. Luego se purificó por medio de una columna de sílica flash, utilizando una mezcla de cloruro de metileno/hexano (1:4) como solvente, obteniéndose el 3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (199) con un rendimiento del 26%.

Técnica b) Se colocaron 350 mg de 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-eno (**202**) en un balón de 500 ml sumergido en un baño a -78°C (acetona/hielo seco), y se agregaron, manteniendo agitación, 200 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, una solución de 140 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico disueltos en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de terminado el agregado se retiró del baño y se permitió reaccionar, con agitación, durante 24 hs más. Pasado este período se lavó hasta neutralidad con una solución saturada de bicarbonato de sodio y se purificó por medio de una columna de sílica flash, utilizando una mezcla de cloruro de metileno/hexano (1:4) como solvente, obteniéndose los siguientes compuestos:

3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (**204**) con un rendimiento del 58%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (3%), R_f= 0,41. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 137-138°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.9.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.16.

EM: *m/z* (%), 485 (M⁺- [(CH₃)₃C-], 4); 393 (1); 83 (100); 55 (51).

3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**199**) con un rendimiento del 9%.

Técnica c) Se disolvieron 500 mg de trióxido de cromo en 2,0 ml de ácido acético o en 1,5 ml de una mezcla (1:1) de anhídrido acético y ácido acético, y se permitió la disolución con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Por otra parte, se disolvieron 526 mg de 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-eno (**202**) en 150 ml de cloruro de metileno recién destilado, dentro de un balón de 300 ml, que posteriormente fue sumergido en un baño a -78°C (hielo seco/acetona). Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, la solución de trióxido de cromo diluida en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Finalizado el agregado se dejó reaccionando 20 minutos más, y se virió el contenido del balón a un vaso de precipitados de 500 ml conteniendo una solución de hidróxido de sodio al 10%. Posteriormente se extrajo con cloruro de metileno y se procedió a purificar por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/cloruro de metileno (4:1) como solvente. Se obtuvieron los siguientes compuestos:

3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (**204**) con un 5% de rendimiento.

3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**199**) con un 20% de rendimiento.

3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmasta-5,22-dien-7-ona (203) con un 15% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/cloruro de metileno (3:7), R_f= 0,52. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 210-211°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.14.

EM: *m/z* (%), 485 (M⁺ - [(CH₃)₃C-], 17); 363 (17); 75 (100); 55 (51).

Estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (194) (pasos c y h, Esquema 2.1).

En un balón de dos bocas de 50 ml, conectado a un tren de nitrógeno, se disolvieron 971 mg de tricloruro de aluminio en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro recién destilado. Una vez finalizada la disolución se agregaron 151 mg de hidruro de litio y aluminio, y se agitó por 5 minutos. Transcurrido este lapso, se agregaron 300 mg de 3 β -acetiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (184) o 270 mg de 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (186) disueltos en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro recién destilado. Se permitió reaccionar con agitación por 3 horas y se agregaron 5 ml de acetona y 5 ml de agua. Se extrajo el producto con éter etílico y se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (1:9) como solvente. Se obtuvieron los siguientes compuestos:

estigmast-22-en-3 β ,5 β -diol (195) con un rendimiento del 14,7%. Solvente para CCD: Hexano/acetato de etilo (1:9), R_f= 0,70. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 196-197°C⁸.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.10.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.17.

EM: *m/z* (%), 430 (M⁺, 7); 412 (M⁺ - H₂O, 3); 394 (2); 55 (100).

estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (194) con un rendimiento del 44%. Solvente para CCD: Hexano/acetato de etilo (1:9), R_f= 0,40. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 200-201°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.10.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.17.

EM: *m/z* (%), 430 (M⁺, 14); 273 (12); 255 (18); 69 (59); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₀O₂, M⁺ = 430,3811. Hallado 430,3812.

3 β -*t*-Butildimetilsililoxiestigmast-22-en-6 β -ol (200).

a) Partiendo del 3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (199) (paso r, Esquema 2.1).

En un balón de dos bocas de 50 ml, conectado a un tren de nitrógeno, se disolvieron 971 mg de tricloruro de aluminio en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro recién destilado. Una

vez finalizada la disolución se agregaron 150 mg de hidruro de litio y aluminio, y se agitó por 5 minutos. Transcurrido este lapso se agregaron 350 mg de 3 β -*t*-butildimetilsililoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (199) disueltos en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro recién destilado. Se permitió reaccionar con agitación por 3 horas y se agregaron 5 ml de acetona y 5 ml de agua. Se extrajo el producto con éter etílico obteniéndose el 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-en-6 β -ol (200) con un rendimiento del 54%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,74. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 170-171°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.10.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.17.

EM: *m/z* (%), 487 (M⁺ - [(CH₃)₃C-], 1); 469 (3); 255 (5); 83 (100).

b) Partiendo del estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (195) (paso i, Esquema 2.1).

Se colocaron 522 mg de estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (195) en un balón de 100 ml, y se agregaron 40 ml de dimetilformamida anhidra. Una vez disuelto el reactivo se agregaron 210 mg de imidazol y 220 mg de cloruro de *t*-butildimetilsililo, y se dejó reaccionando con agitación por 24 hs. Se evaporó el solvente y se extrajo con cloruro de metileno obteniéndose el 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-en-6 β -ol (200) con un rendimiento del 100%.

3 β -Tosiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (205) (paso d, Esquema 2.1).

Se colocaron 584 mg de estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (195) en un balón de 25 ml y se agregaron 10 ml de piridina seca. Luego de completada la disolución se agregaron 500 mg de cloruro de *p*-toluensulfonilo. La mezcla se protegió de la luz y se dejó con agitación por 18 horas, al cabo de lo cual se vertió sobre una mezcla hielo/HCl 5% contenida en un vaso de precipitados de 500 ml. Se dejó cristalizando toda la noche y, se filtró y se lavó con HCl 5% y agua, obteniéndose el 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (205) con un rendimiento del 94%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,42. Se utilizó metanol/agua como solvente de recristalización obteniéndose un producto blanco de p.f. 161-162°C (d).

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.10.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.17.

EM: *m/z* (%), 412 (M⁺ - TsOH, 14); 273 (12); 255 (14); 55 (100)

3 β -*t*-Butildimetilsililoxiestigmast-22-en-6-ona (201) (paso j, Esquema 2.1).

Se colocaron 260 mg de clorocromato de piridonio en un balón de 25 ml, y se suspendieron en 10 ml de cloruro de metileno recién destilado. Se puso el balón, con

agitación, en un baño hielo/agua por el lapso de 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 150 mg de 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-en-6 β -ol (**200**) disueltos en 10 ml de cloruro de metileno recién destilado. Se dejó con agitación y al cabo de unos 20 minutos se retiró el baño de hielo/agua. Se dejó reaccionando por 2 horas, y luego, se pasó por una columnita de sílicagel D. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (3%) como solvente. Se obtuvo la 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-en-6-ona (**201**) con un rendimiento del 95%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (8%), R_f = 0,60. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 151-152°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.11**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.18**.

EM: *m/z* (%), 485 (M⁺ - [(CH₃)₃C-], 100); 345 (2); 83 (49); 43 (19).

EMAR: Calculado para C₃₁H₅₃SiO [M- [(CH₃)₃C-]]⁺, *m/z* = 485,3815. Hallado 485,3813.

3 β -Hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**).

a) Partiendo de estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (**194**) (paso v, Esquema 2.1).

Se colocaron 360 mg de clorocromato de piridonio en un balón de 100 ml, y se suspendieron en 50 ml de cloruro de metileno recién destilado. Se colocó el balón, con agitación, en un baño hielo/agua y se dejó así por el lapso de 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron 636 mg de estigmast-22-en-3 β ,6 β -diol (**194**) disueltos en 10 ml del mismo cloruro de metileno. Se dejó agitando y, luego de 20 minutos, se retiró el balón del baño de hielo/agua. Se permitió reaccionar por el lapso de 2 horas. Se pasó por una columnita de Silicagel D, y se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/acetato de etilo (4:1) como solvente. Se obtuvieron los siguientes compuestos:

estigmast-22-en-3,6-diona (**196**) en un 21% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno, R_f = 0,40. Se recristalizó de acetona, obteniéndose un producto de p.f. 189-190°C⁹.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.11**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.18**.

EM: *m/z* (%), 426 (M⁺, 22); 383 (23); 328 (14); 313 (34); 285 (44); 55 (100).

6 β -hidroxiestigmast-22-en-3-ona (**198**) en un 15% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (7:3), R_f = 0,33. Se recristalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 195-196°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.11**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.18**.

EM: m/z (%), 428 (M^+ , 31); 410 (M^+H_2O , 5); 367 (35); 287 (63); 55 (100).

EMAR: Calculado para $C_{29}H_{48}O_2$, $M^+ = 428,3654$. Hallado 428,3658.

3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**) en un 54% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (1:1), $R_f = 0.43$. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 145-146°C (lit. 146-147°C)¹⁰.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.11**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.18**.

EM: m/z (%), 428 (M^+ , 32); 410 ($M^+ - H_2O$, 2); 286 (49); 55 (100).

b) Partiendo de 3 β -*t*-butildimetilsililoxiestigmast-22-en-6-ona (201**) (paso k, Esquema 2.1).**

Se colocaron 200 mg de 3 β -sililoxiestigmast-22-en-6-ona (**201**) en un balón de 25 ml, y se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro recién destilado. Seguidamente se agregaron 0,85 ml de fluoruro de tetrabutilamonio 0,1 M en tetrahidrofurano (almacenado sobre tamices moleculares). Se dejó reaccionando 4 horas con agitación, se evaporó el solvente y se extrajo con éter etílico. Se obtuvo la 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**197**) con rendimiento cuantitativo.

3 β -Tosiloxiestigmast-22-en-6-ona (190**) (paso e, Esquema 2.1).**

Se colocaron 260 mg de clorocromato de piridonio y 10 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 25 ml con agitación metido en un baño hielo/agua por el lapso de 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron 161 mg de 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (**205**) disueltos en 10 ml de cloruro de metileno recién destilado. Se dejó agitando en baño de hielo/agua 20 minutos más y luego se lo dejó reaccionando por 2 horas a temperatura ambiente. Se pasó por una columnita de sílicagel D y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (85:15) como solvente. Se obtuvo la 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6-ona (**190**) con un rendimiento del 82%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (20%), $R_f = 0,46$. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 180-181°C (lit 185-186°C)¹¹.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.11**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.18**.

EM: m/z (%), 410 ($M^+ - TsOH$, 11); 367 (6); 298 (7); 271 (12); 55 (100).

3 β -Mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (206) (paso l, Esquema 2.1):

Se colocaron 500 mg de 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (197) en un balón de 25 ml y se disolvieron en 5 ml de piridina. Se agregaron 0,2 ml de cloruro de metansulfonilo y se dejó reaccionando en oscuridad por 1 hora. Se virtió la reacción sobre una solución de ácido clorhídrico 5% a 0°C y se extrajo con cloruro de metileno. Se obtuvo cuantitativamente el 3 β -mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (206). Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (7:3), Rf= 0.43. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 148-149°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.11.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.18.**

EM: *m/z* (%), 506 (M⁺, 12); 463 (3); 410 (M⁺ - MsOH, 21); 394 (34); 367 (28); 271 (39); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₃₀H₅₀O₄S, M⁺ = 506,3430. Hallado 506,3424.

3 β -Acetoxiestigmast-22-en-6-ona (214) (Paso a, Esquema 4.1).

Se colocaron 500 mg de 3 β -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (197) en un balón de 25 ml y se disolvieron en 5 ml de piridina. Allí se agregaron 2,5 ml de anhídrido acético y se dejó reaccionando en oscuridad toda la noche. Se virtió sobre una solución de ácido clorhídrico 5% a 0°C y se extrajo con cloruro de metileno. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo (9:1) como solvente, obteniéndose 3 β -acetoxiestigmast-22-en-6-ona (214) con un rendimiento del 100%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (15%), Rf= 0,41. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 146-147°C (lit. 146-147°C)^{12,13}.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.11.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.18.**

EM: *m/z* (%), 470 (M⁺, 20); 427 (3); 410 (M⁺- AcOH, 3); 367 (16); 358 (23); 271 (20); 43 (100).

