

Tesis de Posgrado

Estudio sobre síntesis y bioactividad de análogos de Brassinosteroides

Ramirez, Javier Alberto

2003

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:

Ramirez, Javier Alberto. (2003). Estudio sobre síntesis y bioactividad de análogos de Brassinosteroides. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3604_Ramirez.pdf

Cita tipo Chicago:

Ramirez, Javier Alberto. "Estudio sobre síntesis y bioactividad de análogos de Brassinosteroides". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3604_Ramirez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIOS SOBRE SÍNTESIS Y BIOACTIVIDAD DE ANÁLOGOS DE BRASSINOSTEROIDES

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Lydia R. Galagovsky

LUGAR DE TRABAJO

Departamento de Química Orgánica

Javier Alberto Ramírez

Tesis presentada para optar por el título
de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Julio de 2003

Me - 3604

Dedicada a Ana y Silvina.

Agradezco profundamente a Lydia, quien me permitió desarrollar este trabajo con libertad y en un ambiente estimulante. Por su paciencia, dedicación, respeto y afecto.

Deseo agradecer, en primer lugar, el afecto constante y el apoyo brindado en todo momento por mis amigos: Julieta, Constanza, Esteban y María. Por su confianza, paciencia y cariño.

También agradezco profundamente a Andrea, Eleonora, Sergio y Julietita, por la cordialidad que generan en el trabajo cotidiano.

Al Dr. Juan Bautista Rodríguez, mi Consejero de Estudios, por su disposición a compartir su experiencia, y por las divertidas charlas a la hora del té.

A mis vecinos: la Dra. Rosa Erra, por su afecto y consejos siempre bienvenidos, a Alejandra, por las largas charlas compartidas, a Olga Tarzi y Sergio Bonesi, por su eterno buen humor.

A Elsa, Romina, Martín, Flavia y César, por su dedicación al trabajo y el entusiasmo constante.

A la memoria del Dr. Eduardo Gros, por, entre otras cosas, haberme animado a emprender esta Tesis.

A todos los integrantes de UMYMFOR, por la ayuda que, muchas veces, fue más allá de lo estrictamente técnico.

Al Departamento de Química Orgánica, por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo, y por la ayuda económica otorgada que me permitió realizar una estadía en el extranjero.

A la Dra. Edith Monteagudo, por su colaboración desinteresada en la obtención de espectros de RMN-¹⁹F. Al Dr. David Coker, de Boston University, por la realización de algunos cálculos de modelado molecular. Al Dr. Steve Clouse, por permitirme visitar su laboratorio en la North Carolina State University.

Y a todos mis compañeros del Departamento de Química Orgánica, docentes y no docentes, que contribuyeron, de alguna u otra forma, para que esta Tesis fuera posible.

Quiero agradecer, también, a mi familia: mis papás Alberto y Delia, a mis hermanos Sergio y Mariana, a mis queridos sobrinos Ignacio y Agustín, y a mis abuelas Ana, Filo y Pancha, a quienes llevo siempre conmigo.

A mis amigos Marcelo y Marianita.

A Liliana Budiño, por haber despertado mi interés en la química orgánica, y por su afectuoso apoyo en varias oportunidades en los últimos años.

Los brassinosteroides (BRs) son hormonas vegetales esteroidales de reciente descubrimiento, amplia distribución en la naturaleza, y esenciales para el normal desarrollo de las plantas.

En los últimos años se han multiplicado los estudios sobre sus propiedades biológicas y posibles aplicaciones agronómicas. Debido a su baja concentración en las fuentes naturales, los compuestos utilizados en estos estudios deben obtenerse mediante síntesis química a partir de precursores accesibles.

El trabajo desarrollado en esta Tesis se ha centrado en la síntesis de 28-homobrasinosteroides, a partir de estigmasterol.

Se han sintetizado quince BRs, cuatro de ellos habían sido detectados como compuestos naturales, y once son análogos nuevos con modificaciones en C-3, C-5 y C-6.

En particular, resultó de interés la síntesis de análogos fluorados, debido a las importantes propiedades biológicas conocidas para los compuestos organofluorados.

Se evaluó la actividad biológica de cada uno de los compuestos sintetizados. Los bioensayos utilizados fueron inclinación de la lámina de arroz, elongación del epicotilo de soja y crecimiento de plántulas normales y mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Palabras clave: 28-homobrasinosteroides; hormonas vegetales; fluoroesteroides; síntesis orgánica; bioensayos en plantas.

Brassinosteroids (BRs) are a new group of recently discovered plant hormones, widely distributed in the plant kingdom. BRs are essential for the normal development of plants.

During the last past years studies concerning their biological properties and possible use as agrochemicals have increased. Chemical syntheses of BRs are required since they cannot be obtained from natural sources, due to their extremely low concentrations.

This work has been devoted to the synthesis of 28-homobrassinosteroids, using stigmasterol as starting material.

Four out of the fifteen obtained compounds had already been identified as natural products. The other eleven synthetic BRs were new analogues, with modifications involving the C-3, C-5 and C-6.

The synthesis of fluorinated analogues was of particular interest, due to the important previously reported bioactivities of organofluorinated compounds.

Biological activity for each synthetic compounds has been evaluated using the following bioassays: the rice lamina inclination test, the soybean epicotyl elongation and the growth of wild type and mutant seedlings of *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: *28-homobrassinosteroids; plant hormones; fluorosteroids; organic synthesis; plant development bioassays.*

REACTIVOS Y SOLVENTES:

18-crown-6	1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano
AcCN	acetonitrilo
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
AIBN	2,2'-azobisbutironitrilo
CHP	hidroperóxido de cumeno
DAST	trifluoruro de dietilamino azufre
DEG	dietilenglicol
DHQD CLB	4-clorobenzoato de hidroquinidina
DHQD ₂ (Phal)	hidroquinidina 1,4-ftalazinadiil dieter
DIAD	azadicarboxilato de diisopropilo
DIBAL-H	hidruro de diisobutilaluminio
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EtOH	etanol
HPy ⁺ Cl ⁻	cloruro de piridinio
<i>i</i> -PrOH	isopropanol
L-DET	L-tartrato de dietilo
<i>m</i> -CPBA	ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico
MeOH	metanol
Ms ₂ O	anhídrido metansulfónico
MsCl	cloruro de metansulfonilo
NMO	N-óxido de N-metilmorfolina
PCC	clorocromato de piridinio
PDC	dicromato de piridinio
<i>p</i> -TsOH = <i>p</i> -TsA	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
Py	piridina
<i>t</i> -BuOH	<i>t</i> -butanol
TFAA	anhídrido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TsCl	cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo

OTRAS:

CG	cromatografía gas-líquido
DCA	dihidroxilación catalítica asimétrica
ESEP	ensayo de elongación del segundo entrenudo de poroto
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
ILA	ensayo de inclinación de la lámina de arroz
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos

BRASSINOSTEROIDES: Los brassinosteroides naturales suelen mencionarse en la literatura por sus nombres triviales, a los que se asocia una abreviatura. A continuación se listarán las correspondientes a los compuestos mencionados en esta Tesis.

BL	brassinólido
BR	brassinosteroide (en general)
CS	castasterona
HBL	28-homobrassinólido
HCS	28-homocastasterona
HTE	28-homoteasterona
HTY	28-homotifasterol
TE	teasterona
TY	tifasterol

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. LOS BRASSINOSTEROIDES EN EL REINO VEGETAL.	4
1.1.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS BRASSINOSTEROIDES NATURALES.	5
1.1.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS BRASSINOSTEROIDES EN LA NATURALEZA.	6
1.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE BRASSINOSTEROIDES NATURALES.	7
1.2.1. BIOENSAYOS.	7
1.2.2. MÉTODOS MICROANALÍTICOS.	8
1.3. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE BRASSINOSTEROIDES	9
1.3.1 LA RUTA DE OXIDACIÓN TEMPRANA DEL C-6	11
1.3.2. LA RUTA DE OXIDACIÓN TARDÍA DEL C-6	13
1.3.3. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS	13
1.3.4. LOCALIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS	14
1.4. ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DE BRASSINOSTEROIDES.	15
1.5. APLICACIONES AGRONÓMICAS.	16
1.6. ESTUDIOS SOBRE LA ACCIÓN FISIOLÓGICA DE BRASSINOSTEROIDES.	18
1.6.1. DESCUBRIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES EN BRASSINOSTEROIDES.	18
1.6.2. PERCEPCIÓN DE LOS BRASSINOSTEROIDES Y TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL.	19
1.7. SÍNTESIS DE BRASSINOSTEROIDES.	20
1.7.1. SÍNTESIS DEL FRAGMENTO CÍCLICO.	21
1.7.2. SÍNTESIS DE LA CADENA LATERAL.	23
1.7.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE BRASSINOSTEROIDES.	27
1.8. ESTUDIOS SOBRE RELACIONES ESTRUCTURA - ACTIVIDAD.	28
1.9. PERSPECTIVAS.	29
1.9.1. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS CON APLICACIONES AGRONÓMICAS.	29

1.9.2. ESTUDIOS SOBRE INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE BRASSINOSTEROIDES	29
1.9.3. ESTUDIOS SOBRE MIMÉTICOS NO ESTEROIDALES DE BRASSINOSTEROIDES.	30
1.10. TRABAJO A DESARROLLARSE EN ESTA TESIS.	31
1.11. REFERENCIAS.	31
CAPÍTULO 2: 28-HOMOBRASSINOSTEROIDES NATURALES	39
2.1. SÍNTESIS.	42
2.1.1. SÍNTESIS DE 28-HOMOBRASSINÓLIDO Y 28-HOMOCASTASTERONA.	42
I. ANTECEDENTES	42
II. NUEVA ESTRATEGIA.	45
2.1.2. SÍNTESIS DE 28-HOMOTEASTERONA Y 28-HOMOTIFASTEROL.	48
I. ANTECEDENTES.	48
II. NUEVA ESTRATEGIA PARA LA SÍNTESIS DE 28-HOMOTEASTERONA	50
III. NUEVA ESTRATEGIA PARA LA SÍNTESIS DE 28-HOMOTIFASTEROL.	51
2.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	53
2.2.1. ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA).	54
2.2.2. ENSAYO DE ELONGACIÓN DEL EPICOTILO DE SOJA.	54
2.2.3. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE RAÍCES E HIPOCOTILOS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	55
2.2.4. EFECTO SOBRE MUTANTES BIOSINTÉTICAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	57
2.3. CONCLUSIONES	59
2.4. REFE	60
CAPÍTULO 3: ANÁLOGOS FLUORADOS EN C-3	63
3.1. SÍNTESIS.	65
3.1.1. ANTECEDENTES.	65
3.1.2. SÍNTESIS DE (22R,23R)-3 α -FLUORO-22,23-DIHIDROXIESTIGMASTAN-6-ONA	68
3.1.3. SÍNTESIS DE (22R,23R)-3 β -FLUORO-22,23-DIHIDROXIESTIGMASTAN-6-ONA	78

3.2.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	88
3.2.1.	ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA).	88
3.2.2.	ENSAYO DE ELONGACIÓN DEL EPICOTILO DE SOJA.	89
3.2.3.	EFFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	89
3.2.4.	EFFECTO SOBRE MUTANTES BIOSINTÉTICAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	89
3.3.	CONCLUSIONES	90
3.4.	REFERENCIAS.	92

CAPÍTULO 4: ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-6 97

4.1.	SÍNTESIS DE POSIBLES PRECURSORES BIOSINTÉTICOS DE 28-HOMOBRASSINÓLIDO.	100
4.1.1.	SÍNTESIS DE (22R,23R)-5 α -ESTIGMASTA-2 α ,3 α ,22,23-TETRAOL.	100
4.1.2.	SÍNTESIS DE (22R,23R)-5 α -ESTIGMASTA-2 α ,3 α ,6 α ,22,23-PENTAOL Y DE (22R,23R)-5 α -ESTIGMASTA-2 α ,3 α ,6 β ,22,23-PENTAOL.	102
4.2.	SÍNTESIS DE (22R,23R)- 6 α -FLUORO-5 α -ESTIGMASTA-2 α ,3 α ,22,23-TETRAOL.	104
4.3.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	108
4.4.	CONCLUSIONES.	109
4.5.	REFERENCIAS.	

CAPÍTULO 5: ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-5 113

4.1.	SÍNTESIS DE ANÁLOGOS HIDROXILADOS EN C-5	117
5.1.1.	ANTECEDENTES	117
5.1.2.	SÍNTESIS DE (22R,23R)-3 β ,5,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA Y (22R,23R)-3 α ,5,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA.	118
5.2.	SÍNTESIS DE ANÁLOGOS FLUORADOS EN C-5.	122
5.2.1.	ANTECEDENTES	122
5.2.2.	SÍNTESIS DE (22R,23R)-5-FLUORO-3 β ,22,23-TRIHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA.	123
5.2.3.	SÍNTESIS DE (22R,23R)-5-FLUORO-3 α ,22,23-TRIHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA.	129
5.2.4.	SÍNTESIS DE (22R,23R)-5-FLUORO-2 α ,3 α ,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA.	131

5.3.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	133
5.3.1.	ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA).	133
5.3.2.	ENSAYO DE ELONGACIÓN DEL EPICOTILO DE SOJA.	134
5.3.4.	EFFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE MUTANTES BIOSINTÉTICAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	135
5.4.	CONCLUSIONES.	136
5.5.	REFERENCIAS.	136

CAPÍTULO 6: REACTIVIDAD DEL FLÚOR EN C-5 139

6.1.	ANTECEDENTES	141
6.1.1.	SUSTITUCIÓN NUCLEOFÍLICA DE FLUORURO.	141
6.1.2.	EFFECTO DEL SOLVENTE Y CATALIZADORES EN LA SUSTITUCIÓN DE FLUORURO.	143
6.2.	POSIBLES MECANISMOS PARA LA SUSTITUCIÓN OBSERVADA SOBRE EL COMPUESTO 62.	144
6.3.	EL FLÚOR COMO ACEPTOR DE ENLACES DE HIDRÓGENO.	146
6.3.1.	MÉTODOS TEÓRICOS.	146
6.3.2.	EVIDENCIA EXPERIMENTAL.	150
6.4.	CONCLUSIONES.	152
6.5.	REFERENCIAS.	153

CAPÍTULO 7: CONSIDERACIONES FINALES. 157

CAPÍTULO 8: PARTE EXPERIMENTAL. 167

8.1.	GENERALIDADES.	169
8.2.	SÍNTESIS DE COMPUESTOS	170
8.2.1.	SÍNTESIS DE 28-HOMOBRASSINOSTEROIDES NATURALES.(COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 2).	170
8.2.2.	SÍNTESIS DE ANÁLOGOS FLUORADOS EN C-3. (COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 3).	178
8.2.3.	SÍNTESIS DE ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-6. (COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 4).	188
8.2.4.	SÍNTESIS DE ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-5. (COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 5).	193
8.2.5.	DIHIDROXILACIÓN CATALÍTICA ASIMÉTRICA.	209

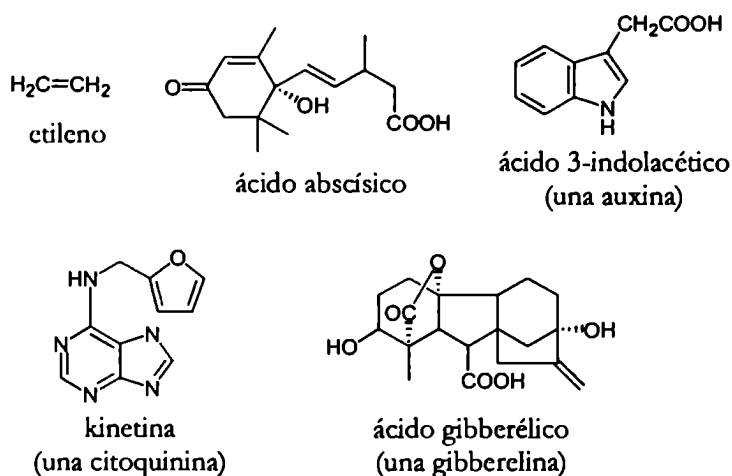
8.3.	ENSAYOS BIOLÓGICOS.	209
8.3.1.	INCLIBNACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ.	209
8.3.2.	ELONGACIÓN DE EPICOTILOS DE SOJA.	210
8.3.3.	EFEECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE ARABIDOPSIS THALIANA.	211
8.3.4.	EFEECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE MUTANTES DE ARABIDOPSIS THALIANA.	211
8.4.	REFERENCIAS.	211
	RESUMEN	215

CAPÍTULO 1

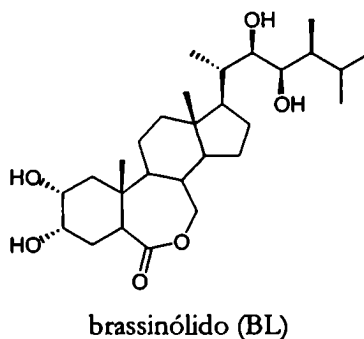
INTRODUCCIÓN

Debido a su naturaleza sésil, las plantas deben regular su metabolismo a fin de aprovechar de manera óptima los recursos disponibles y sobrevivir en condiciones ambientales cambiantes. El crecimiento vegetal está modulado por hormonas que controlan eventos celulares como división, elongación y diferenciación.¹

Hasta hace poco tiempo se asumía la existencia de cinco tipos de fitohormonas: el etileno, el ácido abscísico, las auxinas, las citoquininas y las gibberelinas.



El papel de los esteroides como hormonas en mamíferos se conoce desde la década del 30, posteriormente se ha demostrado también su función endocrina en insectos y hongos. Aunque las plantas son capaces de producir gran variedad de esteroides, fue recién en 1979 cuando investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos describieron la estructura del brassinólido (BL), una lactona esteroidal aislada del polen del nabo silvestre (*Brassica napus* L.), con una notable actividad sobre el crecimiento vegetal.²



Desde entonces, se ha descubierto un gran número de análogos estructurales del brassinólido, colectivamente llamados brassinosteroides (BRs), los cuales se encontraron en todas las especies

vegetales estudiadas: plantas superiores, helechos y algas. Los BRs demostraron poseer actividad reguladora sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como estimulación de la división celular, el crecimiento vegetativo y la reproducción.¹ Estas propiedades hicieron que los BRs se convirtieran en un objetivo sintético interesante en vista de su posible aplicación agronómica. La síntesis de análogos de BRs sirvió, además, para obtener los compuestos necesarios para encarar los estudios sobre biosíntesis, modo de acción y metabolismo.

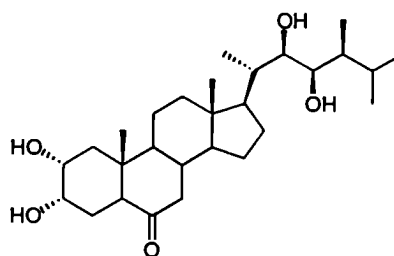
Estos avances en el conocimiento sobre los brassinosteroides no tuvieron, hasta los primeros años de la década de 1990, su correlato en los estudios sobre el papel que los BRs juegan en la regulación del crecimiento vegetal, porque se suponía que éste era redundante con el de otras hormonas como auxinas y gibberelinas. Se creía entonces que los BRs eran intermediarios no esenciales en el desarrollo de las plantas, pero, en los últimos años, el descubrimiento de variedades vegetales mutantes deficientes en la biosíntesis de BRs, permitió acumular suficiente evidencia que demuestra que los brassinosteroides deben ser considerados como un grupo de nuevas hormonas, fundamentales para el desarrollo normal de los vegetales.

A continuación se describirá brevemente el estado actual de las investigaciones sobre BRs, haciendo especial referencia a los aspectos relevantes para esta tesis.

1.1 LOS BRASSINOSTEROIDES EN EL REINO VEGETAL.

En 1941 Mitchell y sus colaboradores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) demostraron que el polen del maíz (*Zea mays*) poseía actividad como promotor del crecimiento vegetal. El interés de éste y de otros grupos relacionados continuó por más de 30 años, siendo infructuosos los esfuerzos dedicados a aislar los compuestos responsables de esta propiedad. En 1974 comenzó un proyecto de cooperación entre distintos centros del USDA que concluyó en 1979 con la identificación del brassinólido.² Por sucesivos fraccionamientos cromatográficos de extractos metanólicos obtenidos a partir de 227 kg de polen de nabo silvestre, se logró purificar 4 mg de un compuesto cuya estructura, determinada por cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹H, resultó ser (22R,23R,24S)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-24-metil-B-homo-7-oxa-5 α -coleston-6-ona. (BL).

Este descubrimiento despertó el interés de distintos grupos de investigación japoneses, que también habían encontrado extractos vegetales activos en distintos bioensayos. Aplicando técnicas de aislamiento similares, Yokota y colaboradores³ lograron purificar, a partir de tejidos de castaño (*Castanea sp.*), el segundo miembro de la familia de los brassinosteroides, al que llamaron castasterona (CS). En estos primeros estudios, los BRs se aislaron y sus estructuras se caracterizaron rigurosamente mediante métodos espectroscópicos.



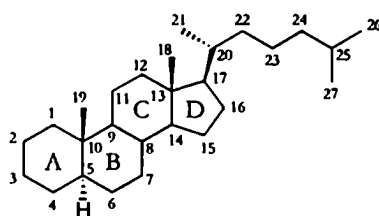
castasterona (CS)

A principio de la década de 1980 hubo dos avances importantes que permitieron el rápido descubrimiento de nuevos brassinosteroides: por un lado, se encontró que el bioensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA), desarrollado por Maeda⁵ para auxinas, era altamente sensible para detectar la presencia de BRs en extractos vegetales parcialmente purificados. Simultáneamente se desarrollaron métodos de análisis basados en la cromatografía gaseosa - espectrometría de masas de BRs derivatizados convenientemente.⁶ De esta manera se detectaron nuevos BRs sin necesidad de purificación previa, lo cual resultó esencial debido a la muy pequeña concentración de estos compuestos en la naturaleza.

1.1.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS BRASSINOSTEROIDES NATURALES.

Hasta el momento se han elucidado las estructuras de mas de 50 brassinosteroides⁷, incluyendo cinco conjugados (dos ésteres de ácidos grasos y tres glucósidos). Suelen clasificarse, dependiendo del número de carbonos en su estructura, como brassinosteroides de C_{27} , C_{28} o C_{29} .

Todos los brassinosteroides identificados hasta ahora poseen en común un esqueleto 5α -colestano, y sus variaciones provienen del tipo y orientación de los grupos funcionales presentes en dicho esqueleto.



esqueleto de 5α -colestano

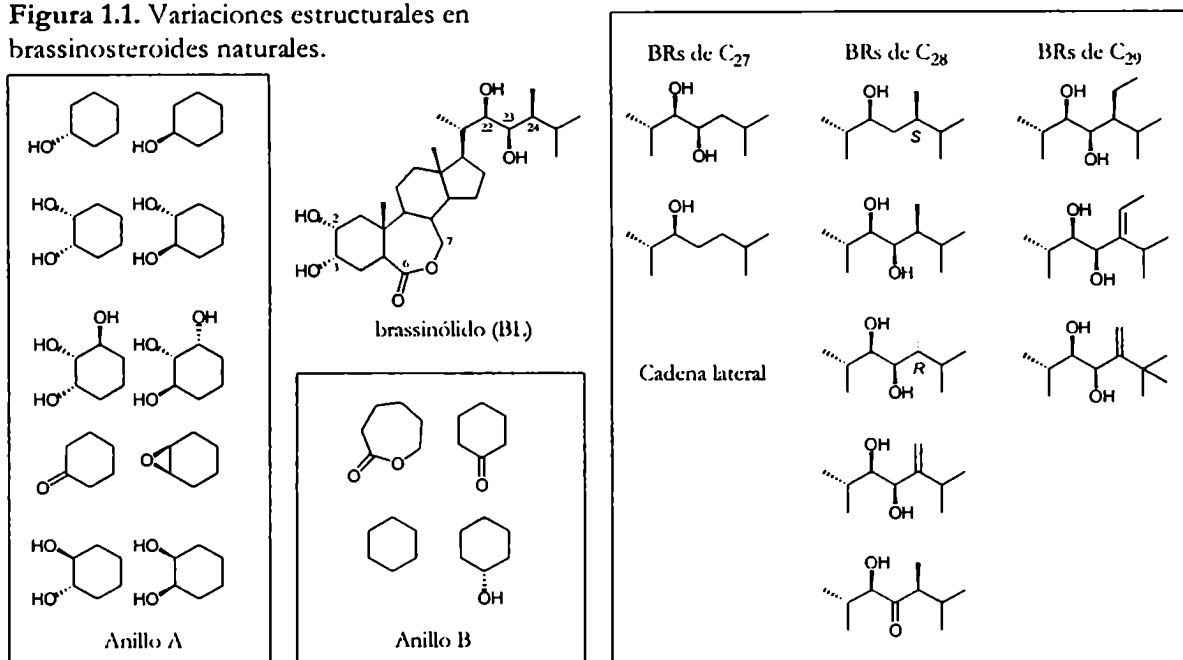
Generalmente poseen en el anillo A hidroxilos vecinales en C-2 y C-3, tanto en configuración α como β , algunos poseen sólo un hidroxilo en C-3 o un grupo 3-ceto. Se conoce, incluso, un ejemplo de un $2\beta,3\beta$ -epóxido, como se muestra en la Figura 1.1.

Con respecto al anillo B, se conocen cuatro tipos de BRs naturales: con estructuras de 7-oxalactona

(7-oxa-6-ona), 6-oxo (6-ceto), 6-deoxo y 6 α -hidroxi.

En cuanto a la cadena lateral del esqueleto de colestano, los BRs naturales se agrupan en 7 categorías. Los más abundantes y ampliamente distribuidos tienen un sustituyente 24 S -metil; también son posibles las sustituciones 24 R -metil (24-epibrassinosteroides), 24 S -etil (28-homobrassinosteroides), 24-metileno, 24-etilideno, 24-metilen-25-metil, o sin sustituyente en C-24 (28-norbrassinosteroides). Además, casi todos los BRs poseen un diol vecinal 22 R , 23 R . Existe un 23-oxo brassinosteroide, que se considera un producto de metabolización.⁸

Figura 1.1. Variaciones estructurales en brassinosteroides naturales.



1.1.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS BRASSINOSTEROIDES EN LA NATURALEZA.

Los brassinosteroides se han hallado en una amplia variedad de especies vegetales, incluyendo plantas superiores (angiospermas y gimnospermas) e inferiores (algas y helechos). Además, se encuentran presentes en todos los órganos estudiados: hojas, tallos, raíces, y principalmente semillas y polen. Generalmente, el polen contiene altas concentraciones de brassinosteroides, del orden del miligramo por gramo de peso húmedo. En comparación, el resto de los tejidos vegetales normalmente contienen sólo nanogramos de BRs por gramo de tejido húmedo.

Como ejemplo de la amplia distribución de los BRs en la naturaleza, se pueden enumerar algunas de las especies donde se han hallado⁷:

Monocotiledóneas: *Oryza sativa* (arroz), *Secale cereale* (centeno), *Triticum aestivum* (trigo), *Zea mays* (maíz),

Lilium longiflorum (lirio), *Tulipa gesneriana* (tulipán).

Dicotiledóneas: *Beta vulgaris* (remolacha), *Helianthus annuus* (girasol), *Brassica napus* (nabo), *Raphanus sativus* (rábano), *Arabidopsis thaliana*, *Castanea crenata* (castaño), *Phaseolus vulgaris* (poroto), *Vicia faba* (haba), *Cannabis sativa*, *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Thea sinensis* (te verde), *Apium graveolens* (apio).

Gimnospermas: *Cupressus arizonica* (ciprés de Arizona), *Pinus thumbergii* (pino negro), *Pinus silvestris* (pino escocés), *Cryptomeria japonica* (cedro japonés).

Algas y helechos: *Hydrodictyon reticulatum*, *Esquisetum arvense*, *Marchantia polymorpha*.

1.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE BRASSINOSTEROIDES NATURALES.

1.2.1. BIOENSAYOS.

Dado que los BRs están presentes en las plantas en muy baja concentración, su identificación requiere bioensayos sensibles y específicos que sean capaces de discriminar su acción de otras hormonas endógenas. Los bioensayos utilizados fueron diseñados para el estudio de otras hormonas vegetales, y fueron adaptados para el análisis de BRs. Se describirán brevemente algunos de ellos:

Elongación del primer entrenudo del poroto: desarrollado originalmente para auxinas⁹, consiste en medir la elongación inducida por la aplicación conjunta del brassinosteroide y una auxina sobre el primer entrenudo en plántulas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) etioladas. Se pueden detectar¹⁰ concentraciones de BRs cercanas a 10^{-10} M.

Elongación del segundo entrenudo del poroto: es similar al anterior. Fue el primer bioensayo específico para BRs², y es capaz de detectar dosis cercanas a los 10 ng.

Desenrrolle de la hoja de trigo: se incuban segmentos de hojas obtenidas a partir de plántulas de trigo¹¹ (*Triticum aestivum*). Los BRs promueven el desenrrolle completo de los segmentos a una concentración de 10 ng / ml.

*Elongación del epicotilo de soja*¹²: se incuban segmentos de epicotilos de plántulas jóvenes de soja (*Glycine max* L.) en una solución del BR en estudio. Se mide la elongación del epicotilo inducida por el compuesto.

Inclinación de la lámina de arroz (ILA): desarrollado por Maeda⁵ para el estudio de auxinas sintéticas, es

el bioensayo más sensible disponible para BRs. Pueden emplearse plántulas enteras de arroz (*Oryza sativa*) o explantes. En el caso de plántulas enteras, se inyecta una solución del BRs por debajo de la zona ligular. El crecimiento diferencial de las células de la zona adaxial a la lígula provoca la inclinación de la lámina.¹³ El límite de detección para el brassinólido¹⁴ es de 50 pg / ml.

Este ensayo fue utilizado para la evaluación de la actividad de los brassinosteroides sintetizados en el presente trabajo.

1.2.2 MÉTODOS MICROANALÍTICOS.

La baja concentración de los BRs en las plantas hace que el aislamiento y purificación para la posterior caracterización no sea una metodología práctica. Esto llevó al desarrollo de métodos instrumentales en los cuales es posible trabajar con extractos parcialmente purificados obtenidos a partir de una cantidad limitada de material vegetal.

*Cromatografía gaseosa – espectrometría de masas*¹⁵: Todos los BRs conocidos poseen al menos un par de hidroxilos vecinales en la cadena lateral. De esta manera, al tratar el extracto en estudio con ácido metanborónico en las condiciones apropiadas, los BRs presentes se derivatizan como metanboronatos cíclicos volátiles que se analizan por CG acoplada a espectrometría de masas.

En los espectros de masas obtenidos por impacto electrónico, generalmente, puede detectarse el ión molecular correspondiente al derivado. Además, se conocen las fragmentaciones típicas de estos derivados, con lo que se puede obtener información estructural de los BRs presentes en el extracto, según se muestra en la Figura 1.2.

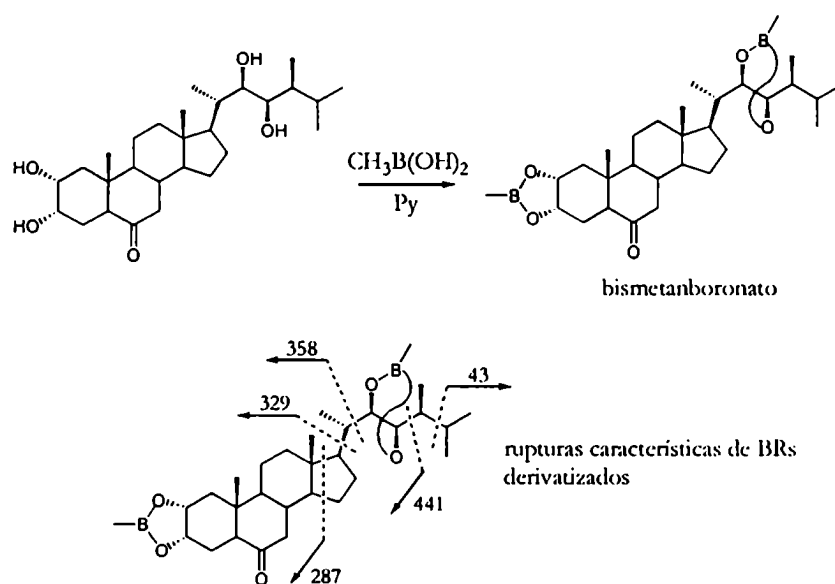


Figura 1.2. Derivatización de BRs para su análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas.

La identificación inequívoca requiere, en todos los casos, el uso de patrones obtenidos por síntesis química.

*Cromatografía líquida*¹⁶: Debido a que los brassinosteroides no poseen grupos cromóforos, se han desarrollado métodos de derivatización que permiten utilizar detectores de absorción ultravioleta, de fluorescencia o electroquímicos. Los límites de detección dependen del tipo de derivado formado; en particular los obtenidos a partir del ácido dansilaminofenilborónico, que reacciona con el diol vecinal de la cadena lateral, permiten la detección fluorimétrica de cantidades tan bajas como 25 pg. Como se muestra en la Figura 1.3, los brassinosteroides derivatizados pueden ser separados usando columnas de fase reversa con acetonitrilo-agua como fase móvil.

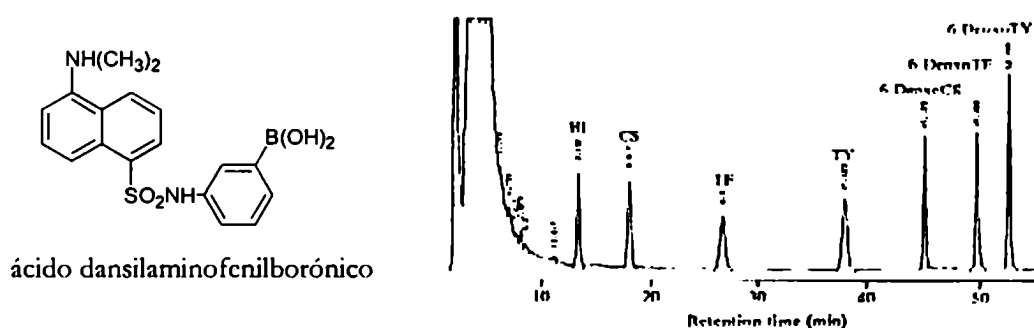


Figura 1.3. Ejemplo de análisis por HPLC de un extracto conteniendo BRs derivatizados como dansilaminofenilboronatos. (Referencia 16).

En la actualidad se está haciendo más extensivo el uso de los métodos de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas, usando tanto ionización química a presión atmosférica como ionización por electrospray. Estas técnicas han permitido descubrir, por ejemplo, BRs esterificados con ácidos grasos.¹⁷

1.3. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE BRASSINOSTEROIDES.

Poco tiempo después del descubrimiento del brassinólido surgieron propuestas sobre su posible origen biosintético.¹⁸ Resultó natural suponer que el campesterol, un esteroide abundante en los vegetales, y con el mismo esqueleto carbonado de C_{28} , fuera el precursor del brassinólido. Cuando se descubrieron otros BRs, tales como castasterona (CS), tifasterol (TY) y teasterona (TE), se supuso que los mismos podrían ser los intermediarios en la biosíntesis de BL a partir de campesterol. Se observó que la capacidad de promover el crecimiento vegetal de estos compuestos aumentaba según la secuencia *campesterol* $\rightarrow$ *TE* $\rightarrow$ *TY* $\rightarrow$ *CS* $\rightarrow$ *BL*, lo que sirvió para postular la ruta biosintética hipotética presentada en la Figura 1.4.

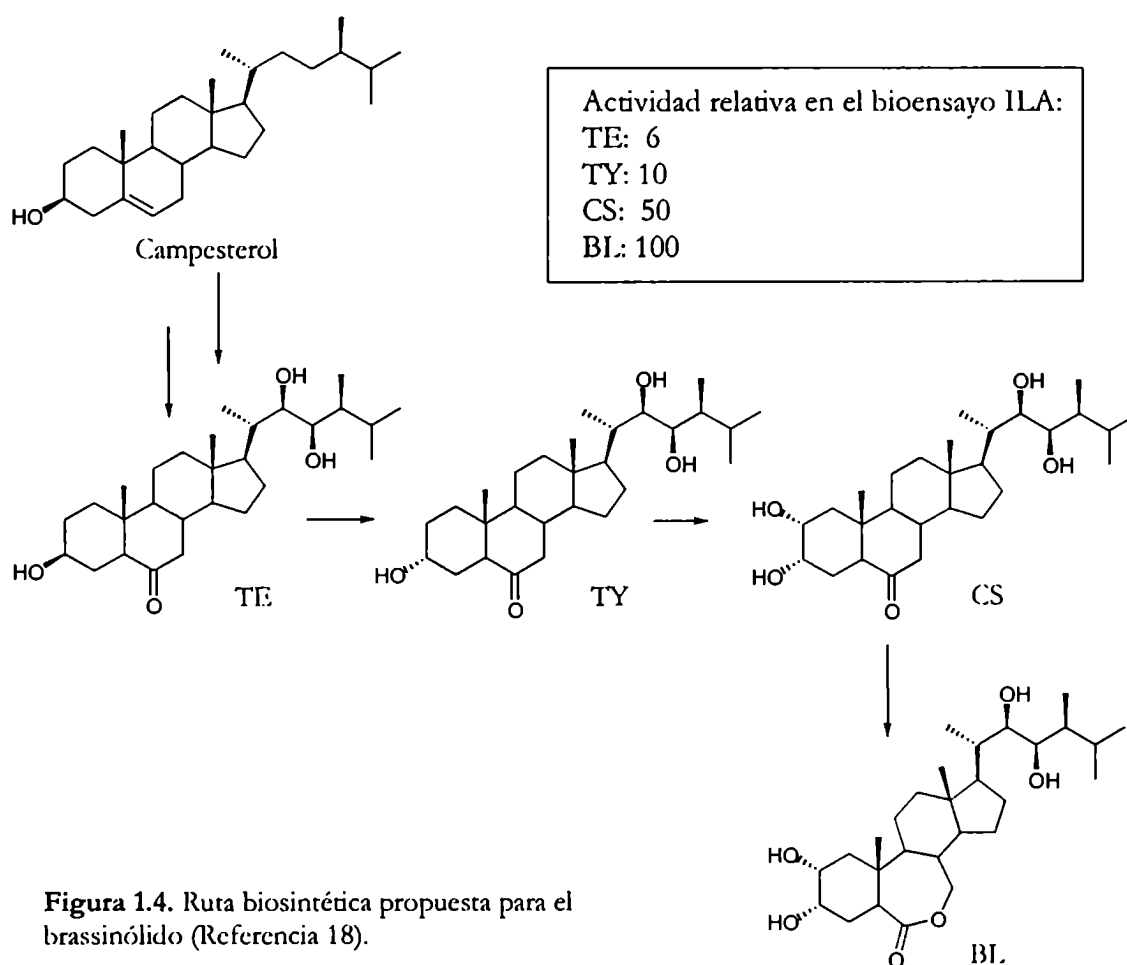
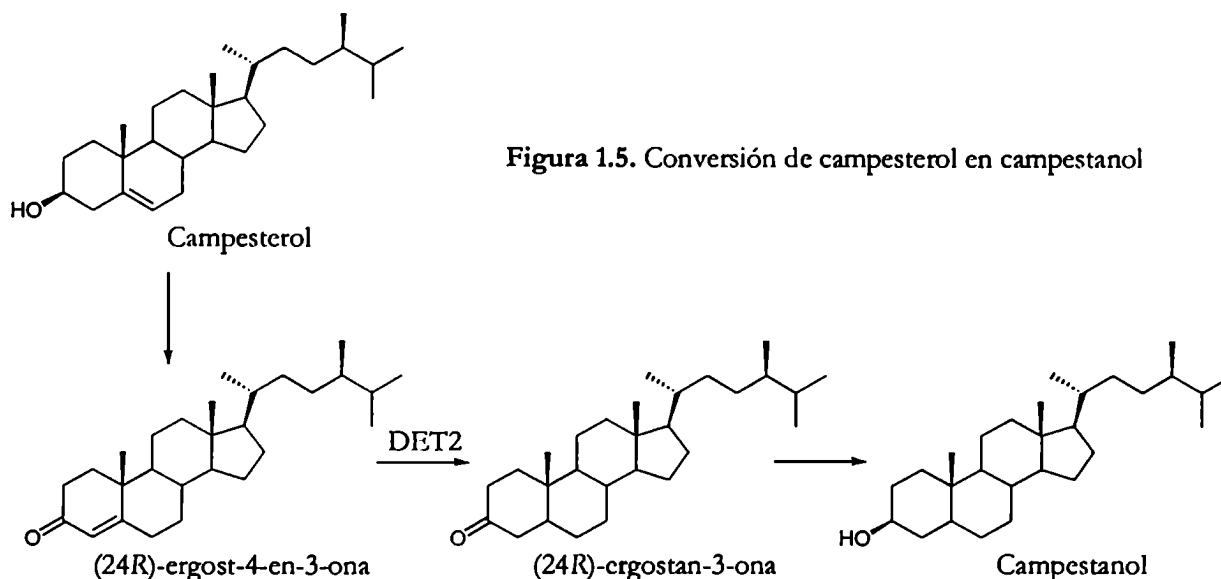


Figura 1.4. Ruta biosintética propuesta para el brassinólido (Referencia 18).

Numerosas investigaciones han permitido confirmar y ampliar esta secuencia. La primera evidencia directa¹⁹ provino de estudios con cultivos de células de *Catharanthus roseus*. Se sintetizaron una variedad de posibles precursores de BRs marcados con deuterio. En una experiencia típica se incubaba un posible precursor (generalmente un 26,28-dideuteroesteroide) en presencia de suspensiones celulares y se analizan los metabolitos mediante cromatografía de gases – espectrometría de masas, la única técnica que por su sensibilidad permite este tipo de análisis bioquímico. Identificando los metabolitos deuterados producidos puede establecerse la relación biosintética entre los distintos compuestos.

Recientemente se han identificado mutantes de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum* deficientes en brassinosteroides, y se ha demostrado que dicha deficiencia se debe a fallos en pasos específicos de la biosíntesis de BRs.^{20, 21} Estas mutantes muestran un crecimiento reducido y alteraciones morfológicas que pueden ser revertidas por BRs exógenos (Sección 1.6.1). Mediante los estudios bioquímicos y genéticos de estas mutantes se pudieron establecer además, con cierto detalle, las bases moleculares de la biosíntesis, que se describen a continuación.

La Figura 1.5 muestra que la oxidación e isomerización del campesterol genera (24R)-ergost-4-en-3-ona, que es reducida por una 5 α -reductasa codificada por el gen *det2*. La proteína DET2 presenta una alta homología con la enzima de mamíferos que cataliza la reducción de testosterona a dihidrotestosterona.²² Una posterior reducción del carbonilo genera campestanol, el cual sigue su camino hacia el BL.



Los pasos que conducen desde el campestanol hasta el brassinólido consisten en la introducción de los hidroxilos en la cadena lateral y la funcionalización de los anillos A y B, y puede ocurrir por dos vías alternativas. El camino que tiene como primera etapa la introducción del carbonilo en C-6 se conoce como la *ruta de oxidación temprana del C-6*, mientras que si el carbonilo se introduce en etapas posteriores, se habla de una *ruta de oxidación tardía del C-6*. Ambas rutas se encuentran resumidas en la Figura 1.6.

1.3.1. LA RUTA DE OXIDACIÓN TEMPRANA DEL C-6

Si se incuban células de *C. roseus* en presencia de campestanol enriquecido con ^{14}C , se pueden identificar como metabolitos 6 α -hidroxicampestanol y 6-oxocampestanol, los cuales son además endógenos en los vegetales. Se demostró que en el paso siguiente la enzima DWF4 oxida el C-22 para generar 22R-hidroxi-6-oxocampestanol, conocido como cathasterona.²³ Posteriormente, la enzima CPD introduce otro hidroxilo en C-23 dando así teasterona.²⁰ Estas dos enzimas son monooxigenasas del tipo citocromo P450, similares a las hidroxilasas de mamíferos.

La teasterona se transforma en tifasterol por inversión reversible del hidroxilo 3 β a 3 α , teniendo a 3-dehidroteasterona como intermediario.²⁴ Finalmente, otro citocromo, la enzima DDWF1 introduce un hidroxilo en C-2 para generar castasterona²⁵, que se transforma en brassinólido mediante una

oxidación del tipo Baeyer-Villiger. Hasta el momento no se conocen las enzimas involucradas en este último proceso, que, se sabe, ocurre a nivel microsomal.

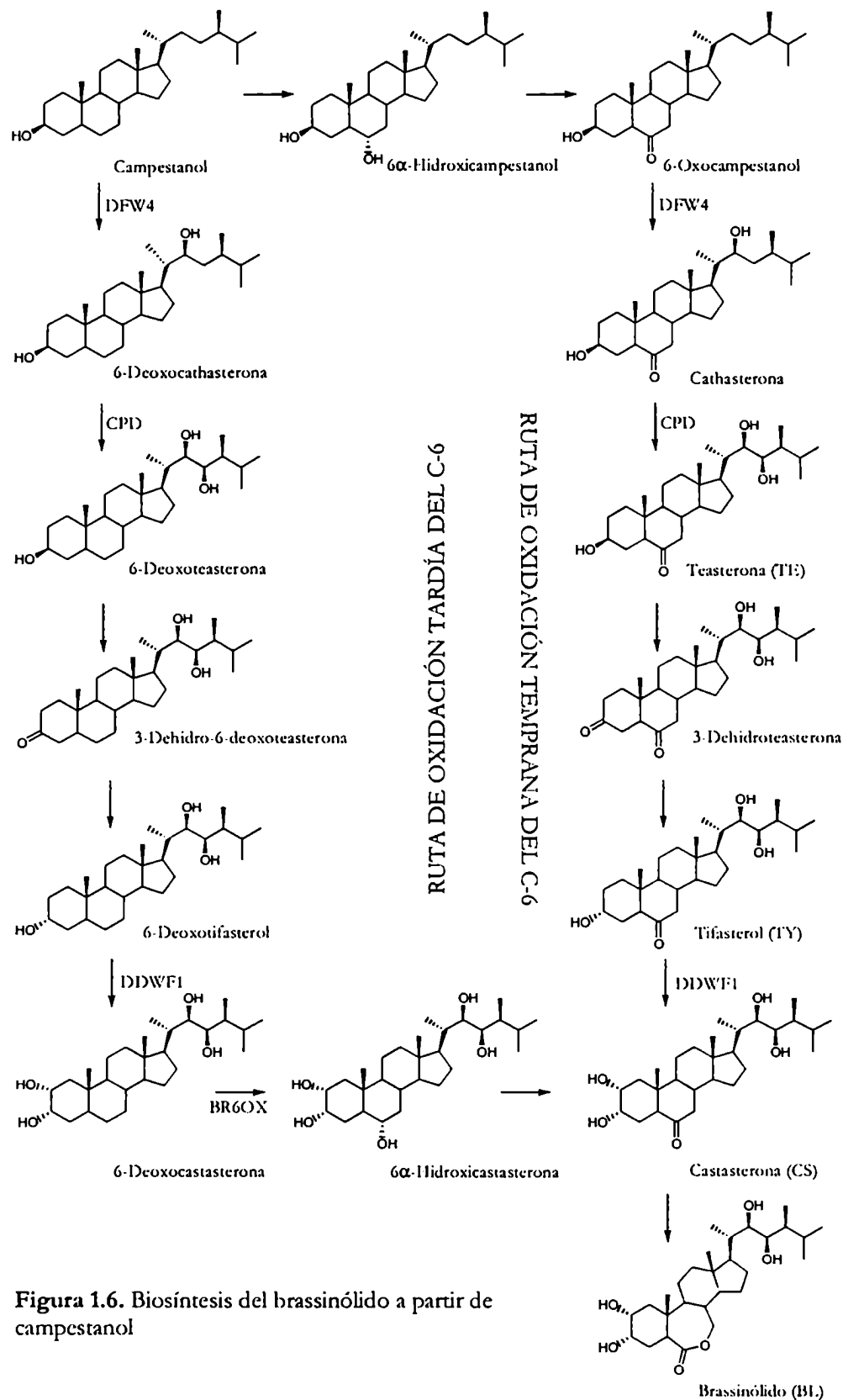


Figura 1.6. Biosíntesis del brassinólido a partir de campestanol

1.3.2. LA RUTA DE OXIDACIÓN TARDÍA DEL C-6.

Esta es una ruta paralela a la descrita anteriormente, en la cual los intermediarios no poseen el carbonilo en C-6. Si bien todos estos compuestos habían sido hallados como BRs endógenos, se suponía que eran productos secundarios, sin función biológica. Sin embargo se ha demostrado que la vía opera normalmente en los vegetales, aunque su regulación parece ser distinta a la ruta de oxidación temprana.

En esta ruta, el campestanol es oxidado sucesivamente en C-22 y C-23 por las enzimas DWF4 y CPD, el intermediario formado, la 6-deoxoteasterona, sufre inversión del hidroxilo 3β para generar 6-deoxotifasterol, que se convierte en 6-deoxocastasterona. La enzima BR6OX, también perteneciente a la familia de los citocromos, cataliza la oxidación en C-6 para generar castasterona via 6α -hidroxycastasterona.²⁷ De esta forma, esta ruta converge con la de oxidación temprana del C-6.

El brassinólido es el brassinosteroide más activo, lo que sugiere que es el producto final de la vía biosintética. Sin embargo, su precursor inmediato, la castasterona, tiene una distribución mucho más amplia, incluso se encuentra en especies donde no se ha detectado el brassinólido: esto puede indicar que la castasterona es activa *per se* y, por ende, sería responsable de funciones hormonales en ciertos tejidos.

Se cree que el esquema biosintético mostrado no es completo: algunos estudios preliminares efectuados con mutantes dobles de *Arabidopsis* sugieren que existe una mayor interconexión entre los dos caminos propuestos²⁸, aunque no hay todavía evidencia experimental directa.

1.3.3. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS.

El brassinólido y sus precursores biosintéticos de C_{28} con un metilo con configuración R en el C-24 son los más abundantes y más ampliamente distribuidos en los vegetales, mientras que los BRs de C_{27} y C_{29} se encuentran en menor concentración, y en un número restringido de especies. La existencia de estos BRs se explica por la presencia, junto al campesterol, de otros esteroides, tales como colesterol y sitosterol, que servirían como precursores biosintéticos de estos BRs minoritarios. (Figura 1.7).

Evidencias recientes²⁹ sugieren que la introducción del hidroxilo en C-22 sería el paso que regula la abundancia relativa de las distintas familias de BRs, pues la enzima DWF4, responsable de esta oxidación, parece tener mayor afinidad por sustratos del tipo C_{28} frente a otros esteroides.

Los niveles endógenos de esteroides tales como campesterol y 6-oxocampesterol son del orden mM, mientras que los BRs con hidroxilos en la cadena lateral sólo se presentan en concentraciones de nivel nM, lo que sugiere que la hidroxilación de la cadena es el paso limitante de la biosíntesis. La

expresión del gen *cpd* en *Arabidopsis* (que codifica para la enzima responsable de la hidroxilación en C-22) disminuye en presencia de brassinólido y otros intermediario con hidroxilos en C-22 y C-23, lo que demuestra que hay un control por retroalimentación negativa a este nivel de la biosíntesis.³⁰

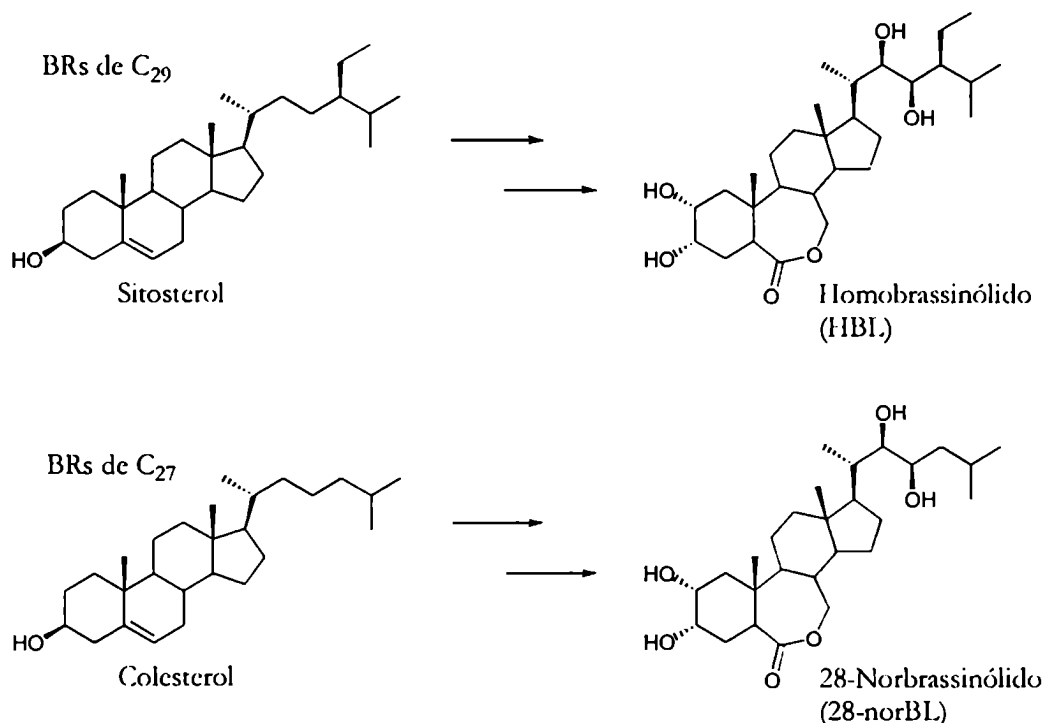


Figura 1.7. Fitosteroles como origen biosintético de los BRs naturales minoritarios.

Por otro lado, los dos caminos biosintéticos mostrados operan en paralelo, aunque hay evidencia de que el camino de oxidación temprana es más activo en la oscuridad, mientras que el oxidación tardía se activa en condiciones de iluminación³¹, indicando que de alguna manera la biosíntesis está regulada por la luz: Recientemente se ha encontrado que el paso de hidroxilación en C-2, catalizado por la enzima DDWF1 está acoplado, mediante una proteína G, con la percepción de la luz a través de los fitocromos.²⁵

1.3.4. LOCALIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS.

Como se comentó anteriormente, el análisis mediante técnicas de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, permitió demostrar que los BRs se hallan normalmente presentes en todos los tejidos de un vegetal, siendo mayor la concentración en los órganos reproductivos y en crecimiento; sin embargo, no quedaba claro si la producción de BRs era específica de algún órgano en particular y si había procesos de transporte que justificaran la distribución desigual observada.

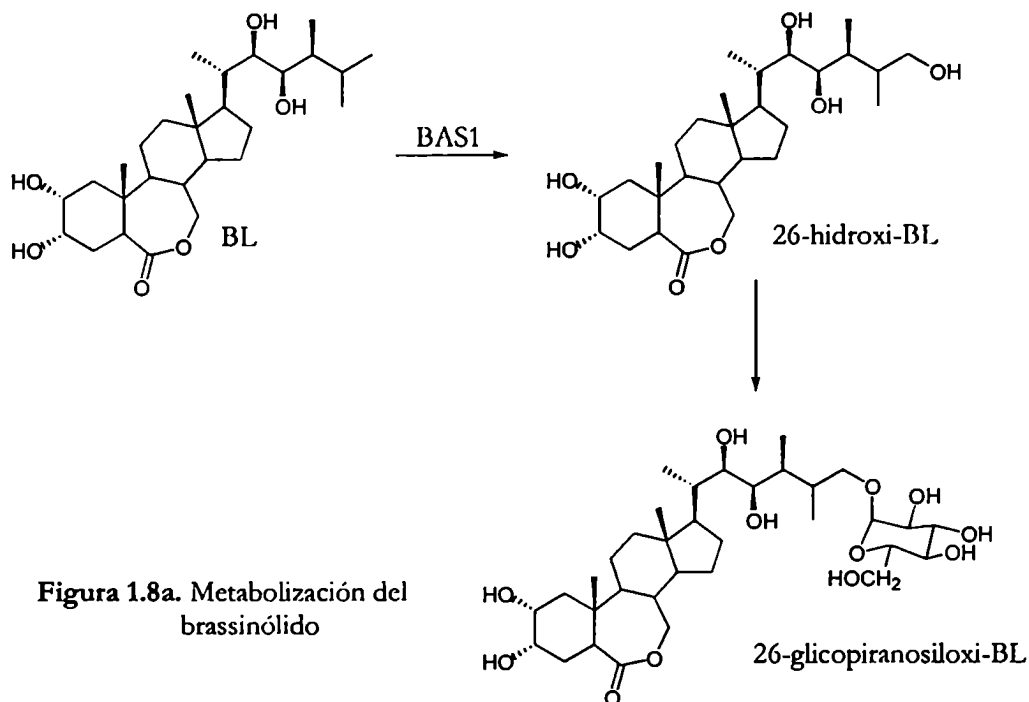
En un estudio reciente³² se demostró que la expresión de los genes biosintéticos, y por lo tanto la biosíntesis, es particularmente activa en los tejidos jóvenes en desarrollo. Esto sugiere que los BRs se generan principalmente en los mismos tejidos sobre los cuales actúan.

Por otro lado, se ha descrito³³ que la proteína BET v1, aislada del polen de abedul, tiene una alta afinidad por el brassinólido. Esta proteína presenta una estructura tridimensional muy similar a las transportadoras de colesterol en mamíferos. Este hallazgo sugiere que los brassinosteroides podrían unirse a proteínas específicas para ser transportados a través de los tejidos.

1.4. ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DE BRASSINOSTEROIDES.

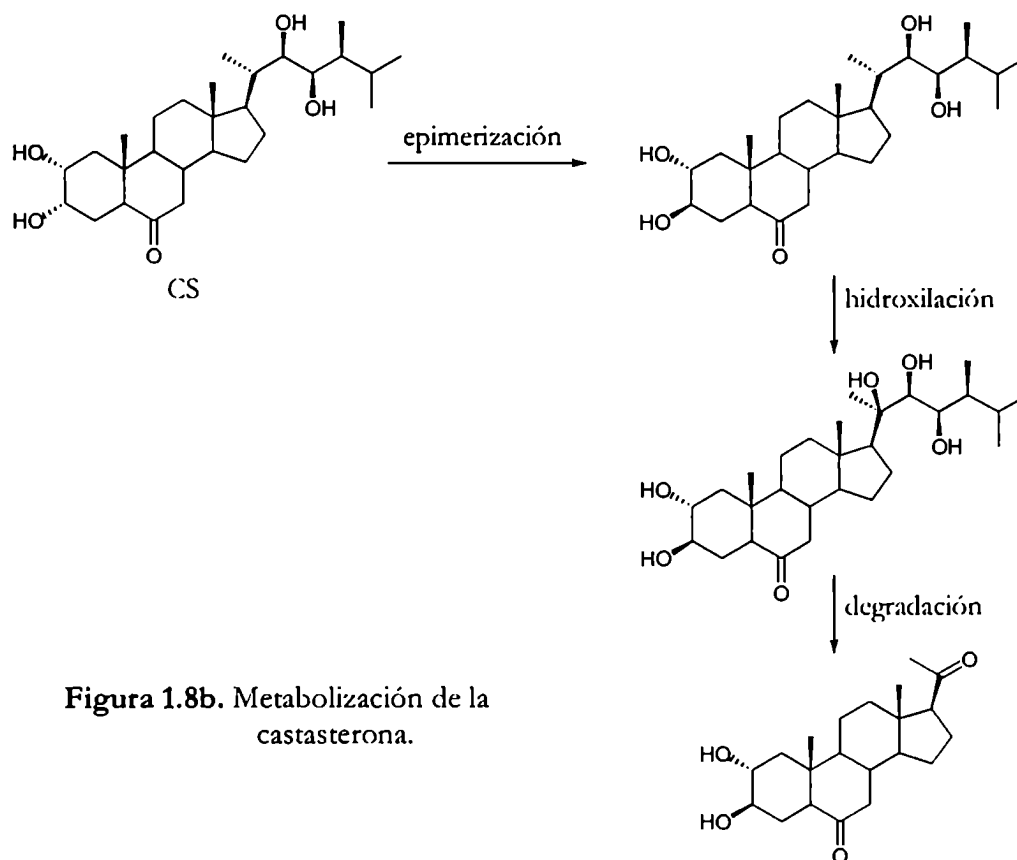
Tras recopilar diversos estudios en distintas especies vegetales, Adam³⁴ postuló dos caminos principales por los cuales se metabolizan los BRs más activos:

Por un lado, es común la oxidación de la cadena lateral por introducción de hidroxilos en C-25 y C-26 y posterior glicosilación, como se ve en la Figura 1.8.a. Se ha encontrado³⁵ que la mutante *bas1* de *Arabidopsis* sobreexpresa la hidroxilasa responsable de la hidroxilación en C-26. Esta mutante presenta niveles bajos de brassinólido y altos de 26-hidroxi-brassinólido y presenta un fenotipo que indica deficiencia de BRs. Notablemente, la expresión del gen *bas1* en plántulas normales, es mayor en las raíces³², sugiriendo que éste sería el órgano encargado de la inactivación de los BRs.



La Figura 1.8.b muestra que también es posible la degradación de la cadena lateral vía hidroxilación

en C-20 y subsecuente ruptura oxidativa del enlace C-20 - C-22. Este proceso suele acompañarse con epimerización del hidroxilo en C-3.



Se ha demostrado³⁶ la existencia de una sulfotransferasa que cataliza la O-sulfonación del hidroxilo en C-22 para generar un producto biológicamente inactivo. Es interesante notar que este tipo de mecanismo de desactivación de hormonas está presente también en mamíferos.

Se han encontrado, además, varios ésteres de ácidos grasos, pero no se sabe si son productos de degradación o una forma inactiva que la célula vegetal utiliza para almacenar o transportar BRs.³⁷

1.5. APLICACIONES AGRONÓMICAS.

Los BRs poseen una serie de propiedades que les confieren gran potencial como agroquímicos³⁸:

Son productos naturales ampliamente distribuidos en los vegetales, por lo tanto están presentes en las cadenas tróficas que incluyen a mamíferos y humanos.

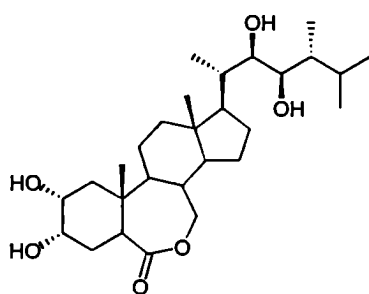
Las plantas responden a dosis muy bajas de BRs (5 a 50 mg / hectárea). En general, el

efecto es de estimulación del crecimiento, lo que se traduce en un aumento de la cantidad y calidad de las cosechas.

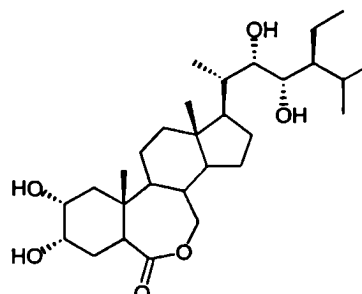
Los BRs incrementan la resistencia contra fitopatógenos y pueden ser usados para sustituir total o parcialmente a algunos de los pesticidas tradicionales perjudiciales para el medio ambiente.

Los BRs pueden aplicarse para el tratamiento de plantas o semillas usando equipamiento y tecnologías sencillas.

Para fines de la década de 1980 dos BRs bioactivos, el 24-epibrassinólido y el isómero no natural 22*S*,23*S* del 28-homobrassinólido fueron seleccionados como candidatos para los ensayos a campo debido a que pueden obtenerse en cantidad mediante síntesis química.



24-epibrassinólido

(22*S*,23*S*)-28-homobrassinólido

Durante varios años se hicieron numerosos estudios utilizando distintas especies vegetales, especialmente en Japón, China, Rusia y algunos países europeos. Incluso ciertas formulaciones conteniendo estos compuestos fueron patentados. Si bien los resultados fueron promisorios en los estudios a nivel de invernadero, las mejoras de las cosechas en las aplicaciones a gran escala no resultaron ser reproducibles. Estos compuestos, que resultan tener una alta actividad en los ensayos biológicos, no son capaces de ejercer un efecto homogéneo cuando se aplican en grandes extensiones de cultivos. Una explicación aceptada es que en los bioensayos habituales se trabaja con una población homogénea de plantas, y la aplicación de los BRs se hace de manera controlada, a intervalos regulares. Estas condiciones no pueden cumplirse fácilmente en los estudios a campo, especialmente si se considera que los individuos en una plantación normal presentan una distribución en cuanto al estadio de desarrollo. Por otro lado, la aplicación sobre la cosecha suele ser única o con períodos prolongados entre dos aplicaciones sucesivas, y debe tenerse en cuenta que los BRs son fácilmente degradados en un ambiente a cielo abierto.

Un problema adicional radica en la baja capacidad de estos compuestos para atravesar las barreras biológicas de los tejidos vegetales, especialmente si se aplican por aspersión.

Pese a estos inconvenientes, se ha demostrado⁹⁹ que, si las condiciones ambientales del cultivo no son óptimas (suelo pobre, frío, sequía, alta salinidad), la aplicación de estos BRs puede mejorar en ciertos casos la producción vegetal entre un 10 y un 40 %.

1.6. ESTUDIOS SOBRE LA ACCIÓN FISIOLÓGICA DE BRASSINOSTEROIDES.

A partir de contar con brassinosteroides sintéticos en cantidades adecuadas, se iniciaron una serie de estudios relacionados con su acción fisiológica en distintas especies. Se estableció que estos compuestos inducen un amplio espectro de respuestas, tanto durante el desarrollo, como durante el crecimiento vegetativo de las plantas: entre otros, los BRs se asocian con los procesos germinativos^{40,41}, de diferenciación vascular⁴², producción de polen y maduración de frutos.⁴³ En general, los efectos suelen ser de promoción del crecimiento, aunque, en ciertos casos (como en las raíces), pueden provocar inhibición del mismo.

Los estudios efectuados demuestran que la aplicación de BRs induce la síntesis de proteínas, hiperpolarización de las membranas celulares. El crecimiento celular viene acompañado por un reordenamiento de los microtúbulos⁴⁴ y fosforilación de proteínas asociadas.

Aunque no se conocen los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos, un estudio reciente⁴⁵ mostró que el brassinólido regula directamente la expresión de al menos 95 genes en *Arabidopsis*, entre los que se incluyen factores de transcripción, genes relacionados con el metabolismo celular, la percepción de la luz, canales de iones, y otros implicados en procesos de elongación y organización de la pared celular.

1.6.1 DESCUBRIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES EN BRASSINOSTEROIDES

Como se mencionó anteriormente, debido a que muchos de los efectos observados son producidos también por otras hormonas vegetales, en una primera instancia se consideró que los BRs no eran esenciales para el desarrollo normal de las plantas.

La evidencia definitiva de que los BRs deben considerarse como un nuevo tipo de hormonas provino de un campo de estudio completamente diferente: el análisis genético de la fotomorfogénesis vegetal. En las plantas, el crecimiento inmediatamente posterior a la germinación ocurre generalmente por debajo de la superficie del suelo, y las plántulas nacientes deben exponer sus hojas a la luz solar para poder comenzar con la fotosíntesis. Una plántula etiolada, con cotiledones cerrados y un hipocotilo en elongación rápida puede alcanzar la superficie sin dañar sus hojas jóvenes. Una vez alcanzada la luz solar, el tipo de crecimiento cambia: los cotiledones se expanden, se desarrollan hojas, se inducen los genes relacionados con las funciones fotosintéticas mientras que se inhibe el crecimiento del hipocotilo, el cual se vuelve más grueso y se transforma en el tallo. El cambio de un desarrollo adaptado a un ambiente subterráneo a otro apropiado para condiciones de iluminación se conoce como fotomorfogénesis o deetiación.⁴⁶

Durante un estudio sobre este proceso se descubrieron mutantes de *Arabidopsis* que, cuando crecen en la oscuridad, presentan características propias de plantas crecidas en la luz. De las 18 mutantes encontradas, la denominada *det2* (de-etiolated 2) crece en la oscuridad con múltiples alteraciones,

como hipocotilos cortos, y cotiledones expandidos y abiertos (Figura 1.9). En la luz, las mutantes *det2* presentan enanismo y fertilidad reducida, y responden mal a las fluctuaciones de la luz ambiente.⁴⁷

Se determinó que las mutantes *det2* poseen alteraciones en un gen del cromosoma 2, al que se denominó DET2. Este gen codifica para una proteína que muestra alta homología con las 5 α -reductasas que intervienen en la biosíntesis de esteroides en animales. Posteriormente, se demostró que esta enzima está implicada en la conversión de campesterol a campestanol (Figura 1.5), y por lo tanto en la biosíntesis de brassinosteroides. La mutante *det2* posee menos de un 10% del contenido de BRs que la variedad salvaje. Además, el fenotipo mutante puede revertirse en gran medida al normal si las plántulas de *det2* crecen en presencia de brassinosteroides.²² Con toda esta evidencia pudo concluirse que los brassinosteroides son esenciales para el normal desarrollo vegetal y deben considerarse como un nuevo grupo de hormonas vegetales. Desde ese momento, se han descrito nuevas mutantes deficientes en la biosíntesis o percepción de BRs, tanto en *Arabidopsis* como en otras especies (tomate, arveja), lo que ha demostrado definitivamente ese hecho.

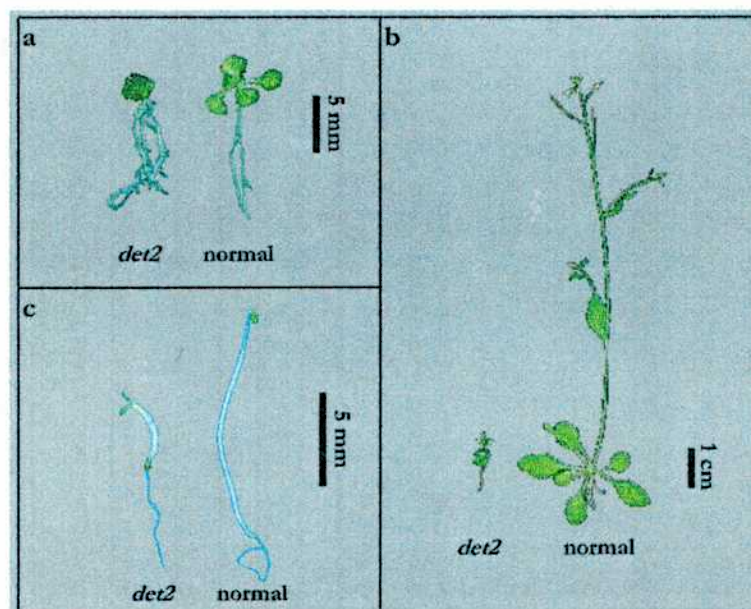


Figura 1.9. Mutantes de *A. thaliana* deficientes en BRs. a) Plántulas de 10 días crecidas en condiciones de iluminación. b) Las mismas plantas, luego de 5 semanas. c) Plántulas etioladas de 8 días.

1.6.2. PERCEPCIÓN DE LOS BRASSINOSTEROIDES Y TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL.

La evidencia acumulada hasta el momento parece sugerir una cierta analogía entre los BRs y las hormonas esteroidales de mamíferos e insectos. De ser así, es de esperar que exista algún tipo de receptor celular que, al unirse con los BRs, dispare las diversas respuestas fisiológicas.

En 1996 se descubrió una mutante de *Arabidopsis* cuyas características fenotípicas son similares a las de *det2*, pero que, a diferencia de otras mutantes biosintéticas, no revierte al estado normal por agregado exógeno de BRs.⁴⁸ Esta mutante se conoce como *bri1* (brassinosteroid-insensitive 1), y se

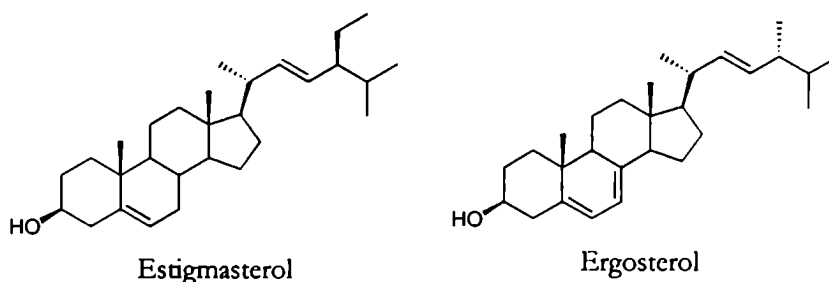
ha demostrado que posee defectos en una quinasa de la membrana celular.⁴⁹ Posteriormente, se determinó que la quinasa BRI1 tiene una gran afinidad por los brassinosteroides⁵⁰, y que luego de su unión, desencadena una cascada compleja de reacciones cuyo efecto final es la activación de genes específicos, por lo que se cree que BRI1 es parte del receptor de BRs. Actualmente, se está estudiando el mecanismo por el cual el receptor BRI1 transmite la señal al interior celular: los primeros resultados⁵¹ muestran que algunos de los intermediarios involucrados presentan una gran homología con elementos similares de mamíferos e invertebrados.

Un estudio reciente⁵² demostró, además, la posible existencia de caminos alternativos para la percepción de los brassinosteroides, en los cuales intervendrían otros receptores distintos a BRI1, aún no identificados.

1.7. SÍNTESIS DE BRASSINOSTEROIDES.

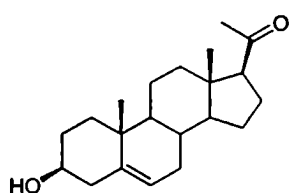
La síntesis de los brassinosteroides naturales comenzó casi inmediatamente luego del descubrimiento del brassinólido en 1979. Prácticamente todas las síntesis publicadas hasta el momento son síntesis parciales, que implican la introducción de los grupos funcionales deseados en el fragmento tetracíclico y en la cadena lateral del esteroide de partida.

Un punto importante en estas síntesis es la elección del esteroide de partida: en casi todos los casos se ha elegido estigmasterol o ergosterol, que son muy accesibles, y que pueden utilizarse para la preparación de los correspondientes brassinosteroides de C_{29} y C_{28} , en procedimientos que no requieren la reconstrucción de la cadena lateral. Por otro lado, la presencia del doble enlace Δ^{22} da la posibilidad de reemplazar parte de la cadena lateral via un aldehído en C-22.

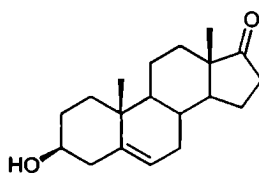


Otros esteroides adecuados que han sido utilizados como productos de partida son el crinosterol y el brassicasterol, aunque estos compuestos no son tan accesibles, un factor a tener en cuenta en las síntesis en gran escala.

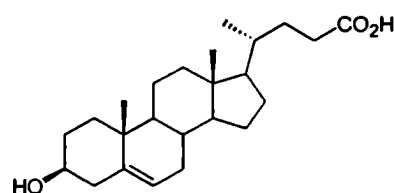
También se han publicado algunas síntesis (especialmente de análogos de BRs) que parten de otros materiales abundantes como pregnanos, androstanos, ácidos cólicos y sapogeninas.



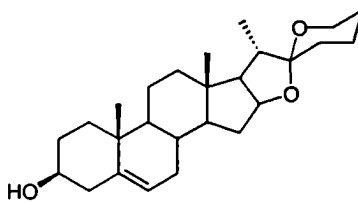
Pregnenolona



Androstenolona



Ácido hiodeoxicólico



diosgenina
(una sapogenina)

A continuación se describirán las estrategias generales usualmente utilizadas en la síntesis de brassinosteroides y sus análogos.

1.7.1. SÍNTESIS DEL FRAGMENTO CÍCLICO.

Los métodos más empleados para la formación del sistema 2,3-dihidroxi-6-ceto, propio de los BRs, se conocen de la química clásica de esteroides. En estos métodos el carbonilo en C-6 se genera primero, seguido por introducción del doble enlace Δ^2 y su posterior dihidroxilación.

La manera más directa de introducir el carbonilo en C-6 es la hidrobioración del doble enlace Δ^5 seguido por oxidación del alcohol intermediario⁵⁹. Este método no es compatible con la presencia de otros dobles enlaces en la molécula.

Una alternativa universalmente empleada se basa en el reordenamiento de los 3 β -sulfonatos derivados

de los Δ^5 -esteroides que genera los 3,5-ciclo-6 β -hidroxi esteroides correspondientes⁵⁴, que pueden oxidarse para dar la cetona en C-6. El ciclopropano del intermediario puede transformarse alternativamente en las cetonas sustituidas^{55,56} en C-3, o en el doble enlace Δ^2 , que puede dihidroxilarse para dar el diol 2 α ,3 α correspondiente.⁵⁷ En la Figura 1.10 se muestran, además, rutas alternativas que también han sido utilizadas para realizar estas transformaciones.⁵⁸

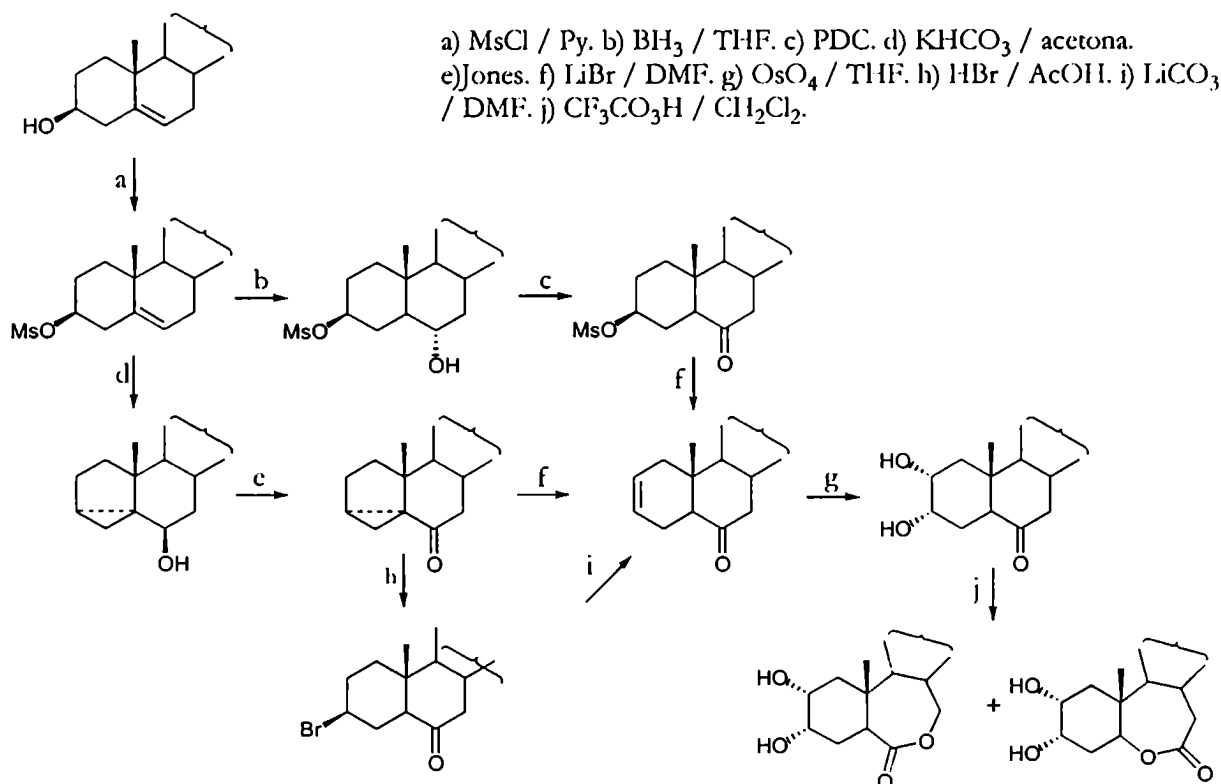
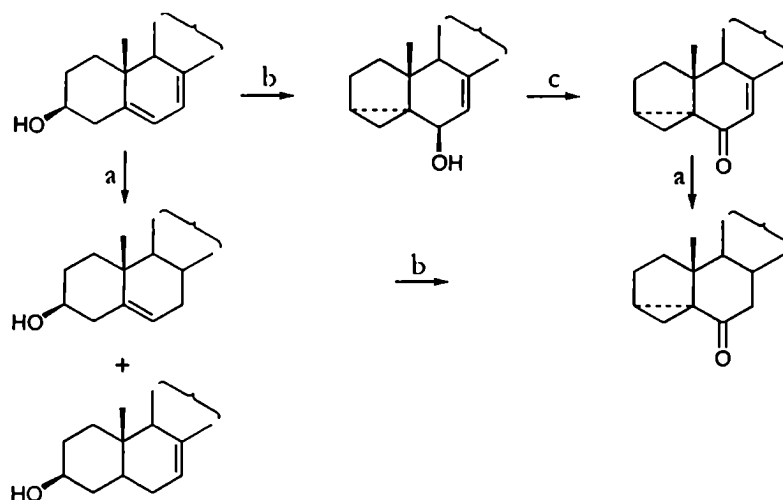


Figura 1.10. Construcción de los anillos A y B de brassinosteroides.

La oxidación de los 6-cetoesteroides mediante la reacción de Baeyer – Villiger es el método estándar para la formación de la lactona⁵⁹ en el anillo B. Esta reacción genera la mezcla de los regioisómeros 7-oxa y 6-oxa en proporción variable, por lo que se han hecho algunos intentos para obtener el isómero deseado exclusivamente.⁶⁰

Si el esteroide de partida es ergosterol (empleado para las síntesis de 24-epibrassinosteroides), la presencia del dieno conjugado $\Delta^{5,7}$ en el anillo B hace necesario un paso adicional de reducción. La reducción puede efectuarse inicialmente para generar el esteroide 3 β -hidroxi- Δ^5 (de manera no selectiva, pues se obtiene también el isómero Δ^7 no deseado); o, más eficientemente, en un paso posterior de la síntesis⁶¹, como se muestra en la Figura 1.11



a) Li / NH₃. b) i) MsCl / Py ii) NaHCO₃ / acetona / agua. c) Jones.

Figura 1.11. Construcción de los anillos A y B partiendo de ergosterol

Una revisión exhaustiva de las estrategias sintéticas para la construcción de los anillos A y B en BRs puede encontrarse en Teme Centurión⁶² o Khripach.⁵⁸

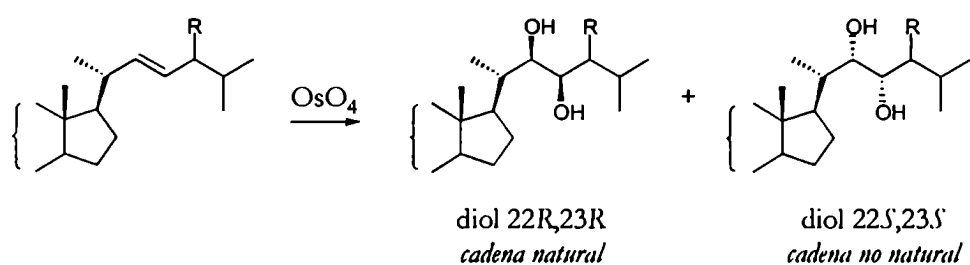
1.7.2. SÍNTESIS DE LA CADENA LATERAL.

Las aproximaciones sintéticas a las cadenas laterales de los BRs pueden dividirse en dos grupos principales: o bien se conserva el esqueleto de carbono del esteroide de partida, o se reconstruye dicha cadena mediante formación de nuevos enlaces carbono-carbono. En ambos casos, el paso clave es la introducción del diol en C-22 y C-23 con la estereoquímica correcta.

A) CONSERVANDO LA CADENA DEL ESTEROIDE DE PARTIDA.

Esta alternativa es adecuada cuando el esteroide de partida tiene un doble enlace Δ^{22} . De esta manera, pueden sintetizarse 28-homobrassinosteroides a partir de estigmasterol y 24-epibrassinosteroides a partir de ergosterol. La dihidroxilación del doble enlace Δ^{22} con tetróxido de osmio suele dar mayoritariamente el diastereómero no natural 22*S*,23*S*. La cantidad obtenida de cada diastereómero depende, en general, de las condiciones de reacción y, especialmente, del tamaño y configuración del sustituyente en C-24.

La estereoquímica de esta reacción puede entenderse si se admite que la cadena lateral de los esteroides es relativamente rígida y que el ataque del tetróxido de osmio ocurre por la cara menos impedida del doble enlace.⁶³



Si bien hubo intentos de obtener selectivamente los dioles con configuración 22R,23R mediante estrategias distintas a la simple dihidroxilación con tetróxido de osmio^{64,65}, las mismas presentaron una baja eficiencia.

Una mejora notable en la síntesis se introdujo cuando se aplicó la dihidroxilación asimétrica de alquenos desarrollada por Sharpless⁶⁶ para la oxidación de esteroides con un doble enlace Δ^{22} . Eligiendo adecuadamente el auxiliar quiral (derivados de quinina y quinidina) se puede favorecer la formación del diol con la configuración requerida, tal como se muestra en la Tabla 1.1.

El efecto del auxiliar quiral depende de la configuración del sustituyente en C-24.

	Auxiliar	% 22R,23R	% 22S,23S	Ref
	ninguno	18	82	67
	DHQD CLB	89	11	68
	ninguno	13	87	67
	DHQD ₂ (Phal)	80	20	69
	ninguno	37	63	70
	DHQD CLB	90	10	61

Tabla 1.1. Proporción de diastereómeros en la dihidroxilación de la cadena lateral de distintos esteroides

DHQD CLB: 4-clorobenzoato de hidroquinidina.

DHQD₂(Phal): hidroquinidina 1,4-ftalazina dieter

B) CON RECONSTRUCCIÓN DE LA CADENA LATERAL.

En ciertos casos no es posible contar con un esteroide de partida con la cadena lateral adecuada, y es necesario construirla. La presencia de cuatro centros quirales consecutivos hace que éste sea un problema complejo que, hasta la fecha, no puede considerarse resuelto de manera totalmente satisfactoria. En particular, se han publicado numerosas síntesis estereoselectivas de la cadena lateral del brassinólido y otros BRs relacionados. A modo de ejemplo se mencionarán las más recientes y eficientes.

En la Figura 1.12 se plantea el esquema seguido por McMorris y colaboradores.⁷¹ Se partió de estigmasterol, y se preparó un esteroide funcionalizado como aldehído en C-22, obtenido por ruptura oxidativa del doble enlace Δ^{22} . La reacción de tipo aldólica con un furano litiado generó una lactona que se redujo estereoselectivamente. La oxidación del hidroxilo en C-29 (previa protección de los hidroxilos en C-22 y C-23) y posterior decarbonilación generó la cadena deseada del brassinólido protegida como acetónido. El rendimiento fue de un 25 % (partiendo desde el aldehído).

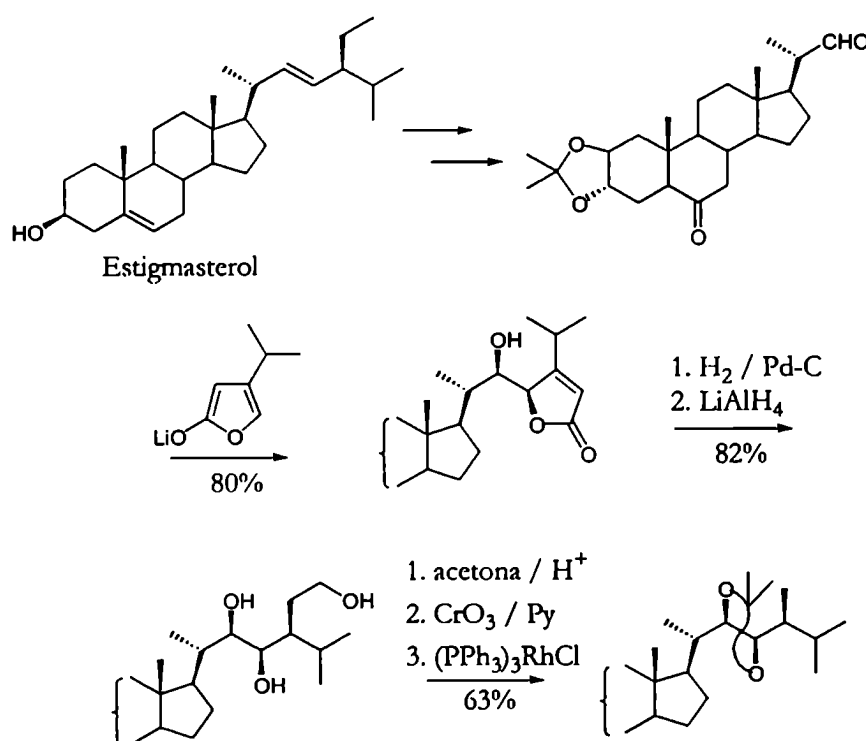


Figura 1.12. Síntesis de la cadena lateral del brassinólido según McMorris y col. (Ref 71)

Otra ruta eficiente diseñada para la obtención de la cadena lateral del brassinólido fue publicada por Marino⁶⁹ en 1996, y se muestra en la Figura 1.13. El aldehído, preparado también a partir de estigmasterol, se condensó con un sulfuro vinílico litiado, y el sulfuro resultante se oxidó con

hidroperóxido de cumeno, en presencia de L-tartrato de dietilo, para dar un sulfóxido quiral. El hidroxilo en C-22 se transformó el mesiloxi derivado, que se desplazó con cianocuprato de metilo en una reacción S_N2' . El sulfóxido se eliminó con t-butillitio, y se dihidroxiló estereoselectivamente el doble enlace formado, obteniéndose así el compuesto deseado.

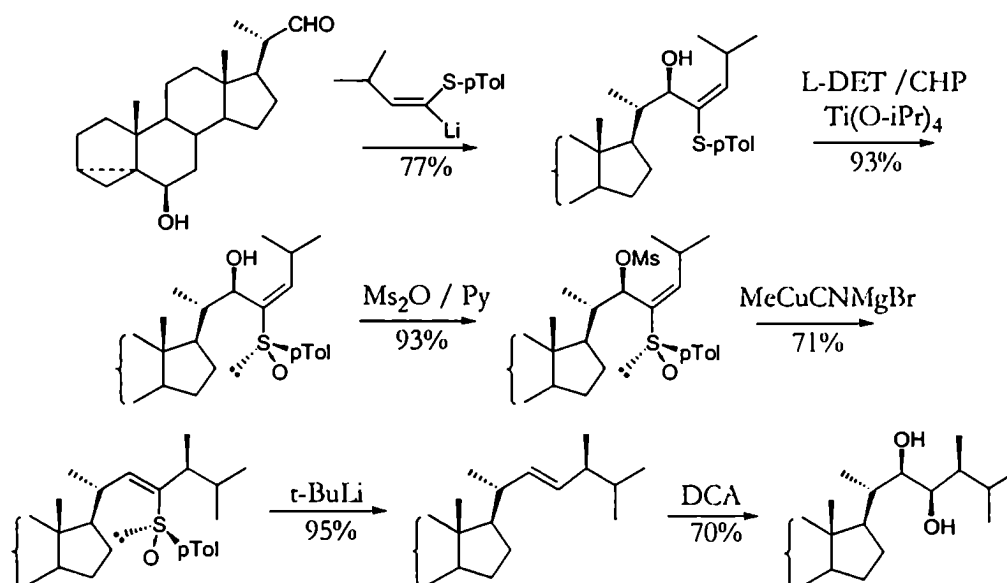


Figura 1.13. Síntesis de la cadena lateral del brassinólido según Marino y col. (Ref 69)

Una síntesis más sencilla es la publicada por Back y colaboradores⁷², que se resume en la Figura 1.14. El aldehído en C-22 se hace reaccionar con un anión derivado de fenilpropilseleniuro (el sustituyente α al centro aniónico voluminoso induce la formación del alcohol 22R). La oxidación

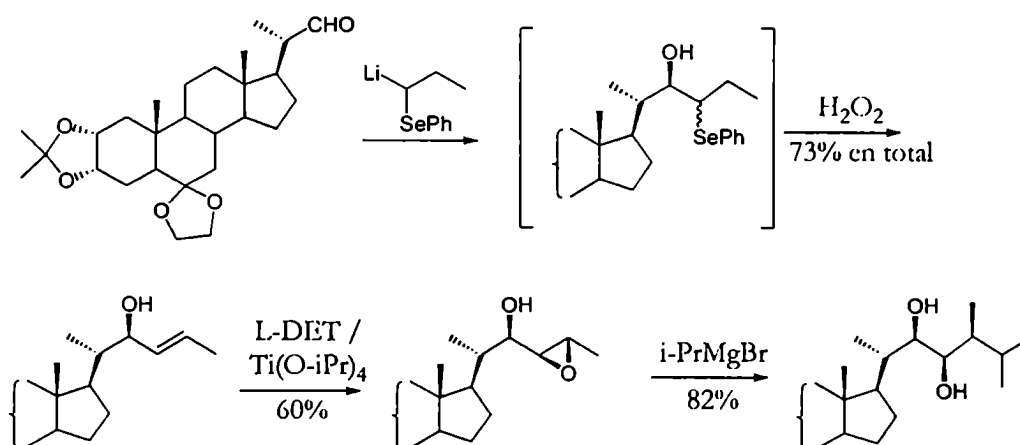


Figura 1.14. Síntesis de la cadena lateral del brassinólido según Back y col. (Ref 72).

del seleniuro intermediario seguida de eliminación dio el alcohol alílico, que se epoxidó estereoselectivamente mediante el método de Sharpless. El ataque de cloruro de isopropil magnesio sobre el epóxido obtenido dio la cadena requerida con un rendimiento del 8% (a partir de estigmasterol).

Finalmente, Watanabe publicó una síntesis en la que el aldehído en C-22, también obtenido a partir de estigmasterol, reacciona con bromuro de (*Z*)-prop-1-enilmagnesio para dar el alcohol que, al sufrir una transposición de Claisen genera estereoespecíficamente el éster correspondiente, según se muestra en la Figura 1.15. El grupo etoxicarbonilo se redujo al metilo, y la posterior dihidroxilación de Sharpless permitió obtener la cadena del brassinólido con un rendimiento del 22% (a partir de estigmasterol).

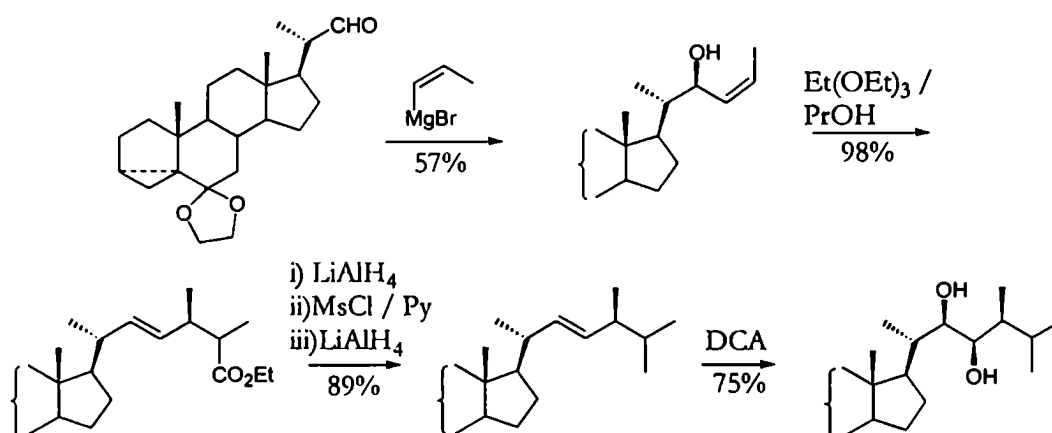


Figura 1.15. Síntesis de la cadena lateral del brassinólido según Watanabe y col. (Ref 73).

1.7.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE BRASSINOSTEROIDES.

La preparación de análogos comenzó luego del descubrimiento del brassinólido, simultáneamente con el aislamiento de nuevos BRs de sus fuentes naturales. La síntesis de análogos permitió abordar estudios sobre biosíntesis, metabolismo y de relación estructura-actividad.

A menudo los análogos se obtienen como subproductos de las síntesis de los compuestos naturales (tal es el caso de los isómeros 22*S*,23*S* que se forman al dihidroxilar el doble enlace Δ^{22} en muchas de las síntesis de BRs). En otros casos son diseñados y preparados con un fin específico.

Es necesario notar que el concepto de “análogo” debe tomarse en un sentido amplio: algunos BRs fueron sintetizados primero como análogos y sólo posteriormente fueron identificados como productos naturales.

En los últimos 20 años se ha sintetizado una gran variedad de análogos de BRs, que incluyen

modificaciones muy diversas en la cadena lateral (tanto en la longitud como en la configuración de los centros quirales), y en la parte cíclica. Una descripción más detallada de esta variedad excede los objetivos de esta introducción. Puede consultarse la monografía de Khripach, que reúne una extensa información sobre el tema.⁷⁴

1.8. ESTUDIOS SOBRE RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

Una vez obtenidos los primeros análogos de BRs, se intentó hallar una relación entre su estructura y la actividad medida en diferentes bioensayos. Lamentablemente, la actividad relativa de los BRs resultó ser distinta en distintos bioensayos, o incluso en modificaciones de un mismo ensayo (usando, por ejemplo, explantes en lugar de plantas enteras). Así, aun no pudo obtenerse una relación cuantitativa estricta entre la estructura y la actividad.

Sin embargo, hay consenso sobre los requerimientos estructurales básicos⁷⁵ necesarios para que un compuesto presente actividad como brassinosteroide:

Presencia de hidroxilos en los carbonos 22 y 23, siendo óptima la configuración 22*R*,23*R*.

Presencia de un grupo alquilo o arilo en C-24.

Debe poseer un grupo polar en el anillo B, en particular una función 6-ceto o 7-oxalactona.

Presencia de hidroxilos en los carbonos 2 y/o 3, especialmente con configuración α .

Fusión *trans* entre los anillos A y B.

Posteriormente resultó claro que el mecanismo de acción fisiológica de los BRs involucraba la unión con un receptor celular, y por lo tanto, que la actividad debía depender de la estructura tridimensional del esteroide. Estudios basados en modelado molecular⁷⁶ sugieren que la actividad de los BRs está determinada por, un lado, con la posición espacial de los oxígenos en C-2, C-3, C-6, C-22 y C-23 implicados en las interacciones receptor-ligando, modulado a su vez por un factor entrópico, derivado de los múltiples conformeros que presenta un análogo dado.

Este modelo puede explicar por qué ciertos análogos presenten alta actividad, a pesar de no cumplir algunos de los requerimientos estructurales enumerados.

Refinamientos de esta idea básica muestran que los BRs se unirían al receptor mediante interacciones polares, posiblemente enlaces de hidrógeno.

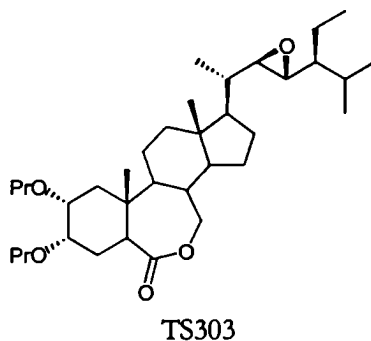
1.9. PERSPECTIVAS

El conocimiento acumulado sobre distintos aspectos de la química, bioquímica y fisiología de los brassinosteroides ha abierto nuevas líneas de investigación, cuyos resultados más interesantes se describirán brevemente:

1.9.1. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS CON APLICACIONES AGRONÓMICAS.

La estabilidad de los BRs naturales se transforma en un factor importante a tener en cuenta para la posible aplicación agronómica. En los últimos años se han desarrollado algunos análogos sintéticos que, si bien no presentan una gran actividad a nivel de los bioensayos convencionales, son estables por períodos prolongados y han mostrado efectos promisorios sobre las cosechas.

Como ejemplo puede mencionarse el análogo conocido como TS303, patentado en Japón, que se encuentra en etapa de evaluación previa a su aprobación oficial.

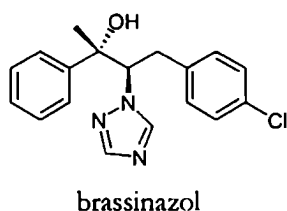


Este compuesto ha demostrado poseer un efecto importante⁷⁷ sobre el rendimiento de cosechas de trigo, arroz, remolacha y papa, si las semillas se tratan por simple inmersión previa a la siembra. Esto provoca un aumento en la proporción de semillas que germinan y raíces más vigorosas. Por otro lado, la aplicación directa sobre viñedos, justo antes de la floración, aumenta el tamaño de los frutos y previene la maduración anticipada. Existen otros compuestos con propiedades similares, y se cree probable que en los próximos años derivados análogos de BRs naturales podrán aplicarse en forma masiva como agroquímicos.

1.9.2. ESTUDIOS SOBRE INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE BRASSINOSTEROIDES.

Como se vio anteriormente, la biosíntesis de los BRs implica múltiples pasos de oxidación mediados por citocromos del tipo P450. Se sabe que este tipo de oxidasas pueden ser inhibidas por derivados del triazol, se desarrollaron entonces compuestos de esta familia que, al ser aplicado sobre plántulas de *Arabidopsis*, indujeron un crecimiento similar al que presentan las mutantes biosintéticas de BRs.

Como ejemplo, se puede mencionar el brassinazol, el cual, a concentraciones del orden de $1\mu\text{M}$, provoca malformaciones tales como enanismo y deetiación en la oscuridad.⁷⁸ Al igual que para las mutantes biosintéticas, todos estos efectos pueden revertirse con la coaplicación de brassinólido. Un estudio bioquímico reveló que el brassinazol bloquea la hidroxilación en C-22 (Figura 1.6), al ser un inhibidor selectivo de la enzima DWF4.⁷⁹



Una ventaja del uso de los inhibidores de la biosíntesis de BRs, es que pueden ser utilizados en el estudio del papel de estas hormonas en una amplia variedad de especies de las cuales no se han descrito las mutantes correspondientes.

1.9.3. ESTUDIOS SOBRE MIMÉTICOS NO ESTEROIDALES DE BRASSINOSTEROIDES.

Un nuevo enfoque, aparecido en los últimos años, es el desarrollo de compuestos no esteroideos que puedan inducir el mismo tipo de respuesta fisiológica que los BRs. En base a los estudios previos sobre relaciones estructura-actividad, Andersen y colaboradores⁸⁰ diseñaron y sintetizaron compuestos que resultaron moderadamente activos en el ensayo de inclinación de la lámina de arroz.

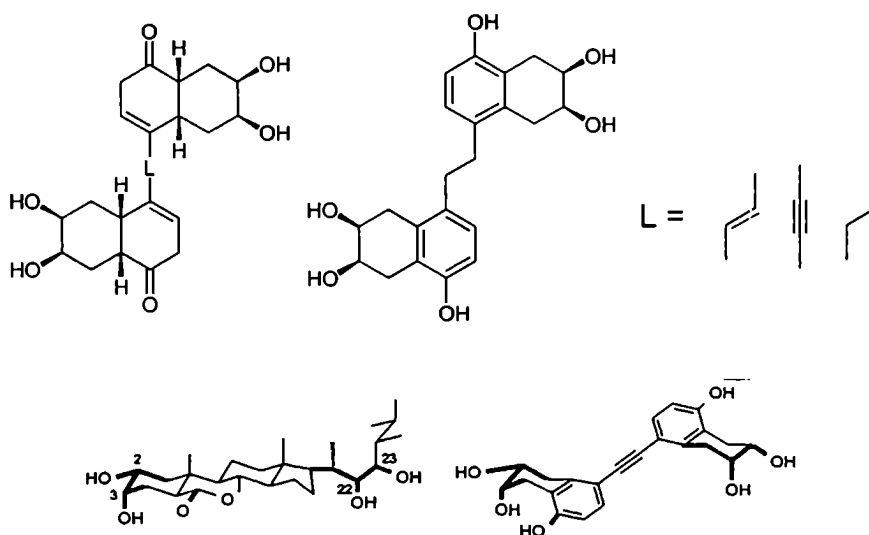


Figura 1.16. Miméticos de brassinosteroides. Las funciones oxigenadas que mimetizan a los grupos de C-2, C-3, C-22 y C-23, responsables de la actividad, aparecen remarcados

Como puede verse en la Figura 1.16, estos compuestos consisten, básicamente, en dos subunidades bicíclicas, que contienen las funciones polares que imitan a los grupos presentes en el brassinólido. Las dos subunidades están unidos por un espaciador que permite que la conformación de los compuestos obtenidos se aproxime a la de los BRs.

Ese tipo de miméticos podrían resultar una alternativa válida para el desarrollo de nuevos agroquímicos.

1.10. TRABAJO A DESARROLLARSE EN ESTA TESIS.

Luego de este breve panorama sobre el estado actual del conocimiento en el campo de los brassinosteroides, en los capítulos siguientes se describirán los aportes efectuados durante esta Tesis. El trabajo se ha centrado sobre los 28-homobrasinosteroides, un subgrupo de BRs con un esqueleto 5 α -estigmastano.

En el Capítulo 2 se describirá las síntesis de los cuatro miembros de esta familia que han sido detectados como compuestos naturales, y se discutirán las posibles relaciones biosintéticas entre ellos que resultan de la evaluación de sus actividades biológicas.

El Capítulo 3 se dedicará a la descripción de las síntesis y bioactividades de análogos de 28-homobrasinosteroides fluorados en C-3, mientras que el trabajo efectuado sobre análogos modificados en C-6 se mostrará en el Capítulo 4.

El Capítulo 5 trata sobre el estudio de análogos hidroxilados y fluorados en C-5. En el Capítulo 6 se discutirán resultados interesantes encontrados durante las síntesis presentadas en el Capítulo 5.

El Capítulo 7 será una revisión donde se destacarán los resultados sobre las bioactividades de los compuestos sintetizados.

Finalmente, la descripción detallada de todo el trabajo experimental efectuado, se mostrará en el Capítulo 8.

1.11. REFERENCIAS

1 Evans M.L. Functions of hormones at the cellular level of organization. En *Hormonal Regulation of Plant Physiology*. T.K. Scott (Ed) , p 23, Springer-Verlag Berlín (1984).

2 Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen J. D., Jr., Steffens G. L., Flippen-Anderson J. L., Cook J. C. Jr. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid

isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281, 216 (1979).

3 Clouse S. D., Sasse J.M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 427 (1998).

4 Yokota T., Arima M., Takahashi N. Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Lett.* 23, 4965 (1982).

5 Maeda E. Rate of lamina inclination in excised rice leaves. *Physiol. Plant.* 18, 813 (1965).

6 Takatsuto S., Ying B., Morisaki M. Microanalysis of brassinolide and its analogs by gas chromatography and gas cromathography – mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 239 233 (1985).

7 Bajguz A., Tretyn A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62, 1027 (2003).

8 Watanabe T., Yokota T., Shibata K., Nomura T., Seto H., Takatsuto S. Cryptolide, a new brassinolide catabolite with a 23-oxo group from Japanese cedar pollen / anther and its synthesis. *J. Chem. Research (S)*. 18 (2000).

9 Meudt W.J., Bennett N.W. Rapid bioassay for auxins. *Physiol. Plant.* 44, 422 (1978).

10 Strnad M., Kaminek M. Sensitized bean first internode bioassay for auxins and brassinosteroids. *Biol. Plant.* 27, 209 (1985).

11 Wada K., Kondo H., Marumo S., A simple bioassay for brassinosteroids: a wheat leaf unrolling test. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2249 (1985).

12 Clouse S.D., Zurek D.M., McMorris T.C., Baker M.E. Effect of brassinolide on gene expresion in elongating soybean epycotils. *Plant Physiol.* 100, 1377 (1992).

13 Abe H. Rice -lamina inclination, endogenous levels in plant tissues and accumulation during pollen developement of brassinosteroids. En: Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Cutler H, Yokota T., Adam G.(Eds). ACS Symposium Series No 474. ACS, Washington DC, pp. 200 (1991).

14 Wada K., Marumo S., Abe H. A rice inclination test: a micro-quantitative bioassay for brassinosteroids. *Agric. Biol. Chem.* 48, 719 (1984).

15 Takatsuto S. Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography –mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 658, 3 (1994).

- 16 Gamoh K., Kitsuwa T., Takatsuto S. Determination of trace brassinosteroids by high performance liquid chromatography. *Anal. Sci.*, 4, 533 (1988).
- 17 Asakawa S., Abe H., Kyokawa Y. Teasterone 3-myristate: a new tipe of brassinosteroid derivative in *Lilium longiflorum* anthers. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 219 (1994).
- 18 Yokota T., Ogino Y., Suzuki H., Takahashi N., Saimoto H., Fujioka S., Sakurai A. Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids. En Cutler H.G, Yokota T., Adam G. (Eds), *Brassinosteroids*, American Chemical Society, Washington D.C. (1991).
- 19 Sakurai A., Fujioka S. Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 757 (1997).
- 20 Szekers M., Nemeth K., Koncz-kalman Z., Altmann T. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell*, 85, 171 (1996).
- 21 Nomura T., Nakayama M., Reid J. Blockage of brassinosteroid biosynthesis causes dwarfism in garden pea. *Plant. Physiol.* , 113, 31 (1997).
- 22 Fujioka S., Li J., Choi Y., Seto H., Takatsuto S., Noguchi T., Watanabe T., Kuriyama H., Yokota T., Chory J., Sakurai A. *The Arabidopsis det2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* , 9, 1951 (1997).
- 23 Choe S., Dilkes B.P., Fujioja S. The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 10, 231 (1998).
- 24 Stündl U., Schneider B. 3 β -Brassinosteroid dehydrogenase activity in *Arabidopsis* and tomato. *Phytochemistry* 58, 989 (2001).
- 25 Kang J.G. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell*, 105, 625 (2001).
- 26 Choi Y., Fujioka S., Harada A. A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone. *Phytochemistry*, 43, 593 (1996).
- 27 Shimada Y., Fujioka S., Miyauchi N., Kushiro M., Takatsuto S., Nomura T., Yokota T., Kamiya Y.,

Bishop G., Yoshida S. Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.* 126, 770 (2001).

28 Clouse S., Feldmann K. Molecular genetics of brassinosteroid action. En: Sakurai A., Yokota T., Clouse S. (Eds). *Brassinosteroids*. p 163. Springer-Verlag, Tokio. (1999).

29 Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. An early oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 130, 930 (2002).

30 Mathur J., Molnár G., Fujioka S., Takatsuto S., Sakurai A., Yokota T., Adam G., Szekeres M. Transcription of the *Arabidopsis* CPD gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J.* 14, 593 (1998).

31 Li J., Nagpal P., Vitart V. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science*, 272, 398 (1996).

32 Shimada Y., Goda H., Nakamura A., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S. Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 131, 287 (2003).

33 Marcovic-Housley Z., Degano M., Lamba D., von Roepenack-Lahaye E., Clemens S., Susani M., Ferreira F., Scheiner O., Breiteneder H. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the mayor birch pollen allergen BET v1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J. Mol. Biol.* 325, 123 (2003).

34 Adam G., Schneider J., Schneider B., Voight B. New developments in brassinosteroid research. En: *Studies in Natural Product Chemistry*. Atta-ur-Rahman (Ed.) Vol 18, 495 (1996).

35 Neff M., Nguyen E., Malancharuvil S., Fujioka T., Noguchi H., Seto M., Tsubuki T., Honda S., Takatsuto S., Yoshida S., Chory J. BAS1: a gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 15316 (1999).

36 Rouleau M., Marsolais F., Richard M., Nicolle L., Voight B., Adam G., Vann L. Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* 274, 20925 (1999).

37 Adam G., Schneider B., Kolbe A., Hai T., Porzel A., Voight B. Progress in brassinosteroid

- metabolism. *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.* 23,7 (1996).
- 38 Mandava N. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 23 (1988).
- 39 Kamuro Y., Takatsuto S. Practical Applications of Brassinosteroids in Agricultural Fields. En: Sakurai A., Yokota T., Clouse S. (Eds). *Brassinosteroids*. pp 21. Springer-Verlag, Tokio, (1999).
- 40 Takeuchi Y., Omigawa Y., Ogasawara M. Effects of brassinosteroids on conditioning and germination of clover broomrape seeds. *Plant Growth Regul.* 16, 153 (1995).
- 41 Steber C., McCourt P. A role for brassinosteroids in germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125, 763 (2001).
- 42 Yamamoto R., Demura T., Fukuda H. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 980 (1997).
- 43 Sugiyama K., Kuraishi S. Stimulation of fruit set of navel orange with brassinolide. *Acta Hort.* 239, 345 (1989).
- 44 Mayumi K., Shibaoka H. A possible double role for brassinolide in the re-orientation of cortical microtubules in the epidermal cells of Azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* 36, 173 (1995).
- 45 Goda H., Shimada Y., Asami T., Fujioka S., Yoshida S. Microarray análisis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 130, 1319 (2002).
- 46 Cosgrove D.J. Photomodulation of growth. En *Photomorphogenesis in plants*. Kendrick R.E., Kronenberg G.H. (Eds), p 341. M. Nijhoff Publishers (1986).
- 47 Chory J., Nagpal P., Peto C.A. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3, 445 (1991).
- 48 Clouse S.D., Langford M., McMorris T.C., A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* 111, 671 (1996).
- 49 Li J., Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929 (1996).

- 50 Wang Z., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., Chory J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*. 410, 380 (2001).
- 51 Clouse S.D. Brassinosteroid signal: novel downstream components emerge. *Current biology* 12, 485 (2002).
- 52 Hu Y., Bao F., Li J. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 24(5), 693 (2000).
- 53 Fung S., Siddall J.B. Stereoselective synthesis of brassinolide: a plant growth promoting steroidal lactone. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6580 (1980).
- 54 Steele J.A., Mosettig E. The solvolysis of stigmasteryl tosylate. *J. Org. Chem.* 28, 571 (1963).
- 55 Anastasia M., Allevi P., Ciuffreda P., Fiecchi A. A new synthesis of brassinosteroids: plant growth promoting steroids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 379 (1983).
- 56 Thompson M.J., Mandava N., Meudt W., Lusby W., Spaulding D. Synthesis and biological activity of brassinolide and its 22 β ,23 β -isomer: novel plant growth-promoting steroids. *Steroids* 38, 567 (1981).
- 57 Mori, K.. Synthesis of a brassinolide analog with high plant growth promoting activity. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1211 (1980).
- 58 Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A. Basic synthetic methods and formal synthesis. E *Brassinosteroids, A new class of plant hormones*. Academic Press. London (1999).
- 59 Adam G., Marquardt V. Brassinosteroids. *Phytochemistry* 25, 1787 (1986).
- 60 Zhou W. S: The synthesis of brassinosteroids. *Pure Appl. Chem.* 61, 431 (1989).
- 61 McMorris T.C., Patil P.A: Improved synthesis of 24-epibrassinolide from ergosterol. *J. Org. Chem.* 58, 2338 (1993).
- 62 Teme Centurión O. Tesis de Doctorado: Síntesis de análogos de castasterona y ensayos de su actividad biológica. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. (1997).

- 63 Ishiguro M., Ikekawa N. Stereochemistry of electrophilic reactions at the steroidal C-22 double bond. *Chem Pharm. Bull.* 23, 2860 (1975).
- 64 Takatsuto S., Ikekawa N. Synthesis of (22R,23R)-28-homobrassinolide. *Chem. Pharm. Bull.* 30, 4181 (1982).
- 65 Sakakibara M., Mori K. Facile synthesis of (22R,23R)- homobrassinolide. *Agric. Biol. Chem.* 46, 2769 (1982).
- 66 Jacobsen E., Marko I., Mungall W., Scroder G., Sharpless K. Asymmetric dihydroxylation via ligand-accelerated catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 1968 (1988).
- 67 Thompson M.J., Mandava N., Meudt W., Dutky S., Lusby W., Spaulding D. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids* 39, 89 (1982).
- 68 Zhou W., Sun L., Pan X. A stereoselective construction of brassinosteroids side chain: a new practical synthesis of brassinolide and its analogs. *Tetrahedron Lett.* 32, 6745 (1991).
- 69 Marino J.P., de Dios A., Anna L., Fernández de la Pradilla R. Highly stereocontrolled formal synthesis of brassinolide via chiral sulfoxide-directed S_N2' reaction. *J. Org. Chem.* 61, 109 (1996).
- 70 Takatsuto S., Ikekawa N. Short-step synthesis of plant growth-promoting brassinosteroids. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 2001 (1984).
- 71 McMorris T., Chavez R., Patil P. Improved synthesis of brassinolide. *J. Chem Soc Perkin I*, 295 (1996).
- 72 Back T., Baron D., Luo W., Nakajima S. Concise, improved procedure for the synthesis of brassinolide and some novel side-chain analogs. *J. Org. Chem.* 62, 1179 (1997).
- 73 Watanabe T., Takatsuto S., Fujioka S. Improved synthesis of castasterone and brassinolide. *J. Chem. Research (S)* 360 (1997).
- 74 Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A. Syntheses of BS analogs. En: *Brassinosteroids, A new class of plant hormones*. Academic Press. London (1999).

- 75 Brosa C., Capdevila J.M., Zamora I. Brassinosteroids, a new way to define the structural requirements. *Tetrahedron* 52, 2435 (1996).
- 76 Brosa C. Structure-activity relationships. En *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*, pp. 191. Eds Sakurai A, Yokota T, Clouse SD. Tokyo: Springer Verlag. (1999).
- 77 Kamuro Y., Takatsuto S., Noguchi T. Practical effects of brassinosteroid compound TS303. *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Amer.* 24, 111 (1997).
- 78 Asami T., Min Y., Nagata N., Yamagishi K., Takatsuto S., Fujioka S., Murofushi N., Yamaguchi I., Yoshida S. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.* 123, 93. (2000).
- 79 Asami T., Misutani M., Fujioka S., Goda H., Min Y., Shimada Y., Nakano T., Takatsuto S., Matsuyama T., Nagata N., Yamagishi K., Yoshida S. Selective interaction of triazole derivatives with DWI4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in planta. *J. Biol. Chem.* 276, 25687 (2001).
- 80 Andersen D., Back T., Jansen L., Michalak K., Pharis R., Sung G. Design, synthesis and bioactivity of the first nonsteroidal mimetics of brassinolide. *J. Org. Chem.* 66, 7129 (2001).

CAPÍTULO 2

28-HOMOBRASSINOSTEROIDES NATURALES

Si bien la presencia de 28-homobrassinosteroides (esqueleto colestano con sustituyente 24*S*-etilo) suele ser minoritaria en fuentes naturales, el interés en los mismos radica en que su síntesis es accesible a partir de estigmasterol, un esteroide muy abundante y fácilmente asequible a partir del insaponificable del aceite de soja. Partir de un esqueleto carbonado con la estereoquímica correcta en gran parte de los centros quirales es fundamental si se piensa en la síntesis en gran escala, en vista de las posibles aplicaciones de los BRs como agroquímicos.

Los 28-homobrassinosteroides naturales conocidos hasta el momento son: 28-homobrassinólido (HBL), 28-homocastasterona (HCS), 28-homotifasterol (HTY), y 28-homoteasterona (HTE).

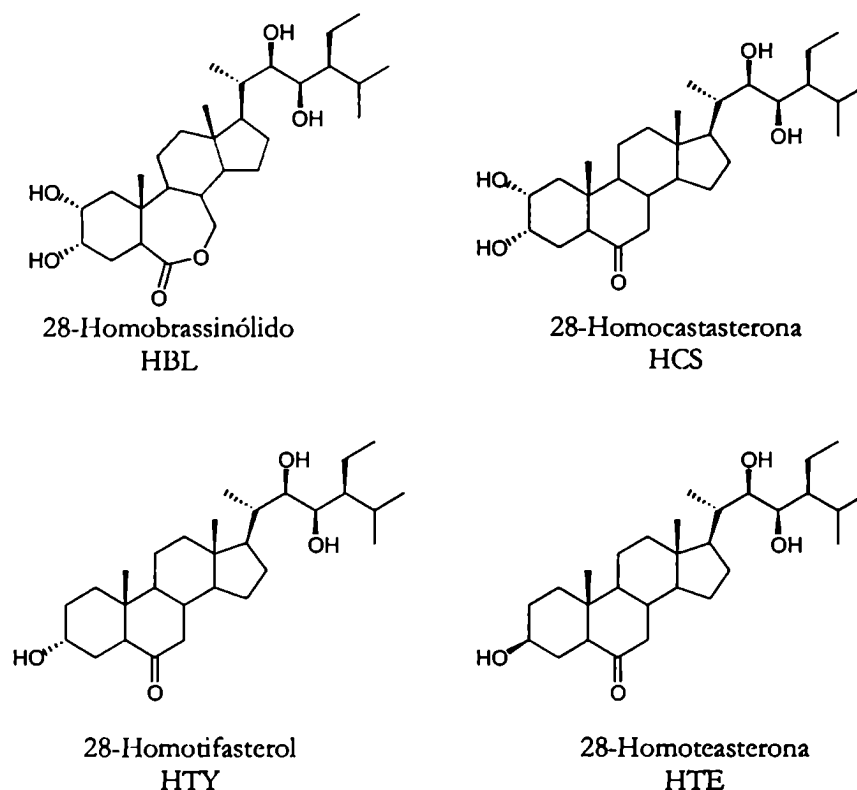


Figura 2.1. 28-Homobrassinosteroides naturales

El HBL posee una notable actividad en distintos bioensayos, y por ser sintéticamente más accesible que el brassinólido, es ampliamente utilizado en estudios de mejoramiento del rendimiento de las cosechas en invernadero y en condiciones naturales.¹

El primer objetivo planteado en este trabajo fue la obtención de los 28-homobrassinosteroides naturales mencionados, los cuales se utilizarían como patrones de bioactividad para la comparación con otros análogos no naturales a sintetizarse. Los cuatro compuestos habían sido ya preparados

por distintos grupos; en las siguientes secciones se describen brevemente algunas de dichas síntesis y se discuten las rutas que se utilizaron en esta tesis.

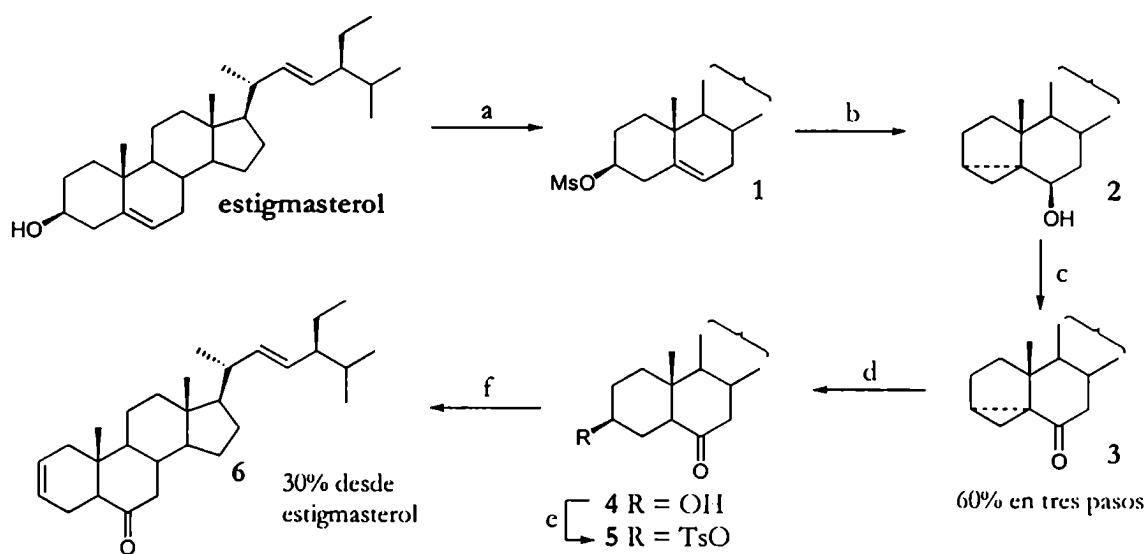
2.1. SÍNTESIS

2.1.1. SÍNTESIS DE 28-HOMOBRASSINÓLIDO Y 28-HOMOCASTASTERONA.

I. ANTECEDENTES.

La primera síntesis de HBL y HCS fue publicada en 1979 por Thompson y colaboradores², cuando todavía dichos brassinosteroides no habían sido identificados en fuentes naturales, hecho que ocurrió en 1983 y 1984, respectivamente.^{3,4} La secuencia sintética utilizada consistió, como es habitual en estos casos, en la introducción de los grupos funcionales requeridos en los anillos A y B y la dihidroxilación posterior del doble enlace Δ^2 .

Las modificaciones en los anillos se basaron en reacciones previamente desarrolladas para la síntesis de ecdisteroideos⁵, y se muestran en la Figura 2.2.



a) MsCl / Py, t.a. b) KHCO_3 / agua / acetona, reflujo c) Reactivo de Jones / acetona, t.a.
d) i) H_2SO_4 / agua / AcOH, reflujo ii) K_2CO_3 / MeOH, t.a. e) TsCl / Py, t.a. f) LiBr / DMF, reflujo.

Figura 2.2. Primera síntesis de HCS y HBL. (referencia 2)

Obtención del intermediario (22E)-5α-estigmasta-2,22-dien-6-ona (6).

La mesilación del stigmasterol, seguida de solvólisis con KHCO_3 acuoso, generó el 3α,5α-ciclo-

6 β -hidroxi esteroide **2** conocido como iso-estigmasterol. Esta es una reacción característica cuyo mecanismo propuesto⁶ puede verse en la Figura 2.3.

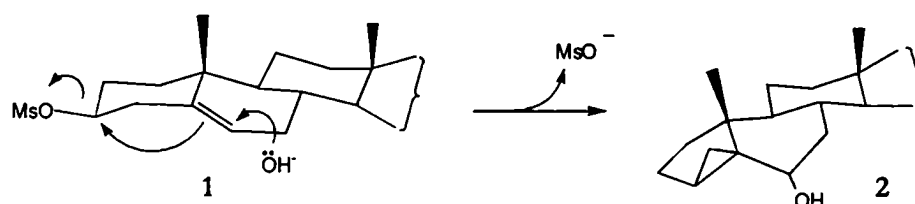


Figura 2.3. Formación del *iso*-estigmasterol.

El iso-esteroide **2** fue oxidado con el reactivo de Jones para dar la cetona correspondiente **3**. La apertura del ciclopropano de **3** con H_2SO_4 / AcOH acuoso, y posterior hidrólisis del 3 β -acetato intermediario, generó el 3 β -hidroxiesteroide **4**, el cual se transformó en el tosilato **5**. La eliminación del tosilato por reflujo en DMF en presencia de LiBr permitió obtener la dienona **6** con un rendimiento global cercano al 30 %.

La posterior dihidroxilación con OsO_4 de los dobles enlaces Δ^2 y Δ^{22} de la dienona **6** dio una mezcla de HCS y del diastereómero no deseado 22*S*,23*S* (**7**), según se muestra en la Figura 2.4. El tratamiento de HCS con ácido trifluoroperacético permitió obtener HBL junto con la 7-oxalactona isomérica **8**. El rendimiento total de la secuencia fue de apenas un 2 %.

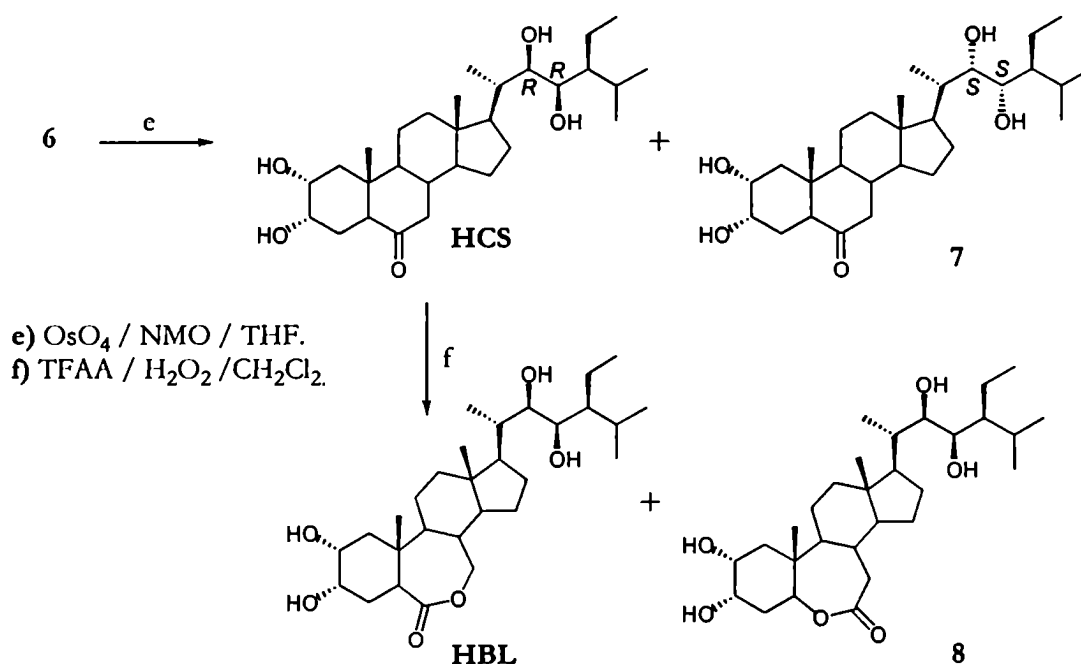


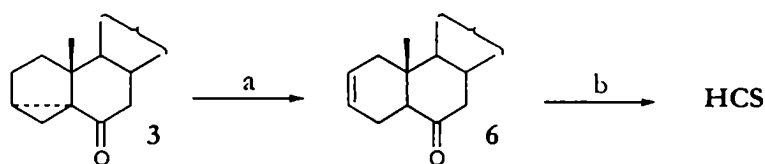
Figura 2.4. Primera síntesis de HCS y HBL (referencia 2) Hidroxilación y lactonización del intermediario **6**.

La principal limitación de esta síntesis consiste en que la presencia del centro quiral en C-24 induce, en el paso de dihidroxilación, la formación preferente del diol 22*S*,23*S* es decir, con la configuración opuesta a la requerida, y sólo se obtiene una pequeña cantidad del brassinosteroide natural. Se hicieron varios intentos para evitar este paso problemático^{7,8}, pero en ningún caso se consiguió un rendimiento global mayor al 7%.

Un adelanto considerable al respecto fue la introducción, en las síntesis de BRs, de la reacción de dihidroxilación catalítica asimétrica catalítica, desarrollada por Sharpless.⁹ Se han publicado varias síntesis de HCS y HBL que, al utilizan esta reacción para funcionalizar la cadena lateral, resultaron más eficientes, algunas de las cuales se describirán brevemente:

En 1994 McMorris publicó una síntesis¹⁰ de HBL en seis pasos (con la HCS como intermediario), con un rendimiento global del 21 %. La estrategia seguía el mismo esquema que el utilizado por Thompson, con algunas modificaciones menores: la conversión de la cetona **3** en la dienona **6** se realizó en un solo paso. En presencia de bromuro de litio se genera un intermediario bromado en C-3 que, por eliminación de HBr, genera el doble enlace Δ^2 (Figura 2.5).

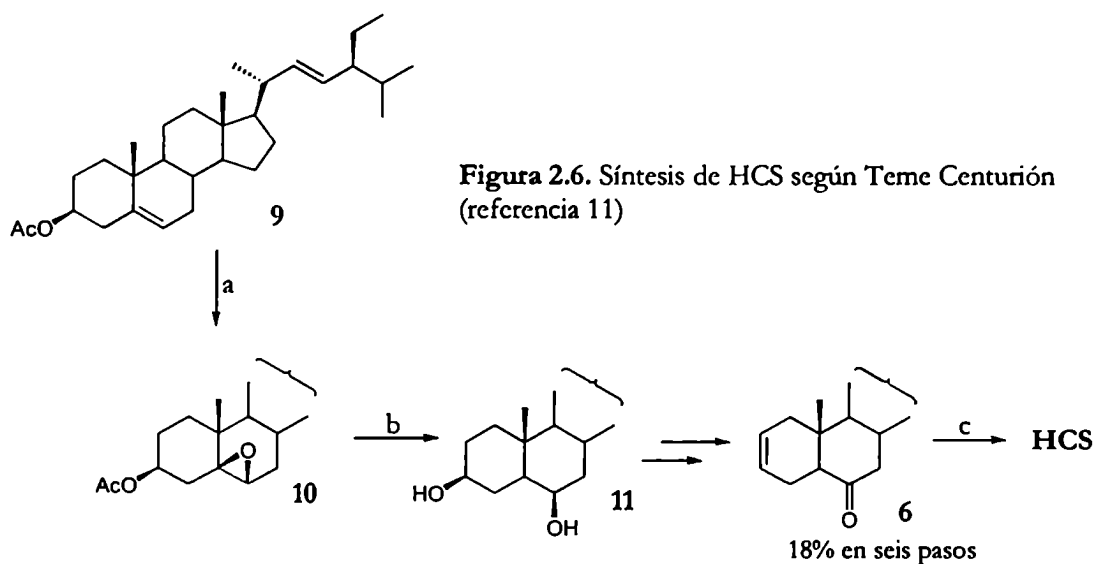
Por otro lado, la dihidroxilación de **6** con el método de Sharpless, usando (DHQD)-4-clorobenzoato como auxiliar quiral en la reacción con OsO₄, dio una mezcla 2:1 del isómero natural 22*R*,23*R* frente al 22*S*,23*S*. La proporción obtenida sin el uso de auxiliar es 1:9.



a) LiBr / HPy⁺Cl⁻ / DMF, reflujo b) K₂OsO₄ / K₄Fe(CN)₆ / K₂CO₃ / CH₃SO₃NH₂ / (DHQD)-4-clorobenzoato / t-BuOH / agua, t.a.

Figura 2.5 Síntesis de HCS y HBL según McMorris (referencia 10)

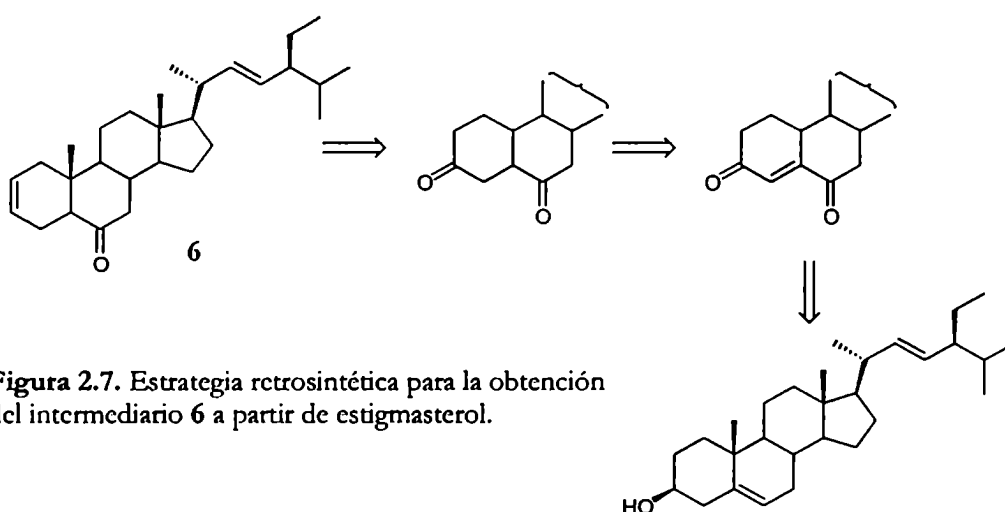
Teme Centurión desarrolló, en nuestro laboratorio¹¹, la síntesis esquematizada en la Figura 2.6, basada en una estrategia alternativa para la construcción del fragmento cíclico: la epoxidación regio y estereoselectiva de estigmasterol acetilado **9**, y la posterior apertura reductiva del epóxido resultante **10**, permitió obtener (22*E*)-5 α -estigmaster-22-en-3 β ,6 β -diol (**11**). La oxidación del hidroxilo en C-6 y eliminación del hidroxilo en C-3, generó la dienona **6**, que se transformó en HCS, mediante las reacciones ya mencionadas, con un rendimiento de 9 % desde estigmasterol.



a) KMnO_4 / CuSO_4 / $t\text{-BuOH}$ / agua / CH_2Cl_2 , t.a. b) LiAlH_4 / AlCl_3 / THF, -78°C c) K_2OsO_4 / $\text{K}_3\text{Fc}(\text{CN})_6$ / K_2CO_3 / $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{NH}_2$ / $(\text{DHQD})_2\text{-Phal}$ / $t\text{-BuOH}$ / agua, t.a

II. NUEVA ESTRATEGIA.

Recopilando información bibliográfica sobre la preparación de esteroides 3,6-disustituídos, encontramos que, en un trabajo clásico de Jones¹², se describía la transformación de 3β -hidroxi- Δ^5 esteroides en distintos derivados 3,6-dioxigenados. Estas reacciones son básicas en la química de esteroides¹³, y se fundamentan en la diferente reactividad de las posiciones 3 y 6 del núcleo esteroideal. Decidimos obtener el compuesto 6 aplicando estas reacciones, a través de una estrategia distinta a las empleadas hasta el momento.



Como se muestra en la Figura 2.7, esta secuencia permitiría la obtención del intermediario 6 a partir

de estigmasterol, en sólo tres pasos de reacción (la síntesis de McMorris, la más corta descrita, emplea cuatro pasos).

La transformación de 3β -hidroxi- Δ^5 esteroides en Δ^4 -3,6-dionas se ha efectuado mediante una gran variedad de oxidantes, aunque suelen obtenerse rendimientos bajos. En los últimos años se encontró que la oxidación con clorocromato de piridonio (PCC) en CH_2Cl_2 o DMF es el método más eficiente, con rendimientos aceptables.¹⁴ Recientemente se ha comenzado a dilucidar el mecanismo de esta reacción¹⁵, que parece involucrar un intermediario del tipo 3-ceto- Δ^5 .

De esta manera, se trató estigmasterol disuelto en DMF con PCC, a temperatura ambiente, y se obtuvo (22*E*)-estigmastera-4,22-dien-3,6-diona (**12**) con un rendimiento de 68 %.

El segundo paso requerido en la secuencia sintética propuesta es la reducción estereoselectiva del doble enlace conjugado Δ^4 del compuesto **12**. El método habitual¹² para lograr esta transformación consiste en el tratamiento de **12** con Zn en ácido acético, pero es más conveniente, al ser las condiciones de reacción más suaves, el uso de cloruro de Ti (III), en solución acuosa.¹⁶

El mecanismo propuesto implica la transferencia de electrones desde el catión al esteroide, para formar un dianión que, al protonarse, genera la dicetona saturada.

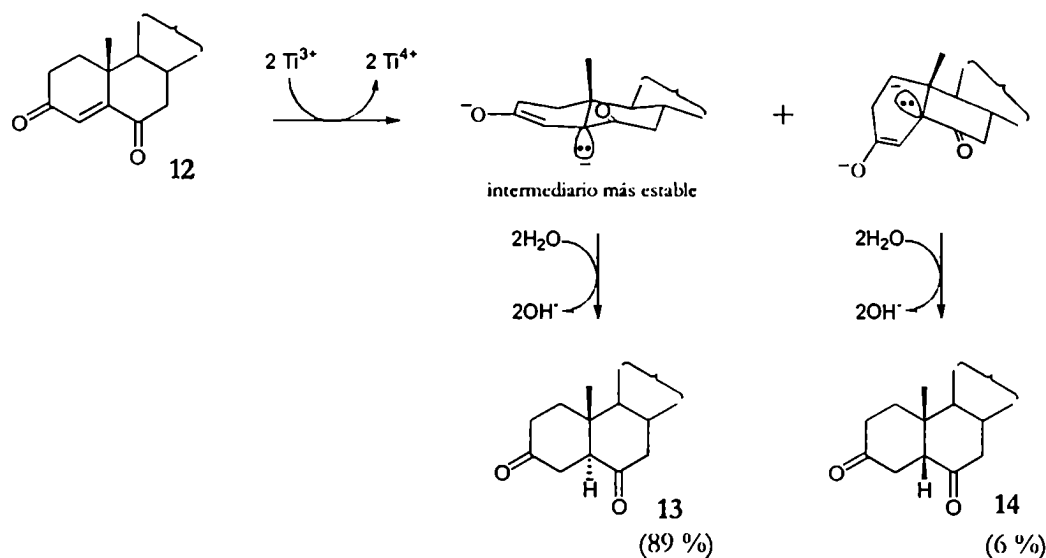


Figura 2.8. Reducción del compuesto **12** con cloruro de Ti (III)

Junto con el compuesto deseado **13**, se obtiene una pequeña cantidad de (22*E*)-5 β -estigmastera-22-en-3,6-diona (**14**), que puede transformarse fácilmente en **13** por epimerización en medio ácido,

aumentando, de esta manera, el rendimiento del producto buscado.

Por último, para obtener el compuesto **6** debe reducirse selectivamente el carbonilo en C-3 de **13**. Existen antecedentes de esta transformación, que aprovechan el menor impedimento del carbonilo en C-3 frente al de C-6 (Figura 2.9). Una posibilidad consiste en formar selectivamente la tosilhidrazona, que por tratamiento en medio fuertemente básico, descompone generando el alqueno requerido (reacción de Shapiro¹⁷).

Las misma reducción puede efectuarse tratando la dienona con cloruro de trimetilsilano y una amalgama de zinc¹⁸, la cual reduce el silil enol éter formado *in situ*.

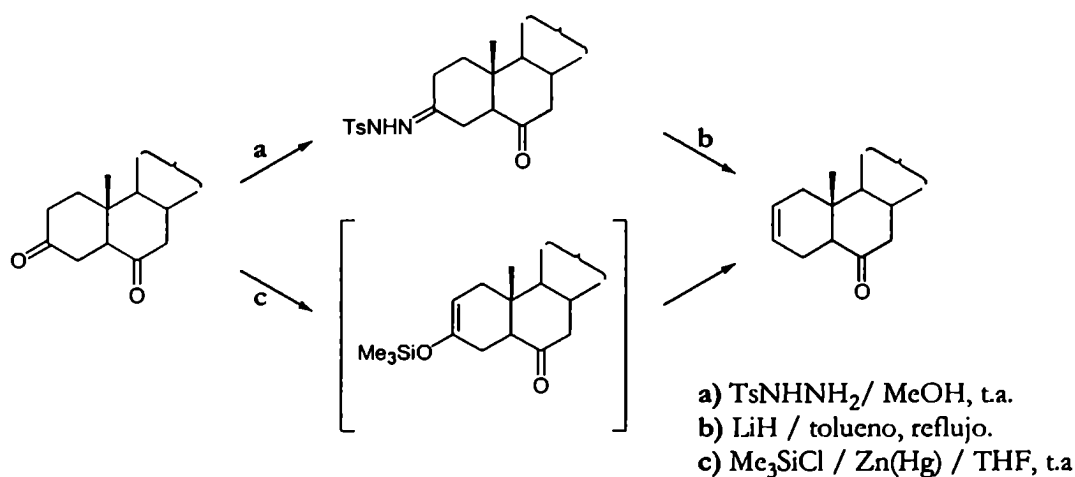


Figura 2.9. Reducción selectiva del carbonilo en C-3.

Decidimos utilizar esta última alternativa, pues los rendimientos informados en sustratos similares eran más altos. De este modo, se obtuvo el intermediario **6** a partir de estigmasterol, en tres pasos, y con un rendimiento de 47 %.

Esta dienona se dihidroxiló utilizando (DHQD)₂-Phal como auxiliar quirral. Se obtuvo, así, la HCS con un rendimiento de 32 %. La reacción de Baeyer-Villiger sobre este compuesto generó HBL, con un rendimiento de 25 %. La identidad de los compuestos obtenidos se verificó por comparación de sus espectros (masas y RMN de ¹H y ¹³C), con los publicados anteriormente.

La Figura 2.10 resume la ruta sintética completa.

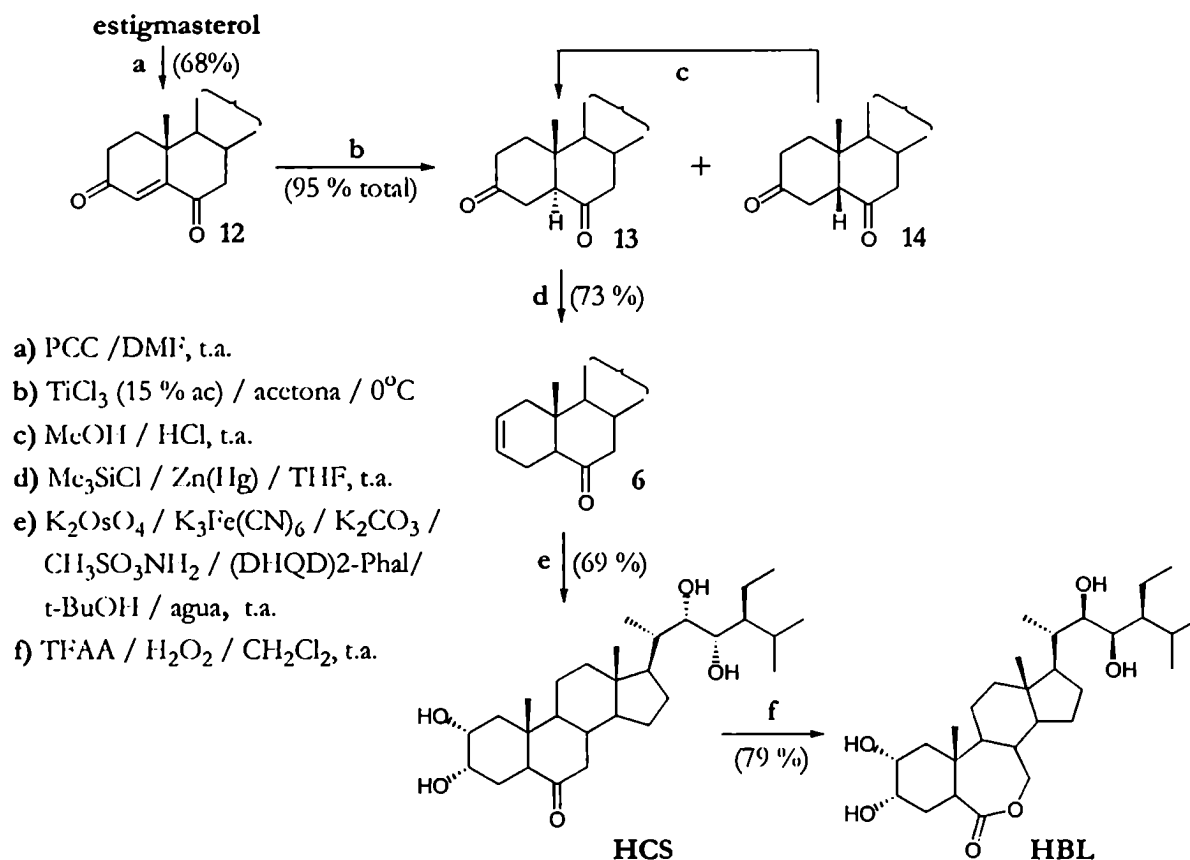


Figura 2.10. Síntesis de HCS y HBL

2.1.2. SÍNTESIS DE 28-HOMOTEASTERONA Y 28-HOMOTIFASTEROL.

I. ANTECEDENTES.

La síntesis de estos compuestos fue publicada en 1984 por Takatsuto e Ikekawa⁷, aunque en ese momento se creía que sólo eran análogos no naturales de brassinosteroides. En 1993 Schmidt identificó la HTE en semillas de rábano¹⁹ mediante CGL-EM. Utilizando el mismo método Abe describió la presencia de HTY en el salvado del arroz.²⁰

En la Figura 2.11 se muestra la ruta empleada por Takatsuto e Ikekawa para la obtención de HTF. En ese momento no era conocida la dihidroxilación de Sharpless, y dado que la dihidroxilación directa con OsO_4 del doble enlace Δ^{22} del stigmasterol conduce mayoritariamente al diastereómero no natural, estos autores intentaron una estrategia alternativa para evitar ese paso problemático.

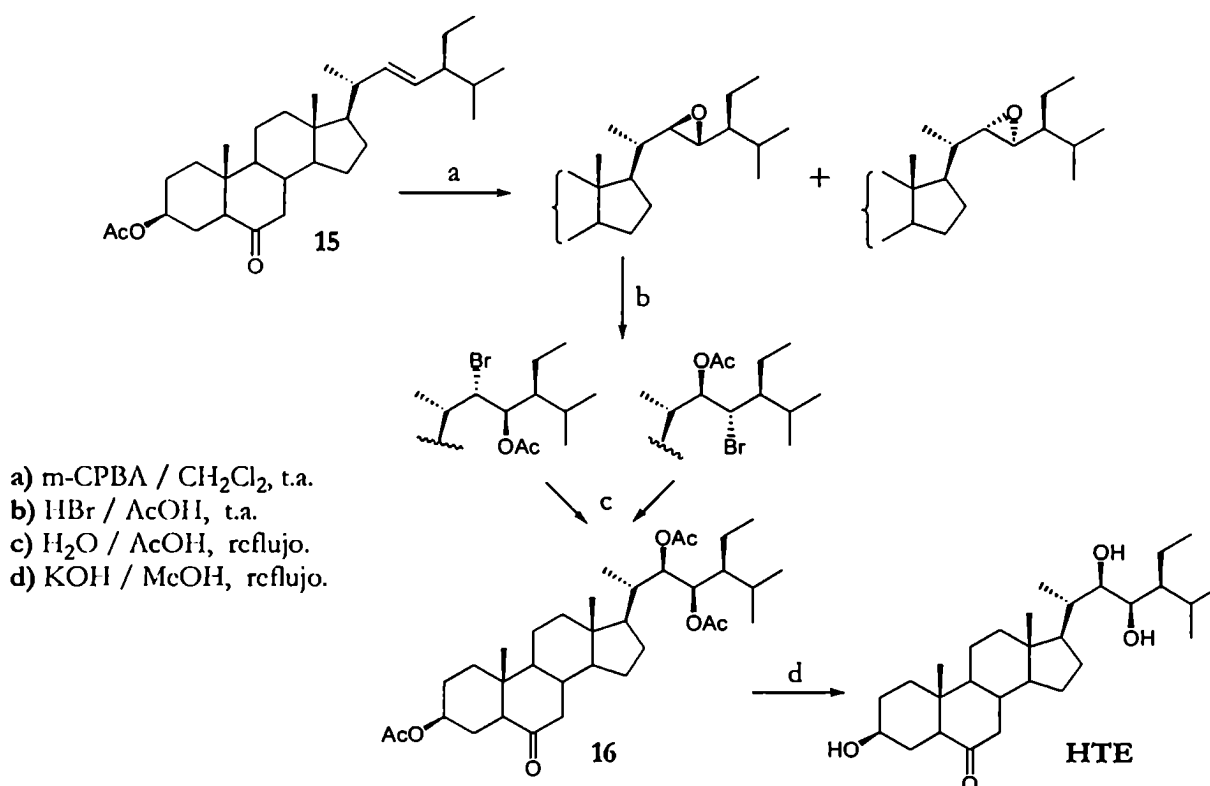


Figura 2.11 Primera síntesis de HTE (referencia 7)

El 3 β -acetato **15** (obtenido por acetilación de **4**), se epoxidó en las condiciones habituales, y se obtuvo una mezcla de epóxidos diastereoméricos, que se separó por cromatografía.

El epóxido con configuración 22*R*,23*R* se trató con HBr para dar una mezcla de bromohidrinas, la que por reflujo en ácido acético acuoso, generó como único producto el triacetato **16**, que se hidrolizó para dar HTE con un rendimiento cercano al 2 % (desde estigmasterol).

El principal inconveniente de esta síntesis radica en el paso de epoxidación, pues se forma una cantidad importante del epóxido 22*S*,23*S*, que se descarta.

La Figura 2.12 muestra la preparación de 28-homotifasterol (HTY) a partir de 28-homoteasterona. Se protegió el 22,23 diol de la HTE, se mesiló el hidroxilo en C-3, y se trató el compuesto resultante con carbonato de litio en DMF. De esa manera, se obtuvo una mezcla del 3 α -alcohol **17**, del 3 α -formiato **18** y del alqueno **19**. La hidrólisis de **18** permitió obtener mayor cantidad del compuesto **15**.

Finalmente, la hidrólisis del acetónido **17** dio HTY, con un rendimiento inferior al 0,5 %.

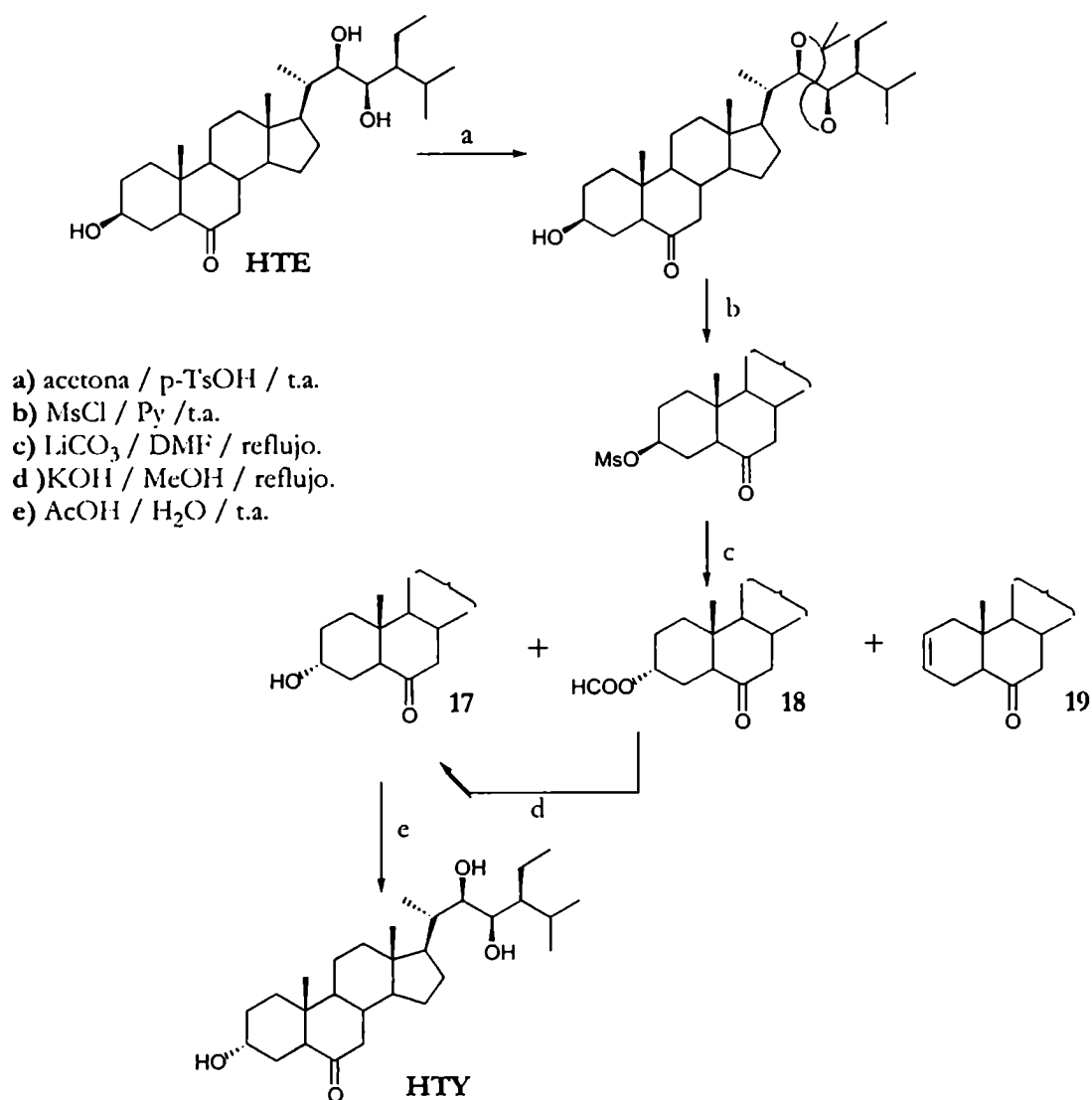


Figura 2.12. Primera síntesis de HTY (referencia 7)

II. NUEVA ESTRATEGIA PARA LA SÍNTESIS DE 28-HOMOTEASTERONA.

Cuando en este trabajo se planteó la obtención de HTE, resultó evidente que la utilización de la dihidroxilación catalítica asimétrica para funcionalizar la cadena lateral permitiría mejorar los rendimientos descriptos de manera notable.

En primer lugar, se preparó el 3 β -hidroxi esteroide **4** por reducción selectiva del carbonilo en C-3 de la dicetona **13**. El tratamiento de **13** con borohidruro de sodio permitió obtener el compuesto **4**

con un 72 % de rendimiento, que pudo elevarse a un 93 % empleando hidruro de tri-*t*-butoxialuminio y litio, un reductor más voluminoso.

La dihidroxilación de 4, utilizando (DHQD)₂ Phal como auxiliar quiral, dio HTE en un solo paso. Aunque, como se vió anteriormente, la diastereoselectividad de la hidroxilación del alqueno Δ^{22} en derivados de estigmastanos, y debido a la presencia del sustituyente en C-24, puede no ser muy alta, la menor cantidad de pasos involucrados en la síntesis permitió que el rendimiento global fuera de un 26 % a partir de estigmasterol (frente al 2 % de la síntesis original).

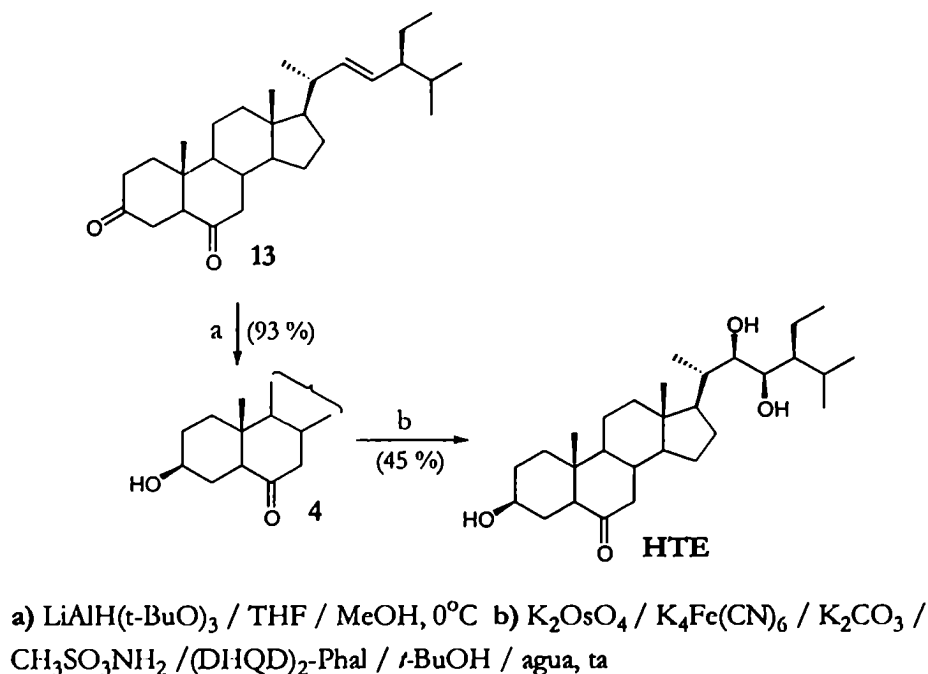


Figura 2.13. Síntesis de HTE

III. NUEVA ESTRATEGIA PARA LA SÍNTESIS DE 28-HOMOTIFASTEROL.

La síntesis de HTY debería ser similar a la de HTE, previa inversión de la configuración del hidroxilo en C-3 del compuesto 4. Esta inversión puede lograrse a través de una sustitución nucleofílica. Las técnicas más utilizadas son:

-La transformación del alcohol en un sulfonato y desplazamiento mediante un nucleófilo adecuado (hidroxilo, o un carboxilato).²⁷

-La reacción de Mitsunobu²², que permite obtener un carboxilato de configuración invertida a partir del alcohol.

La primera alternativa fue la elegida por Takatsuto e Ikekawa en la síntesis original de HTY, pero como se vio anteriormente, las condiciones empleadas promovieron la formación de productos de eliminación, bajando apreciablemente el rendimiento. Sin embargo, en un trabajo más reciente sobre la síntesis de 6-deoxobrassinosteroides²³, la inversión se logró con buenos resultados utilizando superóxido de potasio como nucleófilo.²⁴ (Figura 2.14).

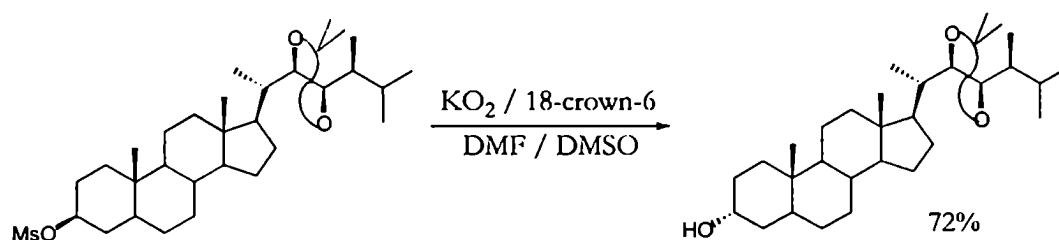


Figura 2.14. Inversión de la configuración del C-3 según la referencia 23.

Pero cuando se intentó la reacción con el sustrato **20** (preparado a partir de **4**), se obtuvo un producto mayoritario (85 %), que luego de un análisis espectroscópico, resultó ser el *iso*-esteroide **3**. Este resultado parece indicar que el carbonilo en C-6 debe estar implicado en la ciclación, favoreciéndola. Una búsqueda en la literatura condujo a referencias que mencionaban que el tratamiento de un 3 β -tosiloxi-6-oxo-5 α -esteroide en condiciones fuertemente básicas generaba el correspondiente 3 α ,5-ciclo-6-oxo derivado.¹³ Había antecedentes, además, de que dichas condiciones no debían ser necesariamente tan enérgicas.²⁵

Si bien se requieren más evidencias para confirmarlo, suponemos que, en medio básico, puede formarse un anión en C-5, que competiría favorablemente frente a otros nucleófilos presentes en el medio de reacción (Figura 2.15).