3 α -Hidroxiestigmast-22-en-6-ona (215) (paso d, Esquema 4.1).

Se colocaron 439 mg de 3 β -mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (206) en un balón de 250 ml y se suspendieron en 48 ml de dimetilformamida. Se agregaron 14 ml de agua y 3 ml de una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se colocó el balón con agitación a 110°C por 2,5 horas. Se evaporó el solvente, se tomó el residuo con cloruro de metileno y se lavó con agua. El extracto se secó y evaporó el solvente. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (4:1) y luego hexano/acetato de etilo (3:2) como solventes. Se obtuvieron los siguientes compuestos:

3 β -mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (206) sin reaccionar, recuperada en un 6%.

estigmasta-2,22-dien-6-ona (179) en un 9% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (96:4), R_f= 0,45. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 117-118°C (lit. 114-115°C)¹⁴.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.13.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.20.

EM: *m/z* (%), 410 (M⁺, 32); 395 (19); 382 (5); 367 (9); 271 (13); 69 (100).

estigmasta-3,22-dien-6-ona (177) en un 31% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (96:4), R_f= 0,39. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 101-102°C (lit. 117-119°C)¹⁵.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.13.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.20.

EM: *m/z* (%), 410 (M⁺, 28); 395 (4); 367 (11); 298 (14); 271 (18); 55 (100).

3 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (215) en un 33% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (1:1), R_f= 0,46. Se recrystalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 192-194°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.11.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.18.

EM: *m/z* (%), 428 (M⁺, 32); 410 (M⁺-H₂O, 2); 286 (49); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₂₉H₄₈O₂, M⁺ = 428,3654. Hallado 428,3657.

3 β -Bromoestigmast-22-en-6-ona (217):

a) Partiendo de 3 β -mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (206) (paso g, Esquema 4.1).

Se colocaron 635 mg de 3 β -mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (206) en un balón de 100 ml y se agitó hasta disolución total en 50 ml de metanol o etanol. Se agregaron 715 mg de bromuro de litio y se mantuvo a reflujo por 6 hs. Transcurrido ese lapso se eliminó el solvente por evaporación, se retomó con cloruro de metileno y se lavó el extracto con agua destilada. Se secó con sulfato de sodio y se evaporó el solvente para obtener una mezcla de productos 3 α y 3 β -bromados en proporción 1:2. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando cloruro de metileno como solvente, obteniéndose los siguientes compuestos.

3 β -bromoestigmast-22-en-6-ona (217) con un rendimiento del 64%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (96:4), R_f= 0,50. Se recrystalizó de metanol obteniéndose un producto blanco de p.f. 140-141°C (lit. 143-145°C)¹⁶.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.11.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.18.

EM: m/z (%), 492 (M^+ , ^{81}Br , 5); 490 (M^+ , ^{79}Br , 5); 410 (M^+ - Br, 1); 449 (4); 351 (12); 55 (100).

3 α -bromoestigmast-22-en-6-ona (216) con un rendimiento del 30%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (96:4), $R_f = 0,55$.

RMN- ^1H : ver **Capítulo 5, Tabla 5.11**.

b) Partiendo de 3 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (215) (paso e, Esquema 4.1).

En un balón de 100 ml se disolvieron 1,75 g de tetrabromuro de carbono y 1,37 g de trifenilfosfina, en 20 ml de cloroformo. Se dejó la mezcla con agitación 30 minutos y sobre ella se agregó una solución de 364 mg de 3 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (215) en 20 ml de cloroformo. Se dejó reaccionando por el lapso de 3 hs, posteriormente la mezcla se pasó por una columna de sílica Davison utilizando hexano como solvente. Se obtuvo la 3 β -bromoestigmast-22-en-6-ona (217) con un 83 % de rendimiento.

Estigmasta-2,22-dien-6-ona (179) (paso f y m, Esquema 2.1).

Se colocaron 366 mg del 3 β -mesiloxiestigmast-22-en-6-ona (206) o 421 mg de 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6-ona (190) en un balón de 25 ml, y se disolvieron en 5 ml de dimetilformamida. Se agregaron 224 mg de bromuro de litio y se colocó el balón con agitación en un baño de aceite a reflujo por el lapso de 1 hora. Se dejó enfriar, se evaporó el solvente y se extrajo con cloruro de metileno. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (3%) como solvente, obteniéndose los siguientes productos:

estigmasta-2,22-dien-6-ona (179) con un rendimiento del 72%.

estigmasta-3,22-dien-6-ona (177) con un 3% de rendimiento.

estigmasta-4,22-dien-6-ona (178) en un 11% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (8%), $R_f = 0,38$. Se recristalizó de metanol obteniéndose un producto blanco de p.f. 133-134°C (lit. 133-135°C)¹⁴.

RMN- ^1H : ver **Capítulo 5, Tabla 5.13**.

RMN- ^{13}C : ver **Capítulo 5, Tabla 5.20**.

EM: m/z (%), 410 (M^+ , 5); 395 (2); 367 (4); 298 (6); 271 (10); 55 (100).

(22R,23R,24S)-24-Etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (12) y (22S,23S, 24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (55) (paso x, Esquema 2.1):

Se colocaron 768 mg de estigmasta-2,22-dien-6-ona (179) en un balón de 100 ml, y se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se agitó hasta disolución y se

agregaron 40 ml de una mezcla de *t*-butanol/ agua (1:1). Una vez homogeneizada la solución se agregaron 291,8 mg de (DHQD)₂-PHAL, 712,7 mg de metansulfonamida, 3,7 g de ferricianuro de potasio, 1,55 g de carbonato de potasio y 34,5 mg de osmato de potasio dihidrato. Se dejó reaccionar a una temperatura no inferior a los 25°C, por 10 días y se finalizó la reacción agregando bisulfito de potasio hasta que cesó el desprendimiento de burbujas. La reacción se dejó en esas condiciones por 1 hora y se procedió a la purificación. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo varias veces con una mezcla cloruro de metileno/metanol (5%). Se juntaron todas las fases orgánicas y se lavó primero con ácido sulfúrico 0,25 M, y luego con hidróxido de sodio 2%. Se purificó por medio de columna de sílica flash utilizando un gradiente de solventes que iban desde de cloruro de metileno/acetonitrilo (25%) hasta cloruro de metileno/acetonitrilo (70%). Se obtuvieron los siguientes productos:

2 α ,3 α -dihidroxiestigmast-22-en-6-ona (**207**) en un 30% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (3:2), R_f= 0,41. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 199-201°C (lit. 234-236°C (d))¹⁷.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.12**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.19**.

(22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (**55**) en un 17% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (2:3), R_f= 0,63. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 203-205°C (lit. 206-208°C)¹⁷.

$[\alpha]_D^{20}$ -7,8° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.2**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3**.

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₁O₅ [M+H]⁺ = 479,3737. Hallado 479,3730.

(22R,23R,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -colestano-6-ona (**12**) en un 34% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (2:3), R_f= 0,51. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 246-248°C (lit. 251-253°C)¹⁷.

$[\alpha]_D^{20}$ -4,0° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.1**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3**.

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₁O₅ [M+H]⁺ = 479,3737. Hallado 479,3746.

(22R,23R,24S)-24-Etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (161)
y (22S,23S,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (162)
(paso b, Esquema 4.1).

Se colocaron 760 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-en-6-ona (214) en un balón de 100 ml, y se disolvieron en 8 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se agitó hasta disolución y se agregaron 32 ml de una mezcla de *t*-butanol/ agua (1:1). Una vez homogeneizada la solución se agregaron 252 mg de (DHQD)₂-PHAL, 308 mg de metansulfonamida, 1,60 g de ferricianuro de potasio, 672 mg de carbonato de potasio y 29,75 mg de osmato de potasio dihidrato. Se dejó reaccionar a una temperatura no inferior a los 25°C, por 9 días y se finalizó la reacción agregando bisulfito de potasio hasta que cesó el desprendimiento de burbujas. La reacción se dejó en esas condiciones por 1 hora y se procedió a la purificación. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo varias veces con una mezcla cloruro de metileno/metanol (5%). Se juntaron todas las fases orgánicas y se lavó, primero con ácido sulfúrico 0,25 M, y luego con hidróxido de sodio 2%. Se purificó por medio de una columna de sílica flash con un gradiente de solventes que iban desde cloruro de metileno/acetonitrilo (10%) hasta cloruro de metileno/acetonitrilo (25%), obteniéndose los siguientes compuestos:

3 β -acetoxiestigmast-22-en-6-ona (214) se recupera con un rendimiento del 46%.

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (162) con un rendimiento del 16,8%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (9:1), R_f= 0,48. Se recristalizó metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 173-174°C.

$[\alpha]_D^{20}$ -19,1° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.2.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₃₁H₅₃O₅ [M+H]⁺ = 505,3893. Hallado 505,3899.

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -acetoxi-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (161) con un rendimiento del 22,3%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (3:1), R_f= 0,55. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 274-275°C (d).

$[\alpha]_D^{20}$ -19,3° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.1.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₃₁H₅₃O₅ [M+H]⁺ = 505,3893. Hallado 505,3902.

(22R,23R,24S)-24-Etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-24-5 α -colestano-6-ona (159) y de (22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (160) (paso f, Esquema 4.1).

Se colocaron 850 mg de 3 β -bromoestigmast-22-en-6-ona (217) en un balón de 100 ml, y se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se agitó hasta disolución y se agregaron 40 ml de una mezcla de *t*-butanol/ agua (1:1). Una vez homogeneizada la solución se adicionaron 262 mg de (DHQD)₂-PHAL, 320 mg de metansulfonamida, 1,66 g de ferricianuro de potasio, 697 mg de carbonato de potasio y 30,91 mg de osmato de potasio dihidrato. Se dejó reaccionar a una temperatura no inferior a los 25°C, por 9 días y se finalizó la reacción agregando bisulfito de potasio hasta que cesó el desprendimiento de burbujas. La reacción se dejó en esas condiciones por 1 hora y se procedió a la purificación. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo varias veces con una mezcla cloruro de metileno/metanol (5%). Se juntaron todas las fases orgánicas y se lavó primero con ácido sulfúrico 0,25 M, y luego con hidróxido de sodio 2%. Se purificó por medio de una columna de sílica flash con un gradiente de solventes que iban desde cloruro de metileno/acetonitrilo (2%) hasta cloruro de metileno/acetonitrilo (20%), obteniéndose los siguientes compuestos:

3 β -bromoestigmasta-22-en-6-ona (217) se recupera con un rendimiento del 21,6%.

(22S,23S,24S)-24-etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (160) con un rendimiento del 17,1%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (95:5), R_f = 0,56. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p. f. 128-130°C.

$[\alpha]_D^{20}$ -9,7° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.2.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₀O₃Br [M+H]⁺ = 525,2943. Hallado 525,2951.

(22R,23R,24S)-24-etil-3 β -bromo-22,23-dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (159) con un rendimiento del 18,3%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (4:1). R_f = 0,58. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p. f. 193-194°C.

$[\alpha]_D^{20}$ -5,2° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.1.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₀O₃Br [M+H]⁺ = 525,2943. Hallado 525,2947.

7.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE CASTASTERONA 5 α -HIDROXILADOS (Esquema 4.2).

3 β -Tosiloxiestigmast-22-eno (169) (paso a, Esquema 4.2).

Se colocaron 8,0 g de estigmasterol (136) en un balón de 300 ml y se agregaron 110 ml de piridina seca. Luego de completada la disolución se agregaron 9,6 g de cloruro de *p*-toluensulfonilo. La mezcla se protegió de la luz y se dejó con agitación toda la noche, al cabo de lo cual se vertió sobre una mezcla hielo/HCl 5% contenida en un vaso de precipitados de 500 ml. Se dejó cristalizando 24 hs y, se filtró y se lavó con HCl 5% y agua, obteniéndose el 3 β -tosiloxiestigmast-22-eno (169) con rendimiento cuantitativo. Solvente para CCD: hexano/cloruro de metileno (7:3), R_f= 0,47. Se utilizó acetona como solvente de recristalización obteniéndose un producto blanco de p. f. 145-146°C (lit. 147-148°C)¹⁸.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.7.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.15.

3 β -Acetoxiestigmast-22-eno (191) (paso i, Esquema 4.2).

Se colocaron 10,0 g de estigmasterol (136) en un balón de 300 ml y se agregaron 200 ml de piridina seca. Luego de completada la disolución se adicionaron 100 ml anhídrido acético. La mezcla se protegió de la luz y se dejó con agitación toda la noche, al cabo de lo cual se volcó sobre una mezcla hielo/HCl 5% contenida en un vaso de precipitados de 500 ml. Se dejó cristalizando toda la noche y, se filtró y se lavó con HCl 5% y agua, obteniéndose el 3 β -acetiloxiestigmast-22-eno (191) con rendimiento cuantitativo. Solvente para CCD: hexano/cloruro de metileno (7:3), R_f= 0,50. Se recristalizó de metanol obteniéndose un producto blanco de p. f. 141-142°C (lit. 141-142°C)^{1,2}.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.7.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.15.

3 β -Tosiloxi-5,6-epoxiestigmast-22-eno (170 y 173) (paso b, Esquema 4.2).

Técnica a) Se colocaron 800 mg de 3 β -tosiloxiestigmast-22-eno (169) en un balón de 500 ml sumergido en un baño a -78°C (acetona/hielo seco), y se agregaron, manteniendo agitación, 250 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, una solución de 344 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico disueltos en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de terminado el agregado se retiró del baño y se permitió reaccionar con agitación durante 24 hs más. Pasado este período se lavó hasta neutralidad con una solución saturada de bicarbonato de sodio. La solución se secó con sulfato de

sodio, y se eliminó el solvente. Se obtuvo una mezcla de 5 α ,6 α y 5 β ,6 β -epóxidos en proporción 5:1 que se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/hexano (3:2) como solvente, obteniéndose las siguientes fracciones:

3 β -tosiloxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (**173**) con un rendimiento del 65 %. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0,40. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p. f. 171-173°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.9**.

EM: *m/z* (%): 410 (M⁺- TsOH, 12); 392 (11); 367 (5); 298 (6); 271 (9); 55 (100).

3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**170**) con un rendimiento del 15 %. Solvente para CCD: hexano/cloruro de metileno (3:7), R_f= 0,55. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p. f. 96°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16**.

EM: *m/z* (%): 410 (M⁺- TsOH, 4); 392 (8); 367 (2); 298 (3); 271 (6); 55 (100).

Técnica b) Se molieron en un mortero 1,10 g de permanganato de potasio y 500 mg de sulfato de cobre, hasta lograr una mezcla uniforme. Se agregaron 55 μ l de agua y se continuó la molienda.

Por otra parte se disolvieron 300 mg de 3 β -tosiloxiestigmast-22-eno (**169**) en 5,5 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 50 ml, al cual se agregó con agitación el contenido del mortero. Se permitió homogeneizar la suspensión y se agregaron 0,55 ml de *t*-butanol. Se dejó reaccionar 4 hs y se filtró a través de un lecho de celite. Se obtuvo 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**170**) en un rendimiento del 27 %.

Técnica c) Se disolvieron 500 mg de trióxido de cromo en 2,0 ml de ácido acético o en 1,5 ml de una mezcla (1:1) de anhídrido acético y ácido acético, y se permitió la disolución con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Por otra parte se disolvieron 566 mg de 3 β -tosiloxiestigmast-22-eno (**169**) en 150 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 300 ml, que posteriormente fue sumergido en un baño a -78°C (hielo seco/acetona). Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, la solución de trióxido de cromo diluida en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Al finalizar el agregado se dejó reaccionar 20 minutos y se virtió el contenido del balón en un vaso de precipitados de 500 ml conteniendo una solución de hidróxido de sodio al 10%. Posteriormente se extrajo con cloruro de metileno. Se procedió a purificar por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/cloruro de metileno (3:7) como solvente, obteniéndose las siguientes fracciones:

3 β -tosiloxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (**173**) en un 3% de rendimiento.

3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**170**) en un 65% de rendimiento.

3 β -tosiloxiestigmasta-5,22-dien-7-ona (**172**) en un 28% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/cloruro de metileno (3:7), R_f= 0,38. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto de p. f. 121°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.14**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.21**.

EM: *m/z* (%), 408 (M⁺- TsOH, 13); 365 (3); 269 (17); 172 (66); 55 (100).

3 β -Acetoxi-5,6-epoxiestigmast-22-eno (184** y **193**) (paso j, Esquema 4.2).**

Técnica a) Se colocaron 800 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-eno (**191**) en un balón de 500 ml sumergido en un baño a -78°C (acetona/hielo seco), y se agregaron, manteniendo agitación, 250 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, una solución de 429 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico disueltos en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego de terminado el agregado se retiró del baño y se permitió reaccionar con agitación durante 24 hs más. Pasado este período se lavó hasta neutralidad con una solución saturada de bicarbonato de sodio. La solución se secó, y se eliminó el solvente para obtener una mezcla de 5 α ,6 α y 5 β ,6 β -epóxidos en proporción 5:1 que se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/hexano (4:1) como solvente, obteniéndose las siguientes fracciones:

3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (**193**) con un rendimiento del 58 %. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0,50. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p. f. 192-193°C³⁻⁵

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.9**.

3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**) con un rendimiento del 12 %. Solvente para CCD: Hexano/Acetato de etilo (9:1), R_f= 0.35. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto de p. f. 138-139°C (lit. 139-140°C)⁵.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16**.

Técnica b) Se molieron en un mortero 1,35 g de permanganato de potasio y 680 mg de sulfato de cobre, hasta lograr una mezcla uniforme. Se agregaron 70 μ l de agua y se continuó la molienda.

Por otra parte se disolvieron 300 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-eno (**191**) en 7,0 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 50 ml, a la cual se agregó con agitación el contenido del mortero. Se permitió homogeneizar la suspensión y se agregaron

0,7 ml de *t*-butanol. Se dejó reaccionar 4 hs y se filtró a través de un lecho de celite. El rendimiento de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**) fue del 70 %.

Técnica c) Se disolvieron 500 mg de trióxido de cromo en 2,0 ml de ácido acético o en 1,5 ml de una mezcla (1:1) de anhídrido acético y ácido acético, y se permitió la disolución con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Por otra parte, se disolvieron 454 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-eno (**191**) en 150 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 300 ml, que posteriormente fue sumergido en un baño a -78°C (hielo seco/acetona). Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, la solución de trióxido de cromo diluida en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Al finalizar el agregado se dejó reaccionar 20 minutos y se virtió el contenido del balón a un vaso de precipitados de 500 ml con una solución de hidróxido de sodio al 10%. Posteriormente se extrajo con cloruro de metileno. Se procedió a purificar por medio de una columna de sílica flash con hexano/acetato de etilo (9:1) como solvente obteniéndose las siguientes fracciones:

3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (**193**) en un 10% de rendimiento.

3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**184**) en un 70% de rendimiento.

3 β -acetiloxiestigmasta-5,22-dien-7-ona (**192**) en un 15% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,45. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p. f. 186-187°C (lit. 185°C)⁶.

EM: *m/z* (%), 468 (M⁺, 1); 408 (M⁺- AcOH, 12); 296 (10); 269 (10); 83 (100).

3 β -Tosiloxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (208) (paso c, Esquema 4.2).

Se disolvieron 500 mg de 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**170**) en 60 ml de dioxano, con agitación en un balón de 300 ml. Luego de completada la disolución se agregaron 15 ml de agua y 10 ml de ácido perclórico 70%. Se permitió reaccionar por el espacio de 2 hs se neutralizó cuidadosamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se llevó a sequedad y se extrajo con cloruro de metileno, lavando varias veces con agua. Se purificó por columna de sílica flash con hexano/acetato de etilo (4:1) como solvente, obteniéndose el 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (**208**) con un rendimiento del 94%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,25. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 142-143°C (d).

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.10.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.17.**

EM: *m/z* (%), 428 (M⁺- TsOH, 3); 410 (17); 392 (41); 43 (100).

3 β -Acetoxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (219) (paso k, Esquema 4.2).

Se disolvieron 500 mg de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (184) en 70 ml de dioxano, con agitación en un balón de 300 ml. Luego de completada la disolución se agregaron 17 ml de agua y 6 ml de ácido perclórico. Se permitió reaccionar por el espacio de 2 hs, se neutralizó cuidadosamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se llevó a sequedad y se extrajo con cloruro de metileno, lavando varias veces con agua. Se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (3:2) como solvente, obteniéndose el 3 β -acetoxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (219) con un rendimiento del 90%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,20. Se recrystalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 237-238°C¹⁹.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.10.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.17.

EM: *m/z* (%), 488 (M⁺,3); 470 (M⁺-H₂O, 2); 410 (7); 367 (6); 271 (9); 253 (30); 55 (100).

3 β -Tosiloxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (174) (paso d, Esquema 4.2).

Se colocó un balón de 100 ml en un de baño hielo agua y en él se suspendieron 231 mg de clorocromato de piridonio en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego se agregaron, a esta suspensión, 300 mg de 3 β -tosiloxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (208) disueltos en 10 ml de cloruro de metileno recién destilados. Transcurridos 20 minutos se retiró el baño de hielo y se permitió reaccionar con agitación por 4 hs más a temperatura ambiente. Pasado ese lapso de tiempo se filtró la suspensión a través de una columna de silicagel D y se evaporó el solvente. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo 18% como solvente, obteniéndose el 3 β -tosiloxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (174) con un rendimiento del 94%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,43. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 88-90°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.12.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.19.

EM: *m/z* (%), 426 (M⁺- TsOH, 2); 408 (8); 392 (2); 43 (100).

3 β -Acetoxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (220) (Paso l, Esquema 4.2).

Se colocó un balón de 100 ml en un baño hielo/agua y en él se suspendieron 170 mg de clorocromato de piridonio en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Luego se agregaron, a esta suspensión, 300 mg de 3 β -acetoxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (219) disueltos en 10 ml de cloruro de metileno recién destilados. Transcurridos 20 minutos se retiró el baño de hielo y se permitió reaccionar con agitación por 4 hs más a temperatura

ambiente. Pasado ese lapso de tiempo se filtró la suspensión a través de una columna de silicagel D y se evaporó el solvente. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo 20% como solvente, obteniéndose el 3 β -acetoxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**220**) con un rendimiento del 82%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (15%), R_f= 0,27. Se recrystalizó de acetona/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 253-254°C⁵.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.12**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.19**.

EM: *m/z* (%), 486 (M⁺, 3); 426 (3); 408 (4); 365 (13); 269 (14); 55 (100).

3 β -Bromo-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (218) (paso g, Esquema 4.2).

Se colocaron 750 mg de 3 β -tosiloxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**174**) en un balón de 100 ml y se agitó hasta disolución total en 50 ml de acetona. Se agregaron 715 mg de bromuro de litio y se calentó a reflujo por 6 hs. Transcurrido ese lapso se eliminó el solvente, se retomó con cloruro de metileno y se lavó con agua destilada. Se secó con sulfato de sodio y se eliminó el solvente para obtener una mezcla de productos 3 α y 3 β -bromados en proporción 2,3:1. Se purificó por columna de sílica flash con cloruro de metileno como solvente obteniéndose el 3 β -bromo-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**218**) con un rendimiento del 54%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0,47. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 200-201°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.12**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.19**.

EM: *m/z* (%), 508 (M⁺, ⁸¹Br, 2); 506 (M⁺, ⁷⁹Br, 2); 427 (1); 43 (100).

EMAR: Calculado para C₂₉H₄₇BrO₂, M⁺ = 506,2759. Hallado 506,2754.