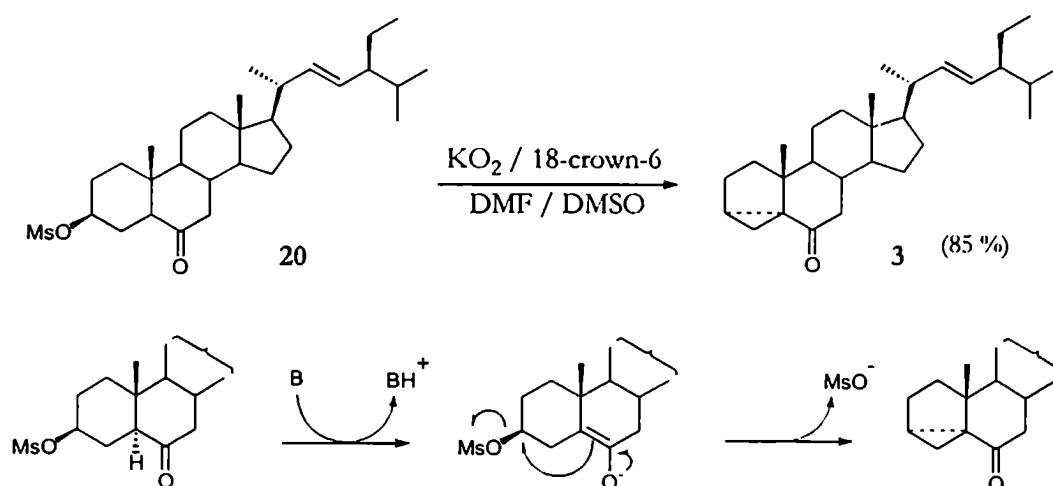


Figura 2.15. Mecanismo propuesto para explicar que la presencia del carbonilo en C-6 promueve, en medio básico, la formación del *iso*-esteroide **3**.

Con estos antecedentes, se debió descartar el uso de nucleófilos que además fueran bases fuertes para efectuar la inversión requerida.

La segunda alternativa para lograr la inversión de la configuración del hidroxilo en C-3, es la reacción de Mitsunobu, también ampliamente utilizada en la síntesis de esteroides²⁶, y con antecedentes de su aplicación en la obtención de otros brassinosteroides.²⁷

El tratamiento del 3 β -hidroxi esteroide **4** con azadicarboxilato de diisopropilo (DIAD), trifenílfosfina y ácido fórmico en benceno permitió obtener, en condiciones muy suaves, el 3 α -formiato **21** con un rendimiento de 83%. La hidrólisis de **21** con K₂CO₃ en metanol dio el correspondiente 3 α -hidroxi esteroide **22**, el cual se dihidroxiló en la cadena lateral como ya se describió. Se obtuvo, así, HTY con un rendimiento global de 17 % desde stigmasterol.

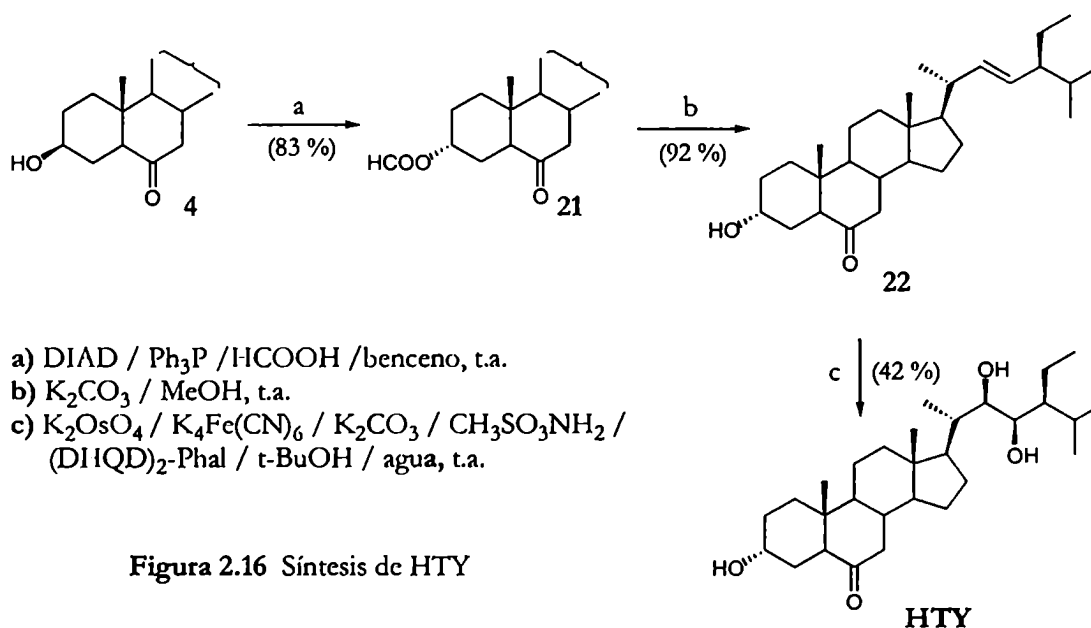


Figura 2.16 Síntesis de HTY

2.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica de los 28-homobrassinosteroides naturales sintetizados (ver Figura 2.1.) fue evaluada mediante algunos de los bioensayos que se mencionaron en el Capítulo 1. Si bien los compuestos habían sido previamente descritos, sólo se habían publicado las bioactividades de HBL y HCS.²⁸ La evaluación de la bioactividad de estos compuestos es importante, ya que serían usados, en esta Tesis, para compararlas con las de los análogos sintéticos que se obtendrían posteriormente. Además, sus actividades relativas pueden dar información sobre la biosíntesis de los 28-homobrassinosteroides. A continuación se describirán los resultados obtenidos. la descripción de los métodos puede verse en la Sección 8.3.1.

2.2.1. ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA)

Este ensayo, ampliamente utilizado para evaluar la actividad de BRs naturales y sintéticos, se llevó a cabo en nuestro laboratorio, mediante un protocolo optimizado previamente. En la Tabla 2.1 se muestra el ángulo promedio inducido por cada compuesto (junto con el error estándar), a tres dosis diferentes. Cada valor es el promedio de 20 – 25 réplicas, siendo el correspondiente al control de $11^\circ \pm 2^\circ$.

Dosis (ng / plántula)	Compuesto			
	HBL	HCS	HTY	HTE
5	35 ± 3	30 ± 2	24 ± 4	10 ± 2
50	90 ± 4	84 ± 5	72 ± 8	25 ± 6
500	101 ± 4	97 ± 4	77 ± 8	60 ± 6

Tabla 2.1 Resultados del ensayo ILA con los 28-homobrassinosteroides sintetizados.

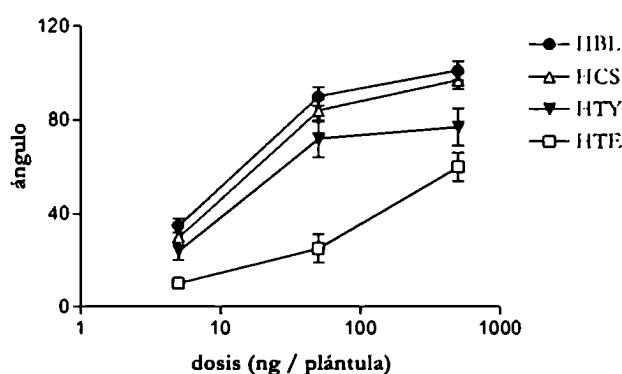


Figura 2.16. Ensayo ILA para los BRs naturales sintetizados.

Como se ve en la Tabla 2.1, excepto para la 28-homoteasterona a la concentración más baja, todos los demás valores son significativamente mayores que el control. En la Figura 2.16 puede comprobarse una clara relación dosis-respuesta para cada compuesto. La actividad relativa sigue, además, el mismo orden observado para los BRs de C_{28} , (Figura 1.4 del capítulo anterior) lo que sugiere una posible relación biosintética entre ellos.

2.2.2. ENSAYO DE ELONGACIÓN DEL EPICOTILO DE SOJA.

Este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Steve Clouse, del Departamento de Horticultura de la North Carolina State University. Consiste en medir la longitud (en mm) de epicotilos de soja luego de incubarlos en una solución conteniendo el BR a estudiar. La Figura 2.17 muestra la longitud

promedio de 10 epicotilos, en función del logaritmo de la inversa de la concentración molar del compuesto estudiado.

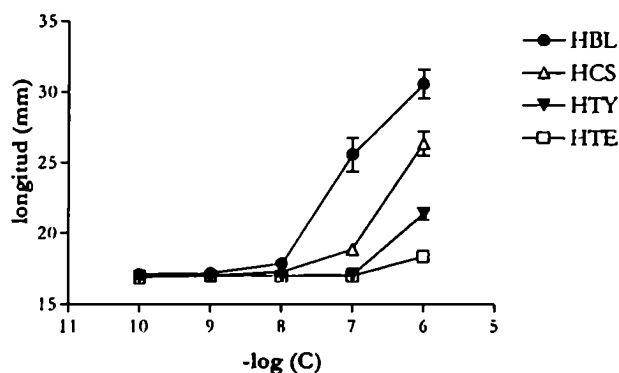


Figura 2.17. Ensayo de elongación del epicotilo de soja.

En este caso, también, se comprueba una relación dosis-respuesta, y el mismo orden relativo de actividades. Es interesante mencionar que, a diferencia del ensayo ILA, donde los compuestos se aplican por inyección, en este caso los distintos BRs deben ser incorporados desde el medio; la concentración efectiva de cada uno en los tejidos es, por lo tanto, una variable no controlada.

2.2.3. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS RAÍCES E HIPOCOTILOS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

Tal como se mencionó en el capítulo anterior, la aplicación de BRs sobre tejidos vegetales provoca notables alteraciones en la estructura de los mismos. En esta sección se describirá el efecto de los compuestos sintetizados sobre el crecimiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (cultivar Columbia), a nivel cuali y cuantitativo. Estas pruebas, al igual que las que se describirán en el punto 2.2.4, fueron desarrolladas en el laboratorio del Dr. S. Clouse.

Es sabido que los brassinosteroides suelen tener un marcado efecto sobre el crecimiento de las raíces, un fenómeno que se supone está mediado por el etileno. Para comprobar si los compuestos sintetizados podían generar dicha respuesta, se hicieron crecer plántulas de *Arabidopsis* en cajas de Petri, en un medio nutritivo conteniendo una concentración conocida del brassinosteroide a evaluar. Las placas se incubaron durante 11 días con un fotoperíodo que simula condiciones naturales de iluminación (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad). Se promedió la longitud (en mm) de las raíces de 20 réplicas y se tabularon los resultados en la Tabla 2.3 (junto con el error estándar). La longitud promedio de las raíces para las plántulas sin tratar fue de $11,5 \pm 1,5$ mm.

Concentración	Compuesto			
	HBL	HCS	HTY	HTE
10^{-6} M	$3,3 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,6$	$10,3 \pm 0,8$

Tabla 2.2. Efecto de los 28-homobrasinosteroides sintetizados sobre las raíces de *A. Thaliana*.

Puede verse que, salvo para HTE, el efecto es inhibitorio, y que los compuestos más activos en los bioensayos mencionados en las secciones anteriores (HBL, HCS) también resultan tener el efecto más marcado.

Este comportamiento había sido descrito anteriormente en otras especies vegetales, y no se tiene todavía una explicación adecuada para el mismo.

Por otro lado, se evaluó el efecto sobre el crecimiento de los hipocotilos de las plántulas. El experimento se repitió en las condiciones comentadas anteriormente, con un medio de cultivo conteniendo a los distintos BRs en la concentración más alta (10^{-6}M). Los resultados se muestran en la Figura 2.18.

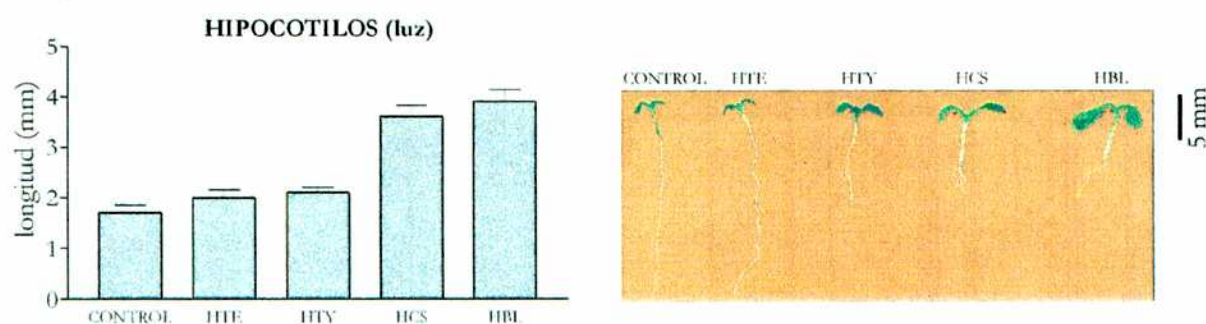


Figura 2.18. Efecto de los compuestos sintetizados sobre *A. thaliana* en la luz.

Pueden verse las distintas alteraciones provocadas por los compuestos aplicados:

- Mientras que HTE y HTY no alteran significativamente la longitud de los hipocotilos, HCS y HBL promueven notablemente su crecimiento. Además del efecto de elongación, es claro un aumento en el grosor de los mismos.
- Hay un marcado efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las raíces. También es posible ver la aparición de raíces secundarias.
- Se observa un desarrollo aberrante de las hojas, las cuales presentan un color verde más claro que el de las plántulas no tratadas. Cualitativamente, estas alteraciones en el desarrollo varían según el compuesto siguiendo un orden similar al observado para los bioensayos descritos previamente.

En el capítulo anterior se mencionaron algunos de los últimos hallazgos, que indican que la acción de los BRs interactúa con los efectos provocados por la luz. Por este motivo se decidió repetir la última experiencia con plántulas etioladas, es decir, que germinaron y crecieron en oscuridad. Los resultados se muestran en la Figura 2.19.

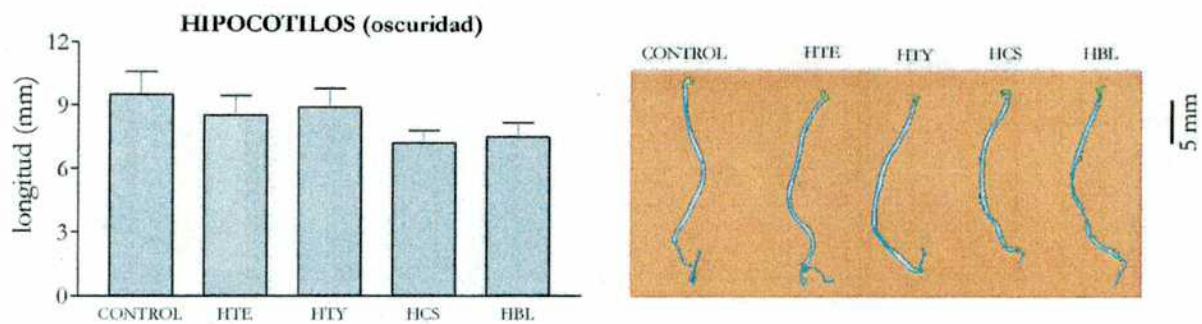


Figura 2.19. Efecto de los compuestos sintetizados sobre *A. thaliana* en la oscuridad.

Comparando con las plántulas que crecieron en la luz, son dos las diferencias principales observadas: por un lado, las plántulas control etioladas poseen un hipocotilo más largo y delgado, las hojas no se encuentran desarrolladas y están protegidas por un cotiledón no expandido; el color de las plántulas etioladas demuestra, además, la ausencia de clorofilas.

Por otro lado, en las plántulas etioladas tratadas con BRs no se observa elongación de los hipocotilos, comparados con el control, lo que podría indicar que este tipo de respuesta está saturada en las condiciones del ensayo (es decir, que las plántulas etioladas presentan una velocidad máxima de crecimiento, no alterada por el agregado exógeno de BRs), o, alternatively, que los tejidos etiolados no son sensibles a los BRs.

2.2.4. EFECTO SOBRE MUTANTES BIOSINTÉTICAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

El descubrimiento de mutantes deficientes en la biosíntesis de BRs ha proporcionado una herramienta fundamental para el estudio del mecanismo de acción de estas hormonas.

Hasta el momento se conocen unas 10 variedades mutantes de *A. thaliana* que, al ser defectuosas en algún paso de la biosíntesis de brassinosteroides, poseen concentraciones endógenas reducidas de los mismos. Todas estas mutantes presentan características comunes: enanismo, hojas más pequeñas de lo normal y fertilidad reducida o esterilidad. Como se vio en el punto anterior, las plántulas normales desarrollan hipocotilos más largos cuando crecen en la oscuridad; en las mutantes los hipocotilos son cortos incluso en estas condiciones.

Si se hacen crecer a estas mutantes en presencia de brassinólido, las plántulas revierten muchas de estas características fenotípicas a la normalidad. Esta reversión se hace posible también si las plántulas crecen en presencia de algún precursor del brassinólido siempre que el compuesto se ubique en la ruta biosintética después del paso afectado por la mutación. Este es un experimento que también permite demostrar si un compuesto en particular puede ser convertido *in vivo* en un brassinosteroide activo.

En este caso en particular, se evaluó la capacidad de los 28-homobrasinosteroides sintetizados para revertir el fenotipo de mutantes *det2* de *Arabidopsis*. Estas mutantes son defectuosas en la reductasa

DET2, que convierte (24R)-ergost-4-en-3-ona en campestanol en las primeras etapas de la biosíntesis (ver Figura 1.5).

La Figura 2.20 muestra los resultados obtenidos para plántulas que crecieron en fotoperíodo. CONTROL corresponde a plántulas *det2* que no fueron tratadas con BRs, mientras que COL corresponde a plántulas de la variedad salvaje Columbia usadas como referencia. La aplicación exógena de BRs produce la reversión de algunas de las características fenotípicas de la mutante al tipo salvaje (COL).

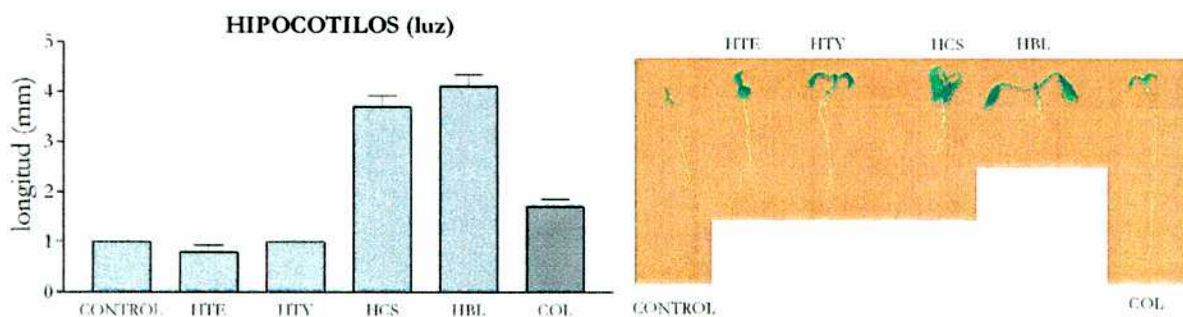


Figura 2.20. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la mutante *det2* de *A. thaliana* en la luz.

Como puede observarse, el fenotipo de las mutantes *det2* presenta hojas más pequeñas, y un hipocotilo y raíces más cortos que la variedad normal.

El agregado de HBL y HCS provoca los mismos efectos que los descritos anteriormente (ver Figura 2.17): se inhibe el crecimiento de las raíces, hay elongación de los hipocotilos (que también se vuelven más gruesos) y un desarrollo mayor de las hojas. Por otro lado, el agregado de HTY y HTE no provoca una elongación sustancial de los hipocotilos, pero puede notarse un cierto aumento en el tamaño de las hojas. Puede decirse, entonces, que las plántulas *det2* tratadas con BRs se asemejan a las plántulas normales tratadas con los mismos compuestos.

En la Figura 2.21 se muestran los resultados para plántulas mutantes etioladas. Como puede verse, las mutantes *det2* poseen un hipocotilo muy corto y grueso en comparación con las plántulas normales.

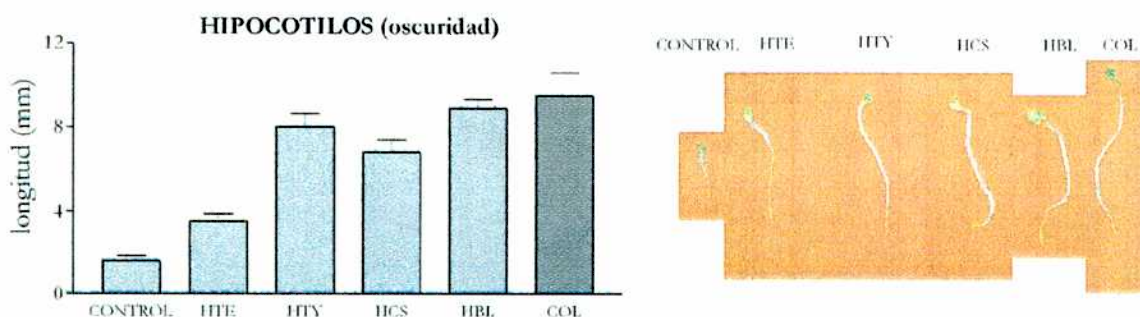


Figura 2.21. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la mutante *det2* de *A. thaliana* en la oscuridad.

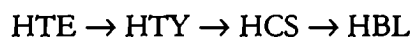
En este caso, las plántulas tratadas con HTE conservan los defectos morfológicos de la mutante, pero, en el caso de las tratadas con los demás compuestos, hay una reversión hacia el fenotipo normal

2.3. CONCLUSIONES

En vista de los últimos avances que permitieron elucidar, al menos parcialmente, la biosíntesis del brassinólido, en este capítulo se intentó ampliar el estudio a la familia de los 28-homobrasinosteroides. Para ello se sintetizaron el 28-homobrasinólido y tres de sus posibles precursores biosintéticos, según la ruta de oxidación temprana del C-6. Estos compuestos habían sido descritos anteriormente, pero no se habían estudiado en este contexto.

En el caso de HBL y HCS, se desarrollaron síntesis que resultaron tener una eficiencia levemente superior a las previamente publicadas; las mejoras fueron sustanciales en el caso de las síntesis de HTY y HTE.

Los datos preliminares, basados en los resultados de los bioensayos efectuados, indicarían que la biosíntesis del 28-homobrasinólido seguiría los mismos pasos que los establecidos para el brassinólido, es decir, que un posible esquema biosintético sería:



Esta hipótesis puede deducirse del orden relativo de actividad de los compuestos en los distintos bioensayos: $\text{HTE} < \text{HTY} < \text{HCS} < \text{HBL}$. Entonces, si la respuesta fisiológica es disparada por el producto final de esta ruta (HBL), la actividad observada depende de la concentración de dicho producto final en el tejido, que, a su vez, se relaciona con la cinética de transformación del precursor aplicado. Cuanto más lejos del HBL se encuentra un precursor en el camino biosintético, menor será la cantidad de HBL formado durante el período del ensayo y menor la respuesta.

Como se discutió en el capítulo anterior, los 28-homobrasinosteroides (de C_{29}) son minoritarios frente a los brassinosteroides de C_{28} , a pesar de que los fitoesteroides a partir de los cuales se originan son igualmente abundantes en los tejidos vegetales. Recientemente se encontraron indicios de que la abundancia relativa entre las dos familias de BRs estaría controlada en las primeras etapas de la biosíntesis.⁴⁴

Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio con las mutantes *det2* (deficientes en brassinosteroides endógenos), demuestran que las enzimas encargadas de las últimas etapas de la biosíntesis, al menos en el camino de oxidación temprana del C-6, son capaces de utilizar también a los homólogos de C_{29} como sustratos.

Hasta el momento no está claro si los 28-homobrassinosteroides tienen funciones fisiológicas propias, o son solamente metabolitos formados de manera marginal.

2.4. REFERENCIAS

- 1 Sasse J.M. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plantarum* 100, 696 (1997).
- 2 Thompson M.J., Mandava N., Meudt W., Dutky S., Lusby W., Spaulding D. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids* 39, 89 (1982).
- 3 Abe H., Morishita T., Uchiyama M., Takatsuto S., Ikekawa N., Ikeda M., Sassa T., Marumo S., Occurrence of new brassinosteroids in higher plants. *Experientia* 48, 2171 (1983).
- 4 Ikekawa N., Takatsuto S., Saito H., Morishita T., Abe H. Analysis of natural brassinosteroids by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 290, 289 (1984).
- 5 Barton D.H.R., Feakins P.G., Poyser J.P., Sammes P.G. A synthesis of the insect moulting hormone ecdysone and related compounds. *J. Chem. Soc. (C)* 1584 (1970).
- 6 Furhop J., Penzlin G. Organic Synthesis, p. 289. VCH Publishers. New York (1994).
- 7 Takatsuto S., Ikekawa N. Synthesis and activity of plant growth-promoting steroids, (22R,23R,24S)-28-Homobrassinosteroids, with modifications in rings A and B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 439 (1984).
- 8 Khripach, V.A., Zhabinskii V.N., Ivanova G.V., Olkhovich V. K. A new synthesis of homobrassinolide. *Vesti. AN Belarusi. Ser Khim.Navuk.* 70 (1992).
- 9 Sharpless K.B., Amberg W., Bennani Y.I. The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement. *J. Org. Chem.* 57, 2768 (1992)
- 10 Mc Morris T., Patil P., Chavez R., Baker M., Clouse S. Synthesis and biological activity of 28-homobrassinolide and analogs. *Phytochemistry* 36, 585 (1994).
- 11 Teme Centurión O., Galagovsky L. Alternative synthesis of 24(S)-homoethylcastasterone from stigmasterol. *Anal. Asoc. Quim. Argentina* 86, 104 (1998).

- 12 Jones E.R., Meakins G., Pragnell J., Muller W., Wilkins A. Studies in the steroid group. Convenient preparations of 3,6- and 6,17- deoxygenated 5 α -androstanes. *J. Chem Soc. Perkin I*, 2376 (1971).
- 13 Fieser L., Fieser M. Steroids, p. 315. Reihold Publ. Corp., New York (1959).
- 14 Parish E., Kizito S., Heidepriem R. A novel synthesis of steroidal-4-en-3,6-diones using pyridinium chlorochromate (PCC). *Synth. Commun.* 23, 223 (1993).
- 15 Li T., Li S. Steroidal 5-en-3-ones, intermediates of the transformation of steroidal 5-en-3 β -ols to steroidal 4-en-3,6-diones oxidized by pyridinium dichromate and pyridinium chlorochromate. *Steroids* 63, 76 (1998).
- 16 Blaszczak L. McMurry J. Reduction of enediacarbonyl compounds with titanous ion. *J. Org. Chem.* 39, 258 (1974).
- 17 Kolonko K., Shapiro R. Elimination of tertiary α hydrogens from tosylhydrazones with lithium diisopropylamide: preparation of trisubstituted alkenes. *J. Org. Chem.* 43, 1404 (1978).
- 18 Zhou W., Huang L. Concise stereoselective construction of side chain of brassinosteroid from the intact side chain of hyodeoxycholic acid: formal syntheses of brassinolide, 25-methylbrassinolide, 26,27-bisnorbrassinolide and their related compounds. *Tetrahedron* 48, 1837 (1992).
- 19 Schmidt J., Yokota T., Spengler B., Adam G., 28-Homoteasterone, a naturally occurring brassinosteroid from seeds of *Raphanus sativus*. *Phytochemistry* 34, 391 (1993).
- 20 Abe M., Takatsuto S., Nakayama M., Yokota T. 28-Homotyphasterol, a new natural brassinosteroid from rice (*Oryza sativa*) bran. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 176 (1995).
- 21 Chang F., Blickenstaff R. Acyl amides as epimerization reagents. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2906 (1958).
- 22 Mitsunobu O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* 1, 1 (1981).
- 23 Takatsuto S., Watanabe T., Fujioka S., Sakurai A. Synthesis of new naturally occurring 6-deoxo brassinosteroids. *J. Chem. Research (S)* 134 (1997).

- 24 Corey J., Nicolau K.C., Shibasaki M., Machida Y., Shiner C.S. Superoxide ion as a synthetical useful oxygen nucleophile. *Tetrahedron Lett.* 37, 3183 (1975).
- 25 Anastasia M., Allevi P., Ciuffreda P., Fiecchi A. A convenient protection of the 3 β -hydroxy or 3 β -chloro substituent of 6-oxo steroids. *Synthesis* 123 (1983).
- 26 Bose A., Lal B., Hoffman W., Manhas M. Facile inversion of unhindered sterol configuration. *Tetrahedron Lett.* 18, 1619 (1973).
- 27 Voight B., Schmidt J., Adam G. Synthesis of 24-epiteasterone, 24-epityphasterol and their B-homo-6 α -oxalactones from ergosterol. *Tetrahedron* 52, 1997 (1996).
- 28 Thompson M., Meudt W., Mandava N., Dutky S., Lusby W., Spaulding D. Synthesis of brassinosteroids and relationships of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids* 39, 89 (1982).
- 29 Teme Centurión O. Tesis de Doctorado: Síntesis de análogos de castasterona y ensayos de su actividad biológica. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. (1997).
- 30 Roddick J.G., Ikekawa N. Modification of root and shoot development in monocotyledon and dicotyledon seedlings by 24-epibrassinolide. *J. Plant. Physiol.* 140, 70 (1992).
- 31 Clouse S.D., Hall A.F., Langford M. Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* 12, 61 (1993).
- 32 Szekers M., Nemeth K., Koncz-kalman Z., Altmann T. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85, 171, (1996).
- 33 Goda H., Shimada Y., Asami T., Fujioka S., Yoshida S. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130, 1319 (2002).
- 34 Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. An early oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 130, 930 (2002).

CAPÍTULO 3

ANÁLOGOS FLUORADOS EN C-3

Los compuestos organofluorados han generado una considerable atracción en el campo de la química medicinal, la agroquímica y la ciencia de materiales.¹ Específicamente, los análogos fluorados de productos naturales han resultado ser herramientas útiles para estudios fisiológicos y farmacológicos, pues la introducción de un átomo de flúor en una molécula a menudo provoca cambios significativos en sus propiedades físicas y biológicas.²

En particular, desde el trabajo pionero de Fried y Sabo³, la química de la fluoración de esteroides se ha desarrollado ampliamente: pueden citarse como ejemplos importantes, los análogos fluorados de corticosteroides, vitamina D y estrógenos.⁴

En los últimos veinte años se han preparado una gran cantidad de análogos de brassinosteroides, con numerosas modificaciones. Sin embargo, son pocos los casos publicados de compuestos fluorados. Hay varias causas que justifican en general la síntesis de organofluorados, y en el caso particular de los BRs puede mencionarse:

Los brassinosteroides son esteroides polihidroxilados, y se sabe que, debido a su alta electronegatividad, el flúor puede mimetizar al oxígeno. La longitud de enlace C-F es de 1,39 Å en comparación con los 1,43 Å de la longitud C-O. El efecto sobre la distribución electrónica de los átomos vecinos es similar en ambos casos, y el reemplazo no altera sustancialmente el momento dipolar de la molécula. Además, y aunque es un tema controvertido⁵, suele admitirse que el flúor puede actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno. Se tiene aquí un punto importante en el contexto de este trabajo, pues se supone que los brassinosteroides se unirían a los receptores celulares a través de este tipo de interacción.⁶

La biosíntesis y metabolización de los BRs implican una serie de hidroxilaciones. La fluoración de una posición particular puede bloquear una oxidación, ya que la energía del enlace C-F (485 kJ / mol en promedio), es muy alta comparada con una unión típica C-H (413 kJ / mol), inhibiéndose de este modo la acción enzimática.

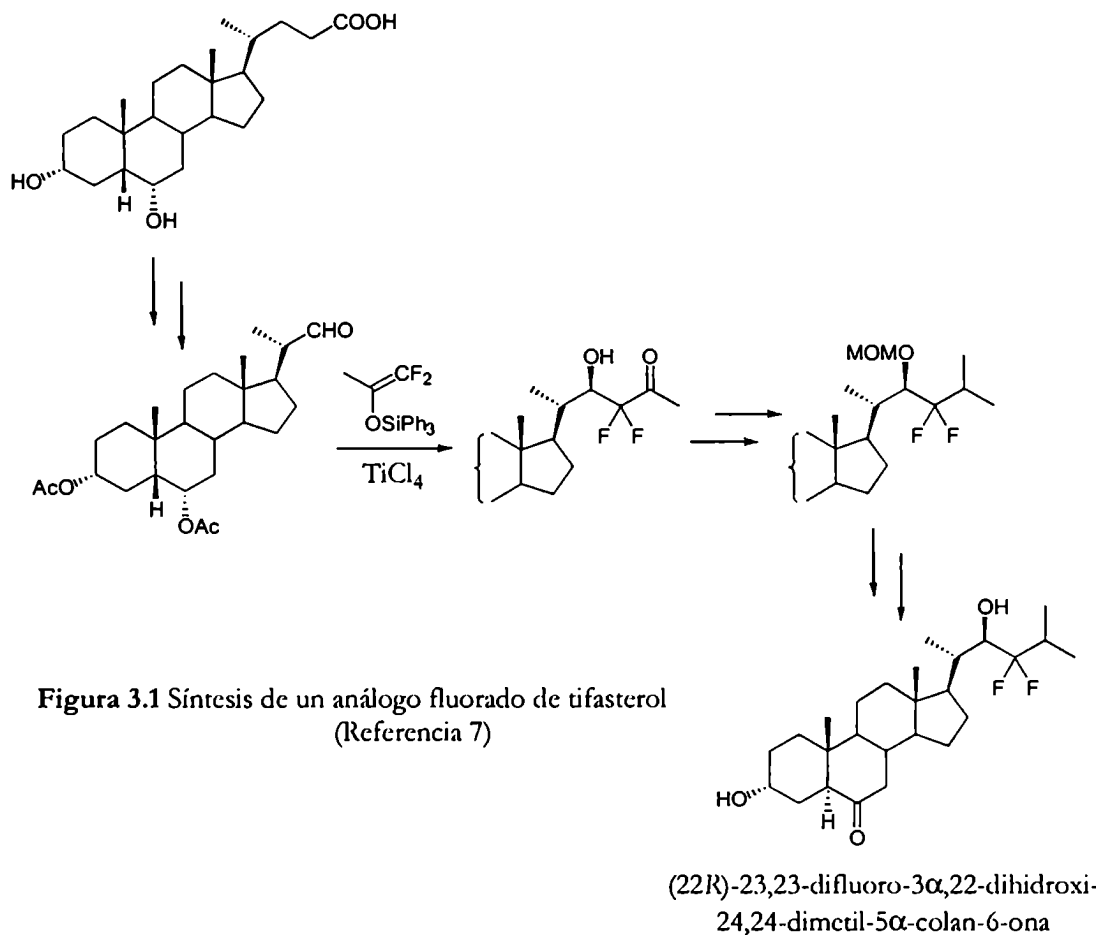
El radio de van der Waals del flúor es 1,35 Å frente a 1,10 Å del hidrógeno. Por lo tanto, el reemplazo no suele alterar la geometría molecular: un sustrato activo y su análogo fluorado son muy similares desde un punto de vista estérico. Sin embargo, la presencia de un átomo de flúor puede influir sobre las propiedades de grupos funcionales vecinos.

3.1. SÍNTESIS

3.1.1. BRASSINOSTEROIDES FLUORADOS: ANTECEDENTES.

El primer ejemplo data de 1993, cuando Jin aplicó la condensación aldólica de 2,2-difluoro enol silil éteres para la construcción de la cadena lateral de un análogo de tifasterol.⁷ La Figura 3.1 resume la

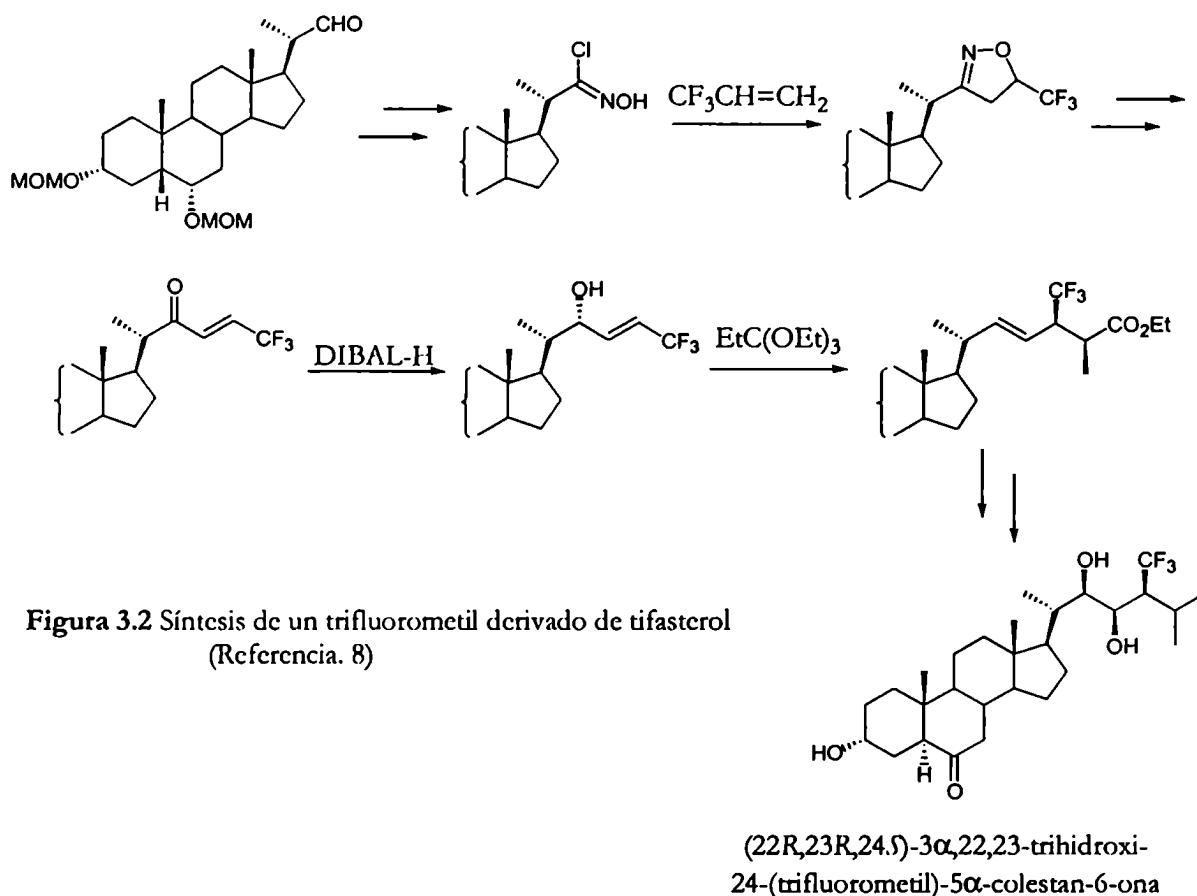
secuencia sintética utilizada.



Otro análogo fluorado del tífasterol fue preparado por Zhou⁸ a partir de un aldehído esteroidal (obtenido también a partir de ácido hideoxicólico). El aldehído se transformó en una clorooxima, que reaccionó con trifluoropropeno (en una cicloadición 1,3-dipolar), para dar una trifluorometil isooxazolina (Figura 3.2).

La isooxazolina se transformó en varios pasos en una trifluorometil cetona insaturada que se redujo estereoselectivamente para dar el alcohol alílico con configuración 22*S*. Al ser tratado con ortopropionato de trietilo, el alcohol sufrió una transposición de Johnson-Claisen para generar el éster correspondiente con un doble enlace Δ^{22} con configuración *E*.

Finalmente, la reducción del éster en C-26, la construcción de los anillos A y B y la dihidroxilación asimétrica del doble enlace de la cadena lateral, permitió obtener (22*R*,23*R*,24*S*)-3α,22,23-trihidroxi-24-(trifluorometil)-5α-colestan-6-ona, un análogo fluorado de tífasterol. En este caso tampoco se informó la bioactividad del compuesto obtenido.



Finalmente, Back⁹ obtuvo los análogos de castasterona y brassinólido fluorados en C-25, mediante una secuencia que se muestra en la Figura 3.3. Esta modificación es interesante, puesto que, como se recordará del Capítulo 1, la metabolización de los BRs puede comenzar con la hidroxilación de esa posición.

Partiendo de un epóxido preparado a partir de estigmasterol (Figura 1.11), y por tratamiento con un reactivo de Grignard apropiado, se construyó la cadena lateral del esteroide con un doble enlace $\Delta^{25,26}$. La adición de HF introdujo el flúor en C-25, dando así 25-fluorocastasterona, que se transformó en 25-fluorobrasinólido mediante el procedimiento habitual.

Si bien ambos compuestos resultaron ser inactivos en el ensayo de inclinación de la lámina de arroz, la interpretación sobre la influencia de la fluoración aún no es clara, debido a la falta de acuerdo entre diferentes autores sobre la bioactividad del 25-hidroxibrasinólido en el mismo bioensayo. Por un lado, Voigt¹⁰ reportó que este compuesto es tan activo como el brassinólido, mientras que Seto¹¹ y Back⁹ describen una bioactividad mucho menor. De todas maneras, la introducción de un átomo de flúor en lugar de un hidroxilo en C-25 parece reducir la bioactividad del análogo resultante.

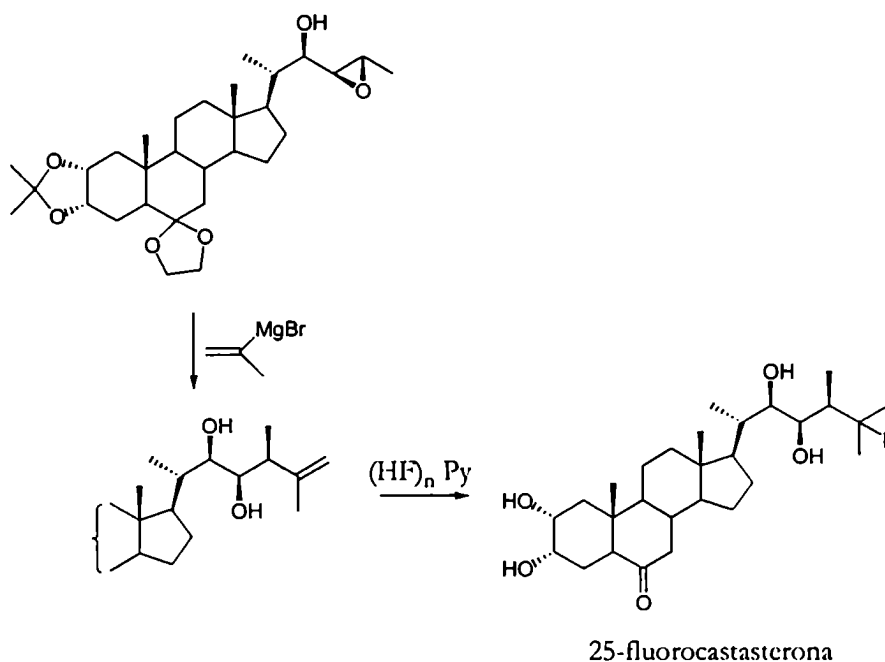


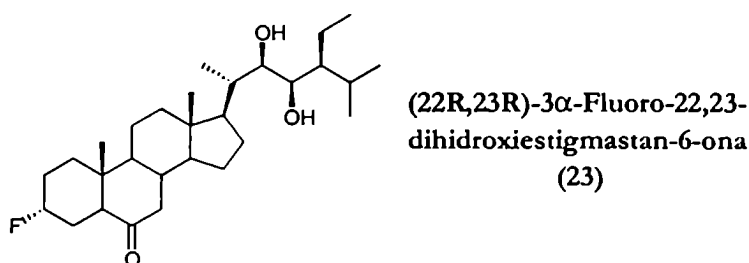
Figura 3.3. Síntesis de 25-fluorobrasinosteroides
(Referencia 9).

Siguiendo una idea similar, en este trabajo se planteó la obtención de análogos fluorados que pudieran utilizarse en estudios sobre la biosíntesis de 28-homobrasinosteroides.

En este capítulo se describirá la síntesis de dos análogos donde se introdujo un flúor en lugar del hidroxilo en C-3, y se discutirá el efecto sobre la bioactividad comparada con los compuestos naturales correspondientes.

3.1.2. SÍNTESIS DE (22R,23R)-3 α -FLUORO-22,23-DIHIDROXIESTIGMASTAN-6-ONA (23).

Este compuesto es el análogo de 28-homotifasterol (HTY), cuya síntesis se describió en la sección 2.1.2 del capítulo anterior.



Dado que el flúor es el elemento más electronegativo, es natural que las reacciones de fluoración más ampliamente utilizadas se basen en sustituciones donde el flúor actúa como nucleófilo. Si las condiciones son tales que la sustitución sigue un mecanismo bimolecular, es posible, además, controlar el transcurso estereoquímico de la reacción.

Una estrategia sencilla para la obtención de **23** se muestra en la Figura 3.4, donde X es un grupo nucleófugo.

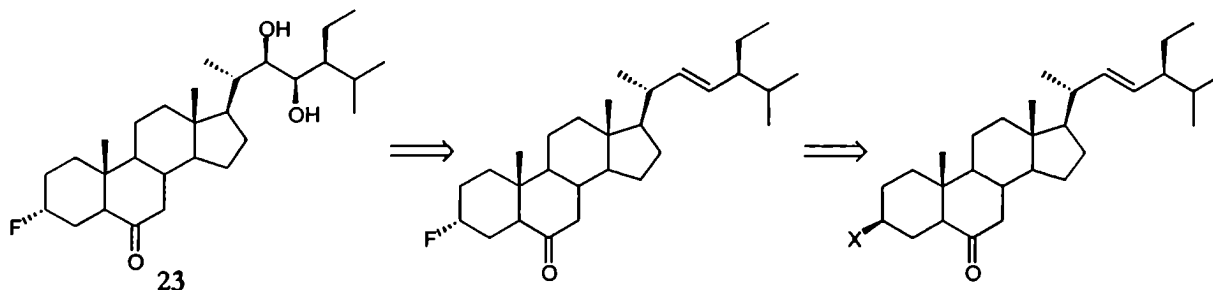


Figura 3.4 Retrosíntesis propuesta para el compuesto **23**.

Los grupos salientes más utilizados en estas sustituciones son el bromo o un sulfonato; se eligió esta última opción dado que durante la síntesis de HTE se había preparado un precursor adecuado. Según la cita original², la reacción consiste simplemente en el tratamiento del 3 β -sulfonato con fluoruro de potasio, en un solvente polar aprótico (acetona o acetonitrilo), a reflujo, aunque los rendimientos informados son modestos.

En una modificación posterior de la misma reacción¹³, se propuso el agregado de 18-crown-6 para que, al formarse el complejo con el catión potasio, aumentara la solubilidad de la sal y la nucleofilicidad del fluoruro.

Otra alternativa¹⁴ consiste en emplear un fluoruro de tetraalquilamonio, también en un solvente aprótico. El contraión no puede en este caso coordinarse eficientemente con el fluoruro, se impide la formación de pares iónicos y se aumenta así la nucleofilicidad.

Es importante mencionar que en todos los casos es necesario trabajar en condiciones anhidras rigurosas: el fluoruro posee una gran tendencia a formar enlaces hidrógeno con los solventes próticos, lo cual disminuye notablemente su carácter nucleofílico.¹⁵

De esta forma, el compuesto **20** se trató con fluoruro de potasio y 18-crown-6 en acetonitrilo a reflujo durante 3 horas. Se obtuvo un compuesto mayoritario con un rendimiento del 87%, pero luego de un análisis espectroscópico del mismo, pudo determinarse que no se trataba del producto fluorado deseado, sino del 3 α ,5 α -ciclo-6-ceto esteroide **3**.

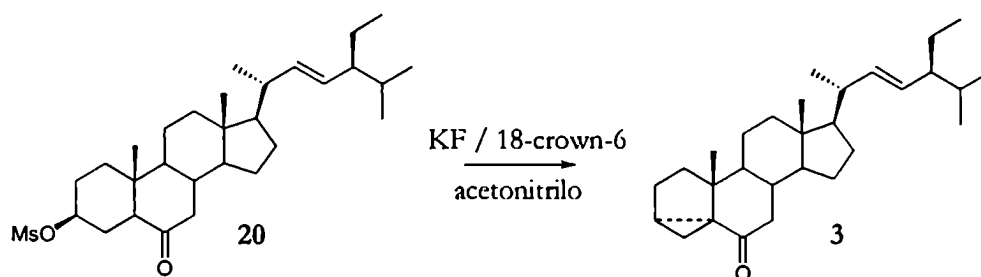


Figura 3.5

Inesperadamente, la basicidad del fluoruro en este medio es suficiente como para promover la reacción de ciclación frente a la de sustitución, en una situación similar a la comentada en el capítulo anterior. En un intento paralelo, el compuesto **20** se trató con fluoruro de tetrabutilamonio en tetrahidrofurano, pero en este caso también se obtuvo el compuesto **3** como producto mayoritario.

Existen antecedentes que muestran la capacidad del fluoruro para actuar como base y catalizar la formación de enolatos de cetonas.¹⁶ Como se discutió en el Capítulo 2, éste parece ser el mecanismo implicado en la reacción de ciclación. Para comprobar esta hipótesis, se intentó la misma reacción pero sobre un sustrato con el carbonilo protegido (Figura 3.6).

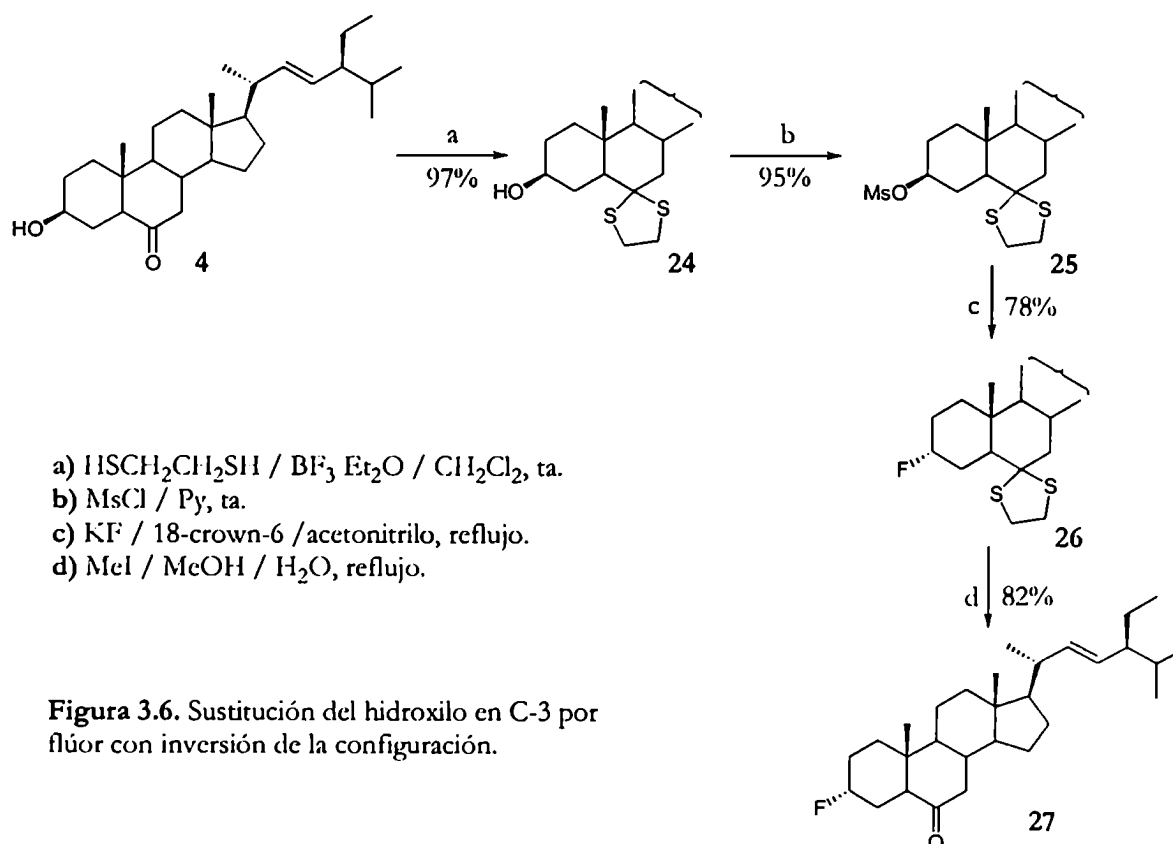


Figura 3.6. Sustitución del hidroxilo en C-3 por flúor con inversión de la configuración.

El carbonilo puede transformarse en un acetal (o tioacetal), pero esta reacción no puede efectuarse directamente sobre el compuesto **20** debido a la labilidad del mesilato en C-3 frente a las condiciones de las protecciones.

Así, el 3 β -hidroxi-6-ceto esteroide **4** se trató con 1,2-etanoditiol en cloruro de metileno a temperatura ambiente, durante 18 h, con eterato de trifluoruro de boro como catalizador.¹⁷ En la reacción, casi cuantitativa, se formó el tioacetal **24**. Este grupo protector se eligió por la facilidad con que puede introducirse, y la estabilidad que presenta ante distintas condiciones de reacción. El hidroxilo en C-3 se transformó en el correspondiente mesilato, en las condiciones habituales, y el compuesto resultante **25** se trató con fluoruro de potasio y 18-crown-6.

En este caso pudo obtenerse un compuesto mayoritario que, como se demostró mediante un análisis espectroscópico, resultó ser el compuesto fluorado deseado **26**.

La presencia del átomo de flúor en el compuesto **26** pudo determinarse, indirectamente, a partir de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

En primer lugar, en el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 3.7), puede observarse claramente un doblete centrado en 89,6 ppm con una constante de acoplamiento de 166,9 Hz. Tanto el desplazamiento químico observado, como el valor de $^1J_{\text{C-F}}$ son indicativos de la presencia de un átomo de flúor en la molécula. El espectro DEPT-135 demuestra, además, que el carbono al que está unido el flúor es secundario.

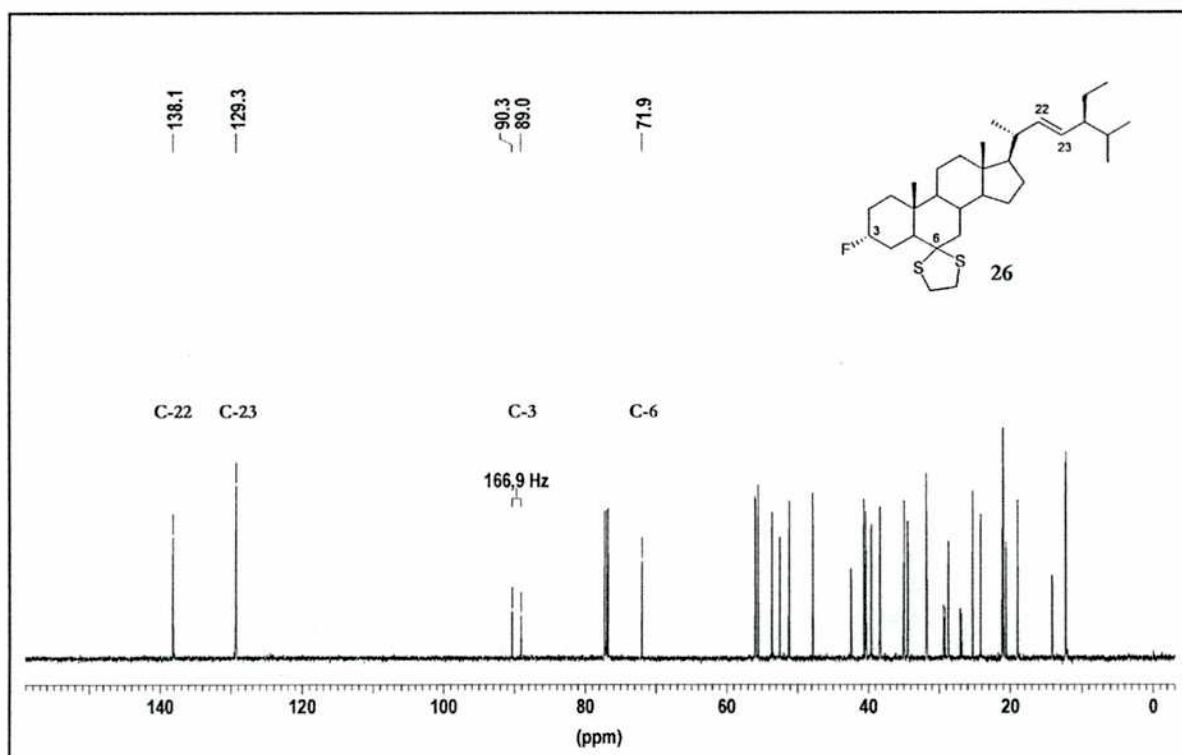


Figura 3.7. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del compuesto **26**.

En el espectro de RMN- ^1H (Figura 3.8), puede verse un doble multiplete centrado en 4,92 ppm. La mayor de las constantes de acoplamiento tiene un valor de 48,7 Hz., lo que indica que el hidrógeno observado es geminal al flúor. Además, las otras constantes de acoplamiento son pequeñas y no alcanzan a resolverse: en un esteroide donde los anillos A y B presentan una unión *trans*, la multiplicidad observada sólo puede explicarse si se admite que el hidrógeno geminal al flúor se encuentra en posición ecuatorial, β con respecto al plano del esteroide. Puede concluirse, entonces, que la sustitución del sulfonato de **25** por fluoruro ocurrió con inversión de la configuración del C-3.

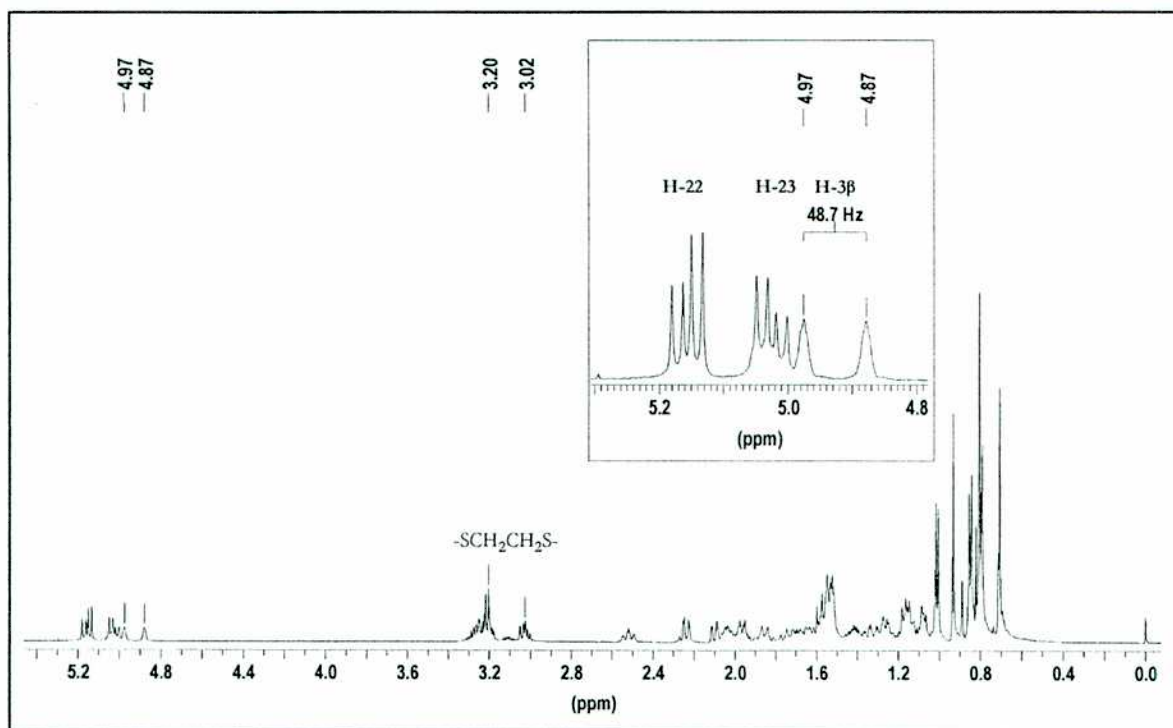


Figura 3.8. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **26**.

Finalmente, el espectro de RMN- ^{19}F del compuesto **26** (Figura 3.9) muestra un único multiplete centrado en $-181,0$ ppm (relativo a CCl_3F). La multiplicidad de esta señal se origina en los acoplamientos F-H, y se discutirá más adelante.

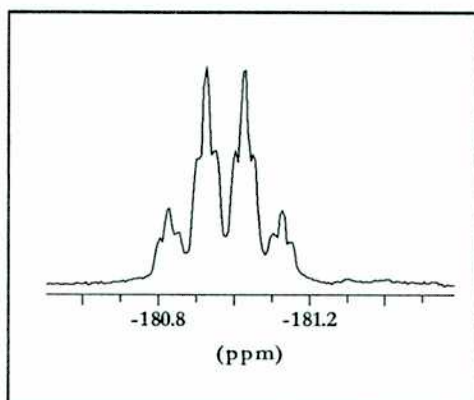


Figura 3.9. Espectro de RMN- ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) del compuesto **26**.

Por otro lado, el resultado sintético confirmaría que el carbonilo en C-6 está implicado en la formación del *iso*-esteroide **3**, según el mecanismo propuesto en el capítulo anterior.

El paso siguiente, mostrado en la Figura 3.6, consistió en la desprotección del carbonilo en C-6. Se evaluaron varias posibilidades. Finalmente se encontró que el tratamiento del ditiano **26** con yoduro de metilo en metanol húmedo a reflujo¹⁸ permitía la transformación requerida con alto rendimiento y en condiciones suaves. De esta manera, se obtuvo el intermediario **27** con un rendimiento del 30 % a partir de estigmasterol.

Simultáneamente al desarrollo de esta secuencia, se buscaron alternativas que permitieran la introducción del átomo de flúor en condiciones neutras o ácidas, para evitar la protección del carbonilo en C-6. Fue entonces que se evaluó la posibilidad de utilizar trifluoruro de dietilamino azufre (DAST) como reactivo fluorante.¹⁹ Este reactivo es ampliamente utilizado para la síntesis de hidratos de carbono y nucleósidos fluorados, y también había sido empleado en la síntesis de fluoroesteroides.^{20,21} Este reactivo permite obtener un fluoruro de alquilo a partir de un alcohol. En general, la reacción ocurre por un mecanismo del tipo S_N2 y, por lo tanto, se observa inversión de la configuración del carbono oxigenado, pero la estereoquímica de la reacción puede verse modificada por la estructura particular del sustrato.²²

Es importante notar que este reactivo también es capaz de reaccionar con compuestos carbonílicos²³, para dar los correspondientes *gem*-difluoro compuestos, pero este tipo de transformación requiere condiciones más enérgicas de reacción. Es de esperar que si se trabaja a bajas temperaturas, el DAST reaccionará selectivamente con el alcohol en C-3 frente al carbonilo en C-6. Se trató, entonces, el 3 β -hidroxi-6-ceto esteroide **4** con DAST, en cloruro de metileno a -78°C , obteniéndose el compuesto **27**, en un solo paso, con un rendimiento total del 47 % a partir de estigmasterol (Figura 3.10.a).

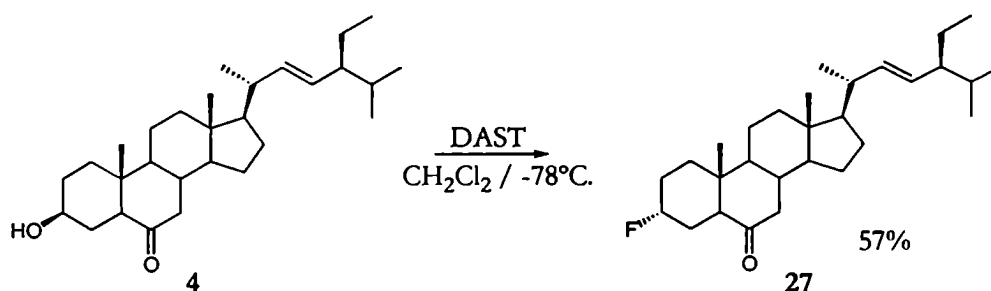


Figura 3.10.a. Reacción del compuesto **4** con DAST.

La Figura 3.10.b muestra el mecanismo de la reacción de fluoración.

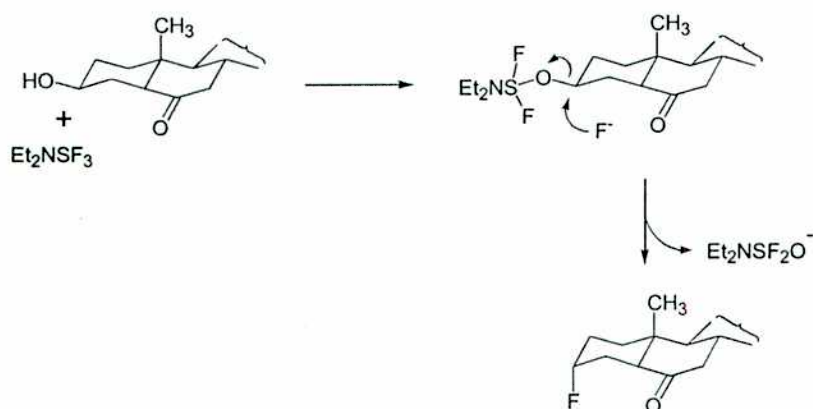


Figura 3.10.b. Mecanismo de la sustitución con DAST

Finalmente, la dihidroxilación catalítica asimétrica del doble enlace de la cadena lateral permitió obtener el análogo **23** con un rendimiento de 18 % a partir de estigmasterol. La estructura del compuesto fue completamente caracterizada por medio de espectrometría de masas de alta resolución (FAB), y espectroscopía de RMN (^1H , ^{13}C , ^{19}F , DEPT-135, COSY-45 y HETCOR). La Figura 3.11 muestra el espectro de RMN- ^1H del análogo obtenido.

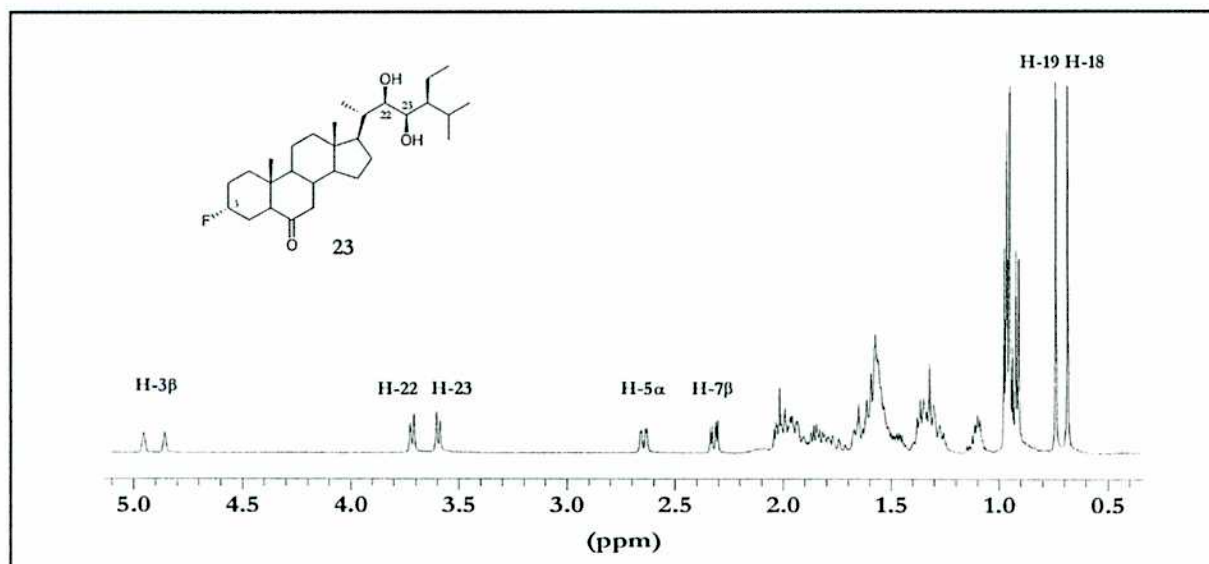


Figura 3.11. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **23**.

En este punto cabe aclarar una cuestión sobre la asignación de la configuración de los carbonos 22 y 23, centros quirales que se forman en el paso de dihidroxilación: como se vio en los capítulos

anteriores, la dihidroxilación catalítica asimétrica del doble enlace Δ^{22} del esqueleto de estigmastano, produce una mezcla de los dioles diastereoméricos, con configuración 22*S*,23*S* y 22*R*,23*R*. La configuración absoluta de estos centros quirales puede determinarse en base al espectro de RMN de ^1H , por comparación con compuestos conocidos. Se ha establecido²⁴ que si el espectro se obtiene en cloroformo, o mezclas cloroformo-metanol, las señales correspondientes a los hidrógenos 22 y 23 son características, tanto en el desplazamiento químico como en la multiplicidad observada, y esto es independiente de las funcionalidades presentes en el fragmento cíclico del esteroide. En la Figura 3.12. puede verse que si la configuración es 22*R*,23*R*, los hidrógenos 22 y 23 aparecen acoplados entre sí, con una constante de acoplamiento cercana a los 8,5 Hz. En cambio, si la configuración es 22*S*,23*S*, los desplazamientos de esos hidrógenos son muy cercanos y ambas señales se presentan superpuestas. Esta diferencia se debe a que la cadena lateral de estos esteroides no presenta libre rotación, existiendo conformaciones preferenciales, distintas para cada diastereómero.²⁵

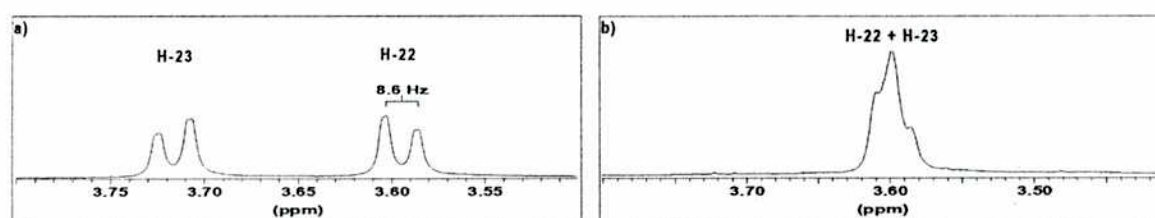


Figura 3.12. a) Señales de H-22 y H-23 para un diol de configuración 22*R*,23*R* en una cadena lateral de estigmastano. b) Idem para una configuración 22*S*,23*S*.

Los diastereómeros 22*S*,23*S* obtenidos como productos secundarios durante las síntesis de todos los análogos obtenidos fueron aislados y caracterizados, aunque dada su baja bioactividad, no son descriptos en esta Tesis.

Como se mencionó anteriormante, la configuración en C-3 se asignó indirectamente, en base al patrón de acoplamiento del hidrógeno geminal al flúor (H-3 β) con los hidrógenos vecinos. En el caso de compuestos organofluorados, es posible, además, utilizar las constantes de acoplamiento del propio flúor para obtener información estereoquímica, pues se conocen relaciones empíricas tipo Karplus que relacionan los valores de J_{FH} y J_{FC} con la geometría molecular:

i) Acoplamientos vecinales F-H ($^3J_{FH}$): La ecuación empírica²⁶ que relaciona el valor absoluto de J (en Hz) con el ángulo dihedro φ F-C-C-H es:

$$^3J_{FH} = \begin{cases} 31 \cos^2 \varphi & \text{si } 0^\circ < \varphi < 90^\circ \\ 44 \cos^2 \varphi & \text{si } 90^\circ < \varphi < 180^\circ \end{cases}$$

Esta ecuación es aplicable si no hay otros grupos electronegativos unidos a los carbonos que definen el dihedro.

En el compuesto **23**, los hidrógenos vecinales acoplados con el flúor (H-2 y H-4) se superponen con el resto de los metilenos, y no aparecen resueltos en el espectro de RMN- ^1H . Las constantes de acoplamiento se estimaron en forma aproximada a partir de los espectros COSY-45 y HETCOR.

Puede tomarse como ejemplo la Figura 3.13. La señal del H-4 β es, debido al flúor vecinal, un doble multiplete, centrado en 2,03 ppm. Este hidrógeno está acoplado, a su vez, con el H-5 α , que resuena a 2,63 ppm. De la correlación entre ambos hidrógenos (que se muestra en el recuadro), pudo medirse un valor aproximado de 45 Hz para $^3J_{\text{F-H-4}\beta}$. De igual manera se estimó un valor cercano a 14 Hz para el acoplamiento del flúor con el H-4 α .

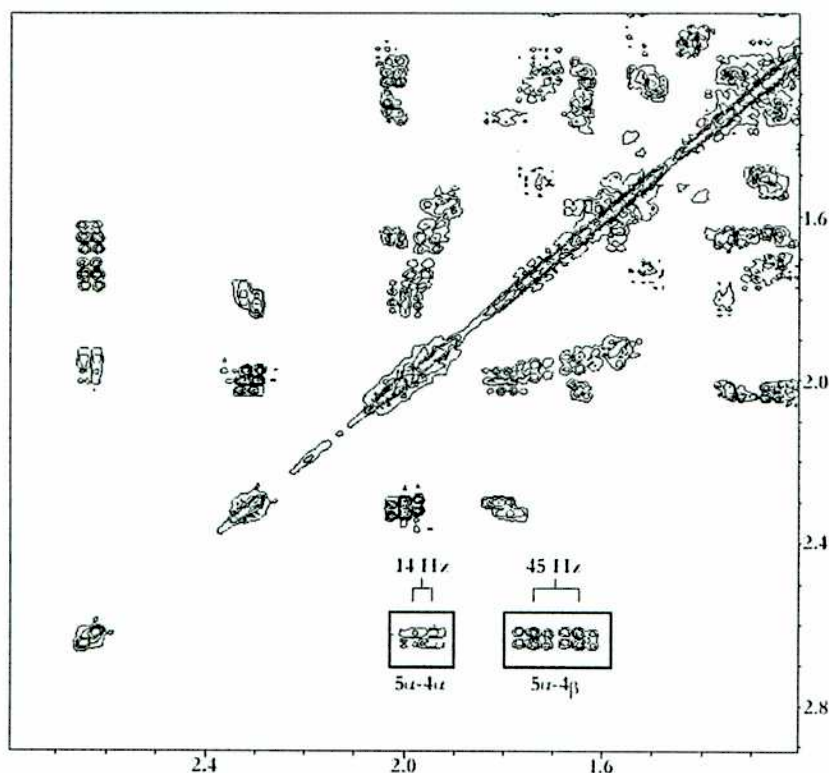


Figura 3.13. Ampliación del espectro COSY-45 (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **23**, mostrando el efecto de la presencia del F sobre las correlaciones.

Esta deducción pudo corroborarse en base al espectro de RMN- ^{19}F (Figura 3.14). Si se admite un acoplamiento geminal (con H-3 β) de 48 Hz, dos acoplamientos vecinales axial – axial (con H-2 β y H-4 β) cercanos a 45 Hz, y dos acoplamientos vecinales axial – ecuatorial (con H-2 α y H-4 α) de aproximadamente 13 Hz, puede reproducirse el patrón de acoplamiento observado para el flúor.

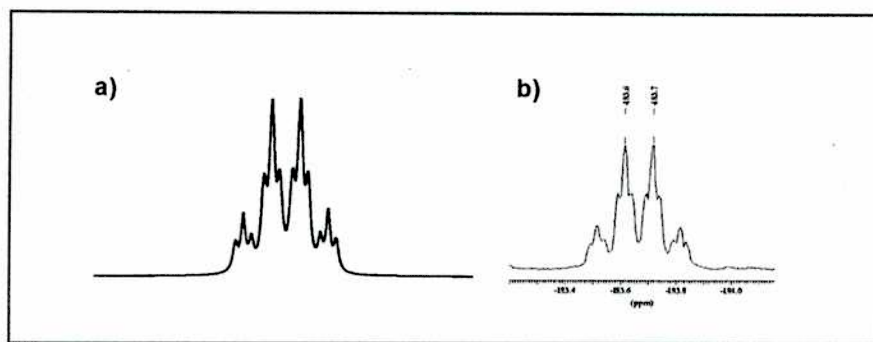


Figura 3.14 a) Espectro simulado que muestra la señal de ^{19}F esperada para el compuesto **23**, calculado a partir de las constantes de acoplamiento $J_{\text{H-F}}$ medidas en los espectros de ^1H .

b) Espectro de ^{19}F del compuesto **23** (470 MHz).

- ii) Acoplamientos vecinales F-C ($^3J_{\text{FC}}$): El valor (en Hz) varía según la ecuación²⁷:

$$^3J_{\text{FC}} = 11 \cos^2 \varphi$$

Estas constantes de acoplamiento se midieron, de manera directa, en el espectro de RMN- ^{13}C .

- iii) Acoplamientos geminales F-C ($^2J_{\text{FC}}$): en el rango de 18 a 24 Hz, no muestran una dependencia significativa con la geometría²⁷, y no pueden utilizarse para obtener información sobre la conformación. Sin embargo, suelen ser útiles para la asignación de los carbonos correspondientes.

Se obtuvo, luego, un modelo aproximado para la geometría del compuesto **23**, en el que sólo se consideró el fragmento cíclico, pues se supuso que la cadena lateral no alteraría notablemente la conformación de los anillos A y B.

La conformación más probable se encontró minimizando la estructura con el hamiltoniano semiempírico AM1²⁸, implementado en el programa MOPAC, incluyendo efectos de solvente (en este caso cloroformo) a través del método COSMO.²⁹ A partir de los parámetros geométricos del modelo, se calcularon las constantes de acoplamiento, según las ecuaciones anteriores.

En la Figura 3.15 se muestran los valores, en Hz, de las constantes de acoplamiento J_{FH} y J_{FC} experimentales. Se indican, entre paréntesis, los valores calculados. Pese a la naturaleza aproximada de las ecuaciones utilizadas, hay una concordancia razonable entre los valores experimentales y los estimados. De esta manera queda confirmada, por otra vía, la correcta asignación de la configuración del C-3.

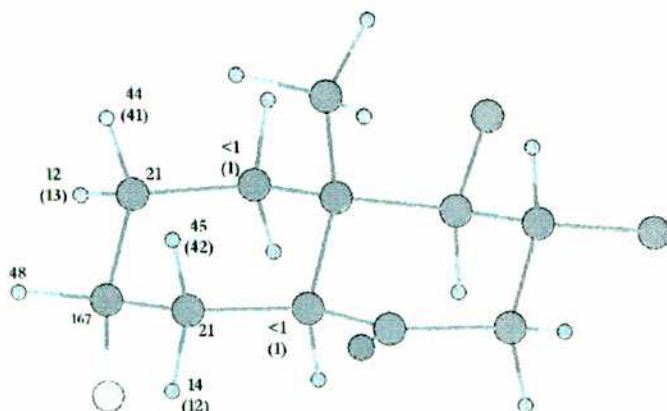
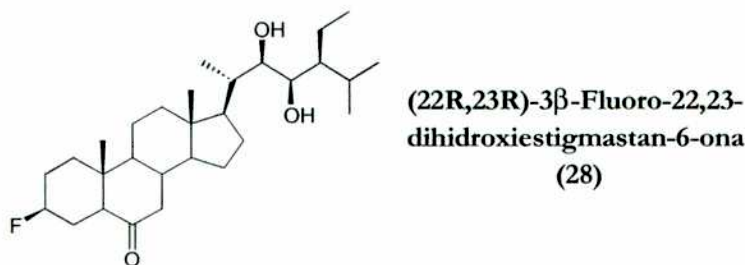


Figura 3.15. Constantes de acoplamiento J_{HH} y J_{HC} para el compuesto 23.

3.1.3. SÍNTESIS DE (22R,23R)-3 β -FLUORO-22,23-DIHIDROXIESTIGMASTAN-6-ONA (28).

Este compuesto es el análogo de 28-homoteasterona (HTE), cuya síntesis se describió en la sección 2.1.2 del capítulo anterior.



La síntesis del análogo 28 podría llevarse a cabo, en principio, mediante una estrategia similar a la utilizada para el compuesto 23, es decir, introduciendo el átomo de flúor por sustitución de un precursor 3 α -hidroxilado, que podría ser el compuesto 22, intermediario en la síntesis de HTY. Sin embargo, los antecedentes encontrados en la literatura indicaban que los intentos de inversión directa de un 3 α -sulfonato por un fluoruro alcalino¹², conducen, invariablemente, a la formación de un doble enlace Δ^2 , debido posiblemente, a que, como se muestra en la Figura 3.16, la reacción de eliminación β está muy favorecida por la geometría del sistema y la basicidad del fluoruro.

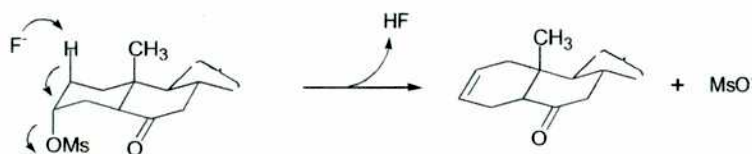


Figura 3.16. Reacción de un 3 α -sulfonato esteroideal con fluoruro.

Aunque era factible que el mismo proceso ocurriera al intentar la fluoración usando DAST, se supuso que unas condiciones de reacción más suaves podrían disminuir las posibilidades de eliminación y conducir al compuesto esperado. Sin embargo, al tratar el el 3 α -hidroxi esteroide **22** con DAST, se obtuvo una mezcla donde el producto mayoritario fue la dienona **6**, formándose en menor proporción, además, un compuesto que resultó ser la dienona³⁰ isomérica **29** (Figura 3.17)

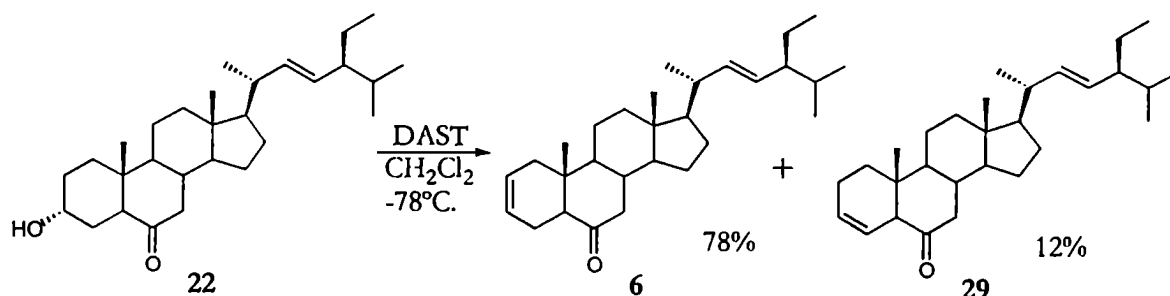


Figura 3.17. Reacción del 3 α -hidroxi esteroide **22** con DAST.

Buscando en la literatura antecedentes sobre obtención de 3 β -fluoro esteroides que pudieran adaptarse a nuestra síntesis, se halló un trabajo de Shoppee (1957) que describía una síntesis sencilla y eficiente de 3 β -fluoro colesterol, el cual se obtenía por apertura con HF acuoso del correspondiente *iso*-esteroide³¹ (Figura 3.18).

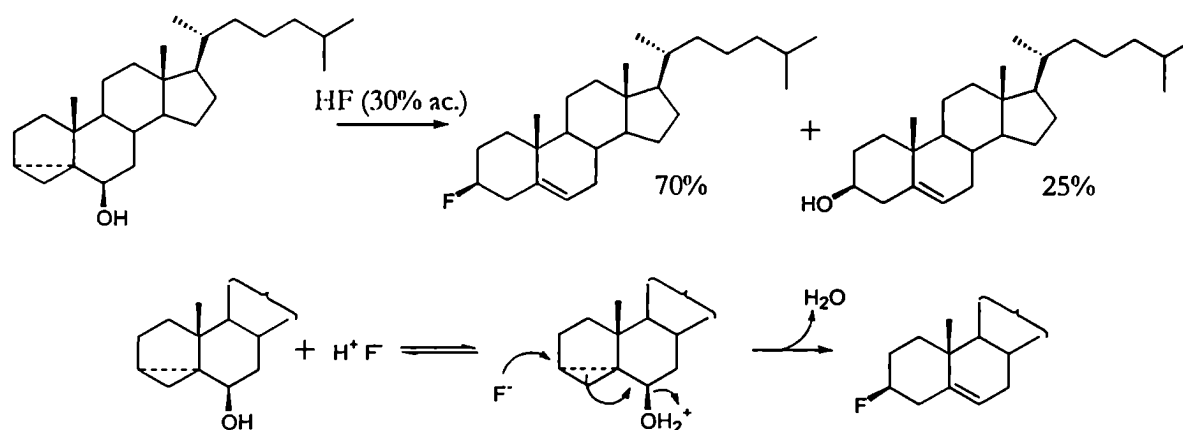


Figura 3.18. Síntesis de 3 β -fluoro colesterol (Referencia 29).

El ataque nucleofílico del fluoruro sobre el C-3 genera el isómero β , más estable. El agua presente en el medio de reacción compite eficientemente con el fluoruro como nucleófilo, formándose, simultáneamente, una cantidad apreciable de colesterol por un mecanismo similar al mostrado. Es evidente que, en principio, podría mejorarse el rendimiento de la reacción si se trabajara en

ausencia de agua u otros nucleófilos. Se descartó la posibilidad de utilizar HF gaseoso, puesto que su alta reactividad requiere el uso de equipamiento especial.

Una alternativa adecuada es el polifluoruro de hidrógeno-piridina (HF-Py, o reactivo de Olah)³², una mezcla compuesta por 30% de piridina y 70% de HF, y que es una fuente de HF anhidro fácil de manipular.

Así, el tratamiento del compuesto **2** con HF-Py en cloruro de metileno condujo a la obtención de (2*E*)-3β-fluoroestigmasta-5,22-dieno (**30**) con un rendimiento del 91% (Figura 3.19).

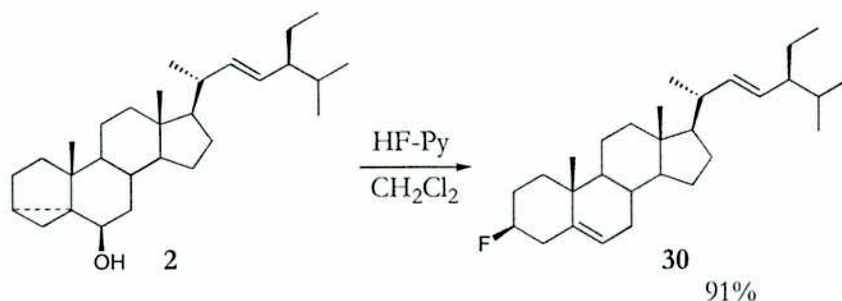


Figura 3.19. Síntesis de (2*E*)-3β-fluoroestigmasta-5,22-dieno (**30**)

Nuevamente, la introducción del flúor en la posición requerida se confirmó mediante espectroscopía de RMN. En los espectros de RMN-¹³C y DEPT-135 aparece un doblete en 92,8 ppm con un valor de $^1J_{\text{FC}}$ de 174,5 Hz que corresponde al C-3. Además, la señal del C-5 en 139,3 ppm se ve como un doblete con un $^3J_{\text{FC}}$ de 12 Hz. (Figura 3.20).

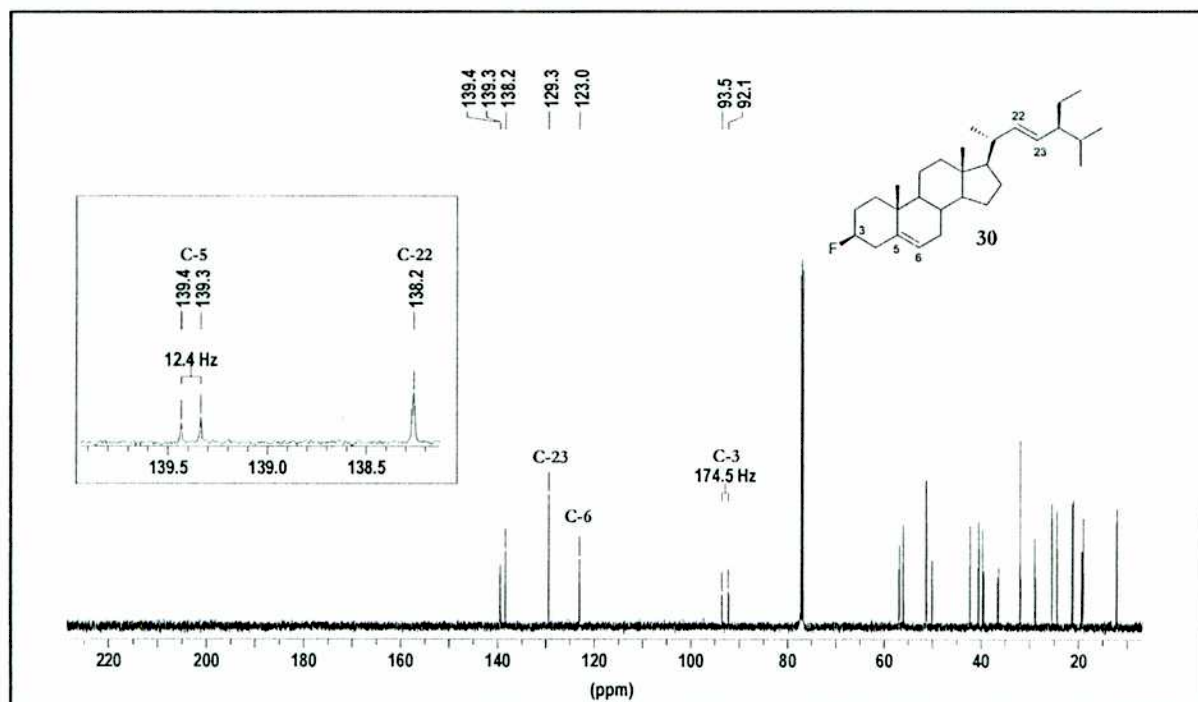


Figura 3.20. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) del compuesto **30**.

El espectro de RMN- ^1H muestra la señal de un hidrógeno geminal al flúor (doblete multiplete centrado en 4,36 ppm y con un $^2J_{\text{FH}}$ de 50,4 Hz). La multiplicidad del H-3 es compatible con una configuración axial, lo que indica la posición ecuatorial (β) del flúor (Figura 3.21).

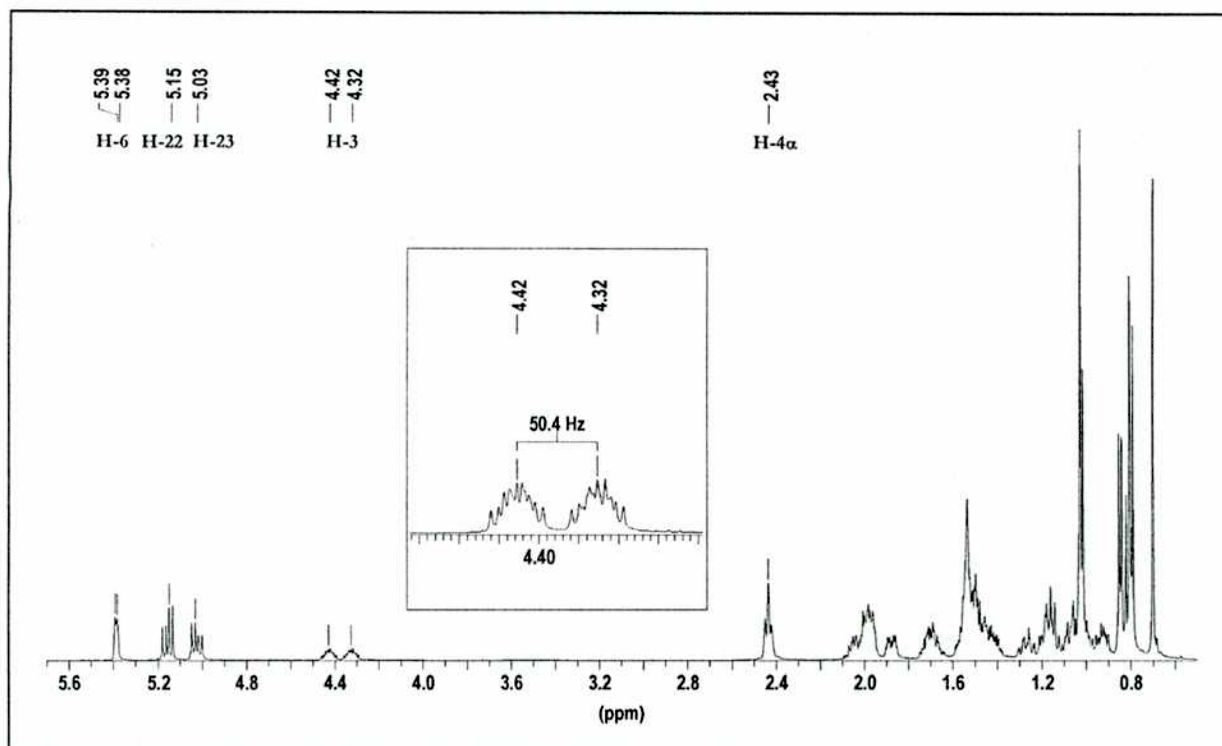


Figura 3.21. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 30.

La señal del flúor en el espectro RMN- ^{19}F aparece también como un doble multiplete, centrado en -167,9 ppm (Figura 3.22)

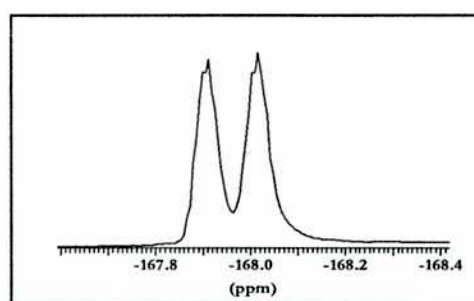


Figura 3.22. Espectro de RMN- ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) del compuesto 30.

De esta manera, el átomo de flúor se introdujo estereoselectivamente en el anillo A, restando aún la funcionalización del anillo B y la cadena lateral para así obtener el análogo requerido.

Una secuencia sencilla tendiente a introducir la función 6-oxo en el anillo B sería la hidratación anti-

Markovnikov del doble enlace Δ^5 , que puede, en principio, lograrse mediante una hidroboración, y posterior oxidación del alcohol resultante. Sin embargo, no puede esperarse que el paso de hidroboración sea selectivo frente al doble enlace de la cadena lateral.

Es posible lograr, en un esteroide, la oxidación selectiva del doble enlace Δ^5 frente al Δ^{22} , mediante una epoxidación. Esta estrategia ya había sido utilizada con éxito en nuestro grupo en la síntesis de otros análogos de BRs.^{33,34}

El tratamiento de un precursor adecuado con ácido *m*-cloroperoxibenzoico (*m*-CPBA) a baja temperatura, genera una mezcla de los epóxidos $5\alpha,6\alpha$ y $5\beta,6\beta$, siendo el primero mayoritario. El uso de la baja temperatura es esencial para lograr la regioselectividad deseada. La estereoselectividad en la epoxidación con *m*-CPBA puede explicarse, como es habitual en estos casos, admitiendo que la presencia del metilo de C-19 en posición axial bloquea la entrada del reactivo epoxidante por la cara β del esteroide, formándose, en consecuencia, una mayor proporción del epóxido $5\alpha,6\alpha$ (compuesto 31).

Por otro lado, el tratamiento del esteroide con una mezcla de permanganato de potasio y nitrato férrico, en una mezcla de diclorometano / agua / *t*-butanol, permite obtener una mezcla donde el epóxido $5\beta,6\beta$ (compuesto 32) se forma en mayor proporción³⁵, y con una mínima cantidad de subproductos de oxidación en otras posiciones.

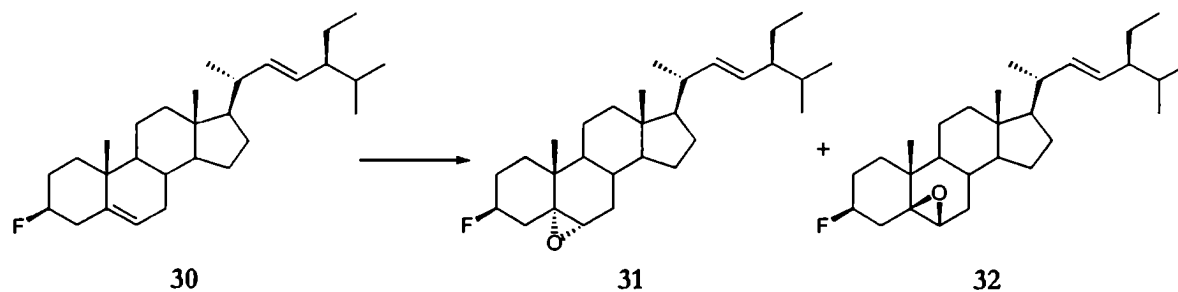


Figura 3.23. Epoxidación regioselectiva del doble enlace Δ^5 del compuesto 30

En el caso de la epoxidación con permanganato, la situación no es tan clara, y si bien no se ha establecido el mecanismo exacto de la reacción, se sabe que la misma ocurre en la fase acuosa que se forma sobre las sales inorgánicas, y donde el *t*-butanol actuaría como catalizador transfiriendo al esteroide entre las fases orgánica y acuosa.³⁶

Algunos resultados sugieren que el origen de la selectividad facial en la epoxidación, se debe a que los iones de los metales de transición se coordinarían con el doble enlace Δ^5 , por la cara α , menos impedida, formando un complejo π . La formación del enlace de coordinación produce, además, un debilitamiento del doble enlace, haciéndolo más susceptible al subsecuente ataque del permanganato

por la cara opuesta, dando el epóxido β . Este modelo se basa en la observación de que el agregado de otros metales de transición capaces de formar complejos π , también son efectivos promoviendo la estereoselectividad observada, mientras que si se utilizan metales alcalinos, la misma se pierde.³⁷ El siguiente paso consiste en la transformación del 5,6-epóxido para conseguir la correcta funcionalización del anillo B.

Un análisis sencillo (Figura 3.24) permite demostrar que solamente partiendo del epóxido $5\beta,6\beta$ (32), una apertura reductiva, mediante un hidruro, puede generar un producto con fusión *trans* entre los anillos A y B y oxigenado en C-6 (compuesto 33).

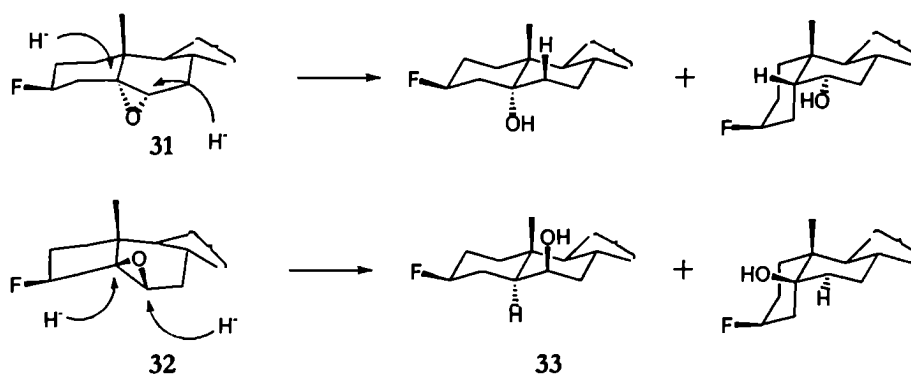


Figura 3.24. Posibles productos formados por apertura reductiva de 5,6-epóxidos

De esta manera, queda definida la necesidad de obtener el epóxido $5\beta,6\beta$: el tratamiento del (22*E*)- 3β -fluoroestigmasta-5,22-dieno (30) con permanganato de potasio y nitrato férrico, en las condiciones mencionadas anteriormente, permitió obtener una mezcla de los epóxidos $5\alpha,6\alpha$ (31) y $5\beta,6\beta$ (32), en una proporción aproximada de 1 a 7. El rendimiento para la formación del epóxido 32 fue del 72%.

La Figura 3.24 muestra también que, en principio, el ataque del hidruro sobre el epóxido 32 puede ocurrir en el C5 o el C6, generándose, en este último caso un isómero 5β -hidroxilado no deseado. Es sabido que, en el caso de epóxidos en ciclohexanos conformacionalmente rígidos, la regioselectividad en la apertura del oxirano es tal que se favorece la formación del producto donde los nuevos sustituyentes quedan en posiciones *trans*-diaxial entre sí³⁶. Por este motivo, es de esperar la formación predominante del producto buscado (33).

Por otro lado, el agregado de un ácido de Lewis permite que la reacción ocurra en condiciones más suaves: el ácido se coordina con el oxirano y debilita la unión C-O. La catálisis electrofílica favorece, además, la entrada del hidruro en el C-5 (el más sustituido).

Como primera opción se decidió emplear hidruro de litio y aluminio como reductor y tricloruro de aluminio como ácido de Lewis. Esta combinación había sido utilizada por nuestro grupo en anteriores síntesis de BRs.³³ Se sabe que en el medio de reacción se forman especies tales como AlH_2Cl y AlHCl_2 , que son las que actúan como reductoras. La proporción relativa de estas especies depende de la proporción inicial de LiAlH_4 y AlCl_3 , siendo la regio y estereoselectividad de las reducciones altamente dependiente de la composición de la mezcla de reductores.³⁹

Si se disuelven en THF tres equivalentes de hidruro por equivalente de tricloruro de aluminio, se forma una solución de hidruro de aluminio:



El tratamiento del epóxido **32** con esta solución a temperatura ambiente no produjo reacción, sin embargo, a temperaturas mayores a 50°C se obtuvieron dos productos mayoritarios, que pudieron separarse e identificarse:

El primer producto, obtenido con un rendimiento del 43 %, resultó tener un ión molecular cuya masa, determinada con alta resolución, coincidió con la esperada para el alcohol deseado.

En la Figura 3.25 se puede ver el espectro ^1H -RMN correspondiente. La señal a 3,81 ppm es compatible con un alcohol obtenido por apertura *trans*-diaxial del epóxido, pues su patrón de acoplamiento es el esperado para un hidrógeno ecuatorial.

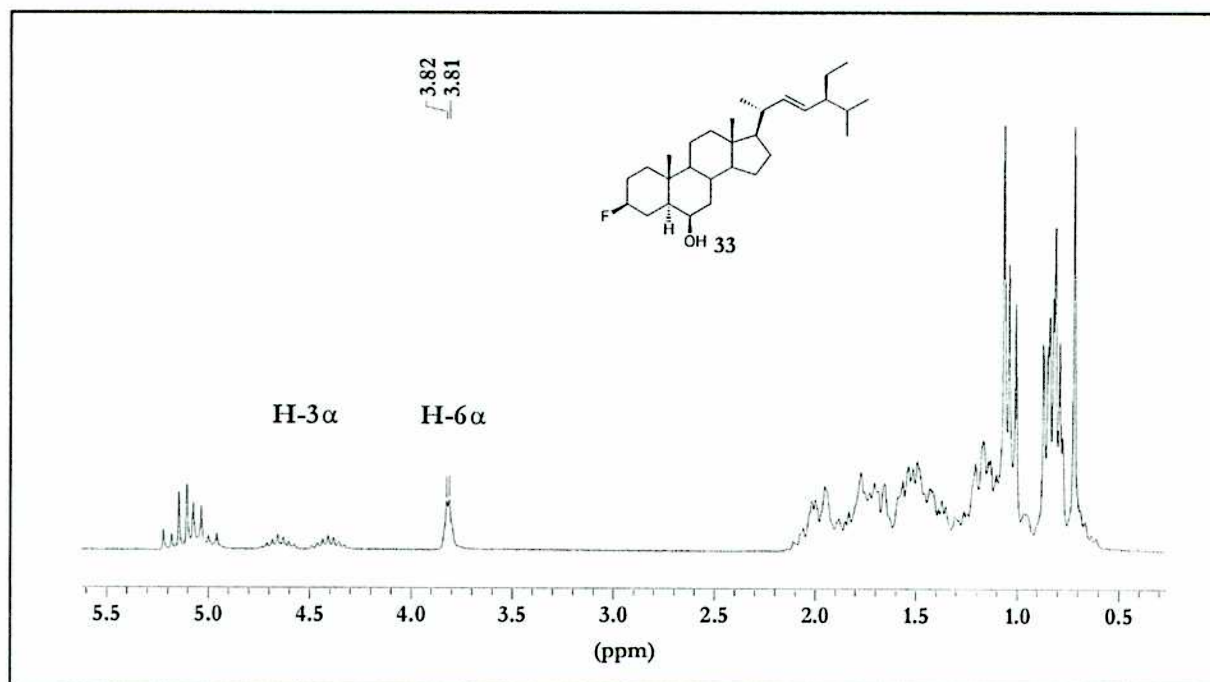


Figura 3.25. Espectro de RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) del compuesto **33**.

Además, las constantes de acoplamiento del H-3 α , geminal al flúor, no cambiaron con respecto al epóxido precursor **32**, indicando que se mantuvo la unión *trans* entre los anillos A y B.

Por otro lado, los espectros de RMN- ^{13}C y DEPT-135 muestran una única señal en la zona de los carbonos oxigenados, a 71,8 ppm, y que corresponde a un alcohol secundario (obviamente, en el epóxido de partida se observan dos señales en esta región). Todo esto indica que el producto obtenido es el fluoro alcohol **33**.

El segundo producto aislado posee un espectro de ^1H -RMN (Figura 3.26) muy similar al presentado anteriormente. También aparece una señal a 3,96 ppm, que puede atribuirse a un hidrógeno ecuatorial geminal a un hidroxilo (posiblemente en C-6). Sin embargo, la señal del H-3 α , geminal al flúor, se encuentra más desprotegido y superpuesta con la correspondiente al alqueno Δ^{22} .

El ión molecular hallado es 466, es decir, 34 unidades más de lo esperado. Este resultado, confirmado posteriormente mediante espectrometría de masas de alta resolución, indica que se produjo el ataque de un cloruro sobre el epóxido, para dar el compuesto **34**, con un rendimiento del 38%.

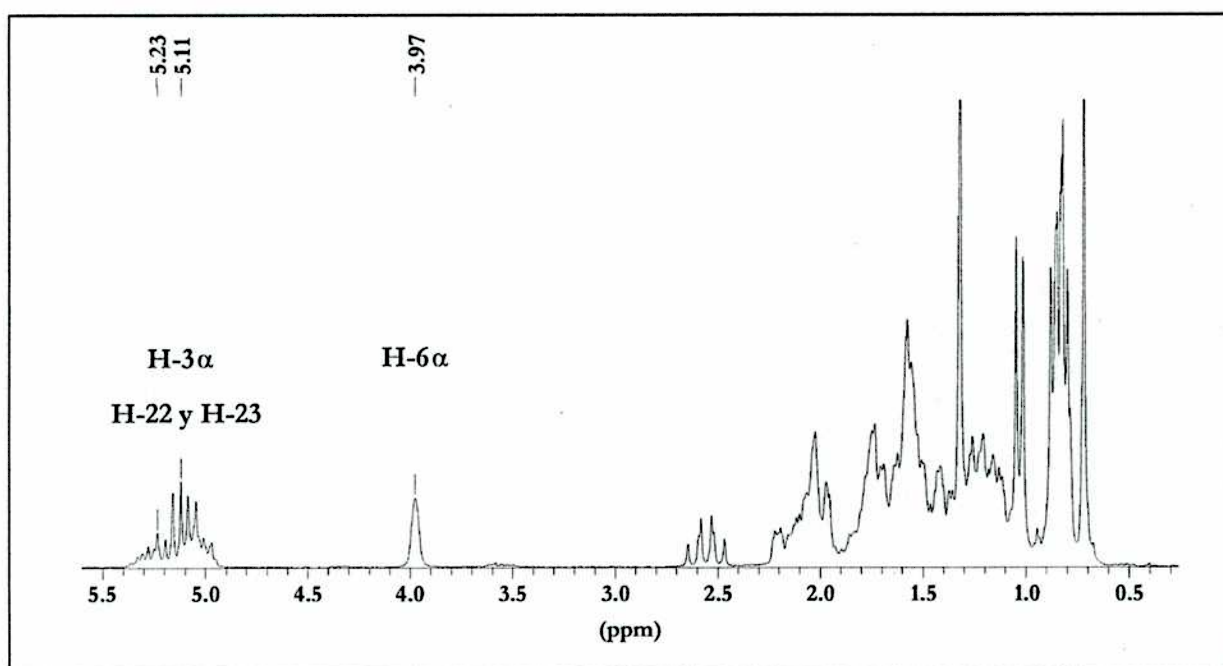


Figura 3.26. Espectro de RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) del compuesto **34**.

Si se admite que el cloro se encuentra en C-5 en posición axial (α), una interacción 1,3-diaxial sería responsable de la desprotección observada para el H-3 α . Por otro lado, el análisis del espectro de ^{13}C -RMN muestra una señal correspondiente a un carbono terciario en 83,5 ppm, que puede atribuirse al carbono unido al cloro. Esta señal aparece como un doblete de 10,6 Hz compatible con un acoplamiento carbono-flúor a tres enlaces (confirmando que el cloro está unido al C-5).

Este tipo de reacción secundaria había sido descrita anteriormente⁴⁰, y su incidencia es variable, dependiendo de las condiciones de reacción.

Es interesante notar, sin embargo, que si se aplica la misma reacción al epóxido **10** (ver Figura 2.6 del capítulo anterior), no se obtienen, en forma apreciable, productos de cloración.³³ No se tiene una explicación adecuada sobre la diferencia en el comportamiento entre ambos epóxidos, aunque cabe plantear la hipotética influencia del flúor en C-3 sobre el transcurso de la reacción.

Se hicieron varios intentos, modificando la proporción $\text{LiAlH}_4 / \text{AlCl}_3$, la temperatura, y la velocidad de agregado del epóxido, pero en todos los casos el alcohol **33** se formó junto a cantidades importantes de la clorohidrina **34** (Figura 3.27)

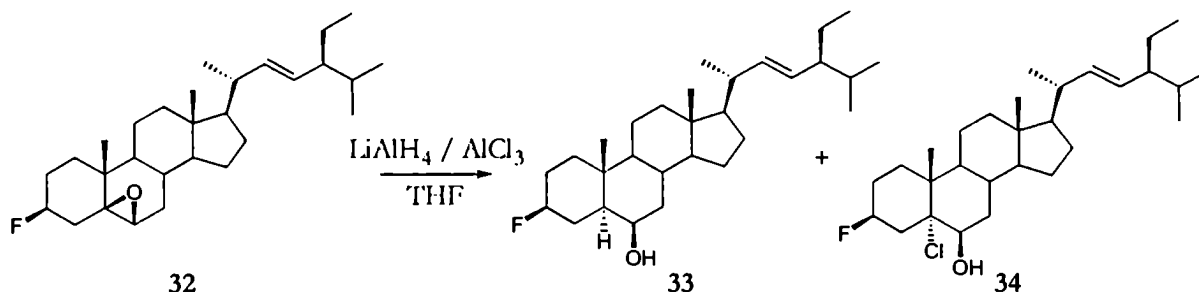


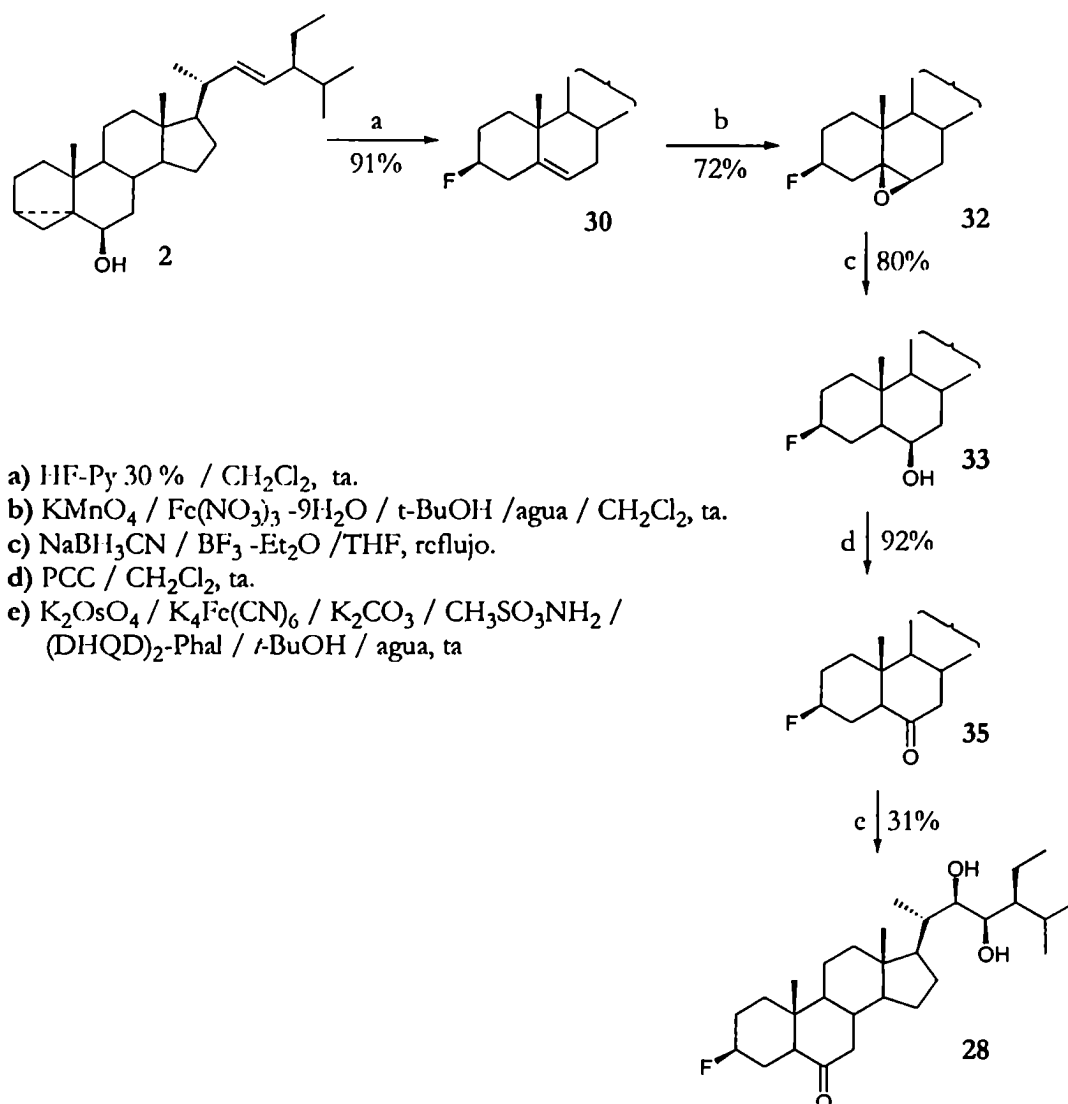
Figura 3.27. Reacción del epóxido **32** con $\text{LiAlH}_4 / \text{AlCl}_3$.

Resultó evidente que la estrategia seguida conducía al compuesto deseado, pero se intentó optimizar este último paso eligiendo otra combinación reductor / catalizador. Se encontró que esta misma transformación podía efectuarse, en condiciones suaves, con cianoborohidruro de sodio como fuente de hidruro y trifluoruro de boro como catalizador.⁴¹

Debe tenerse en cuenta que aquí también es posible obtener una fluorohidrina como producto secundario⁴², pero si se controla la cantidad de BF_3 agregada, esta reacción puede minimizarse. En la práctica, se usa un indicador ácido-base, verde de bromocresol, para determinar la cantidad mínima de BF_3 necesaria para acidificar el medio de reacción, y así evitar un exceso de catalizador. De esta manera, el tratamiento del epóxido **32** con esta combinación de reactivos, a reflujo en THF, permitió obtener el compuesto **33** con un rendimiento del 80%.

La oxidación del fluoroalcohol **33** en condiciones suaves, con clorocromato de piridinio en diclorometano, generó la fluorocetona **35** con alto rendimiento.

Finalmente, la dihidroxilación catalítica asimétrica del doble enlace Δ^{22} permitió obtener el análogo **28** con un rendimiento total de 20 % a partir de estigmasterol. La Figura 3.28 resume la secuencia sintética utilizada.



Esquema 3.28. Síntesis de (22R,23R)-22,23-dihidroxi-3β-fluoroestigmastan-6-ona (28)

La estructura del análogo 28 se confirmó utilizando espectrometría de masas de alta resolución (FAB), y espectros de RMN (¹H, ¹³C, ¹⁹F, DEPT-135, COSY-45 y HETCOR).

Al igual que para el análogo 23, resulta posible analizar la información estereoquímica obtenida a partir de las constantes de acoplamiento de los carbonos e hidrógenos con el flúor. La Figura 3.29 muestra los valores experimentales, en Hz, de los ³J_{FC} y ³J_{HH}, junto a los calculados (entre paréntesis) en base a la geometría optimizada, tal como se describió anteriormente.

El análisis confirma nuevamente la configuración del C-3, y sirve como ejemplo del uso de los acoplamientos a larga distancia del flúor para el estudio de la estructura tridimensional de moléculas

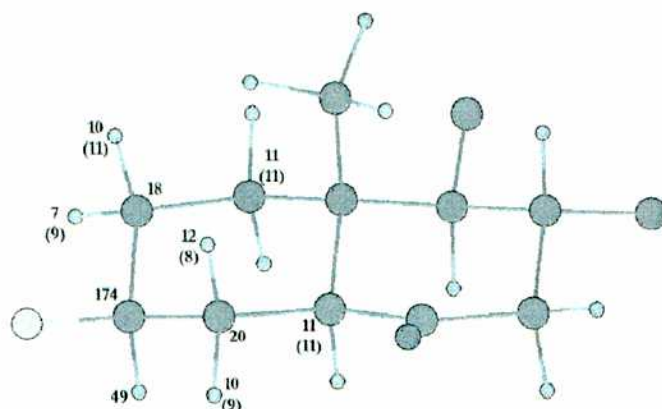
orgánicas.⁴³

Figura 3.29. Constantes de acoplamiento J_{FH} y J_{FC} para el compuesto 28.

3.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

La bioactividad de los análogos sintetizados se evaluó en distintos ensayos; a continuación se describirán los resultados obtenidos. Con el fin de estudiar el efecto producido al remplazar un hidroxilo por un flúor, se incluyen, además, los valores de bioactividad de los compuestos 28-homoteasterona (HTE) y 28-homotifasterol (HTY), ya descritos en el Capítulo 2.

3.2.1. ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA).

Se desarrolló en las condiciones ya descritas. La tabla resume el valor del ángulo promedio (en grados) para distintas dosis aplicadas.

Dosis (ng / plántula)	Compuesto			
	HTE	28	HTY	23
5	10 ± 2	11 ± 1	24 ± 4	10 ± 1
50	25 ± 6	23 ± 4	72 ± 8	34 ± 8
500	60 ± 6	38 ± 8	77 ± 8	86 ± 6

Control: 11 ± 2

Mediante un análisis estadístico (test de Mann-Whitney)⁴⁴ se pueden comparar las respuestas inducidas por cada análogo fluorado y el compuesto natural correspondiente, para cada dosis aplicada. Se encuentra que la actividad del compuesto 28 es similar a la de HTE a las dosis más bajas, pero es significativamente menor en la dosis de 500 ng / plántula. De todas maneras, el compuesto fluorado

28 presenta una actividad significativa a dosis altas, comparado con el control.

Por otro lado, el compuesto **23** es menos activo que el correspondiente brassinosteroide natural HTY a dosis bajas, pero posee una actividad comparable a dosis altas. Estos resultados permiten afirmar, en forma preliminar, que la sustitución del hidroxilo en C-3 por un flúor disminuye, pero no elimina, la bioactividad, contrariamente a lo observado por Back⁹ para el caso de la sustitución en C-25.

3.2.2. ENSAYO DE ELONGACIÓN DEL EPICOTILO DE SOJA.

Ninguno de los compuestos fluorados sintetizados resultó tener actividad en este bioensayo, en un rango de concentraciones de 10^{-10} M hasta 10^{-6} M. Debe recordarse (sección 2.2.2 del capítulo anterior) que tanto HTE como HTY eran levemente activos solamente a la mayor concentración evaluada.

3.2.3. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*:

En la Figura 3.31 se muestran las longitudes promedio de hipocotilos de plántulas de *Arabidopsis* cv. Columbia (Col) que crecieron en fotoperíodo (durante 11 días), o en oscuridad (durante 8 días), en presencia de los distintos BRs a una concentración 10^{-6} M. ..

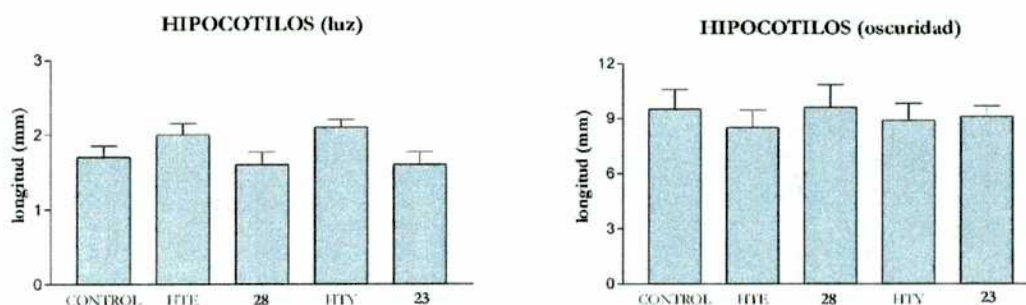


Figura 3.31. Efecto de los compuestos sintetizados sobre plántulas de *A. thaliana*.

Se comprueba que los BRs naturales HTE y HTY no inducen una respuesta significativa (ya demostrado en el capítulo anterior), y que los análogos fluorados sintetizados tampoco presentan actividad.

3.2.4. EFECTO SOBRE MUTANTES BIOSINTÉTICAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*: Pese a los resultados que muestran que los análogos sintetizados no promueven el crecimiento de *Arabidopsis*, se decidió repetir la experiencia utilizando la mutante *det2*, en la cual los niveles endógenos de BRs son muy bajos. La Figura 3.32 resume los resultados obtenidos al aplicar los compuestos **23** y **28** en una concentración 10^{-6} M.

Para permitir la comparación, se incluyeron, en cada caso, los datos correspondientes a plántulas

normales (ecotipo Columbia).

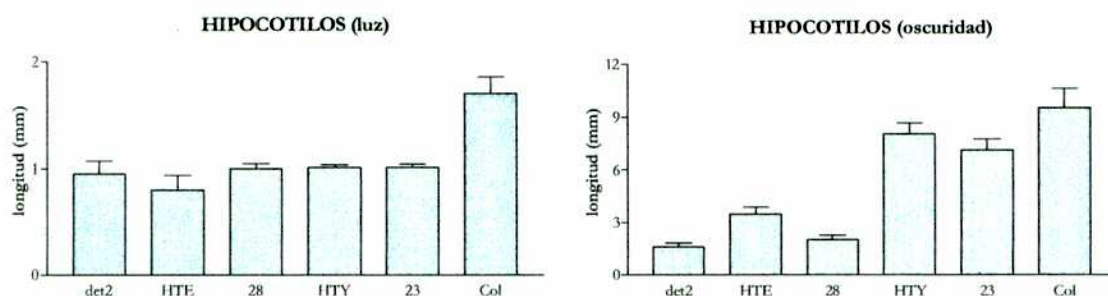


Figura 3.32. Efecto de los compuestos sintetizados sobre mutantes biosintéticos de *A. thaliana*.

Los resultados obtenidos indican que:

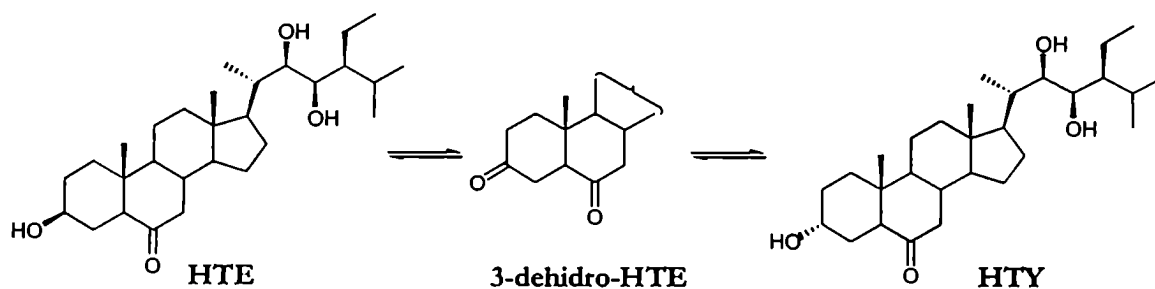
- Como se comprobó en el capítulo anterior, las plántulas mutantes presentan enanismo, lo que se refleja en la menor longitud de los hipocotilos. Esta característica es más notable en las plántulas etioladas (comparar *det2* vs. Columbia en ambas condiciones de iluminación).
- Un análisis estadístico muestra que, en condiciones de iluminación, los compuestos aplicados no revierten el fenotipo de la mutante *det2*.
- Las plántulas *det2* etioladas responden levemente al tratamiento con HTE, pero no lo hacen con el análogo fluorado **28**; sin embargo, tanto HTY como el análogo fluorado **23** son capaces de promover la elongación y revertir, en parte, el fenotipo.

Como resumen general se observa que, si las plántulas crecen en fotoperíodo, los compuestos aplicados no modifican sustancialmente el crecimiento de la variedad salvaje ni el de la mutante biosintética. Las plántulas normales etioladas no son sensibles a los compuestos aplicados, en cambio, la variedad mutante sí parece responder.

3.3. CONCLUSIONES

En el Capítulo 2 se hallaron evidencias preliminares de que la biosíntesis de los 28-homobrassinosteroides parece implicar los mismos pasos que los establecidos para la ruta de oxidación

temprana del C-6 de los brassinosteroides de C_{28} . Si esto es así, una 3β -deshidrogenasa⁴⁵ sería la enzima encargada de epimerizar el C-3 de la 28-homoteasterona para dar 28-homotifasterol, vía un 3-ceto esteroide como intermediario.



En este Capítulo se describió la síntesis de los análogos **23** y **28**, en los que el hidroxilo de C-3 de HTY y HTE se reemplazó por un átomo de flúor. Debido a la semejanza estereoelectrónica entre el flúor y el hidroxilo, es de esperar que estos compuestos puedan ser sustrato de las enzimas encargadas de la biosíntesis. Sin embargo, la estabilidad de la unión C-F debería impedir la acción de la deshidrogenasa, y por lo tanto, la epimerización enzimática del compuesto **28**. Como consecuencia, debería esperarse que el análogo **28** resultara inactivo.

Dado que ninguno de los compuestos estudiados fue capaz de promover el crecimiento de los hypocotilos de soja o *Arabidopsis*, no pudieron extraerse conclusiones a partir de estos ensayos. Es posible que en estos sistemas los niveles endógenos de BRs generen una respuesta máxima que no se modifica por el agregado de precursores biosintéticos. Las mutantes biosintéticas, defectuosas en un paso temprano de la biosíntesis, con niveles endógenos bajos de BRs, podrían responder a estos compuestos.

Se verificó que las mutantes *det2* etioladas revierten parcialmente su fenotipo si se tratan con HTE y HTY. Esta acción de HTE y HTY se justifica usualmente suponiendo que los compuestos aplicados se transforman *in vivo* en los compuestos finales de la biosíntesis, más activos. El reemplazo del hidroxilo en C-3 de HTE por un flúor debería generar un análogo que, al no poder continuar la ruta biosintética normal, debería ser inactivo. Esto es precisamente lo observado para el análogo **28**.

Por otro lado, el compuesto **23** presenta una actividad importante, posiblemente debido a que sí puede participar de esa ruta.

Como conclusiones generales puede adelantarse que:

- El flúor en C-3 con configuración α es capaz de mimetizar la presencia de un hidroxilo, puesto que en todos los ensayos donde el HTY es activo, el correspondiente análogo fluorado

23 también lo es.

- b) El flúor en C-3 con configuración β disminuye, o anula, la actividad. Esto puede reflejar que el análogo fluorado **28** es incapaz de participar de la biosíntesis. Sin embargo, en el ensayo de inclinación de la lámina de arroz presenta, a la mayor concentración evaluada, una actividad significativa; si el estudio con la mutante *det2* implica que no se generan productos de biosíntesis activos, esto sólo puede explicarse admitiendo que el compuesto **28** posee una actividad *per se*. Si esta hipótesis es correcta, el mismo razonamiento puede aplicarse a otros brassinosteroides, y, por lo tanto, la bioactividad medida podría ser una combinación de efectos derivados tanto de la acción propia del compuesto aplicado como de sus posibles metabolitos.

3.4.REFERENCIAS

- 1 Liebman J., Greenberg A., Dolbier W. Jr. Editores. Fluorine containing molecules: structure, reactivity, synthesis and applications. VCH Publishers, New York (1988).
- 2 Welch J.T. Advances in the preparation of biologically active organofluorine compounds. *Tetrahedron* 43, 3123 (1987).
- 3 Fried J., Sabo E. F. 9 α -fluoro derivatives of cortisone and hydrocortisone. *J. Am Chem. Soc.* 76, 1455 (1954).
- 4 Kobayashi Y., Taguchi T. Biomedical aspects of fluorine chemistry. Kodensha Ltd. Tokio (1982).
- 5 O'Hagan D., Rzepa H. Some influences of fluorine in bioorganic chemistry. *Chem Commun.* 645 (1997).
- 6 Brosa C., Zamora I., Terricabras E., Kohout L. The effect of electrostatic properties and ability to form hydrogen-bond on the activity of brassinosteroids side-chain analogs. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 1635 (1998).
- 7 Jin F., Xu Y., Huang W. 2,2-Difluoro enol silyl ethers: convenient preparation and application to the synthesis of a novel fluorinated brassinosteroid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 795 (1993).
- 8 Jiang B., Liu Y., Zhou W. Stereocontrolled synthesis of the 22E,24 β -(S)-trifluoromethyl steroidal side chain and its applications to the synthesis of fluorinated analogues of naturally occurring sterols. *J. Org. Chem.* 65, 6231 (2000).

- 9 Back T., Janzen L., Nakajima S., Pharis R. Synthesis and biological activity of 25-methoxy-, 25-fluoro-, and 25-azabassinolide and 25-fluorocastasterone: surprising effects of heteroatom substituents at C-25. *J. Org. Chem.* 64, 5494 (1999).
- 10 Voigt B., Porzel A., Golsch D., Adam W., Adam G. Regioselective oxyfunctionalization of brassinosteroids by methyl(trifluoromethyl)dioxirane: synthesis of 25-hydroxybrassinolide and 25-hydroxy-24-epibrassinolide by direct C-H insertion. *Tetrahedron* 52, 10635 (1996).
- 11 Seto H., Fujioka S., Koshino H., Yoshida S. Synthesis and biological evaluation of extra-hydroxylated brassinolide analogs. *Tetrahedron* 55, 8341 (1999).
- 12 Henbest H., Jackson W. The use of aprotic solvents for nucleophilic substitution reactions at C(3) and C(17) in steroids. *J. Chem. Soc.* 954 (1962).
- 13 Liotta C., Harris H. The chemistry of "naked" anions I. Reactions of the 18-crown-6 complex of potassium fluoride with organic substrates in aprotic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 2250 (1974).
- 14 Birdsall N. J. A simple synthesis of monofluorostearic acids. *Tetrahedron Lett.* 28, 2675 (1971).
- 15 Clark J., Miller J. Hydrogen bonding in organic synthesis. Part 7. Intermolecular self-condensation of some enolisable ketones in the presence of fluoride. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 2063 (1977).
- 16 Fitjer L. 1,1-Bifunctional cyclopropanes: convenient synthesis of 1-Bromo, 1-Chloro and 1-Fluoro cyclopropyl methyl ketones. *Synthesis* 189 (1977).
- 17 Williams J., Sarkisian G. Selective thioacetal formation of steroid ketones. *Synthesis* 32 (1974).
- 18 Fetizon M., Jurion M. Aldehydes and ketones from thioacetals. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 382 (1972).
- 19 Middleton W. New fluorinating reagents. Dialkylaminosulfur fluorides. *J. Org. Chem.* 40, 574 (1975).
- 20 Thomas M., Suckling C., Pitt A., Suckling K. The synthesis of A- and B-ring fluorinated analogues of cholesterol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 3191 (1999).
- 21 Rozen S., Faust Y., Ben-Yakov H. A new method for fluorination of sterols. *Tetrahedron Lett.* 20, 1823 (1979).

- 22 Shellhamer D., Briggs A., Miller B., Prince J., Scott D., Heasley V. Reaction of aminosulfur trifluorides with alcohols: inversion vs. retention. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 5, 973 (1996).
- 23 Markovskij L., Pashinnik V., Kirsanov V. Application of dialkylaminosulfur trifluorides in the synthesis of fluoroorganic compounds. *Synthesis* 787 (1973).
- 24 Porzel A., Marquandt V., Adam G. ^1H and ^{13}C analysis of brassinosteroids. *Magn. Res. Chem.* 30, 651 (1992).
- 25 Stoldt M., Porzel A., Adam G., Brandt W. Side chain conformation of the growth-promoting phytohormones brassinolide and 24-epibrassinolide. *Magn. Res. Chem.* 35, 629 (1997).
- 26 Williamson K., Yuang-Fang L., Hall F., Swager S., Coulter M. Dihedral angle and bond dependence of vicinal proton-fluorine spin-spin coupling. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6717 (1968).
- 27 Schneider H., Gschwendtner W., Heiske D., Hoppen V., Thomas F. ^{13}C - ^{19}F couplings and ^{19}F NMR shifts of cycloalkyl, bicycloalkyl and steroid monofluoro compounds. *Tetrahedron* 33, 1769 (1977).
- 28 Dewar M., Zoebisch E., Healy E., Stewart J. AM1: A new general purpose quantum mechanical model. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902 (1985).
- 29 Klamt A., Schüümann G. COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 799 (1993).
- 30 Takatsuto S., Kobayashi K., Watanabe T., Kutiyama H., Furuse T. (22E,2S)-5 α -stigmasta-3,22-dien-6-one: an intermediate of the isomerization of (22E,24S)-3 α ,5-cyclo-5 α -stigmast-22-en-6-one into (22E,24S)-5 α -stigmasta-2,22-dien-6-one. *Agric. Biol. Chem.* 52 (12), 3217 (1988).
- 31 Shoppee C., Summers G. Steroids, Part XIV. Some 3 β -fluoro-steroids. *J. Chem. Soc.* 4813 (1957).
- 32 Olah G., Welch J., Vankar Y., Noyima M., Kerekes I., Olah J. Synthetic methods and reactions 63. Pyridinium poly(hydrogen fluoride) (30% Pyridine – 70% Hydrogen fluoride). A convenient reagent for organic fluorination reactions. *J. Org. Chem.* 44, 3872 (1979).
- 33 Teme Centurión O. Tesis de Doctorado: Síntesis de análogos de castasterona y ensayos de su actividad biológica. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. (1997).

- 34 Ramírez J., Teme Centurión O., Galagovsky L., Gros E. Synthesis of bioactive brassinosteroid analogs. *Steroids*. 65/6, 329 (2000).
- 35 Syamala A., das J., Baskaran S., Chandrasekaran S. A novel and highly β -selective epoxidation of Δ^5 -unsaturated steroids with permanganate ion. *J. Org. Chem.* 57, 1928 (1992).
- 36 Hanson J., Nagaratnam S., Stevens J. The epoxidation of steroidal alkenes with potassium permanganate-metal sulfates. *J. Chem. Research (S)*. 102 (1996).
- 37 Parish E., Li S. The study of epoxidation of steroidal alkenes with potassium permanganate-inorganic salts. *J. Chem. Research (S)*. 288 (1996).
- 38 Carruthers W. Some modern methods in Organic Synthesis, pg 381. 3rd Ed. Cambridge University Press. (1986).
- 39 Sankawa U., Sato T., The stereochemical course of the reaction of optically active styrene oxide with aluminium hydride and dichloroaluminium hydride. *Tetrahedron Lett.* 11, 981 (1978).
- 40 Rerick M., Eliel E. Reaction paths in the reduction of epoxides with lithium aluminium hydride and aluminium chloride. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 2356, 1962.
- 41 Hutchins R., Taffer I., Burgoyne W. Regio and stereoselective cleavage of epoxides with cyanoborohydride and boron trifluoride etherate. *J. Org. Chem.* 46, 5214 (1981).
- 42 Bowers A., Cuellar Ibáñez L., Ringold H. Synthesis of halogenated steroid hormones. *Tetrahedron* 7, 138 (1959).
- 43 Gakh Y., Gakh A., Gronenborm A. Fluorine as an NMR probe for structural studies of chemical and biological systems. *Magn. Res. Chem.* 38, 551 (2000).
- 44 Sokal R., Rohlf F. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd Edition. W.H. Freeman and Co. New York. (1981).
- 45 Stündl U., Schneider B. 3β -Brassinosteroid dehydrogenase activity in Arabidopsis and tomato. *Phytochemistry* 58, 989 (2001).

CAPÍTULO 4

ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-6

Luego de una década de estudios, se logró dilucidar la biosíntesis del brassinólido, al menos en sus aspectos principales. Los dos caminos propuestos, activos en *Arabidopsis* y otras especies, se mostraron en la Figura 1.6 del Capítulo 1.

En el Capítulo 2 presentamos evidencias que sugieren que la biosíntesis del 28-homobrassinólido sigue, al menos en las últimas etapas, un camino similar a la ruta de *oxidación temprana del C-6* del brassinólido. Se indagará ahora sobre la posibilidad de que el HBL también pueda formarse a través de una ruta de *oxidación tardía del C-6*, similar a la hallada para los BRs de C₂₈, y que se muestra en la Figura 4.1.

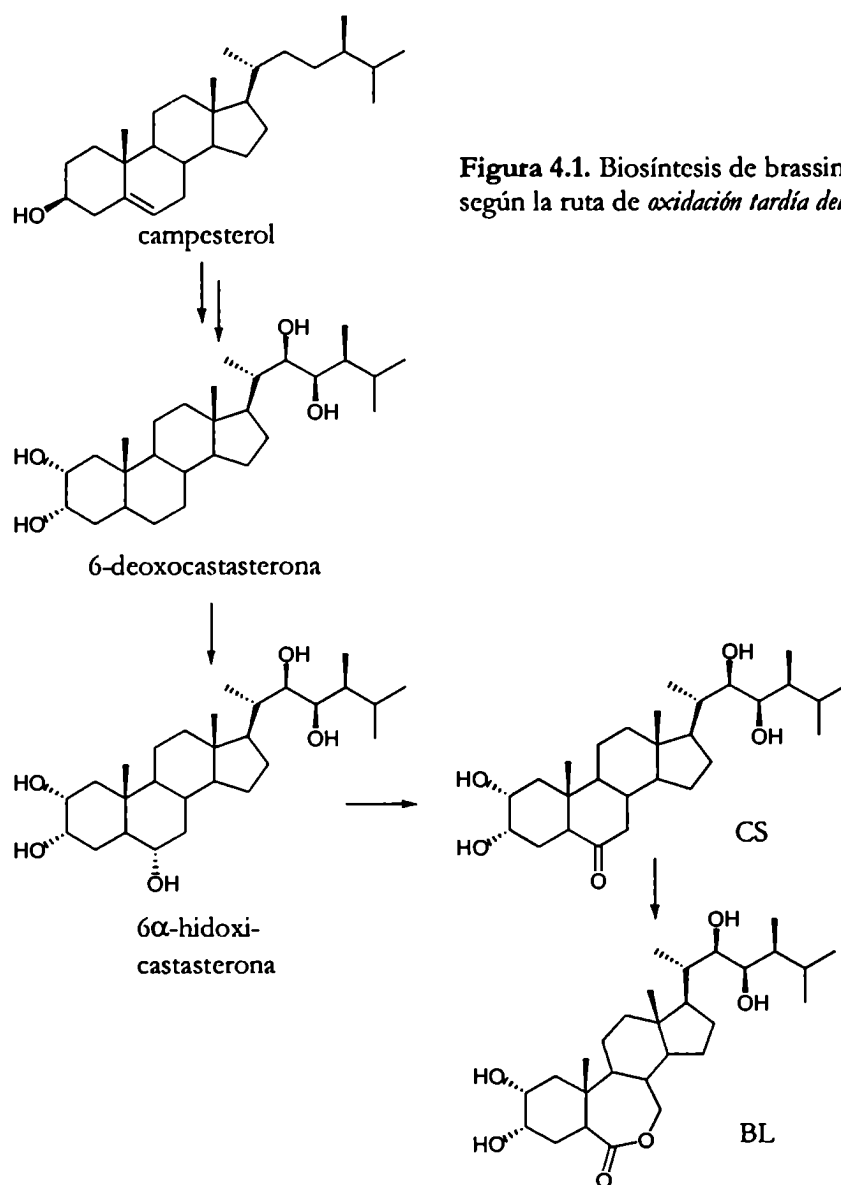


Figura 4.1. Biosíntesis de brassinólido según la ruta de *oxidación tardía del C-6*.

Hasta el momento, no se han hallado en fuentes naturales los precursores hipotéticos de C_{29} involucrados en esta ruta: en este Capítulo se describirá la síntesis de los compuestos **36** y **37**, homólogos de 6-deoxocastasterona y 6α -hidroxicastasterona, respectivamente.

Además, se presentará la síntesis de los compuestos **38** y **39**, otros análogos modificados en C-6, junto con la evaluación de sus bioactividades.

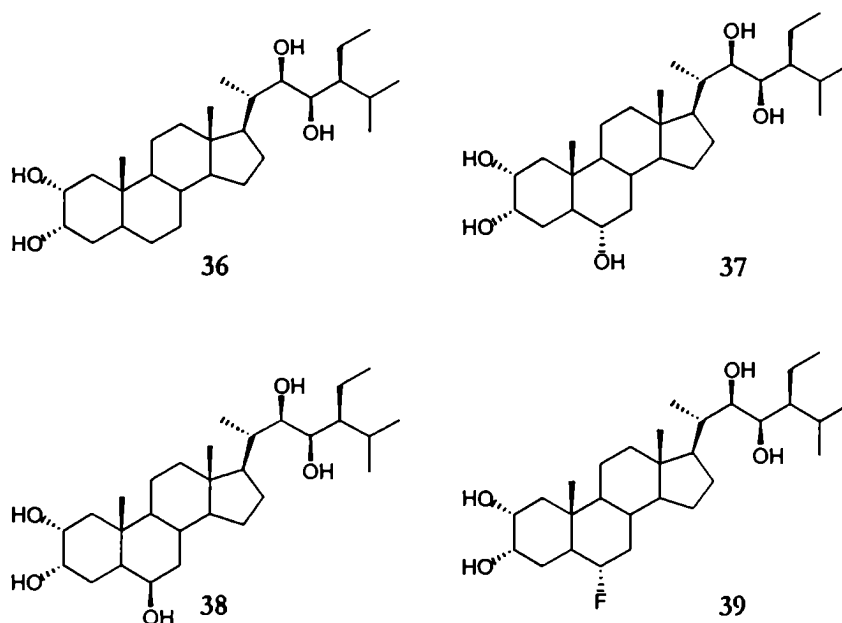
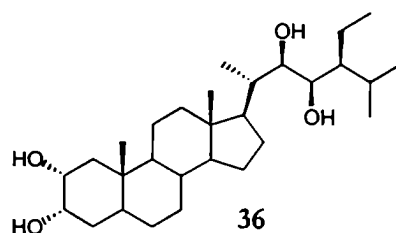


Figura 4.2. Estructuras de los análogos modificados en C-6.

4.1. SÍNTESIS DE POSIBLES PRECURSORES BIOSINTÉTICOS DE 28-HOMOBRASSINÓLIDO.

4.1.1. SÍNTESIS DE (22R,23R)-5 α -ESTIGMASTA-2 α ,3 α ,22,23-TETRAOL (**36**).



(22R,23R)-5 α -estigmasta-2 α ,3 α ,22,23-tetraol

Se buscaron en la literatura antecedentes sobre la síntesis de 6-deoxobrassinosteroides, y se encontró que, para su obtención, se habían utilizados dos estrategias:

- i) Reducción de un esteroide α,β insaturado, del tipo 3-ceto- Δ^4 , y posterior construcción del anillo A.
- ii) Reducción del carbonilo en C-6 del correspondiente 6-oxo brassinosteroide, preparado según los métodos ya descritos.²

En este punto se decidió que la mejor alternativa era ésta última, utilizando 28-homocasterona como producto de partida, dado que se trataba de una ruta más directa.

En la síntesis original de 6-deoxocasterona², la reducción del carbonilo de la castasterona se efectuó mediante una reacción de Wolf-Khishner (Figura 4.3), que, como se sabe, implica condiciones enérgicas. Los autores reportaron un bajo rendimiento para esta transformación.

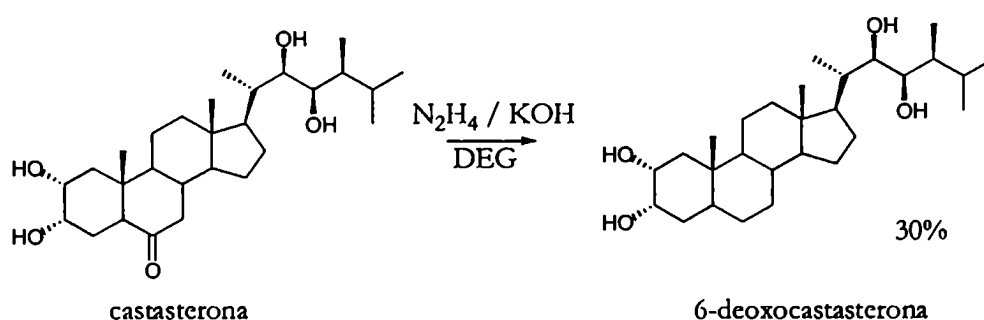


Figura 4.3. Obtención de 6-deoxocasterona (Referencia 2)

Por este motivo, se buscó otro método, que requiriera condiciones más suave. Se decidió intentar la desulfuración de un tioacetal obtenido a partir de la HCS (Figura 4.4).

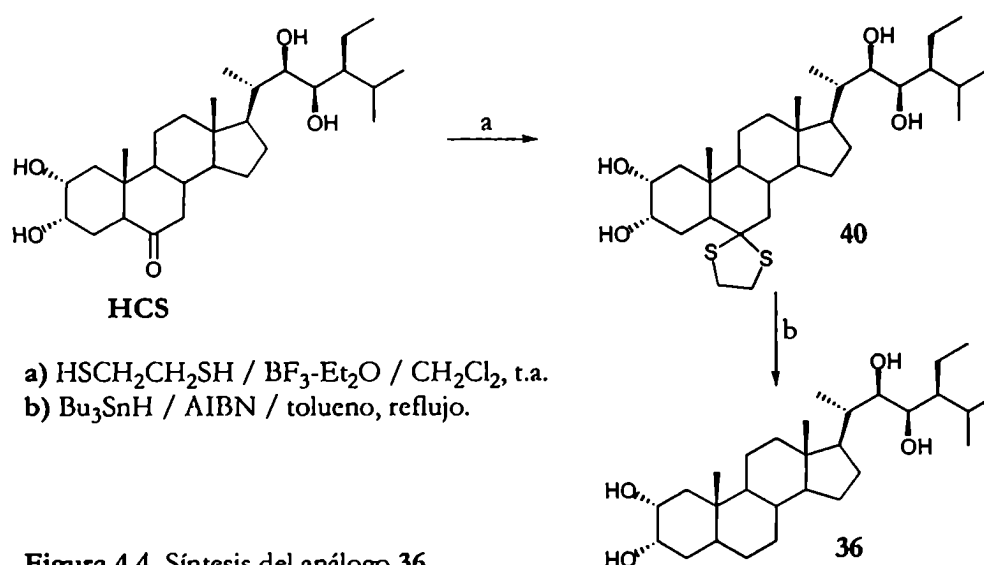
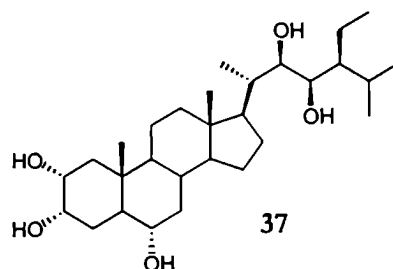


Figura 4.4. Síntesis del análogo 36.

De esta manera, el tratamiento de HCS con 1,3-etanoditiol, con catálisis ácida ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), produjo el tioacetal intermediario **40** con alto rendimiento. Este compuesto se trató con hidruro de tributilestano, en benceno, lo que provocó la reducción del 1,3-ditiano', para dar el análogo requerido **36** con un rendimiento de 70 % (desde HCS).

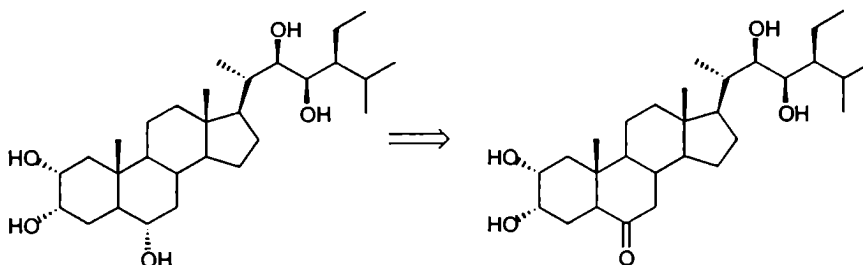
Nuevamente, la estructura del análogo obtenido se confirmó por medio de espectrometría de masas de alta resolución (FAB), y espectroscopía de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY-45 y HETCOR).

4.1.2. SÍNTESIS DE (22R,23R)-5 α -ESTIGMASTA-2 α ,3 α ,6 α ,22,23-PENTAOL (**37**) Y DE (22R,23R)-5 α -ESTIGMASTA-2 α ,3 α ,6 β ,22,23-PENTAOL (**38**).



(22R,23R)-5 α -estigmasta-2 α ,3 α ,6 α ,22,23-pentaol

La alternativa más directa para su obtención implica la reducción del carbonilo de la HCS.



Es necesario, en primer lugar, analizar la estereoselectividad de la transformación requerida. Se sabe que las reducciones de cetonas cíclicas que presentan restricciones conformacionales, generan una mezcla de los alcoholes con el hidroxilo en posiciones ecuatorial o axial, y que la proporción entre ellos depende, fundamentalmente, del reactivo utilizado, y de la estructura del sustrato. En el caso de los reductores que actúan transfiriendo un hidruro, y si las dos caras del carbonilo son igualmente accesibles, suele formarse una mayor cantidad del alcohol termodinámicamente más estable (hidroxilo ecuatorial)⁴. Sin embargo, en este caso, la presencia del metilo de C-19 bloquea la cara β del esteroide, favoreciendo la entrada del hidruro por la cara α y la consecuente formación del alcohol axial. La reducción del carbonilo en C-6 utilizando un hidruro metálico (LiAlH_4 o NaBH_4), genera en mayor

proporción el alcohol con configuración 6β , no deseado. (Figura 4.5).

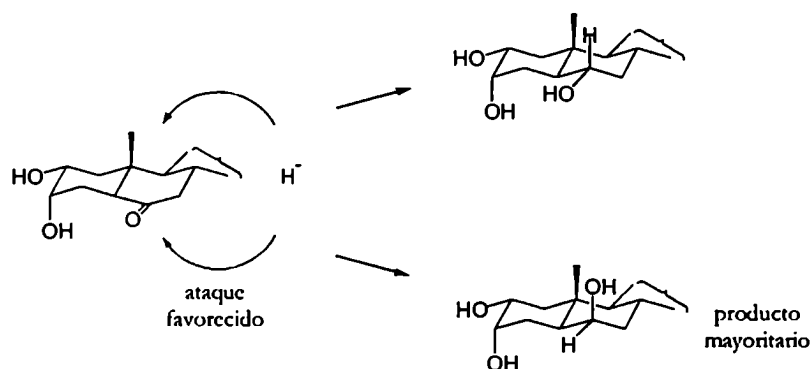


Figura 4.5. Reducción con hidruros metálicos del carbonilo en C-6.

Una alternativa sencilla para efectuar la reducción requerida, es la que utiliza metales alcalinos en solventes próticos, que implica un intermediario radical aniónico, formado a expensas de los electrones cedidos por el metal, y que suele generar como producto el alcohol ecuatorial, más estable. Sin embargo, la estereoquímica de este tipo de reacciones se ve menos afectada por el entorno del carbonilo, y suele usarse en la síntesis de esteroides como método complementario a la reducción con hidruros.⁵

La reducción se efectúa habitualmente con litio en amoníaco líquido, pero se prefirió intentar primero con sodio en etanol, por ser las condiciones experimentalmente más sencillas.

Es así que se disolvió 28-homocastasterona (HCS) en etanol a reflujo, y se agregó sodio metálico hasta que la conversión fue completa, se obtuvieron así sólo dos productos (Figura 4.6).

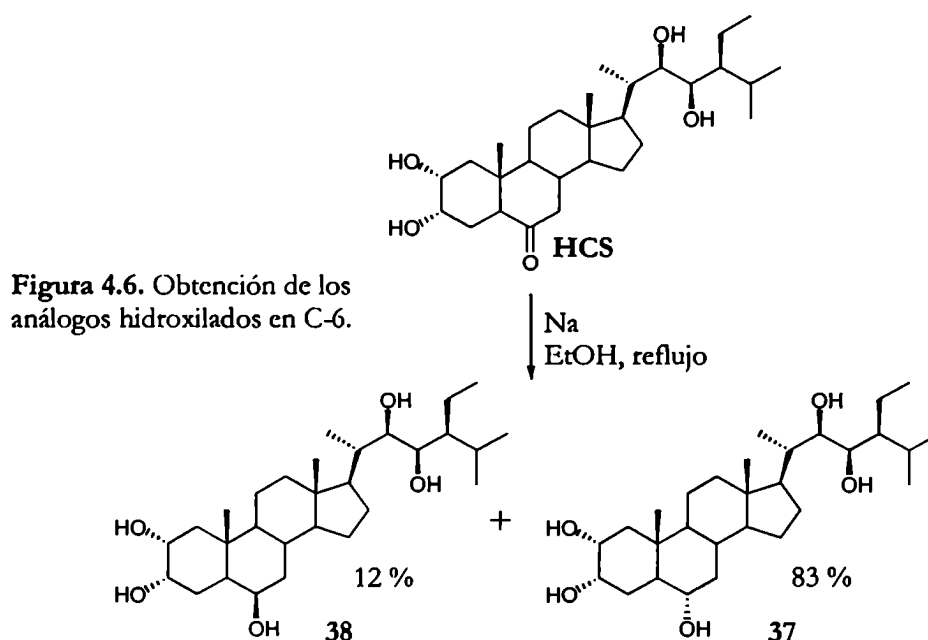
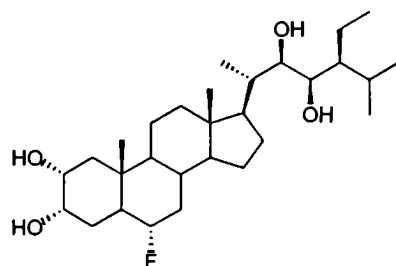


Figura 4.6. Obtención de los análogos hidroxilados en C-6.

El más polar de los compuestos, minoritario, aislado con un rendimiento del 12 %, resultó ser (22R,23R)-5 α -estigmaster-2 α ,3 α ,6 β ,22,23-pentaol (**38**). El análisis espectroscópico del producto mayoritario (obtenido con un rendimiento del 83 %) reveló que se trataba del compuesto requerido, (22R,23R)-5 α -estigmaster-2 α ,3 α ,6 α ,22,23-pentaol (**37**).

La configuración del hidroxilo en C-6 se asignó a partir del patrón de acoplamiento (en el espectro de RMN de ^1H) del H-6, geminal al mismo. La identidad de los análogos **37** y **38** se confirmó mediante las técnicas espectroscópicas habituales.

4.2. SÍNTESIS DE (22R,23R)- 6 α -FLUORO-5 α -ESTIGMASTER-2 α ,3 α ,22,23-TETRAOL (**39**).



(22R,23R)-6 α -fluoro-5 α -estigmaster-2 α ,3 α ,22,23-tetraol

Este compuesto es el análogo fluorado del compuesto **37**.

La estrategia más inmediata para su obtención sería la sustitución de un hidroxilo 6 β , según se muestra en la Figura.4.6.

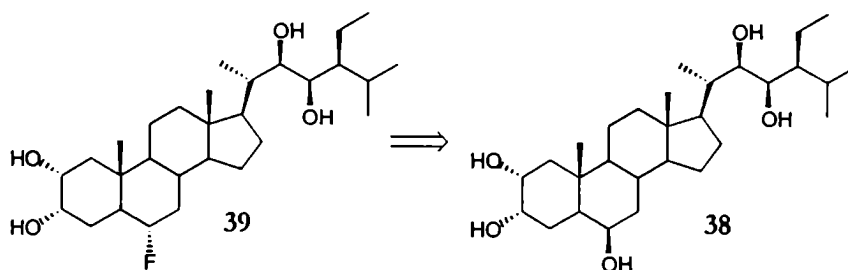


Figura 4.6. Retrosíntesis para la obtención del análogo fluorado **39**.

Como la sustitución no es regioselectiva, pueden plantearse dos alternativas:

- Protección, previa a la sustitución, de los 1,2-dioles del compuesto **38**, y posterior desprotección.
- Sustitución sobre un precursor adecuado, y posterior introducción de los dioles 2,3 y 22,23.

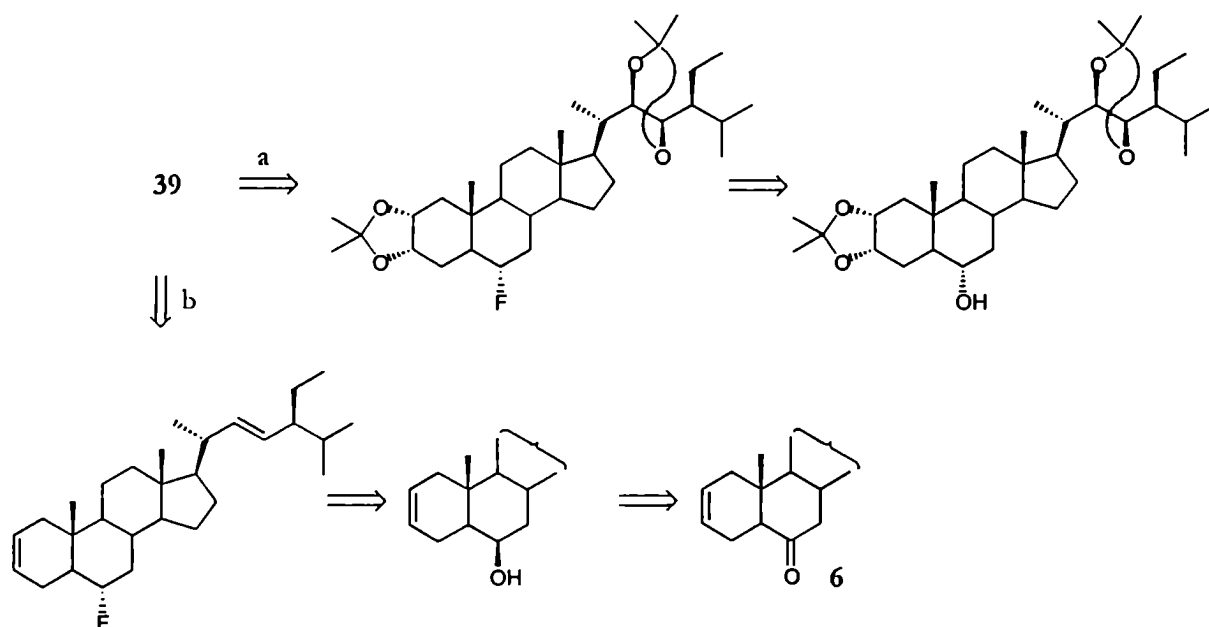


Figura 4.7. Rutas alternativas para la síntesis del análogo 39

Decidimos explorar primero la alternativa b), para lo cual debe prepararse el precursor 41. Como se discutió anteriormente, la reducción de un 6-ceto esteroide con un hidruro metálico genera mayoritariamente un alcohol con configuración 6β (axial), tal como se requiere en esta secuencia. Este resultado se debe, fundamentalmente, al bloqueo que el metilo 19 ejerce sobre la cara β del plano del esteroide, y es de esperar que el uso de un reductor más voluminoso redunde en una estereoselectividad aún mayor para la obtención del alcohol deseado. Es por eso que la cetona 6 se trató con hidruro de tri-*t*-butoxialuminio y litio, obteniéndose en forma casi exclusiva el alcohol 41.

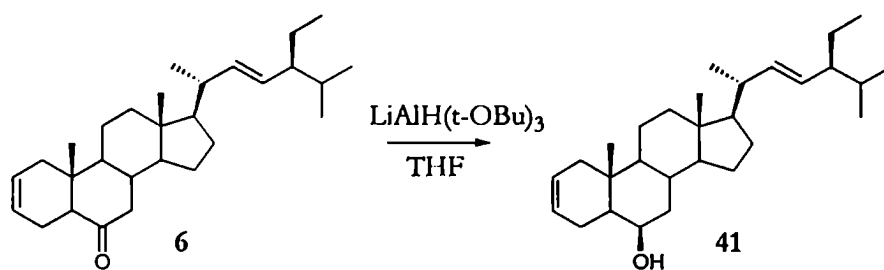


Figura 4.8. Reducción estereoselectiva de la cetona 6.

Dados los resultados presentados en el capítulo anterior, se optó por tratar el alcohol 41 con DAST, a fin de obtener el fluoroesteroide correspondiente. Sin embargo, esta vez no se observó reacción, incluso luego de largos tiempos, o trabajando a mayores temperaturas que la habitual (la ambiente,

en lugar de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dado que este reactivo es térmicamente inestable⁶, no fue posible intentar la reacción a mayores temperaturas.

Encontramos en la literatura una situación similar: en un trabajo publicado por Kumar en 1995, se describió la imposibilidad de efectuar la fluoración con DAST sobre hidroxilos esteroidales, con configuración axial 17β , impedidos estéricamente⁷. Según los autores, la presencia del metilo de C-18 vecino, también de configuración axial, impediría la formación del intermediario implicado en la fluoración. Mas aún, la fluoración de un alcohol 17α genera como producto mayoritario un 17α -fluoro esteroide, con retención de la configuración.