5 α -Hidroxiestigmasta-2,22-dien-6-ona (209) (paso e, Esquema 4.2).

Se disolvieron 500 mg de 3 β -tosiloxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**174**) en un balón de 250 ml, con 100 ml de acetona. A la mezcla se agregaron 350 mg de ioduro de potasio y se reflujo con agitación durante 2 hs. Se detuvo el calentamiento, se evaporó la acetona y se agregó dimetilsulfóxido hasta disolución (aprox. 20 ml). A esa nueva solución se agregaron 700 mg de carbonato de litio y se la colocó, con agitación, en un baño de aceite a 120°C por dos horas. Se retiró del baño, se dejó enfriar y se evaporó el solvente. Se extrajo con éter etílico y se purificó por medio de una columna de sílica flash usando una mezcla hexano/acetato de etilo (13%) como solvente, obteniéndose la 5 α -hidroxiestigmasta-2,22-dien-6-ona (**209**) con un rendimiento del 74%. Solvente para

CCD: hexano/ acetato de etilo (13%), Rf= 0,40. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 154-155°C²⁰.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.13.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.20.

EM: *m/z* (%), 426 (M⁺, 10); 408 (3); 83 (23); 55 (100).

(22R,23R,24S)-24-Etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestan-6-ona (163) y de **(22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23**-pentahidroxi-5 α -colestan-6-ona (164) (paso f, Esquema 4.2)

Se colocaron 700 mg de 5 α -hidroxiestigmasta-2,22-dien-6-ona (209) en un balón de 100 ml, y se disolvieron en 14 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se agitó hasta disolución y se agregaron 40 ml de una mezcla de *t*-butanol/agua (1:1). Una vez homogeneizada la solución se adicionaron 256,2 mg de (DHQD)₂-PHAL, 625,2 mg de metansulfonamida, 3,25 g de ferricianuro de potasio, 1,40 mg de carbonato de potasio y 30,2 mg de osmato de potasio dihidrato. Se dejó reaccionar a una temperatura no inferior a los 25°C, por 9 días y se finalizó agregando bisulfito de potasio hasta que cesó el desprendimiento de burbujas. La reacción se dejó en esas condiciones por 1 hora y se procedió a la purificación. Se separaron las fases, en una ampolla de decantación y la fase acuosa se extrajo varias veces con una mezcla cloruro de metileno/metanol (5%). Se juntaron todas las fases orgánicas y se lavó primero con ácido sulfúrico 0,25 M, y luego con hidróxido de sodio 2%. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando un gradiente de solventes que va desde cloruro de metileno/acetonitrilo (30%) hasta cloruro de metileno/acetonitrilo (70%). Se obtuvieron los siguientes productos:

2 α ,3 α ,5 α -trihidroxiestigmasta-22-en-6-ona (213) en un 24% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (3:2), Rf= 0,48. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 207-208°C²⁰.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.12.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.19.

EMAR: Calculado para C₂₉H₄₉O₄ [M+H]⁺ = 461,3539. Hallado 461,3545.

(22S,23S,24S)-24-etil-2 α ,3 α ,5,22,23-pentahidroxi-5 α -colestan-6-ona (164) en un 5,3% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (2:3), Rf= 0,76. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 254°C (d).

$[\alpha]_D^{20}$ -13,7° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.2.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₁O₆ [M+H]⁺ = 495,3686. Hallado 495,3679.

(22R,23R,24S)-24-etil-2α,3α,5,22,23-pentahidroxi-5α-colestan-6-ona (**163**) en un 12,6% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetoneitrilo (2:3), Rf= 0,64. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 241-244°C.

$[\alpha]_D^{20}$ -45,0° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.1.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₁O₆ [M+H]⁺ = 495,3686. Hallado 495,3678.

(22R,23R,24S)-24-Etil-3β-acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (167) y de (22S,23S,24S)-24-etil-3β-acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (168) (paso m, Esquema 4.2).

Se colocaron 735 mg de 3β-acetoxi-5α-hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**220**) en un balón de 100 ml, y se disolvieron en 7 ml de tetrahydrofurano recién destilado. Se agitó hasta disolución y se agregaron 42 ml de una mezcla de *t*-butanol/agua (1:1). Una vez homogeneizada la solución se adicionaron 236 mg de (DHQD)₂-PHAL, 288 mg de metansulfonamida, 1,5 g de ferricianuro de potasio, 627 mg de carbonato de potasio y 27,83 mg de osmato de potasio dihidrato. Se dejó reaccionar a una temperatura no inferior a los 25°C, por 10 días y se finalizó agregando bisulfito de potasio hasta que cesó el desprendimiento de burbujas. La reacción se dejó en esas condiciones por 1 hora y se procedió a la purificación. Se separaron las fases en una ampolla de decantación, y la fase acuosa se extrajo varias veces con una mezcla cloruro de metileno/metanol (5%). Se juntaron todas las fases orgánicas y se lavó con ácido sulfúrico 0,25 M y hidróxido de sodio 2%. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando un gradiente de solventes que iba desde cloruro de metileno/acetoneitrilo (7%) hasta cloruro de metileno/acetoneitrilo (40%). Se obtuvieron los siguientes compuestos:

3β-acetoxi-5α-hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**220**) sin reaccionar recuperado en un 64%.

(22S,23S,24S)-24-etil-3β-acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (**168**) con un rendimiento del 9%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetoneitrilo (25%), Rf= 0,7. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 197-199°C.

$[\alpha]_D^{20}$ -42,8° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.2.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₃₁H₅₃O₆ [M+H]⁺ = 521,3842. Hallado 521,3849.

(22R,23R,24S)-24-etil-3β-acetoxi-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (**167**) con un rendimiento del 12%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (25%), R_f = 0,56. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 274-275°C (d).

$[\alpha]_D^{20}$ -23,2° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.1.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₃₁H₅₃O₆ [M+H]⁺ = 521,3842. Hallado 521,3839.

(22R,23R,24S)-24-Etil-3β-bromo-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (165) y de (22S,23S,24S)-24-etil-3β-bromo-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (166) (paso h, Esquema 4.2).

Se colocaron 816 mg de 3β-bromo-5α-hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**218**) en un balón de 100 ml, y se disolvieron en 12 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se agitó hasta disolución y se agregaron 36 ml de una mezcla de *t*-butanol/agua (1:1). Una vez homogeneizada la solución se adicionaron 251 mg de (DHQD)₂-PHAL, 307 mg de metansulfonamida, 1,6 g de ferricianuro de potasio, 669 mg de carbonato de potasio y 29,67 mg de osmato de potasio dihidrato. Se dejó reaccionar a una temperatura no inferior a los 25°C, por 10 días y se finalizó agregando bisulfito de potasio hasta que cesó el desprendimiento de burbujas. La reacción se dejó en esas condiciones por 1 hora y se procedió a la purificación. Se separaron las fases, en una ampolla de decantación y la fase acuosa se extrajo varias veces con una mezcla cloruro de metileno. Se juntaron todas las fases orgánicas y se lavó primero con ácido sulfúrico 0,25 M, y luego con hidróxido de sodio 2%. Se purificó por medio de una columna de sílica flash utilizando un gradiente de solventes que iba desde cloruro de metileno/acetonitrilo (10%) hasta cloruro de metileno/acetonitrilo (25%). Se obtuvieron los siguientes compuestos:

3β-bromo-5α-hidroxiestigmastan-22-en-6-ona (**218**) sin reaccionar recuperado en un 61%.

(22S,23S,24S)-24-etil-3β-bromo-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (**166**) con un rendimiento del 19,5%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetonitrilo (25%), R_f = 0,80. Se recristalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 132-133°C.

$[\alpha]_D^{20}$ -25,8° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.2.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₂₉H₅₀O₄Br [M+H]⁺, *m/z* = 541,2892. Hallado 541,2885.

(22R,23R,24S)-24-etil-3β-bromo-5,22,23-trihidroxi-5α-colestan-6-ona (**165**) con un rendimiento del 18,7%. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetoneitrilo (25%), R_f = 0,45. Se recrystalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 205°C (d).

[α]_D²⁰ -29,3° (c 1.0 en Cl₃CH)

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.1.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.3.**

EMAR: Calculado para C₃₁H₅₃O₆ [M+H]⁺ = 541,2892. Hallado 541,2891.

7.4. SÍNTESIS DE COMPUESTOS UTILIZADOS PARA COMPLETAR DATOS DE LAS TABLAS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

7.4.1. COMPUESTOS BROMADOS.

3α y 3β-Bromoestigmast-22-eno (**221**, **222**) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

En un balón de 100 ml se disolvieron 1,6 g de tetrabromuro de carbono y 1,2 g de trifenilfosfina, en 10 ml de cloroformo. Se dejó la mezcla con agitación 30 minutos y sobre ella se agregó una solución de 320 mg de estigmasterol (**136**) en 20 ml de cloroformo. Se dejó reaccionando por el lapso de 4 hs y se pasó la mezcla a través de una columna de sílica Davison utilizando hexano como solvente. Se obtuvo una mezcla de productos 3α y 3β-bromados en proporción 1:8 que posteriormente se purificó por placa preparativa utilizando hexano como solvente, obteniéndose los siguientes compuestos:

3α-bromoestigmast-22-eno (**221**) con un rendimiento del 8%. Solvente para CCD: hexano, R_f = 0,70. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 90°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.7.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.15.**

EM: *m/z* (%), 476 (M⁺, ⁸¹Br, 2); , 474 (M⁺, ⁷⁹Br, 2); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₂₉H₄₇Br, M⁺ = 474,2861. Hallado 474,2862.

3β-bromoestigmast-22-eno (**222**) con un rendimiento del 72%. Solvente para CCD: hexano, R_f = 0,60. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 100-101°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.7.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.15.**

EM: *m/z* (%), 476 (M⁺, ⁸¹Br, 3); , 474 (M⁺, ⁷⁹Br, 3); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₂₉H₄₇Br, M⁺ = 474,2861. Hallado 474,2862 .

3α y 3β-Bromo-5β,6β-epoxiestigmast-22-eno (182, 183) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

Se disolvieron 935 mg de trióxido de cromo en 2,0 ml de ácido acético o en 1,5 ml de una mezcla (1:1) de anhídrido acético y ácido acético, y se permitió la disolución con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Por otra parte se disolvieron 642 mg de una mezcla (1:9) de 3α y 3β-bromoestigmast-22-eno (221 y 222) en 150 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 300 ml, que posteriormente fue sumergido en un baño a -78°C (hielo seco/acetona). Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, la solución de trióxido de cromo diluida en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Al finalizar el agregado se dejó reaccionar 20 minutos y se virtió el contenido del balón a un vaso de precipitados de 500 ml con una solución de hidróxido de sodio al 10%. Posteriormente se extrajo con cloruro de metileno y se procedió a purificar por columna de sílica flash utilizando cloruro de metileno/hexano (3:7) y cloruro de metileno/hexano (1:1) como solventes, obteniéndose los siguientes compuestos:

3β-bromo-5β,6β-epoxiestigmast-22-eno (182) con un 68% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetato de etilo (1:1), R_f = 0,80. Se recristalizó de acetona obteniéndose un producto blanco de p.f. 93-94°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16.**

EM: *m/z* (%), 492 (M⁺, ⁸¹Br, 4); , 490 (M⁺, ⁷⁹Br, 4); 411 (4); 269 (9); 55 (100).

Análisis para C₂₉H₄₇BrO calculado: C (70,98%), H (9,66%); hallado: C (71,02%), H (9,75%).

3α-bromo-5β,6β-epoxiestigmast-22-eno (183) con un 8% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetato de etilo (1:1), R_f = 0,60. Se recristalizó de acetona obteniéndose un producto blanco de p.f. 131-132°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16.**

EM: *m/z* (%), 492 (M⁺, ⁸¹Br, 5); , 490 (M⁺, ⁷⁹Br, 5); 411 (2); 55 (100).