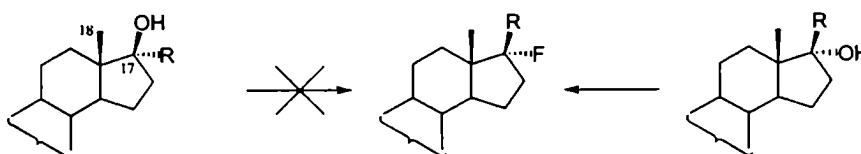


Figura 4.9. Fluoración con DAST, con retención de la configuración (referencia 7)

Este resultado mostraría que estaría operando un mecanismo de tipo $\text{S}_{\text{N}}1$, posibilidad que fue confirmada posteriormente mediante otros estudios.⁸

En nuestro caso, el alcohol 6β estaría inhibido para reaccionar, debido a las interacciones 1,3-diaxiales con el metilo de C-19. La analogía con el caso presentado anteriormente nos llevó a evaluar la posibilidad de lograr la fluoración con retención de la configuración en el C-6. Para eso, se preparó el alcohol **42** por reducción de la cetona **6** con sodio en etanol, reacción ya empleada en la síntesis del análogo **34** (Figura 4.10).

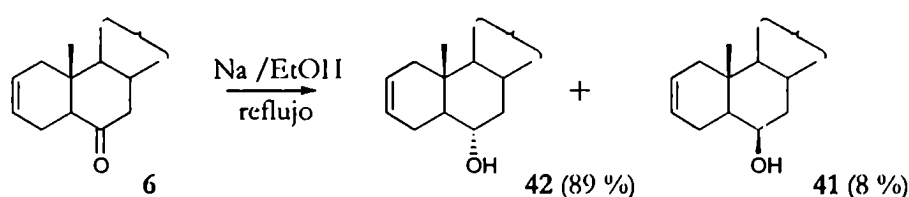


Figura 4.10. Reducción estereoselectiva de la cetona **6**.

Al tratar el alcohol **42** con DAST, en las condiciones habituales, se obtuvo un compuesto mayoritario **43** que, a juzgar por su espectro de RMN de ^{13}C , no poseía funciones oxigenadas pero sí un átomo de flúor (doblete centrado en 94,3 ppm, con un acoplamiento de 169 Hz).

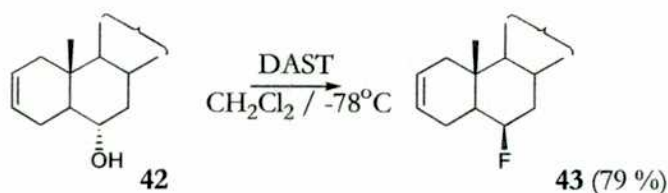


Figura 4.11. Fluoración del intermediario **42** con retención de la configuración.

La configuración del carbono unido al flúor puede determinarse, como es habitual, por el patrón de acoplamiento del hidrógeno geminal en el espectro RMN- ^1H . La Figura 4.12.a muestra la señal

con H-7 β . El doble multiplete observado en el espectro del compuesto **43** (Figura 4.12.b) presenta las mismas constantes de acoplamiento, sugiriendo que la fluoración transcurrió, como esperábamos, con retención de la configuración.

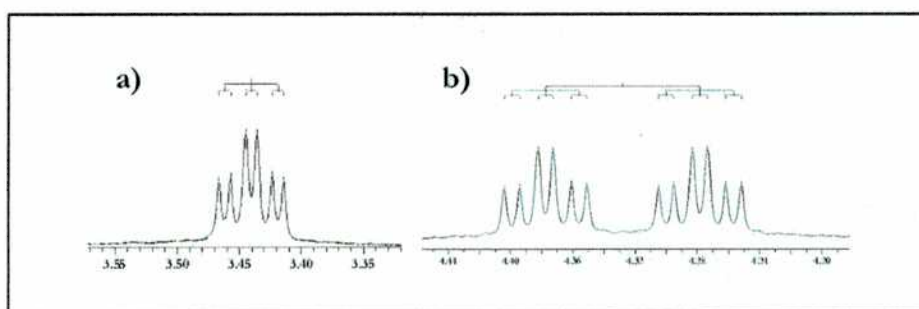


Figura 4.12. Señal del H-6 en los compuestos **42**(a) y **43**(b) (500 MHz, CDCl_3).

La configuración del C-6 también pudo asignarse en base a las constantes de acoplamiento C-F. Para eso, se obtuvo un modelo teórico de la geometría del compuesto **43** y se calcularon las constantes de acoplamiento F-C a tres enlaces, de manera similar a la detallada en la Sección 3.1.2 del Capítulo anterior.

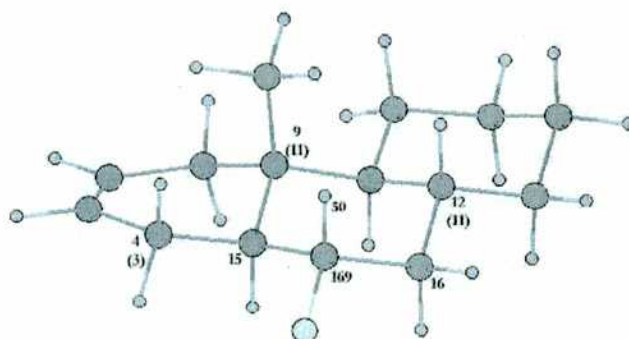


Figura 4.13. Constantes de acoplamiento J_{FH} y J_{FC} para el compuesto **43**.

La Figura 4.13 muestra los valores experimentales de todas las constantes de acoplamiento observadas, donde los números entre paréntesis corresponden a los valores calculados para las $^1J_{\text{FC}}$, que se ajustan razonablemente a los valores medidos, confirmando así la configuración asignada.

Finalmente, la dihidroxilación catalítica asimétrica del intermediario **43** permitió obtener el análogo buscado **39** con un rendimiento de 14 % a partir de estigmasterol. la Figura 4.14 resume la secuencia sintética empleada.

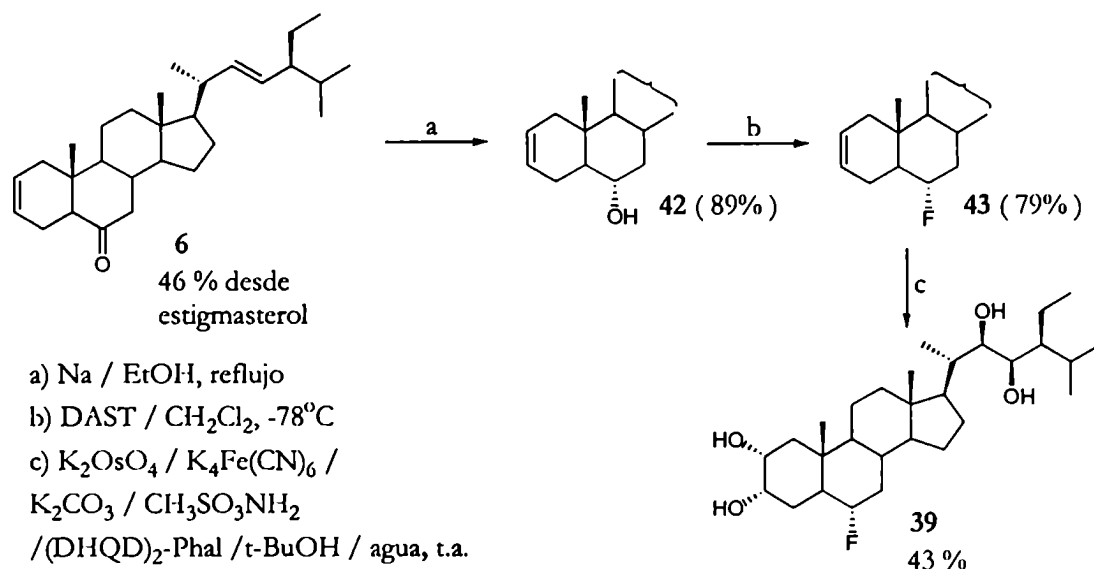


Figura 4.14. Síntesis del análogo fluorado **39**.

4.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica de los compuestos sintetizados, evaluada en el ensayo de inclinación de la lámina de arroz, se muestra en la Tabla 4.1. Se incluyen, a modo de comparación, las actividades de los BRs naturales HCS y HBL. Los valores corresponden al ángulo inducido, en grados, junto con el error estándar (calculado a partir de 20 plántulas tratadas de igual manera).

Dosis (ng / plántula)	Compuesto					
	HBL	HCS	36	37	38	39
1	94 ± 7	45 ± 8	24 ± 3	16 ± 3	19 ± 2	12 ± 1
10	100 ± 7	96 ± 9	21 ± 5	19 ± 4	33 ± 5	13 ± 2
100	97 ± 9	102 ± 7	20 ± 5	54 ± 8	59 ± 9	24 ± 3
500	98 ± 7	91 ± 9	45 ± 5	70 ± 4	90 ± 5	30 ± 3
Control: 11 ± 2						

Tabla 4.1. Ensayo ILA para los compuestos sintetizados

Un análisis detallado de estos resultados surge de las Figuras 4.15 y 4.16.

En la Figura 4.15 se graficaron los valores de bioactividad para el 28-homobrassinólido y sus posibles precursores biosintéticos: **HCS**, **36** y **37**. Puede verse una clara relación dosis-respuesta (excepto para el HBL, que muestra la máxima actividad incluso a una dosis de 1 ng). Si se comparan los valores en todo el rango de concentraciones, la actividad relativa es **HBL** > **HCS** > **37** > **36**, orden que está de acuerdo con el esperado si la ruta biosintética de *oxidación tardía del C-6* operara en los tejidos durante el transcurso del ensayo.

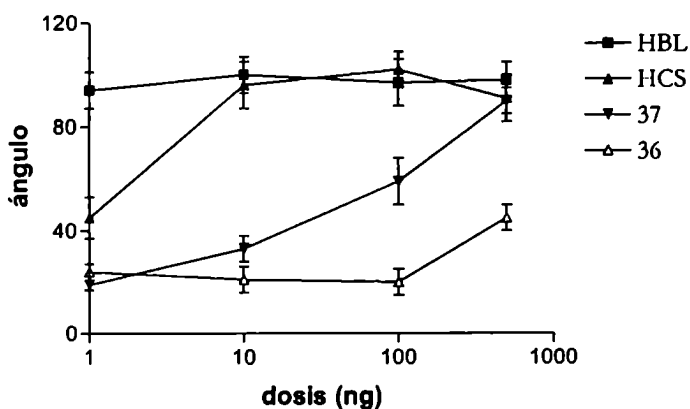


Figura 4.15

Por otro lado, en la Figura 4.16 se graficaron las actividades de los análogos sintetizados, en función de la dosis aplicada.

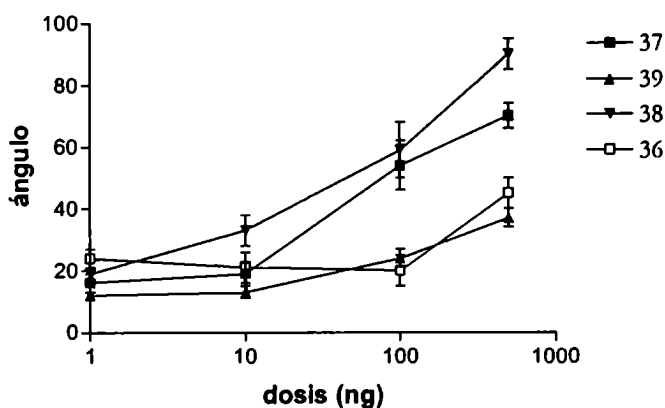


Figura 4.16.

Pueden destacarse dos resultados interesantes:

en primer lugar, el compuesto **38**, con un hidroxilo 6 β , presenta una actividad importante.

Un análisis estadístico demuestra que en todas las dosis aplicadas su actividad es comparable

con la del análogo **37**, supuesto precursor biosintético de HBL.

el compuesto fluorado **39** posee una baja actividad, similar a la del análogo **36**, no funcionalizado en C-6, resultado que sugiere la incapacidad del flúor de imitar la presencia de un hidroxilo en esa posición.

4.4. CONCLUSIONES.

En este capítulo se ha descrito la síntesis de los compuestos **36** y **37**, hipotéticos precursores de 28-homobrassinólido, según la vía de *oxidación tardía del C-6*. Estos compuestos no han sido hallados aún en la naturaleza; es probable que su presencia en los vegetales sea indetectable por los métodos analíticos actuales, dada la baja concentración de los 28-homobrassinosteroides en general.

La bioactividad observada para estos análogos parece sugerir que, en efecto, pueden transformarse en HBL, el producto final de la biosíntesis, ya que el orden relativo de actividades sigue la secuencia esperada.

Si esta interpretación es correcta, los resultados implican que, en el sistema utilizado (arroz), están presentes las enzimas encargadas de efectuar la oxidación del C-6. Se sabe que en *Arabidopsis* y tomate esta enzima es un citocromo⁹ del tipo P450, que introduce primero un hidroxilo con configuración α , que luego es oxidado. Es de esperar que en otras especies vegetales funcionen procesos similares.

En este trabajo encontramos, además, que el análogo **38**, que posee un hidroxilo 6β , también es activo. Esto puede indicar que la oxidasa no tiene una especificidad exclusiva por 6α -hidroxibrassinosteroides.

Por otro lado, el análogo fluorado **39** presenta una baja actividad, incluso menor que la del compuesto **36**, no funcionalizado en C-6. Aparentemente, la presencia del flúor impediría la acción de la oxidasa, bloqueando, para este compuesto, el camino biosintético. Sin embargo, **39** es levemente activo, lo que sugiere que tiene una actividad intrínseca. Este resultado es similar al observado en el capítulo anterior para el compuesto fluorado **28**, e introduce nuevamente la posibilidad de que la respuesta generada por un brassinosteroide sea una combinación de una actividad *per se*, junto con la inducida por los productos de la biosíntesis.

4.5. REFERENCIAS.

- 1 Takatsuto S., Watanabe T., Fujioka S., Sakurai A. Synthesis of new naturally occurring 6-deoxo brassinosteroids *J. Chem. Research (S)* 134 (1997).
- 2 Mori K., Sakakibara M., Okada K. Synthesis of naturally occurring brassinosteroids employing cleavage of 23,24-epoxides as key reactions. Synthesis of brassinolide, castasterone, dolicholide, dolichosterone, homodolicholide, homodolichosterone, 6-deoxocastasterone and 6-deoxodolicosterone. *Tetrahedron* 40, 1767 (1984).
- 3 Gutierrez C., Stringham R., Nitasaka T., Glasscock K. Tri-n-butyltin hydride: A selective reducing agent for 1,3-dithiolanes. *J. Org. Chem.* 45, 3393 (1980).
- 4 House H.O. Modern synthetic reactions. 2nd Edition. W.A. Benjamin Inc. p 60-63. (1972).
- 5 Kirk D., Hartshorn M. Steroid reaction mechanism. Elsevier, Amsterdam, p 131-147 (1968).
- 6 Jolliffe K. *N,N*-diethylaminosulfur trifluoride (DAST, Et₂NSF₂) and related reagents. *Aust. J. Chem.* 54, 75 (2001).
- 7 Kumar V., Rodger C., Bell M. Reaction of steroidal 17-acetylenic alcohols with diethylaminosulfur trifluoride and the structural assignment of 17-fluorosteroids. *J. Org. Chem.* 60, 4591 (1995).
- 8 Shellhamer D., Briggs A., Miller B., Prince J., Scott D., Heasley V. Reaction of aminosulfur trifluorides with alcohols: inversion vs. retention. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 5, 973 (1996).
- 9 Shimada Y., Fujioka S., Miyauchi N., Kushiro M., Takatsuto S., Nomura T., Yokota T., Kamiya Y., Bishop G., Yoshida S. Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.* 126, 770 (2001).

CAPÍTULO 5

ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-5

En los últimos 20 años se han sintetizado una gran variedad de análogos de BRs con múltiples modificaciones, tanto en el fragmento cíclico como en la cadena lateral. Una modificación particularmente interesante, es la introducción de hidroxilos en posiciones no habituales. La síntesis de estos brassinosteroides extrahidroxilados se justifica por dos motivos: por un lado, los BRs naturales son estructuras polihidroxiladas, y se cree que estos grupos funcionales son los que permiten su interacción, mediante enlaces de hidrógeno, con los receptores biológicos¹; por otro lado, los mecanismos de inactivación *in vivo* de BRs implican hidroxilaciones que llevan a su degradación. En la Figura 5.1 se muestran algunos de los BRs extrahidroxilados sintetizados hasta el momento.

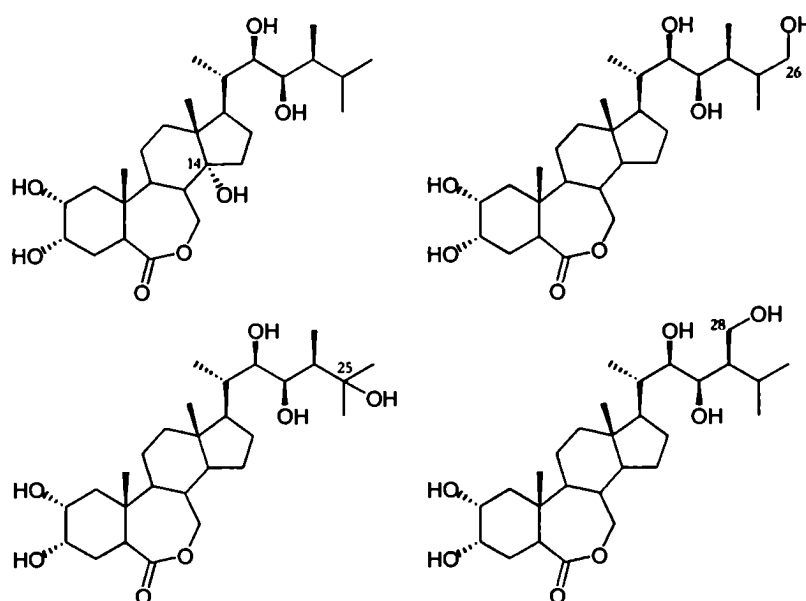
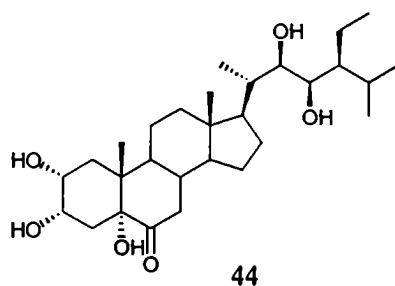


Figura 5.1. Algunos brassinosteroides polihidroxilados

Se encontró que la introducción de un hidroxilo en C-14 o C-26 en la estructura del brassinólido produce compuestos totalmente inactivos², mientras que la hidroxilación en C-25 o C-28 no altera sustancialmente la actividad en el bioensayo de inclinación de la lámina de arroz.³ Las diferencias demuestran el efecto profundo sobre la actividad que produce este tipo de modificación.

El único 28-homobrasinosteroide extrahidroxilado obtenido hasta el momento es el compuesto **44**, análogo hidroxilado en C-5 de la 28-homocastasterona (HCS). Este compuesto fue sintetizado de manera simultánea por el grupo de la Dra. Brosa en Barcelona⁴, y en nuestro laboratorio por el Dr. Teme Centurión.⁵ En ambos casos se observó que la sustitución efectuada reduce la bioactividad con respecto al compuesto natural, al ser evaluados en el bioensayo ILA en variedades distintas.



A partir de un estudio de modelado molecular⁶ se demostró que es posible la formación de un enlace de hidrógeno entre el hidroxilo introducido en C-5 y el de C-3. Esta situación sería la responsable de la disminución de la bioactividad, pues impediría la unión del hidroxilo en C-3 con el receptor de BRs, reduciendo la afinidad, y, así, la bioactividad.

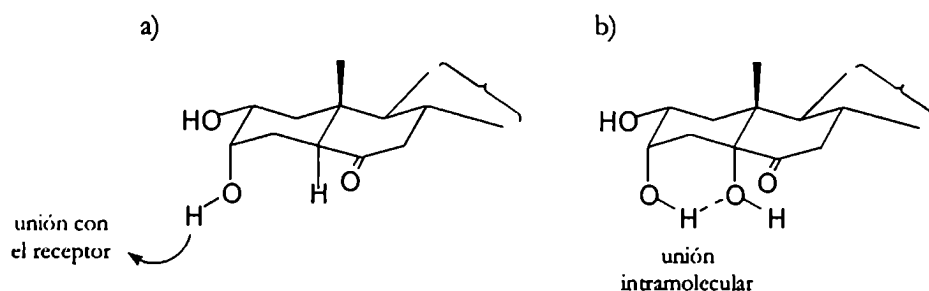
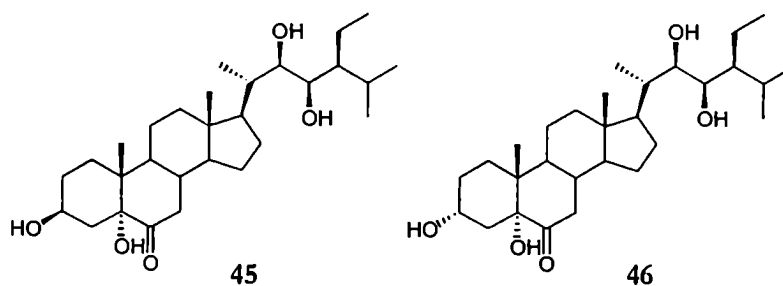
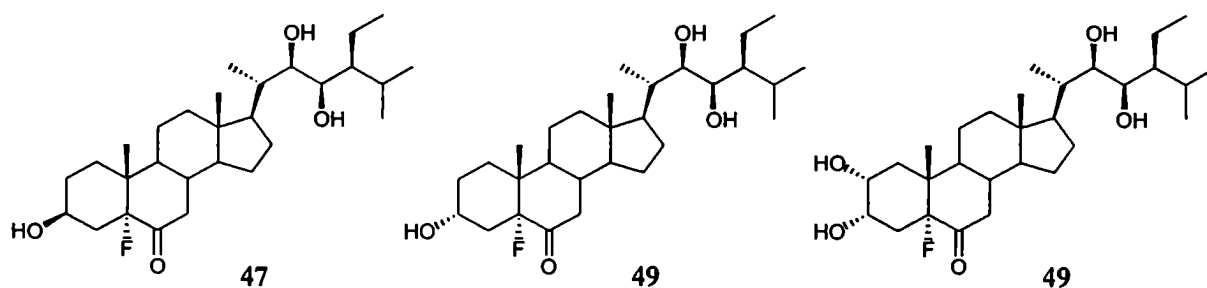


Figura 5.2. (a) En la HCS, el hidroxilo 3 α participa en la unión con el receptor. Esta unión está impedida en el análogo 44, debido al enlace intramolecular con el hidroxilo 5 α (b).

En esta tesis se decidió ampliar el estudio sobre los 28-homobrassinosteroides sustituidos en C-5, para lo cual se sintetizaron, por un lado, los análogos 5 α -hidroxilados de HTE y HTY, compuestos 45 y 46, respectivamente.



Por otro lado, se sintetizaron los análogos 5 α -fluorados 47, 48 y 49.



En este capítulo se describirán sus síntesis y los estudios sobre los efectos biológicos provocados por estos compuestos.

5.1. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS HIDROXILADOS EN C-5.

5.1.1. ANTECEDENTES

La estrategia elegida por Brosa y Teme Centurión para la síntesis de **44** se resume en la Figura 5.3, e implica la epoxidación selectiva del doble enlace Δ^5 del estigmasterol, y la posterior apertura hidrolítica del epóxido resultante en condiciones oxidantes, para generar un 5α -hidroxi-6-oxo esteroide. La eliminación del grupo en C-3, y la posterior dihidroxilación de Sharpless de los dobles enlaces Δ^2 y Δ^{22} , permitió obtener el análogo buscado con un rendimiento global cercano al 10 %.

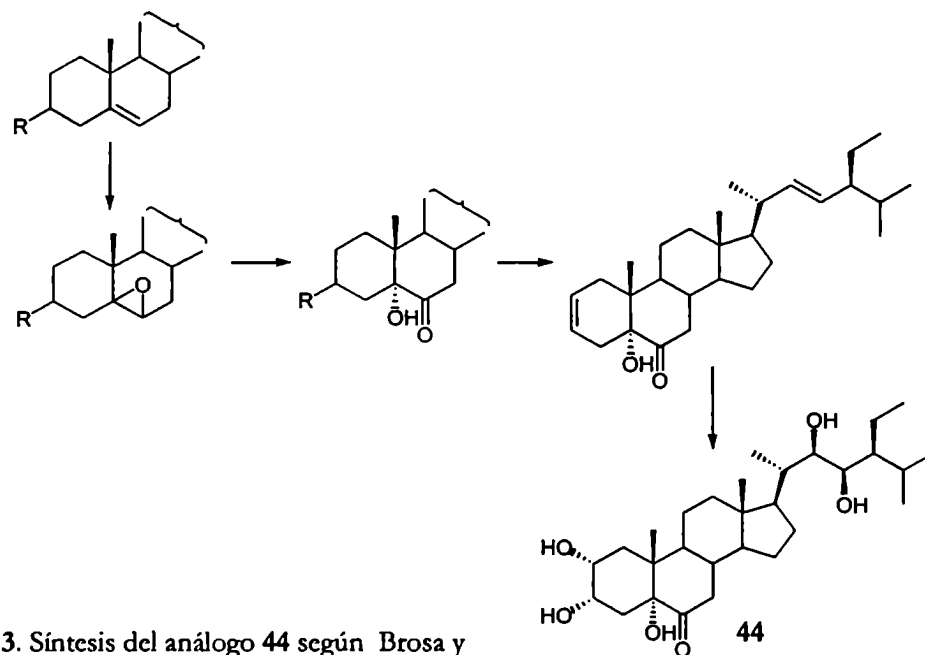
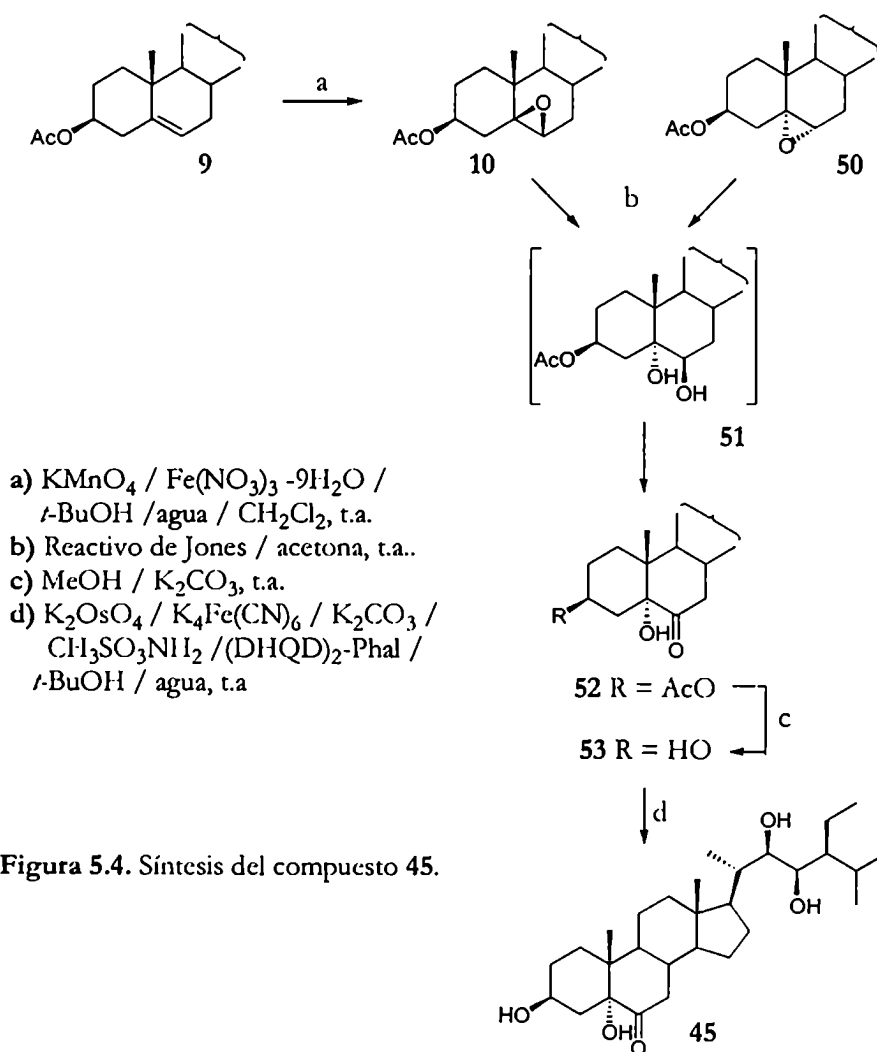


Figura 5.3. Síntesis del análogo **44** según Brosa y Teme Centurión (Referencias 4 y 5)

5.1.2. SÍNTESIS DE (22R,23R)-3 β ,5,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA (45) Y (22R,23R)-3 α ,5,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA (46).

Los nuevos análogos **45** y **46** se obtuvieron adaptando la estrategia descrita anteriormente, donde se incluyeron las modificaciones necesarias para introducir los grupos funcionales requeridos en el anillo A.

La Figura 5.4 muestra la ruta sintética seguida para la obtención del compuesto **45**. Se preparó, a partir de estigmasterol, el acetato **9**, que se epoxidó regioselectivamente, utilizando la técnica descrita en el capítulo 3. Se obtuvo así una mezcla de los 5 β ,6 β y 5 α ,6 α - epóxidos en proporción 7:1 (compuestos **10** y **50** respectivamente).



La apertura *trans*-diaxial de los oxiranos de **10** y **50** en el medio ácido acuoso, dado por el reactivo de Jones, genera el mismo compuesto **51**, que se oxida *in situ*, dando el intermediario **52**. Por este motivo, no es necesaria la separación previa de la mezcla de epóxidos.

La estructura de **52** se confirmó mediante espectroscopia de RMN. El espectro de ^{13}C (Figura 5.5) muestra una señal correspondiente al carbonilo de C-6, en 212,1 ppm, además de una sola señal a 80,3 ppm, lo que confirma la apertura del oxirano. Esa única señal corresponde, según el espectro DEPT-135, a un carbono terciario, que es lo esperado para el C-5.

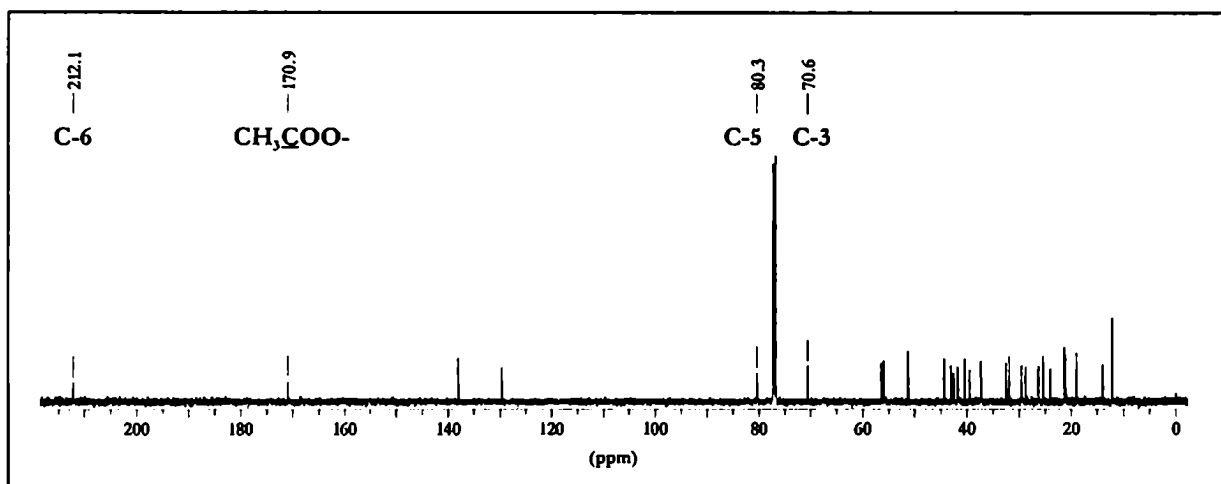


Figura 5.5. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del intermediario **52**.

La stereoquímica de la fusión entre los anillos A y B se determinó a partir del espectro de ^1H . El primer indicio se obtiene del desplazamiento químico del H-3 α , el cual se encuentra a 5,03 ppm. Teniendo en cuenta que en el compuesto 5 α -hidrogenado esta señal se ubica a 4,65 ppm⁷, este efecto de desapantallamiento puede explicarse si se acepta una interacción diaxial entre el H-3 α y el hidroxilo 5 α (Figura 5.6)

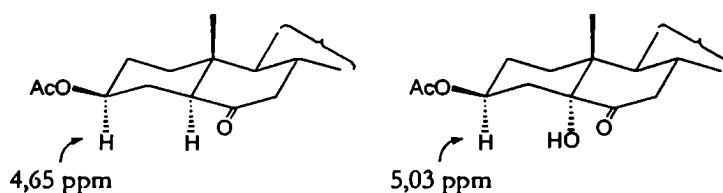


Figura 5.6. El hidroxilo en C-5 modifica el desplazamiento químico del H-3 α en el espectro RMN- ^1H de **52**.

Además, la señal del H-3 α se presenta como un multiplete compatible con una posición axial. Esta señal se encuentra superpuesta con la del H-23, por lo que es necesario sustraer esta última. (Figura 5.7).

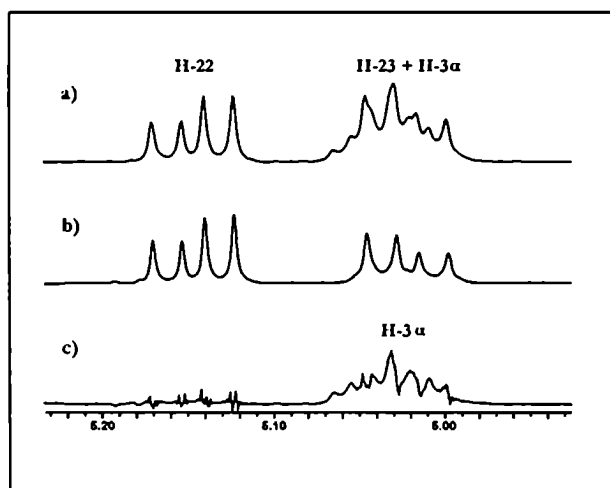


Figura 5.7. a) En el compuesto **52**, la señal del H-3 α se superpone con la del H-23. Luego de sustraer el espectro b), puede verse la señal del H-3 α (c), que corresponde a un hidrógeno en posición axial. El espectro b) se obtuvo a partir del compuesto **22**. (500 MHz, CDCl₃)

Puede concluirse, entonces, que el compuesto **52** posee la fusión buscada *trans* entre los anillos A y B

La hidrólisis del acetato **52**, y la posterior dihidroxilación asimétrica del doble enlace de la cadena lateral permitió obtener el análogo **42** con un rendimiento de 16 % a partir de estigmasterol.

La síntesis del análogo **46** puede plantearse fácilmente a partir del compuesto **53**, vía una inversión del hidroxilo en C-3 (Figura 5.8).

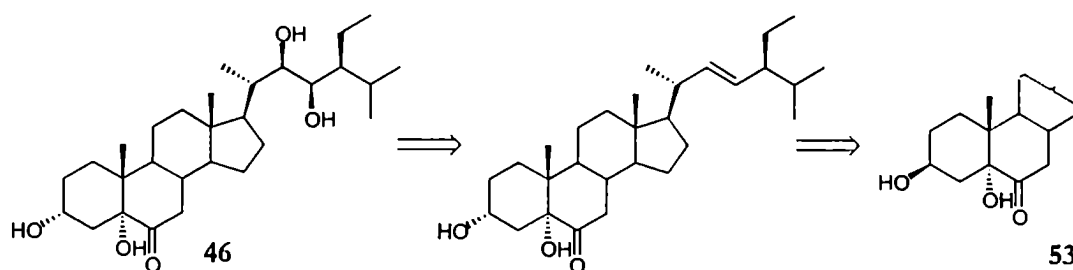


Figura 5.8. Retrosíntesis para el análogo **46**.

La presencia de dos hidroxilos en el compuesto **53** plantea un problema de selectividad. Si bien, y tal como se describió en la Sección 2.2.3 del Capítulo 2, la inversión puede lograrse mediante una reacción de Mitsunobu, es muy posible que en esas condiciones, y debido a la estabilidad termodinámica de la cetona insaturada resultante, se promueva la eliminación del hidroxilo en C-5.⁸

La alternativa consiste en la sustitución nucleofílica de un 3 β -sulfonato, para lo cual se debía obtener este sulfonato por reacción selectiva del hidroxilo en C-3, ecuatorial y secundario, con menor impedimento estérico para reaccionar que el hidroxilo terciario, axial, del C-5. Luego de varios intentos, se encontró que por tratamiento de **53** con cloruro de metansulfonilo a baja temperatura, podía obtenerse, efectivamente, el producto requerido **54** con un rendimiento aceptable (83 %). La Figura 5.9 muestra la ruta sintética seguida para la obtención del análogo **46** a partir del compuesto **53**.

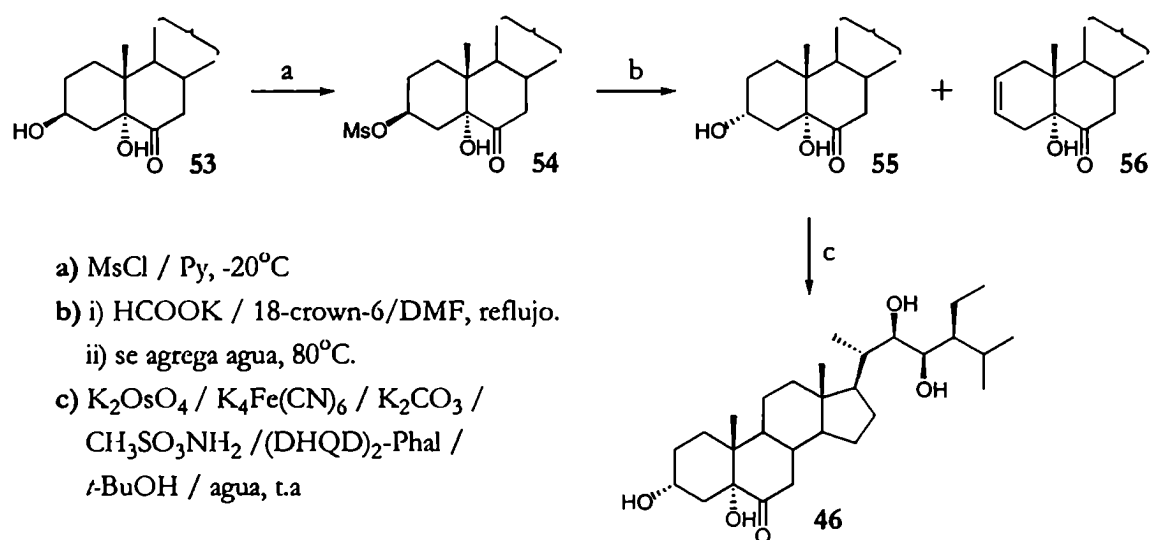


Figura 5.9. Síntesis del análogo **46**.

El metansulfonato **54** se trató con formiato de potasio y 18-crown-6, en DMF a reflujo, hasta que por CCD se determinó su desaparición. Un análisis por RMN-¹H de la mezcla de reacción mostró señales correspondientes a un 3 α -formil derivado, junto a productos de eliminación. A esta mezcla se agregó agua, y se continuó el calentamiento por 8 horas más. Se obtuvo así el compuesto requerido **55** con un rendimiento de 74 %, junto con un 14 % de la dienona **56**, proveniente de la eliminación del grupo en C-3.

Por último, se dihidroxiló el doble enlace de la cadena lateral del compuesto **55**, según las condiciones habituales, para obtener el análogo **46** con un rendimiento global de 9 %.

Las estructura de los análogos obtenidos se confirmó, como siempre, por medio de espectrometría de masas de alta resolución (FAB), y espectroscopía de RMN mono y bidimensional.

5.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS FLUORADOS EN C-5.

5.2.1. ANTECEDENTES

En la literatura se encuentran dos estrategias que permiten preparar 5 α -fluoro-6-oxo esteroides partiendo de sustratos Δ^5 insaturados:

a) Adición de fluoruro de nitrosilo⁹: en este método, el fluoruro de nitrosilo se adiciona desde la cara menos impedida del doble enlace Δ^5 , se genera así un 5 α -fluoro-6 β -nitroso compuesto como intermediario, que se oxida espontáneamente en el medio de reacción a una 5 α -fluoro-6-nitrimina. Este compuesto, una vez aislado, se hidroliza en presencia de alúmina para dar el compuesto deseado.

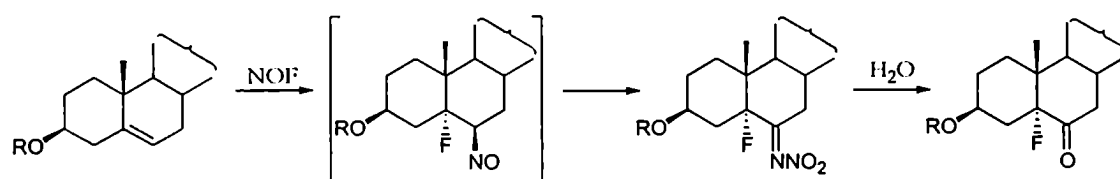


Figura 5.10.a. Adición de fluoruro de nitrosilo a alquenos esteroideos.

b) Epoxidación del doble enlace y posterior reacción con trifluoruro de boro¹⁰: el trifluoruro de boro actúa como ácido de Lewis, debilitando los enlaces C-O del epóxido, y simultáneamente, como fuente de fluoruro. Si se parte de un 5 β ,6 β -epoxi esteroide, el ataque *trans*-diaxial sobre el oxirano ocurre sobre el C-5, más electrofílico, dando un 5 α -fluoro-6 β -hidroxi esteroide, que debe oxidarse en una segunda etapa.

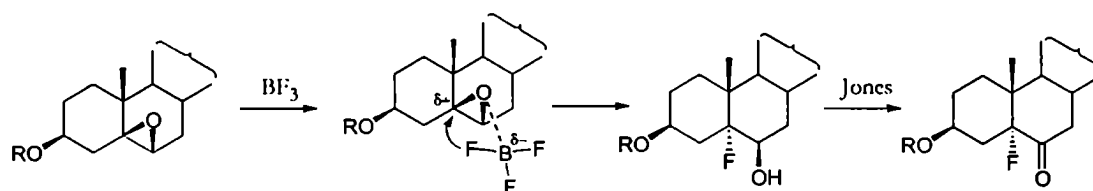


Figura 5.10.b. Apertura de un 5 β ,6 β epóxido con BF₃.

La primera técnica implica un paso menos, pues en la segunda es necesario preparar el epóxido a partir del alqueno Δ^5 . Otra ventaja es que el NOF presenta reactividad selectiva para dobles enlaces ubicados en el fragmento cíclico frente a otros en la cadena lateral. Sin embargo, el fluoruro de

nitrosilo es un gas a temperatura ambiente, con propiedades corrosivas que hacen inadecuado el empleo del equipamiento habitual de laboratorio. Por otro lado, la preparación de un epóxido con la estereoquímica requerida por el método ii) puede efectuarse con buenos rendimientos, como se vio anteriormente en la Sección 3.1.3 del Capítulo 3.

Por este motivo, decidimos utilizar esta última estrategia para la introducción del flúor en los análogos a preparar.

Por otro lado, resultó interesante explorar una nueva alternativa, que si bien había sido utilizada para la fluoración de esteroides, no se había aplicado en la síntesis de compuestos fluorados en C-5:

- c) Obtención de α -fluoro cetonas por fluoración electrofílica'' de un enol derivado:

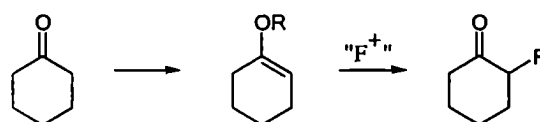


Figura 5.10.c. Fluoración electrofílica de cetonas.

La selectividad y estereoquímica de la fluoración es altamente dependiente de la estructura del sustrato y de las condiciones de reacción, y su aplicación a este caso particular se discutirá más adelante

5.2.2. SÍNTESIS DE (22R,23R)-5-FLUORO-3 β ,22,23-TRIHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA (47).

Este análogo se preparó mediante las dos rutas que se describirán a continuación:

RUTA A: Apertura nucleofílica de un epóxido. Se preparó el epóxido **10**, y se trató con eterato de trifluoruro de boro. La reacción transcurrió rápidamente, y generó gran cantidad de productos, de entre los cuales se aislaron y analizaron por espectroscopía de RMN los dos mayoritarios (Figura 5.11).

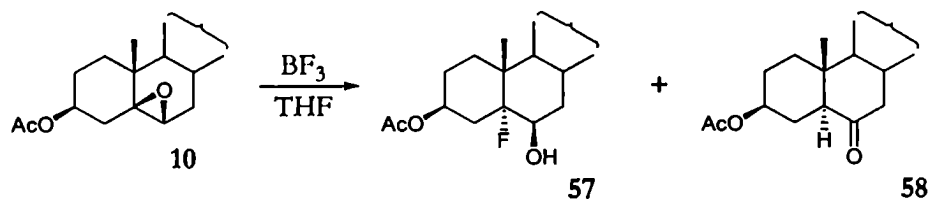


Figura 5.11. Reacción del epóxido **10** con BF_3 .

El espectro de ^{13}C del primero de ellos, el compuesto **57**, aislado con un rendimiento del 77 %, mostró que la introducción del flúor había sido efectiva, pues se observó claramente un doblete de $J = 167\text{ Hz}$ centrado en 98,6 ppm (Figura 5.12), y correspondiente, según el espectro DEPT-135, a un carbono terciario. Por otro lado, el C-6 aparece como un doblete centrado en 73 ppm (carbono oxigenado), y el valor de su constante de acoplamiento (35 Hz), es consistente con la estructura propuesta. Pueden verse además, entre otros, los acoplamientos C-F con los carbonos 3 y 19, lo que confirma la posición del flúor.

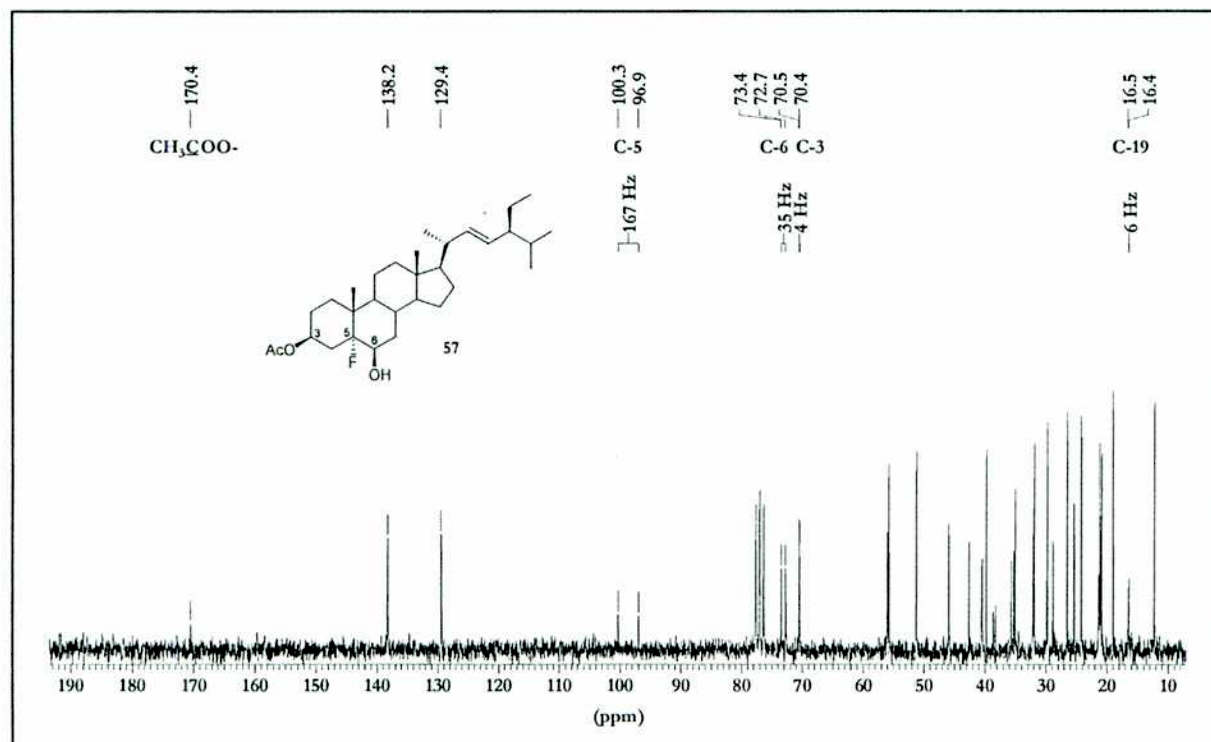


Figura 5.12. Espectro de RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) del compuesto **57**.

Por otro lado, y tal como se dedujo en otros casos, la estereoquímica de la unión entre los anillos A y B se asignó como *trans* a partir de la multiplicidad del H-3 en el espectro de RMN- ^1H .

El segundo compuesto aislado presentó un ión molecular de 470 unidades, igual que el del epóxido de partida. En el espectro de RMN- ^{13}C no se encontraron señales correspondientes a carbonos fluorados, pero sí una señal de carbonilo a 209,6 ppm. La elucidación estructural completa demostró que se trataba del 6-ceto esteroide **58**, cuya formación como producto secundario (13 %), se justifica admitiendo que el trifluoruro de boro cataliza la isomerización del epóxido, mediante una migración 1,2 de hidruro¹², según se muestra en la Figura 5.13.

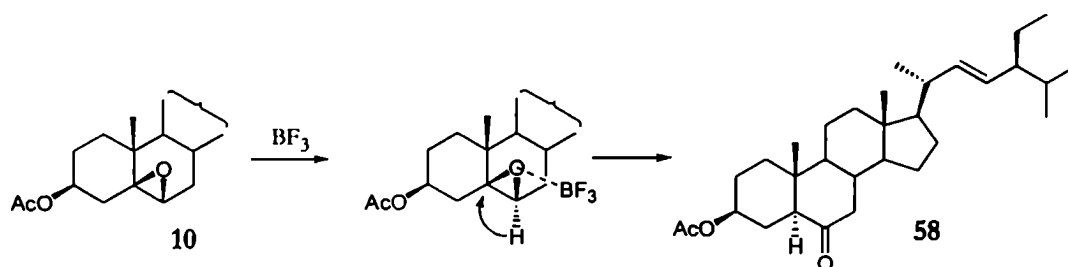


Figura 5.13. Formación de la cetona **58** por reordenamiento del epóxido **10**.

Esta es una reacción típica de epóxidos alicíclicos¹³, pues en epóxidos rígidos, como los derivados de esteroides, está más favorecida la apertura por fluoruro.

Simultáneamente, se ensayaron distintos reactivos fluorantes para la apertura del epóxido, cuyo uso había sido descrito en esta clase de transformaciones:

Con fluoruro ácido de potasio¹⁴ (KFH_2): las condiciones enérgicas necesarias para la reacción (reflujo en etilenglicol), condujeron a un bajo rendimiento del compuesto **57**, junto con una gran cantidad de productos secundarios no identificados.

Con fluoruro de hidrógeno-piridina: en este caso, la reacción es rápida y eficiente, incluso a baja temperatura. El compuesto **57** se obtuvo en un 89 % de rendimiento, junto con un 5 % de la cetona **58**.

El compuesto **57** se oxidó en condiciones suaves para generar la fluorocetona **59**. La hidrólisis del acetato en la condiciones usuales (K_2CO_3 / MeOH) dio el intermediario **60**, que se sometió a una dihidroxilación asimétrica (Figura 5.14).

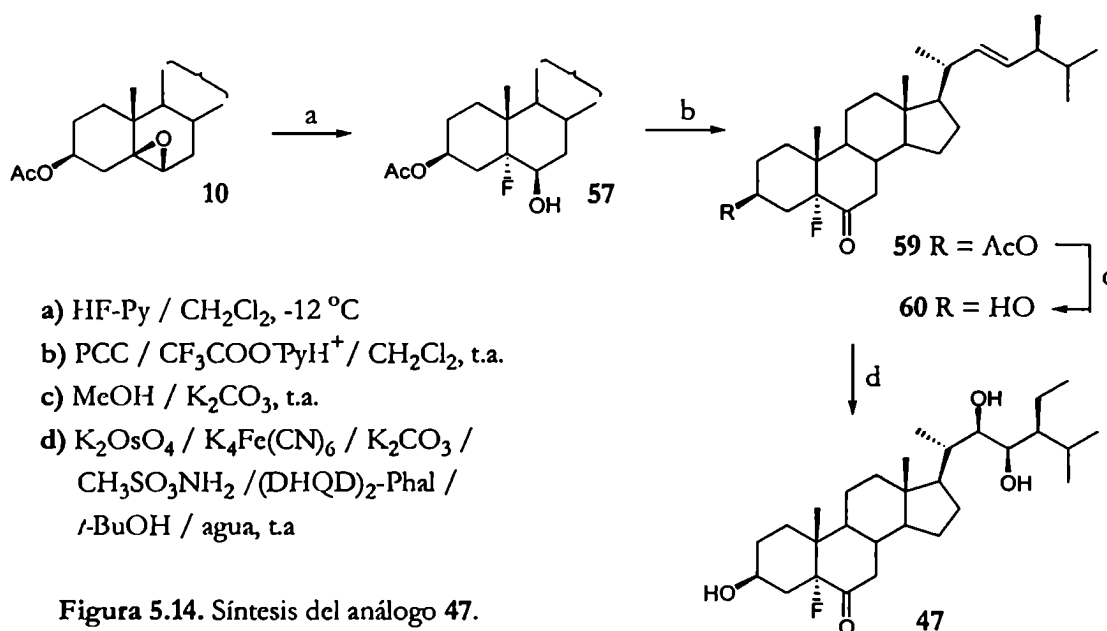


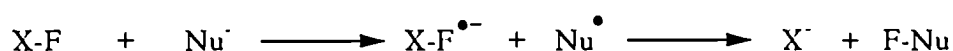
Figura 5.14. Síntesis del análogo **47**.

Se obtuvo así el compuesto **47**, análogo fluorado en C-5 de la 28-homoteasterona, con un rendimiento total de 13 % desde estigmasterol.

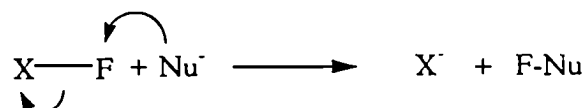
RUTA B: Fluoración electrofílica de compuestos carbonílicos. El concepto de fluoración electrofílica ha generado un considerable debate, porque parece implicar la cesión de electrones por parte del flúor, el átomo más electronegativo.

Sin embargo, se han postulado mecanismos¹⁵ que explican esta reactividad particular, donde no es necesaria la formación de especies positivas de flúor:

-transferencia de electrones: la nueva unión nucleófilo-F se forma en etapas discretas de transferencia de electrones, involucrando, entonces, especies radicalarias.



-ataque nucleofílico sobre el fluor: hay un desplazamiento concertado del grupo saliente unido al flúor, quien no llega a desarrollar una densidad de carga positiva.



La fluoración electrofílica es utilizada desde hace tiempo en la síntesis de esteroides¹⁶. Sin embargo, la alta reactividad de los reactivos empleados, tales como fluoruro de perclorilo (FClO_3), hipofluorito de trifluorometilo (CF_3OF), e incluso flúor elemental, impidió el uso extendido de estas metodologías.

La aparición comercial del difluoruro de xenón (XeF_2), un sólido que puede utilizarse con relativa seguridad¹⁷, revivió el interés por sus eventuales aplicaciones sintéticas. Recientemente se han desarrollado nuevos reactivos, colectivamente conocidos como agentes fluorantes NF , que poseen un átomo de flúor unido a nitrógeno¹⁸; estos compuestos son sólidos estables, de reactividad moderada, con los cuales pueden lograrse fluoraciones electrofílicas selectivas.

Todos los reactivos mencionados son capaces de transformar enolatos, silil enol éters, enol acetatos o enaminas en los respectivos compuestos α -fluoro carbonílicos. Decidimos, entonces, estudiar la posibilidad de su uso para la preparación del análogo **47** por fluoración de un 6-oxo esteroide.

En primer lugar, se presenta el problema de la regioselectividad. Es posible, a partir de un 6-oxo

esteroide, generar dos enolatos distintos: un Δ^5 o un Δ^6 enolato. Es factible pensar que, si se trabaja en condiciones de equilibrio termodinámico, se formará mayoritariamente el primero, más estable.

En un primer intento, se trató el compuesto **4** con anhídrido acético, con ácido perclórico como catalizador, condiciones habituales para la preparación de un enol acetato.¹⁸ Sin embargo, y luego de horas de reflujo, sólo se obtuvo el acetato **58**. El mismo resultado se obtuvo empleando acetato de isopropenilo (con ácido p-toluensulfónico como catalizador).

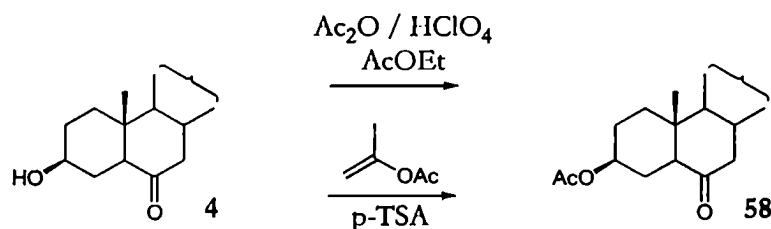


Figura 5.15. Intentos de obtención del enol acetato del 6-oxo esteroide **4**.

El carbonilo en C-6 parece presentar una baja tendencia a enolizar en estas condiciones. Sin embargo, como se recordará del Capítulo 2, la enolización parecía posible en medio básico. Decidimos intentar, entonces, la formación de un enol sili éter como sustrato de la fluoración.

El tratamiento de **58** con cloruro de trimetilsililo en trietilamina^{19,20} a temperatura ambiente, no llevó, tampoco, al resultado esperado. Fueron necesarias varias horas a reflujo para lograr obtener el compuesto **61**, con un rendimiento cercano al 73 %. Este compuesto resultó ser inestable, por lo que se empleó, sin purificación previa, en la siguiente reacción.

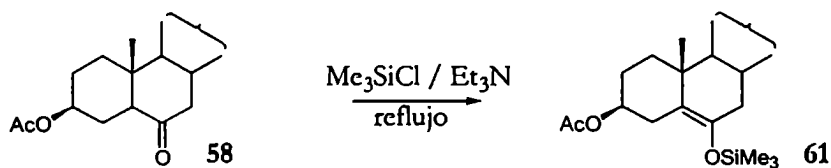


Figura 5.16. Obtención del enol sili éter del 6-oxo esteroide **58**.

El compuesto **61** se disolvió en acetonitrilo y se trató con heptafluorodiborato de N-fluoropiridonio (Figura 5.17). Luego de 24 horas de reflujo, sólo se produjo la reconversión del compuesto **61** en el **58**. El mismo resultado se tuvo al intentar la fluoración con triflato de N-fluoropiridonio.

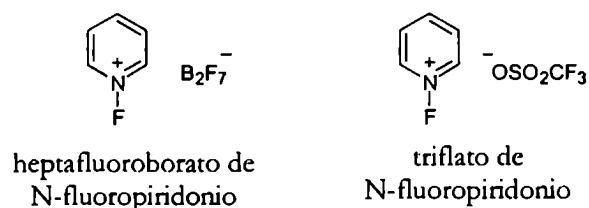


Figura 5.17. Sales de N-fluoropiridonio.

Dada la labilidad del enol éter **61**, es posible que su descomposición proceda con mayor velocidad que la reacción de fluoración, si se tiene en cuenta la moderada reactividad de las sales de N-fluoropiridonio.

Decidimos utilizar un agente fluorante más reactivo. Se agregó, entonces, el compuesto **61** sobre una solución de difluoruro de xenón en diclorometano. Luego de 2 horas a temperatura ambiente pudo obtenerse la fluorocetona **59** con un 72 % de rendimiento. La estereoquímica de la fluoración puede explicarse admitiendo el ataque preferencial del XeF_2 por la cara α , menos impedida, del esteroide, efecto ya descrito en la literatura²⁹, y parece implicar que la reacción no transcurre por un mecanismo radicalario. (Figura 5.18).

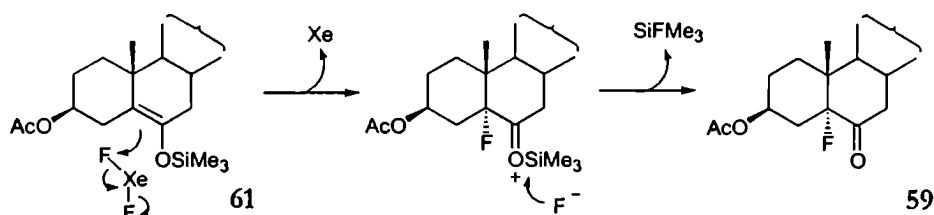


Figura 5.18. Fluoración del intermediario **61** con XeF_2 .

Por último, el compuesto **59** se transformó en el análogo **47** tal como se describió anteriormente.

El rendimiento global de la ruta B resultó ser de un 6 %, inferior al 13 % logrado mediante la ruta A. De todas maneras, sirve como ejemplo de las aplicaciones potenciales de la fluoración electrofílica, estrategia complementaria a las fluoraciones nucleofílicas usuales.

5.2.2. SÍNTESIS DE (22R,23R)-5-FLUORO-3 α ,22,23-TRIHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA (48).

La síntesis del análogo 5 α -fluorado de 28-homotifasterol (48), puede plantearse a partir del intermediario 60. En este caso, a diferencia de lo discutido para el análogo 46, sí puede pensarse en la reacción de Mitsunobu para la inversión de la configuración del hidroxilo en C-3, como la alternativa más adecuada. Esta reacción requiere un ácido orgánico, que actúa simultáneamente como fuente de protones y como nucleófilo. La reacción sobre el intermediario 60, utilizando ácido acético, transcurrió con buen rendimiento para dar el 3 α -acetato 62.

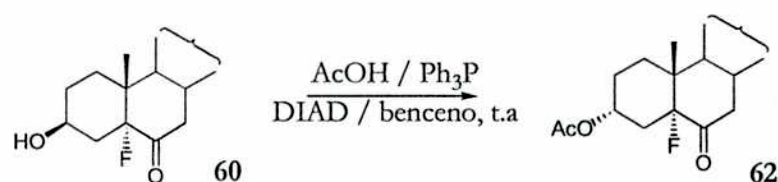


Figura 5.19. Inversión de la configuración del C-3 del intermediario 60.

Pero cuando se intentó la hidrólisis en las condiciones habituales (K_2CO_3 / MeOH) para obtener el correspondiente 3 α -alcohol, se obtuvo un compuesto mayoritario 63, que presentó un ión moleculares de 458 unidades de masa, 12 unidades más que lo esperado. La característica más notable del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 63 (Figura 5.20) era la ausencia de señales asignables a carbonos fluorados.

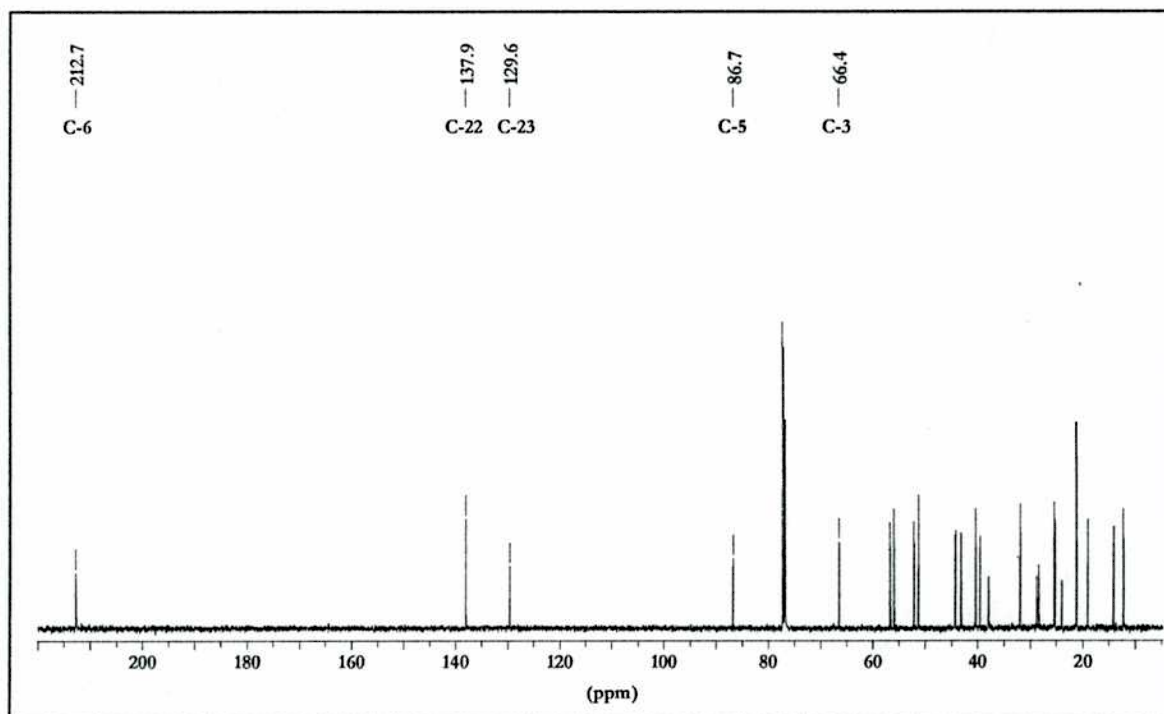


Figura 5.20 Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto 63.

Tampoco era visible el carbonilo característico de un acetato, lo que indicaba que había ocurrido la hidrólisis del mismo. En la zona de los carbonos oxigenados aparecían dos señales, una a 66,4 ppm, atribuible al C-3, y otra a 86,7 ppm, que según el espectro DEPT-135, pertenecía a un carbono terciario.

Mediante el espectro de RMN- ^1H (Figura 5.21) se confirmó la hidrólisis del acetato, pues no se observó el singlete característico de su metilo en 2 ppm. En su lugar, apareció, en 3,22 ppm, un singlete, integrando para 3 H. El patrón de acoplamiento del H-3 β demuestra, además, que la unión de los anillos A y B sigue siendo *trans*.

Estos datos, junto con la fórmula mínima obtenida a partir de la masa del ión molecular determinada con alta resolución, permitió determinar la estructura del compuesto **63** (Figura 5.21). La asignación completa de todas las señales de los espectros ^1H y ^{13}C , obtenida a partir de experimentos bidimensionales, resultó consistente con la estructura propuesta.

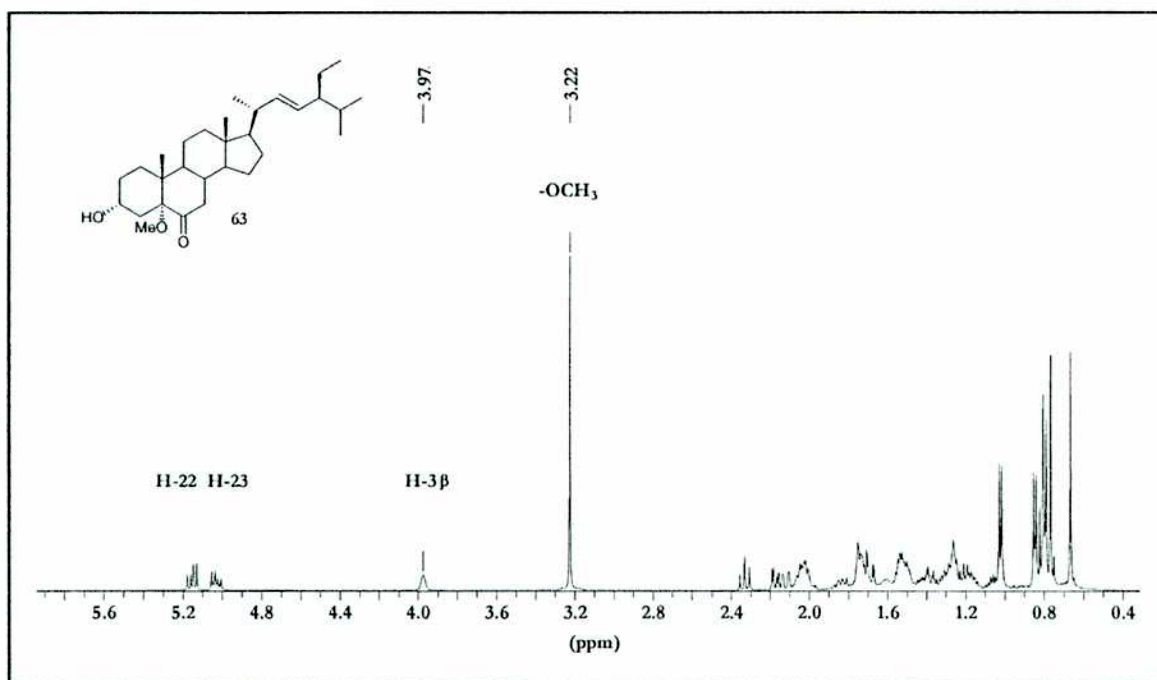


Figura 5.21. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **63**.

Toda la evidencia presentada anteriormente indica que, en las condiciones empleadas para la hidrólisis del acetato, ocurrió una sustitución nucleofílica del fluoruro presente en el compuesto **62** por un grupo metoxilo (Figura 5.22).

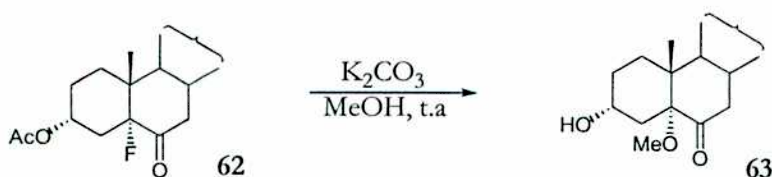


Figura 5.22. Sustitución nucleofílica de fluoruro por metoxilo.

Este resultado se discutirá con más detalle en el capítulo siguiente.

Dada la posibilidad de que la reacción de desplazamiento del fluoruro estuviera relacionada con la fuerza del medio básico empleado para la hidrólisis del acetato, se intentó efectuar la misma en condiciones más suaves, reemplazando el carbonato por bicarbonato de potasio; pero, en este caso, el compuesto **62** resultó inerte. Se decidió, entonces, realizar la inversión de Mitsunobu sobre el C-3, esta vez con ácido fórmico. Se obtuvo así el 3 α -formiato **64**, que pudo ser hidrolizado en condiciones más suaves (KHCO₃ / MeOH), para dar el alcohol **65** con buen rendimiento, según se muestra en la Figura 5.23. Cabe destacar que, en estas condiciones, no se obtuvieron evidencias de la formación del compuesto **63**. La dihidroxilación de **65**, en las condiciones habituales, permitió obtener **48**, el análogo 5 α -fluorado de 28-homotifasterol, con un rendimiento de 8 % desde estigmasterol.

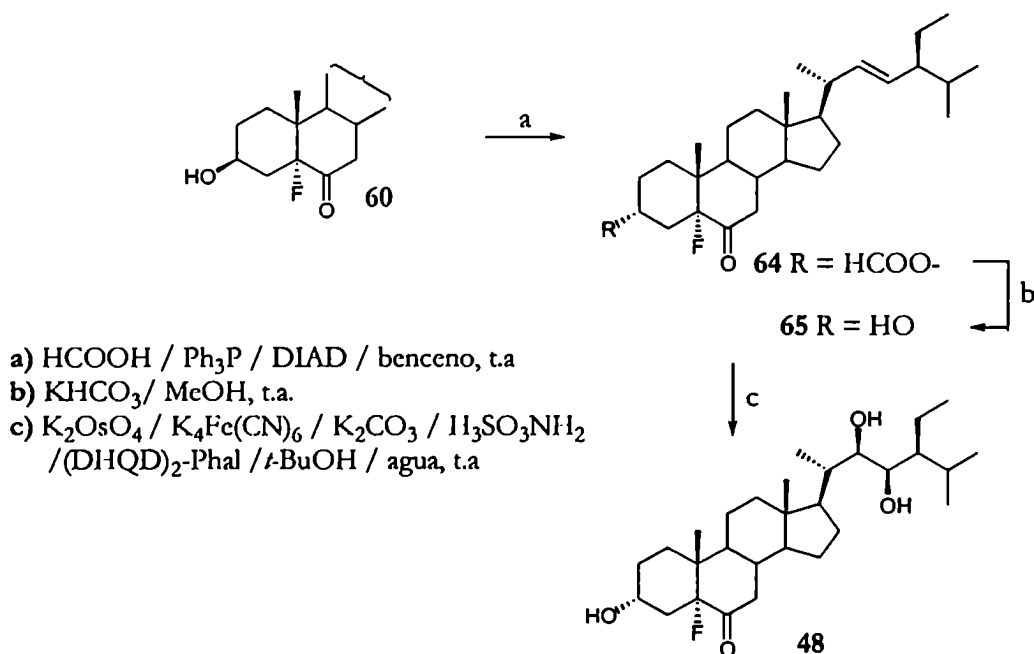


Figura 5.23. Síntesis del análogo **48**.

5.2.4 SÍNTESIS DE (22R,23R)-5-FLUORO-2 α ,3 α ,22,23-TETRAHIDROXI-5 α -ESTIGMASTAN-6-ONA (**49**).

Para la obtención del análogo **49** se siguió una secuencia similar a la empleada por Brosa y Teme Centurión para la síntesis del análogo **44**. El alcohol **60** se transformó en el correspondiente 3 β -mesiloxi derivado **66**, que se trató con bromuro de litio a alta temperatura, con lo cual se favoreció la eliminación que condujo al alqueno **67**. La confirmación de que, en efecto, se obtuvo el alqueno

Δ^2 , se obtuvo a partir de la asignación completa de los espectros de **67** mediante técnicas bidimensionales. Es interesante mencionar que en esta reacción se obtuvo, como producto secundario, un compuesto que resultó ser el dieno conjugado **68** formado, posiblemente, a partir de **67** por una β eliminación de fluoruro de hidrógeno. Esta reacción, poco habitual, está favorecida posiblemente por la formación del sistema conjugado, y por la rigidez del sistema esteroidal, con el H-4 β en una posición periplanar *anti* con respecto al flúor, óptima para la eliminación (Figura 5.24). Existen antecedentes²² de que cationes tales como el Li⁺ pueden promover la eliminación de fluoruro.

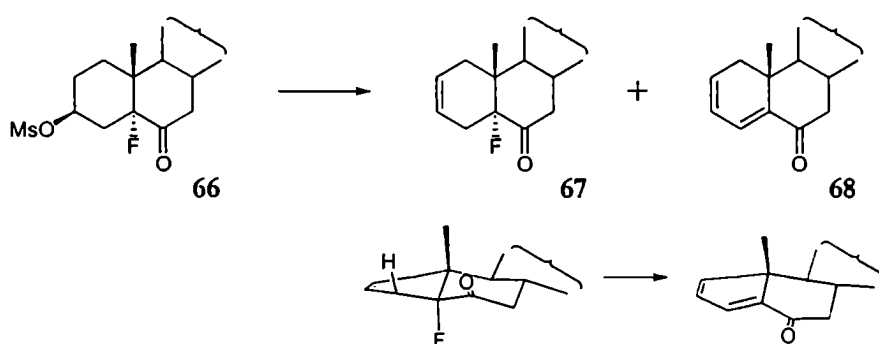


Figura 5.24. Formación de los alquenos **67** y **68**.

La dihidroxilación de los dobles enlaces de **67** condujo al compuesto buscado **49**, análogo 5 α -fluorado de la 28-homocastasterona, según se muestra en la Figura 5.25.

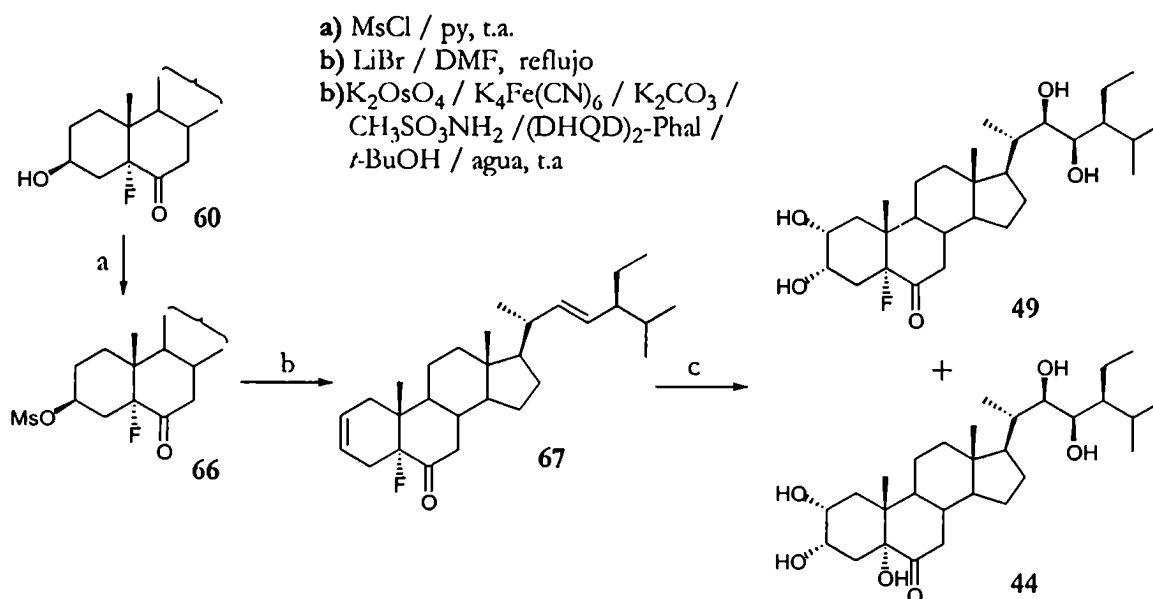


Figura 5.25. Síntesis del análogo **49**.

Sin embargo, el rendimiento del paso de dihidroxilación resultó inferior a lo habitual. Un análisis detallado mostró que, además de los subproductos normales de la reacción (dioles 2 β ,3 β y 22 Δ ,23 Δ), se formaron otros compuestos. Se aisló y caracterizó el más polar de ellos, que resultó ser el análogo 5 α -hidroxilado 44. En el capítulo siguiente se discutirá una posible explicación para este resultado, que parece relacionado con lo observado durante la hidrólisis del acetato 62.

5.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

A continuación se describirán los resultados obtenidos en los ensayos de bioactividad efectuados sobre los análogos 5 α -hidroxilados 45 y 46, y los análogos 5 α -fluorados 47, 48 y 49. Se incluyen las actividades de los compuestos naturales correspondientes HTE, HTY y HCS, a fin de evaluar los efectos provocados por los cambios estructurales introducidos.

5.3.1. ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA):

En la Figura 5.26 pueden verse los resultados obtenidos en este ensayo. Como es habitual, cada punto en los gráficos resulta de promediar los ángulos medidos para 20 plántulas. En este caso, el control de etanol indujo un ángulo de $15^\circ \pm 2^\circ$.

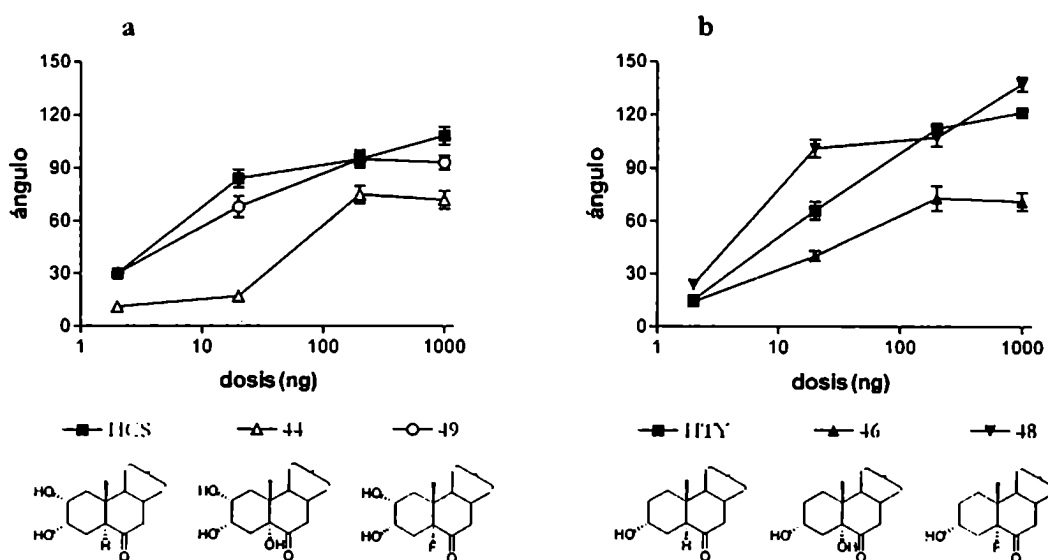


Figura 5.26. Ensayo ILA para HCS, HTY, y sus análogos modificados en C-5.

Tal como había sido descrito por Brosa⁴ y Teme Centurión⁵, el análogo **44** resultó ser sustancialmente menos activo que el compuesto natural HCS (Figura 5.26.a). En el presente estudio se verifica el mismo efecto entre el análogo **46** y HTY (Figura 5.26.b).

Por otro lado, los análogos fluorados **48** y **49** resultaron poseer actividades comparables, o incluso mayores, a las de los compuestos naturales. Desde el punto de vista de la acción biológica, un grupo 5 α -flúor se asemeja, entonces, a un 5 α -H y no a un 5 α -OH.