Análisis para C₂₉H₄₇BrO calculado: C (70,98%), H (9,66%); hallado: C (70,98%), H (9,81%).

3 β -bromoestigmasta-5,22-dien-7-ona (**236**) con un 17% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (95:5), Rf= 0,43. Se recristalizó de metanol obteniéndose un producto blanco de p.f. de 136°C.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.21.

EM: *m/z* (%), 408 (M⁺- Br, 5); 269 (7); 83 (100).

3 α -bromoestigmasta-5,22-dien-7-ona (**238**) con un 4% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (95:5), Rf= 0,34. Se recristalizó de metanol obteniéndose un producto blanco de p.f. de 100-101°C.

EM: *m/z* (%), 408 (M⁺- Br, 8); 269 (15); 43 (100).

3 β -Bromoestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (**231**) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

Se disolvieron 500 mg de 3 β -bromo-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**183**) en 30 ml de tetrahidrofurano, con agitación en un balón de 100 ml. Luego de completada la disolución se agregaron 2,0 ml de ácido sulfúrico 1,5N y se permitió reaccionar a temperatura ambiente por el espacio de 18 hs. Se neutralizó cuidadosamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se llevó a sequedad y se extrajo con éter etílico. Se purificó por columna de sílica flash utilizando cloruro de metileno/hexano (7:3) y cloruro de metileno/hexano (4:1) como solventes, obteniéndose el 3 β -bromoestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (**231**) con un rendimiento del 35%. Solvente para CCD: cloruro de metileno, Rf= 0,30. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 121-122°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.10.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.17.

EM: *m/z* (%), 508 (M⁺, ⁸¹Br, 1); 510 (M⁺, ⁷⁹Br, 1); 429 (1); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₂₉H₄₉BrO₂, M⁺ = 508,2916. Hallado 508,2907.

7.4.2. COMPUESTOS CLORADOS.

3 α y 3 β -Cloroestigmast-22-eno (**223**, **224**) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

En un balón de 100 ml se mezclaron 3,1 g de trifenilfosfina y 24 ml de tetracloruro de carbono. Se dejó la mezcla con agitación 30 minutos y sobre ella se agregaron 824 mg de estigmasterol (**136**). Se dejó reaccionando a reflujo por el lapso de 3 hs y se pasó la mezcla por una columna de sílica Davison utilizando hexano como solvente. Se obtuvo una mezcla de productos 3 α y 3 β -clorados en proporción 1:1 que posteriormente se separaron en una placa preparativa utilizando hexano como solvente, obteniéndose los siguientes compuestos:

3 α -cloroestigmast-22-eno (**223**) con un rendimiento del 40%. Solvente para CCD: hexano, Rf= 0,38. Se recristalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 65-66°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.7**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.15**.

EM: *m/z* (%), 432 (M⁺, ³⁷Cl, 13); 430 (M⁺, ³⁵Cl, 34); 395 (M⁺-Cl, 2); 83 (100).

3 β -cloroestigmast-22-eno (**224**) con un rendimiento del 42%. Solvente para CCD: hexano, Rf= 0,53. Se recristalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 89-90°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.7**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.15**.

EM: *m/z* (%), 432 (M⁺, ³⁷Cl, 12); 430 (M⁺, ³⁵Cl, 35); 395 (M⁺-Cl, 3); 83 (100).

3 α y 3 β -Cloro-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**228, 229**) (**Figura 5.2 y Tabla 5.6**).

Se disolvieron 935 mg de trióxido de cromo en 2,0 ml de ácido acético o en 1,5 ml de una mezcla (1:1) de anhídrido acético y ácido acético, y se permitió la disolución con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Por otra parte se disolvieron 582 mg de una mezcla (1:1) de 3 α y 3 β -cloroestigmast-22-eno (**223 y 224**) en 150 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 300 ml, que posteriormente fue sumergido en un baño a -78°C (hielo seco/acetona). Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, la solución de trióxido de cromo diluida en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Al finalizar el agregado se dejó reaccionar 20 minutos y se virtió el contenido del balón a un vaso de precipitados de 500 ml conteniendo una solución de hidróxido de sodio 10%. Posteriormente se extrajo con cloruro de metileno. Se procedió a purificar por una columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/hexano (1:1) como solvente obteniéndose las siguientes fracciones:

3 β -cloro-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**229**) en un 37% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), Rf= 0,62. Se recristalizó de acetona/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 65-66°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16**.

EM: *m/z* (%), 448 (M⁺, ³⁷Cl, 16); 446 (M⁺, ³⁵Cl, 34); 411 (M⁺-Cl, 2); 83 (100).

3 α -cloro-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (**228**) en un 40% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), Rf= 0,79. Se recristalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 143-144°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16.**

EM: *m/z* (%), 448 (M⁺, ³⁷Cl, 5); 446 (M⁺, ³⁵Cl, 16); 411 (M⁺-Cl, 1); 55 (100).

3β-cloroestigmasta-5,22-dien-7-ona (**237**) en un 17% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0,65. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 148-150°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.14.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.21.**

EM: *m/z* (%), 446 (M⁺, ³⁷Cl, 47); 446 (M⁺, ³⁵Cl, 89); 409 (M⁺-Cl, 2); 55 (100).

3β-Cloroestigmast-22-en-5α,6β-diol (**232**) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

Se disolvieron 500 mg de 3β-cloro-5β,6β-epoxiestigmast-22-eno (**228**) en 30 ml de tetrahydrofurano, con agitación en un balón de 100 ml. Luego de completada la disolución se agregaron 2,0 ml de ácido sulfúrico 1,5N y se permitió reaccionar a temperatura ambiente por el espacio de 18 hs. Se neutralizó cuidadosamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se llevó a sequedad y se extrajo con éter etílico. Se purificó por columna de sílica flash con cloruro de metileno/hexano (7:3) como solvente de elución, obteniéndose el 3β-cloroestigmast-22-en-5α,6β-diol (**232**) con un rendimiento del 35%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,44. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 138-140°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.10.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.17.**

EM: *m/z* (%), 466 (M⁺, ³⁷Cl, 4); 464 (M⁺, ³⁵Cl, 41); 83 (100).

3β-Cloro-5α-hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**234**) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

Se colocaron 260 mg de clorocromato de piridonio en un balón de 25 ml, y se suspendieron en 10 ml de cloruro de metileno recién destilado. Se colocó el balón con agitación en un baño hielo/agua y se dejó así por el lapso de 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron 128 mg de 3β-cloroestigmast-22-en-5α,6β-diol (**232**) disueltos en 10 ml del mismo cloruro de metileno. Se dejó agitando y se retiró del baño de hielo/agua luego de los 20 minutos. Se dejó reaccionando por 2 horas. Se filtró por una columna de silicagel D, y se purificó por una columna de sílica flash utilizando cloruro de metileno como solvente. Se obtuvo la 3β-cloro-5α-hidroxiestigmast-22-en-6-ona (**234**) con un rendimiento del 75%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0,40. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 188-190°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.12.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.19.**

EM: *m/z* (%), 464 (M⁺, ³⁷Cl, 27); 462 (M⁺, ³⁵Cl, 80); 427 (M⁺-Cl, 4); 83 (100).

7.4.3. COMPUESTOS METOXILADOS.

3β-Metoxiestigmast-22-eno (225) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

En un balón de 100 ml se colocaron 130 mg de 3β-tosiloxiestigmast-22-eno (**169**) y se suspendieron en 20 ml de metanol. Se reflujo por 2 horas y se dejó enfriar. Se sometió el producto a una purificación por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/acetato de etilo (98:2) como solvente, obteniéndose el 3β-metoxiestigmast-22-eno (**225**) con un rendimiento del 80%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f = 0,69. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 117-119°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.7.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.15.**

3β-Metoxi-5β,6β-epoxiestigmast-22-eno (230) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

Se disolvieron 935 mg de trióxido de cromo en 2,0 ml de ácido acético o en 1,5 ml de una mezcla (1:1) de anhídrido acético y ácido acético, y se permitió la disolución con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Por otra parte se disolvieron 576 mg de 3β-metoxiestigmast-22-eno (**225**) en 150 ml de cloruro de metileno recién destilado, en un balón de 300 ml, que posteriormente fue sumergido en un baño a -78°C (hielo seco/acetona). Luego de completada la disolución se agregó lentamente (aprox. 2 ml/10 min), desde una ampolla compensadora, la solución de trióxido de cromo diluida en 25 ml de cloruro de metileno recién destilado. Al finalizar el agregado se dejó reaccionar 20 minutos y se vertió el contenido del balón a un vaso de precipitados de 500 ml con una solución de hidróxido de sodio 10%. Posteriormente se extrajo con cloruro de metileno. Se procedió a purificar por una columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/acetato de etilo (98:2), obteniéndose 3β-metoxi-5β,6β-epoxiestigmast-22-eno (**230**) en un 66% de rendimiento. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f = 0,35. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 138-140°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.8.**

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.16.**

3 β -Metoxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (233) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

Se disolvieron 500 mg de 3 β -metoxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (230) en 30 ml de tetrahidrofurano, con agitación en un balón de 100 ml. Luego de completada la disolución se agregó 2,0 ml de ácido sulfúrico 1,5 N y se permitió reaccionar a temperatura ambiente por el espacio de 18 hs. Se neutralizó cuidadosamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se llevó a sequedad y se extrajo con éter etílico. Se purificó por columna de sílica flash con cloruro de metileno/acetato de etilo (3:2) como solvente de elución, obteniéndose el 3 β -metoxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (233) con un rendimiento del 87%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (1:1), R_f= 0,734. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 175°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.10.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.17.

3 β -Metoxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (235) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

Se colocaron 260 mg de clorocromato de piridonio en un balón de 25 ml, y se suspendieron en 10 ml de cloruro de metileno recién destilado. Se colocó el balón con agitación en un baño hielo/agua y se dejó así por el lapso de 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron 128 mg de 3 β -metoxiestigmast-22-en-5 α ,6 β -diol (233) disueltos en 10 ml del mismo cloruro de metileno. Se dejó agitando, se retiró del baño de hielo/agua luego de los 20 minutos y se dejó reaccionando por 2 horas a temperatura ambiente. Se filtró por una columna de sílicagel D, y se purificó por una columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/acetato de etilo (3:2) como solvente. Se obtuvo la 3 β -metoxi-5 α -hidroxiestigmast-22-en-6-ona (235) con un rendimiento del 75%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (4:1), R_f= 0,27. Se recrystalizó de acetona, obteniéndose un producto blanco de p.f. 136°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.12.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.19.

7.4.4. COMPUESTOS FORMILADOS.**3 α -Formiloxiestigmast-22-eno (226) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).**

En un balón de 25 ml se colocaron 500 mg de 3 β -tosiloxiestigmast-22-eno (169) y 15 ml de dimetilformamida. Se agregaron 50 mg de carbonato de litio y se refluxó por espacio de 3 horas. Se evaporó el solvente se tomó con cloruro de metileno y se lavó con agua. Se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de

metileno/hexano (4:1) como solvente, obteniéndose la 3 α -formiloxiestigmast-22-eno (226) con un rendimiento del 20%.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.7.

3 α -Formiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (175) (Figura 2.7) y 3 α -formiloxi-5 β ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (227) (Figura 5.2 y Tabla 5.6).

En un balón de 25 ml se colocaron 500 mg de una mezcla (20:1) de 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (170) y 3 β -tosiloxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (173), y 15 ml de dimetilformamida. Se agregaron 50 mg de carbonato de litio y se reflujo por espacio de 3 horas. Se evaporó el solvente, se tomó con cloruro de metileno y se lavó con agua. Se purificó por una columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro hexano/acetato de etilo (9:1) como solvente, obteniéndose los siguientes compuestos:

3 α -formiloxi-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-eno (227) con un rendimiento del 10%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo, R_f= 0,40. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 151-152°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.9.

EM: *m/z* (%), 456 (M⁺, 6); 410 (M⁺-HCOOH, 8); 392 (4); 349 (13); 253 (22); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₃₀H₄₈O₃, M⁺ = 456,3603. Hallado 456,3603.