No puede extenderse esta comparación a los análogos de la HTE, puesto que no se observaron diferencias significativas entre ellos (Figura 5.27), dada la baja actividad que mostraron todos estos compuestos.

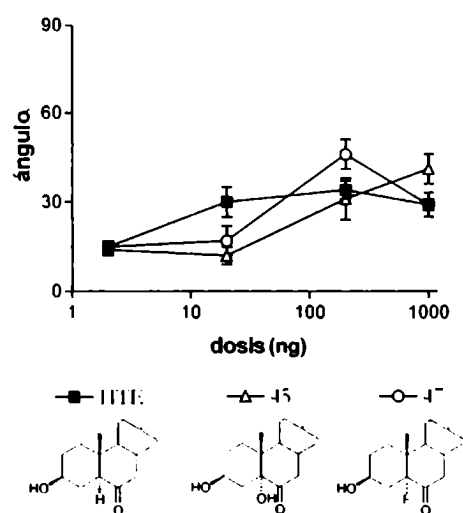


Figura 5.27. Ensayo ILA para HTE y sus análogos modificados en C-5.

5.3.2. ENSAYO DE ELONGACIÓN DEL EPICOTILO DE SOJA:

En la Figura 5.28 se muestran las longitudes promedio de epicotilos de soja luego de ser incubados

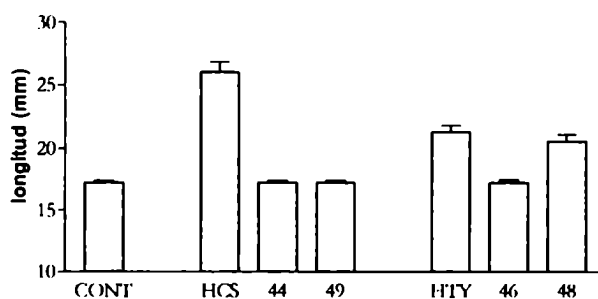


Figura 5.28. Elongación de epicotilos de soja.

Si bien la HCS es capaz de promover la elongación de los epicotilos, ninguno de sus análogos retiene esa propiedad. El análogo fluorado **48**, en cambio, es casi tan activo como el compuesto natural del que deriva (HTY).

5.3.3. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE MUTANTES BIOSINTÉTICAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

Nuevamente, el efecto sobre el crecimiento de las mutantes *det2* se evaluó en luz y oscuridad. Los compuestos se aplicaron, como es usual, a una concentración de 10^{-6} M. La Figura 5.29 muestra que, cuando la experiencia se realiza en condiciones de iluminación, la introducción de un hidroxilo (**44**) o un flúor (**49**) en el C-5 de la HCS disminuye la actividad del análogo resultante, si bien el efecto es menos importante en el último caso. Notablemente, el análogo fluorado **48** resultó ser muy activo, hecho inesperado si se considera que el compuesto natural relacionado, HTY, no lo es. El resto de los análogos, al igual que la HTE, no son activos

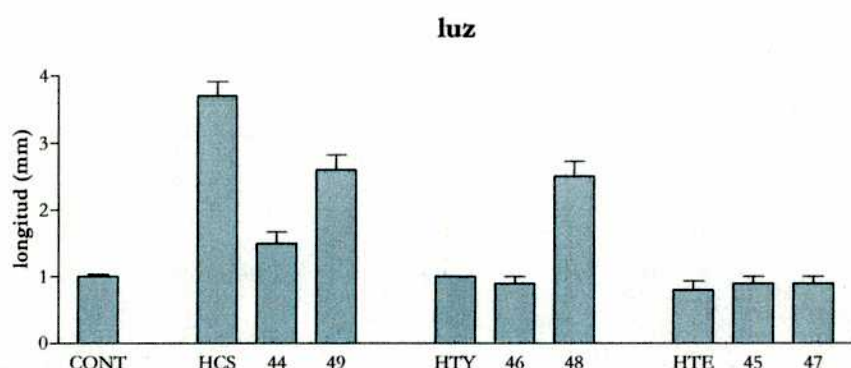


Figura 5.29. Efecto de los compuestos sintetizados sobre el crecimiento de la mutante *det 2* de *A. thaliana* en la luz.

Cuando la experiencia se realiza en la oscuridad, los resultados son muy diferentes (Figura 5.30)

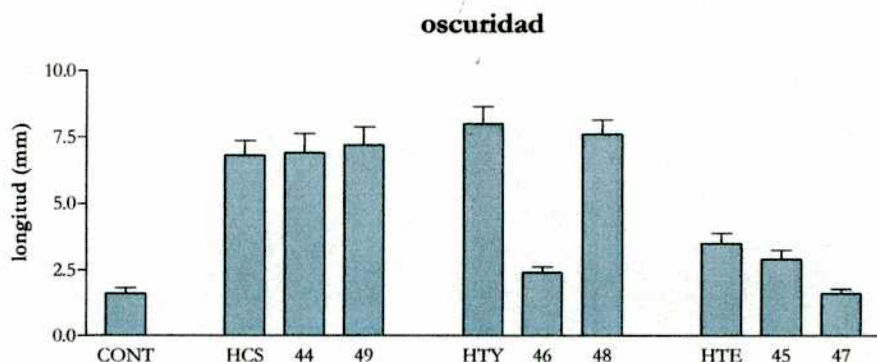


Figura 5.30. Efecto de los compuestos sintetizados sobre el crecimiento de la mutante *det 2* de *A. thaliana* en la oscuridad.

En primer lugar, tanto la HCS como sus análogos resultaron tener actividades comparables. Por otro lado, la introducción de un hidroxilo anula la actividad en el caso de HTY, pero no de HTE, observándose lo opuesto para la introducción de un flúor en estos mismos compuestos naturales.

5.4. CONCLUSIONES.

En este Capítulo se describió la síntesis de análogos modificados por introducción de un flúor o un hidroxilo, en el carbono 5 de distintos 28-homobrassinosteroides naturales (HTE, HTY y HCS). La introducción de un 5 α -hidroxilo se realizó mediante la adaptación de estrategias ya utilizadas en nuestro laboratorio. Por otro lado, para la fluoración de esa posición se exploraron tanto una secuencia publicada previamente (apertura nucleofílica de epóxidos) como otra novedosa (adición electrofílica de flúor). Durante el transcurso de la síntesis de los análogos fluorados, se encontraron resultados interesantes sobre la sustitución nucleofílica del flúor. Este punto se discutirá más detalladamente en el Capítulo siguiente.

Los ensayos biológicos muestran que, en general, la introducción de un hidroxilo disminuye la actividad con respecto a los correspondientes compuestos naturales. Los derivados fluorados no muestran, en ese sentido, un comportamiento homogéneo, con una tendencia a presentar actividades comparables a la de los BRs naturales.

Si bien todos los bioensayos utilizados se basan en la capacidad de los BRs para estimular el crecimiento vegetal, es posible que los mecanismos fisiológicos, disparados a nivel molecular, sean distintos en cada caso. Esto podría explicar por qué la actividad relativa de un compuesto natural y sus análogos no se repite a lo largo de los distintos ensayos.

5.5. REFERENCIAS.

- 1 Brosa C., Capdevila J. M., Zamora I. Brassinosteroids: a new way to define the structural requirements. *Tetrahedron* 52, 2435 (1996).
- 2 Seto H., Fujioka S., Koshino H., Yoshida S. Synthesis and biological evaluation of extra-hydroxylated brassinolide analogs. *Tetrahedron* 55, 8341 (1999).
- 3 Kametani T., Katoh T., Fujio J., Nogiwa I., Tsubuki M., Honda T., An improved synthesis of plant growth regulating steroid brassinolide and its congeners. *J. Org. Chem.* 53, 1982 (1988).
- 4 Brosa C., Soca L., Terricabras E. New synthetic brassinosteroids: a 5 α -hydroxy-6-ketone analog

with strong plant growth promoting activity. *Tetrahedron* 54, 12337 (1998).

5 Teme Centurión O. Tesis de Doctorado: Síntesis de análogos de castasterona y ensayos de su actividad biológica. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos Aires. (1997).

6 Brosa C., Zamora I., Terricabras E., Soca L., Peracaula L., Rodríguez-Santamarta C. Synthesis and molecular modeling: related approaches to the progress in brassinosteroid research. *Lipids*, 32, 1341 (1997)

7 Takatsuto S., Ikekawa N. Synthesis and activity of plant growth-promoting steroids, (22R,23R,24S)-28-Homobrassinosteroids, with modifications in rings A and B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 439 (1984).

8 Mitsunobu O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* 1, 1 (1981).

9 Boswell G. Reaction of nitrosyl fluoride and selected steroid enes. *J. Org. Chem.* 33, 3699 (1968).

10 Henbest H., Wrigley T. The formation of fluorohydrines from cholesteryl 5:6-epoxides and boron trifluoride-ether complex. *J. Chem. Soc.* 4765 (1957).

11 Rozen S., Filler R. α -fluorocarboxyl compounds and related chemistry. *Tetrahedron* 41, 1111 (1985).

12 Parker R., Isaacs N. Mechanisms of epoxides reactions. *Chem. Rev.* 59, 737 (1959).

13 Shahak, Manor, Bergmann. Organic fluorine compounds. The reaction of hydrofluoric acid with cycloalkene epoxides. *J. Chem. Soc. C.* 2129 (1968).

14 Oshima E., Sai H., Takatsuto S., Ikekawa N., Kobayashi Y., Tanaka Y., DeLuca H. Synthesis and biological activity of 1 α -fluoro-25-hydroxy Vitamin D₃. *Chem. Pharm. Bull.* 32(9), 3525 (1984).

15 Sankar Lal G., Pez G., Syvert R. Electrophilic NF fluorinating agents. *Chem. Rev.* 96, 1737 (1996).

16 Chamberlin J. Steroid Reaction: an outline for Organic Chemists. Djerassi C (Ed) pp 164. Holden-Day. San Francisco (1963).

17 Tius M. Xenon difluoride in synthesis. *Tetrahedron* 51, 6605 (1995).

18 Berkoz B., Chavez E., Djerassi C. Factors controlling the direction of enol acetylation of 3-oxo steroids. *J. Chem. Soc.* 1323 (1962).

19 House H., Czuba L., Gall M., Olmstead H. *J. Org. Chem.* 34, 2324 (1969).

20 Brownbridge P. Silyl enol ethers in synthesis. *Synthesis* 1, 1 (1983).

21 Tsushima T., Kawada K., Tsuji T. α -fluorination of ketones by xenon and iodobenzene difluorides: a stereochemical evidence demonstrating their mechanistic differences. *Tetrahedron Lett.* 23, 11, 1165 (1982).

22 Matsubara S., Matsuda H., Hamatani T., Schlosser M. Base-promoted elimination of hydrogen fluoride from alkyl fluorides: reactivity and stereochemistry. *Tetrahedron* 44, 2855 (1988).

CAPÍTULO 6

REACTIVIDAD DEL FLÚOR EN C-5

Durante la síntesis de los análogos fluorados en C-5 se observó un resultado inesperado: el tratamiento del compuesto **62** en las condiciones que habitualmente se emplean para promover la hidrólisis de un acetato provocó, efectivamente, la hidrólisis del 3 α -acetato, pero también la sustitución del fluoruro por un anión metóxido. La formación del compuesto **63**, donde se retuvo la configuración del C-5 (ver Figura 5.22 del capítulo anterior) sugiere, además, que la sustitución involucró a un intermediario carbocatiónico.

Se admite habitualmente que, debido a la energía del enlace F-C, el fluoruro no es un buen nucleófilo. Por otro lado, se considera que la presencia de un carbonilo adyacente al carbono que sufre la sustitución haría poco probable una reacción S_N1.¹ Por estos motivos, se decidió profundizar más sobre este resultado experimental poco habitual.

6.1. ANTECEDENTES

6.1.1 Sustitución nucleofílica de fluoruro.

El enlace F-C presenta un comportamiento muy amplio frente a las sustituciones nucleofílicas, que va desde la reactividad extrema del perfluoroisobuteno, hasta la inercia que caracteriza al politetrafluoroetileno (Teflon®). Estas diferencias deben atribuirse tanto a las características estructurales del compuesto organofluorado como al mecanismo por el cual procede la sustitución.

Las sustituciones nucleofílicas de fluoruro pueden seguir tres tipos de mecanismos:

i) Adición – eliminación.

Si el flúor está unido a un carbono sp², la sustitución procede mediante un mecanismo de adición – eliminación, con un intermediario de tipo carbaniónico. Es conocida la reactividad de los fluoruros de vinilo frente a la reducción con hidruros² o la sustitución por alcóxidos³ (Figura 6.1).

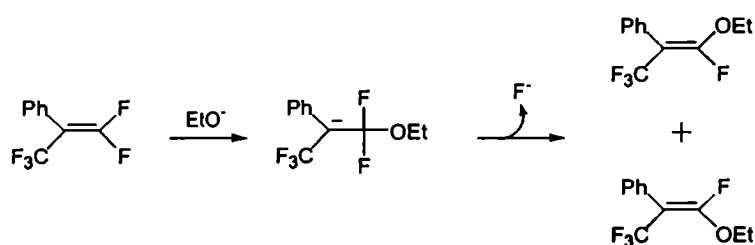


Figura 6.1. Sustitución de fluoruros de vinilo (Referencia 3).

También se ha estudiado ampliamente el papel del flúor en las sustituciones nucleofílicas aromáticas, que proceden por un mecanismo similar.⁴

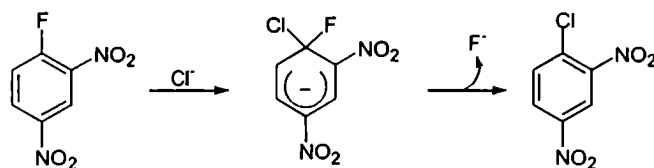


Figura 6.2. Sustitución en fluoruros de arilo (Referencia 4).

Los estudios efectuados parecen demostrar que el paso limitante en estas reacciones es la adición del nucleófilo, proceso favorecido por la presencia del flúor, dado su carácter electroattractor. De esta manera se explica por qué los fluoruros suelen ser mucho más reactivos que los demás halogenuros en este tipo de reacciones.⁵

ii) Si el flúor unido a un carbono sp^3 , la sustitución puede seguir un mecanismo tipo S_N1 o S_N2 , con un espectro de estados de transición, que depende del grado de ruptura del enlace $C-F$ durante el proceso.

El enlace $F-C(sp^3)$ es muy polar (por la alta electronegatividad del flúor) y muy fuerte. Se tienen entonces dos efectos contrapuestos: el carbono unido al F es deficiente en electrones, y susceptible al ataque nucleofílico, pero la ruptura del enlace $C-F$ es altamente energética, y en general, desfavorable. El segundo factor es más importante en los fluoruros de alquilo, que suelen ser menos reactivos que los demás halogenuros.

A excepción de algunos estudios mecanísticos que utilizan moléculas simples (fluoruros de alquilo o de bencilo^{6,7}), son muy pocos los ejemplos de sustituciones nucleofílicas alifáticas de fluoruro que pueden encontrarse en la literatura. Recientemente se describió uno interesante, donde durante la síntesis de un inhibidor de glicosidasas, se observó, para sorpresa de los autores, la sustitución de un fluoruro secundario por hidracina⁸, mediante el mecanismo mostrado en la Figura 6.3.

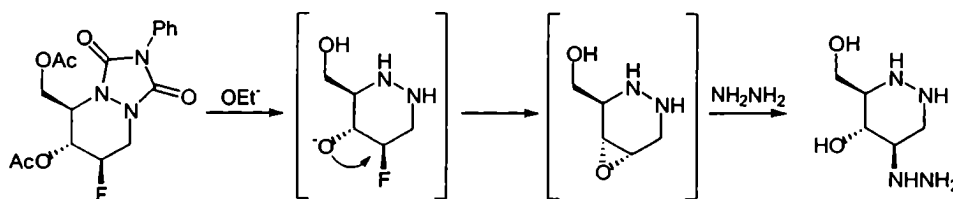


Figura 6.3. Ejemplo de S_N2 de fluoruro (Referencia 8).

iii) Sustitución nucleofílica radicalaria: (S_NR1): En este proceso hay transferencias discretas de electrones (single electron transfer, o SET) que llevan a la disociación homolítica del enlace C-F, para dar, finalmente, un anión fluoruro y un radical, que reacciona propagando la cadena (Figura 6.4).

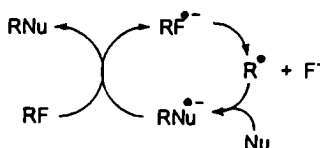


Figura 6.4. Mecanismo de la sustitución nucleofílica radicalaria (S_NR1).

Este mecanismo se favorece si el potencial de ionización del nucleófilo y la afinidad electrónica del sustrato son altas, y se han documentado varios casos de sustituciones de fluoruros aromáticos.⁹ Sin embargo, hasta la fecha se conoce sólo un ejemplo¹⁰ de sustitución de un fluoruro alifático (Figura 6.5).

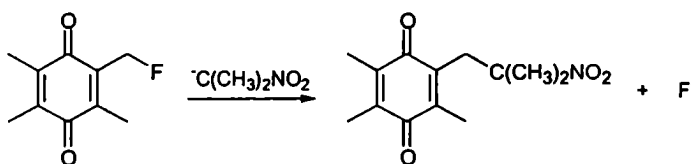
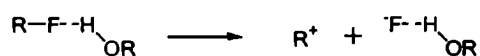


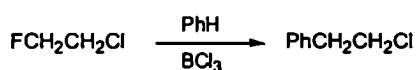
Figura 6.5. Ejemplo de S_NR1 de fluoruro (Referencia 10).

6.1.2 Efecto del solvente y catalizadores en la sustitución de fluoruro.

Es bien conocido el efecto que tiene la solvatación sobre la velocidad de las reacciones de sustitución de fluoruro. El anión fluoruro forma enlaces de hidrógeno muy fuertes, por lo tanto, al incrementarse la capacidad de un solvente de actuar como dador de estos enlaces, se favorece la heterólisis del enlace C-F, aumentando la reactividad relativa de los fluoruros comparados con otros halogenuros.



Por otro lado, la velocidad de la sustitución puede verse incrementada, también, por la catálisis de ciertos ácidos de Lewis, como AlCl₃ y BCl₃. La energía del enlace Al-F o B-F parece ser la fuerza que impulsa la ruptura del enlace C-F.^{5, 11}



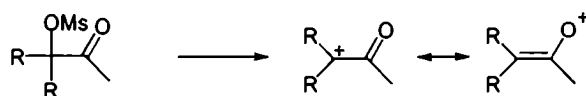
6.2. POSIBLES MECANISMOS PARA LA SUSTITUCIÓN OBSERVADA EN EL COMPUESTO 62.

En base a los antecedentes presentados, cabe preguntarse cuál es el mecanismo más probable para la sustitución en el compuesto **62**, que dio origen al compuesto **63**.

Parece poco factible una sustitución que involucre un mecanismo radicalario, pues implicaría la cesión de un electrón por parte del metóxido, un dador pobre de electrones. Cabe pensar, entonces, en un ataque nucleofílico sobre el carbono.

La estereoquímica de la sustitución (retención de la configuración del C-5), sugiere un mecanismo unimolecular, pues el ataque del nucleófilo ocurriría por la cara α , más accesible, del carbocatión formado.

Generalmente se admite que es poco probable un α -oxo carbocatión. Sin embargo, Creary demostró¹² que la solvólisis de α -oxo mesilatos terciarios se produce a través de un mecanismo S_N1 . Aparentemente el efecto inductivo atractor de electrones del carbonilo, se compensa, en parte, con una estabilización por resonancia. De esta manera, tales carbocationes serían tan estables como un carbocatión secundario.



Como se discutió anteriormente, la formación de tal carbocatión, por heterólisis del enlace C-F, se encontraría favorecida en un solvente dador de enlaces hidrógeno, como el metanol empleado en esta reacción.

Sin embargo, el tratamiento del 3 β -alcohol **59**, en las mismas condiciones de la hidrólisis de **62**, condujo al alcohol **60**, con buen rendimiento. En la Figura 6.6 se muestra esa situación en la cual, en las mismas condiciones de hidrólisis, el flúor en C-5 se retiene en el producto, o se sustituye, dependiendo de la configuración del acetato.

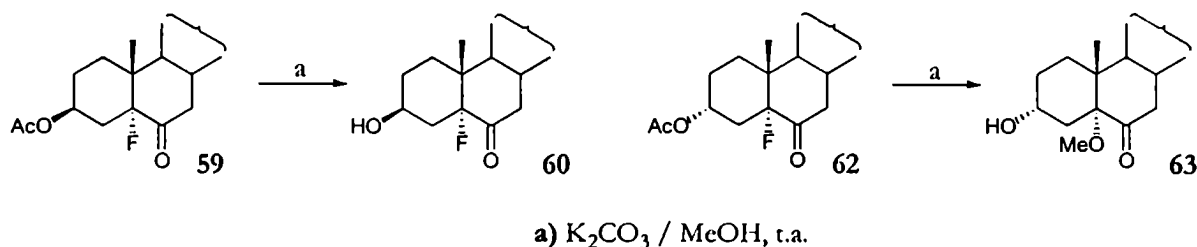


Figura 6.6. Sustratos similares conducen a distintos productos

Esta reactividad diferencial sugiere un papel para el sustituyente en C-3 en el mecanismo de la reacción.

Planteamos, entonces, una hipótesis que intenta explicar la aparente participación del hidroxilo en C-3.

En las condiciones empleadas ocurriría, en primer lugar, la hidrólisis del 3 α -acetato, el hidroxilo libre resultante formaría un enlace de hidrógeno con el flúor en C-5. El enlace de hidrógeno intramolecular produciría, de esta manera, el mismo efecto que el postulado en la literatura para las moléculas de un solvente prótico, favoreciendo la heterólisis del enlace C-F y la formación de un intermediario carbocaciónico, que sufriría el posterior ataque por parte del metanol presente en el medio. (Figura 6.7).

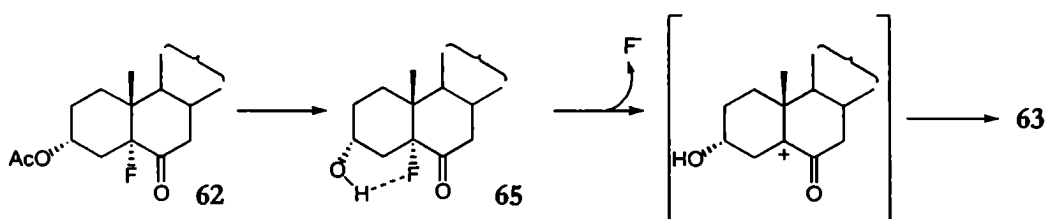


Figura 6.7. Un enlace de hidrógeno intramolecular con el OH de C-3 sería responsable de la reactividad del fluoruro en C-5.

Esta propuesta se sustenta en algunos hechos experimentales adicionales:

Durante la hidrólisis del compuesto **62** se detectó, mediante cromatografía gaseosa – espectrometría de masas, la formación, y posterior desaparición, de una pequeña cantidad del alcohol **65**, supuesto intermediario.

Al tratar el alcohol **65**, obtenido de manera diferente (Sección 5.5.2), en las mismas condiciones de reacción (KHCO_3 / MeOH), se observó la rápida transformación del mismo en el producto de sustitución **63**. Es interesante destacar que la conversión total del acetato **62** en el compuesto **63** necesitó aproximadamente 5 horas, mientras que la conversión de **65** en **63** se completó en 10 minutos (Figura 6.8).

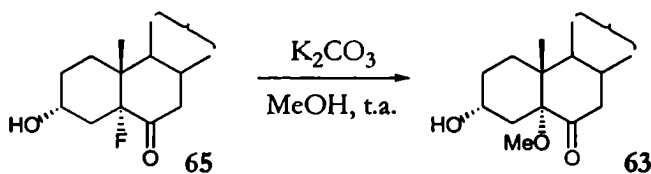


Figura 6.8. Sustitución del fluoruro por metoxilo sobre el alcohol **65**.

Este mecanismo sencillo no explica el hecho de que la hidrólisis del 3 α -formiato **64**, en condiciones menos básicas, conduce, exclusivamente, al alcohol **65** (Figura 5.23). Esta situación muestra una aparente dependencia de la sustitución con la concentración de metóxido, característica de una sustitución bimolecular. Es posible que el mecanismo sea más complejo que el presentado, su elucidación completa requerirá aún mayor estudio. Sin embargo, resulta interesante analizar la factibilidad de la formación del enlace de hidrógeno intramolecular planteado en la Figura 6.7.

6.3 EL FLÚOR COMO ACEPTOR DE ENLACES DE HIDRÓGENO.

Es un hecho demostrado la capacidad del ión fluoruro y del fluoruro de hidrógeno de actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno¹³, y se admite que lo mismo es sucede con un flúor unido a carbono.

Sin embargo, esta afirmación ha sido recientemente puesta en duda¹⁴ por Howard y colaboradores: la mayor electronegatividad y menor polarizabilidad del flúor frente al oxígeno anularía la participación del flúor orgánico en este tipo de enlaces. Estos autores analizaron las estructuras de rayos X de 1163 compuestos organofluorados y encontraron que en sólo un caso la distancia C-F...H-X es compatible con un enlace de hidrógeno.

Resulta interesante, entonces, analizar, mediante métodos teóricos y experimentales, la posible formación de un enlace de hidrógeno intramolecular en el esteroide **65**, como origen de la reactividad observada para el flúor.

6.3.1. MÉTODOS TEÓRICOS.

Dado el tamaño de la molécula en cuestión, para poder efectuar los cálculos con un costo computacional aceptable, se estudió una subestructura del esteroide formada por los anillos A, B y C, considerando que sería un modelo adecuado para representar al compuesto **65**.

En primer lugar se realizó una búsqueda conformacional a un nivel HF/3-21G(d), tomando como variable la orientación del hidroxilo de C-3 con respecto al resto de la molécula. Se hallaron dos estructuras que demostraron, mediante un análisis de sus modos normales de vibración, ser mínimos energéticos.

Estas estructuras fueron los puntos de partida para una optimización a un nivel B3LYP/6-31G(d,p), adecuado para obtener geometrías confiables. Todos los cálculos se efectuaron con el programa Gaussian 98W.¹⁵ Las conformaciones halladas se muestran en la Figura 6.9.

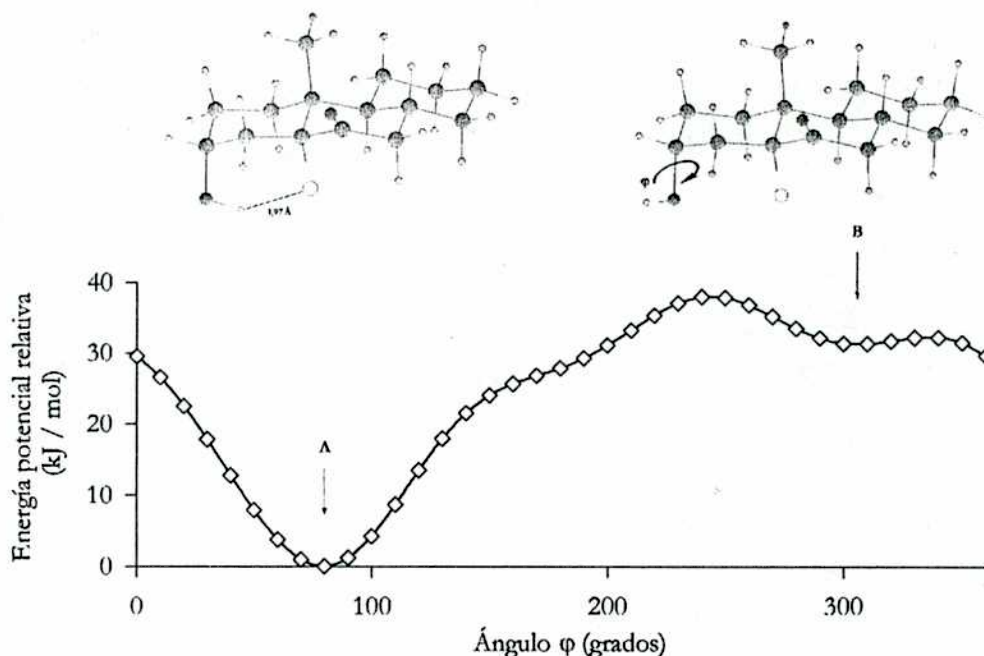


Figura 6.9. Energía potencial en función del ángulo diedro ϕ .

La curva se calculó a un nivel HF /3-21G(d). Las conformaciones de mínima energía se optimizaron a un nivel B3LYP/6-31G(d,p)

Puede verse que, en la conformación A, más estable, la distancia entre el hidrógeno del hidroxilo y el átomo de flúor es de 1,97 Å del flúor, menor que la suma de sus respectivos radios de van der Waals (2,67 Å), lo que se considera un buen indicio de la existencia de un enlace de hidrógeno. El hidroxilo y el flúor forman, además, junto con los carbonos 3, 4 y 5, un anillo de seis miembros, conformación energéticamente favorable.

En un intento por demostrar de manera más estricta la existencia del enlace de hidrógeno, decidimos aplicar a este caso la teoría de “átomos en moléculas” (AIM).

La teoría de “átomos en moléculas”, desarrollada por R. Bader¹⁶, es un formalismo que, a partir de un análisis topológico de la densidad electrónica de una molécula $\rho(\mathbf{r})$, define características tales como cargas atómicas o enlaces entre átomos.

En el marco de esta teoría, los átomos son regiones del espacio delimitadas en función del gradiente de la densidad electrónica $\nabla\rho(\mathbf{r})$. Los átomos definidos de esta manera son entidades cuánticas independientes, y las propiedades calculadas para ellos son observables físicas bien definidas. El núcleo de un átomo se caracteriza por ser un máximo local de $\rho(\mathbf{r})$. Cuando dos átomos interactúan entre sí, existe un punto $\mathbf{r}_{pc}$ sobre la línea que une a los núcleos donde $\nabla\rho(\mathbf{r}_{pc}) = 0$, es decir, la densidad de carga presenta un punto crítico: se habla entonces de un *punto crítico de enlace*, condición

que indica la existencia de un enlace entre los átomos.

La teoría predice, además, una relación entre la naturaleza de la interacción y el laplaciano de la densidad de carga en el punto crítico de enlace $\nabla^2\rho(\mathbf{r}_{pc})$: si el enlace es covalente, el laplaciano de $\rho(\mathbf{r})$ en el punto crítico es negativo, mientras que las interacciones electrostáticas están caracterizadas por un valor positivo de $\nabla^2\rho(\mathbf{r}_{pc})$.

La teoría de AIM se ha utilizado ampliamente en el estudio teórico de complejos unidos por enlaces de hidrógeno^{17,18} por lo que en este trabajo se tomó la estructura de la conformación Λ , previamente optimizada, y se calculó la densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ a un nivel B3LYP/6-311+G(d,p). La inclusión de funciones difusas y de polarización en la base empleada es necesaria para obtener una descripción precisa de la función de onda electrónica. Se hallaron luego los puntos críticos de la densidad electrónica, y se determinó el valor del laplaciano en ellos.

Los resultados demuestran que la densidad electrónica presenta, además de los esperados para cada uno de los enlaces covalentes de la molécula, un punto crítico de enlace en la línea que conecta al hidrógeno del hidroxilo de C-3 con el flúor. En este punto, la densidad electrónica es aproximadamente 10 veces menor que la correspondiente a un enlaces covalentes típico (0,02 electrones / bohr³ versus 0,2 electrones / bohr³), compatible con una interacción relativamente débil.

Además, el laplaciano de $\rho(\mathbf{r})$ en ese punto es positivo (0,086 electrones / bohr³). Esto indica que, al menos en teoría, existe un enlace formal entre los dos átomos, y que el mismo presenta las características de una interacción electrostática, típica de los enlaces de hidrógeno.

Por otro lado, se estimó la diferencia de energía libre entre las estructuras halladas, y la constante del equilibrio entre las dos conformaciones.



Los cálculos predicen que la conformación preferencial es la Λ , y que la proporción de moléculas con un enlace de hidrógeno intramolecular, frente a las que poseen el hidroxilo libre, es aproximadamente 1400 a 1 (Tabla 6.1).

Sin embargo, debe recordarse que, en los cálculos efectuados, las moléculas se representan en el vacío, sin interacciones con el medio. Para evaluar la influencia del solvente sobre el equilibrio, se calculó la energía libre de solvatación para cada conformación, mediante el método COSMO, en dos solventes distintos.

Si bien estos valores son una aproximación, se obtienen tendencias interesantes:

la solvatación estabiliza en mayor medida a la conformación B, pues el hidroxilo puede interactuar mejor con el solvente. De esta manera, disminuye la proporción relativa del conformero A frente al B.

este efecto es más pronunciado cuanto mayor es la polaridad del solvente.

	ΔG (vacío)	ΔG Solv (CCl_4)	ΔG (CCl_4)	ΔG Solv (MeOH)	ΔG (MeOH)
CONFORMACIÓN A	-18,0	-7,5	-12,6	-52,8	-3,4
CONFORMACIÓN B		-13,0		-67,5	
	K_{eq} (vacío)		K_{eq} (CCl_4)		K_{eq} (MeOH)
	1437,5		160,0		3,9

Tabla 6.1. Efecto de la solvatación sobre el equilibrio entre las dos conformaciones estables. Los valores de energía libre están expresados en kJ / mol.

Puede concluirse que, teóricamente, es posible la existencia del enlace de hidrógeno propuesto, y que el mismo puede estar presente en metanol, solvente donde ocurrió la sustitución del flúor.

Decidimos realizar, luego, un análisis similar sobre el diol **55** (Figura 5.9), a fin de validar las metodologías empleadas. En este caso es razonable plantear la formación de un enlace de hidrógeno entre los hidroxilos de C-3 y C-5.

Se realizó una búsqueda conformacional, considerando como variables las posiciones relativa de ambos hidroxilos, y se hallaron cuatro conformaciones de mínima energía (Figura 6.10).

A juzgar por las distancias OH-OH, en todas ellas parece haber un enlace de hidrógeno intramolecular.

Se optimizó la conformación A a un nivel más alto de teoría, y, al aplicar la teoría AIM, se encontró la existencia de un enlace de hidrógeno, de naturaleza electrostática ($\nabla^2\rho(r_{pe}) = 0,01$ electrones / bohr³), entre los hidroxilos del C-3 y el C-5. Aunque el cálculo no se repitió para las demás conformaciones, son de esperar resultados similares.

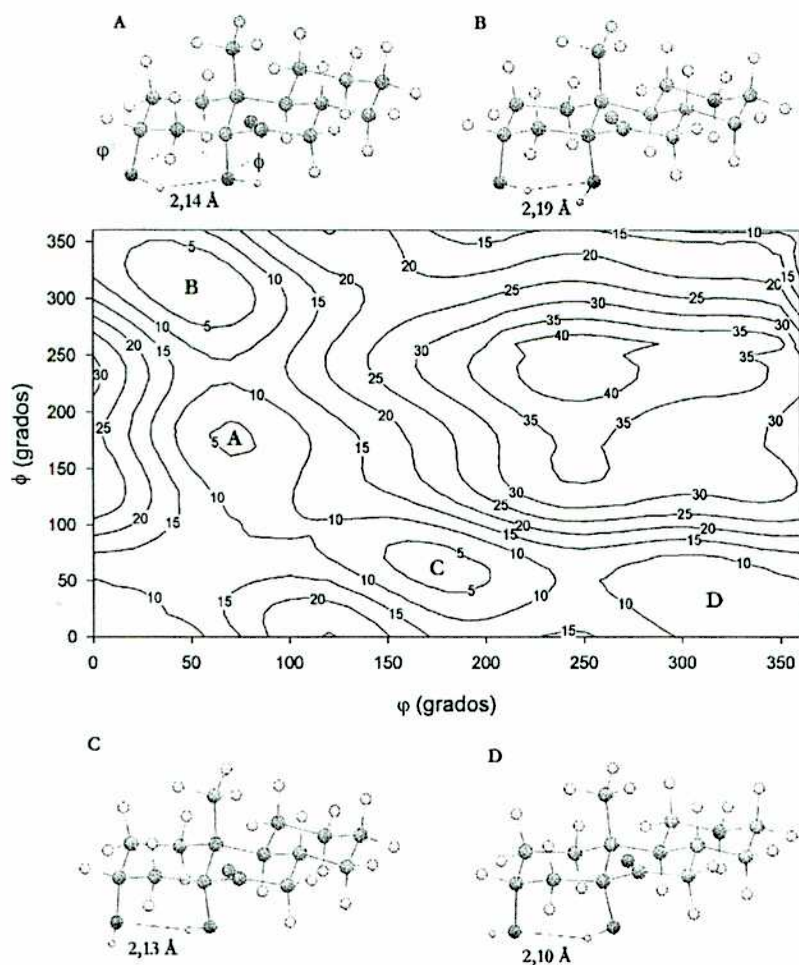


Figura 6.10. Contornos de nivel de energía potencial relativa (en kJ / mol), en función de los ángulos diedros ϕ y ϕ . El gráfico se construyó a un nivel HF / 3-21G(d). Se muestran las estructuras de los cuatro mínimos hallados (A-D) optimizados a un nivel B3LYP / 6-31G(d,p).

6.3.2. EVIDENCIA EXPERIMENTAL

En la sección anterior se demostró que, en teoría, es posible la formación de un enlace intramolecular entre el hidroxilo y el flúor en el compuesto **65**. Nos preguntamos, entonces, si existía alguna evidencia experimental directa que confirmara el análisis anterior.

Un método muy empleado para obtener este tipo de información es la espectroscopía de absorción infrarroja. Es sabido que la formación de enlaces de hidrógeno puede modificar la frecuencia de las vibraciones moleculares.¹⁹ En particular, la frecuencia de estiramiento O-H se desplaza a mayores longitudes de onda si el hidroxilo se encuentra asociado.

Se obtuvieron, entonces, los espectros IR de los compuestos **65** y **55** en solución de tetracloruro de carbono, solvente empleado en estos casos para favorecer la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, y a varias concentraciones.

Los espectros pueden verse en la Figura 6.11.

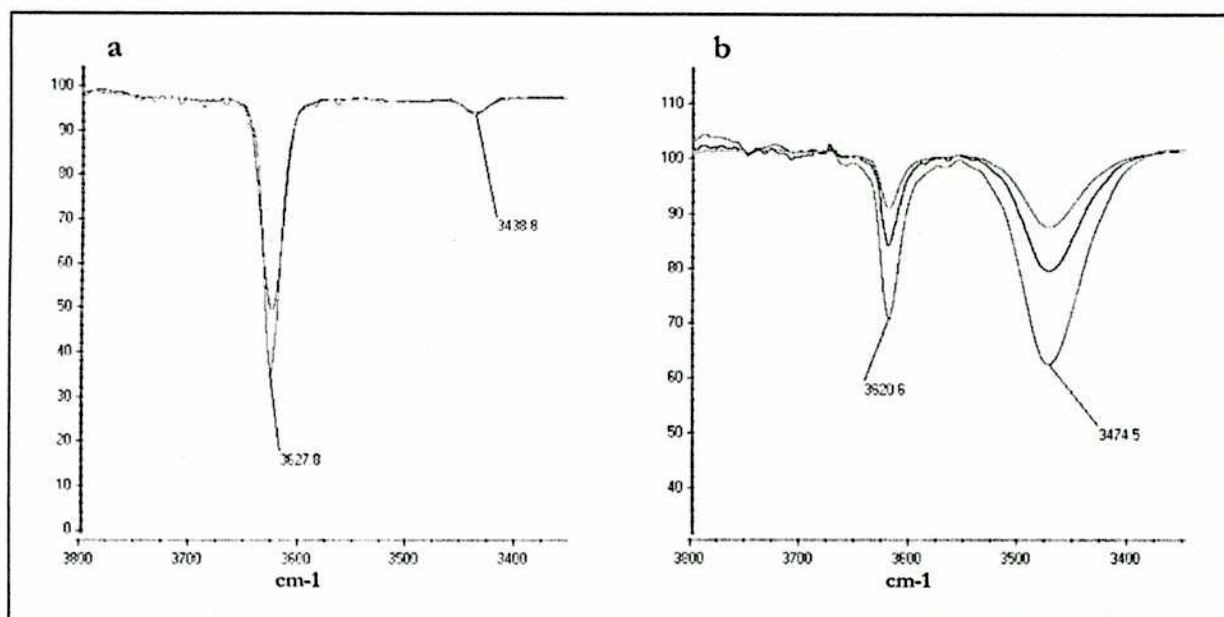


Figura 6.11. Espectros IR de los compuestos **65** (a) y **55** (b) en CCl_4 , a distintas diluciones.

En el espectro del compuesto **55** (Figura 6.11.b) pueden observarse dos bandas de intensidad comparables, con máximos en 3475 y 3620 cm^{-1} , siendo esta última más aguda. Se sabe que tanto un 3 α -hidroxilo como un 5 α -hidroxilo no asociados, aparecen como bandas agudas en la zona de 3600 - 3630 cm^{-1} . La banda más ancha, observada a mayores longitudes de onda, puede asignarse, entonces, a un hidroxilo participando de un enlace de hidrógeno. La intensidad relativa de las bandas no se modifica con la dilución, lo que sugiere una asociación intramolecular. Debe recordarse que los modelos teóricos predicen que, a temperatura ambiente, todas las conformaciones preferenciales de **55** presentan un hidroxilo libre y otro asociado. Este resultado, y su interpretación, son compatibles con el trabajo clásico de Kuhn sobre enlaces de hidrógeno intramoleculares en ciclohexanodiolos.²⁰

Por otro lado, en el espectro de **65** (Figura 6.11.a) aparece una banda aguda en 3628 cm^{-1} , y otra, mucho menos intensa, en 3441 cm^{-1} .

La primera de ellas puede asignarse al 3 α -hidroxilo libre, mientras que la segunda, por analogía con el caso anterior, es compatible con un hidroxilo asociado. La independencia de la intensidad relativa con la concentración indica, nuevamente, el carácter intramolecular de la unión. Los cálculos demostraron que sólo una fracción de las moléculas de **65** presenta un OH unido por un enlace de H con el flúor, el espectro IR parece contener, entonces, señales de los dos conformeros. (Figura 6.12).

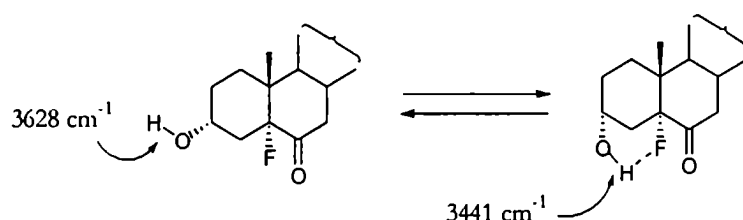


Figura 6.12. El espectro IR del compuesto **65** presenta señales de los dos conformeros.

6.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se describieron estudios preliminares que indican la posibilidad de que en el compuesto **65** se forme, entre el hidroxilo en C-3 y el flúor en C-5, un enlace de hidrógeno intramolecular.

La evidencia más directa proviene de los espectros IR, que pueden interpretarse a partir de los modelos teóricos empleados. Este resultado es interesante en sí mismo, puesto que, aunque habitualmente se admite que el flúor unido a carbono puede participar de este tipo de enlaces, se han publicado muy pocos ejemplos inequívocos al respecto. Más aún, existen varios estudios que van en contra de esta posibilidad.

Recientemente, un trabajo teórico de Richardson y colaboradores²¹, predice que estos enlaces se formarían sólo si la geometría del sistema es la óptima para que haya un contacto cercano entre el flúor y el grupo dador. En nuestro ejemplo, la restricción conformacional dada por la rigidez del esqueleto esteroideal, podría contribuir a la estabilidad de este enlace.

Por otro lado, este enlace podría ser responsable de la reactividad poco habitual observada para el flúor, resultado notable si se considera que la sustitución nucleofílica parece transcurrir por un mecanismo unimolecular, con formación de un α -oxo cabocación.

A la luz de estos resultados resulta posible, también, explicar la formación, durante la síntesis del análogo **49**, del compuesto 5 α -hidroxilado **44** (Figura 5.25). Se sabe que, frente a una dihidroxilación, el doble enlace Δ^2 es más reactivo que el Δ^{22} . Durante la dihidroxilación de la dienona **67**, se forma primero el intermediario **68**. Si es correcta la hipótesis presentada en este capítulo, el hidroxilo en C-3 podría aumentar la reactividad del flúor en C-5, promoviendo la solvolisis por el agua presente en la reacción (el *t*-butanol, cosolvente en la reacción de Sharpless, es mucho menos nucleofílico) (Figura 6.13)

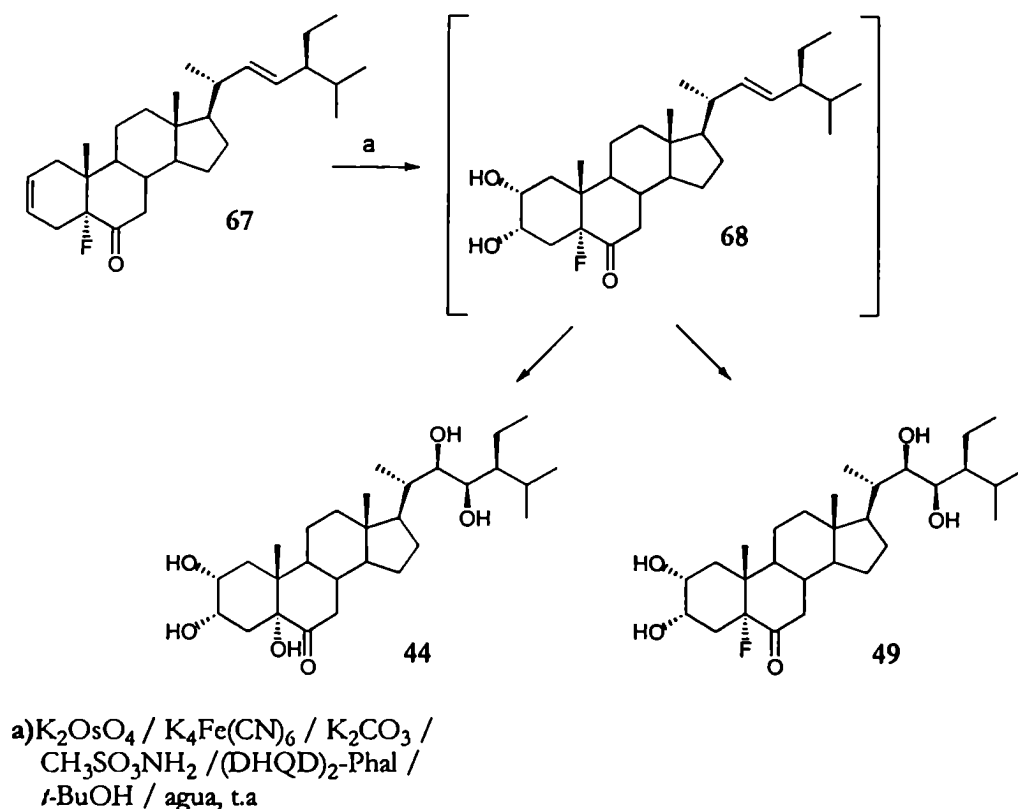


Figura 6.13. Formación del compuesto 44 a partir del intermediario 68.

Resulta interesante notar, sin embargo, que la reacción de sustitución, en este caso, no se completa, incluso luego de varios días. Es posible que la naturaleza heterogénea de la dihidroxilación (en contraste con la reacción homogénea en la que se solvolyza 62) tenga relación con las diferencias encontradas. La confirmación de estas conjeturas requerirá aún mayor estudio.

6.5. REFERENCIAS.

- 1 Bèguè, Charpentier-Morize. α -Acylcarbenium ions. *Acc. Chem. Res.* 13, 207 (1980).
- 2 Dmowski W. Nucleophilic reactions of fluoroolefins. Reactions of 1-phenylpentafluoropropene with lithium aluminium hydride. *J. Fluorine Chem.* 29, 273 (1985).
- 3 Koch H. Kielbania A. Nucleophilic reactions of fluoroolefins. Evidence for a carbanion intermediate in vinyl and allyl displacement reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 729 (1970).

- 4 Vlasov V. Fluoride ion as a nucleophile and a leaving group in aromatic nucleophilic substitution reactions. *J. Fluorine Chem.* 61, 193 (1993).
- 5 Chambers R. Fluorine in Organic Chemistry. Wiley-Interscience. U.K. (1974).
- 6 Swain C., Spalding R., Mechanism of acid catalysis of the hydrolysis of benzyl fluoride. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 6104 (1960).
- 7 Toteva M., Richard J., Hydrogen bonding and catalysis of solvolysis of 4-methoxybenzyl fluoride. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 9798 (2002).
- 8 Ernholz I., Bols M. Synthetic studies of fluorinated analogues of 1-azafagomines: remarkable nucleophilic substitution of fluorine for hydrazine. *Tetrahedron* 53, 9357 (1997).
- 9 Rossi R., Pierini A., Peñéñory A. Nucleophilic substitution by electron transfer. *Chem. Rev.* 103, 71 (2003).
- 10 Crozet M., Giraud L., Sabuco J-F., Vanelle P. Fluoride as leaving group in S_N1 reactions of a tetrasubstituted-1,4-benzoquinone. *Tetrahedron Lett.* 33, 1064 (1992).
- 11 Ooi T., Uraguchi D., Kagoshima N., Maruoka K. Organoaluminium-catalyzed new alkylation of *tert*-alkyl fluorides: Synthetic utility of Al-F interaction. *Tetrahedron Lett.* 38, 5679 (1997).
- 12 Creary X. Competing, *kc*, borderline *ks*, and carbonyl addition processes in solvolyses of α -keto mesylates and triflates. α -Keto cations. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 5568 (1984).
- 13 Gutowsky H., Chuang C., Keen J., Klots T., Emmilson R. Microwave rotational spectra, hyperfine interactions, and structure of hydrogen fluoride dimers. *J. Chem Phys.* 83, 2070 (1985).
- 14 Howard J., Hoy V., O'Hagan D., Smith G. How good is fluorine as a hydrogen bond acceptor?. *Tetrahedron* 52, 12613 (1996).
- 15 Gaussian 98, Revision A.7, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V.

Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, y J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, (1998).

16 Bader R. F. Atoms in Molecules: A quantum theory. Clarendon Press, Oxford (1994).

17 Schiott B., Iversen B., Madsen G., Bruice T. Characterization of the short strong hydrogen bond in benzoylacetone by ab initio calculations and accurate diffraction experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12117, 1998.

18 Arnold W., Oldfield E., The chemical nature of hydrogen bonding in proteins via NMR: J-couplings, chemical shift, and AIM theory. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12835, 2000.

19 Pimentel G., Mac Clellan A. The hydrogen bond. Freeman Publisher, San Francisco (1960).

20 Kuhn L. The hydrogen bond. Intra- and intermolecular hydrogen bond in alcohols. *J. Am Chem. Soc.* 74, 2492 (1952).

21 Richardson A., Hedberg K. Conformational analysis: a gas phase electron-diffraction and ab-initio molecular orbital investigation of 3-fluoropropan-1-ol. Is there a significant internal hydrogen bonding? *J. Mol. Struct.* 567 187 (2001).

CAPÍTULO 7

CONSIDERACIONES FINALES

En este capítulo presentaremos una revisión de algunos resultados destacados de esta tesis sobre la bioactividad particular de los compuestos sintetizados.

LA BIOSÍNTESIS DEL HBL PARECE SER SIMILAR A LA DEL BL.

El 28-homobrassinólido (HBL) es el brassinosteroide natural de C_{29} más activo, que, aunque minoritario en fuentes vegetales, es muy utilizado en investigaciones de laboratorio y agronómicas, debido a su accesibilidad sintética. A diferencia del BL (ver Sección 1.3), no se conoce fehacientemente su origen biosintético, por lo que en esta tesis se han realizado algunos estudios al respecto.

En el Capítulo 2 se ha presentado una nueva síntesis para el HBL y para los otros tres 28-homoBRs naturales conocidos: HCS, HTY y HTE. Estos compuestos serían precursores biosintéticos inmediatos anteriores del HBL, en una ruta similar a la del BL. Esta conclusión se basa en el orden relativo de actividad que estos compuestos presentaron en los distintos bioensayos efectuados, situación análoga a la reportada por numerosos investigadores para el caso de los BRs de C_{28} . En la Figura 8.1 se muestra la biosíntesis tentativa para los BRs de C_{29} , que partiría de sitosterol.

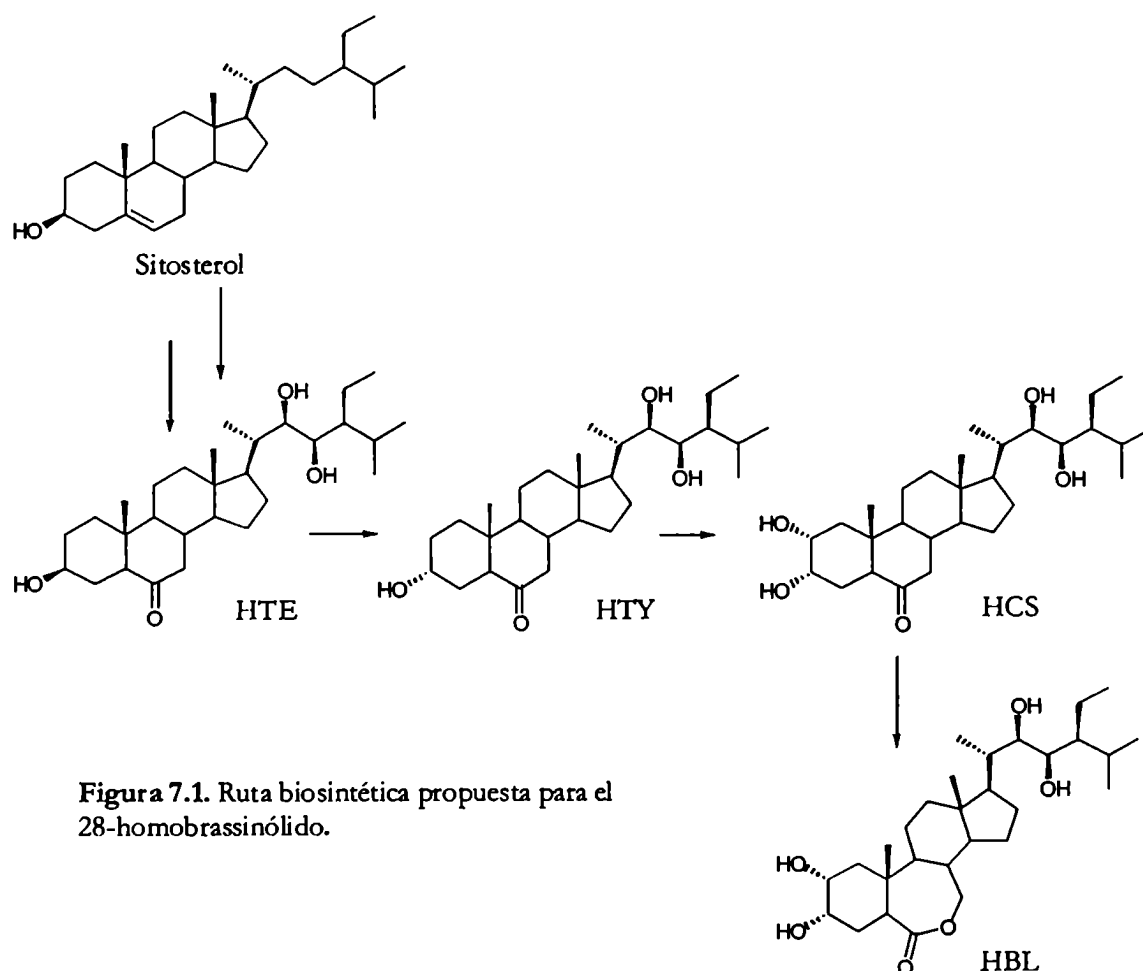


Figura 7.1. Ruta biosintética propuesta para el 28-homobrassinólido.

Considerando esta analogía entre los BRs de C_{28} y C_{29} , es factible postular, también, una ruta de oxidación tardía del C-6 (Figura 8.2). En el Capítulo 4 se describió la síntesis de los compuestos **36** y **37**, posibles integrantes de esta ruta biosintética alternativa. Si bien estos compuestos no han sido hallados en fuentes naturales, aún no puede descartarse su existencia en los vegetales.

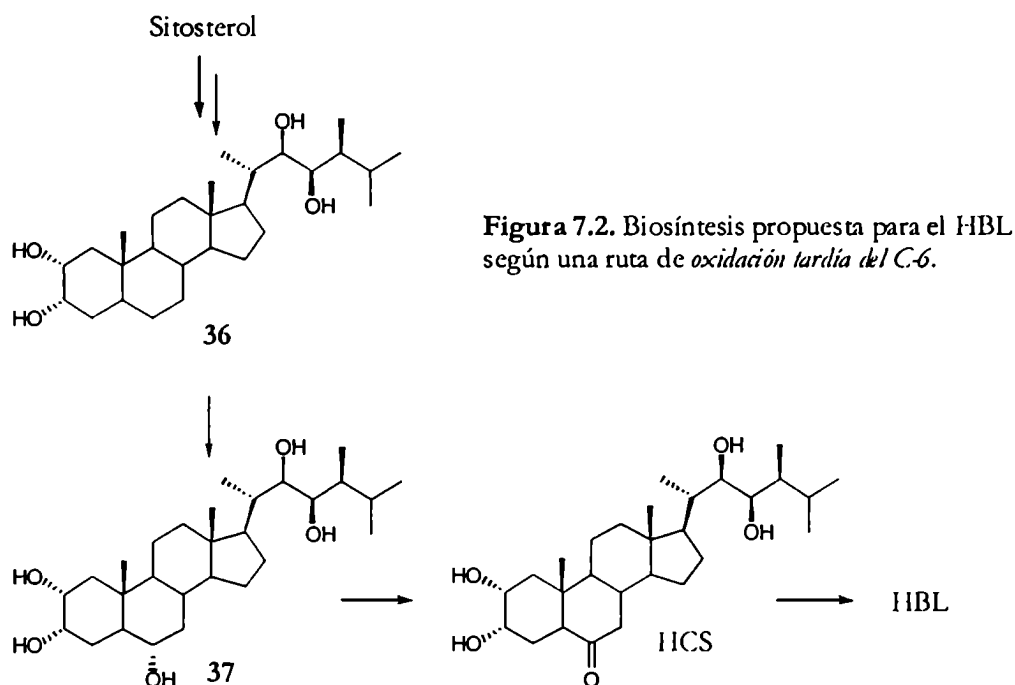


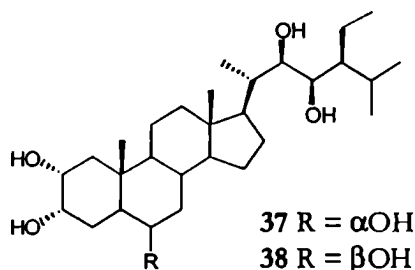
Figura 7.2. Biosíntesis propuesta para el HBL según una ruta de oxidación tardía del C-6.

En los Capítulos 2 y 4 hemos mostrado que la actividad relativa de estos compuestos, en el ensayo II.A, aumenta según el orden que cada uno ocupa en las rutas propuestas, es decir $HBL > HCS > HTY > HTE$ y $HBL > HCS > 37 > 36$.

Recientemente, el Dr. Ladislav Kohout del Instituto de Química Orgánica y Bioquímica de la Academia de Ciencias de la República Checa, evaluó la bioactividad de nuestros compuestos en el ensayo de Elongación del Segundo Entrenado del Poroto (ESEP), y encontró la misma tendencia. Los investigadores que establecieron el orden de actividad de los precursores biosintéticos para la serie de BRs de C_{28} , asumieron la idea implícita de que sólo el producto final (BL) es activo, y, por lo tanto, que la actividad medida para los precursores, en un bioensayo particular, se debería a la facilidad con que cada precursor puede transformarse *in vivo* en dicho producto final durante el bioensayo.

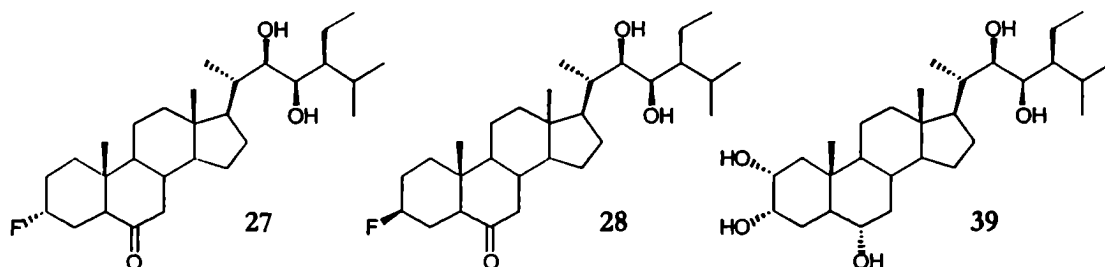
Para evaluar esta hipótesis, sobre los compuestos sintetizados por nosotros, en una segunda etapa de esta tesis decidimos obtener análogos de los posibles precursores del HBL, planteando cambios estructurales que deberían modificar la capacidad de los compuestos para participar de los procesos biosintéticos normales, con la consecuente alteración de la actividad biológica observada.

Por un lado, resulta interesante notar que el compuesto **38** presenta, en todos los bioensayos efectuados, una actividad comparable a la del precursor **37**, lo que parece indicar que la enzima encargada de generar HCS a través de la oxidación del C-6 de **37**, no tiene especificidad por la estereoquímica de esa posición.



EFFECTOS PRODUCIDOS AL FLUORAR POSICIONES QUE PARTICIPAN EN LA BIOSÍNTESIS.

Como los pasos biosintéticos implican hidroxilaciones y oxidaciones de distintas posiciones del núcleo esteroidal, obtuvimos también análogos donde se ocuparon algunas de estas posiciones por átomos de flúor. Este reemplazo no modifica sustancialmente la geometría del análogo resultante con respecto al compuesto original, pero puede alterar de manera importante sus propiedades físicas y químicas. De esta manera, se obtuvieron los compuestos **27**, **28** y **39**, donde un flúor reemplaza a los hidroxilos de C-3 de HTY y HTE, o hidroxilo de C-6 del compuesto **37**, respectivamente.



Los resultados demuestran que el efecto de la sustitución no es independiente de la estructura del resto de la molécula: mientras que el reemplazo en los compuestos HTE y **37** disminuye sustancialmente la actividad, el análogo fluorado **27** retiene, a concentraciones altas, la actividad del correspondiente compuesto natural 28-homotifasterol (HTY) (Figura 7.3).

En el caso del análogo **28**, su transformación *in vivo* en HBL por la ruta biosintética mostrada en la Figura 8.1, implica la oxidación del C-3. Es posible que la deshidrogenasa encargada de este proceso no pueda actuar sobre un carbono fluorado. Lo mismo ocurriría con la oxidasa responsable de oxidar el C-6 de **39** en la segunda vía. De esta manera, la predicción establece que los análogos resultantes deberían ser inactivos.

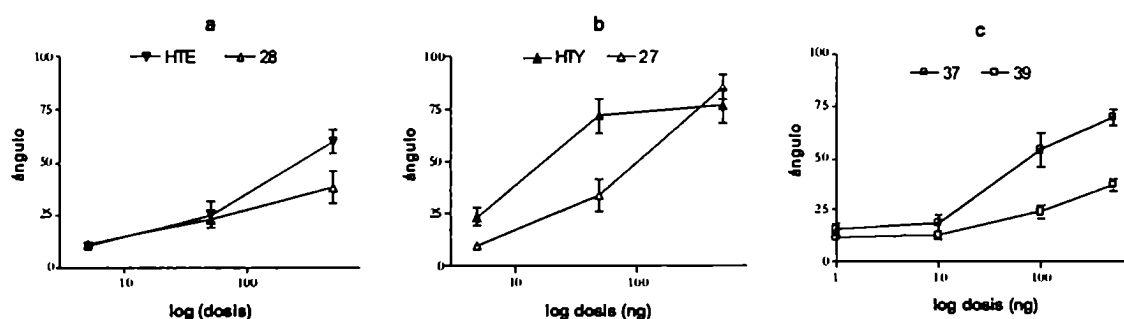


Figura 7.3. Ensayo ILA sobre análogos fluorados de precursores biosintéticos.

Sin embargo, ambos compuestos retienen parte de la actividad. Esto puede explicarse de dos maneras alternativas:

Las enzimas sí pueden transformar a los análogos fluorados en compuestos más activos, aunque a una menor velocidad que los correspondientes sustratos naturales hidroxilados. Los compuestos evaluados no pueden entrar en el camino biosintético, y la respuesta fisiológica medida se debe a una actividad *per se*, por unión directa con los receptores de HBL.

En contra de la primera explicación puede argumentarse que, en general, la alta energía del enlace C-F en fluoruros de alquilo impide la oxidación. Sin embargo, en esta tesis hemos visto ejemplos donde el flúor presenta una reactividad química notablemente alta (en reacciones de eliminación o sustitución).

La segunda explicación parece más factible, aunque lleva a una conclusión interesante: si la respuesta observada en un bioensayo se debe a una combinación de la actividad intrínseca del compuesto aplicado, y la producida por los subsecuentes productos de biotransformación, se pone en duda, de alguna manera, la utilidad de este tipo de experiencias para el desarrollo de modelos estructura – actividad.

LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS ES DEPENDIENTE DEL SISTEMA EMPLEADO PARA SU EVALUACIÓN.

Como un ejemplo, puede analizarse la actividad de los análogos sustituidos en C-5, una posición, que, ocupada por un hidrógeno en los BRs naturales, no está implicada directamente en la biosíntesis. Sin embargo, la introducción de un hidroxilo o un flúor provoca modificaciones notables en la bioactividad, entre las cuales pueden mencionarse:

En el ensayo ILA, tanto HTE como sus análogos, presentan una actividad baja y comparable. Sin embargo, en el ensayo ESEP, llevado a cabo por el Dr. Kohout, nuestros análogos sustituidos 45 y

47 resultaron significativamente más activos que el natural (Figura 8.4).

Por otro lado, en el ensayo ILA, el análogo fluorado 49 tiene una actividad comparable a la de la HCS, pero el análogo hidroxilado 44 es menos activo. En el ensayo ESEP, el compuesto fluorado es menos activo que el natural, y el hidroxilado muestra un comportamiento complejo, donde no parece haber una relación clara dosis-respuesta (Figura 8.5).

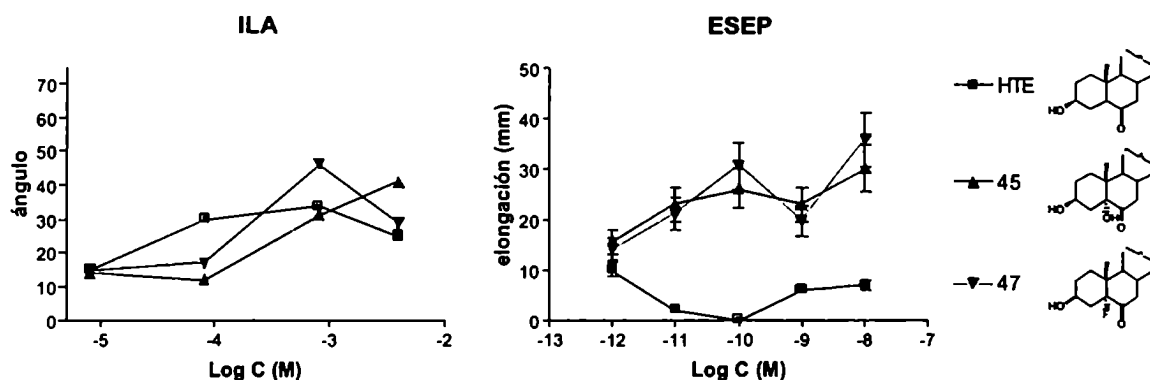


Figura 8.4. Ensayos sobre los análogos sustituidos en C-5 de HTE.

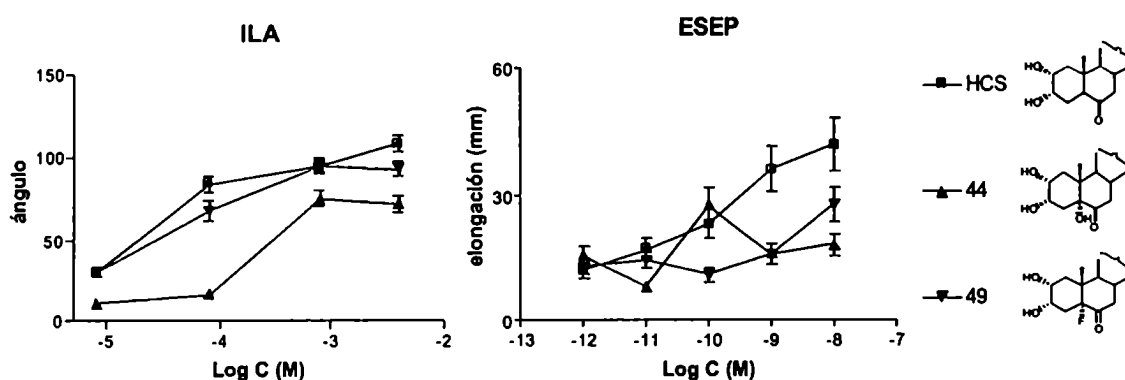


Figura 8.5. Ensayos sobre los análogos sustituidos en C-5 de HCS.

Esto demuestra que la actividad relativa es altamente dependiente del sistema biológico empleado, y por lo tanto, reafirma la idea de que es imposible obtener un modelo de relación estructura-actividad extrapolable entre distintas especies vegetales.

Este resultado puede tener consecuencias importantes: generalmente, la búsqueda de análogos de BRs apropiados para la aplicación agronómica, comienza con la evaluación de los compuestos

sintetizados en alguno de los bioensayos mencionados, especialmente el ILA, para anticipar, así, su comportamiento en cultivos.

OBTENCIÓN DE UN ANÁLOGO SINTÉTICO MÁS POTENTE QUE LOS COMPUESTOS NATURALES.

En los últimos años hemos comenzado un programa de investigación, en colaboración con el Dr. Adauto Pereira-Netto, del Departamento de Botánica de la Universidad de Paraná, en Curitiba, Brasil, sobre el uso de los BRs en técnicas de micropropagación de especies vegetales de lento crecimiento y de interés comercial.

En un estudio preliminar, se demostró que la aplicación del análogo fluorado **49** (Figura 5.25) es capaz de incrementar la tasa de reproducción de manzana (variedad marubakaido), a través de un incremento del número de brotes formados en explantes jóvenes. Notablemente, ni el análogo hidroxilado **44**, ni la HCS, el compuesto natural del que derivan, son capaces de provocar el mismo incremento. Además, el efecto sólo se observa para un rango específico de concentraciones, como se muestra en la Figura 8.6.

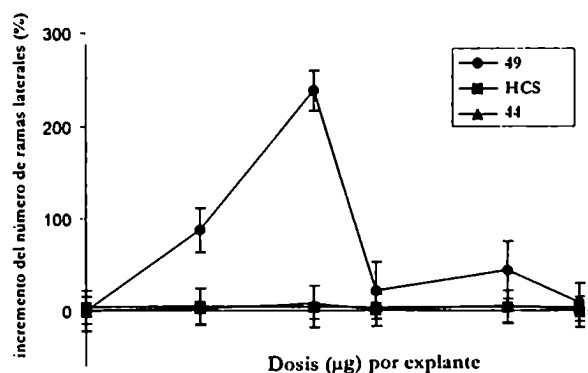


Figura 8.6. Efecto de algunos BRs sintetizados sobre la formación de brotes en experiencias de micropropagación de manzana.

Como se vio anteriormente, el análogo **49** es igual de activo que la HCS en el ensayo ILA, e incluso menos activo en el ensayo ESEP. Esto es una clara demostración de las limitaciones propias de los bioensayos como herramientas para la generalización de resultados sobre la posible utilidad de los BRs como agroquímicos.

BRASSINOSTEROIDES COMO HORMONAS VEGETALES: FACTORES A TENER EN CUENTA.

El modelo comúnmente aceptado para el modo de acción de una hormona vegetal o animal es la unión entre la hormona y un receptor, que desencadena una cascada de eventos que se traducen en una respuesta fisiológica mensurable; esa respuesta es, generalmente, dependiente de la concentración de la hormona.

Los complejos resultados obtenidos en los bioensayos con nuestros compuestos nos llevan a considerar, en primer lugar, la posible diferencia entre la concentración de hormona aplicada y la que efectivamente se halla en la biofase que contiene al receptor en cada caso. Podría ocurrir que si se agrega el compuesto a un medio de cultivo, o se incorpora a un tejido vía inoculación, se hagan importantes los factores cinéticos relacionados con el transporte a través de membranas biológicas, distintos para cada análogo estudiado. No es sencillo corregir la respuesta medida cuando se encuentra modulada por estos fenómenos desconocidos.

Por otro lado, si el número de etapas que median entre la unión hormona–receptor y la respuesta medida, es grande, pueden obtenerse relaciones dosis–respuesta cada vez más complejas. En el caso de los BRs, estas etapas apenas se conocen.

Hay otros factores a tener en cuenta, como la interacción entre los BRs y otros reguladores endógenos del crecimiento vegetal, tales como auxinas y citoquininas. Por ejemplo, la respuesta del ensayo ILA hacia los BRs se incrementa notablemente si las plántulas son tratadas previamente con ácido 3-indolacético.

Recientemente se ha encontrado que, en el tomate, el BL y la sistemina (una péptido involucrado en el mecanismo de defensa ante lesiones) comparten el mismo receptor, sin embargo, las respuestas fisiológicas provocadas por cada hormona son muy distintas.

Además, aunque no hay evidencia directa, podría haber más de un receptor de BRs en los tejidos vegetales, que desencadenarían respuestas distintas.

Por último, hay investigadores que proponen que es un error conceptual el intentar asimilar el comportamiento de las fitohormonas al de las hormonas de artrópodos y mamíferos. Hay evidencias de que la respuesta no está modulada por cambios en la concentración de hormona, sino por la sensibilidad de un tejido particular a la hormona, cuya concentración puede permanecer más o menos constante en el tiempo.

Resulta claro, entonces, que es muy difícil extraer conclusiones válidas a partir de los ensayos que utilizan sistemas biológicos complejos, sean plántulas enteras o partes de ellas. Es posible que, en el futuro, la actividad de las hormonas vegetales en general deba evaluarse mediante experimentos basados en procesos aislados, a nivel celular, o incluso molecular, donde sea más claro el mecanismo involucrado.

CAPÍTULO 8

PARTE EXPERIMENTAL

8.1. GENERALIDADES

Uso de solventes anhidros y reactivos sensibles a la humedad: los solventes utilizados fueron de calidad “para análisis” o superior, y se purificaron según métodos descriptos en bibliografía.¹ En todos los casos las reacciones con solventes o reactivos sensibles a la humedad se llevaron a cabo con material de vidrio previamente flameado y bajo atmósfera de nitrógeno o argón.

Cromatografía en placa delgada: se utilizaron cromatofolios de sílica gel F₂₅₄ de 0,20 mm de espesor, sobre soporte de aluminio (Merck). Los sistemas de solventes empleados (técnica ascendente) se indican en cada caso. El revelado se realizó por inmersión en solución de H₂SO₄ 5% (v/v) en etanol, y posterior calentamiento, o por inmersión en una solución 0,04 M de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 3 mM de Ce(SO₄)₂ en H₂SO₄-H₂O (9:1), y posterior calentamiento.

Cromatografía en columna: se utilizó sílica gel 60 de malla 230-400 (Merck). Los solventes de elución se indican en cada caso.

Puntos de fusión: se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Resonancia magnética nuclear: los espectros de RMN se adquirieron con espectrómetros Bruker AC-200 (Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA, a 200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C), Bruker AM-500 (LANAIS RMN-500, CONICET, a 500 MHz para ¹H, 125 MHz para ¹³C y 470 MHz para ¹⁹F) o Bruker Avance (Menarini Ricerche SPA, Roma, Italia, a 376 MHz para ¹⁹F). Se utilizaron los solventes deuterados que se indican en cada caso. Los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C se indican en partes por millón (ppm) respecto de la señal de tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos de ¹⁹F se indican en partes por millón (ppm) respecto de la señal de fluorotriclorometano (CCl₃F). Los patrones de acoplamiento se consideraron de primer orden, y las constantes correspondientes se expresaron en Hz. Las señales se describen como *s* (singulete), *d* (doblete), *t* (tripleto), *q* (cuarteto), *dd* (doblete doblete), *ddd* (doblete doble doblete), *dt* (doblete tripleto), *dm* (doblete multiplete), *sa* (singulete ancho) y *m* (multiplete).

La asignación de los espectros de RMN se realizó, cuando fue posible, mediante comparación con datos publicados para compuestos estructuralmente relacionados. En otros casos fue necesario el empleo de una combinación de técnicas mono y bidimensionales: DEPT-135, correlación homonuclear (COSY-45), y correlación heteronuclear (HETCOR).

Espectrometría de masa: Se utilizaron técnicas de ionización impacto electrónico (IE) e ionización por bombardeo de átomos rápidos (FAB). Los espectros IE de baja resolución se adquirieron en espectrómetros VG TRIO2 o Shimadzu QP5050 (LANAIS-EMAR, CONICET) a 70 eV. Los

espectros FAB se adquirieron en un espectrómetro VG ZAB-E (Mass Spectrometry Resource, Washington University, St. Louis, USA) con un potencial de aceleración de 8 kV. Se utilizaron NOBA, 3NBA-Li o NBA-Na como matrices, y la ionización se realizó por bombardeo de átomos de Xe o de Cs. Los espectros de masa de alta resolución se adquirieron en un espectrómetro VG ZAB-SEQ4F (Mass Spectrometry Resource, Washington University, St. Louis, USA) con las mismas matrices de ionización.

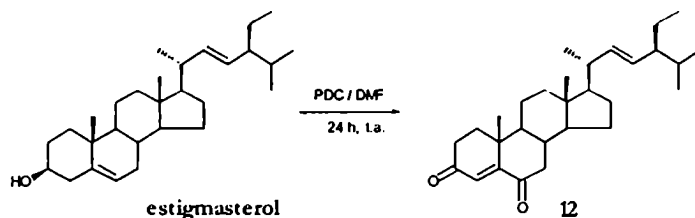
Espectroscopía IR: los espectros IR se adquirieron con un espectrómetro Nicolet Magna 550, en solución de CCl₄ (UMYMFOR - CONICET).

8.2. SÍNTESIS DE COMPUESTOS.

Las secciones siguientes describen la preparación de los análogos sintetizados, y de todos los intermediarios. Se incluye, además, la caracterización de otros compuestos obtenidos en el marco de las distintas aproximaciones sintéticas.

8.2.1. SÍNTESIS DE 28-HOMOBRASSINOSTEROIDES NATURALES (COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 2).

(22E)-estigmasta-4,22-dien-3,6-diona (12).



Se disolvieron 1,32 g (3,5 mmol) de PDC en 10 ml de DMF² anhidra, y a esta solución se agregaron 200 mg (0,5 mmol) de estigmasterol. La mezcla se mantuvo con agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte, durante 24 horas. Luego se volcó sobre 100 ml de agua y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó y evaporó. La purificación del residuo crudo por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 9:1) permitió obtener (22E)-estigmasta-4,22-dien-3,6-diona² (12) con un rendimiento del 68 %.

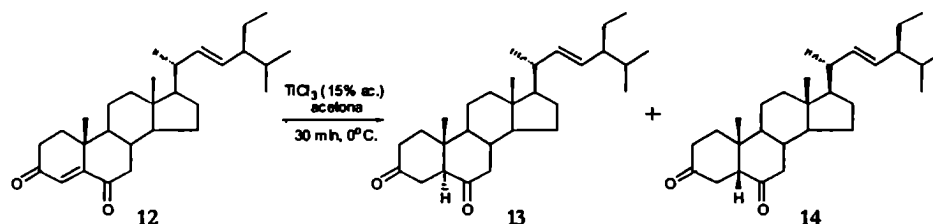
P.f. : 103 °C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,74 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,02 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,7); 1,16 (H-19, 3H, *s*); 2,45 (H-2α, 1H, *m*); 2,53 (H-2β, 1H, *m*); 2,67 (H-7β, 1H, *dd*, *J* = 15,9 y 4,1); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 6,17 (H-4, 1H, *d*, *J* = 0,8).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0 y 12,2 (C-18 y C-29); 17,5 (C-19); 19,0 (C-26); 20,9 (C-11); 21,0 y 21,1 (C-21 y C-27); 24,0 (C-15); 25,3 (C-28); 28,6 (C-16); 31,8 (C-25); 33,9 y 35,6 (C-1 y C-2); 34,2 (C-8); 39,0 (C-12); 39,8 (C-10); 40,3 (C-20); 42,4 (C-13); 46,8 (C-7); 51,0 (C-9); 51,2 (C-24); 55,8 y 56,7 (C-14 y C-17); 125,4 (C-4); 129,8 (C-23); 137,7 (C-22); 161,0 (C-5); 199,4 y 202,2 (C-3 y C-6).

EM (IE): *m/z* (int.rel.): 424 [M]⁺ (10); 381 (10); 285 (7); 284 (12); 55 (100).

(22E)-5α-estigmasta-22-en-3,6-diona (13).



Se disolvieron 200 mg (0,5 mmol) de **(22E)-estigmasta-4,22-dien-3,6-diona (12)** en 10 ml de acetona a 0°C, y se agregaron lentamente 1,5 ml de una solución acuosa al 15 % de tricloruro de titanio (1,46 mmol). Luego de 30 minutos, la mezcla se volcó sobre 100 ml de s.s. de NaCl, y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó y evaporó. Al purificar el crudo resultante por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 95:5) se obtuvo **(22E)-5α-estigmasta-22-en-3,6-diona' (13)** con un rendimiento de 89 %.

P.f. : 189°C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,69 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 0,96 (H-19, 3H, *s*); 1,02 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,7); 2,38 (H-7β, 1H, *m*); 2,40 (H-2β, 1H, *m*); 2,58 (H-4β, 1H, *m*); 2,50 (H-5α, 1H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,2; 12,2 y 12,3 (C-18, C-19 y C-29); 19,0 (C-26); 21,1 (C-11); 21,2 y 21,7 (C-21 y C-27); 24,0 (C-15); 25,4 (C-28); 28,7 (C-16); 31,8 (C-25); 37,0 (C-10); 37,4 (C-2); 38,0 (C-8); 38,1 y 39,3 (C-1 y C-12); 40,4 (C-20); 41,3 (C-4); 42,9 (C-13); 46,6 (C-7); 51,2 (C-24); 53,5 (C-9); 56,0 y 56,7 (C-14 y C-17); 57,5 (C-5); 128,7 (C-23); 137,8 (C-22); 209,2 y 211,2 (C-3 y C-6).

EM (IE): *m/z* (int.rel.): 426 [M]⁺; 383 (25); 328 (15); 313 (30); 55 (100).

La posterior elución permitió obtener **(22E)-5β-estigmasta-22-en-3,6-diona (14)**, con un rendimiento de 6 %.

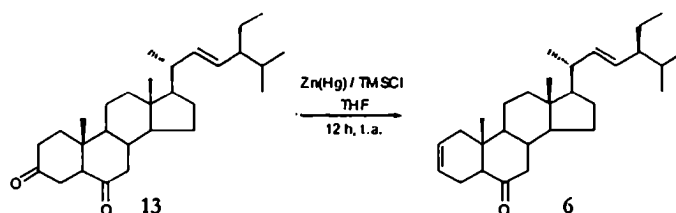
P.f. : 177-178°C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,70 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 0,96 (H-19, 3H, *s*); 1,02 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,7); 2,29 (H-7β, 1H, *m*);

2,42 (H-2 β , 1H, *m*); 2,33 (H-4 β , 1H, *m*); 2,47 (H-5 β , 1H, *m*); 2,66 (H-4 α , 1H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y $8,6$); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y $8,6$).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 12,1; y 12,3 (C-18 y C-29); 19,0 (C-26); 21,1 (C-11); 21,2 y 21,7 (C-21 y C-27); 22,5 (C-19); 23,9 (C-15); 25,4 (C-28); 28,5 (C-16); 31,8 (C-25); 35,7 (C-1); 36,5 (C-2); 36,8 (C-8); 38,3 (C-10); 39,4 (C-12); 40,0 (C-4); 40,4 (C-20); 41,0 (C-9); 42,7 (C-7); 43,1 (C-13); 51,2 (C-24); 56,0 y 56,7 (C-14 y C-17); 59,6 (C-5); 128,7 (C-23); 137,8 (C-22); 208,2 y 210,9 (C-3 y C-6). EM (IE): m/z (int.rel.): 426 [M^+]; 383 (10); 328 (22); 313 (26); 55 (100).

(22E)-5 α -Estigmasta-2,22-dien-6-ona (6).



Se disolvieron 0,42 g (1,0 mmol) de (22E)-estigmasta-4,22-dien-3,6-diona (13) en 100 ml de THF anhidro. Se agregaron 1,2 g de amalgama de zinc⁴, y 4 ml de cloruro de tetrametilsilano. La mezcla se mantuvo con agitación durante 12 horas a temperatura ambiente, bajo atmósfera inerte. Se filtró el sólido, y el solvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 98:2). Se obtuvo así (22E)-5 α -estigmasta-2,22-dien-6-ona⁴ (6) con un rendimiento de 73 %.

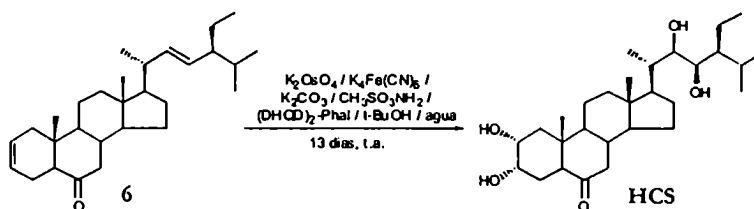
P.f.: 111-112 °C.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3): 0,69 (H-18, 3H, *s*); 0,72 (H-19, 3H, *s*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*), 5,46–5,76 (H-2 y H-3, 2H, *m*).

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): 12,2 y 12,3 (C-18 y C-29); 13,5 (C-19); 19,0 (C-26); 21,0 y 21,1 (C-21 y C-27); 21,8 y 21,8 (C-11 y C-4); 24,0 (C-15); 25,4 (C-28); 28,8 (C-16); 31,9 (C-25); 37,7 (C-8); 39,4 (C-1 y C-12); 40,1 (C-10); 40,5 (C-20); 42,7 (C-13); 47,0 (C-7); 51,3 (C-24); 53,5 y 53,9 (C-9 y C-5); 56,9 y 55,9 (C-14 y C-17); 125,0 y 124,6 (C-2 y C-3); 129,6 (C-23); 138,1 (C-23); 212,0 (C-6).

EM (IE): m/z (int.rel.): 410 [M^+] (15), 395 (44), 367 (17), 312 (9), 299 (7), 271 (16), 55 (100).

(22R,23R)-2 α ,3 α ,22,23-Tetrahidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (HCS, 28-homocastasterona).



La dihidroxilación catalítica asimétrica (cuya técnica se describirá en la sección 8.2.5) de 520 mg

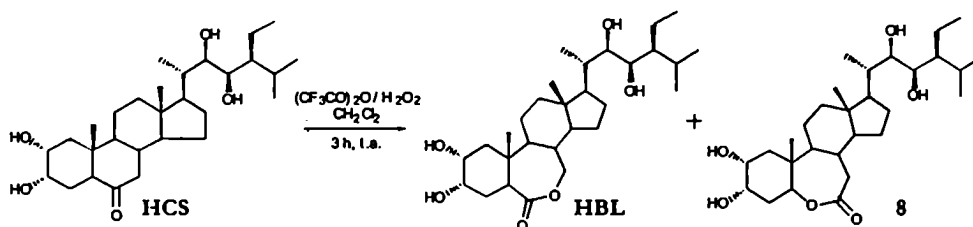
(1,17 mmol) de **(22E)-5 α -estigmastera-2,22-dien-6-ona** (**6**) permitió obtener **(22R,23R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -estigmasteran-6-ona⁶** (**28-homocasterona, HCS**) con un rendimiento de 69 %. La purificación se efectuó por medio de cromatografía en columna de sílica, con una mezcla CHCl₃ / AcCN (85:15) como solvente de elución.

P.f.: 255 - 256°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 0,70 (H-18, 3H, *s*); 0,76 (H-19, 3H, *s*); 2,71 (H-5 α , *dd*, *J* = 12,5 y 3,7), 3,58 (H-22, 1H, *d*, *J* = 9), 3,70 y 3,72 (H-2 β y H-23, 2H, *m*), 4,00 (H-3 β , 1H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 12,0 y 12,0 (C-18 y C-21); 13,6 (C-19); 13,8 (C-29); 19,1 (C-28); 19,6 (C-26); 21,3 (C-27); 21,4 (C-11); 24,0 (C-15); 26,5 (C-4); 27,7 (C-16); 29,2 (C-25); 37,1 (C-20); 38,1 (C-8); 39,7 (C-12); 40,0 (C-1); 42,9 (C-10); 43,0 (C-13); 46,7 (C-24); 46,9 (C-7); 51,1 (C-5); 52,5 (C-17); 53,9 (C-9); 56,8 (C-14); 68,2 (C-2); 68,4 (C-3); 72,6 (C-23); 74,5 (C-22); 213,9 (C-6).

(22R,23R)-2 α ,3 α ,22,23-Tetrahidroxi-B-homo-7-oxa-5 α -estigmasteran-6-ona. (HBL, 28-homobrassinólido).



A una solución de **(22R,23R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -estigmasteran-6-ona (HCS)** (210 mg, 0,4 mmol) en 10 mL de diclorometano a 0°C, se agregaron 2 ml de una mezcla 7:1 de anhídrido trifluoroacético / peróxido de hidrógeno 30% (ac). Luego de 3 horas se agregó bisulfito de sodio (s.s.) y se extrajo con AcOEt. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (CHCl₃ / AcCN 7:3), obteniéndose, en primer lugar **(22R,23R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-B-homo-7-oxa-5 α -estigmasteran-6-ona⁷** (**28-homobrassinólido, HBL**) con un rendimiento de 79%.

P.f.: 270-271°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 0,73 (H-18, 3H, *s*); 0,91 (H-19, 3H, *s*); 3,15 (H-5 α , *dd*, *J* = 12,0 y 4,5); 3,58 (H-22, 1H, *d*, *J* = 9); 3,70 y 3,72 (H-2 β y H-23, 2H, *m*); 3,96 (H-3 β , 1H, *m*); 4,11 (H-7 α , *d*, *J* = 5).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 12,0 y 12,0 (C-18 y C-21); 13,8 (C-29); 15,5 (C-19); 19,1 (C-28); 19,6 (C-26); 21,3 (C-27); 22,4 (C-11); 24,5 (C-15); 27,7 (C-16); 29,2 (C-25); 31,4 (C-4); 37,1 (C-20); 38,4 (C-10); 39,3 (C-8); 39,7 (C-12); 41,2 (C-5); 41,3 (C-1); 42,6 (C-13); 46,7 (C-24); 51,4 y 52,5 (C-14 y C-17); 58,3 (C-9); 68,0 (C-2); 68,1 (C-3); 70,8 (C-7); 72,6 (C-23); 74,5 (C-22); 177,6 (C-6).

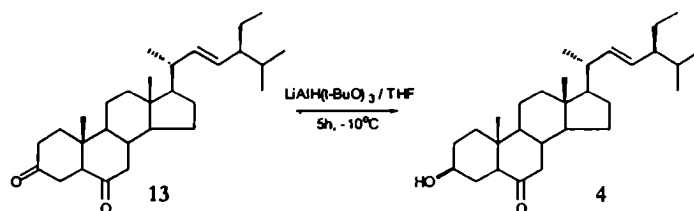
Por elución posterior se obtuvo el isómero **(22R,23R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-B-homo-6-oxa-5 α -estigmasteran-7-ona⁶** (**8**) con un rendimiento de 17 %.

P.f.: 278°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 0,71 (H-18, 3H, *s*); 0,95 (H-19, 3H, *s*); 2,50 (H-7 α , 1H, *m*); 3,59 (H-22, 1H, *d*, *J* = 9); 3,70 y 3,72 (H-2 β y H-23, 2H, *m*); 3,96 (H-3 β , 1H, *m*); 4,64 (H-5 α , *dd*, *J* = 12,1 y 5,0).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 11,7 y 11,8 (C-18 y C-21); 12,6 (C-19); 13,4 (C-29); 18,7 (C-28); 19,2 (C-26); 20,9 (C-27); 22,4 (C-11); 25,3 (C-15); 27,3 (C-16); 29,2 (C-25); 34,3 (C-4); 34,3 (C-8); 36,9 (C-20); 38,0 (C-7); 39,2 (C-1); 39,8 (C-12); 40,6 (C-10); 42,6 (C-13); 46,4 (C-24); 52,7 (C-17); 55,4 (C-14); 57,8 (C-9); 67,8 (C-2); 68,8 (C-3); 72,3 (C-23); 74,2 (C-22); 79,3 (C-5); 176,2 (C-6).

(22E)-3 β -Hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (4).



Se disolvieron 150 mg (0,37 mmol) de **(22E)-5 α -estigmast-22-en-3,6-diona (13)** en 25 ml de THF. Se agregaron 130 mg de hidruro de tri-*t*-butoxi aluminio y litio (0,5 mmol), y se mantuvo la agitación, a a -10°C, durante 5 horas. Se agregó s.s. de NaHCO₃, se evaporó el THF a presión reducida, y se extrajo el residuo acuoso con diclorometano. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica, obteniéndose **(22E)-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona' (4)** con un rendimiento de 93%.

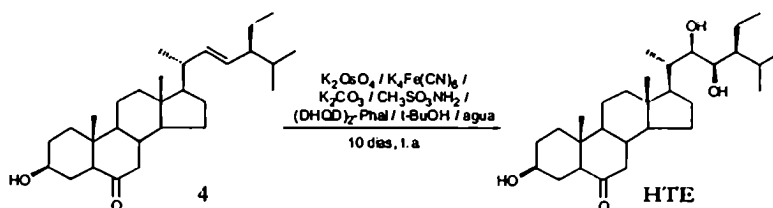
P.f.: 189-190 °C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,67 (H-18, 3H, *s*); 0,77 (H-19, 3H, *s*); 2,18 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,1 y 2,2); 2,30 (H-5 α , 1H, *dd*, *J* = 12,5 y 4,0); 3,54 (H-3 α , 1H, *m*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0 y 12,1 (C-18 y C-29); 13,2 (C-19); 18,8 (C-26); 21,1 y 20,9 (C-21 y C-27); 21,7 (C-11); 24,0 (C-15); 25,2 (C-28); 27,7 (C-16); 29,6 (C-2); 30,3 (C-25); 30,4 (C-4); 36,8 (C-1); 38,3 (C-8); 39,7 (C-12); 40,3 (C-20); 41,3 (C-10); 42,9 (C-13); 46,8 (C-7); 51,1 (C-24); 54,0 (C-9); 57,0 (C-5); 55,2 y 56,8 (C-17 y C-14); 70,2 (C-3); 129,2 (C-23); 138,2 (C-22); 212,6 (C-6).

EM (IF): *m/z* (int.rel.): 428 [M]⁺ (32); 410 (2); 286 (49); 55 (100).

(22R,23R)-3 β ,22,23-Trihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (HTE, 28-homoteasterona).



La dihidroxilación catalítica asimétrica de 210 mg (0,5 mmol) de **(22E)-3β-hidroxi-5α-estigmast-22-en-6-ona (4)** permitió obtener **(22R,23R)-3β,22,23-trihidroxi-5α-estigmast-22-en-6-ona (28-homoteasterona, HTE)⁴** con un rendimiento de 45%. La purificación se efectuó por medio de una cromatografía en columna de sílica, con una mezcla AcOEt / hexano 85:15 como solvente de elución.

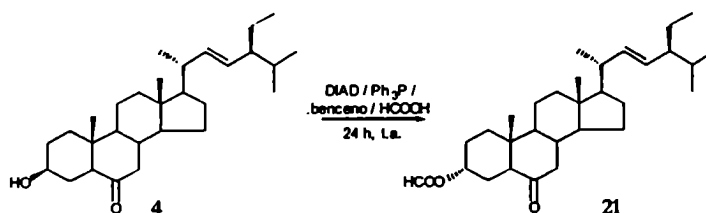
P.f.: 208-209°C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,69 (H-18, 3H, *s*); 0,76 (H-19, 3H, *s*); 2,18 (H-7α, 1H, *dd*, *J* = 12,0 y 2,2); 2,31 (H-5α, 1H, *dd*, *J* = 12,5 y 4,0); 3,52 (H-3α, 1H, *m*); 3,58 (H-22, 1H, *d*, *J* = 9); 3,72 (H-23, 1H, *d*, *J* = 9).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0 y 12,1 (C-18 y C-21); 13,3 (C-19); 13,8 (C-29); 19,1 (C-28); 19,6 (C-26); 21,3 (C-27); 21,7 (C-11); 24,1 (C-15); 27,9 (C-16); 29,2 (C-25); 29,6 (C-2); 30,2 (C-4); 36,7 (C-1); 37,2 (C-20); 38,1 (C-8); 39,7 (C-12); 41,2 y 43,0 (C-10 y C-13); 46,7 (C-24); 46,8 (C-7); 52,4 (C-17); 54,1 (C-9); 56,8 (C-14); 57,1 (C-5); 70,3 (C-3); 72,6 (C-23); 74,5 (C-22); 212,4 (C-6).

EM (FAB): *m/z* (int.rel.): 463 [M+1]⁺ (84); 445 (32); 391 (100); 289 (32).

Formiato de **(22E)-6-oxo-5α-estigmast-22-en-3α-ilo (21)**.



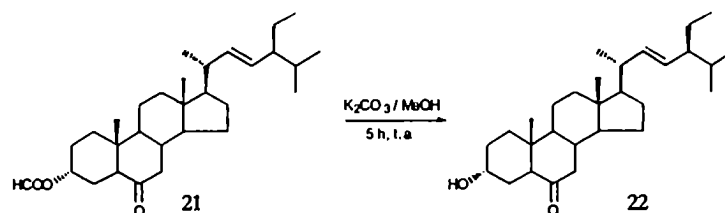
A una solución de **(22E)-3β-hidroxiestigmast-22-en-6-ona (4)** (1,17 g, 2,7 mmol), ácido fórmico (0,2 ml) y trifenilfosfina (1,17 g, 4,5 mmol) en 60 ml de benceno seco, se agregó, gota a gota, azadicarboxilato de isopropilo (DIAD, 1,1 g, 5,5 mmol). Se mantuvo la agitación a temperatura ambiente por 24 horas en atmósfera inerte, y se evaporó el solvente a presión reducida. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 95:5) permitió obtener **formiato de (22E)-6oxo-5α-estigmast-22-en-3α-ilo (21)** con un rendimiento de 83%.

P.f.: 184-185°C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,69 (H-18, 3H, *s*); 0,75 (H-19, 3H, *s*); 2,31 (H-7α, 1H, *dd*, *J* = 13,0 y 4,3); 2,59 (H-5α, 1H, *dd*, *J* = 12,1 y 3,0); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*); 5,27 (H-3β, 1H, *m*); 8,03 (1H, *s*, HCOO-).

RMN-¹³C (CDCl₃): 12,2; 12,2 y 12,4 (C-18, C-19 y C-29); 19,0 (C-26); 21,1 (C-11); 21,1 y 21,1 (C-21 y C-27); 24,0 (C-15); 25,0 y 25,3 (C-2 y C-4); 25,4 (C-28); 28,7 (C-16); 31,8 (C-25); 32,2 (C-1); 39,0 (C-8); 39,4 (C-12); 40,4 (C-20); 41,3 (C-10); 42,8 (C-13); 46,8 (C-7); 51,2 (C-24); 52,4 (C-5); 53,8 (C-9); 55,9 y 56,9 (C-14 y C-17); 69,1 (C-3); 129,6 (C-23); 138,0 (C-22); 160,3 (HCOO-); 211,7 (C-

6).

(22E)-3 α -Hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (22).

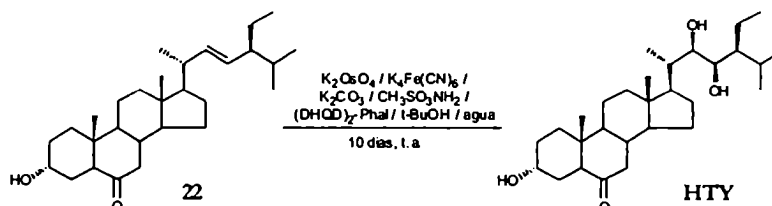
Se disolvieron 1,05 g (2,3 mmol) de **formiato de (22E)-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 α -ilo (21)** en 100 ml de metanol y se agregó 1 g (7,2 mmol) de carbonato de potasio. La suspensión se mantuvo con agitación a temperatura ambiente por 5 horas, se diluyó con 100 ml de agua y se extrajo con cloruro de metileno. Luego de la purificación por columna de sílica (hexano / AcOEt 8:2), se obtuvo **(22E)-3 α -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona⁹ (22)** con un rendimiento de 92%.

P.f.: 191-192°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,75 (H-18, 3H, s); 0,81 (H-19, 3H, s); 2,35 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,0 y 2,1); 2,74 (H-5 α , *dd*, *J* = 12,2 y 3,4); 4,17 (H-3 β , 1H, *m*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0 y 12,1 (C-18 y C-29); 12,4 (C-19); 18,8 (C-26); 21,0 y 21,1 (C-21 y C-27); 21,3 (C-11); 24,0 (C-15); 25,2 (C-28); 27,7 (C-16); 27,6 y 27,8 (C-2 y C-4); 30,3 (C-25); 32,0 (C-1); 38,4 (C-8); 39,7 (C-12); 40,2 (C-20); 41,9 (C-10); 43,0 (C-13); 46,9 (C-7); 51,1 (C-24); 52,1 (C-5); 52,7 y 56,9 (C-14 y C-17); 53,8 (C-9); 64,9 (C-3); 129,1 (C-23); 138,1 (C-22); 214,6 (C-6).

EM (IE): *m/z* (int.rel.): 428 [M]⁺ (32), 410 (2), 286 (49), 55 (100).

(22R,23R)-3 α ,22,23-Trihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (HTY, 28-homotifasterol).

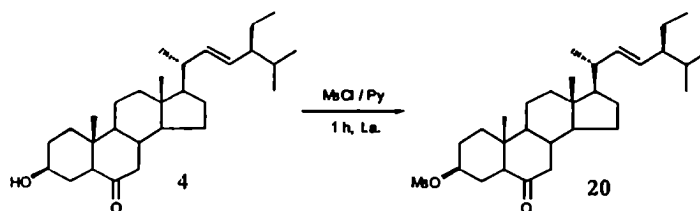
La dihidroxilación catalítica asimétrica de 210 mg (0,5 mmol) de **(22E)-3 α -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (22)** permitió obtener **(22R,23R)-3 α ,22,23-trihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (28-homotifasterol)⁸** con un rendimiento de 42%. La purificación se efectuó por medio de una cromatografía en columna de sílica usando una mezcla AcOEt / hexano 85:15.

P.f.: 240 - 241°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,69 (H-18, 3H, s); 0,76 (H-19, 3H, s); 2,33 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,1 y 2,0); 2,76 (H-5 α , *dd*, *J* = 12,2 y 3,4); 3,58 (H-22, 1H, *d*, *J* = 9); 3,72 (H-23, 1H, *d*, *J* = 9); 4,15 (H-3 β , 1H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0 12,0 y 12,4 (C-18, C-21 y C-19); 13,8 (C-29); 19,1 (C-28); 19,6 (C-26); 21,3 (C-11); 21,3 (C-27); 24,0 (C-15); 27,6 y 27,9 (C-2 y C-4); 27,7 (C-16); 29,2 (C-25); 31,9 (C-1); 37,2 (C-20); 38,4 (C-8); 39,7 (C-12); 41,9 (C-10); 43,0 (C-13); 46,7 (C-24); 46,9 (C-7); 52,0 (C-5); 52,7 y 56,9 (C-14 y C-17); 53,9 (C-9); 64,9 (C-3); 72,5 (C-23); 74,5 (C-22); 214,6 (C-6).
EM (FAB): m/z (int.rel.): 463 [M+1]⁺ (75), 445 (100), 391 (15), 289 (21).

Metansulfonato de (22E)-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (20).



Se disolvieron 500 mg de (22E)-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (4) en 7 ml de piridina, y se agregaron 0,2 ml de cloruro de metansulfonilo. Luego de 1 hora de reacción a temperatura ambiente, la mezcla se volcó sobre una solución acuosa al 5% de HCl. Se extrajo con CH₂Cl₂ y se purificó el producto crudo mediante cromatografía en columna (hexano / AcOEt 9:1). Se obtuvo, así, metansulfonato de (22E)-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo¹⁰ (20) con un rendimiento de 95%.

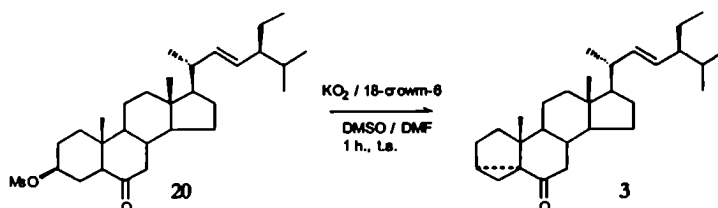
P.f.: 149°C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,69 (H-18, 3H, s); 0,79 (H-19, 3H, s); 2,18 (H-7 α , 1H, dd, J = 12,1 y 2,2); 2,32 (H-5 α , 1H, dd, J = 12,5 y 4,0); 3,03 (CH₃SO₃-, 3H, s); 4,65 (H-3 α , 1H, m); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, m).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0, 12,1 y 12,6 (C-18, C-19 y C-29); 18,7 (C-26); 21,1 y 20,8 (C-21 y C-27); 20,9 (C-11); 23,7 (C-15); 25,1 (C-28); 27,0 y 27,9 (C-2 y C-4); 28,4 (C-16); 31,5 (C-25); 36,0 (C-1); 37,5 (C-8); 38,5 (CH₃SO₃-); 39,0 (C-12); 40,1 (C-10); 40,2 (C-20); 42,5 (C-13); 46,1 (C-7); 50,9 (C-24); 53,2 (C-9); 56,4 (C-5); 55,9 y 55,6 (C-17 y C-14); 80,9 (C-3); 129,2 (C-23); 137,6 (C-22); 208,8 (C-6).

EM (IE): m/z (int.rel.): 506 [M]⁺ (12); 463 (3); 394 (34); 55 (100).

(22E)-3 α ,5-Ciclo-5 α -estigmast-22-en-6-ona. (3).



Se disolvieron 95 mg (0,18 mmol) de metansulfonato de (22E)-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (20) en 8 ml de una mezcla de DMSO y DMF (1:1). Se agregaron 490 mg (1,84 mmol) de 18-

crown-6, y 40 mg (0,55 mmol) de superóxido de potasio. Una vez que el sólido desapareció (aproximadamente 1 hora), se agregó agua y se acidificó con HCl 1M. La mezcla se extrajo con diclorometano, y se secó y evaporó la fase orgánica. Luego de purificar el crudo de reacción por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 95:5), se obtuvo un producto principal (85%) que resultó ser **(22E)-3 α ,5-Ciclo-5 α -estigmast-22-en-6-ona**.⁷

P.f.: 99-100°C.

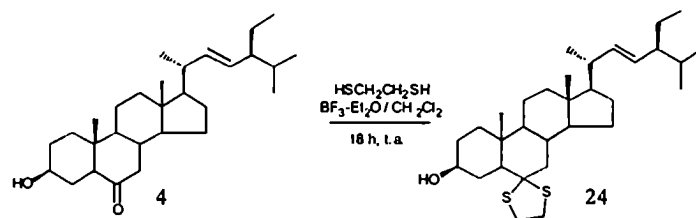
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,29 (H-4 α , 1H, *dd*, *J* = 7,8 y 4,7); 0,52 (H-4 β , 1H, *t*, *J* = 3,9); 0,74 (H-18, 3H, *s*); 1,01 (H-19, 3H, *s*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 11,6 (C-4); 12,2 (C-18 y C-29); 19,0 y 21,2 (C-21 y C-27); 19,7 (C-19); 21,1 (C-26); 22,9 (C-11); 24,1 (C-15); 25,4 (C-28); 25,9 (C-2); 28,9 (C-16); 31,9 (C-25); 33,4 (C-1); 34,8 (C-3); 35,3 (C-8); 39,6 (C-12); 40,5 (C-20); 42,6 (C-5); 44,8 (C-7); 46,1 (C-9); 46,3 (C-10 y C-13); 51,2 (C-24); 55,9 y 57,1 (C-14 y C-17); 129,5 (C-23); 138,1 (C-22); 209,7 (C-6).

EM (IE): *m/z* (int.rel.): 410 [M]⁺ (100); 395 (11); 367 (33); 312 (9); 271 (36).

8.2.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS FLUORADOS EN C-3 (COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 3).

(22E)-6,6-(Etilenditio)-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-eno (24).



Se disolvieron 700 mg (1,6 mmol) de **(22E)-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona** (4) en 10 ml de CH₂Cl₂, se agregaron 0,25 ml de etanoditiol y 0,1 ml de eterato de trifluoruro de boro. Se mantuvo la agitación durante 18 horas a temperatura ambiente, y se agregaron 30 ml de NaOH 2%. La fase orgánica se lavó tres veces con agua, se secó y evaporó. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 7:3) y se obtuvo **(22E)-6,6-(etilenditio)-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-eno** con un rendimiento de 96%.

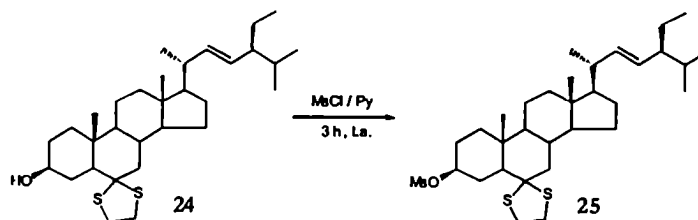
P.f.: 103°C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,70 (H-18, 3H, *s*); 0,96 (H-19, 3H, *s*); 3,65 (H-3 α , 1H, *m*); 3,03 – 3,30 (-SCH₂CH₂S-, 4H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *m*); 5,15 (H-22, 1H, *m*).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,2 y 12,3 (C-18 y C-29); 15,1 (C-19); 19,0 (C-26); 21,0 y 21,2 (C-21 y C-27); 21,1 (C-11); 24,2 (C-15); 25,3 (C-28); 28,8 (C-16); 31,3 (C-2); 31,8 (C-25); 33,5 (C-4); 35,1 (C-8); 38,1 (C-10); 38,5 (C-1); 38,7 y 40,7 (-SCH₂CH₂S-); 39,7 (C-12); 40,4 (C-20); 42,5 (C-13); 51,2 (C-24); 52,6 (C-7); 53,2 (C-5); 53,8 (C-9); 55,6 y 56,0 (C-14 y C-17); 71,8 (C-3); 72,2 (C-6); 129,4 (C-23); 138,1 (C-22).

EM (IE): m/z (int.rel.): 504 $[M]^+$ (2); 443 (1); 411 (1); 393 (1); 349 (1); 149 (8); 44 (100).

Metansulfonato de (22E)-6,6-(Etilenditio)-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (25).



Se disolvieron 650 mg (1,3 mmol) de (22E)-6,6-(Etilenditio)-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-eno (24) en 15 ml de piridina. Luego de completada la disolución se agregaron 0,4 ml de cloruro de metansulfonilo. La mezcla se protegió de la luz y se dejó con agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se vertió sobre una solución acuosa de HCl al 5%. La mezcla resultante se extrajo con CH_2Cl_2 , la fase orgánica se secó y evaporó. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 85:15), obteniéndose metansulfonato de (22E)-6,6-(etilenditio)-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (25) con un rendimiento de 94%.

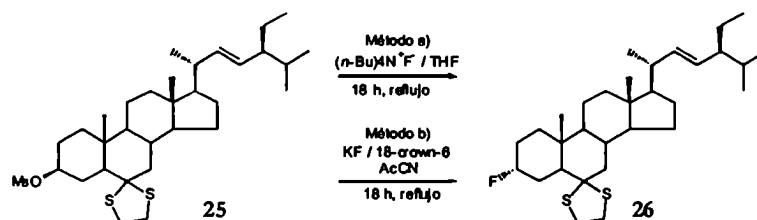
P.f.: 78-80°C

RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3): 0,70 (H-18, 3H, s); 0,98 (H-19, 3H, s); 3,01 (CH_3SO_3^- , 3H, s); 3,03 – 3,30 ($-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$, 4H, m); 4,66 (H-3 α , 1H, m); 5,02 (H-23, 1H, m); 5,15 (H-22, 1H, m).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 12,2 y 12,2 (C-18 y C-29); 15,0 (C-19); 19,0 (C-26); 21,0 (C-11); 21,0 y 21,2 (C-21 y C-27); 24,2 (C-15); 25,3 (C-28); 28,7 (C-2); 28,7 (C-16); 30,4 (C-4); 31,8 (C-25); 35,0 (C-8); 37,9 (C-10); 38,4 (C-1); 38,8 (CH_3SO_3^-); 38,9 y 40,7 ($-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$); 39,6 (C-12); 40,3 (C-20); 42,5 (C-13); 51,2 (C-24); 52,4 (C-7); 53,0 (C-5); 53,6 (C-9); 55,5 y 56,0 (C-14 y C-17); 71,4 (C-6); 82,3 (C-3); 129,4 (C-23); 138,1 (C-22).

EM (IE): m/z (int.rel.): 582 $[M]^+$ (0,5); 486 (3); 458 (1); 393 (6); 279 (8); 149 (60); 43 (100).

(22E)-6,6-(Etilenditio)-3 α -fluoro-5 α -estigmast-22-eno (26).



Método a)

Se disolvieron 180 mg (0,3 mmol) de metansulfonato de (22E)-6,6-(etilenditio)-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (25) en 10 ml de una solución 1M de fluoruro de tetrabutilamonio en THF. La mezcla se reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 18 horas. Se llevó a temperatura ambiente, se evaporó

el solvente a presión reducida y se purificó el producto crudo por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 96:4). Se obtuvo **(22E)-6,6-(etilenditio)-3 α -fluoro-5 α -estigmast-22-eno (26)** con un rendimiento de 62 %.

P.f.: 92°C

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,71 (H-18, 3H, *s*); 0,93 (H-19, 3H, *s*); 3,03 – 3,30 (-SCH₂CH₂S-, 4H, *m*); 4,92 (H-3 β , 1H, *dm*, ²J_{HF} = 48,7); 5,02 (H-23, 1H, *m*); 5,15 (H-22, 1H, *m*).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,2 y 12,3 (C-18 y C-29); 14,1 (C-19); 20,3 (C-11); 20,6 y 21,0 (C-21 y C-27); 24,2 (C-15); 25,3 (C-28); 26,9 (*d*, C-2, ²J_{CF} = 21,7); 28,7 (C-16); 29,3 (*d*, C-4, ²J_{CF} = 19,7); 31,8 (C-25); 34,5 (C-1); 35,0 (C-8); 38,4 (C-10); 38,9 y 40,7 (-SCH₂CH₂S-); 39,6 (C-12); 40,4 (C-20); 42,5 (C-13); 47,9 (C-5); 51,2 (C-24); 52,5 (C-7); 53,6 (C-9); 55,5 y 55,9 (C-14 y C-17); 72,0 (C-6); 89,7 (*d*, C-3, ¹J_{CF} = 166,9); 129,4 (C-23); 138,1 (C-22).

RMN-¹⁹F (470 MHz, CDCl₃): -181,0 (*m*).

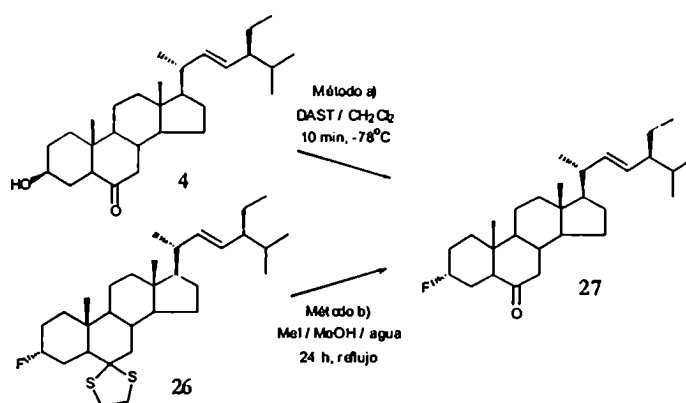
EM (IE): *m/z* (int.rel.): 506 [M]⁺ (27); 486 (3); 445(4); 393(14); 273 (7); 83(84); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₃₁H₅₁S₂F [M]⁺: 506,3416, hallado 506,3416.

Método b)

Una solución de **metansulfonato de (22E)-6,6-(etilenditio)-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (25)**, en AcCN anhidro (45 mg en 10 ml), conteniendo 26 mg de 1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano (18-crown-6) y 50 mg de fluoruro de potasio, se reflujo durante 18 horas. Se evaporó el solvente y se purificó el producto crudo como se describió anteriormente. Se obtuvo **(22E)-6,6-(etilenditio)-3 α -fluoro-5 α -estigmast-22-eno** con un rendimiento de 60 %.

(22E)-3 α -Fluoro-5 α -estigmast-22-en-6-ona (27).



Método a)

Sobre una solución de DAST (0,49 g, 3,0 mmol) en 3 ml de cloruro de metileno a -78°C, se agregaron, gota a gota, 430 mg (1,0 mmol) de **(22E)-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (4)** disueltos en

18 ml de cloruro de metileno. Después de 10 minutos, la mezcla se retiró del baño, y cuando alcanzó la temperatura ambiente se volcó sobre agua. Se separó la fase orgánica, que se lavó con bicarbonato de sodio, se secó y evaporó. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna de sílica permitió obtener **(22E)-3 α -fluoro-5 α -estigmast-22-en-6-ona** con un 57% de rendimiento. P.f.: 156 – 157°C.

RMN-¹H: (500 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, s); 0,73 (H-19, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, d, J = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, t, J = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, d, J = 6,3); 1,02 (H-21, 3H, d, J = 6,7); 2,31 (H-7 α , 1H, dd, J = 13,0 y 4,5); 2,63 (H-5 α , 1H, dd, J = 12,8 Hz y 3,0); 4,90 (H-3 β , 1H, dm, ²J_{HF} = 48,3); 5,02 (23-H, 1H, dd, J = 15,1 y 8,6); 5,15 (22-H, 1H, dd, J = 15,1 y 8,6).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,2 (C-18), 12,2 (C-29), 12,3 (C-19), 18,9 (C-26), 21,1 (C-11), 21,1 (C-27), 21,2 (C-21), 24,0 (C-15), 25,4 (C-28), 25,9 (d, C-4, ²J_{CF} = 21,4), 26,3 (d, C-2, ²J_{CF} = 21,7), 28,7 (C-16), 31,7 (C-25), 31,9 (C-1), 38,0 (C-8), 39,4 (C-12), 40,4 (C-20), 41,2 (C-10), 42,9 (C-13), 46,8 (C-7), 51,2 (C-24), 51,9 (C-5), 53,8 (C-9), 55,9 (C-17), 56,9 (C-14), 88,5 (C-3, ¹J_{CF} = 167,1), 129,6 (C-23), 138,0 (C-22), 211,8 (C-6).

RMN-¹⁹F: (376 MHz, CDCl₃): -184,0 (m).

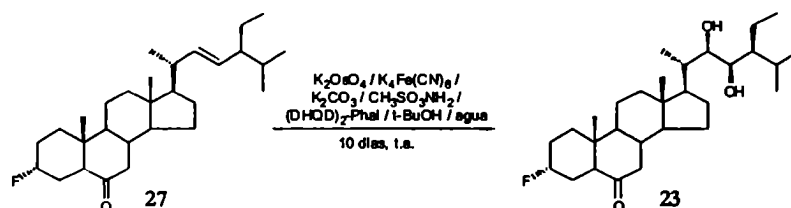
EM (IE): m/z (int.rel.): 430 [M]⁺ (8), 415 (1), 387 (6), 289 (13), 149 (40), 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₂₉H₄₇OF [M]⁺: 430,3611, hallado: 430,3608.

Método b)

Se disolvieron 480 mg (0,9 mmol) de **6,6-(etilenditio)-3 α -fluoroestigmast-22-eno (26)** en 10 ml de metanol, se agregaron 50 μ l de agua y 0,5 ml de yoduro de metilo. La mezcla se refluxó durante 24 horas, se llevó a temperatura ambiente y evaporó a presión reducida. La purificación del producto crudo permitió obtener **(22E)-3 α -fluoro-5 α -estigmast-22-en-6-ona (27)** con un rendimiento de 83 %.

(22R,23R)-3 α -fluoro-22,23-dihidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (23).



Se sometieron 180 mg de **(22E)-3 α -fluoro-5 α -estigmast-22-en-6-ona (27)** (0,42 mmol) a una dihidroxilación catalítica asimétrica según la técnica habitual. El producto crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (gradiente CH₂Cl₂ / AcCN) y se obtuvo **(22R,23R)-22,23-dihidroxi-3 α -fluoro-5 α -estigmastan-6-ona (23)** con un rendimiento de 46%.

P.f.: 201 – 202°C

RMN-¹H: (500 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,73 (H-19, 3H, *s*); 0,91 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,8); 0,92 - 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 2,31 (H-7α, 1H, *dd*, *J* = 12,9 y 4,4); 2,63 (H-5α, 1H, *dd*, *J* = 12,9 y 3,0); 3,58 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,71 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 4,90 (H-3β, 1H, *dm*, ²*J*_{H,F} = 48,3).

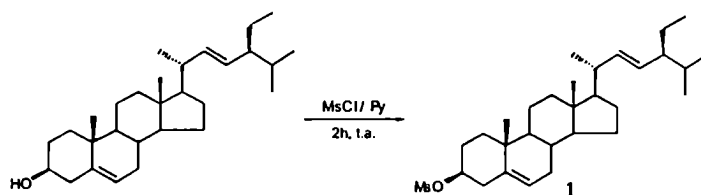
RMN-¹³C: (125 MHz, CDCl₃): 12,0 (C-21); 12,2 (C-18); 12,3 (C-19); 13,8 (C-29); 19,1 (C-28); 19,6 (C-26); 21,1 (C-11); 21,3 (C-27); 24,0 (C-15); 25,9 (*d*, C-4, ²*J*_{C,F} = 21,5); 26,3 (*d*, C-2, ²*J*_{C,F} = 21,6); 28,7 (C-16); 29,2 (C-25); 31,9 (C-1); 37,2 (C-20); 38,0 (C-8); 39,4 (C-12); 41,2 (C-10); 42,9 (C-13); 46,7 (C-24); 46,8 (C-7); 51,9 (C-5); 53,8 (C-9); 55,9 (C-17); 56,9 (C-14); 72,6 (C-23); 74,5 (C-22); 88,5 (*d*, C-3, ¹*J*_{C,F} = 167,2); 211,8 (C-6).

RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): -183,6 (*m*).

EM (FAB): *m/z* (int.rel.): 471 [M+Li]⁺ (87), 294 (19).

HRMS (FAB): Calculado para C₂₉H₄₇OFLi [M+Li]⁺: 471,3826, hallado: 471,3811.

Metansulfonato de (22E)-5α-estigmasta-5,22-dien-3β-ilo (1).



Se disolvieron 8,0 g de estigmasterol en 110 ml de piridina seca. Luego de completada la disolución, se agregaron 4,5 ml de cloruro de metansulfonilo. La mezcla se protegió de la luz y se dejó con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se volcó sobre una solución acuosa de HCl al 5%. Se dejó cristalizando 2 horas, se filtró y se lavó con HCl 5% y agua. El producto se secó y se recrystalizó de acetona, obteniéndose metansulfonato de (22E)-5α-estigmasta-5,22-dien-3β-ilo¹⁰ (1) con un rendimiento de 95%.

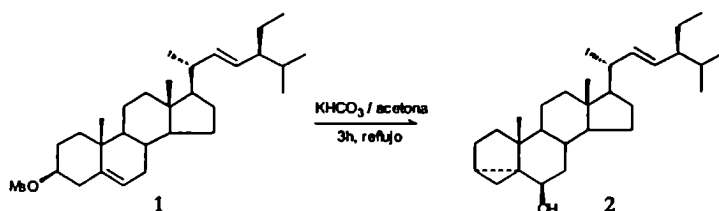
P. f. 119-120°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,71 (H-18, 3H, *s*); 1,04 (H-19, 3H, *s*); 3,03 (CH₃SO₃-, 3H, *s*); 4,53 (H-3α, 1H, *m*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*); 5,40 (H-6, 1H, *d*, *J* = 4).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,1 (C-18); 12,3 (C-29); 18,9 (C-19 y C-26); 21,1 (C-11); 21,0 y 21,1 (C-21 y C-27); 24,4 (C-15); 25,4 (C-28); 28,5 (C-2); 28,7 (C-16); 31,8 (C-7); 31,9 (C-8 y C-25); 36,4 (C-10); 37,0 (C-1); 38,7 (CH₃SO₃-); 38,9 (C-4); 39,6 (C-12); 40,5 (C-20); 42,2 (C-13); 50,0 (C-9); 51,3 (C-24); 56,8 y 58,0 (C-14 y C-17); 82,3 (C-3); 123,4 (C-6); 129,3 (C-23); 138,1 (C-22); 138,6 (C-5).

EM (IE): *m/z* (int.rel.): 395 [M]⁺ (33); 394 (100); 351 (10); 296 (3); 255 (30).

(22E)-3 α ,5-Ciclo-5 α -estigmast-22-en-6 β -ol (2).



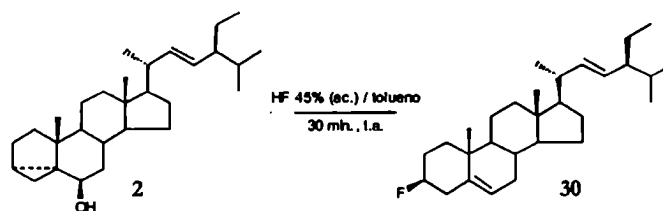
Se disolvieron 2,5 g (9,7 mmol) de metansulfonato de (22E)- 5 α -estigmasta-5,22-dien-3 β -ilo (1) en 190 ml de acetona, se agregaron 3,5 g (35,0 mmol) de bicarbonato de potasio y 39 ml de agua. La mezcla se reflujo por 3 horas, se evaporó la acetona a presión reducida y se extrajo la fase acuosa resultante con cloruro de metileno. La fase orgánica se secó y evaporó. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 9:1). Se obtuvo (22E)-3 α ,5-ciclo-5 α -estigmast-22-en-6 β -ol¹² (2) con un rendimiento de 82%.

El producto puro se presenta como un aceite incoloro.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,29 (H-4 α , 1H, *dd*, *J* = 7,8 y 4,7); 0,52 (H-4 β , 1H, *t*, *J* = 3,9); 0,74 (H-18, 3H, *s*); 1,06 (H-19, 3H, *s*); 3,25 (H-6 α , 1H, *m*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 11,5 (C-4); 12,1 (C-29); 12,3 (C-18); 18,9 (C-26); 20,0 (C-19); 20,9 y 21,1 (C-21 y C-27); 22,6 (C-11); 24,1 (C-3); 24,2 (C-15); 25,3 (C-28); 28,9 (C-16); 29,7 (C-2); 31,8 (C-25); 31,9 (C-8); 33,2 (C-1); 37,1 (C-7); 38,5 (CH₃SO₃-); 38,7 (C-5); 40,0 (C-12); 40,4 (C-20); 42,5 (C-10); 42,8 (C-13); 47,7 (C-9); 51,1 (C-24); 56,0 y 56,5 (C-14 y C-17); 75,6 (C-6); 129,1 (C-23); 138,2 (C-22).

(22E)-3 β -fluoroestigmasta-5,22-dieno (30).



A una solución de (22E)-3 α ,5-ciclo-5 α -estigmast-22-en-6 β -ol (200 mg, 0,5 mmol), en 10 ml de tolueno, se agregaron 2 ml de HF-Py 70%. La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, la fase orgánica se lavó con NaHCO₃ (s.s.) hasta neutralidad, se secó y evaporó. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (hexano) y se obtuvo (22E)-3 β -fluoroestigmasta-5,22-dieno¹³ (30) con un rendimiento de 70%.

RMN-¹H: (500 MHz, CDCl₃): 0,70 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,02 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,2); 1,03 (H-19, 3H, *s*); 4,37 (H-3 α , 1H, *dm*, ²*J*_{HF} = 52,0); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,38 (H-6, 1H, *d*,

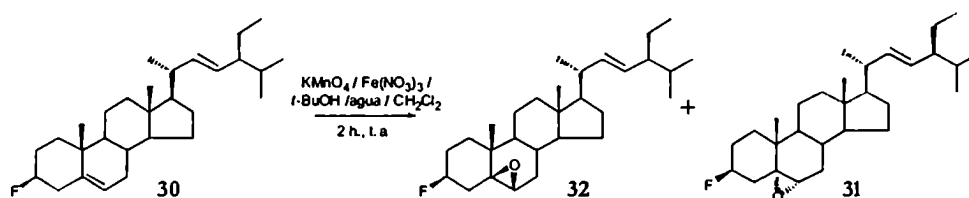
$J = 4,6$).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 12,0 y 12,2 (C-18 y C-29); 19,0 (C-26); 19,3 (C-19); 21,1 (C-11); 21,1 y 21,2 (C-21 y C-27); 24,4 (C-15); 25,4 (C-28); 28,8 (*d*, C-2, $^2J_{\text{CF}} = 17,0$); 28,9 (C-16); 31,9 (C-7); 31,9 y 31,9 (C-8 y C-25); 36,4 (*d*, C-1, $^1J_{\text{CF}} = 10,1$); 36,6 (C-10); 39,4 (*d*, C-4, $^2J_{\text{CF}} = 18,8$); 39,6 (C-12); 40,4 (C-20); 42,2 (C-13); 50,1 (C-9); 51,2 (C-24); 56,0 y 56,8 (C-14 y C-17); 92,9 (*d*, C-3, $^1J_{\text{CF}} = 174,5$); 123,0 (C-6); 129,4 (C-23); 138,2 (C-22); 139,4 (*d*, C-5, $^1J_{\text{CF}} = 12,4$).

RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): -168,0 (*m*).

EM (IE): m/z (int.rel.): 414 $[\text{M}]^+$ (24); 399 (3); 385 (1); 371 (10); 302 (18); 273 (21); 153 (28); 55 (100).

(22E)-5 β ,6 β -Epoxi-3 β -fluoroestigmast-22-eno (32).



Una mezcla de permanganato de potasio (1,1 g, 6,9 mmol) y nitrato férrico nonahidratado (0,55 g, 1,4 mmol) se molieron en mortero hasta obtener un polvo fino, y se agregaron 0,4 ml de agua. Esta mezcla se suspendió en 20 ml de cloruro de metileno, se agregaron 2 ml de *t*-butanol y 2 g (4,1 mmol) de (22E)-3 β -fluoroestigmasta-5,22-dieno (30). Después de 2 horas de reacción, el producto se separó del residuo inorgánico agregando 20 ml de dietiléter y filtrando a través de un lecho de Celite. El sólido resultante de la evaporación del solvente se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 97:3) obteniéndose (22E)-5 β ,6 β -epoxi-3 β -fluoroestigmast-22-eno (32) con un rendimiento de 72%.

P.f.: 130°C

RMN- ^1H : (500 MHz, CDCl_3): 0,66 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, $J = 6,5$); 0,81 (H-29, 3H, *t*, $J = 7,4$); 0,85 (H-26, 3H, *d*, $J = 6,3$); 1,01 (H-19, 3H, *s*); 1,02 (H-21, 3H, *d*, $J = 6,7$); 3,03 (H-6 α , 1H, *d*, $J = 2,1$); 4,57 (H-3 α , 1H, *dm*, $^2J_{\text{HF}} = 49,5$); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y 8,6).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 11,9 (C-18); 12,2 (C-29); 17,0 (C-19); 18,8 (C-26); 21,1 (C-11); 21,1 (C-21); 21,1 (C-27); 24,2 (C-15); 25,4 (C-28); 27,8 (*d*, C-2, $^2J_{\text{CF}} = 21,0$); 28,8 (C-16); 29,6 (C-8); 31,6 (C-25); 32,4 (C-7); 34,7 (*d*, C-4, $^2J_{\text{CF}} = 21,1$); 35,4 (C-10); 38,7 (*d*, C-1, $^1J_{\text{CF}} = 10,1$); 39,6 (C-12); 40,3 (C-20); 41,9 (C-13); 50,6 (C-9); 51,2 (C-24); 56,0 (C-17); 56,3 (C-14); 62,0 (*d*, C-5, $^1J_{\text{CF}} = 15,0$); 63,1 (C-6); 90,0 (*d*, C-3, $^1J_{\text{CF}} = 170,1$); 129,7 (C-23); 138,0 (C-22).

RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): -171,3 (*m*).

EM (IE): m/z (int.rel.): 430 $[\text{M}]^+$ (7); 413 (4); 387 (4); 369 (12); 289 (15); 43 (100).

EMAR (IE): Calculado para $C_{29}H_{47}OF$ $[M]^+$: 430,3611, hallado: 430,3611.

La elución posterior con el mismo sistema de solventes permitió obtener **(22E)-5 α ,6 α -epoxi-3 β -fluoroestigmast-22-eno (31)**, con un rendimiento de 10%.

P.f.: 183 - 184°C

RMN- 1H : (500MHz, $CDCl_3$): 0,66 (H-18, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, d, $J = 6,5$); 0,81 (H-29, 3H, t, $J = 7,4$); 0,82 (H-19, 3H, s); 0,85 (H-26, 3H, d, $J = 6,3$); 1,02 (H-21, 3H, d, $J = 6,7$); 2,90 (H-6 α , 1H, d, $J = 4,0$); 5,02 (H-3 α , 1H, dm, $^2J_{HF} = 49,4$); 5,02 (H-23, 1H, dd, $J = 15,1$ y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, dd, $J = 15,1$ y 8,6).

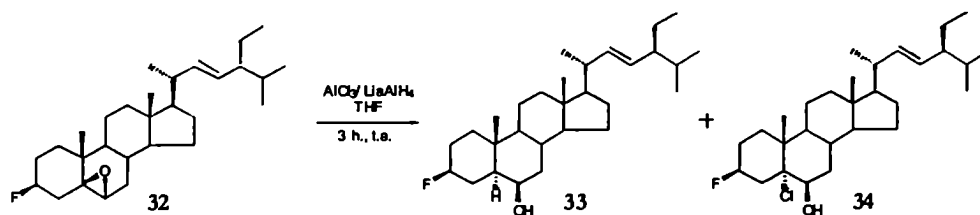
RMN- ^{13}C (125MHz, $CDCl_3$): 12,0 (C-18); 12,2 (C-29); 15,8 (C-19); 18,8 (C-26); 20,0 (C-11); 21,1 (C-21); 21,1 (C-27); 24,2 (C-15); 25,4 (C-28); 27,3 (d, C-2, $^2J_{CF} = 21,6$); 28,7 (C-7); 28,8 (C-16); 29,7 (C-8); 31,6 (C-25); 32,4 (d, C-4, $^2J_{CF} = 20,5$); 34,1 (d, C-1, $^2J_{CF} = 10,9$); 35,3 (C-10); 39,8 (C-12); 40,3 (C-20); 42,1 (C-13); 42,3 (C-9); 51,2 (C-24); 55,8 y 56,6 (C-14 y C-17); 57,6 (C-6); 64,8 (d, C-5, $^2J_{CF} = 11,3$); 89,2 (d, C-3, $^2J_{CF} = 169,8$); 129,7 (C-23); 138,0 (C-22).

RMN- ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): -175,8 (m).

EM (IE): m/z (int.rel.): 430 $[M]^+$ (7); 413 (4); 387 (4); 369 (12); 289 (15); 43 (100).

(22E)-3 β -Fluoro-5 α -estigmast-22-en-6 β -ol (33).

Método a)



Se disolvieron 500 mg de tricloruro de aluminio en 15 ml de THF anhidro. Cuando se completó la disolución, se agregaron 80 mg de $LiAlH_4$ y luego de 10 minutos se agregaron, lentamente, 150 mg de **(22E)-5 β ,6 β -epoxi-3 β -fluoroestigmast-22-eno (32)** disueltos en 10 ml de THF. A las 3 horas de reacción se agregó acetona y luego agua. La posterior extracción con CH_2Cl_2 permitió obtener un producto crudo que se purificó por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 8:2). Se obtuvo así **(22E)-3 β -fluoro-5 α -estigmast-22-en-6 β -ol (33)** con un 43% de rendimiento.

P.f.: 136°C

RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$): 0,71 (H-18, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, d, $J = 6,5$); 0,81 (H-29, 3H, t, $J = 7,4$); 0,85 (H-26, 3H, d, $J = 6,3$); 1,01 (H-19, 3H, s); 1,02 (H-21, 3H, d, $J = 6,7$); 3,80 (H-6 α , 1H, d, $J = 2,5$); 4,52 (H-3 α , 1H, dm, $^2J_{HF} = 49,3$); 5,02 (H-23, 1H, dd, $J = 15,1$ y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, dd, $J = 15,1$ y 8,6).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 12,1 (C-29); 12,3 (C-18); 15,7 (C-19); 18,9 (C-26); 21,0 (C-27); 21,2 (C-11); 21,2 (C-21); 24,3 (C-15); 25,4 (C-28); 28,5 (*d*, C-2, $^2J_{\text{CF}} = 19,0$); 28,9 (C-16); 31,7 (C-25); 31,8 (C-8); 32,4 (*d*, C-4, $^2J_{\text{CF}} = 18,0$); 35,4 (C-10); 37,8 (*d*, C-1, $^1J_{\text{CF}} = 12,0$); 39,6 (C-7); 39,8 (C-12); 40,4 (C-20); 42,6 (C-13); 46,7 (*d*, C-5, $^1J_{\text{CF}} = 9,5$); 51,2 (C-24); 54,1 (C-9); 56,0 (C-17); 56,8 (C-14); 71,8 (C-6); 93,1 (*d*, C-3, $^1J_{\text{CF}} = 172,5$); 129,6 (C-23); 138,0 (C-22).

RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): -169,5 (*m*).

EM (IE): m/z (int.rel.): 432 $[\text{M}]^+$ (30); 417 (3); 371 (21); 275 (30); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{OF}$ $[\text{M}]^+$: 432,3767, hallado: 432,3761.

Por posterior elución, con el mismo solvente, se obtuvo **(22E)-5-cloro-3 β -fluoro-5 α -estigmast-22-en-6 β -ol (34)** con un rendimiento del 38%.

P.f.: 105°C.

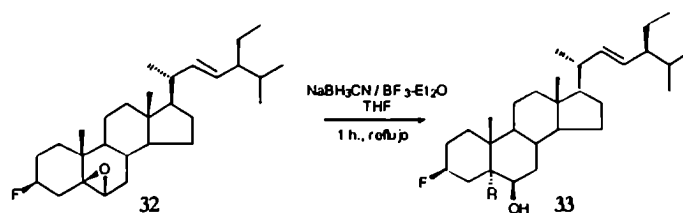
RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3): 0,72 (H-18, 3H, *s*); 1,32 (H-19, 3H, *s*); 3,97 (H-6 α , 1H, *m*); 4,90 – 5,30 (H-22, H-23 y H-3 β , 3H, *m*)

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): 12,2 y 12,3 (C-19 y C-29); 18,0 y 19,0 (C-19 y C-26); 21,0 y 21,2 (C-21 y C-21); 21,2 (C-11); 24,2 (C-15); 25,3 (C-28); 27,5 (*d*, C-2, $^2J_{\text{CF}} = 19,0$); 28,9 (C-16); 30,4 (C-8); 31,9 (C-25); 33,4 (*d*, C-1, $^1J_{\text{CF}} = 10,5$); 34,0 (C-7); 38,4 (*d*, C-4, $^2J_{\text{CF}} = 21,9$); 39,7 (C-12); 39,9 (C-10); 40,4 (C-20); 42,6 (C-13); 46,0 (C-9); 51,2 (C-24); 55,8 y 56,0 (C-14 y C-17); 75,6 (C-6); 83,5 (*d*, C-5, $^1J_{\text{CF}} = 10,7$); 90,5 (*d*, C-3, $^1J_{\text{CF}} = 169,0$); 129,5 (C-23); 138,2 (C-22).

RMN- ^{19}F (470 MHz, CDCl_3): -177,2 (*m*).

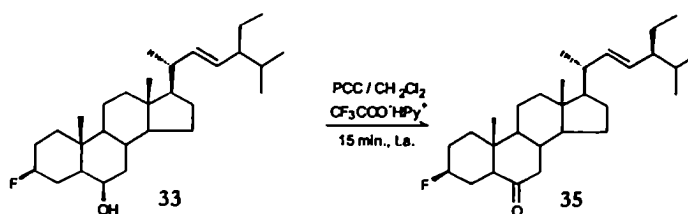
EM (IE): m/z (int.rel.): 466 $[\text{M}]^+$ (6); 430 (12); 415 (12); 325 (22); 81 (64); 56 (100).

Método b)



A una solución de 170 mg (0,39 mmol) de **(22E)-5 β ,6 β -epoxi-3 β -fluoroestigmast-22-eno (32)** (170 mg, 0,39 mmol) en 10 ml de THF seco se agregaron 85 mg (1,35 mmol) de NaBH_3CN y una pequeña cantidad de verde de bromocresol. Sobre esa solución se agregó gota a gota trifluoruro de boro eterato hasta que el indicador viró al color amarillo. La mezcla se reflujo bajo nitrógeno durante 1 hora. Una vez fría, se agregó solución saturada de cloruro de sodio y se extrajo con dietiléter. La fase orgánica se secó y evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 95:5) permitió obtener **(22E)-3 β -fluoro-5 α -estigmast-22-en-6 β -ol (33)** con un 80% de rendimiento.

(22E)-3β-Fluoro-5α-estigmast-22-en-6-ona (35).



Una solución de (22E)-3β-fluoro-5α-estigmast-22-en-6β-ol (33) (210 mg, 0.5 mmol) en 25 ml de cloruro de metileno se trataron con clorocromato de piridonio (109 mg, 0.51 mmol) y trifluororacetato de piridonio (30 mg, 0.15 mmol). La suspensión se agitó a temperatura ambiente por 15 minutos y se filtró a través de un lecho de Celite. Luego de evaporar el solvente a presión reducida, el producto crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 97:3). Se obtuvo (22E)-3β-fluoro-5α-estigmast-22-en-6-ona (35), con un rendimiento de 92%.

P.f.: 146 – 147°C

RMN-¹H (500MHz, CDCl₃): 0,71 (H-18, 3H, s); 0,78 (H-19, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, d, J = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, t, J = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, d, J = 6,3); 1,02 (H-21, 3H, d, J = 6,5); 2,17 (H-5α, 1H, d, J = 12,6); 2,33 (H-7α, 1H, dd, J = 13,2 y 4,4); 4,46 (H-3α, 1H, dm, ²J_{H_F} = 48,5); 5,02 (H-23, 1H, dd, J = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, dd, J = 15,1 y 8,6).

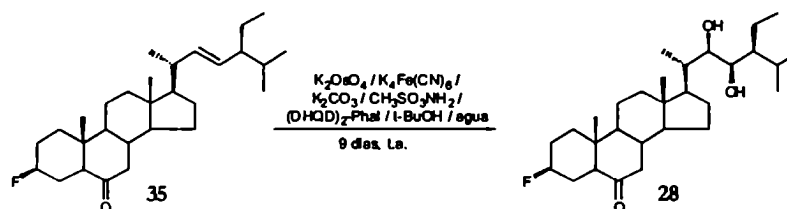
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,1 (C-29); 12,2 (C-18); 13,1 (C-19); 18,8 (C-26); 21,1 (C-11); 21,1 (C-27); 21,2 (C-21); 24,0 (C-15); 25,4 (C-28); 27,2 (d, C-4, ²J_{CF} = 19,7); 28,0 (d, C-2, ²J_{CF} = 17,9); 28,7 (C-16); 31,7 (C-25); 36,0 (d, C-1, ¹J_{CF} = 10,8); 37,8 (C-8); 39,4 (C-12); 40,4 (C-20); 40,9 (C-10); 42,9 (C-13); 46,6 (C-7); 51,2 (C-24); 55,9 (C-17); 56,0 (d, C-5, ¹J_{CF} = 10,8); 56,8 (C-9); 56,8 (C-14); 92,3 (d, C-3, ¹J_{CF} = 174,1); 129,7 (C-23); 138,1 (C-22); 209,7 (C-6).

RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): -172,6 (m).

EM (IE): m/z (int.rel.): 430 [M]⁺ (3); 415 (1); 387 (2); 318 (4); 289 (5); 44 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₂₉H₄₇OF [M]⁺: 430,3611, hallado: 430,3605.

(22R,23R)-22,23-Dihidroxi-3β-fluoro-5α-estigmastan-6-ona (28).



Se sometieron 180 mg (0,42 mmol) de (22E)-3β-fluoro-5α-estigmast-22-en-6-ona (35) a una dihidroxilación catalítica asimétrica, según la técnica habitual. El producto crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (gradiente cloruro de metileno / acetonitrilo) y se

obtuvo (22R,23R)-22,23-dihidroxi-3 β -fluoro-5 α -estigmastan-6-ona (28) con un rendimiento de 43%.

P.f.: 198°C

RMN-¹H (500MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,78 (H-19, 3H, *s*); 0,91 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,8); 0,92 - 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 2,17 (H-5 α , 1H, *d*, *J* = 12,6); 2,33 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 13,2 y 4,4); 3,58 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,71 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 4,45 (H-3 β , 1H, *dm*, ²*J*_{H-F} = 48,9).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,0 (C-21); 12,2 (C-18); 13,1 (C-19); 13,8 (C-29); 19,1 (C-28); 19,6 (C-26); 21,1 (C-11); 21,3 (C-27); 24,0 (C-15); 27,2 (*d*, C-4, ²*J*_{C-F} = 19,7); 28,0 (*d*, C-2, ²*J*_{C-F} = 18,0); 28,7 (C-16); 29,3 (C-25); 36,1 (*d*, C-1, ¹*J*_{C-F} = 10,5); 37,2 (C-20); 37,8 (C-8); 39,4 (C-12); 40,8 (C-10); 42,9 (C-13); 46,7 (C-7); 46,7 (C-24); 55,8 (C-17); 56,1 (*d*, C-5, ¹*J*_{C-F} = 10,9); 56,8 (C-9); 56,9 (C-14); 72,5 (C-23); 74,4 (C-22); 92,2 (*d*, C-3, ¹*J*_{C-F} = 174,0); 209,6 (C-6).

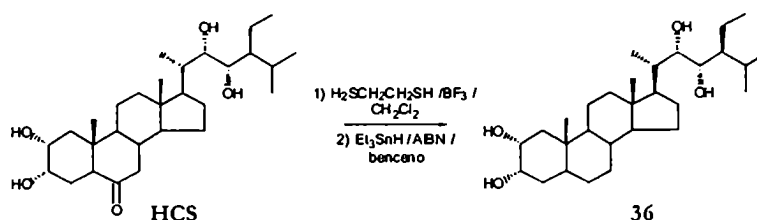
RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): -170,4 (*m*).

EM (FAB): *m/z* (int.rel.): 471 (100) [M+Li]⁺, 397 (29), 294 (20).

EMAR (FAB): Calculado para C₂₉H₄₇O₂FLi [M+Li]⁺: 471,3826, hallado: 471,3816.

8.2.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-6 (COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 4).

(22R,23R)-5 α -estigmasta-2 α ,3 α ,22,23-tetraol (36).



15 mg de 28-homocasterona disueltos 20 ml de CH₂Cl₂ se trataron con 50 μ l de etanoditiol y 50 μ l de eterato de trifluoruro de boro. Se obtuvo así el correspondiente ditiano, como un producto crudo que se disolvió, sin purificación, en 5 ml de benceno anhidro. A esta solución se agregaron 0,1 ml de hidruro de tributilestano y 3 mg de AIBN. Luego de 5 horas se evaporó el solvente y se purificó el producto crudo por medio de cromatografía en placa preparativa (CH₂Cl₂ / acetonitrilo 9:1 como solvente de elución), de esta manera se obtuvieron 14 mg de (22R,23R)-5 α -estigmasta-2 α ,3 α ,22,23-tetraol (36).

P.f.: 223°C

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 0,70 (H-18, 3H, *s*); 0,81 (H-19, 3H, *s*); 0,89 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,2); 0,92 - 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 3,59 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,69 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,72 (H-2 β , 1H, *m*); 4,05 (H-3 β , 1H, *dd*, *J* = 6,0 y 3,0).

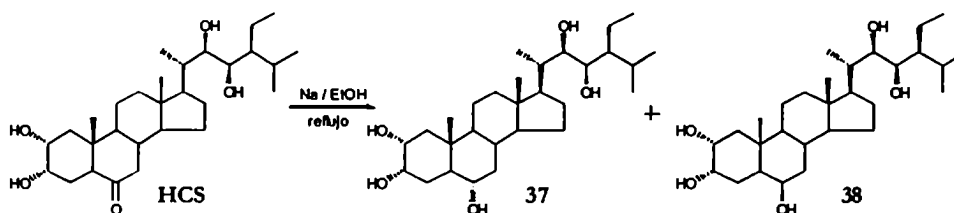
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 11,6 (C-18); 11,7 (C-21); 13,0 (C-19); 13,5 (C-29); 19,0

(C-28); 19,3 (C-26); 20,8 (C-11); 20,8 (C-27); 23,8 (C-15); 27,7 (C-6); 28,5 (C-16); 29,0 (C-25); 32,7 (C-7); 34,5 (C-4); 36,0 (C-8); 36,5 (C-20); 37,6 (C-10); 38,5 (C-5); 39,8 (C-1); 40,9 (C-12); 42,2 (C-13); 46,4 (C-24); 52,3 (C-17); 53,6 (C-9); 55,5 (C-14); 68,1 (C-3); 68,7 (C-2); 72,2 (C-23); 74,3 (C-22).

EM (FAB) m/z (int. rel): 487 $[M+Na]^+$ (10); 447 (8); 429 (12); 231 (30); 136 (100).

EMAR (FAB): Calculado para $C_{29}H_{52}O_4Na$ $[M+Na]^+$: 487,3763, hallado: 487,3770.

(22R,23R)-5 α -estigmastan-2 α ,3 α ,6 α ,22,23-pentaol (37) y (22R,23R)-5 α -estigmastan-2 α ,3 α ,6 β ,22,23-pentaol (38).



A una solución de HCS en etanol anhidro (25 mg en 6 ml), mantenida a reflujo, se agregaron 28 mg de sodio en porciones pequeñas durante un período de 2 horas. Luego de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con $CHCl_3$. La fase orgánica se secó y evaporó, generando un producto crudo que se purificó por cromatografía en columna. La elución con un gradiente de $CHCl_3$ / AcCN permitió obtener como primera fracción (22R,23R)-5 α -estigmastan-2 α ,3 α ,6 α ,22,23-pentaol (37) con un rendimiento de 83 %.

P.f.: 227°C.

RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): 0,67 (H-18, 3H, s); 0,82 (H-19, 3H, s); 0,89 (H-21, 3H, d, $J = 6,2$); 0,92 – 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, m); 3,29 (H-6 β , ddd, $J = 10,8, 10,7$ y 4,7); 3,56 (H-22, 1H, dd, $J = 8,4$ y 1,3); 3,67 (H-23, 1H, dd, $J = 8,4$ y 1,3); 3,71 (H-2 β , 1H, m); 3,98 (H-3 β , 1H, dd, $J = 6,0$ y 3,0).

RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): 11,7 y 11,8 (C-18 y C-21); 13,1 y 13,4 (C-19 y C-29); 18,7 (C-28); 19,2 (C-26); 20,7 (C-11); 20,9 (C-27); 23,8 (C-15); 27,5 (C-4); 28,4 (C-16); 28,9 (C-25); 34,1 (C-8); 36,9 (C-20); 37,9 (C-10); 39,7 (C-1); 40,7 (C-12); 41,3 (C-7); 42,2 (C-13); 46,4 (C-24); 48,9 (C-5); 52,4 (C-17); 53,6 (C-9); 55,6 (C-14); 68,4 (C-3); 68,5 (C-2); 69,1 (C-6); 72,3 (C-23); 74,2 (C-22).

EM (FAB) m/z (int. rel.): 503 $[M+Na]^+$ (25); 305 (10); 231 (22); 154 (31); 55 (100).

EMAR (FAB): Calculado para $C_{29}H_{52}O_5Na$ $[M+Na]^+$: 503,3712, hallado: 503,3720.

La segunda fracción, aislada con un 12 % de rendimiento, resultó ser (22R,23R)-5 α -estigmastan-2 α ,3 α ,6 β ,22,23-pentaol (38).

P.f.: 234°C.

RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): 0,70 (H-18, 3H, s); 0,89 (H-21, 3H, d, $J = 6,2$); 0,92 –

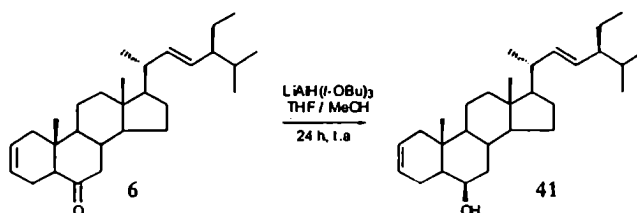
0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 1,02 (H-19, 3H, *s*); 3,57 (H-22, 1H, *dd*, $J = 8,4$ y $1,3$); 3,68 (H-23, 1H, *dd*, $J = 8,4$ y $1,3$); 3,74 (H-2 β , 1H, *m*); 3,79 (H-6 α , 1H, *m*); 4,01 (H-3 β , 1H, *dd*, $J = 6,0$ y $3,0$).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 / MeOD 95:5): 11,7 y 11,7 (C-18 y C-21, 13,5 (C-29); 15,6 (C-19); 19,3 (C-26); 21,1 (C-27); 18,7 (C-28); 20,7 (C-11); 28,1 (C-4); 23,9 (C-15); 28,5 (C-16); 34,1 (C-8); 37,0 (C-20); 28,9 (C-25); 37,1 (C-10); 39,7 (C-1); 40,7 (C-12); 41,9 (C-7); 42,3 (C-13); 46,4 (C-24); 50,5 (C-5); 54,2 (C-9); 52,7 (C-17); 55,6 (C-14); 69,1 (C-2); 68,5 (C-3); 72,3 (C-23); 74,3 (C-22); 70,9 (C-6).

EM (FAB) m/z (int. rel.): 503 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (62); 317 (9); 231 (31); 154 (92); 55 (100).

EMAR (FAB): Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}_5\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 503,3712, hallado: 503,3730.

(22E)-5 α -estigmasta-2,22-dien-6 β -ol (41).



Se disolvieron 150 mg (0,36 mmol) de (22E)-5 α -estigmasta-2,22-dien-6-ona (6) en 15 ml de una mezcla 9:1 de THF / metanol bajo atmósfera de nitrógeno. A esta solución se agregaron 280 mg (1,1 mmol) de hidruro de tri-*t*-butoxialuminio y litio. Luego de 24 horas, la solución se volcó sobre HCl 5% y se extrajo con CH_2Cl_2 . La purificación del producto crudo (hexano / AcOEt 95:5) permitió obtener 140 mg de (22E)-5 α -estigmasta-2,22-dien-6 β -ol (41).

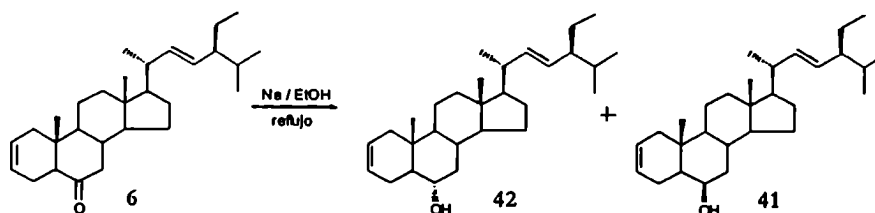
P.f.: 107°C.

RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3): 0,72 (H-18, 3H, *s*); 0,80 (H-27, 3H, *d*, $J = 6,5$); 0,81 (H-29, 3H, *t*, $J = 7,4$); 0,85 (H-26, 3H, *d*, $J = 6,5$); 0,97 (H-19, 3H, *s*); 1,02 (H-21, 3H, *d*, $J = 6,7$); 3,85 (H-6 α , 1H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y $8,5$); 5,16 (H-22, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y $8,6$); 5,56 – 5,71 (H-2 y H-3, 2H, *m*).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 12,2 y 12,2 (C-18 y C-29); 15,2 (C-19); 19,0 (C-26); 20,8 (C-11); 21,0 (C-21); 21,2 (C-27); 24,3 (C-15); 25,4 (C-28); 26,4 (C-4); 28,9 (C-16); 31,9 (C-25); 34,2 (C-8); 34,6 (C-10); 39,7 (C-12); 39,9 (C-1); 40,5 (C-20); 41,7 (C-7); 42,5 (C-13); 44,5 (C-5); 51,2 (C-24); 54,2 (C-9); 56,1 y 56,3 (C-14 y C-17); 70,5 (C-6); 125,6 (C-3); 125,7 (C-2); 129,3 (C-23); 138,3 (C-22).

EM (IE): m/z (int. rel.): 412 [M] $^+$ (2); 351 (1); 271 (3); 253 (3); 199 (2); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$: 412,3705, hallado: 412,3712.

(22E)-5 α -estigmasta-2,22-dien-6 α -ol (42).

A una solución de (22E)-estigmasta-2,22-dien-6-ona (6) en etanol anhidro (100 mg en 20 ml), mantenida a reflujo, se agregaron 53 mg de sodio en porciones pequeñas durante un período de 2 horas. Luego de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó y evaporó, generando un producto crudo que se purificó por cromatografía en columna. La elución con hexano / AcOEt (95:5) permitió obtener como primera fracción 12 mg de (22E)-5 α -estigmasta-2,22-dien-6 β -ol (41).

La posterior elución, con el mismo solvente, permitió obtener 83 mg de (22E)-5 α -estigmasta-2,22-dien-6 α -ol (42).

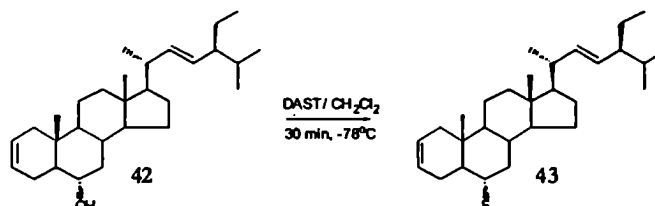
P.f.: 119°C

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,77 (H-19, 3H, *s*); 0,80 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,4); 1,02 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,7); 3,29 (H-6 β , 3H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,5); 5,16 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,56 – 5,71 (H-2 y H-3, 2H, *m*).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,2 y 12,3 (C-18 y C-29); 15,2 (C-19); 19,0 (C-26); 20,8 (C-11); 21,0 y 21,2 (C-21 y C-27); 24,3 (C-15); 25,4 (C-28); 26,4 (C-4); 28,9 (C-16); 31,9 (C-25); 34,2 (C-8); 34,6 (C-10); 39,7 (C-12); 39,9 (C-1); 40,5 (C-20); 41,7 (C-7); 42,5 (C-13); 44,5 (C-5); 51,2 (C-24); 54,2 (C-9); 56,1 y 56,3 (C-14 y C-17); 70,5 (C-6); 125,6 (C-3); 125,7 (C-2); 129,3 (C-23); 138,3 (C-22).

EM (IE): *m/z* (int.rel.): 412 [M] (2); 351 (1); 314 (1); 271 (4); 229 (3); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₂₉H₄₈O: 412,3705, hallado: 412,3699.

(22E)-6 α -fluoro-5 α -stigmas-2,22-dieno (43).

A una solución de (22E)-estigmasta-2,22-dien-6 α -ol (42) (78 mg, 0,19 mmol) en 10 ml de CH₂Cl₂ se agregó lentamente a una solución de DAST (0,1 ml) en 3 ml de CH₂Cl₂ a -78°C. La reacción se mantuvo bajo atmósfera inerte durante 20 minutos, se llevó a temperatura ambiente y se volcó sobre agua. La fase orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO₃, se secó y evaporó. Luego de

la purificación cromatográfica (hexano / AcOEt 98:2) se obtuvieron 63 mg de **(22E)-6 α -fluoro-5 α -estigmasta-2,22-dieno (43)**.

P.f.: 97°C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,77 (H-19, 3H, *s*); 0,80 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,5); 0,81 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,4); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,5); 1,02 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,7); 2,38 (H-4 β , 1H, *m*); 4,33 (H-6 β , 1H, *dm*, ²*J*_{HF} = 49,7); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,5); 5,16 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,56 – 5,71 (H-2 y H-3, 2H, *m*).

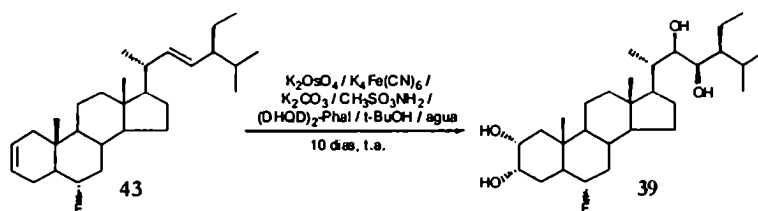
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,1 y 12,2 (C-18 y C-29); 13,0 (C-19); 19,0 (C-26); 21,0 (C-21); 21,0 (C-27); 24,2 (C-15); 20,8 (C-11); 25,3 (C-28); 25,4 (C-4, ¹*J*_{C-F} = 3,8); 28,7 (C-16); 31,9 (C-25); 33,9 (C-8, ¹*J*_{C-F} = 11,8); 35,7 (C-10, ¹*J*_{C-F} = 9,4); 38,0 (C-7, ²*J*_{C-F} = 16,3); 39,6 (C-12); 39,8 (C-1); 40,4 (C-20); 42,5 (C-13); 46,6 (C-5, ²*J*_{C-F} = 15,1); 51,2 (C-24); 53,4 (C-9); 56,0 y 56,1 (C-14 y C-17); 94,3 (C-6, ¹*J*_{C-F} = 169,1); 124,9 (C-3); 125,3 (C-2); 129,4 (C-23); 138,1 (C-22).