3 α -formiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (175) con un rendimiento del 10%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), R_f= 0,38. Se recristalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 91-92°C.

RMN-¹H: ver Capítulo 5, Tabla 5.8.

RMN-¹³C: ver Capítulo 5, Tabla 5.16.

EM: *m/z* (%), 456 (M⁺, 10); 410 (M⁺-HCOOH, 17); 349 (48); 253 (77); 55 (100).

EMAR: Calculado para C₃₀H₄₈O₃, M⁺ = 456,3603. Hallado 456,3603.

7.5. OTROS COMPUESTOS (Figuras varias).

Estigmasta-3,5,22-trien-7-ona (176) (Figura 2.9)

En un balón de 100 ml se disolvieron 473 mg de 3 β -tosiloxiestigmasta-5,22-dien-7-ona (172) en 50 ml de acetato de etilo. Se agregaron 20 mg de bromuro de litio y se colocó a reflujo por 30 minutos. Se evaporó el solvente y se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/hexano (3:1) como solvente, obteniéndose cuantitativamente el estigmasta-3,5,22-trien-7-ona (176). Solvente para CCD:

hexano/cloruro de metileno (3:7), $R_f = 0,73$. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 88-89°C (lit 105 °C)^{21,22}.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.14**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.21**.

EM: m/z (%), 408 (M^+ , 8); 365 (1); 269 (8); 43 (100).

5 α -Formiloxi-3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (211) (Figura 3.5).

Se suspendieron 500 mg de 3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (170) en 24 ml de ácido fórmico y 4 ml de agua. Se calentó a 60°C con agitación por 2 horas. Se agregaron 24 ml de agua y se extrajo con cloruro de metileno. Se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (7:3) como solvente, obteniéndose los siguientes compuestos:

3 β -tosiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-eno (170) recuperado en un 20%.

5 α -formiloxi-3 β -tosiloxiestigmast-22-en-6 β -ol (211) con un rendimiento del 80%. Solvente para CCD: hexano/acetato de etilo (9:1), $R_f = 0,20$. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 153-154°C (d).

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.10**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.17**.

EM: m/z (%), 456 (M^+ -TsOH, 2); 438 (3); 410 (4); 392 (8); 253 (22); 55 (100).

3 β -Acetoxiestimasta-4,22-dien-6 β -ol (185) (Figura 2.13).

En un balón de 50 ml se disolvieron 500 mg de 3 β -acetiloxi-5 β ,6 β -epoxiestigmasta-22-dieno (184) en 20 ml de dimetilformamida. Se agregaron 75 mg de bromuro de litio y se colocó a reflujo por 30 minutos. Se evaporó el solvente y se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/acetato de etilo (9:1) como solvente, obteniéndose el 3 β -acetiloxiestimasta-4,22-dien-6 β -ol (185) con un 95% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetato de etilo (9:1), $R_f = 0,39$. Se recrystalizó de metanol/agua, obteniéndose un producto blanco de p.f. 153-154°C.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.13**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.20**.

EM: m/z (%), 452 (M^+ -H₂O, 13); 410 (M^+ -AcOH, 60); 392 (100); 253 (18); 367 (23); 298 (20); 271 (20).

Análisis para C₃₁H₅₀O₃ calculado: C (79,09%), H (10,71%); hallado: C (79,03%), H (10,79%).

Estigmasta-4,22-dien-3 β ,6 β -diol (187) (Figura 2.13).

En un balón de 50 ml se disolvieron 500 mg de 5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ol (186) en 20 ml de dimetilformamida. Se agregaron 75 mg de bromuro de litio y se colocó a reflujo por 30 minutos. Se evaporó el solvente y se purificó por columna de sílica flash utilizando una mezcla de cloruro de metileno/acetato de etilo (3:7) como solvente, obteniéndose el estigmasta-4,22-dien-3 β ,6 β -diol (187) con un 50% de rendimiento. Solvente para CCD: cloruro de metileno/acetato de etilo (3:7), R_f= 0,33. Se recrystalizó de metanol, obteniéndose un producto blanco de p.f. 151-152°C²³.

RMN-¹H: ver **Capítulo 5, Tabla 5.13**.

RMN-¹³C: ver **Capítulo 5, Tabla 5.20**.

EM: *m/z* (%), 428 (M⁺, 2); 410 (M⁺ - H₂O, 4); 367 (3); 269 (10); 55 (100).

Análisis para C₂₉H₄₈O₂ calculado: C (81,24%), H (11,29%); hallado: C (81,20%), H (11,25%).

7.6. BIBLIOGRAFIA.

- 1- H. L. Holland, P. R. P. Diakow, G. J. Taylor; *Can. J. Chem.*, **56**, 3121 (1978).
- 2- I. Rubinstein, L. J. Goad, A. D. H. Clague, L. J. Mulheim; *Phytochemistry*, **15**, 195 (1976).
- 3- R. Ikan, P. Klain; *Isr. J. Chem.*, **8**, 965 (1970).
- 4- C. Prakash, S. Saleh, I. A. Blair; *Tetrahedron Lett.*, **36**, 19 (1989).
- 5- L. Galagovsky, G. Burton, E. Gros; *Z. Naturforsch*, **44b**, 806 (1989).
- 6- L. S. Fieser, M. Fieser, R. N. Chakranarti; *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2226 (1949).
- 7- L. Galagovsky, E. Gros; *J. Chem. Res.*, **11**, 366 (1990).
- 8- P. K. Gladu, G. W. Patterson, G. H. Wikfors, W. R. Lusby; *Lipids*; **26**, 656 (1991).
- 9- M. I. Fernandez, J. R. Predo, E. Seoane; *Phytochemistry*, **22**, 2087 (1983).
- 10- K. Wada, S. Marumo; *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2579 (1981).
- 11- S. Takatsuto, N. Ikekewa; *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4181 (1982).
- 12- S. Takatsuto, N. Ikekewa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 439 (1984).
- 13- C. E. Anagstopoulos, L. F. Fieser; *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 532 (1954).
- 14- R. B. Mitra, V. M. Kapoor; *Synth. Commun.*, **15**, 1087 (1985).
- 15- S. Takatsuto, K. Kabayashi, T. Watanabe, H. Kuriyama, T. Furuse; *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3217 (1988).
- 16- A. A. Lakhvich, A. V. Khripach, V. N. Kovganko, N. V. Zhabinskii; *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **283**, 130 (1985).
- 17- T. C. McMorris, P. A. Patil, R. G. Chavez, M. E. Baker, S. D. Clouse; *Phytochem.*, **36**, 585 (1994).
- 18- J. A. Steel, E. Mosettig; *J. Org. Chem.*; **28**, 571 (1963).
- 19- Y. Endo; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1529 (1993).
- 20- N. V. Kovganko, S. K. Ananich; *Zh. Org. Chim.*, **27**, 103 (1991).
- 21- R. D. Rofi, A. B. Pomilio; *Fitoterapia*, **516**, 183 (1982).
- 22- M. S. Ahmad, I. A. Ansari, K. Saleem, G. Monuddin; *Indian J. of Chem.*, **23B**, 1110 (1984).
- 23- C. Xiong, P. Deji; *Zhongcaoyao*, **18**, 530 (1987).



**RESUMEN DEL
TRABAJO REALIZADO**

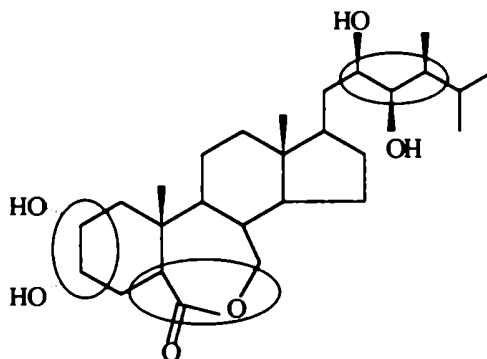
Los BR's son un nuevo tipo de hormonas vegetales que poseen la propiedad de estimular el crecimiento y la división celulares¹. A partir del descubrimiento del brassinólido (1) y su determinación estructural por espectroscopía de rayos X², se llevaron a cabo numerosos intentos de sintetizar sus análogos estructurales de origen natural^{3,4} y de medir su actividad⁵.

Además, se aislaron diferentes análogos naturales de diferentes tejidos tan disímiles como hojas, tallos, polen y flores; de fuentes tan diversas como arroz, poroto, té o cítricos⁶⁻⁵¹. Se publicaron también resultados muy promisorios en cuanto a su aplicación en el aumento de los rendimientos de cosechas^{52,53}.

La estructura molecular tan particular de estos compuestos fue un interesante desafío para los químicos dedicados a la síntesis orgánica, quienes a partir de la década del '80 trataron de sintetizarlos con la ayuda de reacciones regio y estereoselectivas⁵⁴⁻¹⁰⁵ con la finalidad de obtener los distintos BR's y análogos no naturales¹⁰⁶⁻¹¹².

En vista del esqueleto esteroideal que poseían los BR's (ver **Figuras 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4, Capítulo 1**, pags. 8-11) nuestra intención fue llevar a cabo la síntesis de algunos análogos naturales y no naturales a partir de estigmasterol (136). Esta metodología que parte de una materia prima fácilmente accesible y de bajo valor comercial, nos permitiría obtener productos de alto valor agregado.

La estrategia general consistió en aprovechar el esqueleto esteroideal y la cadena lateral del estigmasterol para sintetizar análogos de castasterona 22(R),23(R) y 22(S),23(S)-dihidroxi-24(S)-etil sustituidos, con diferentes modificaciones en los anillos A y B. En la **Figura** se indican los sectores de la molécula de brassinólido (1) que fueron modificados.



Se planeó la síntesis de dos series de análogos: los 5α -hidrogenados y los 5α -hidroxilados (**Capítulos 2-4**), con diferentes sustituyentes en C-2 y C-3 (ver **Figura 2.1** del **Capítulo 2** y **Figura 4.1** del **Capítulo 4**, pags. 58 y 129 respectivamente). Entre estos compuestos se hallaban la (22R,23R,24S)-24-etil- $2\alpha,3\alpha,22,23$ -tetrahidroxi- 5α -coleston-6-ona [24(S)-homoetilcastasterona] (**12**) y la (22R,23R,24S)-24-etil- $2\alpha,3\alpha,5,22,23$ -pentahidroxi- 5α -coleston-6-ona (**163**), considerados compuestos cabeza de serie y utilizados como patrones de bioactividad al realizar los bioensayos. Como consecuencia de los intentos de obtener estas moléculas surgió un estudio sobre la influencia del sustituyente de C-3 en las reacciones de apertura del β -epóxido ubicado en C-5 y C-6¹¹³.

Se resumieron las características espectroscópicas de los distintos productos intermediarios de síntesis asignando los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de las diferentes series homólogas, y se discutieron los efectos de los sustituyentes. También, se asignaron los espectros RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los análogos de brassinosteroides sintetizados y se registraron sus espectros de masa de iones positivos y negativos obtenidos por Bombardeo de Átomos Veloces (BAV)¹¹⁴ (**Capítulo 5**).

Finalmente, se optimizó el *ensayo de la inclinación de la lámina de arroz* (ILA)^{115,116}, buscando primero una variedad de arroz local apropiada que cumpliera con los requisitos necesarios de crecimiento parejo, reproducibilidad y sensibilidad a los productos aplicados. Una vez determinada la variedad *Chui* como la más indicada y luego de hallada la dosis del orden de $1\mu\text{g/plántula}$ como la óptima, se realizaron los ensayos ILA e ILA modificado con fase de oscuridad, obteniendo un orden de actividad biológica comparada de los análogos de brassinosteroide sintetizados (**Capítulo 6**).

Durante el presente trabajo de Tesis Doctoral se han sintetizado y descripto 55 nuevos compuestos.

Además, se han publicado dos trabajos^{113,114} en revistas científicas internacionales, y otras dos están en etapa de escritura. También se ha solicitado una Patente Argentina al Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual¹¹⁷.

BIBLIOGRAFIA.


- 1- J. F. Worley, J. W. Mitchell; *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **96**, 270 (1971).
- 2- M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohweder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D Warthen, G. L. Steffens, J. L. Flippen-Anderson, J. C. Cook Jr., *Nature*, **281**, 216 (1979).
- 3- N. B. Mandava; *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **39**, 23 (1988).
- 4- G. Adam, V. Marquardt; *Phytochemistry*, **25**, 1787 (1986).
- 5- A. Sakurai, S. Fujioka; *Plant Growth Regulation*, **13**, 147 (1993).
- 6- T. Yokota, J. Baba, N. Takahashi. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4865 (1982).
- 7- J. Baba, T. Yokota, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 659 (1983).
- 8- T. Yokota, J. Baba, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1409 (1983).
- 9- T. Yokota, J. Baba, S. Koba, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2529 (1984).
- 10- S. Takatsuto, B. Ying, M. Morisaki, N. Ikekawa. *J. Chromatography*, **239**, 233 (1982).
- 11- H. Abe, M. Morishita, M. Uchiyama, S. Marumo, K. Minakata, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2609 (1982).
- 12- M. Ikeda, S. Takatsuto, T. Sassa, M. Ikekawa, M. Nukima. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 655 (1983).
- 13- H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Ikeda, T. Sassa, T. Kutsima, S. Marumo. *Experientia*, **39**, 351 (1983).
- 14- M. Arima, T. Yokota, N. Takahashi. *Phytochemistry*, **23**, 1587 (1984).
- 15- T. Morishita, H. Abe, M. Uchiyama, S. Marumo, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Phytochemistry*, **22**, 1051 (1983).
- 16- H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2171 (1984).
- 17- K.-H. Park, T. Yokota, A. Sakura, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3081 (1987).
- 18- N. Ikekawa, F. Nishiyama, Y. Fujimoto. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 405 (1988).
- 19- R. D. Plattner, S. L. Taylor, M. D. Grove. *J. Nat. Prod.*, **49**, 540 (1986).
- 20- T. Yokota, M. Morita, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2189 (1983).
- 21- T. Yokota, S. Koba, S.-K. Kim, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Sakakibara, K. Okada, K. Mori, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1625 (1987).
- 22- S. -K. Kim. en **Study of Bio-Organic Chemistry of Naturally-Occurring Brassinosteroids** (en japonés). Ph. D Thesis, the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. 1988.
- 23- T. Yokota, S.-K. Kim, N. Takahashi. In 13th Int. Conf. on PLant Growth Sustances. Abstr. N° 168, Calgary, Canada. 1988.

- 24- S.-K. Kim, T. Yokota, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2303 (1987).
- 25- T. Yokota, S.-K. Kim, Y. Kosaka, Y. Ogino, N. Takahashi. en **Conjugate Plant Hormone, Structure, Metabolism and Function**. K. Schreiber; H. E. Schutte; G. Sembder, Eds. VEG Deucher Verlag der Wissenchaffen. Pgs. 286-296. 1987.
- 26- S.-K. Kim, T. Yokota, Y. Ogino, N. Takahashi. In 13th Int. Conf. on PLant Growth Sustances. Abstr. N° 401, Calgary, Canadá. 1988.
- 27- J. A. Schneider, K. Yoshihara, K. Nakanishi, N. Kato. *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3859 (1983).
- 28- H. Abe, K. Nakamura, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1103 (1984).
- 29- Y. Susuki, I. Yamaguchi, T. Yokota, N. Yakahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3133 (1986).
- 30- H. Abe. Rice lamina inclination, endogenous levels in plant tissues and accumulation during pollen development of brssinosteroids, en **Brassinosteroids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS Washinton DC. 1991.
- 31- T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi, S. Yakatsuto, N. Ikekawa, T. Takematsu. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2419 (1983).
- 32- T. Yokota, M. Amina, N. Takahashi, A. Crozier. *Phytochemistry*, **24**, 1333 (1985).
- 33- S.-K. Kim, H. Abe, C. H. A. Little, R. P. Pharis. *Plant Physiol.*, **94**, 1709 (1990).
- 34- T. Yokota, S. -K. Kim, Y Fukui, N. Yakahashi, Y. Takeuchi, T. Takematsu; *Phytochemistry*, **26**, 503 (1987).
- 35- S. Takatsuto, H. Abe, K. Gamoh. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1057 (1990).
- 36- T. Yokota, Y. Ogino, N. Takahashi, H. Saimoto, S. Fujioka, A. Sakurai. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1107 (1990).
- 37- S. -K. Kim. Ntural occurrence of brassinosteroids, en **Brassinosteroids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS Washinton DC. Pgs. 27-35. 1991.
- 38- J. Schmidt, T. Yokota, G. Adam, N. Takahashi. *Phytochemistry*, **30**, 364 (1991).
- 39- K. H. Park, H. Saimoto, S. Nakagawa, A. Sakurai, T. Yokota, N. Takahashi, K. Syōno. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 805 (1989).
- 40- Y. Susuki, I. Yamaguchi, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 49 (1985).
- 41- S. Takatsuto, T. Yokota, K. Omote, K. Gamoh, N. Takahashi. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2177 (1989).
- 42- S. Takatsuto, K. Omote, K. Gamoh, M. Ishibashi. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 757 (1990).

- 43- N. Ikekawa, S. Takatsuto, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita. *Proc. Jpn. Acad.*, **59**, 9 (1983).
- 44- S. Asakawa, H. Abe, Y. Kyokawa, S. Nakamura, M Natsume; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 219 (1994).
- 45- H. Susuki, S. Fujioka, T. Yokota, N. Murofushi, A. Sakurai; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 2075 (1994).
- 46- P. E. Taylor, K. Spuck, P. M. Smith, J. M. Sasse, T. Yokota, P. G. Griffiths, D. W. Cameron; *Planta*, **189**, 91 (1993).
- 47- J. Smidth, B. Splenger, T. Yokota, G. Adam; *Phytochemistry*, **32**, 1614 (1993).
- 48- J. Smidth, T. Yokota, B. Splenger, G. Adam; *Phytochemistry*, **34**, 391 (1993).
- 49- J. Smidth, C. Kuhnty, G. Adam; *Phytochemistry*, **36**, 175 (1994).
- 50- K. H. Park, J. D. Park, K. H. Hyun, M. Nasayama, T. Yokota; *Biosci. Biotech. Biochem*, **58**, 1343 (1994).
- 51- C. Motegi, S. Takatsuto, K. Gamoh; *J. Chromatography*, **658**, 27 (1994).
- 52- Y. Takeuchi, M. Ogasawara, M. Konnai, T. Takematsu; *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, **19**, 343 (1992).
- 53- Y. Karumo, S. Takatsuto; Captability for, and problems of practical uses of brassinosteroids, in **Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. H. G. Cutler; T. Yokota; G. Adam, Eds. ACS Symposium Series N° 474. ACS, Washinton DC. 1991.
- 54- M. Tsubuki, K. Keinu, T. Honda; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2643 (1992).
- 55- L. Kohout, M. Strnad; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **57**, 1731 (1992).
- 56- K. Wada, S. Marumo; *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2579 (1981).
- 57- K. Okada, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 89 (1983).
- 58- M. Anastasia, P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Fiecchi, A. Scala; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2117 (1986).
- 59- T. Kishi, K. Wada, S. Marumo, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1821 (1986).
- 60- L. Kohout; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **59**, 1219 (1994).
- 61- C. Brosa, R. Peracaula, S. Nusimovich; *Steroids*, **59**, 463 (1994).
- 62- E. E. Levinston, N. A. Kutnetsova, N. Y. Podkhalyusina, V. F. Traven; *Mendeleev Commun.*, **96** (1994).
- 63- M. J. Thompson, N. Mandava, J. L. Flippen-Anderson, J. F. Worley, S. R. Dutky, W. E. Robins, W. Lubby; *J. Org. Chem.*, **44**, 5002 (1979).
- 64- K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1211 (1980).
- 65- K. Mori, M. Sakakibara, Y. Ichikawa, H. Ueda, K. Okada, T. Umemura, G. Yabuta, S. Kuwahara, H. Kondo; *Tetrahedron*, **38**, 2099 (1982).

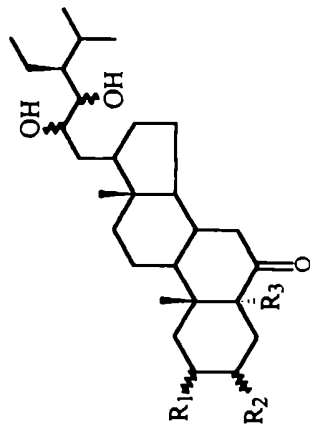
- 66- M. Sakakibara, K. Okada, Y. Ichikawa, K. Mori; *Heterocycles*, **17**, 301 (1982).
- 67- M. Anastasia, P. Ciuffreda, M. del Puppo, A. Fiechi; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 383 (1983).
- 68- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4081 (1982).
- 69- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 663 (1983).
- 70- K. Okada, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 925 (1983).
- 71- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1407 (1983).
- 72- K. Mori, M. Sakakibara, K. Okada; *Tetrahedron*, **40**, 1767 (1984).
- 73- K. Mori; *Rev. Latinoam. Quim.*, **16**, 55 (1985).
- 74- S. Takatsuto; *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2361 (1988).
- 75- T. Honda, K. Keino, M. Tsubuki; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 650 (1990).
- 76- T. Mc Morris, P. A. Patil; *J. Org. Chem.*, **58**, 2338 (1993).
- 77- T. McMorris, P. A. Patil, R. G. Chavez, M. E. Baker, S. D. Clouse; *Phytochemistry*, **36**, 585 (1994).
- 78- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2001 (1984).
- 79- S. Fung, J. B. Sidall; *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6580 (1980).
- 80- M. Ishiguro, S. Takatsuto, M. Morisaki, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 962 (1980)
- 81- S. Takatsuto, B. Ying, M. Morisaki, N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 903 (1981).
- 82- S. Takatsuto, N. Yasawa, M. Ishiguro, M. Morisaki, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 139 (1984).
- 83- M. Anastasia, P. Ciuffreda, A. Fiechi; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 379 (1983).
- 84- W. Zhou; *Pure & Appl. Chem.*, **61**, 431 (1989).
- 85- W. Zhou, B. Jiang, X. Pou; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 612 (1989).
- 86- Z. Sheu, W. Zhou; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1765 (1990).
- 87- C. Brosa, R. Peracaula, R. Puig, M. Ventura; *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7057 (1992).
- 88- V. Cerný; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **54**, 2211 (1989).
- 89- S. Seo, T. Nagasaki, Y. Katsuyama, F. Matsubara, T. Sakada, M. Yoshioka, Y. Makisumi; *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **27**, 1383 (1989).
- 90- A. Kolbe, V. Marquardt, G. Adam; *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **31**, 811 (1992).
- 91- J. E. Edwards, J. S. Mills, J. Sundeen, J. H. Freed; *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1248 (1969).
- 92- R. F. Hutchins, M. J. Thompson, J. A. Svodoba; *Steroids*, **15**, 113, (1970).
- 93- W. G. Salmond, M. C. Sobala; *Tetrahedron Lett.*, **16**, 1695 (1977).
- 94- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2133 (1983).

- 95- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *Tetrahedron Lett.*, **24**, 773, (1983).
- 96- J. R. Donaubauer, A. M. Greaves, T. C. Mc Morris; *J. Org. Chem.*, **49**, 2833 (1984).
- 97- H. Hayami, M. Sato, S. Kanemoto, Y. Morizawa, K. Oyima, H. Nozaki; *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4491 (1983).
- 98- K. Mikami, S. Sakuda; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 710 (1993).
- 99- T. Kametani, K. Keino, M. Kigawa, M. Tsubuki, T. Honda; *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3141 (1989).
- 100- T. Yokota, S. Watanabe, Y. Ogino, I. Yamaguchi, N. Takahashi; *J. Plant. Growth Regul.*, **9**, 151 (1990).
- 101- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 745 (1984).
- 102- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2769 (1982).
- 103- M. Sakakibara, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1405 (1983).
- 104- M. Anastasia, P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Fiechi, A. Sacca; *J. Org. Chem.*, **50**, 321 (1985).
- 105- M. Anastasia, P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Fiechi, A. Sacca; *J. Org. Chem.*, **49**, 4297 (1984).
- 106- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe; *Phytochemistry*, **22**, 1393 (1983).
- 107- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa, T. Takematsu, Y. Takeuchi, M. Koguchi; *Phytochemistry*, **22**, 2437 (1983).
- 108- M. J. Thompson, W. J. Meudt, N. B. Mandava, S. R. Dutky, W. R. Lusby, D. W. Spaulding; *Steroids*, **39**, 89 (1982).
- 109- M. Kondo, K. Mori; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 97 (1983).
- 110- S. Takatsuto, N. Yasawa, N. Ikekawa; *Phytochemistry*, **23**, 525 (1984).
- 111- S. Takatsuto, N. Ikekawa; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 439 (1984).
- 112- S. Takatsuto, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe; *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 211 (1987).
- 113- O. Teme Centurión, L. R. Galagovsky, E. G. Gros; *Steroids*, **60**, 434 (1995).
- 114- G. M. Caballero, O. Teme Centurión, L. Galagovsky, E. Gros; *Journal American Society Mass Spectrometry*, **8**, 270 (1997).
- 115- K. Wada, S. Marumo, N. Ikekawa, M. Morisaki, K. Mori; *Plant Cell Physiol.*, **22**, 323 (1981).
- 116- K. Takeno, R. P. Pharis; *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1275 (1982).
- 117- E. G. Gros, L. R. Galagovsky, O. Teme Centurión; "Nuevos derivados de 24-etil-colestán-6-ona, procedimientos para la preparación de estos compuestos reguladores del crecimiento vegetal, y sus formulaciones". Solicitada por FCEN. UBA. Exp. N° 36877/95.



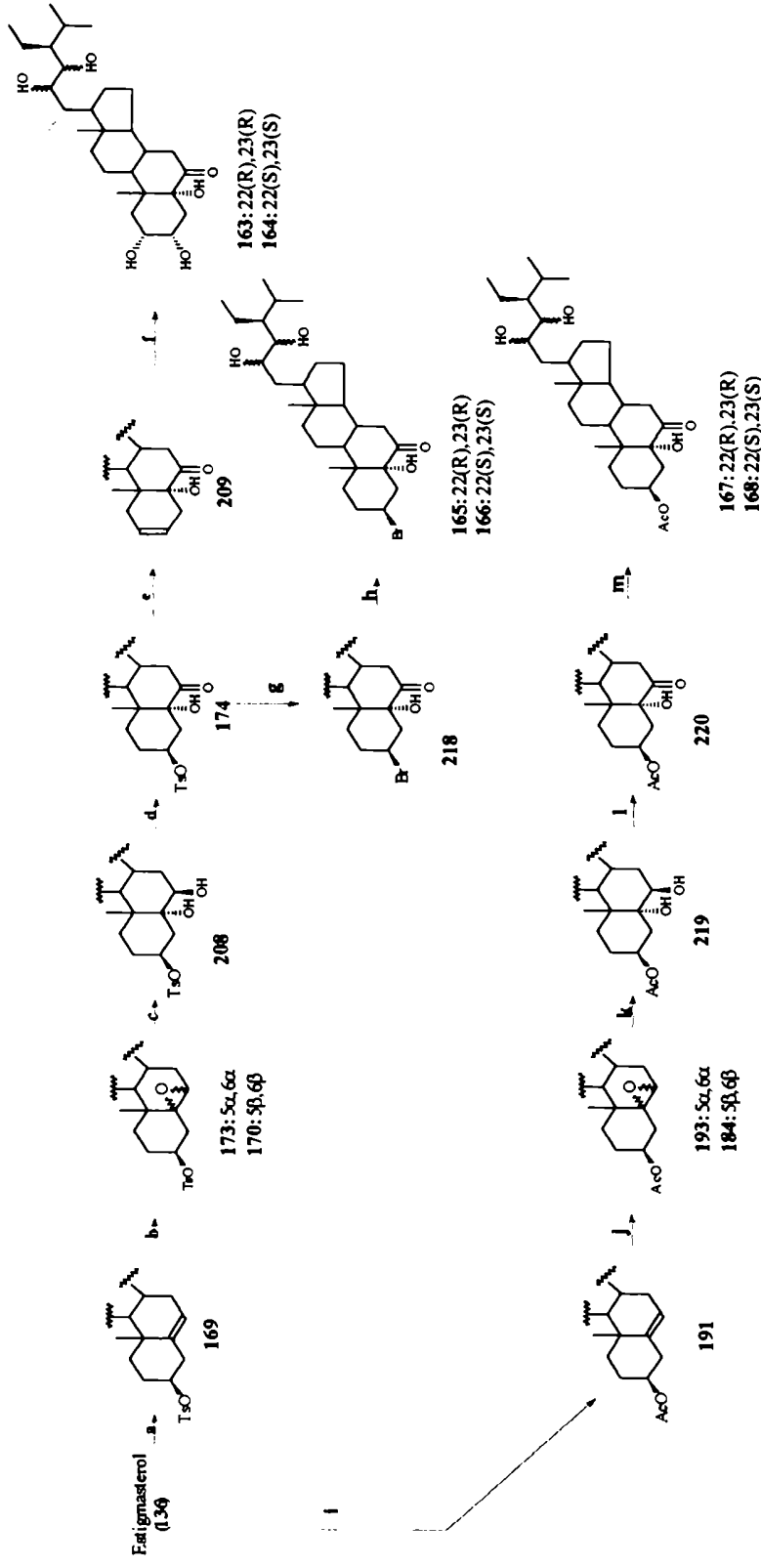
O. TEME CENTURIÓN





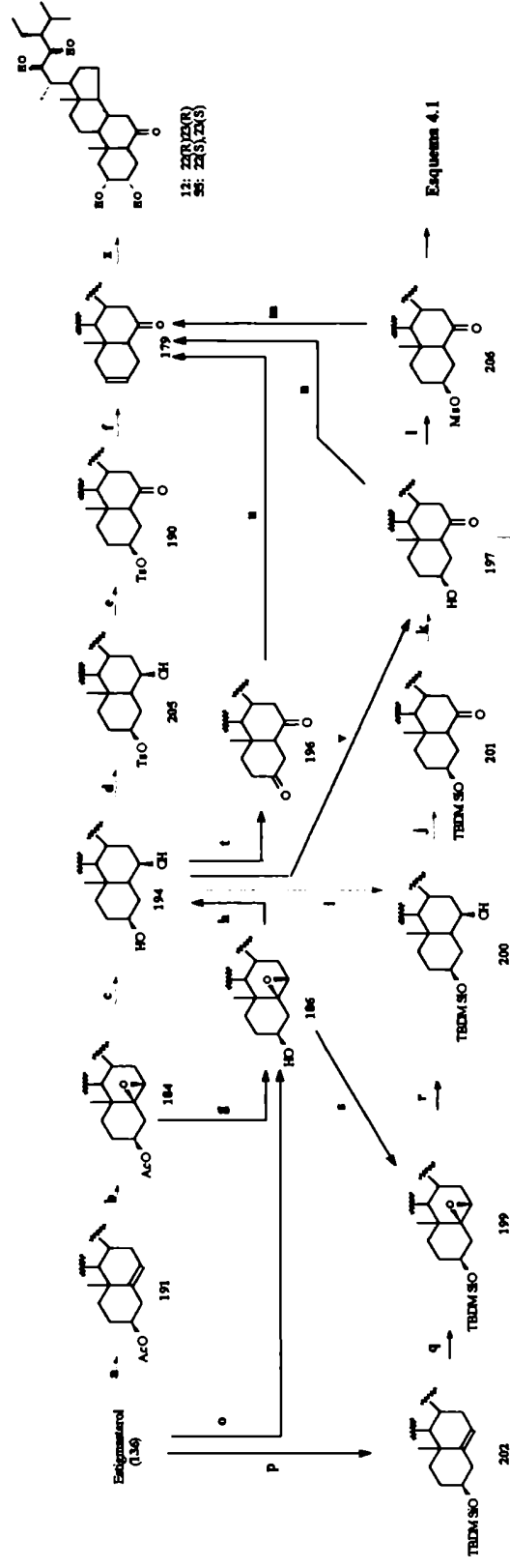
12 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = H	22(R),23(R)	2,3-(R,R)
55 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = H	22(S),23(S)	2,3-(S,S)
159 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = H	22(R),23(R)	3B-(R,R)
160 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = H	22(S),23(S)	3B-(S,S)
161 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = H	22(R),23(R)	3A-(R,R)
162 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = H	22(S),23(S)	3A-(S,S)
163 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = OH	22(R),23(R)	2,3,5-(R,R)
164 : R ₁ = α-OH	R ₂ = α-OH	R ₃ = OH	22(S),23(S)	2,3,5-(S,S)
165 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = OH	22(R),23(R)	3B,5-(R,R)
166 : R ₁ = H	R ₂ = β-Br	R ₃ = OH	22(S),23(S)	3B,5-(S,S)
167 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = OH	22(R),23(R)	3A,5-(R,R)
168 : R ₁ = H	R ₂ = β-AcO	R ₃ = OH	22(S),23(S)	3A,5-(S,S)

Figura 6.2. Brassinosteroides sintetizados y la nomenclatura utilizada en este capítulo.



a. TsCl/Py (100%) **b.** mCPBA/Cl₂CH₂/-78°C (80%) **c.** HClO₄ (98%) **d.** CCP (94%) **e.** LiCO₃/DMSO (74%)
f. (DHQD)₂-PHAL/K₂OsO₂(OH)₄ (13%) **g.** LiBr/acetona (54%) **h.** (DHQD)₂-PHAL/K₂OsO₂(OH)₄ (19%) **i.** (AcO)₂O/Py (100%) **j.** mCPBA/Cl₂CH₂/-78°C (70%) **k.** HClO₄ (90%) **l.** CCP (82%) **m.** (DHQD)₂-PHAL/K₂OsO₂(OH)₄ (12%)

Esquema 4.2. Estrategias sintéticas ensayadas y rendimientos obtenidos en la síntesis de análogos de 5 α -hidroxilados de 24(S)-homoetilcastasterona (12).



- a. $(\text{AcO})_2/\text{Py}$ (100%) b. $\text{CrO}_3/(\text{AcO})_2$ ó $\text{KMnO}_4/\text{CuSO}_4$ (70%) c. $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$ (44%) d. TeCl/Py (94%) e. PCC (82%) f. LiBr/DMA (70%) g. LiAlH_4 (80%) h. $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$ (44%)
 i. $\text{TBDMSiCl}/\text{Im}$ (100%) j. PCC (95%) k. $(n\text{Bu})_4\text{N}^+\text{F}^-/\text{THF}$ (100%) l. MsCl/Py (100%) m. LiBr/DMA (73%) n. $\text{CuSO}_4/\text{silica}$ (20%) o. $\text{KMnO}_4/\text{CuSO}_4$ (59%) p. $\text{TBDMSiCl}/\text{Im}$ (91%)
 q. $\text{CrO}_3/(\text{AcO})_2$ ó $\text{KMnO}_4/\text{CuSO}_4$ (25%) r. $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$ (54%) s. $\text{TBDMSiCl}/\text{Im}$ (70%) t. Jones (100%) u. $\text{Zn}(\text{Hg})/\text{TMSiCl}$ (50%) v. PCC (55%) x. $(\text{DHQD})_2\text{-PHAL}/\text{K}_2\text{O}_2(\text{OH})_4$ (34%)

Esquema 2.1. Distintas estrategias sintéticas ensayadas para la obtención de la 24(S)-homocastasterona (12). Las flechas rojas indican la secuencia sintética que conduce al mayor rendimiento global.