RMN-¹⁹F: -180,8 (*m*).

EM (IE): *m/z* (int. rel.): 414 [M]⁺ (1); 371 (1); 302 (3); 273 (5); 260 (3); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₂₉H₄₇F: 414,3662, hallado: 414,3656.

(22R,23R)-6 α -fluoro-5 α -estigmasta-2 α ,3 α ,22,23-tetraol (39).



60 mg de **(22E)-6 α -fluoro-5 α -stigmasta-2,22-dieno (43)** (0,14 mmol) se sometieron a una dihidroxilación catalítica asimétrica según la técnica habitual. El producto crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (gradiente cloruro de metileno / acetonitrilo) y se obtuvo **(22R,23R)-6 α -fluoro-5 α -estigmasta-2 α ,3 α ,22,23-tetraol (39)** con un 43 % de rendimiento.

P.f.: 221°C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 0,67 (H-18, 3H, *s*); 0,82 (H-19, 3H, *s*); 0,89 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,3); 0,92 – 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 3,56 (H-22, 1H, *d*, *J* = 8,9); 3,68 (H-23, 1H, *d*, *J* = 8,9); 3,71 (H-2 β , 1H, *m*); 3,99 (H-3 β , 1H, *d*, *J* = 3,0); 4,27 (H-6 β , *dm*, ²*J*_{HF} = 50,0).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 13,2 (C-19); 13,4 (C-29); 11,7 (C-18); 11,7 (C-21); 21,0 (C-27); 19,3 (C-26); 18,8 (C-28); 20,7 (C-11); 28,3 (C-4, ¹*J*_{C-F} = 3,6); 23,9 (C-15); 27,5 (C-16); 28,9 (C-25); 38,3 (C-10, ¹*J*_{C-F} = 8,8); 33,9 (C-8, ¹*J*_{C-F} = 10,5); 39,6 (C-1); 36,9 (C-20); 43,3 (C-5, ²*J*_{C-F} = 14,4); 37,9 (C-7, ²*J*_{C-F} = 17,7); 40,6 (C-12); 42,4 (C-13); 46,4 (C-24); 53,3 (C-9); 52,5 (C-17); 55,9 (C-14); 68,1 (C-3); 68,3 (C-2); 72,3 (C-23); 74,3 (C-22); 92,4 (C-6, ¹*J*_{C-F} = 168,8).

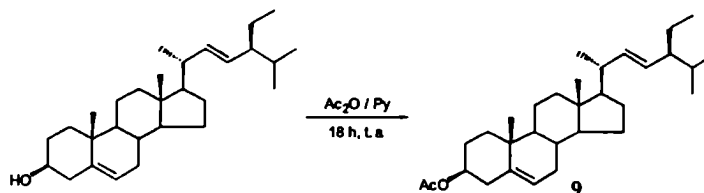
RMN-¹⁹F: -181,0 (*m*).

EM (FAB) *m/z* (int. rel.): 505 [M+Na]⁺ (12); 465 (10); 447 (9); 307 (15); 231 (27); 154 (100); 137

(88).

EMAR (FAB): Calculado para $C_{29}H_{51}O_4FNa$ $[M+Na]^+$: 505,3669, hallado: 505,3649.

8.2.4. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS MODIFICADOS EN C-5 (COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 5).

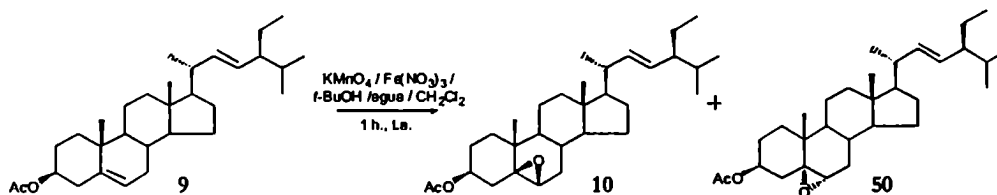
Acetato de (22E)-5 α -estigmasterol-5,22-dien-3 β -ilo (9).

A una solución de 10 g estigmasterol (24,3 mmol) en 200 ml de piridina seca se agregaron 100 ml de anhídrido acético. La mezcla se dejó a temperatura ambiente y protegida de la luz una noche, luego de lo cual se volcó sobre HCl 5% frío. El producto crudo se filtró y secó. Se obtuvo el compuesto **acetato de (22E)-5 α -estigmasterol-5,22-dien-3 β -ilo (9)** con un rendimiento de 97 %.

P.f.: 141-142°C.

RMN- 1H (200 MHz, $CDCl_3$): 0,72 (H-18, 3H, s); 1,04 (H-19, 3H, s); 2,04 (CH_3CO- , 3H, s); 4,30 (H-3 α , 1H, m); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, m); 5,30 (H-6, 1H, d, $J=4$).

RMN- ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$): 12,0 y 12,2 (C-18 y C-29); 19,0 y 19,3 (C-19 y C-19); 21,0 (C-11); 21,0 y 21,3 (C-21 y C-27); 21,2 (CH_3CO-); 24,3 (C-15); 25,4 (C-28); 27,7 (C-2); 28,9 (C-16); 31,8 (C-7); 31,8 (C-8); 31,8 (C-25); 36,5 (C-10); 37,0 (C-1); 38,1 y 39,6 (C-4 y C-12); 40,5 (C-20); 42,2 (C-13); 50,0 (C-9); 51,2 (C-24); 55,9 y 56,7 (C-17 y C-14); 73,8 (C-3); 122,4 (C-6); 129,1 (C-23); 138,1 (C-22); 139,4 (C-5); 175,5 (CH_3CO-).

Acetato de (22E)-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ilo (10).

Una mezcla de permanganato de potasio (2g, 12,65 mmol) y nitrato férrico noahidratado (1 g, 2,47 mmol) se molió en mortero hasta obtener un polvo fino y se agregaron 0,1 ml de agua. Esta mezcla se suspendió en 20 ml de cloruro de metileno, se agregaron 2 ml de *t*-butanol y 2 g (4,08 mmol) de **acetato de (22E)-5 α -estigmasterol-5,22-dien-3 β -ilo (9)**. Después de 1 hora de reacción, el producto se separó del residuo inorgánico agregando 50 ml de dietiléter y filtrando a través de un lecho de

Celite. El sólido resultante de la evaporación del solvente se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / acetato de etilo 97:3) obteniéndose **acetato de (22E)-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ilo (10)**¹⁴ con un rendimiento de 73%.

P.f.: 139°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,66 (H-18, 3H, s); 1,09 (H-19, 3H, s); 2,02 (CH₃CO-, 3H, s); 3,05 (H-6 α , 1H, d, J = 2); 4,75 (H-3 α , 1H, m); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, m).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 11,6 y 12,0 (C-18 y C-29); 16,5 (C-19); 19,3 (C-26); 20,9 (C-11); 21,2 (CH₃CO-); 21,8 y 20,9 (C-21 y C-27); 24,4 (C-15); 25,3 (C-28); 27,1 (C-2); 29,1 (C-16); 29,7 (C-8); 32,4 (C-7); 32,4 (C-25); 35,0 (C-10); 36,6 (C-1); 37,9 (C-4); 39,6 (C-12); 40,4 (C-20); 42,6 (C-13); 50,8 (C-9); 51,0 (C-24); 55,3 y 55,3 (C-14 y C-17); 62,4 (C-5); 63,3 (C-6); 71,2 (C-3); 129,3 (C-23); 138,1 (C-22); 170,5 (CH₃CO-).

EM (IE) m/z (int. rel): 470 [M]⁺ (4); 410 (80); 393 (7); 382 (14); 378 (6); 269 (2); 55 (100).

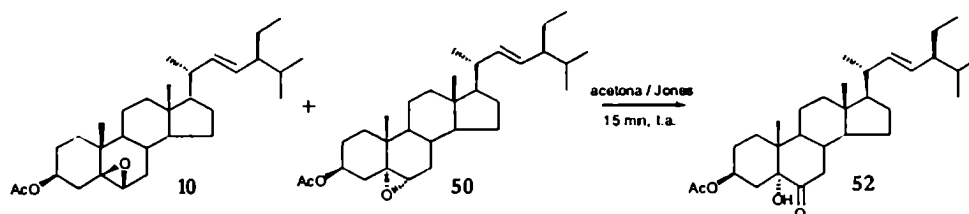
La elución posterior, con el mismo solvente, permitió obtener **acetato de (22E)-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-en-3 β -ilo (50)**.

P.f.: 192°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,63 (H-18, 3H, s), 1,00 (H-19, 3H, s), 2,02 (CH₃CO-, 3H, s), 2,90 (H-6 β , 1H, d, J = 2), 4,77 (H-3 α , 1H, m), 5,10 (H-22 y H-23, 2H, m).

EM (IE) m/z (int. rel): 470 [M]⁺ (5); 410 (92); 393 (5); 382 (10); 378 (6); 269 (2); 55 (100).

Acetato de (22E)-5-hidroxi-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (52).



A una solución de **acetato de (22E)-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ilo (10)** y **acetato de (22E)-5 α ,6 α -epoxiestigmast-22-en-3 β -ilo (50)** (345 mg, 0,73 mmol) disueltos en 25 ml de acetona se agregaron 0,5 ml de reactivo de Jones. La reacción se detuvo por el agregado gota a gota de isopropanol. La mezcla se neutralizó agregando bicarbonato de sodio sólido, se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 85:15) y se obtuvo **acetato de (22E)-5-hidroxi-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (52)**¹⁴ con un rendimiento de 87%.

P.f.: 252 °C.

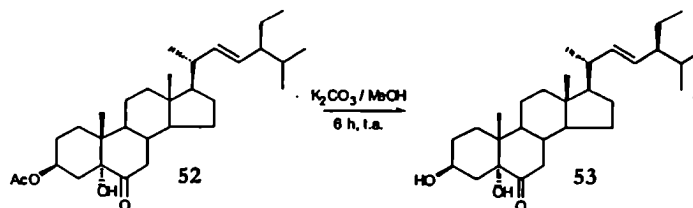
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,66 (H-18, 3H, s); 0,80 (H-19, 3H, s); 2,40 (CH₃CO-, 3H, s); 5,00 (H-3 α , 1H, m); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, m).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,2 y 12,2 (C-18 y C-29); 13,9 (C-19); 19,0 (C-26); 21,1 y 21,3 (C-21 y C-27); 21,2 (C-11); 21,2 (CH₃CO-); 24,0 (C-15); 25,4 (C-28); 26,3 (C-2); 28,8 (C-16); 29,5 (C-1); 31,8

(C-25); 32,3 (C-4); 37,3 (C-8); 39,5 (C-12); 40,4 (C-20); 41,7 (C-7); 42,5 y 43,0 (C-10 y C-13); 44,3 (C-9); 51,2 (C-24); 56,0 y 56,4 (C-14 y C-17); 70,8 (C-3); 80,2 (C-5); 129,6 (C-23); 138,1 (C-22); 170,5 (CH₃CO-); 212,4 (C-6).

EM (IE) m/z (int, rel): 486 [M]⁺ (3); 426 (3); 408 (4); 365 (13); 269 (14); 55 (100).

(22E)-3 β ,5-Dihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (53).



Se disolvieron 325 mg (0,62 mmol) de acetato de (22E)-5-hidroxi-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo¹⁸ (52) en 100 ml de metanol y se agregaron 100 mg (0,72 mmol) de carbonato de potasio. La mezcla de reacción se mantuvo por 6 horas a temperatura ambiente y se neutralizó con solución saturada de cloruro de amonio. Se evaporó el metanol a presión reducida y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno; la fase orgánica resultante se secó y evaporó. El producto crudo se purificó por cromatografía (hexano / AcOEt 1:1) y se obtuvo (22E)-3 β ,5-dihidroxi -5 α -estigmast-22-en-6-ona (53) con un rendimiento de 94%.

P.f.: 250°C.

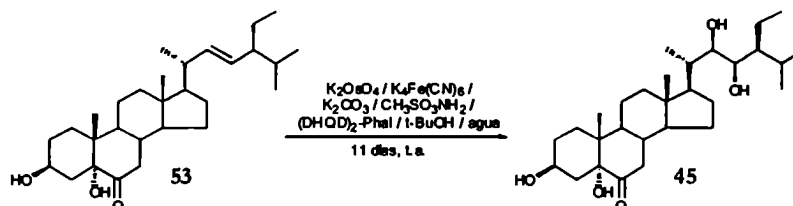
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,67 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,82 (H-19, 3H, *s*); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,6); 2,58 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,6 y 12,5); 3,95 (H-3 α , 1H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 11,8 (C-18 y C-29); 13,6 (C-19); 18,6 (C-26); 20,7 (C-11); 20,7 y 21,0 (C-27 y C-21); 23,6 (C-15); 24,9 (C-28); 28,3 (C-16); 29,5 (C-2); 30,0 (C-1); 31,4 (C-25); 35,7 (C-4); 37,0 (C-8); 39,1 (C-12); 40,0 (C-20); 41,5 (C-7); 42,0 (C-13); 42,6 (C-10); 43,9 (C-9); 50,8 (C-24); 55,5 (C-17); 56,0 (C-14); 66,3 (C-3); 79,7 (C-5); 129,0 (C-23); 137,7 (C-22); 212,9 (C-6).

EM (IE) m/z (int. rel): 444 [M]⁺ (0,6); 426 (0,2); 383 (0,4); 365 (0,7); 303 (1); 269 (2); 42 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₂₉H₄₈O₃: 444,3603, hallado 444,3604.

(22R,23R)-3 β ,5,22,23-Tetrahidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (45).



252 mg (0,57 mmol) de (22E)-3 β ,5-dihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (53) se sometieron a una dihidroxilación catalítica asimétrica según la técnica habitual. El producto crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (cloruro de metileno / isopropanol) para dar (22R, 23R)-3 β ,5,22,23-tetrahidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (45) (25 % de rendimiento).

P.f.: 238°C.

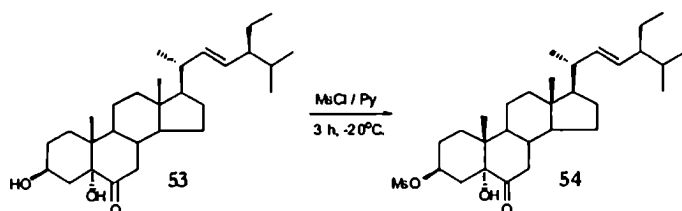
RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 0,67 (H-18, 3H, *s*); 0,82 (H-19, 3H, *s*); 0,91 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,8); 0,92 - 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 2,58 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,6 y 12,5); 3,58 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,71 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,95 (H-3 α , 1H, *m*).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 11,6 (C-21); 11,8 (C-18); 13,2 (C-29); 13,6 (C-19); 19,0 (C-28); 19,2 (C-26); 20,7 (C-11); 20,9 (C-27); 23,6 (C-15); 28,3 (C-16); 28,8 (C-25); 29,5 (C-2); 30,1 (C-1); 35,7 (C-4); 36,8 (C-20); 37,0 (C-8); 39,1 (C-12); 41,6 (C-7); 42,0 (C-13); 42,6 (C-10); 43,9 (C-9); 46,4 (C-24); 55,5 (C-17); 55,8 (C-14); 66,1 (C-3); 72,2 (C-23); 74,1 (C-22); 79,7 (C-5); 212,8 (C-6).

EM (FAB) *m/z* (int. rel): 479 [M+H]⁺ (25); 461 (15); 443 (33); 425 (100).

EMAR (FAB): Calculado para C₂₉H₅₁O₅ [M+H]⁺: 479,3737, hallado 479,3733.

Metansulfonato de (22E)-5-hidroxi-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (54).



Se disolvieron 260 mg (0,58 mmol) de (22E)-3 β ,5-dihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (53) en piridina, y se enfrió a -20°C. Se agregaron gota a gota, a lo largo de 2 horas, 0,15 ml de cloruro de metansulfonilo. La mezcla se volcó sobre agua y se extrajo con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con HCl 5%, con agua, se secó y evaporó. La purificación del crudo por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 85:15) dio un 83 % de metansulfonato de (22E)-5-hidroxi-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (54).

P.f.: 150°C (descompone).

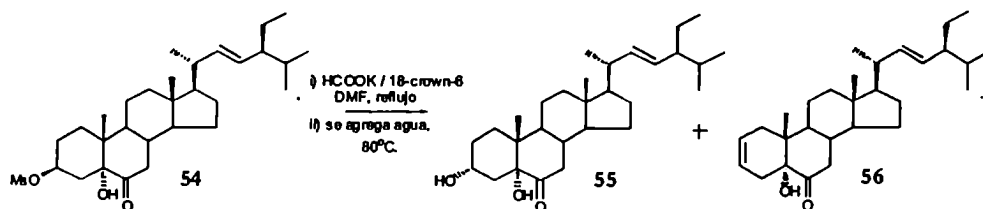
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,84 (H-19, 3H, *s*); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 2,71 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,6 y 12,5); 3,02 (CH₃SO₃, 3H, *s*); 4,95 - 5,07 (H-3 α y H-23, 2H, *m*); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 11,9 y 12,1 (C-29 y C-18); 13,7 (C-19); 18,9 (C-26); 21,0 y 21,3 (C-27 and C-21); 21,1 (C-11); 23,9 (C-15); 25,3 (C-28); 27,5 (C-2); 28,6 (C-16); 29,6 (C-1); 31,7 (C-25); 33,5 (C-4); 37,2 (C-8); 38,5 (CH₃SO₃-); 39,3 (C-12); 40,3 (C-20); 41,6 (C-7); 42,3 (C-13); 42,9 (C-10); 44,1 (C-9); 51,1 (C-24); 55,8 y 56,3 (C-17 y C-14); 79,5 (C-3); 80,3 (C-5); 129,5 (C-23); 137,9 (C-22); 212,4 (C-6).

EM (IE) m/z (int. rel): 522 $[M]^+$ (3); 504 (1); 426 (8); 408 (11); 365 (19); 269 (24); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para $C_{30}H_{50}O_5S$: 522,3379, hallado 522,3379.

(22E)-3 α ,5-Dihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (55).



Una solución de metansulfonato de (22E)-5-hidroxi-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (54) (250 mg, 0,48 mmol) en 10 ml de DMF se reflujoó con formiato de potasio (85 mg, 1,0 mmol), bajo nitrógeno, durante 6 horas. Se agregó 1 ml de agua y se mantuvo a 80°C durante 3 horas más. El solvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se particionó entre agua y cloruro de metileno. La fase orgánica se secó y evaporó. La purificación por cromatografía del producto crudo permitió obtener (22E)-5-hidroxi-5 α -estigmastan-2,22-dien-6-ona¹⁹ (56) con un rendimiento de 14 %.

P.f.: 155°C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,67 (H-18, 3H, *s*); 0,71 (H-19, 3H, *s*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*), 5,65 (H-2 y H-3, 2H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,4 y 12,5 (C-18 y C-29); 14,6 (C-19); 19,1 (C-26); 21,1 (C-11); 21,3 y 21,3 (C-21 y C-27); 24,1 (C-15); 25,5 (C-28); 28,8 (C-16); 32,0 (C-25); 34,6 (C-1); 35,6 (C-4); 37,5 (C-8); 39,5 (C-12); 40,5 (C-20); 42,4 (C-7); 42,7 y 42,9 (C-10 y C-13); 45,3 (C-9); 51,3 (C-24); 56,6 y 56,9 (C-14 y C-17); 78,1 (C-5); 122,4 (C-3); 125,4 (C-2); 129,5 (C-23); 137,9 (C-22); 211,2 (C-6).

EM (IE) m/z (int. rel): 426 $[M]^+$ (12); 408 (5); 83 (25); 55 (100).

Por elución posterior se obtuvo (22E)-3 α ,5-dihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (55), con un rendimiento de 74 %.

P.f.: 209-211°C

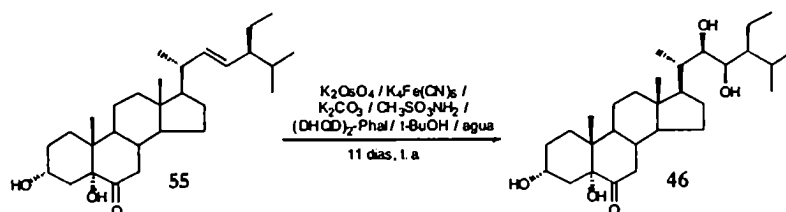
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,67 (H-18, 3H, *s*), 0,75 (H-19, 3H, *s*), 0,79 (H-27 3H, *d*, $J = 6,0$), 0,80 (H-29 3H, *t*, $J = 7,2$), 0,85 (H-26 3H, *d*, $J = 6,3$), 2,71 (H-7 α , 1H, *dd*, $J = 12,6$ y $12,6$), 4,30 (H-3 β , 1H, *m*), 5,02 (H-23, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y $8,6$), 5,15 (H-22, 1H, *dd*, $J = 15,1$ y $8,6$).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,2 (C-18 y C-29); 13,7 (C-19); 19,0 (C-26); 21,1 (C-11); 21,1 y 21,2 (C-21 y C-27); 24,0 (C-15); 25,4 (C-2); 25,4 (C-28); 28,3 (C-1); 28,8 (C-16); 31,4 (C-4); 31,9 (C-25); 37,7 (C-8); 39,6 (C-12); 40,5 (C-20); 41,7 (C-7); 43,0 (C-13); 43,8 (C-10); 44,8 (C-9); 51,2 (C-24); 56,0 y 56,5 (C-17 y C-14); 67,5 (C-3); 80,3 (C-5); 129,5 (C-23); 138,1 (C-22); 211,9 (C-6).

EM (IE) m/z (int. rel): 444 $[M]^+$ (11); 426 (12); 408 (5); 365 (21); 269 (26); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para $C_{29}H_{48}O_3$: 444,3603, hallado 444,3604.

(22R,23R)-3 α ,5,22,23-Tetrahidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (46).



150 mg (0,34 mmol) de **(22E)-3 α ,5-dihidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (55)** se sometieron a una dihidroxilación catalítica asimétrica según la técnica habitual. El producto crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (cloruro de metileno / isopropanol) para dar **(22R, 23R)-3 α ,5,22,23-tetrahidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (46)** (26 % de rendimiento).

P.f.: 238°C.

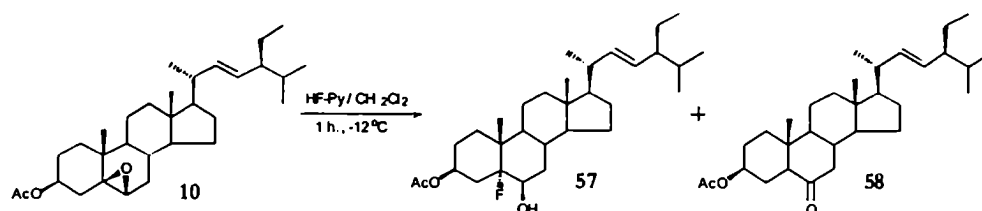
RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): 0,67 (H-18, 3H, *s*); 0,75 (H-19, 3H, *s*); 0,91 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,8); 0,92 - 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 2,71 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,6 y 12,5); 3,58 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,71 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,87 (H-3 β , 1H, *m*).

RMN- ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): 11,6 (C-21); 12,2 (C-18); 13,3 (C-29); 13,7 (C-19); 19,0 (C-28); 19,2 (C-26); 20,9 (C-27); 21,1 (C-11); 24,0 (C-15); 25,4 (C-2); 28,3 (C-1); 28,8 (C-25); 28,8 (C-16); 31,4 (C-4); 36,7 (C-20); 37,7 (C-8); 39,6 (C-12); 41,7 (C-7); 43,0 (C-13); 43,8 (C-10); 44,8 (C-9); 46,4 (C-24); 56,0 y 56,5 (C-17 y C-14); 67,5 (C-3); 72,2 (C-23); 74,2 (C-22); 80,3 (C-5); 211,9 (C-6).

EM (FAB) *m/z* (int. rel): 479 $[M+H]^+$ (23); 477 (2) $^+$; 461 $[M+H-H_2O]^+$ (31); 443 (45); 425 (100).

EMAR (FAB): Calculado para $C_{29}H_{49}O_5$ (M-H) $^+$: 477,3580, hallado 479,3567.

Acetato de (22E)-5-fluoro-6 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (57).



En un recipiente de polietileno, conteniendo 15 ml de diclorometano, se disolvieron 250 mg de acetato de **(22E)-5 β ,6 β -epoxiestigmast-22-en-3 β -ilo (10)** (0,53 mmol). La solución se enfrió en baño de hielo / sal a -12°C, y se agregaron 0,5 ml de solución de HF-Py. La agitación se mantuvo durante 1 hora. La mezcla de reacción se volcó sobre agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó lavó 4 veces con solución saturada de bicarbonato de sodio, se secó y se evaporó a

presión reducida. El residuo se disolvió en tolueno y se volvió a vaporar para eliminar la piridina presente. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (hexano / AcOEt 9 : 1) para dar acetato de (22E)-5-fluoro-6 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (57), con un rendimiento de 89 %.

P.f.: 215- 216 °C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,70 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,6); 1,16 (H-19, 3H, *s*); 2,02 (CH₃CO-, 3H, *s*); 3,73 (H-6 α , 1H, *dt*, *J*_{H-H} = 4,5 y *J* = 2,3); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,07 (H-3 α , 1H, *m*); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,2 y 12,3 (C-29 y C-18); 19,0 (C-26); 21,0 (C-11); 21,1 (CH₃COO-); 21,2 (C-21 y C-27); 16,5 (C-19, *d*, *J*_{CF} = 6,1); 24,2 (C-15); 25,4 (C-28); 26,5 (C-2); 28,8 (C-16); 29,7 (C-1); 31,9 (C-25); 32,0 (C-8); 35,0 (C-7); 39,7 (C-12); 40,4 (C-20); 42,6 (C-13); 45,9 (C-9); 51,2 (C-24); 35,4 (C-4, *d*, *J*_{CF} = 20,2); 55,8 56,0 (C-17 y (C-14); 38,4 (C-10, *d*, *J*_{CF} = 19,3); 70,4 (C-3, *d*, *J*_{CF} = 3,8); 73,0 (C-6, *d*, *J*_{CF} = 35,4); 98,6 (C-5, *d*, *J*_{CF} = 166,9); 129,4 (C-23); 138,2 (C-22); 170,4 (CH₃COO-).

RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): -161,2 (*d*, *J*_{HF} = 39,5).

EM (IE) *m/z* (int. rel): 490 [M]⁺ (9); 475 (1); 447 (3); 349 (21); 43 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₃₁H₅₁O₃F: 490,3822; hallado 490,3823.

También pudo aislarse acetato de (22E)-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo⁷ (58) con un rendimiento de 5 %

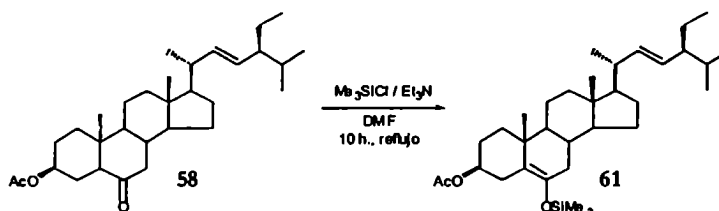
P.f.: 147 °C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,77 (H-19, 3H, *s*); 2,18 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,1 y 2,2); 2,30 (H-5 α , 1H, *dd*, *J* = 12,5 y 4,0); 2,40 (CH₃COO-, 3H, *s*); 4,67 (H-3 α , 1H, *m*); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0 y 12,1 (C-18 y C-29); 12,9 (C-19); 18,7 (C-26); 20,8, 21,1 y 21,2 (C-21, C-27 y CH₃COO-); 20,9 (C-11); 23,7 (C-15); 25,1 (C-28); 27,4 (C-16); 25,8 (C-2); 31,5 (C-25); 26,6 (C-4); 36,1 (C-1); 37,6 (C-8); 39,1 (C-12); 40,3 (C-20); 40,9 (C-10); 42,6 (C-13); 46,3 (C-7); 50,9 (C-24); 53,5 (C-9); 56,5 (C-5); 56,1 y 56,6 (C-17 y C-14); 72,5 (C-3); 129,3 (C-23); 137,9 (C-22); 170,5 (CH₃COO-); 209,6 (C-6).

EM (IE) *m/z* (int. rel): 470 [M]⁺ (22); 427 (4); 410 (4); 367 (20); 358 (31); 271 (25); 43 (100).

Acetato de (22E)-6-(trimetilsililo)-5,22-dien-3 β -ilo (61).



Se disolvieron 650 mg (1,4 mmol) de acetato de (22E)-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (58) en 15 ml de DMF. Se agregaron 0,5 ml de cloruro de trimetilsililo y 1 ml de trietilamina. La mezcla se reflujo durante 10 horas, se llevó a temperatura ambiente, y se diluyó con 50 ml de diclorometano. Se lavó con s.s. de NaHCO₃, y la fase orgánica resultante se evaporó a presión reducida. El producto crudo se utilizó directamente en la reacción subsiguiente. El contenido del enol silil éter en la mezcla obtenida se estimó a partir de la integración de las señales de los hidrógenos 22 y 23 y la correspondiente al grupo trimetilsililo, y resultó ser de un 73%, aproximadamente.

La purificación de parte de la mezcla obtenida, permitió separar el acetato de (22E)-6-(trimetilsililo)-5,22-dien-3 β -ilo (61) como un aceite.

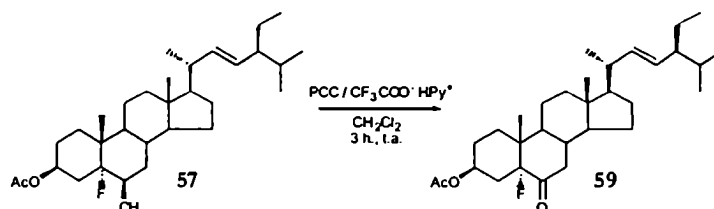
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,23 ((CH₃)₃SiO-, 9H, s); 0,71 (H-18, 3H, s); 0,91 (H-19, 3H, s); 2,04 (CH₃CO-, 3H, s); 4,30 (H-3 α , 1H, m); 5,10 (H-22 y H-23, 2H, m).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,0 y 12,2 (C-18 y C-29); 19,0 (C-26); 19,3 (C-19); 21,0 (C-11); 21,0 y 21,3 (C-21 y C-27); 21,2 (CH₃CO-); 24,3 (C-15); 25,4 (C-28); 26,9 y 28,0 (C-2 y C-4); 28,9 (C-16); 31,8 (C-25); 32,9 (C-10); 36,2 (C-8); 36,5 y 37,5 (C-1 y C-7); 39,6 (C-12); 40,5 (C-20); 42,2 (C-13); 48,1 (C-9); 51,2 (C-24); 55,9 y 56,7 (C-17 y C-14); 73,8 (C-3); 120,6 (C-5); 129,1 (C-23); 138,1 (C-22); 151,5 (C-6); 175,5 (CH₃CO-).

EM (IE) *m/z* (int. rel): 542 [M]⁺ (0,1); 467 (0,3); 410 (1); 347 (2); 43 (100).

Acetato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (59).

Método a)



Se trató una solución de acetato de (22E)-5-fluoro-6 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (57) (300 mg, 0,61 mmol), en cloruro de metileno (60 ml), con clorocromato de piridonio (500 mg, 1,32 mmol) y trifluoroacetato de piridonio (100 mg, 0,52 mmol). La suspensión se mantuvo con agitación a temperatura ambiente por 3 horas. Luego de filtrar a través de un lecho de Celite, la solución se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 95:5) permitió aislar acetato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (59), con un rendimiento del 84%.

P.f.: 162- 163 °C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,67 (H-18, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, d, *J* = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, t, *J* = 7,2); 0,83 (H-19, 3H, s); 0,85 (H-26, 3H, d, *J* = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, d, *J* = 6,6); 2,05 (CH₃CO-, 3H, s); 2,70 (H-7 α , dd, *J* = 12,6 y 12,3); 5,02 (H-23, 1H, dd, *J* = 15,1 y 8,6); 5,04 (H-3 α , 1H, m); 5,15 (H-22, 1H, dd, *J* = 15,1 y 8,6).

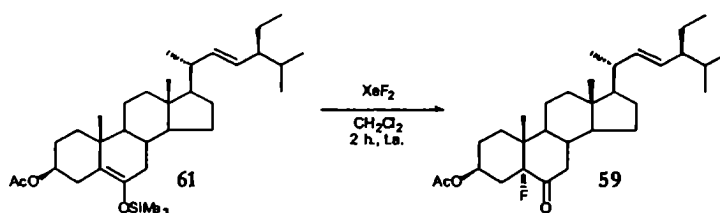
RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 12,1 y 12,2 (C-29 y C-18); 13,7 (C-19, d , $^1J_{\text{CF}} = 5,1$); 18,9 (C-26); 21,1 (C-11); 21,1 y 21,3 (C-27 y C-21); 21,2 (CH_3CO); 23,9 (C-15); 25,4 (C-28); 26,0 (C-2); 28,7 (C-16); 30,3 (C-1); 30,5 (C-4, d , $^1J_{\text{CF}} = 25,3$); 31,8 (C-25); 37,8 (C-8); 39,2 (C-12); 40,4 (C-20); 42,5 (C-7); 42,9 (C-13); 45,4 (C-9, d , $^1J_{\text{CF}} = 3,9$); 51,2 (C-24); 55,8 y 56,3 (C-17 y C-14); 43,2 (C-10, d , $^1J_{\text{CF}} = 19,8$); 69,6 (C-3); 100,8 (C-5, d , $^1J_{\text{CF}} = 176,0$); 129,6 (C-23); 137,9 (C-22); 170,4 (CH_3COO -); 207,2 (C-6, d , $^1J_{\text{CF}} = 27,1$).

RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): -159,7 (d , $^1J_{\text{FH}} = 42,5$).

EM (IE) m/z (int. rel): 488 $[\text{M}]^+$ (0,3); 445 (0,2); 410 (1); 347 (2); 43 (100).

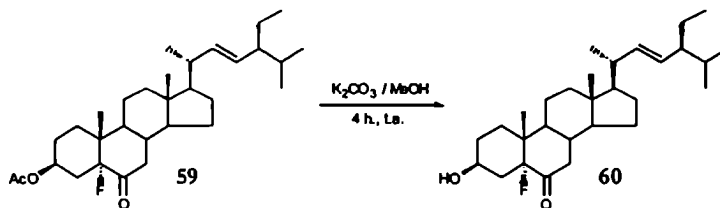
EMAR (IE): Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{O}_3\text{F}$: 488,3666, hallado 488,3663.

Método b)



Se disolvió 310 mg de una mezcla conteniendo aproximadamente 70 % de acetato de (22E)-6-(trimetilsililo)-5,22-dien-3 β -ilo (61) en diclorometano anhidro. Se agregaron 170 mg (0,9 mmol) de difluoruro de xenón, y se mantuvo la agitación de la solución durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se lavó entonces con NaHCO_3 (s.s.), y la fase orgánica se secó y evaporó. Se obtuvo un producto que, al ser purificado por cromatografía en columna de sílica, permitió obtener el acetato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (59) con un rendimiento cercano al 72 %.

(22E)-5-Fluoro-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (60).



A una solución de acetato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-6-ona-3 β -ilo (59) (540 mg, 1,10 mmol) en metanol (60 ml) se agregó carbonato de potasio (100 mg, 0,72 mmol). Después de 4 horas de reacción a temperatura ambiente, se agregó cloruro de amonio (s. s.) hasta neutralidad. Se evaporó el metanol a presión reducida y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno. La fase orgánica se secó y evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 9:1) y se obtuvo (22E)-5-fluoro-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (60) con un 96%

de rendimiento.

P.f.: 149- 151°C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,85 (H-26 3H, *d*, *J* = 6,3); 0,90 (H-19, 3H, *s*); 1,01 (H-21 3H, *d*, *J* = 6,6); 2,70 (H-7α, *dd*, *J* = 12,6 y 12,3); 4,05 (H-3α, 1H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6).

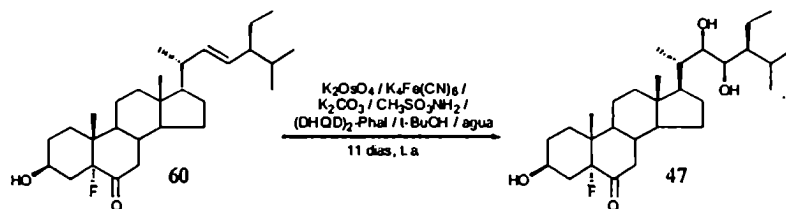
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,2 (C-18 y C-29); 13,8 (C-19, *d*, *J*_{CF} = 5,9); 19,0 (C-26); 21,1 y 21,2 (C-21 y C-27); 21,2 (C-11); 24,0 (C-15); 25,4 (C-28); 28,6 (C-16); 30,0 y 30,8 (C-1 y C-2); 31,9 (C-5); 33,9 (C-4, *d*, *J*_{CF} = 22,2); 37,8 (C-8); 39,4 (C-12); 40,3 (C-20); 42,7 (C-7); 43,2 (C-10, *d*, *J*_{CF} = 15,3); 42,9 (C-13); 45,6 (C-9); 51,2 (C-24); 56,0 y 56,5 (C-17 y C-14); 66,9 (C-3); 101,3 (C-5, *d*, *J*_{CF} = 175,4); 129,7 (C-23); 137,9 (C-22); 207,2 (C-6, *d*, *J*_{CF} = 26,8).

RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): -159,1 (*d*, *J*_{CF} = 42,5).

EM (IE) *m/z* (int. rel.): 446 [M]⁺ (14); 426 (4); 403 (9); 333 (23); 305 (33); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₂₉H₄₇O₂F: 446,3560, hallado 446,3560.

(22R,23R)-5-Fluoro-3β,22,23-trihidroxi-5α-estigmastan-6-ona (47).



La dihidroxilación catalítica asimétrica de 198 mg (0.44 mmol) de **(22E)-5-fluoro-3β-hidroxi-5α-estigmast-22-en-6-ona (60)**, según la técnica habitual, permitió obtener **(22R,23R)-5-fluoro-3β,22,23-trihidroxi-5α-estigmastan-6-ona (47)**, con un rendimiento de 19 %. La purificación se efectuó por cromatografía en columna de sílica (gradiente hexano / AcOEt).

P.f.: 207°C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,90 (H-19, 3H, *s*); 0,91 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,8); 0,92 - 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, *m*); 2,58 (H-7α, 1H, *dd*, *J* = 12,5 y 12,5); 3,58 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,71 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 8,4 y 1,3); 3,88 (H-3α, 1H, *m*).

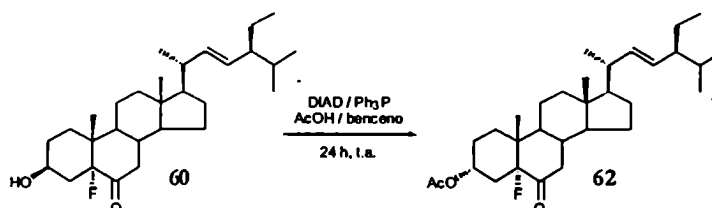
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃ / MeOD 95:5): 11,6 (C-21); 12,2 (C-18); 13,3 (C-29); 13,8 (C-19, *d*, *J*_{CF} = 6,2); 18,7 (C-28); 19,1 (C-26); 21,2 (C-27); 21,2 (C-11); 24,0 (C-15); 28,6 (C-16); 28,7 (C-25); 30,0 y 30,8 (C-1 y C-2); 33,9 (C-4, *d*, *J*_{CF} = 22,1); 36,8 (C-20); 37,8 (C-8); 39,4 (C-12); 42,7 (C-7); 42,9 (C-13); 43,2 (C-10, *d*, *J*_{CF} = 14,8); 45,6 (C-9); 46,5 (C-24); 56,0 y 56,5 (C-17 y C-14); 66,9 (C-3); 72,0 (C-23); 74,1 (C-22); 101,3 (C-5, *d*, *J*_{CF} = 176,9); 207,2 (C-6, *d*, *J*_{CF} = 27,2).

RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3 / MeOD 95:5): -159,1 (d , $^1J_{\text{HF}} = 42,5$).

EM (FAB) m/z (int. rel.): 481 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (25); 463 (100); 445 (81); 425 (22).

EMAR (FAB): Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{F}$ ($\text{M}-\text{H}$) $^+$: 479.3537, hallado 479.3529.

Acetato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 α -ilo (62).



A una solución de (22E)-5-fluoro-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (59) (450 mg, 1,01 mmol), ácido acético (0,05 ml) y trifenilfosfina (430 mg, 1,68 mmol) en 15 ml de benceno seco se agregó, gota a gota, azadicarboxilato de isopropilo (DIAD, 350 mg, 2,01 mmol) previamente disueltos en 5 ml de benceno. Se mantuvo la agitación a temperatura ambiente por 24 horas en atmósfera inerte, luego de lo cual se evaporó el solvente a presión reducida. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna de sílica (hexano) permitió obtener acetato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 α -ilo (62) con un rendimiento del 77%.

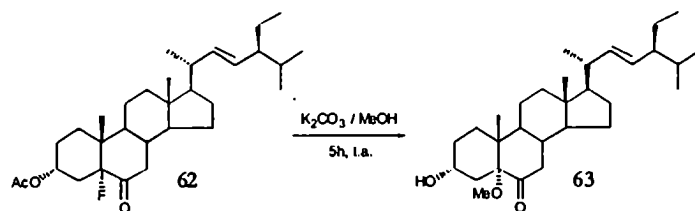
P.f.: 154 °C.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3): 0,67 (H-18, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, d , $J = 6,0$); 0,80 (H-29, 3H, t , $J = 7,2$); 0,80 (H-19, 3H, s); 0,85 (H-26, 3H, d , $J = 6,3$); 1,01 (H-21, 3H, d , $J = 6,6$); 2,03 (CH_3COO -, 1H, s); 2,61 (H-7 α , dd , $J = 12,6$ y $12,3$); 4,95 (H-3 β , 1H, m); 5,02 (H-23, 1H, dd , $J = 15,1$ y $8,6$); 5,15 (H-22, 1H, dd , $J = 15,1$ y $8,6$); .

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): 12,2 (C-18 y C-29); 13,6 (C-19, d , $^1J_{\text{CF}} = 5,4$); 19,0 (C-26); 21,0 (CH_3COO); 21,0 y 21,1 (C-21 y C-27); 21,4 (C-11); 23,9 (C-15); 24,8 y 26,5 (C-1 y C-2); 25,3 (C-28); 28,1 (C-4, d , $^2J_{\text{CF}} = 22,0$); 28,6 (C-16); 31,8 (C-25); 37,9 (C-8); 39,4 (C-12); 40,4 (C-20); 42,3 (C-7); 43,4 (C-10, d , $^2J_{\text{CF}} = 20,3$); 43,1 (C-13); 45,4 (C-9, d , $^1J_{\text{CF}} = 5,4$); 51,2 (C-24); 55,8 y 56,4 (C-17 y C-14); 67,3 (C-3); 99,2 (C-5, d , $^1J_{\text{CF}} = 177,7$); 129,7 (C-23); 137,9 (C-22); 170,6 (CH_3COO); 207,9 (C-6, d , $^2J_{\text{CF}} = 28,5$).

RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): -157,5 (d , $^1J_{\text{HF}} = 45,0$).

EM (IE) m/z (int. rel.): 488 $[\text{M}]^+$ (2); 445 (1); 408 (2); 375 (5); 347 (8); 269 (5); 55 (100).

(22E)-3 α -Hidroxi-5-metoxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (63).

Se disolvieron 250 mg (0,51 mmol) de acetato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 α -ilo (62) en 50 ml de metanol. Se agregaron 70 mg (0,66 mmol) de carbonato de sodio, y se mantuvo la agitación durante 5 horas, a temperatura ambiente. Se neutralizó con HCl 2M, se evaporó el metanol y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó, evaporó y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 8:2). Se obtuvo un 86% de (22E)-3 α -Hidroxi-5-metoxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (63).

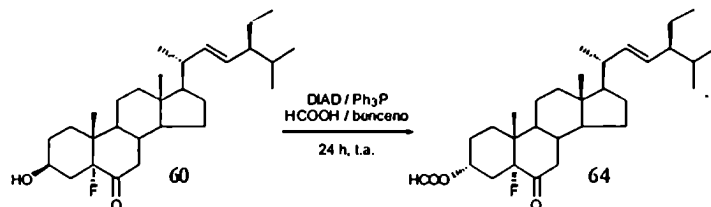
P.f.: 163 °C.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): 0,67 (H-18, 3H, s); 0,79 (H-19, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, d, J = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, t, J = 7,2); 0,85 (H-26, 3H, d, J = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, d, J = 6,6); 2,33 (H-7 α , t, J = 12,6); 3,22 (CH₃O-, 3H, s); 3,97 (H-3 β , 1H, m); 5,02 (H-23, 1H, dd, J = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, dd, J = 15,1 y 8,6).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): 12,2 (C-18 y C-29); 14,0 (C-19); 19,0 (C-26); 21,0 (C-21); 21,1 (C-11); 21,1 (C-27); 25,1 (C-2); 25,2 (C-4); 25,4 (C-28); 28,3 (C-1); 28,7 (C-16); 31,9 (C-25); 37,9 (C-8); 39,5 (C-12); 40,4 (C-20); 43,0 y 44,3 (C-10 y C-13); 43,1 (C-7); 44,2 (C-9); 51,2 (C-24); 52,1 (CH₃O-) 55,9 (C-14); 56,7 (C-15); 56,7 (C-17); 66,4 (C-3); 86,7 (C-5); 129,6 (C-23); 137,9 (C-22); 212,7 (C-6).

EM (IE) m/z (int. rel): 458 [M]⁺ (5); 365 (3); 269 (6); 241 (6); 123 (15); 97 (42); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₃₀H₅₀O₃: 458,3760, hallado 458,3757.

Formiato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 α -ilo (64).

A una solución de (22E)-5-fluoro-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (60) (228 mg, 0,50 mmol), ácido fórmico (0,035 ml) y trifenilfosfina (212 mg, 0,83 mmol) en 10 ml de benceno seco se agregó, gota a gota, azodicarboxilato de isopropilo (DIAD, 170 mg, 0,98 mmol) previamente disueltos en 2 ml de benceno. Se mantuvo la agitación a temperatura ambiente por 24 horas en atmósfera inerte, luego de lo cual se evaporó el solvente a presión reducida. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 9:1) permitió obtener formiato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 α -ilo (64) con un rendimiento del 77%.

P.f.: 151-152°C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,80 (H-19, 3H, *s*); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,6); 2,62 (H-7α, *dd*, *J* = 12,6 y 2,3); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,27 (H-3β, 1H, *m*); 8,02 (1H, *s*, HCOO-).

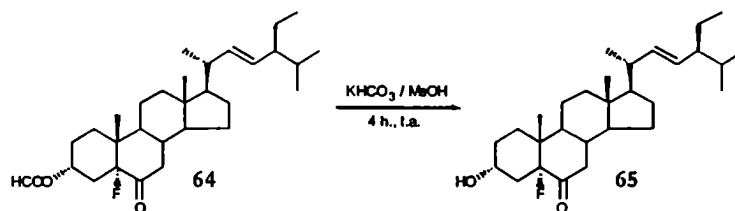
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,2 (C-18 y C-29); 13,5 (C-19, *d*, *J*_{CF} = 6,0); 19,0 (C-26); 21,0 21,1 (C-21 y C-27); 21,1 (C-11); 23,9 (C-15); 24,8 26,4 (C-1 y C-2); 25,3 (C-28); 25,9 (C-4, *d*, *J*_{CF} = 22,1); 28,6 (C-16); 31,8 (C-25); 37,9 (C-8); 39,3 (C-12); 40,4 (C-20); 42,3 (C-7); 43,4 (C-10, *d*, *J*_{CF} = 19,8); 43,0 (C-13); 45,4 (C-9, *d*, *J*_{CF} = 5,0); 51,2 (C-24); 55,8 56,4 (C-17 y C-14); 67,2 (C-3); 99,0 (C-5, *d*, *J*_{CF} = 178,8); 129,7 (C-23); 137,9 (C-22); 160,5 (HCOO-); 207,8 (C-6, *d*, *J*_{CF} = 27,0).

RMN-¹⁹F (470 MHz, CDCl₃): -157,0 (*d*, *J*_{HF} = 45,3).

EM (IE) *m/z* (int. rel.): 474 [M]⁺ (11); 431 (6); 362 (18); 333 (30); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₃₀H₄₇O₃F: 474,3509, hallado 474,3509.

(22E)-5-Fluoro-3α-hidroxi-5α-estigmast-22-en-6-ona (65).



300 mg (0,63 mmol) de formiato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5α-estigmast-22-en-3α-ilo (64) se hidrolizaron con bicarbonato de potasio (100 mg, 0,94 mmol), en una mezcla de 30 ml de metanol y 2 ml de agua, a temperatura ambiente. Luego de 6 horas, se neutralizó con HCl 1M, se evaporó el metanol y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó, evaporó y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica para dar (22E)-5-fluoro-3α-hidroxi-5α-estigmast-22-en-6-ona (65), con un rendimiento de 88%.

P.f.: 149-150°C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-19, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,6); 2,61 (H-7α, *dd*, *J* = 12,6 y 12,3); 4,07 (H-3β, 1H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6).

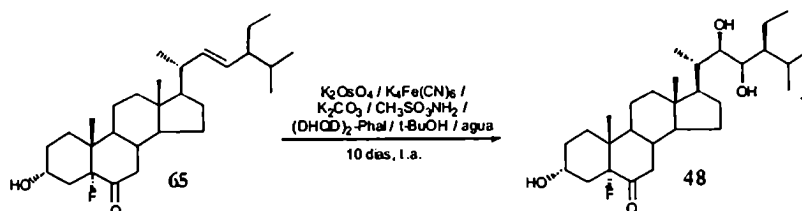
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,2 (C-18 y C-29); 13,4 (C-19, *d*, *J*_{CF} = 5,9); 19,0 (C-26); 21,0 y 21,1 (C-21 y C-27); 21,1 (C-11); 23,9 (C-15); 25,8 y 27,8 (C-1 y C-2); 25,3 (C-28); 30,6 (C-4, *d*, *J*_{CF} = 19,8); 28,6 (C-16); 31,8 (C-25); 37,9 (C-8); 39,3 (C-12); 40,3 (C-20); 42,3 (C-7, *d*, *J*_{CF} = 2,2); 43,7 (C-10, *d*, *J*_{CF} = 19,0); 43,0 (C-13); 45,6 (C-9, *d*, *J*_{CF} = 4,9); 51,2 (C-24); 55,8 y 56,4 (C-17 y C-14); 65,3 (C-3); 102,5 (C-5, *d*, *J*_{CF} = 172,4); 129,7 (C-23); 137,9 (C-22); 207,4 (C-6, *d*, *J*_{CF} = 27,2).

RMN-¹⁹F (470 MHz, CDCl₃): -154,7 (*d*, *J*_{HF} = 48,6).

EM (IE) m/z (int. rel): 446 $[M]^+$ (5); 426 (1); 403 (2); 365 (4); 334 (12); 305 (15); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para $C_{39}H_{47}O_2F$: 446,3560, hallado 446,3560.

(22R, 23R)-5-Fluoro-3 α -22,23-trihidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (48).



220 mg (0,49 mmol) de **(22E)-5-fluoro-3 α -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (65)**, se sometieron al tratamiento habitual de la dihidroxilación catalítica asimétrica. El producto crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (gradiente de hexano / AcOEt) y se obtuvo **(22R, 23R)-5-fluoro-3 α -22,23-trihidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (48)** con un rendimiento del 21%. P.f.: 152-153°C

RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): 0,68 (H-18, 3H, s); 0,86 (H-19, 3H, s); 0,91 (H-21, 3H, d , $J = 6,8$); 0,92 - 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, m); 2,60 (H-7 α , 1H, dd , $J = 12,5$ y $12,6$); 3,58 (H-22, 1H, dd , $J = 8,4$ y $1,3$); 3,71 (H-23, 1H, dd , $J = 8,4$ y $1,3$); 4,07 (H-3 β , 1H, m).

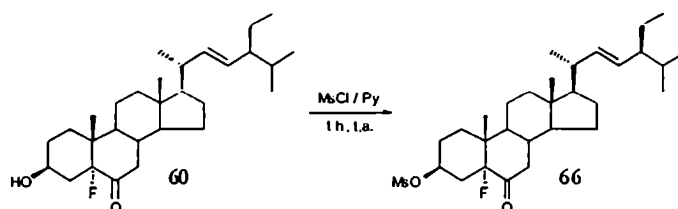
RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): 11,6 (C-21); 12,1 (C-18); 13,3 (C-29); 13,4 (C-19, d , $^1J_{CF} = 6,0$); 18,6 (C-28); 19,2 (C-26); 20,8 (C-27); 21,1 (C-11); 23,9 (C-15); 25,9 y 27,5 (C-1 y C-2); 28,6 (C-16); 28,8 (C-25); 30,4 (C-4, d , $^2J_{CF} = 19,5$); 36,8 (C-20); 37,7 (C-8); 39,3 (C-12); 42,3 (C-7, d , $^1J_{CF} = 1,9$); 43,7 (C-10, d , $^2J_{CF} = 19,3$); 43,2 (C-13); 45,6 (C-9, d , $^1J_{CF} = 4,9$); 46,4 (C-24); 55,8 y 56,4 (C-17 y C14); 65,3 (C-3); 72,1 (C-23); 74,1 (C-22); 102,5 (C-5, d , $^1J_{CF} = 172,0$); 207,4 (C-6, d , $^2J_{CF} = 26,9$).

RMN- ^{19}F (470 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): -154,7 (d , $^3J_{HF} = 48,6$).

EM (FAB) m/z (int. rel.): 481 $[M+H]^+$ (32); 463 (93); 445 (100); 425 (37).

EMAR (FAB): Calculado para $C_{39}H_{48}O_4F$ (M-H) $^+$: 479,3537, hallado 479,3540.

Metansulfonato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (66).



A una solución de **(22E)-5-fluoro-3 β -hidroxi-5 α -estigmast-22-en-6-ona (60)** (250 mg, 0,51 mmol) en 20 ml de piridina se agregaron 1,5 ml de cloruro de metansulfonilo. Después de una hora a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se acidificó con HCl 5% y se extrajo con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con agua, se secó y evaporó a presión reducida. El producto

crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica (hexano / AcOEt 9:1) obteniéndose metansulfonato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (66), con un rendimiento del 98%.

P.f.: 175-177 °C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,68 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,82 (H-19, 3H, *s*); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,6); 2,71 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,6 y 12,5); 3,01 (CH₃SO₃⁻, 3H, *s*); 4,90 (H-3 α , 1H, *m*); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6).

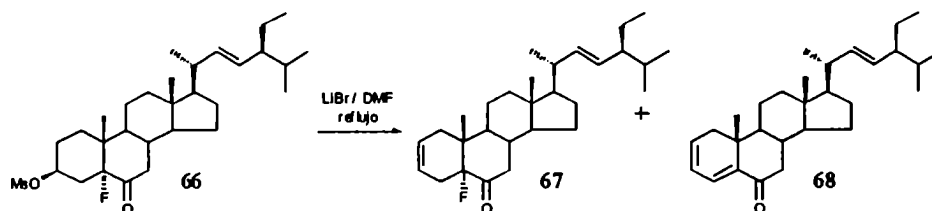
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,2 (C-18 y C-29); 13,7 (C-19, *d*, *J*_{CF} = 4,9); 19,0 (C-26); 21,1 (C-11); 21,1 y 21,2 (C-27 y C-21); 23,9 (C-15); 25,3 (C-28); 27,5 (C-2); 28,6 (C-16); 30,4 (C-1); 31,4 (C-4, *d*, *J*_{CF} = 21,1); 31,8 (C-25); 37,7 (C-8); 38,7 (CH₃SO₃); 39,2 (C-12); 40,3 (C-20); 42,5 (C-13); 43,0 (C-7); 43,5 (C-10, *d*, *J*_{CF} = 16,8); 45,5 (C-9, *d*, *J*_{CF} = 3,0); 51,2 (C-24); 56,3 (C-14 y C-17); 77,9 (C-3); 100,9 (C-5, *d*, *J*_{CF} = 176,0); 129,7 (C-23); 137,8 (C-22); 206,9 (C-6, *d*, *J*_{CF} = 26,2).

RMN-¹⁹F (470 MHz, CDCl₃): -159,6 (*d*, *J*_{HF} = 42,5).

EM (IE): *m/z* (int. rel.); 524 [M]⁺ (1); 481 (1); 383 (7); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para C₃₀H₄₉O₄SF 524,3335, hallado 524,3330.

(22E)-5-Fluoro-5 α -estigmasta-2,22-dien-6-ona (67).



Una solución metansulfonato de (22E)-5-fluoro-6-oxo-5 α -estigmast-22-en-3 β -ilo (66), (354 mg, 0,67 mmol) en 10 ml de DMF, se trató con 217 mg de LiBr (2,49 mmol), a reflujo, bajo atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. El solvente se evaporó a presión reducida, el residuo se resuspendió en agua y se extrajo con cloruro de metileno. La fase orgánica se secó y evaporó. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna de sílica (hexano) permitió obtener (22E)-5-fluoro-5 α -estigmasta-2,22-dien-6-ona (67), con un rendimiento de 76%.

P.f.: 121 °C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 0,75 (H-18, 3H, *s*); 0,79 (H-27, 3H, *d*, *J* = 6,0); 0,80 (H-29, 3H, *t*, *J* = 7,2); 0,82 (H-19, 3H, *s*); 0,85 (H-26, 3H, *d*, *J* = 6,3); 1,01 (H-21, 3H, *d*, *J* = 6,6); 2,72 (H-7 α , 1H, *dd*, *J* = 12,6 y 7,9); 5,02 (H-23, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, *dd*, *J* = 15,1 y 8,6); 5,56 – 5,71 (H-2 y H-3, 2H, *m*).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 12,2 y 12,9 (C-18 y C-29); 14,0 (C-19, *d*, *J*_{CF} = 5,8); 19,0 (C-26); 21,0 y 21,1 (C-27 y C-21); 21,2 (C-11); 24,0 (C-15); 25,3 (C-28); 26,7 (C-4, *d*, *J*_{CF} = 23,8); 28,6 (C-16); 31,8

(C-25); 34,7 (C-1); 37,9 (C-8); 39,3 (C-12); 40,4 (C-20); 42,4 (C-10, $d, {}^2J_{CF} = 20,8$); 42,8 (C-13); 43,0 (C-7, $d, {}^1J_{CF} = 1,9$); 46,0 (C-9, $d, {}^1J_{CF} = 2,0$); 51,2 (C-24); 55,9 y 56,4 (C-14 y C-17); 98,3 (C-5, $d, {}^1J_{CF} = 176,0$); 121,6 (C-3); 124,5 (C-2); 129,7 (C-23); 137,9 (C-22); 207,6 (C-6, $d, {}^2J_{CF} = 27,1$).

RMN- ^{19}F (470 MHz, $CDCl_3$): -161,0 ($d, {}^1J_{HF} = 45,0$).

EM (II): m/z (int. rel.): 428 $[M]^+$ (12); 408 (2); 385 (7); 316 (18); 287 (25); 55 (100).

EMAR (IE): Calculado para $C_{29}H_{45}OF$ 428,3454, hallado 428,3454.

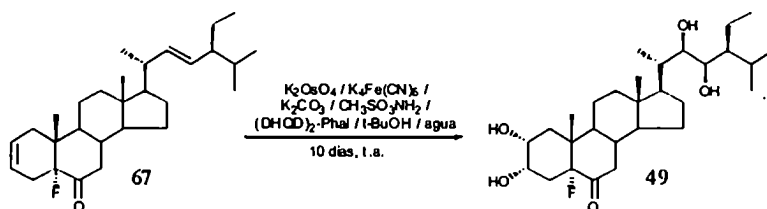
La elución posterior permitió obtener **(22E)-estigmasa-2,4,22-trien-6-ona¹⁶ (68)**, con un rendimiento de 10%.

P.f.: 135°C.

RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$): 0,72 (H-18, 3H, s); 0,79 (H-27, 3H, $d, J = 6,0$); 0,80 (H-29, 3H, $t, J = 7,2$); 0,85 (H-26, 3H, $d, J = 6,3$); 1,01 (H-19, 3H, s); 1,01 (H-21, 3H, $d, J = 6,6$); 2,56 (H-7 α , 1H, $dd, J = 16,9$ y 4,3); 5,02 (H-23, 1H, $dd, J = 15,1$ y 8,6); 5,15 (H-22, 1H, $dd, J = 15,1$ y 8,6); 6,07 (H-2 y H-3, 2H, m); 6,83 (H-4, 1H, m).

RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): 12,0 (C-29); 12,2 (C-18); 17,8 (C-19); 19,0 (C-26); 21,0 (C-11); 21,2 (C-21); 21,2 (C-27); 24,1 (C-15); 25,3 (C-28); 28,7 (C-16); 31,8 (C-25); 32,8 (C-8); 35,9 (C-10); 37,9 (C-1); 39,3 (C-12); 40,4 (C-20); 42,3 (C-13); 45,4 (C-7); 50,3 (C-9); 51,2 (C-24); 55,8 (C-14); 56,7 (C-17); 123,2 (C-3); 128,3 (C-4); 129,6 (C-23); 132,7 (C-2); 138,0 (C-22); 140,7 (C-5); 200,0 (C-6).

(22R,23R)-5-Fluoro-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (49).



760 mg (1,61 mmol) de **(22E)-5-fluoro-5 α -estigmasa-2,22-dien-6-ona (67)** se sometieron a una dihidroxilación catalítica asimétrica según la técnica habitual. El producto crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica (gradiente de hexano / $AcOEt$) y se obtuvo **(22R,23R)-5-fluoro-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-5 α -estigmastan-6-ona (49)** con un rendimiento del 15%.

P.f.: 245°C.

RMN- 1H (500 MHz, $CDCl_3$ / $MeOD$ 95:5): 0,68 (H-18, 3H, s); 0,91 (H-21, 3H, $d, J = 6,8$); 0,92 – 0,99 (H-26, H-27 y H-29, 9H, m); 0,96 (H-19, 3H, s); 2,61 (H-7 α , 1H, $t, J = 12,5$); 3,58 (H-22, 1H, $dd, J = 8,4$ y 1,3); 3,71 (H-23, 1H, $dd, J = 8,4$ y 1,3); 3,76 (H-2 β , 1H, m); 4,05 (H-3 β , 1H, $dd, J = 6,0$ y 3,0).

RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$ / $MeOD$ 95:5): 11,6 (C-21); 11,7 (C-18); 13,4 (C-29); 14,2 (C-19, $d, {}^1J_{CF} = 5,2$); 18,7 (C-28); 19,2 y 20,9 (C-26 y C-27); 20,9 (C-11); 23,6 (C-15); 27,3 (C-16); 28,8 (C-25); 29,9 (C-4, $d, {}^2J_{CF} = 19,3$); 34,3 (C-1); 36,8 (C-20); 37,4 (C-8); 39,9 (C-12); 42,0 (C-13); 42,8 (C-7); 42,8 (C-

10, $d, {}^2J_{CF} = 24,8$); 45,2 (C-9, $d, {}^1J_{CF} = 3,9$); 46,4 (C-24); 52,3 y 55,9 (C-14 y C17); 66,8 (C-3); 67,6 (C-2); 74,1 (C-22); 72,2 (C-23); 98,2 (C-5, $d, {}^1J_{CF} = 176,9$); 207,7 (C-6, $d, {}^2J_{CF} = 27,0$).

RMN- ^{19}F (470 MHz, $CDCl_3$ / MeOD 95:5): -153,9 ($d, {}^1J_{HF} = 45,4$).

EM (FAB) m/z : (int. rel.): 497 $[M+H]^+$ (12); 479 (100), 461 (31), 441 (22).

EMAR (FAB): Calculado para $C_{27}H_{48}O_5F$ (M-H) $^+$: 495,3486, hallado 495,3470.

8.2.5. DIHIDROXILACIÓN CATALÍTICA ASIMÉTRICA.

Esta reacción se utilizó para la formación, a partir del doble enlace Δ^2 , del diol 22R,23R en la cadena lateral de todos los análogos sintetizados. En un procedimiento típico, se disolvió 1 mmol del esteroide en la mínima cantidad de *t*-butanol (30 a 70 ml, dependiendo de la solubilidad del sustrato), y se agregó el mismo volumen de agua. Sobre esta mezcla se agregan 0,93 g (0,5 mmol) de DHQD₂-Phal, 450 mg (2 mmol) de metansulfonamida, 4.5 g (5,9 mmol) de ferricianuro de potasio, 2 g (100 mmol) de carbonato de potasio, y 30 mg (0,08 mmol) de osmato de potasio.

La mezcla se mantiene con agitación vigorosa, a temperatura ambiente, durante 9 a 14 días. La reacción, controlada por c.c.d., generalmente no se completa. Se agrega bisulfito de sodio sólido, en porciones pequeñas, hasta que cesa el desprendimiento de burbujas. La mezcla se extrae con AcOEt, se lava con H_2SO_4 0,25 M (para extraer el auxiliar, que se recupera), con NaOH (para destruir el exceso de metansulfonamida), y finalmente con agua. La fase orgánica se seca y evapora.

En cada caso, del crudo de reacción puede separarse el compuesto deseado, junto con el correspondiente diasterómero 22S,23S, y una cantidad variable del producto de partida.

Es interesante aclarar que la reacción puede completarse si durante el transcurso de la misma se agregan cantidades nuevas de osmato de potasio, pero el exceso de oxidante disminuye la dasteroselectividad en favor del isómero no requerido. Por esto, es preferible, en general, extraer los productos y repetir la reacción con el material de partida recuperado que no reaccionó.

8.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

8.3.1 INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ.¹⁷

Se esterilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa* cv, Chui) por inmersión en etanol durante 30 segundos, Las semillas se lavaron 5 veces con agua estéril, y se mantuvieron sumergidas en agua, también estéril, durante 48 hs a 30°C, con un fotoperíodo de 16 hs luz ($45 \mu E m^{-2} s^{-1}$) / 8 hs oscuridad, en una cámara de crecimiento. Se seleccionaron las semillas que presentaban una radícula de al menos 1 mm, y se sembraron en cristalizadores sobre agar al 0,5 %, estéril y sin nutrientes. Los cristalizadores se incubaron en un ambiente saturado de humedad en las mismas condiciones de temperatura e

iluminación durante 4 días.

Se seleccionaron las plántulas cuyas partes aéreas midieran $4,5 \pm 0,5$ cm. Se inyectó a cada plántula, 2 mm por debajo de la lígula, $0,5 \mu\text{l}$ de una solución etanólica del compesto a ensayar, y se incubaron durante 48 hs a 30°C en oscuridad. Se midió el ángulo inducido entre la lámina y la vaina (Figura 8.1). Los valores informados en esta Tesis se obtuvieron promediando los ángulos medidos para 20 a 25 plántulas tratadas en las mismas condiciones.

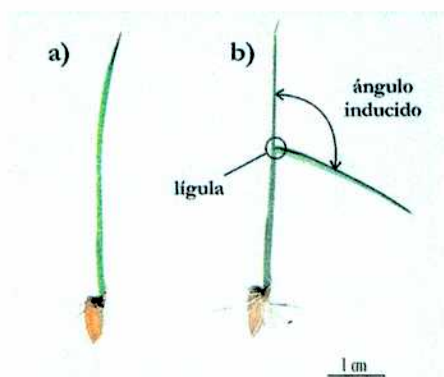


Figura 8.1.a) Plántula de arroz de 6 días sin inocular. **b)** Plántula inoculada, por debajo de la zona ligular, con un BR activo.

8.3.2. ELONGACIÓN DE EPICÓTILOS DE SOJA.¹⁸

Se sumergieron semillas de soja (*Glycine max* cv, Williams 82) en agua durante 12 horas, y se sembraron en bandejas sobre una mezcla 50 % vermiculita – 50 % perlita. Las plántulas crecieron durante 10 días en invernadero ($25 - 27^\circ\text{C}$) bajo iluminación natural. Las secciones de epicótilos se obtuvieron por escisión de los primeros 1,5 cm por debajo de la plúmula (Figura 8.2.a), y se sumergieron en buffer KPSC (0,14 % KH_2PO_4 , 2 % sacarosa, 0,005 % cloranfenicol, a pH 6) durante 2 horas, para eliminar las auxinas endógenas, que pueden interferir en el ensayo.

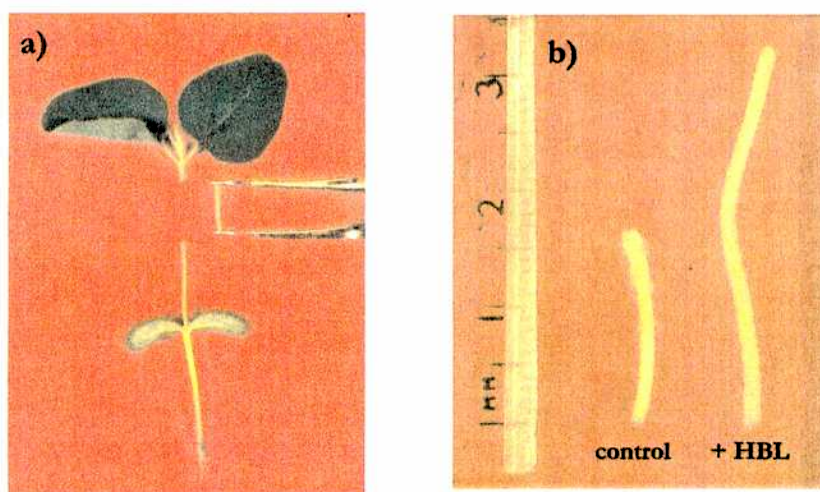


Figura 8.2.a) Obtención de los segmentos de epicótilos empleados en el ensayo. **b)** Epicótilos de soja incubados durante 18 h, sin agregado de BRs exógeno (control) y con agregado de un BR activo (+HBL).

Se colocaron 20 secciones en Erlenmeyers de 50 mL conteniendo 10 mL de buffer KPSC, y se agregó al medio 100 µl de solución etanólica del compuesto a ensayar. Los epicótilos se mantuvieron con agitación a 27°C, bajo iluminación continua (lámpara Gro – Lux 25 µE m⁻² s⁻¹). Luego de 18 hs, se midió la longitud de los epicótilos con una precisión de 1 mm (Figura 8.2.b). Se promedió la longitud de 10 segmentos tratados en las mismas condiciones.

8.3.3. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.¹⁹

Se esterilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (cv Columbia), sumergiéndolas durante 10 minutos en etanol absoluto y 20 minutos en hipoclorito de sodio 5 % (conteniendo 0,1 % de Tritón X-100). Las semillas se lavaron tres veces con agua estéril, y se incubaron cubiertas por agua durante 4 días a 4°C.

El medio de cultivo (Gamborg B5 0,2 %, sacarosa 2%, agar 0,8% regulado a pH 5,8), se esterilizó en autoclave en fracciones de 20 ml a las que se agregaron 0,5 ml de solución etanólica del compuesto a ensayar. El medio se dejó solidificar en placas de Petri, y se sembraron sobre el mismo las semillas de *A. thaliana*. Las placas se incubaron en posición vertical en una cámara de crecimiento a 20°C con un fotoperíodo de 16 hs luz (50 µE m⁻² s⁻¹) / 8 hs oscuridad durante 11 días. Se promedió la longitud de las raíces y/o hipocótilos de 10 plántulas tratadas de igual manera.

La experiencia se repitió nuevamente, pero con plántulas incubadas durante 8 días en oscuridad.

8.3.4. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE MUTANTES DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

Se siguió el mismo procedimiento descripto anteriormente para el ensayo de inhibición del crecimiento de raíces de *Arabidopsis*, pero utilizando semillas de la variedad mutante *det2*. Las plántulas se incubaron a 20°C, durante 11 días en fotoperíodo o durante 8 días en oscuridad, según el experimento.

8.4. REFERENCIAS.

1 Perrin D., Amarego W. Purification of laboratory chemicals 3rd Edition. Pergamon Press, UK (1988).

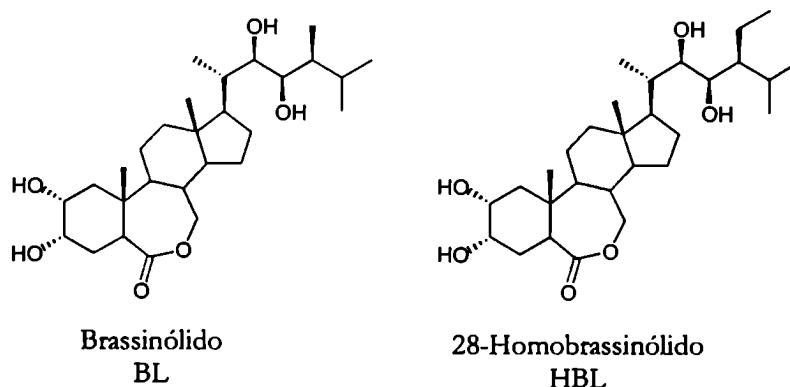
2 D'Auria M., de Mico E., D'Onofrio F., Scettri A. Pyridinium Dichromate in Organic Chemistry: A New Synthesis of Enediacarbonyl Compounds. *Synthesis*, 988 (1985).

3 Gaspar E., Neves H. Steroidal constituents from mature wheat straw. *Phytochemistry*, 34, 523 (1993).

- 4 Furniss B., Hannaford A., Smith P., Tatchell A. Vogel's textbook of practical Organic Chemistry. 5th. Edition. pg 467. Longman Scientific & Technical, Essex, UK. (1992).
- 5 Mori, K. Synthesis of a brassinolide analog with high plant growth promoting activity. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1211 (1980).
- 6 Thompson M.J., Mandava N., Meudt W., Dutky S., Lusby W., Spaulding D. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids* 39, 89 (1982).
- 7 Wada K., Marumo S. Synthesis and growth-plant promoting activity of brassinolide analogues. *Agric. Biol. Chem.* 45, 2579 (1981).
- 8 Takatsuto, S., Ikekawa, N., Synthesis and activity of plant growth-promoting steroids, (22R,23R,24S)-28-Homobrasinosteroids, with modifications in rings A and B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 439 (1984).
- 9 Ramírez J., Teme Centurión O., Galagovsky L., Gros E., Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroids analogs. *Steroids* 65, 329 (2000).
- 10 Mitra R., Kapoor V. Formation of Δ^4 -6-keto isomer in the synthesis of Δ^2 -6-keto steroids used as intermediates in the synthesis of brassinolide and analogues plant-growth stimulators. *Synth. Commun.* 15, 1087 (1985).
- 11 Brosa, C., Peracaula, R., Nusimovich, S., Synthesis of new brassinosteroids with potential activity as antiecdysteroids. *Steroids*. 59, 463 (1994).
- 12 Steele J., Mosettig E. The solvolysis of stigmasteryl acetate. *J. Org. Chem.* 28, 571 (1963)..
- 13 Ponce M., Ramírez J., Galagovsky L., Gros E., Erra-Balsells R. Singlet-oxygen ene reaction with 3 β -substituted stigmastanes. An alternative pathway for the classical Schenck rearrangement. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* 2351 (2000).
- 14 Galagovsky, L., Burton, G., Gros E., 5 β ,6 β -Epoxidation of 3 β -cholesteryl acetate and its analogues. *Z. Naturforsch.* 44b, 806 (1989).

- 15 Brosa C., Soca L., Terricabras E. New synthetic brassinosteroids: a 5 α -hydroxy-6-ketone analog with strong plant growth promoting activity. *Tetrahedron* 54, 12337 (1998).
- 16 Khripach V. Synthesis of brassinosteroids. *Pure & Appl. Chem.* 62, 1319 (1990).
- 17 Aguayo M.C. Actividad biológica de brassinosteroides sintéticos. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exatas y Naturales. Universidad de Buenos Aires (1999).
- 18 Clouse S.D., Zurek D.M., McMorris T.C., Baker M.E. Effect of brassinolide on gene expresion in elongating soybean epycotils. *Plant Physiol.* 100, 1377 (1992).
- 19 Clouse S., Hall A., Langford M., McMorris T., Baker M. Physiological and molecualr effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul* 12, 61 (1993).

En 1979 se describió la estructura del brassinólido (BL), una lactona esteroidal con potente actividad de estimulación del crecimiento vegetal, presente en muy baja concentración en extractos de polen de *Brassica napus* (nabo silvestre). Desde ese momento se han encontrado, en todas las especies vegetales estudiadas, más de 50 compuestos estructuralmente relacionados, denominados brassinosteroides (BRs). Actualmente se considera que los BRs son un nuevo tipo de hormonas vegetales.



El interés en la probable aplicación de estos compuestos como agroquímicos de origen natural, y el hecho de que el aislamiento de fuentes naturales a gran escala no es viable, generó múltiples esfuerzos tendientes a su obtención por síntesis química, a partir de precursores accesibles.

En esta Tesis se presenta, en el Capítulo 2, el desarrollo de métodos de síntesis mejorados para la obtención de BRs naturales de la serie 28-homo, a partir de estigmasterol. Se obtuvieron 28-homobrassinólido (HBL) —homólogo de C_{29} del brassinólido—, 28-homocasterona (HCS), 28-homotifasterol (HTY) y 28-homoteasterona (HTE), utilizando secuencias sintéticas más breves y eficientes que las publicadas anteriormente.

Posteriormente, resultó interesante intentar la síntesis de análogos de estos compuestos, con el fin de estudiar los efectos que las modificaciones estructurales introducidas tenían sobre la actividad biológica.

Dado que los BRs son esteroides polioxigenados, una hipótesis muy aceptada indica que la interacción de estos compuestos con su receptor biológico ocurriría a través de enlaces de hidrógeno. Se planearon, entonces, diferentes estrategias para la obtención de análogos de BRs con la intención de analizar efectos de correlación estructura-actividad. Las modificaciones estructurales realizadas incluyeron la introducción de grupos hidroxilos adicionales, la eliminación de grupos hidroxilo o carbonilo de los compuestos naturales, la inclusión de átomos de flúor en posiciones no sustituidas, y el reemplazo de funciones oxigenadas habituales por fluoruro.

La obtención de análogos fluorados en C-3 se presenta en el Capítulo 3.

La obtención de análogos con modificación en C-6 se presenta en el Capítulo 4.

La obtención de análogos hidroxilados y fluorados en C-5 se presenta en el Capítulo 5.

Los estudios sobre la fluoración de los distintos esteroides se efectuó mediante estrategias que se basan en la nucleofilicidad del fluoruro. En un caso particular se demostró la viabilidad de acceder al compuesto propuesto por una fluoración electrofílica, alternativa menos usual pero igualmente eficaz. Por otro lado, se encontró evidencia experimental que mostró una reactividad imprevista en los análogos con un grupo 5 α -flúor. Este hecho derivó en el análisis teórico y experimental, mostrado en el Capítulo 6, que reveló la posible participación del flúor en enlaces de hidrógeno intramolecular como origen de la particular reactividad observada.

Los efectos sobre la actividad biológica provocados por cada una de las modificaciones estructurales efectuadas se analizaron, respectivamente, al final de cada capítulo. Una visión integradora de los resultados de diferentes bioensayos se presentó en el Capítulo 7. Las conclusiones más importantes son:

La actividad relativa encontrada para los compuestos naturales obtenidos, parece indicar que la biosíntesis de 28-homoBRs (C_{29}) sería similar a la establecida por otros investigadores para los BRs de C_{28} . Los resultados obtenidos a partir de los análogos fluorados en C-3 y C-6 parecen reafirmar este esquema biosintético.

Los precursores biosintéticos del HBL podrían poseer una actividad biológica *per se*, y provocar un efecto fisiológico sin ser necesaria su transformación en el HBL.

Los bioensayos usados habitualmente en el estudio de los BRs presentan un panorama complejo de resultados que no muestran una clara correlación estructura-actividad. La respuesta relativa medida en cada bioensayo es altamente dependiente del modelo biológico empleado y no necesariamente puede ser generalizada a otros bioensayos.

Para la obtención de los 4 BRs naturales y de los 11 análogos nuevos de esta Tesis, se sintetizaron numerosos compuestos intermediarios, de los cuales 29 fueron compuestos originales, y, por lo tanto, completamente caracterizados.

El trabajo descrito en esta Tesis ha permitido la realización de dos publicaciones sobre la síntesis de los compuestos, en revistas especializadas, y una publicación en colaboración, relativa a la aplicación

práctica de uno de los análogos obtenidos, en la micropropagación de una variedad de manzana:

J. A. Ramírcz, E. Gros, L. Galagovsky

Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom substituents on synthetic 28-homobrassinosteroid analogs. *Tetrahedron*. 56/34, 6171 (2000).

L.R. Galagovsky, E. G. Gros, J. A. Ramírez.

Synthesis and bioactivity of natural and C-3 fluorinated biosynthetic precursors of 28-homobrassinolide. *Phytochemistry*. 58, 973 (2001)

S. Schaefer, S.A. Medeiro, J.A. Ramírez, L.R. Galagovsky, A.B. Pereira-Netto

Brassinosteroid-driven enhancement of *in vitro* multiplication rate for the marubakaido apple rootsock (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh). *Plant Cell Reports*. 20(11):1093-1097 (2002).

En estos momentos se encuentran en etapa de redacción tres trabajos adicionales.

Las estructuras de los BRs sintetizados se resumen en la Figura adjunta:

