BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

"OBTENCIÓN DE NUEVAS ESTRUCTURAS COLESTÁNICAS NITROGENADAS"

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÌTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:
Q. ANALLELY HUEPALCALCO GUEVARA

ASESORES:
DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ
DRA. MARICELA RODRÍGUEZ ACOSTA

MAYO DE 2017

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y de la Dra. Maricela Rodríguez Acosta. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me otorgó la beca No. 658661/573297. Aspectos relevantes de este trabajo fueron presentados en congresos nacionales (XX Simposio Interno del Posgrado, octubre 2015, Foro de investigación multidisciplinaria sobre la biodiversidad; del laboratorio al campo y la industria, junio 2016, en la XII Reunión Academia Mexicana de Química Orgánica, marzo 2016, y XXI Simposio Interno del Posgrado, octubre 2016).

Contenido

Abreviaturas ..... **I**

Resumen ..... **II**

Introducción **1**

Justificación **2**

Antecedentes **3**

a) Estructuras moleculares, naturales y sintéticas, con uno, dos, tres y cuatro anillos pirrólicos. **3**

b) Reacción de Paal-Knorr. **7**

c) Fármacos sintetizados a partir de la condensación de Paal-Knorr **9**

d) Trabajo personal desarrollado con anterioridad. **10**

Objetivos **12**

Discusión de resultados **13**

a) Apertura regioselectiva de los anillos E y F de la diosgenina. **13**

b) Caracterización del diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (32) **14**

c) Caracterización del diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (33) **15**

d) Caracterización del diacetato de 27-nor-22,25-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (34) **17**

e) Mecanismo de la formación de 34. ..... **24**

f) Caracterización de arilformamida (35) **27**

g) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-bencilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (37) **32**

h) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-(3-hidroxi)propilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (38) **39**

i) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5;22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (39a) **45**

j) Caracterización de 16β-acetoxi-3β-hidroxi-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5;22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (39b) **49**

k) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-(4-hidroxi)fenetilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (40) **52**

Evaluación biológica **58**

Metodologías y equipos empleados **61**

Desarrollo experimental **63**

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo. (32) **63**

Diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (33) **64**

Diacetato de 27-nor-22,25-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (34) **65**

***N*-(3,4,5-trimetoxifenil)formamida (35)** **66**

N-(3,4,-dimetoxifenil)formamida (36) **67**

3β,16β-diacetoxi-*N*-bencilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]-27-norcolest-5-eno. (37) **68**

3β,16β-diacetoxi-*N*-(3-hidroxi)propilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno. (38) **69**

3β,16β-diacetoxi-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno. (39a) **70**

Acetato de *N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno-3β-hidroxi,26-ilo. (39b) **71**

3β,16β-diacetoxi-*N*-(4-hidroxi)fenetilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno. (40) **72**

Introducción **74**

Justificación **75**

Antecedentes **76**

Objetivos **80**

Evaluación como promotores de crecimiento vegetal **81**

Etapa 1: prueba de laboratorio. **85**

Etapa 2; prueba de invernadero **88**

Conclusiones **91**

Apéndices **93**

Referencias **100**

Abreviaturas

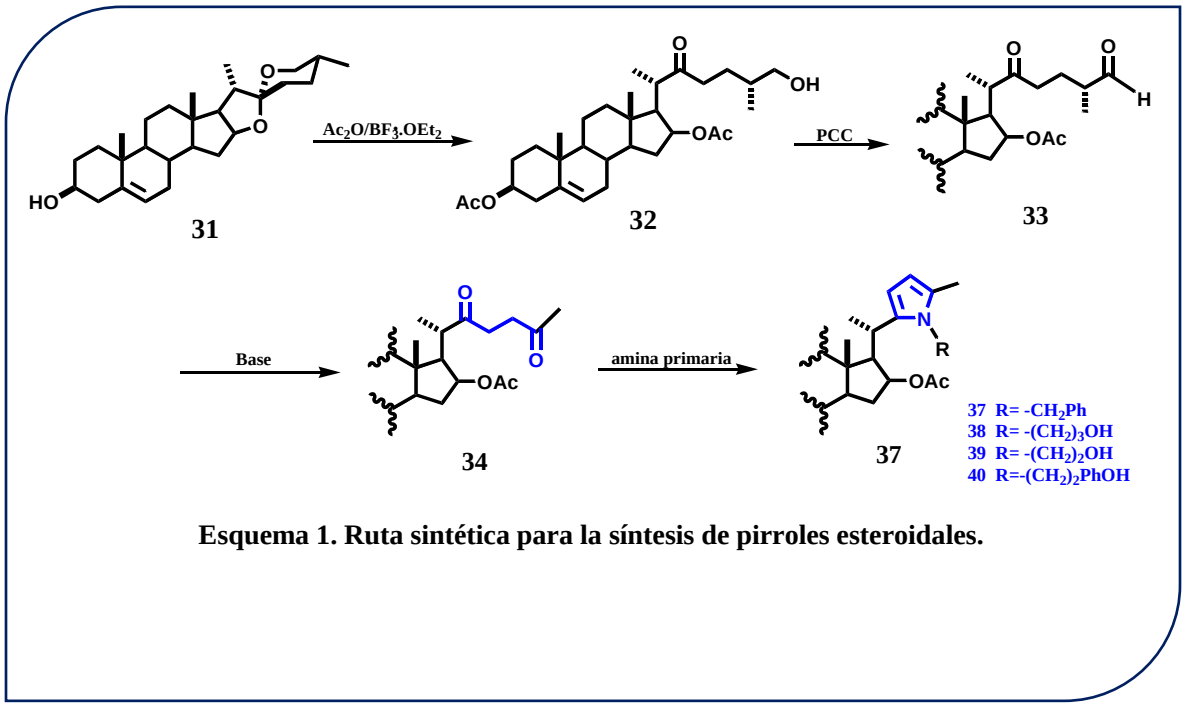
PCC	Clorocromato de piridinio
J	Constante de acoplamiento
COSY	**Co**rrelation **S**pectroscop**y**
CCF	**C**romatografía en **c**apa **f**ina
δ	Desplazamiento químico en RMN
EMAR	**E**spectrometría de **M**asas de **A**lta **R**esolución
HMBC	**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**oherence
HSQC	**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation
IR	Infrarrojo
ppm	Parte por millón
Py	Piridina
Pf	Punto de fusión
RMN ^{13}C	**R**esonancia **M**agnética **N**uclear de Carbono 13
RMN ^{1}H	**R**esonancia **M**agnética **N**uclear de Protón
c	Señal cuádruple
d	Señal doble
da	Señal doble, ancha
dd	Señal doble de doble
m	Señal múltiple
t	Señal triple
dq	Señal doble de cuádruple
DMAP	4-(**D**i**m**etil**a**mino)**p**iridina
TMAn	3,4,5-**t**ri**m**etoxi**an**ilina
DMAn	3,4-**d**i**m**etoxi**an**ilina
PMAn	4-**m**etoxi**an**ilina
CMI	**C**oncentración **M**ínima **I**nhibitoria

Resumen

En este trabajo se presenta la síntesis de nuevas estructuras colestánicas nitrogenadas **37**, a partir de la diosgenina (**31**). El camino sintético se inició con la apertura selectiva del sistema espirocetálico de **31** con lo cual se obtuvo una estructura colestánica hidroxilada en posición 26. El grupo alcohol fue selectivamente oxidado para generar el 3β,16β-diacetoxi-22-oxocolest-5-en-26-al (**33**). El compuesto aldehídico **33** fue sometido a la acción de una base orgánica fuerte, obteniéndose el diacetato de 27-nor-22,25-dioxocolest-5-en-3β,16β-diilo (**34**), que contiene un sistema 1,4-dicarbonílico. Este sistema dicarbonílico fue empleado para la producción de los pirroles (**37, 38, 39 y-40**) mediante la aplicación de la reacción de Paal-Knorr.

Las nuevas estructuras esteroidales pirrólicas han sido generadas con el fin de evaluar su actividad en plantas como promotores de crecimiento vegetal y como controladores de plagas a nivel de raíz, a través de la técnica de imbibición en semillas. Además, los compuestos finales se evaluaron en su actividad antifúngica en cepas de *Candida sp*. En ambos casos, se obtuvo una relevante bioactividad.

La ruta sintética para generar los pirroles esteroidales es la siguiente:



Esquema 1. Ruta sintética para la síntesis de pirroles esteroidales.

CAPÍTULO I

OBTENCIÓN DE NUEVAS ESTRUCTURAS COLESTÁNICAS NITROGENADAS

Introducción

Los heterociclos poseen una amplia gama de propiedades biológicas, como antiinflamatorios, antivirales, antibacterianos, antitumorales, antioxidantes, entre otras.

El anillo pirrólico es el componente de muchas estructuras moleculares responsables de los procesos bioquímicos fundamentales. La variación estructural de las moléculas da lugar a una amplia serie de compuestos que conllevan a una diversidad de funciones. La estructura del pirrol y sus derivados otorgan una gran variedad de actividades biológicas. Estructuras ampliamente conocidas son las moléculas tetrapirrólicas denominadas clorofilas que realizan, conjuntamente con metales, el proceso de la fotosíntesis. Otro tetrapirrol de gran importancia está presente en la hemoglobina, la cual la transportación de moléculas de oxígeno hacia las células. Otras estructuras pirrólicas están presentes en diversos alcaloides, la vitamina B12 y otros. [1]

En la literatura se han descrito muy pocos compuestos esteroidales conteniendo anillos pirrólicos o dihidropiridínicos, por lo que surgió el interés de sintetizar estructuras novedosas con posible aplicación antimicrobiana, éste es el tema de dicha tesis.

Justificación

La química de productos naturales ha integrado un cúmulo de estructuras moleculares a partir de diversas fuentes naturales (marinas, terrestres, bacterias, hongos, etc.), lo que ha provocado la síntesis orgánica, biosíntesis, biotransformaciones, entre otros. Las sapogeninas han adquirido gran valor comercial, ya que son materia transformable a través de la síntesis parcial en innumerables estructuras esteroidales.

El análisis de la reactividad de las sapogeninas esteroidales y de los heterociclos de cinco miembros nos proporciona ideas para realizar modificaciones estructurales y así obtener nuevos compuestos con actividad biológica.

La diosgenina (**31**) ha sido materia prima de partida para llevar a cabo modificaciones en la cadena colestánica generando pirroloesteroides biológicamente activos.

La síntesis y la actividad biológica que presentan derivados de pirrol son un campo de investigación muy amplio en la química heterocíclica; la unidad pirrólica se encuentra en un gran número de productos naturales. En el campo de los esteroides, son muy pocas las estructuras reportadas que contienen anillos pirrólicos sobre el esqueleto tetracíclico pero ninguna sobre la cadena lateral, por lo cual se decidió incursionar en esta área.

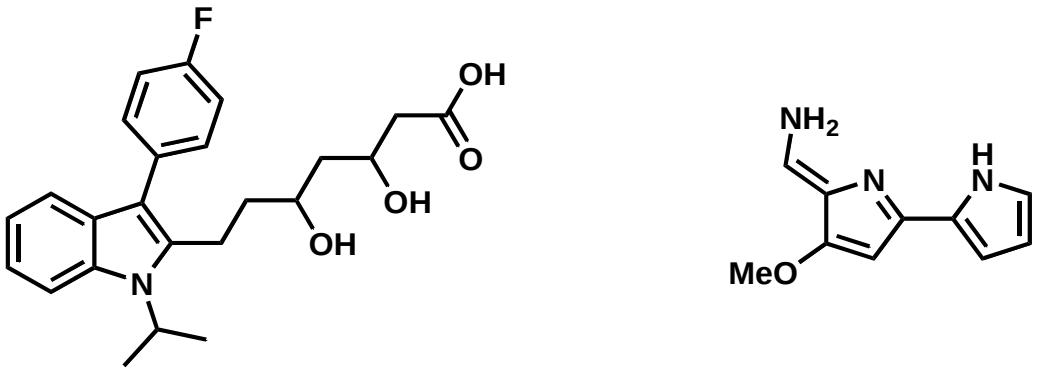
Antecedentes

a) Estructuras moleculares, naturales y sintéticas, con uno, dos, tres y cuatro anillos pirrólicos.

En la naturaleza existen moléculas con una, dos, tres y cuatro unidades pirrólicas, tales como las que se mencionan a continuación.

Las estatinas como, fluvastatina (**1**) expresa acción inhibitoria ante la enzima HMG-CoA reductasa, enzima empleada en la biosíntesis del colesterol. En la estructura de fluvastatina presenta un pirrol pentasustituido, (**ver figura 1**). [2]

Tambajamina (**2**) es un alcaloide aislado a partir del molusco *T. ceutae,* dicho compuesto posee actividad antiproliferativa y en su estructura química contiene dos unidades de pirrol, (**ver figura 1**). [3]

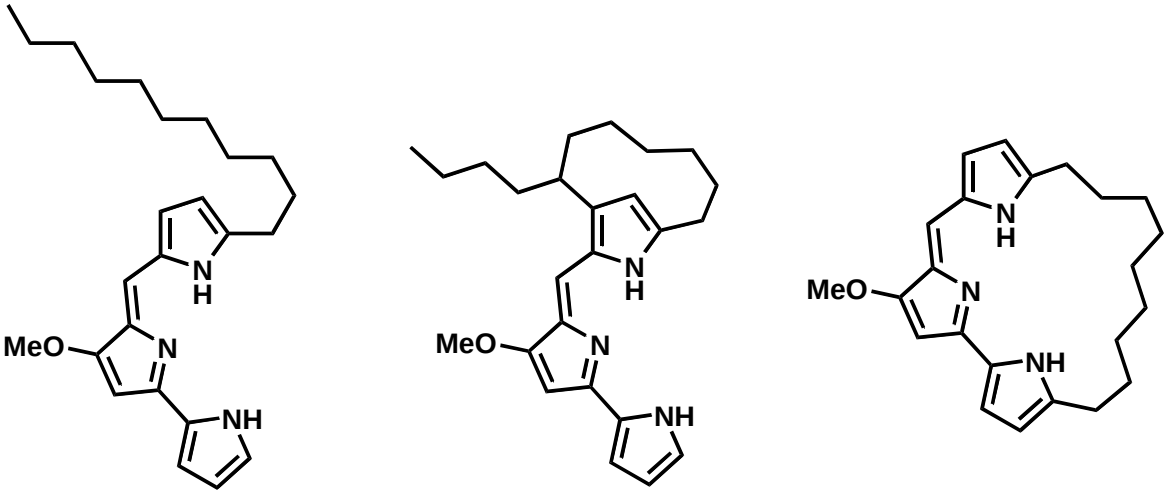


1 **2**

Figura 1. Estructuras con una y dos unidades de pirrol.

La prodigiosina es un metabolito secundario de *Serratia marcescens*, capaz de actuar sinérgicamente con tracolimus (FK506), este último es empleado como fármaco inmunodepresor. A partir de la familia de prodigiosina se encuentran estructuras con tres anillos pirrólicos; como por ejemplo; prodigiosina 25-C (**3**), estreptorubin B (**4**) y nonilprodigiosina (**5**), (**ver figura 2**). [4]

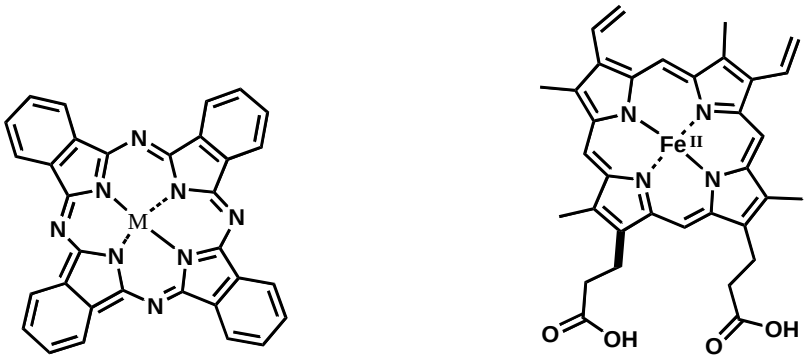
Los alcaloides de pirrol exhiben un enorme rango de actividad contra bacterias, protozoos y hongos patógenos.



3 **4** **5**

Figura 2. Algunas estructuras de la familia prodigiosina con tres anillos pirrólicos.

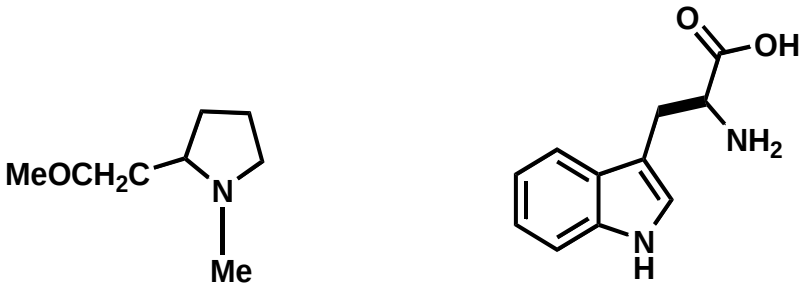
Los pirroles también pueden formar moléculas de cuatro unidades y son comúnmente conocidos como anillos porfirínicos, tales como las ftalocianinas las cuales pueden ser M; de cobre, zinc, entre otros (**6**) que se emplean en la industria de los pigmentos, la hemoglobina (**7**) capaz de transportar el oxígeno en la sangre y la bilirrubina un pigmento biliar que se almacena en la vesícula biliar y posteriormente formar parte de la bilis, (**ver figura 3**);



6 ***7***

Figura 3. Estructuras con cuatro anillos pirrólicos.

Derivados del anillo pirrólico se les encuentra dentro de los alcaloides pirrolidínicos e indólicos, como por ejemplo, la higrina (**8**) que se encuentra en las hojas de la coca y el triptófano (**9**) un aminoácido esencial en la dieta alimenticia, (**ver figura, 4**).



8 **9**

Figura 4. Ejemplos de alcaloides pirrolidínicos e indólicos.

Dentro de la clasificación de los alcaloides encontramos a los pseudoalcaloides, por ejemplo; la conesina, (**10**, **ver figura 5**).

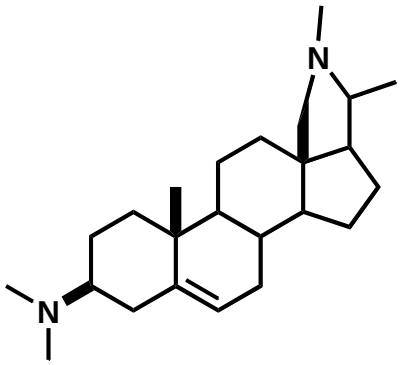
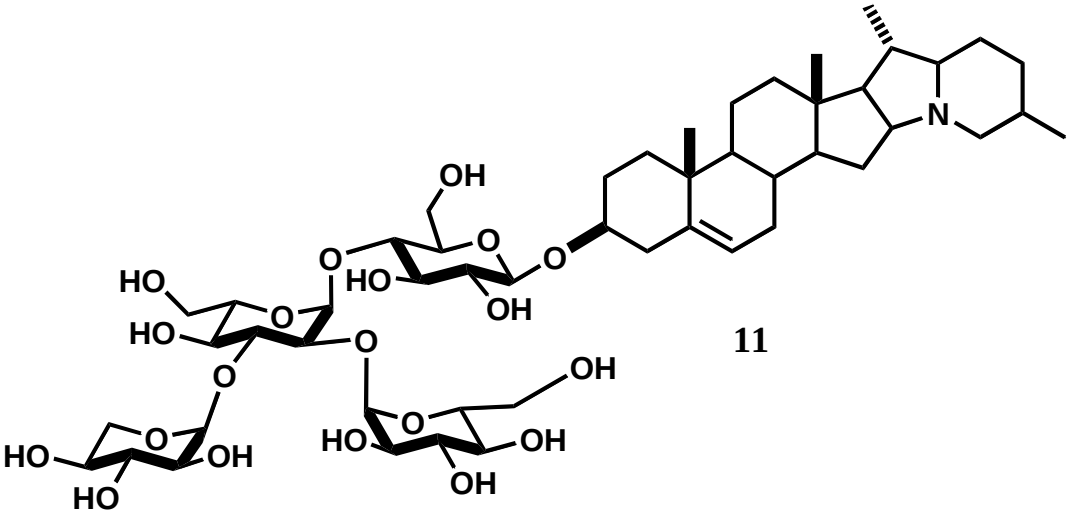


Figura 5. Estructura de la conesina.

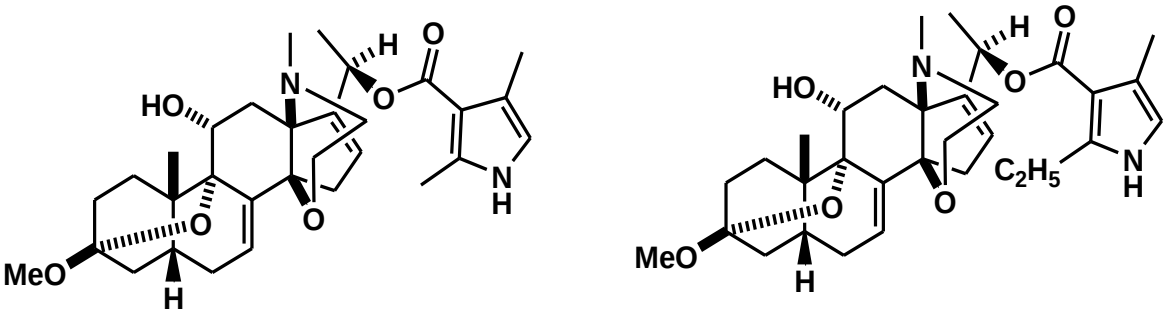
Las saponinas se encuentran en plantas en forma de glicósidos; estructuras compuestas por una aglicona sustituida con uno o varios azúcares. Algunas saponinas con una cadena azucarada en C-3 tienen gran actividad microbicida en las plantas y esta actividad depende de la presencia de los azúcares, tal como la chaconina (**11**). De modo que cuando se pierde un azúcar o el glicósido, la saponina da lugar a la pérdida de actividad microbicida. [5].



11

Figura 6. Estructura de la chaconina.

Dumbacher *et. al*., a partir de la piel y plumas en cinco especies de sapos y aves de Nueva Guinea pertenecientes al género *Pitohui*, lograron aislar alcaloides esteroidales nitrogenados conocidos como batracotoxinas (**12**) y (**13**). [6]



12 **13**

Figura 7. Estructura de alcaloides esteroidales nitrogenados.

Las plantas terrestres son fuentes prolíficas de alcaloides esteroidales, dando como resultado una serie de compuestos. Sin embargo, se ha divulgado que algunos invertebrados marinos como las esponjas, proveen esteroides característicos.

En 1997 Marino *et. al*., examinaron una esponja del Sur del Pacífico, cuyos extractos mostraron actividad contra virus de leucemia y ligera actividad contra el de VIH. La

purificación del extracto condujo al aislamiento de un alcaloide esteroidal, denominado plakinamina A (**14**). [7]

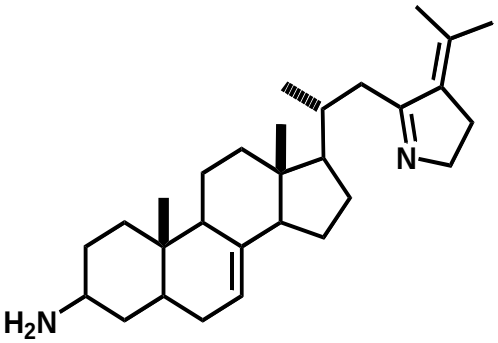


Figura 8. Estructura de plakinamina A.

Años más tarde Ridley y Faulkner, en 2003, aislaron 2 alcaloides esteroidales citotóxicos (**15** y **16**) de la esponja marina *Corticium niger*, reportando que tras realizar ensayos estos presentaron actividad antifúngica. [8]

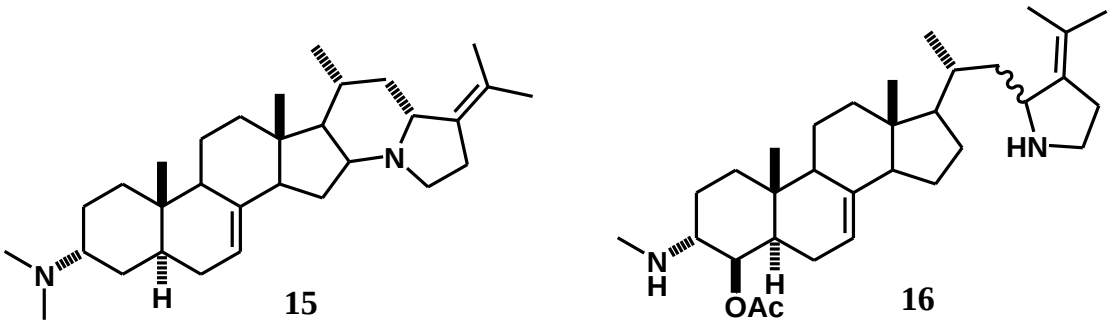


Figura 9. Estructura de alcaloides esteroidales citotóxicos.

b) Reacción de Paal-Knorr.

En 2015 Abbat *et. al*., propusieron un mecanismo de la reacción Paal-Knorr para la síntesis de pirroles, mostrado en la **figura 10**. [9]

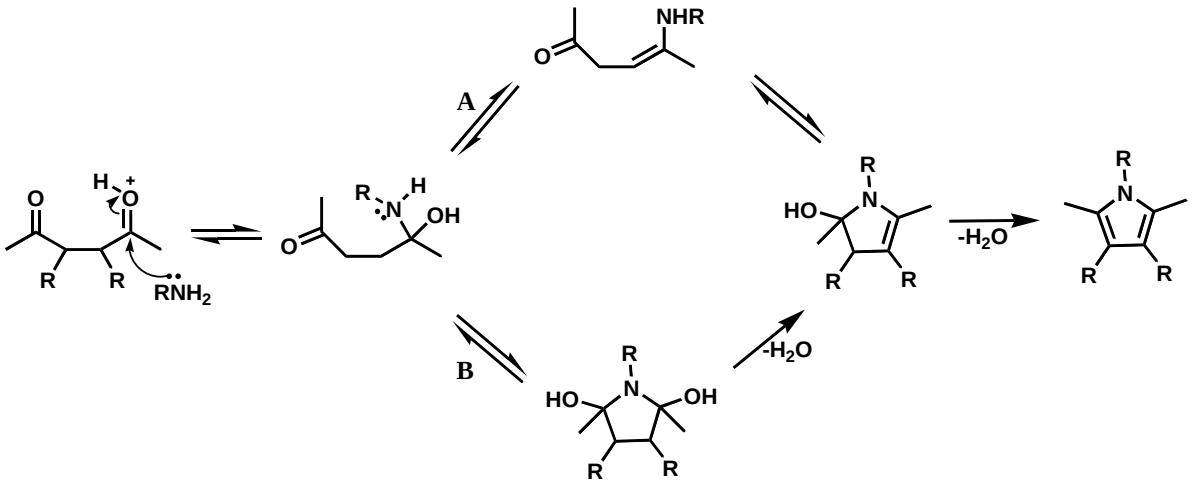
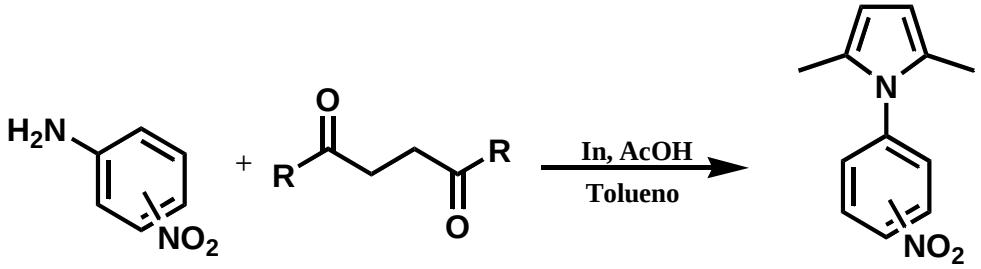


Figura 10. Rutas para la síntesis de pirroles a través de la reacción de Paal-Knorr.

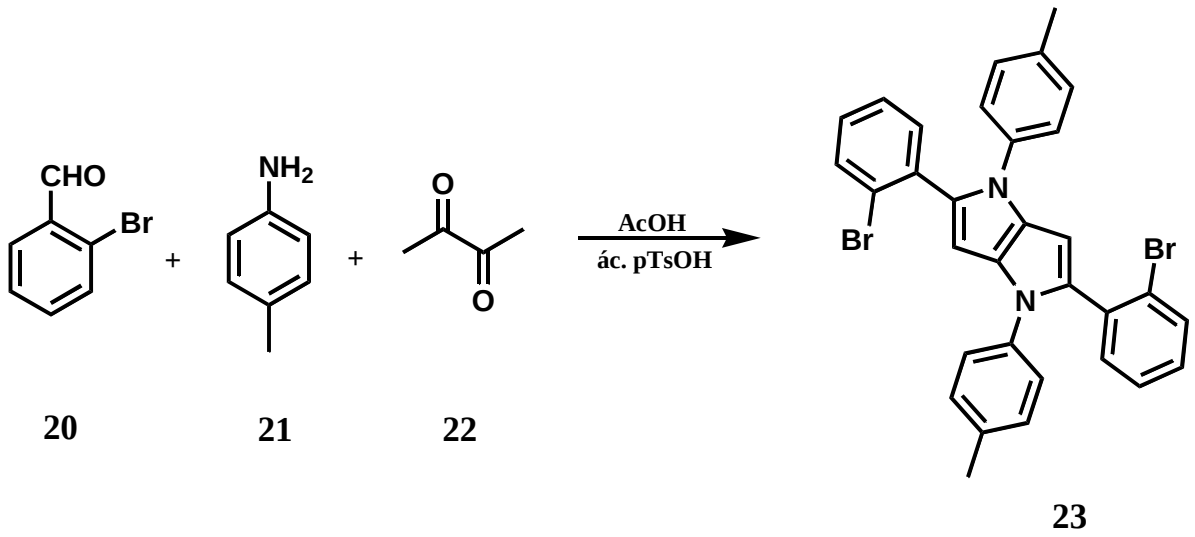
En 2015 el grupo de investigación de Byeong, empleando la condensación de Paal-Knorr sintetizó pirroles a partir de un sistema 1,4-dicarbonílico, nitroanilinas y como catalizador ácido acético. [10]



17 **18** **19**

Figura 11. Síntesis de pirroles trisustituidos.

El grupo de investigación de Jonathan Brewer generó pirroles a partir de aldehídos, aminas aromáticas y sistemas 1,2-dicarbonílicos, y como catalizador empleó ácido *para*-toluenosulfónico (**ver figura 12**). [11]



20 **21** **22** **23**

Figura 12. Síntesis de pirroles.

En 2003 Minetto *et. al*., sintetizaron pirroles a partir de un sistema 1,4-dicarbonilo, empleando la condensación de Paal-Knorr y microondas. El uso de microondas en síntesis ha despertado el interés a diversos grupos de investigación, debido a que es una tecnología fructífera para el descubrimiento de fármacos. [12]

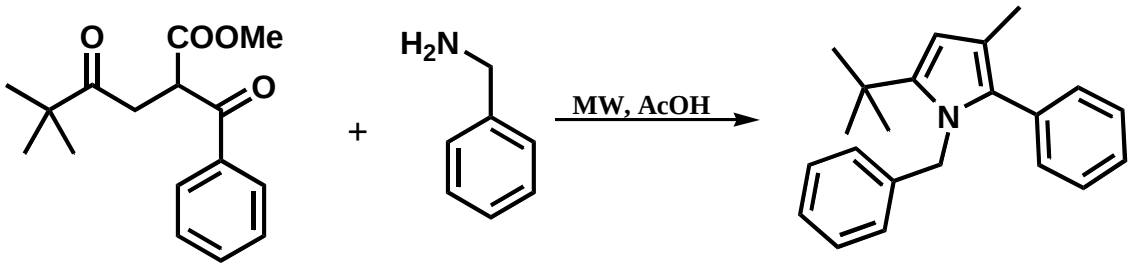
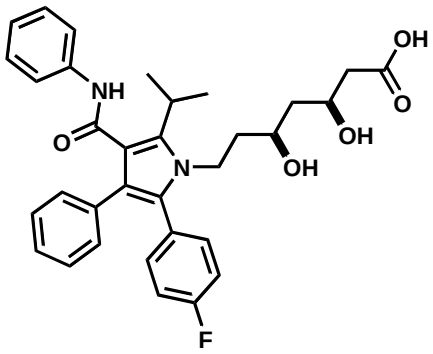


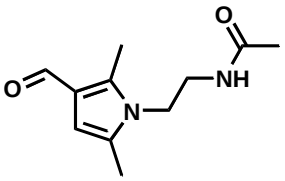
Figura 13. Síntesis de pirroles por microondas.

c) Fármacos sintetizados a partir de la condensación de Paal-Knorr

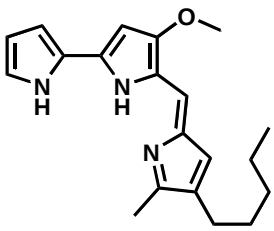
Existen reportes en los que emplean catalizadores de metales de transición, nanocatalizadores y organocatalizadores para la obtención de heterociclos de 5 miembros. La importancia de la condensación de Paal-Knorr se destaca en la síntesis de los fármacos comerciales tales como, Atorvastatina (**24**, antitriglicérido), Aloracetam (**25**, anti-Alzheimer), Prodigiosina (**26**, antibacteriana, antifúngica, antimalaria) y Roseophilin (**27**, antitumoral), (**ver figura 14**). [9]



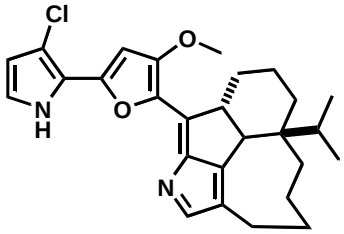
24



25



26

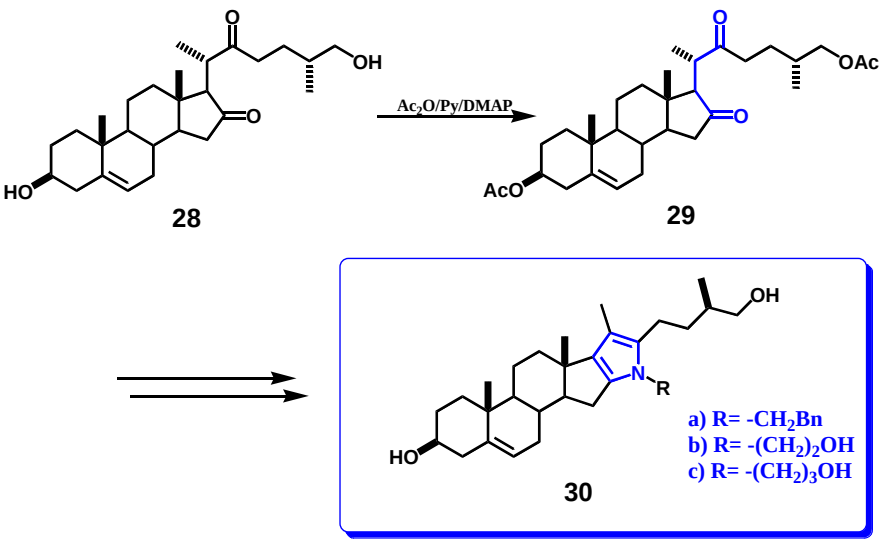


27

Figura 14. Fármacos sintetizados empleando la condensación de Paal-Knorr.

d) Trabajo personal desarrollado con anterioridad.

En un trabajo anterior, reporté la formación de pirroles ubicados entre el esqueleto y la cadena lateral, con resultados satisfactorios, (**ver esquema 2**). [13] Es sabido que las reacciones que se efectúan en la cadena lateral son más difíciles que las que se efectúan sobre el esqueleto tetracíclico dado que existe un libre giro y por tanto la velocidad de reacción es grande o bien las reacciones no conducen a lo programado. La formación de los compuestos **30a** y **30c** fue favorecida por que el grupo carbonilo C-16 no presenta libre giro, ya que se encuentra ubicado sobre el esqueleto rígido. Estos compuestos fueron evaluados en su actividad antimicrobiana, conjuntamente con el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias de la BUAP, y se obtuvieron resultados exitosos. El presente trabajo es una continuación de la síntesis de heterociclos, pero con un grado mayor de complejidad dado que se emplea exclusivamente la cadena lateral.



Esquema 2. Síntesis de pirroles esteroidales a partir de kriptogenina.

Objetivos

- Analizar la reactividad de un sistema 1,5-dicarbonilo para lograr la formación de una tetrahidropiridina y compararla con la reactividad del sistema 1.4-dicarbonílico en la formación de un pirrol; ubicados ambos sistemas en la cadena lateral esteroidal.
- Obtener el diacetato de 27-nor-22,25-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo, que contiene un sistema 1,4-dicarbonilo y evaluar su reactividad en las condiciones de Paal-Knorr para generar los productos nitrogenados:

    - 3β,16β-diacetoxi-*N*-bencilpirrolo[2',3',4',5':22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (**37**).
    - 3β,16β-diacetoxi-*N*-(3-hidroxi)propilpirrolo[2',3',4',5':22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (**38**).
    - 3β,16β-diacetoxi-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2',3',4',5':22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (**39a**).
    - 3β,16β-diacetoxi-*N*-(4-hidroxi)fenetilpirrolo[2',3',4',5':22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (**40**).

- Caracterizar los productos obtenidos por medio de diversas técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear de 1 y 2 dimensiones, IR, MS y sus propiedades físicas.
- Evaluar los compuestos colestánicos nitrogenados en su actividad antimicrobiana.

Discusión de resultados

a) Apertura regioselectiva de los anillos E y F de la diosgenina.

El compuesto 22-oxo-26-hidroxicolestánico se obtuvo utilizando una metodología reportada por nuestro grupo de investigación. [14] Se realizó la apertura regioselectiva de los anillos E y F de la diosgenina, empleando eterato de trifluoruro de boro ($BF_3.OEt_2$) y anhídrido acético a 0°C. Bajo dichas condiciones de reacción, se formó el intermediario (***i***); donde los carbonos de carbonilo del anhídrido acético son activados por el ácido de Lewis y uno de ellos es atacado por el par electrónico proveniente del oxígeno del anillo tetrahidropiránico, generando así al ion oxocarbenio. Posteriormente se efectúa un ataque en C-22 por una molécula de agua formando el intermediario (***ii***), subsecuentemente se genera el intermediario hemicetálico (***iii***). La apertura del anillo F de (***iii***) por la participación de un par electrónico del átomo de oxígeno del alcohol intermediario. Finalmente se forma la estructura **26** de la cetona protonada en (***iv***) y la desprotonación de la misma.

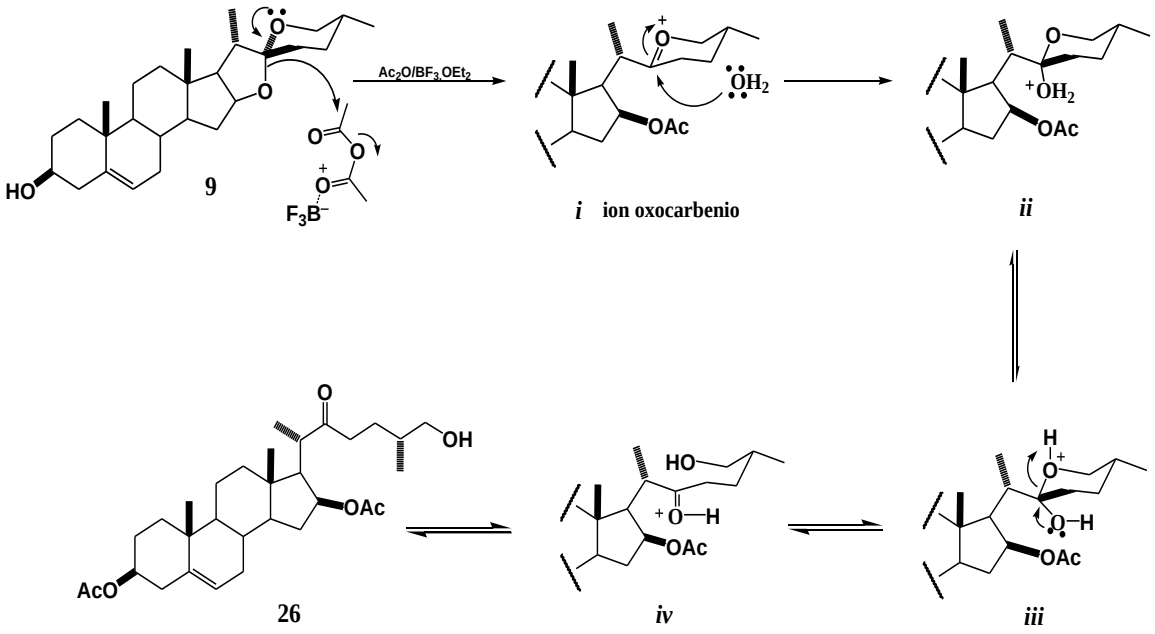


Figura 15. Esquema para obtener cadenas 22-oxo-26-hidroxicolestánicas.

b) Caracterización del diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (32)

En el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **32** (**figura 16**) se puede observar a 5.34 ppm una señal doble para H-6 cuyo desplazamiento es característico para un protón vinílico, con una constante de acoplamiento $J_{6\text{-}7}$= 4.8 Hz. Posteriormente se observa una señal múltiple para H-16 en 4.96 ppm y a 4.58 ppm una señal múltiple para H-3, otra señal es la correspondiente a los protones en 26 en 3.40 ppm como una señal doble con una constante de acoplamiento $J_{26,25}$= 6 Hz. En 2.94 ppm se puede apreciar una señal múltiple, correspondiente al H-20. Mientras que a 2.62 y 2.39 ppm se observan los H-23a y H-23b, protones en posición alfa al grupo cetónico. Los metilos de los acetatos en 2.01 y 1.95 ppm, respectivamente, la señal para los metilos 19 y 18 en 1.00 ppm y 0.85 ppm, para el metilo 21 se observa como una señal *d*a 1.12 ppm, y el metilo 27 como una señal doble en 0.89 ppm respectivamente.

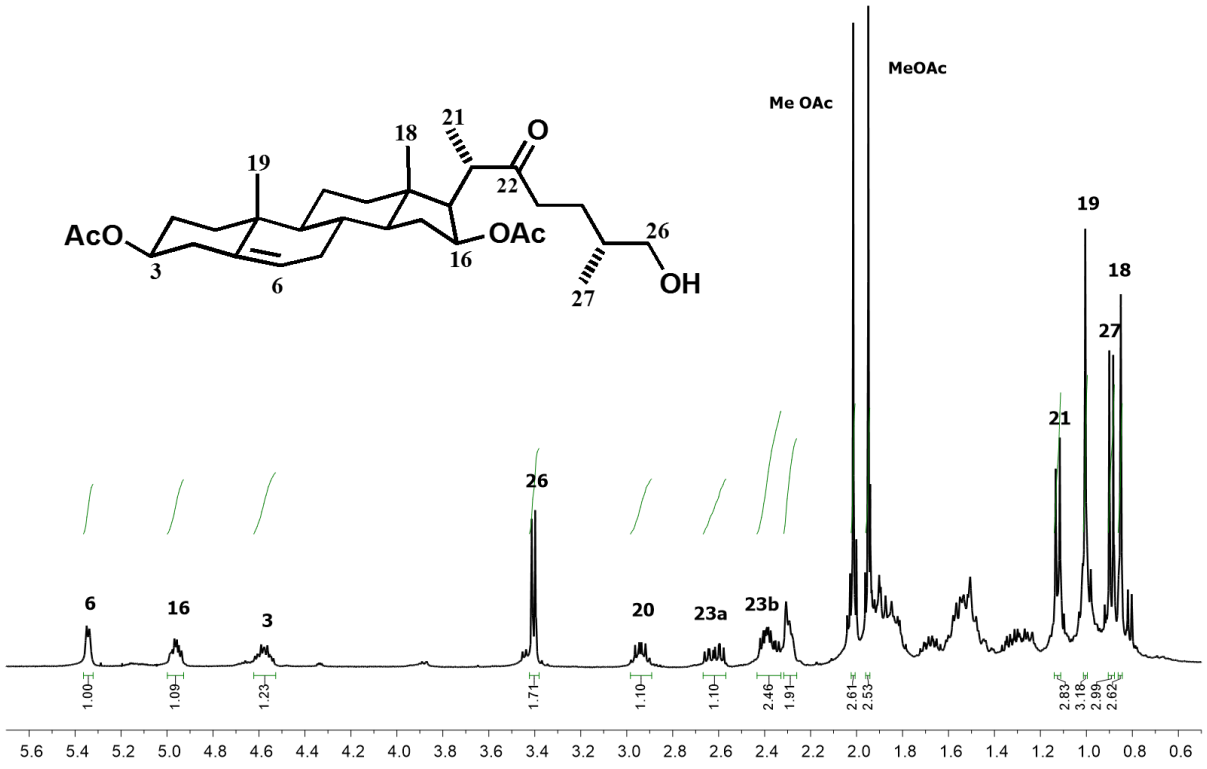


Figura 16. RMN de ^{1}H de **32.**

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **32** (**figura 16**) se aprecia la señal de C-22 que pertenece a un carbonilo de cetona en 213.8 ppm, mientras que la señal de los carbonilos de

grupos acetatos pertenecientes a C-3 y C-16 se observan en 170.7 y 170.0 ppm. Las señales de los C-5 y C-6 en 139.8 y 122.5 ppm, que indica la presencia del doble enlace, mientras que se distinguen las señales de C-16 y C-3 en 75.9 y 74.0 ppm. En 67.6 ppm se observa la señal de C-26. En campo alto se encuentran las señales de los metilos 27, 21, 19 y 18 en 17.1ppm, 16.8 ppm, 19.50 y 13.4 ppm.

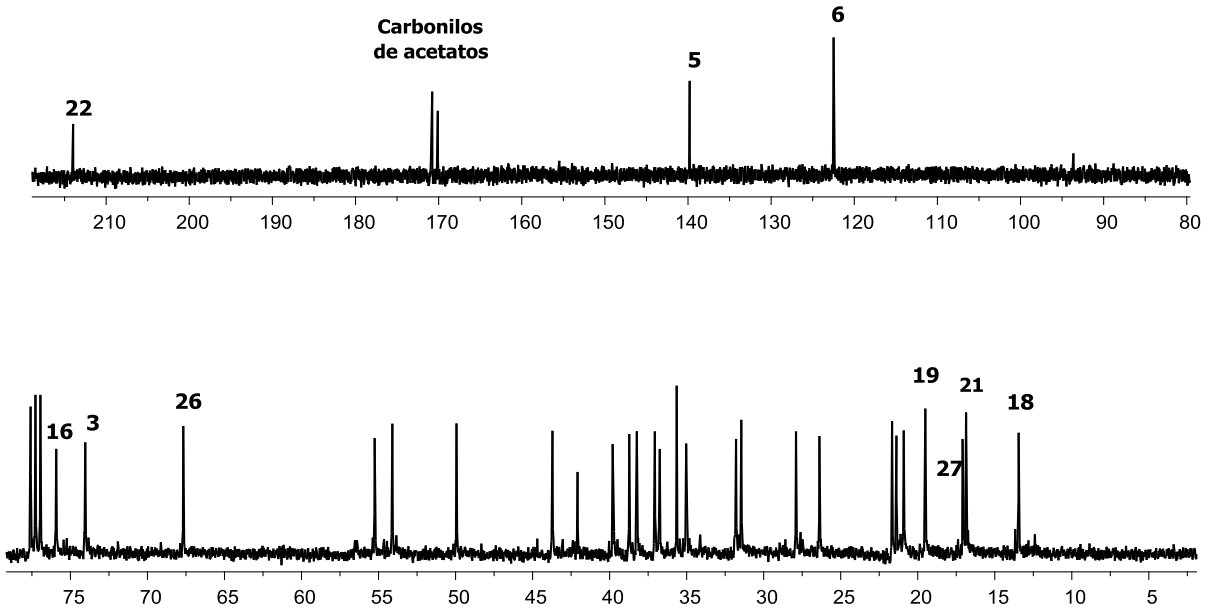


Figura 16. RMN de ^{13}C de **32**.

c) Caracterización del diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (33)

Una señal que es muy importante elucidar es la del protón en C-26, del grupo aldehídico. En el espectro de ^{1}H del derivado **33**, se distingue al protón H-26 en 9.56 ppm, como una señal doble. Para comprobar que el doble enlace en C-5 no sufrió modificaciones, se procede a analizar la sección entre 5 y 6 ppm. Se observa una señal doble perteneciente al protón vinílico H-6. Por otra parte, en 4.95 ppm se encuentra una señal múltiple del H-16 y en 4.57 ppm de H-3 respectivamente. En 2.90 ppm se aprecia el protón de 20, como una señal *dq*. La estructura esteroidal tiene presente dos grupos acetatos y los metilos de dichos acetatos se

observan en 2.01 ppm (para el ubicado en C-16) y 1.94 ppm (para el localizado en C-3). Los protones de los metilos de 21 y 27 se observan como señales dobles en 1.09 y 1.11 ppm. Los metilos 19 y 18 en 1.00 y 0.84 ppm, respectivamente.

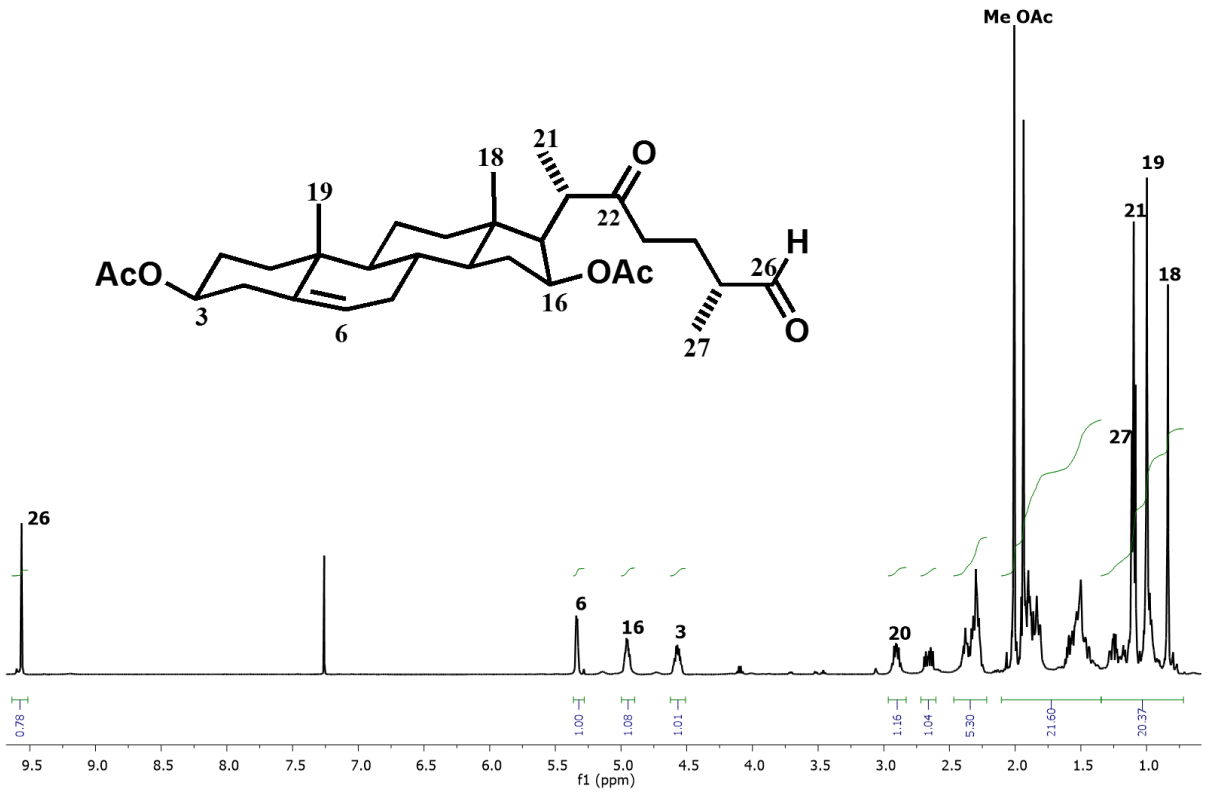


Figura 17. RMN de ^{1}H de **33**.

En el espectro de ^{13}C del compuesto **33**, se puede apreciar en 212.1 ppm la señal de carbono de carbonilo de cetona correspondiente a C-22. En 204.4 ppm corresponde al carbono de carbonilo de aldehído C-26, posteriormente en 170.4 y 169.7 ppm de carbono de carbonilo pertenecientes a los C-16 y C-3. El esteroide presenta un doble enlace por lo que el C-6 se observan en 122.1 ppm, mientras que en 75.5 y 73.7 ppm corresponden a los carbonos C-16 y C-3. Los metilos 18, 19, 21 y 27 se aprecian en 13.1, 19.2, 16.6 y 13.4 ppm respectivamente, pero para los metilos de los grupos acetatos de C-16 y C-3 en 21.3 y 21.1 ppm.

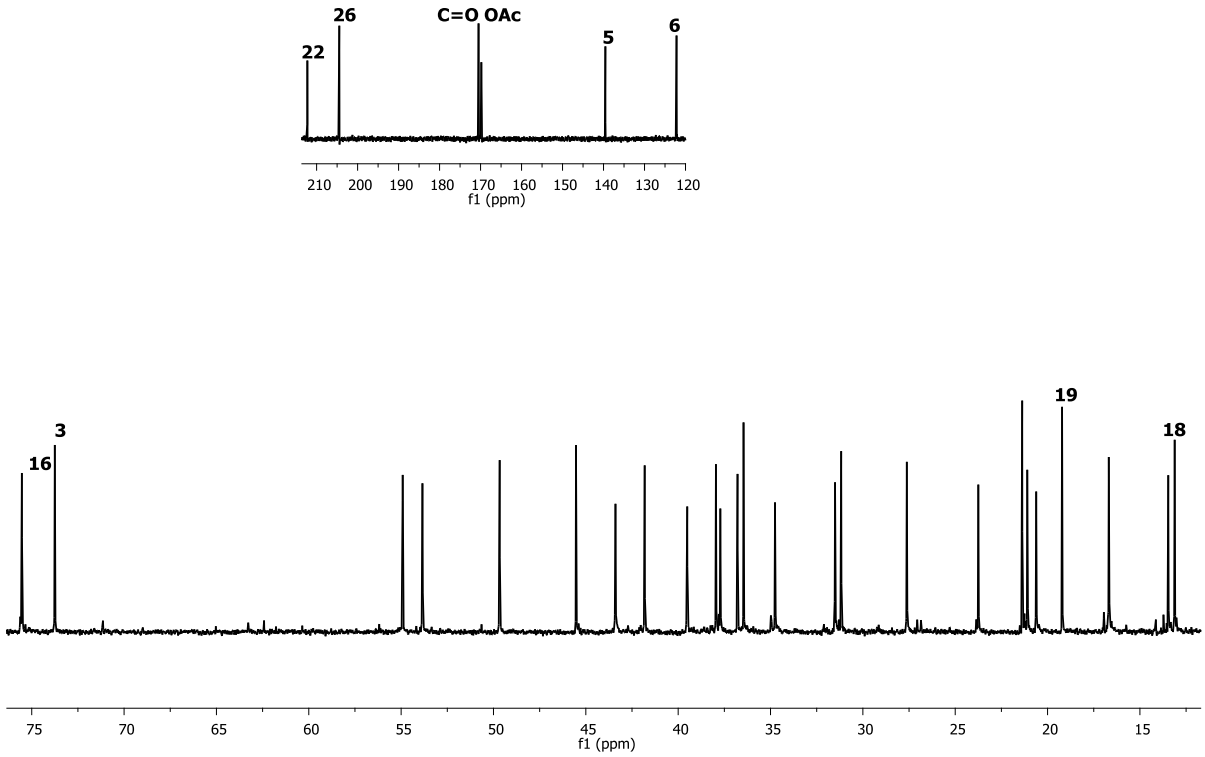


Figura 18. RMN de ^{13}C de **33**.

d) Caracterización del diacetato de 27-nor-22,25-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (34)

En la **figura 19** se muestra el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **34**, en el que se puede apreciar a campo bajo el protón vinílico H-6 en 5.32 ppm demostrando que no hubo modificación del Δ^5, así mismo en 4.88 ppm (señal múltiple correspondiente a H-16), en 4.55 ppm (señal múltiple para H-3) y la señal en 2.96 ppm (doble de cuádruple, de H-20).

A campo alto en 2.14 ppm se aprecia una nueva señal simple que integra para tres protones correspondientes al metilo 26.

De acuerdo a la ruta sintética, las posiciones 3 y 16 se encuentran protegidos con grupos acetatos, por lo tanto los metilos de ambas señales se observan a campo alto a 1.99 y 1.97 ppm.

Las señales de los siguientes metilos se observan sin cambios, de ésta manera corroboramos que sólo se llevó a cabo la modificación en la cadena lateral y no en los anillos del esteroide.

La señal del metilo 21 se observa en 1.13 ppm. Por último, en 0.98 y 0.83 ppm se encuentran las señales correspondientes a los metilos 19 y 18. Una vez conociendo la totalidad de las señales del espectro de protón, se concluye la pérdida de un átomo de carbono y que éste debe ser el que contenía el grupo aldehídico, dado que es evidente la pérdida del protón de aldehído, característico del compuesto **33**.

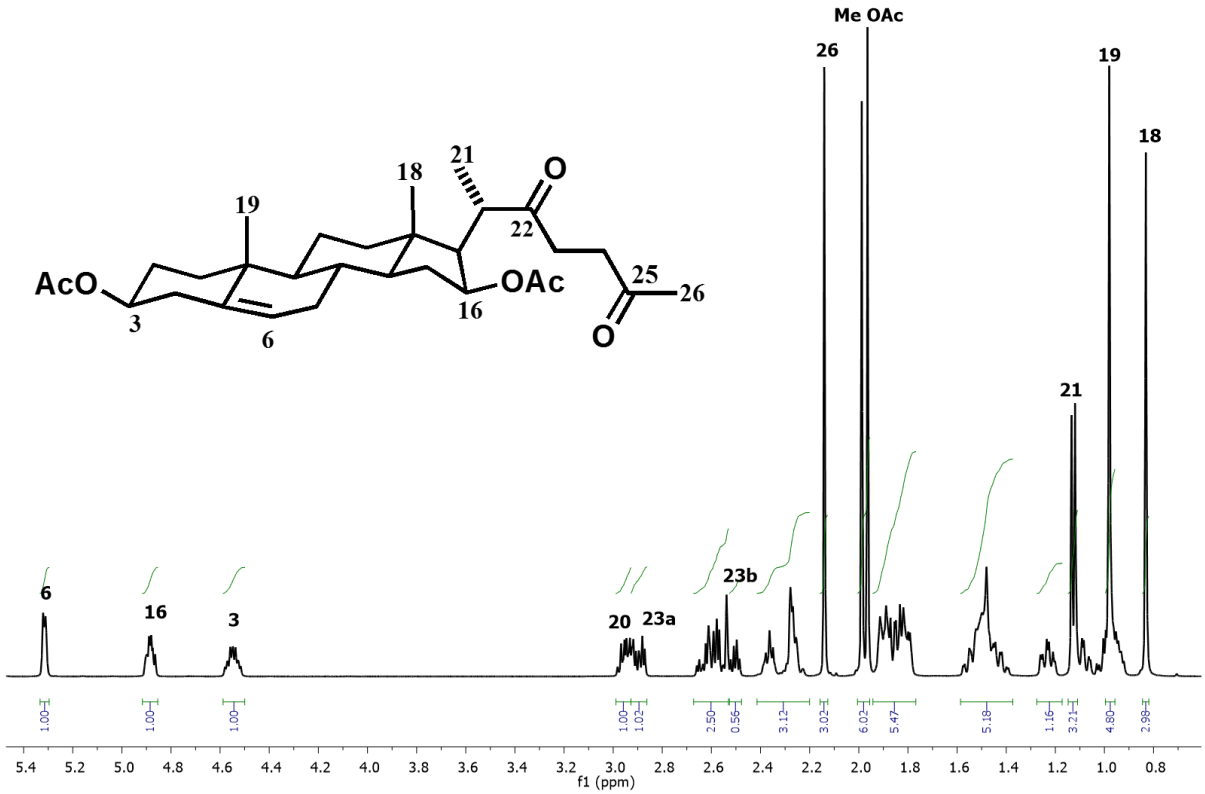


Figura 19. RMN de 1H de **34.**

Estos resultados propiciaron el interés de utilizar otras estructuras análogas a la TMAn con el propósito de evaluar el efecto de dichas aminas con el grupo carbonilo de aldehído.

Primeramente realizamos ensayos con TMAn con diferentes disolventes y tiempos de reacción, de donde encontramos que el mejor rendimiento es empleando etanol a 3.5 h de calentamiento convencional. De aquí nos basamos para las demás reacciones.

Posteriormente empleamos los mismos disolventes pero con DMAn. En este caso disminuimos el tiempo de calentamiento convencional, debido a que al momento de

monitorear la reacción se observaba consumo inmediato de la materia prima. Se observó que si aumentaba el tiempo de reacción, el rendimiento no mostraba grandes cambios.

Subsecuentemente se llevó a cabo las reacciones con PMAn y mismos disolventes, nuevamente se disminuyó el tiempo de reacción ya que aumentando el tiempo de calentamiento el rendimiento no presentaba cambios significativos.

A continuación, se muestra en la tabla 1; la amina, el disolvente, el tiempo de reacción y el rendimiento que se obtuvo del compuesto **34**.

Tabla 1. Ensayos con 4 disolventes.

Amina	**Disolvente**	**Tiempo de reacción**	**Rendimiento del compuesto 34**
TMAn	Etanol	3.5 h, Δ	70%
TMAn	Metanol	3 h, Δ	60%
TMAn	Isopropanol	4 h, Δ	55%
TMAn	Acetonitrilo	5 h, Δ	58%
DMAn	Etanol	3 h, Δ	55%
DMAn	Metanol	3 h, Δ	60%
DMAn	Isopropanol	4 h, Δ	55%
DMAn	Acetonitrilo	3.5 h, Δ	70%
PMAn	Etanol	3 h, Δ	60%
PMAn	Metanol	3 h, Δ	55%
PMAn	Isopropanol	3 h, Δ	55%
PMAn	Acetonitrilo	4 h, Δ	50%

En la **tabla 1**, encontramos que el compuesto **33** reacciona con tres aminas aromáticas activadas con rendimientos que van del 50-70%, empleando tres disolventes próticos y un aprótico.

Además se puede apreciar, la reactividad de las aminas cuando se disminuyen los tiempos de reacción y cuando la amina aromática contiene tres, dos o un grupo donador de densidad electrónica. Esto afecta el rendimiento del compuesto **34**.

En la **figura 20**, se muestra una comparación de los espectros de 1H de RMN de los compuestos 33 y 34. En la materia prima 33, las señales de los protones de los metilos 21 y 27 presentan desplazamientos químicos muy similares, por ubicarse en la zona de desprotección de los carbonilos 22 y26, mientras que en espectro de 34, únicamente se observa una señal doble, la del metilo sobre C-20.

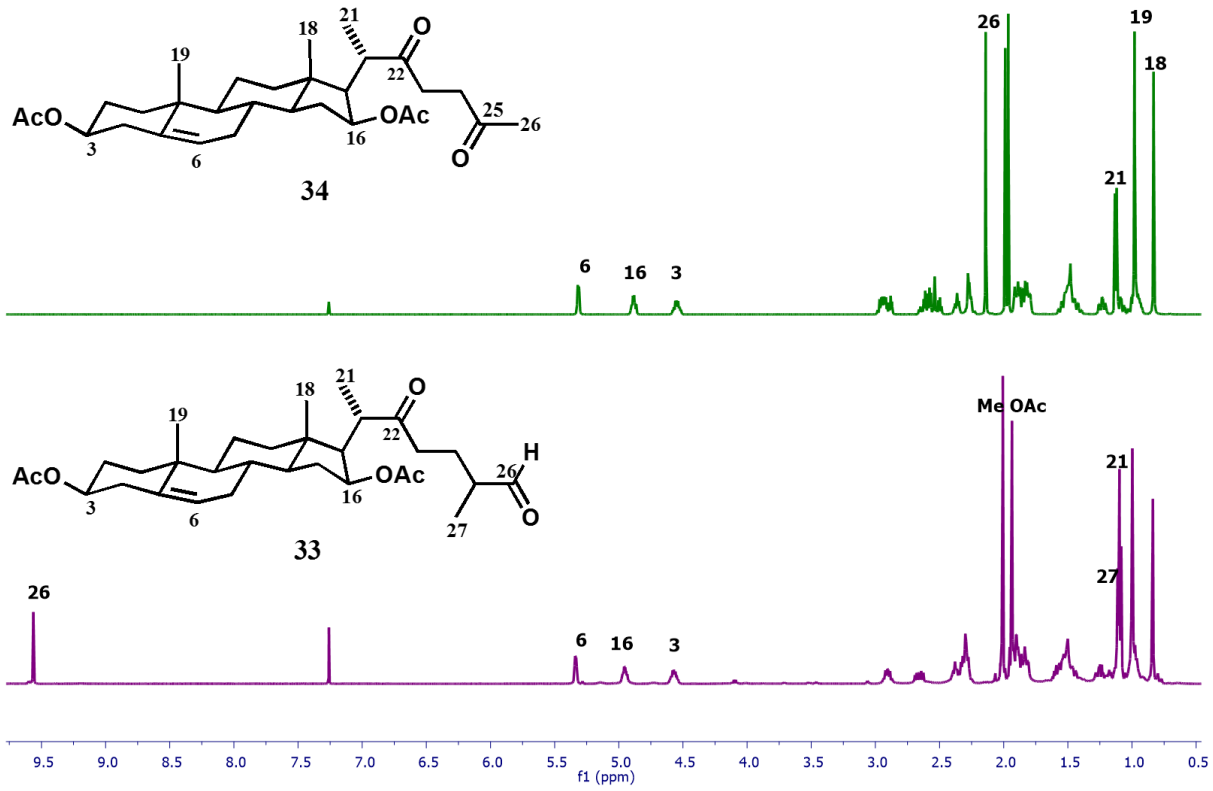


Figura 20. Espectros de ^{1}H de RMN de compuestos **33** y **34**.

En la **figura 21** se muestra el experimento de COSY en el que se pueden resaltar las correlaciones de los protones del compuesto **34**.

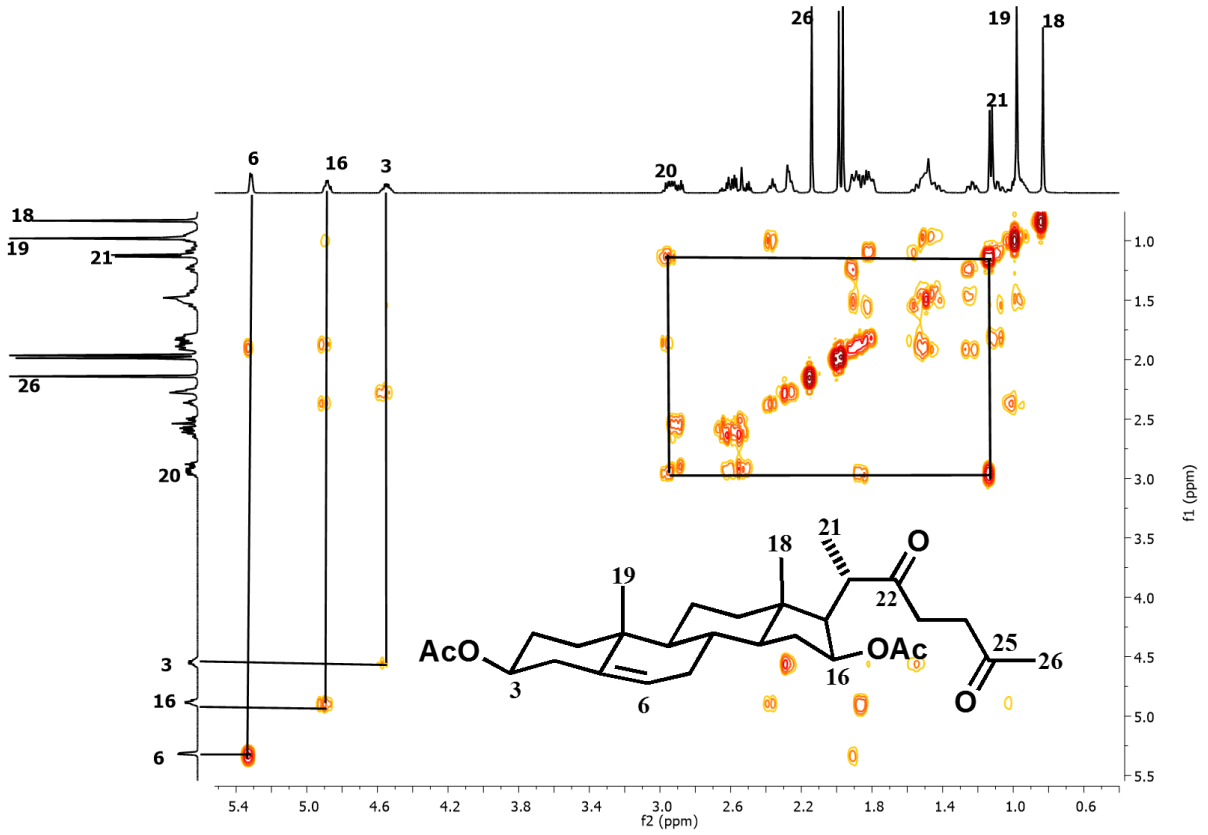


Figura 21 Experimento COSY de **34.**

En el espectro de ^{13}C del compuesto **34** encontramos la señal característica de un carbono de cetona en 211.7 ppm, para C-22, mientras que la correspondiente a la cetona en C-25 aparece en 206.9 ppm. La señal del carbono del carbonilo del acetato en C-16 se observa en 170.1 ppm y en 169.8 ppm el de C-3. La señal de los carbonos vinílicos 5 y 6 en 139.4 y 122.0 ppm respectivamente.

Se visualizan las señales de 3 y 16 en 73.7 y 75.4 ppm respectivamente. Las señales de los metilos 18, 19 y 21 se encuentran en 13.0, 19.1 y 16.6 ppm. Así como la nueva señal que corresponde al metilo 26 en 29.9 ppm.

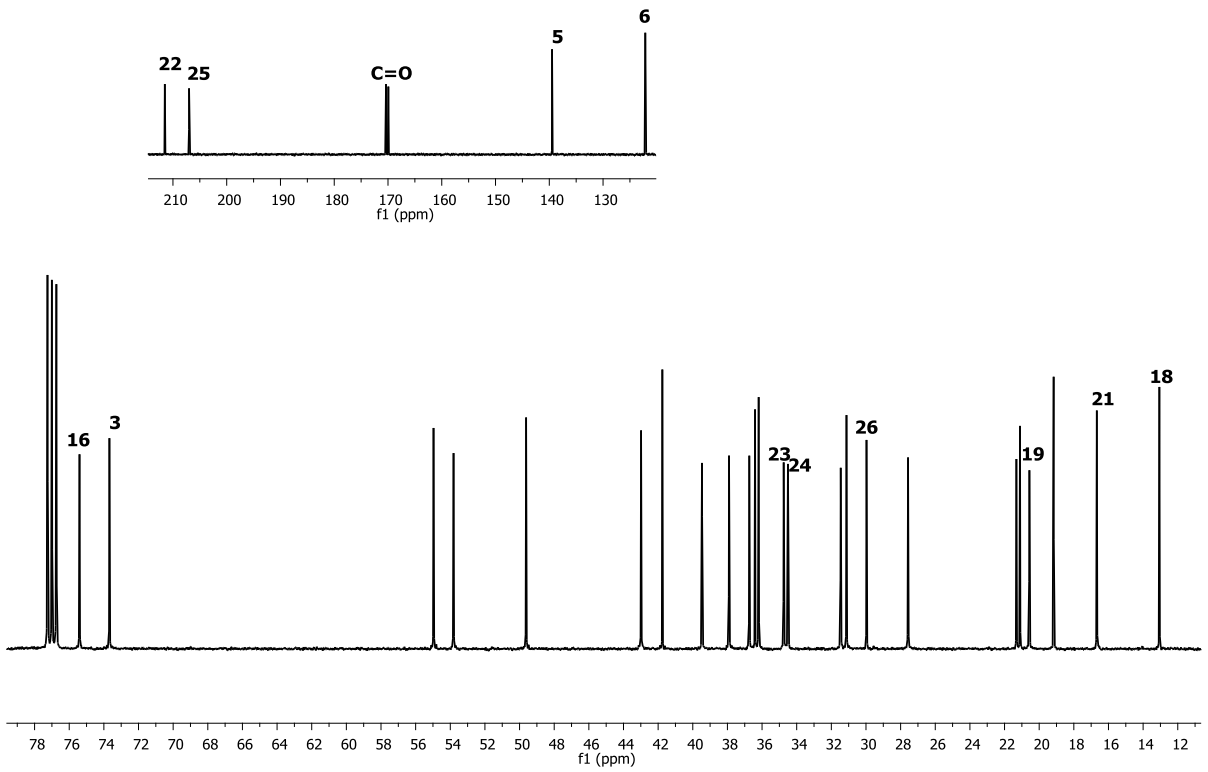


Figura 22. RMN de ^{13}C de **34**.

Las señales de ^{1}H con su correspondiente carbono se asignaron gracias a la ayuda del experimento de correlación HSQC, (**ver figura 23**). En este experimento se observa la correlación a un enlace de distancia. Todas las señales son características del compuesto, sin embargo, las más importantes son el metilo 26, metilos de esteres, pues la modificación de la cadena lateral indicará nuevos desplazamientos y nuevas correlaciones.

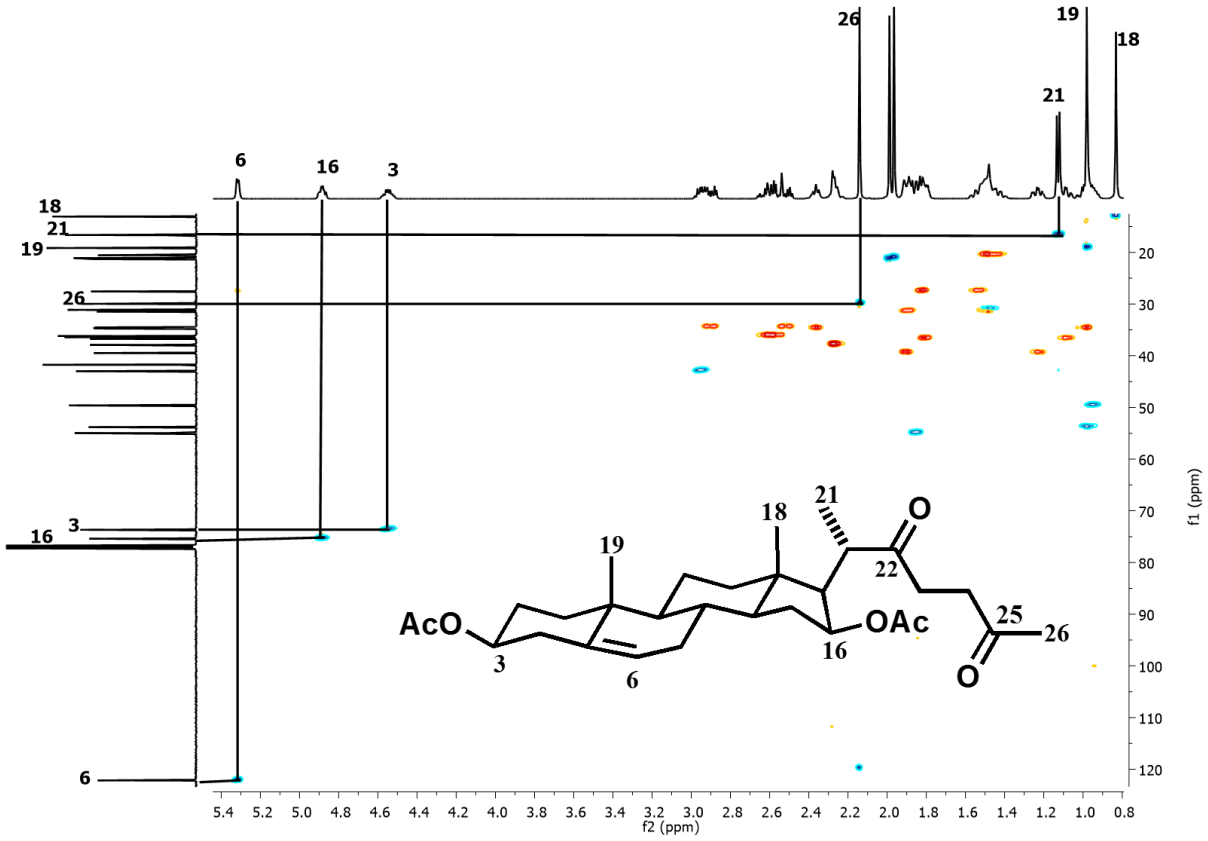


Figura 23. Experimento HSQC de **34**.

Con el propósito de asignar los átomos de carbono y corroborar la modificación de la cadena lateral, en la **figura 24** se presenta el experimento HMBC con las correlaciones del esqueleto esteroidal, ya que muestra las correlaciones a dos, tres enlaces de distancia. Las señales características son la correlación que presenta el metilo 26 con C-25 a 206.9 ppm, el cual corresponde al carbono de carbonilo de cetona. Así también se observan las correlaciones de los protones H-23, H-24 con C-25 y con C-22. Otras correlaciones son de los protones H-20, H-23, H-24, H-21 con C-22 a 211.2 ppm.

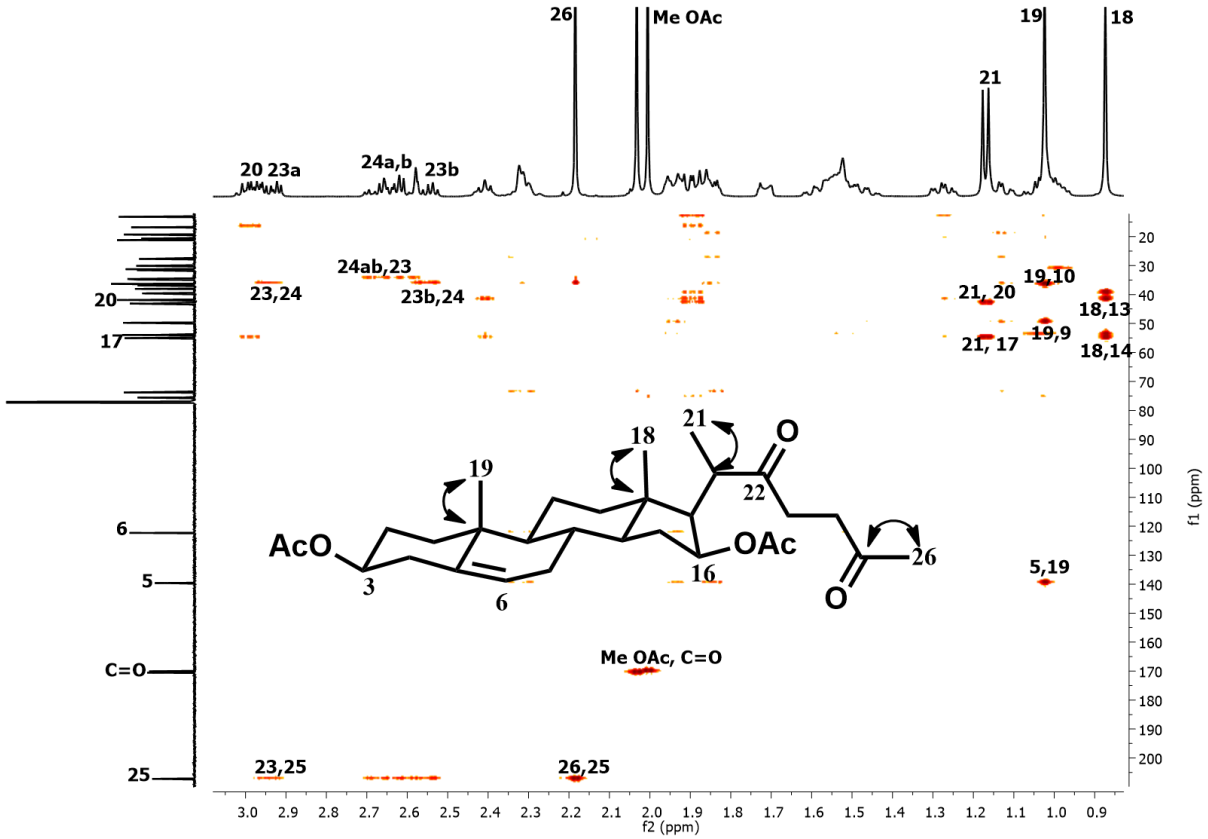


Figura 24. Experimento HMBC de **34**.

e) Mecanismo de la formación de 34.

Cuando se realiza una reacción química, es sustancial preservar todos los compuestos obtenidos, debido a que son indispensables para explicar y/o proponer un mecanismo de reacción.

Al llevar a cabo la reacción empleando anilina no se produjo compuesto de adición (imina) o ciclación (tetrahidropiridina). Sin embargo, cuando se empleó TMAn si hubo reacción y la purificación así como la caracterización condujo a proponer la formación del compuesto **34**, que de primera instancia no correspondía a ningún compuesto de adición o ciclación, sino a un compuesto norcolestánico, cuya estructura se elucidó en base a la argumentación expuesta en el inciso anterior y a los datos de la parte experimental de **34**.

El resultado obtenido, obligó a presentar una explicación del porqué la reacción no conduce un compuesto de adición o ciclación, además de proponer un mecanismo de reacción para explicar la formación del compuesto norcolestánico **34**.

Reacciones emprendidas para formar un compuesto de adición o ciclación con **33**, se realizaron empleando tolueno a reflujo, bajo la presencia de catalizador ácido y las aminas primarias; bencilamina, 3-aminopropanol, 2-aminoetanol y TMAn, pero en todos los casos se recuperó la materia prima **33**. La reacción de **33** con bencilamina y TMAn a reflujo de tolueno tampoco condujo producto alguno. Sin embargo, la reacción con TMAn a reflujo de MeOH, EtOH, iPrOH o MeCN produjo al compuesto 27-norcolestánico **34**. Este resultado revela que la reacción se inhibe bajo catálisis ácida o con el empleo de un disolvente no polar. Por lo tanto, se decidió emplear bases más ricas en electrones, en ausencia de catalizador ácido. Cuando se empleó un disolvente polar prótico o aprótico, como EtOH, MeOH, iPrOH o MeCN y TMAn, se produjo la obtención del compuesto **34**. Estos resultados propiciaron el interés de utilizar otras bases, con el grupo metoxi, electrodonador, sobre el grupo fenilo, en otras posiciones. También analizar el efecto de la temperatura sobre el curso de la reacción. En este caso se observó que a reflujo de MeOH la reacción transcurría satisfactoriamente pero no cuando se incrementaba la temperatura con el empleo de EtOH o iPrOH. Además, nos cercioramos que no es forzoso el empleo de disolventes próticos, ya que con Acetonitrilo también condujo a la formación del mismo compuesto esteroidal. Por otra parte, una posible razón del por qué bases más ricas en electrones conducen a la reacción, debe estar relacionada al volumen del orbital del par electrónico desaparead presente en el átomo de nitrógeno, que aumenta cuando hay grupos electrodonadores. De acuerdo a lo anterior, queremos mencionar que, en principio, parecía evidente que cualquier amina primaria reaccionase rápidamente con el grupo carbonilo del aldehído en C-26, pero al parecer la cadena lateral de este tipo de sustratos está aglomerada y el grupo aldehído se sobrepone al grupo carbonilo en C-22, con lo cual no se encuentra disponible para reaccionar.

Con respecto al mecanismo de reacción, se propone el mostrado en la **figura 25**. Bajo las condiciones de reacción descritas en el desarrollo experimental, el par electrónico del nitrógeno de la TMAn ataca al carbono de carbonilo del aldehído mediante una adición nucleofílica generando al intermediario ***i***, el cual conduce a la carbinolamina ***ii***, (ver **figura**

25). Un par de electrones del oxígeno del grupo hidroxilo toma un hidrógeno del nitrógeno generando el nuevo intermediario ***iii***, la deshidratación conduce a la formación de la imina ***iv***, o denominada comúnmente base de Schiff.

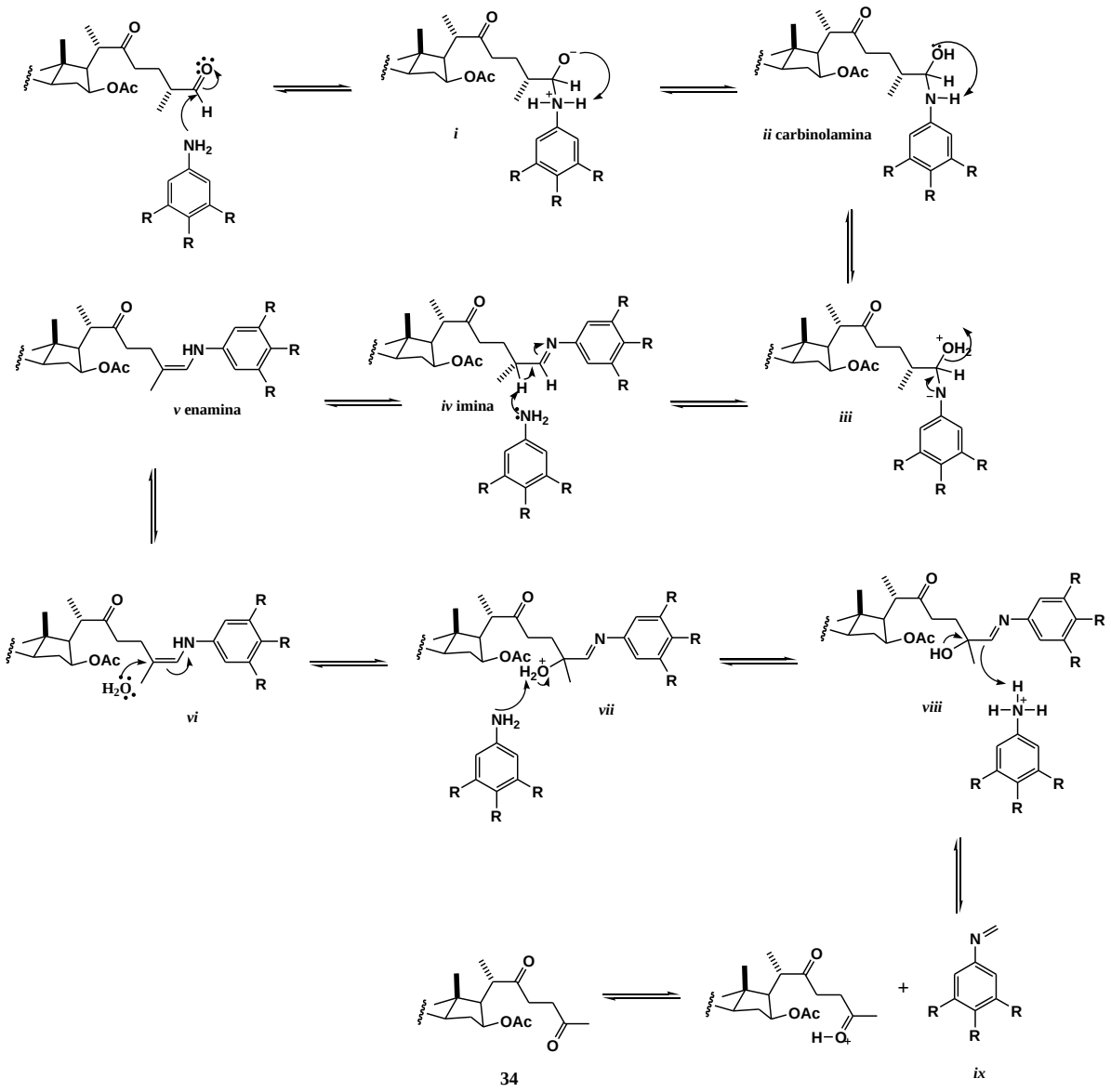


Figura 25. Mecanismo de reacción propuesto para obtener el compuesto **34**.

La TMAn toma un hidrógeno adyacente de la imina, provocando que el par de electrones participe en la formación de un nuevo enlace C-C y a su vez desplazando un par de electrones

del enlace C=N, causando la formación del intermediario ***v***, denominado enamina. Lo anteriormente descrito corresponde a una tautomería imina-enamina.

El par de electrones del oxígeno de una molécula de agua (proveniente del medio ambiente) realiza un ataque nucleofílico a la enamina ***v***, donde la TMAn extrae un átomo de hidrogeno del oxígeno con carga positiva ocasionando estabilidad al mismo. Posteriormente el par de electrones del grupo hidroxilo participa en la formación de un grupo carbonilo de cetona hidratado y de forma concertada se rompe un enlace C-C liberando la posible imina aromática correspondiente. Cabe resaltar que es en este paso donde se elimina el átomo de carbono C-26. Consecutivamente, el nuevo carbonilo protonado que se encuentra en posición 25, se desprotona generando así el nuevo compuesto **34**.

f) Caracterización de arilformamida (35)

Se logró purificar al compuesto que según el mecanismo anterior correspondería a una imina aromática. Sin embargo, el análisis espectroscópico (Resonancia Magnética Nuclear de 1 y 2 dimensiones, Espectrometría de masas, IR-FT) demuestra que el compuesto corresponde a una arilformamida.

En el espectro de ^{1}H de RMN (**ver figura 26**), se observan dos señales en 8.80 y 828 ppm que corresponden a los protones de NH, debido a que la amida se encuentra en equilibrio y también formando puentes de hidrógeno, provocando que se observen las señales dobles.

Posteriormente en 8.59 y 8.26 ppm señales que pertenece al hidrogeno del grupo aldehído, esta última señal de 8.26 ppm se encuentra traslapada con la del protón de NH. Mientras que en 6.84 ppm se observa una señal simple que integra para cuatro hidrógenos y otra señal simple en 6.28 ppm que integra para dos hidrógenos, ambas señales pertenecen a la posición 2. Por otro lado, en 3.76 ppm aparece una señal *m* los cuales pertenecen a los hidrógenos de los metilos (correspondientes a OMe).

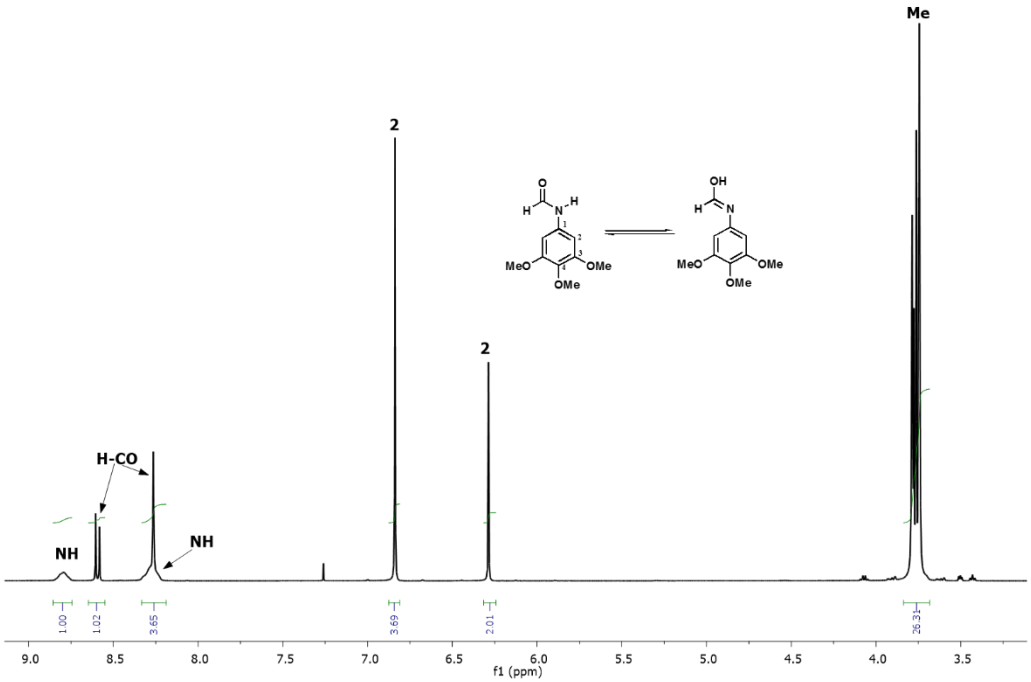


Figura 26. RMN de ^{1}H de **35**.

En la **figura 27**, se presenta el espectro de ^{13}C de RMN, en donde a 162.7 y 159.4 ppm se encuentra la señal del grupo carbonilo, en 153.8 y 153.0 ppm se observa la señal de C-3 respectivamente. Mientras que en 134.3 ppm la señal del C-4, posteriormente en el rango de 135 y 130 ppm los C-4 y C-1. Sin embargo en la región de 95-100 ppm los C-1 y C-2. Subsecuentemente en 60.9 y 55.8 ppm las señales de los metilos de las posiciones 4 y 3, siguiendo la numeración de la estructura propuesta.

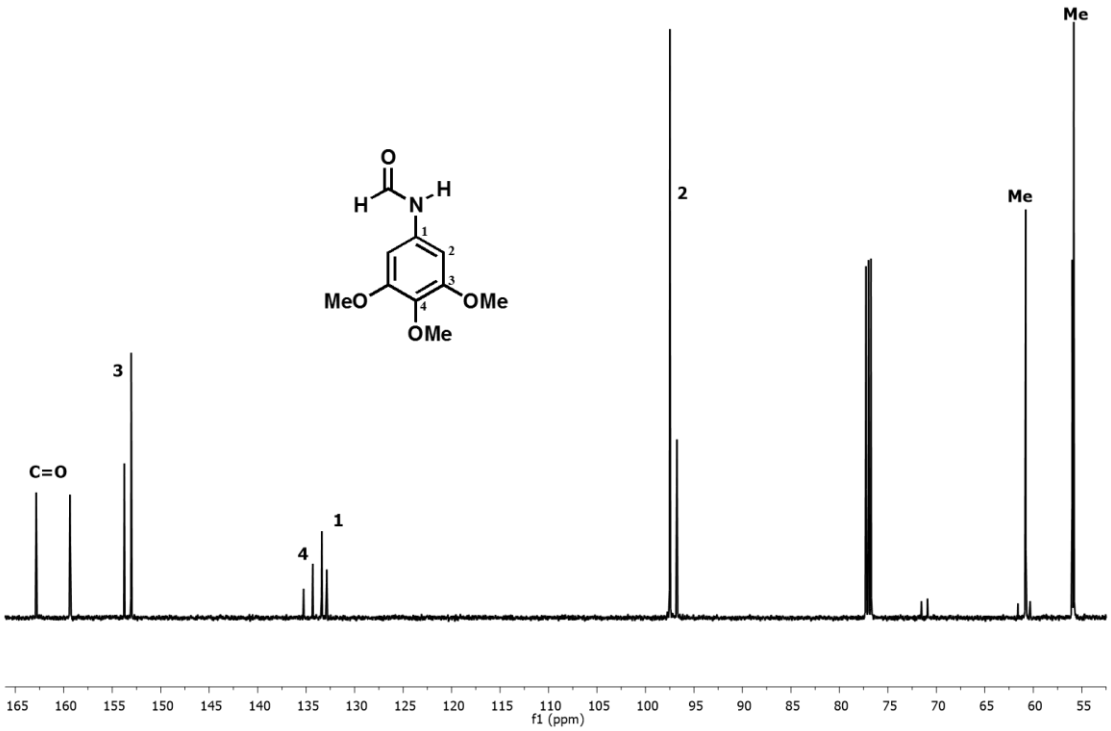


Figura 27. RMN de ^{13}C de **35**.

Se asignaron los respectivos carbonos con su correspondiente señal de protón gracias a los experimentos de dos dimensiones de RMN, como por ejemplo, el experimento HMBC muestra las correlaciones a dos y tres enlaces. Donde encontramos una señal muy característica de NH, de modo que la señal de protón se correlaciona a tres enlaces con el C-1, los protones de C-2 se correlacionan con C-1 y C-4, así como los protones de metilos se correlacionan con C-3 y C-4.

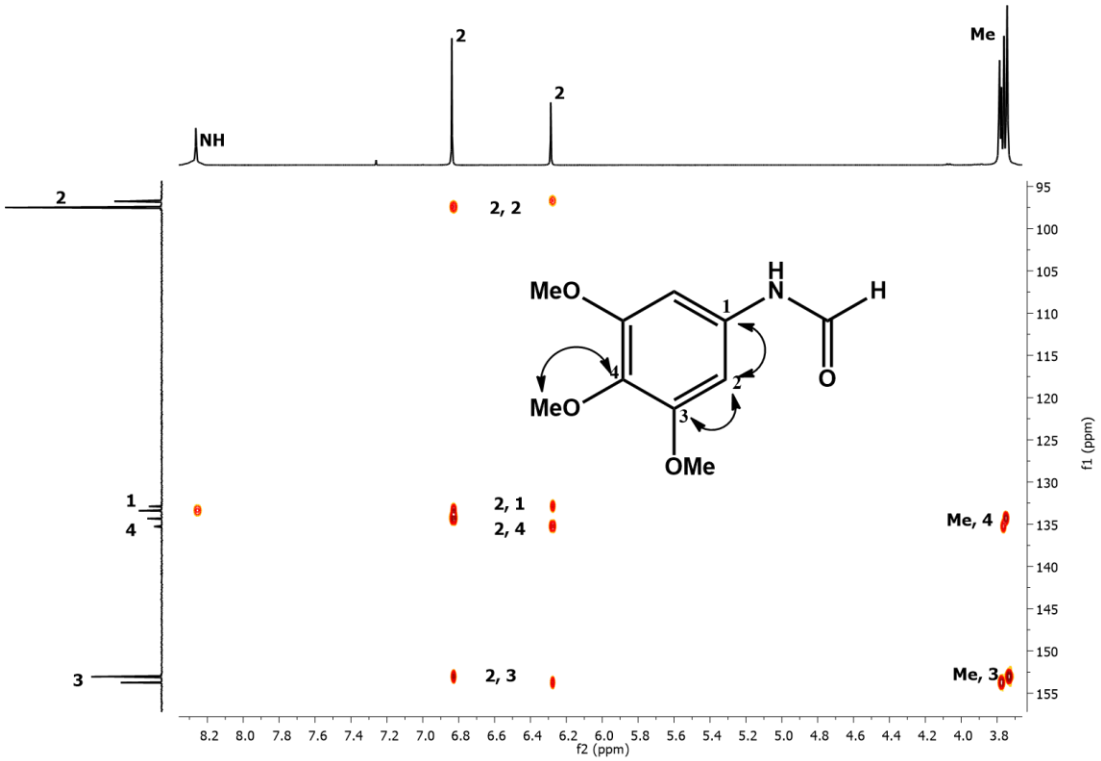


Figura 28. Experimento HMBC de **35**.

Para explicar su formación se propone el mecanismo mostrado en la **figura 29**. El grupo imino tiene un comportamiento de reactividad similar al del grupo carbonilo, donde el par electrónico del oxígeno de una molécula de agua, ataca al carbono del grupo imino desplazando el par electrónico de la doble ligadura al nitrógeno, generando una carga negativa al mismo átomo. La carga negativa generada extrae un átomo de hidrogeno del oxígeno. Finalmente, el par electrónico del enlace H-O forma un nuevo enlace O=C, desplazando a un átomo de hidrogeno como hidruro. Una base extrae un hidrógeno del intermediario oxonio y así generar la amida.

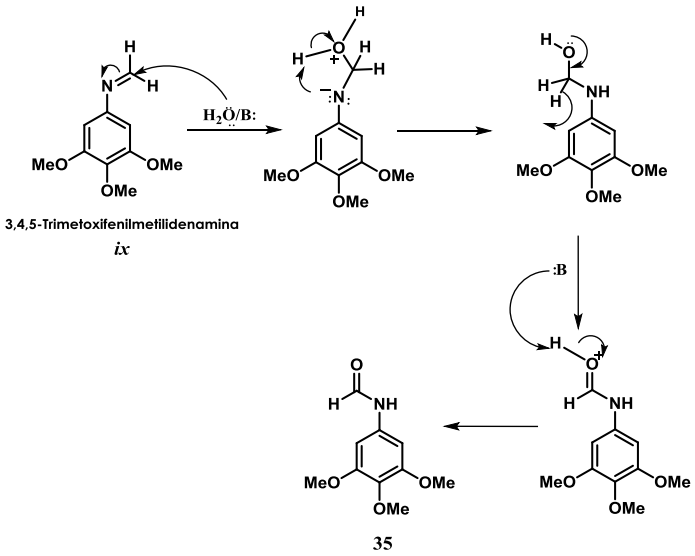


Figura 29. Mecanismo de reacción propuesto para obtener la arilformamida **35**.

En la **tabla 1**, se presenta el comportamiento de las cantidades de amina, disolvente, tiempo de reacción y rendimiento con se obtuvo del compuesto **35**, subproducto en la formación de **34.**

Tabla 1. Ensayos con 4 disolventes.

Amina	Disolvente	Tiempo de reacción	Rendimiento del compuesto 34
TMAn	Etanol	3.5 h, Δ	70%
TMAn	Metanol	3 h, Δ	60%
TMAn	Isopropanol	4 h, Δ	55%
TMAn	Acetonitrilo	5 h, Δ	58%
DMAn	Etanol	3 h, Δ	55%
DMAn	Metanol	3 h, Δ	60%
DMAn	Isopropanol	4 h, Δ	55%
DMAn	Acetonitrilo	3.5 h, Δ	70%
PMAn	Etanol	3 h, Δ	60%
PMAn	Metanol	3 h, Δ	55%
PMAn	Isopropanol	3 h, Δ	55%
PMAn	Acetonitrilo	4 h, Δ	50%

g) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-bencilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (37)

Es de suma importancia recalcar que la síntesis de pirroloesteroides es novedosa y se requiere profundizar en las condiciones de reacción para optimizar el protocolo de síntesis. Por tanto, como primera acción a realizar en esta transformación, es necesario analizar la elección del disolvente, tiempo de reacción, cantidad y pureza de la amina. Primeramente, se llevó a cabo una reacción con bencilamina, sin embargo, los resultados no fueron exitosos porque, la amina se tomó directamente del envase comercial. Por lo tanto, se decidió destilar la bencilamina se conservó bajo malla molecular de 3 Åy el f rasco se selló con un tapón de hule.

La reacción de la dicetona con la bencilamina condujo el pirrol **37** deseado, con buen rendimiento. Con otras aminas, la reacción produjo pirroles con rendimientos menores. La estructura del pirrol **37**, fue establecida por métodos espectroscópicos que corroboraron la formación del mismo.

En la **figura 30** se muestra el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **37.** A frecuencias altas se aprecian tres señales para los protones del fragmento aromático de la bencilamina; en 7.29 ppm los protones *meta*-, en 7.22 ppm el protón *para*- y en 6.88 ppm los protones de *orto*-. El fragmento bencilamínimo es diferente al presente de la bencilamina pues en el producto los protones bencílicos aparecen como un sistema AB, centrado en 5.06 ppm, dado que son diastereotópicos. Los protones de la cadena lateral esteroidal sufren un cambio drástico, una señal importante que indica la formación del heterociclo es la de los protones Ha y Hb del anillo pirrólico, que se presenta como un sistema AB, centrado en 5.85 ppm. La señal de protón vinílico en C-6 en 5.36 ppm no sufre cambio apreciable, así como los protones en las posiciones 3 y 16 (en 4.60 y 4.95 ppm, respectivamente). El protón en C-20 se puede apreciar en 2.99 ppm, como señal doble de cuádruple. La señal de Me-26 tuvo un pequeño desplazamiento, de 2.14 a 2.09 ppm, desplazamientos característicos para una metilcetona y un metil vinílico, respectivamente. Otro pequeño desplazamiento ocurrió con el metilo del acetato en C-3 (1.97 ppm); sin embargo, los hidrógenos del correspondiente acetato en C-16 son desplazados de 1.99 y 1.79 ppm, lo cual indica que los protones del Me-16 se afectan por el cono de protección del anillo aromático. El metilo 19 se encuentra en 1.02 ppm y se ubicó

por la correlación que presenta con C-5 en el experimento HMBC. El metilo 18 aparece en 0.90 y 21 en 0.91 ppm.

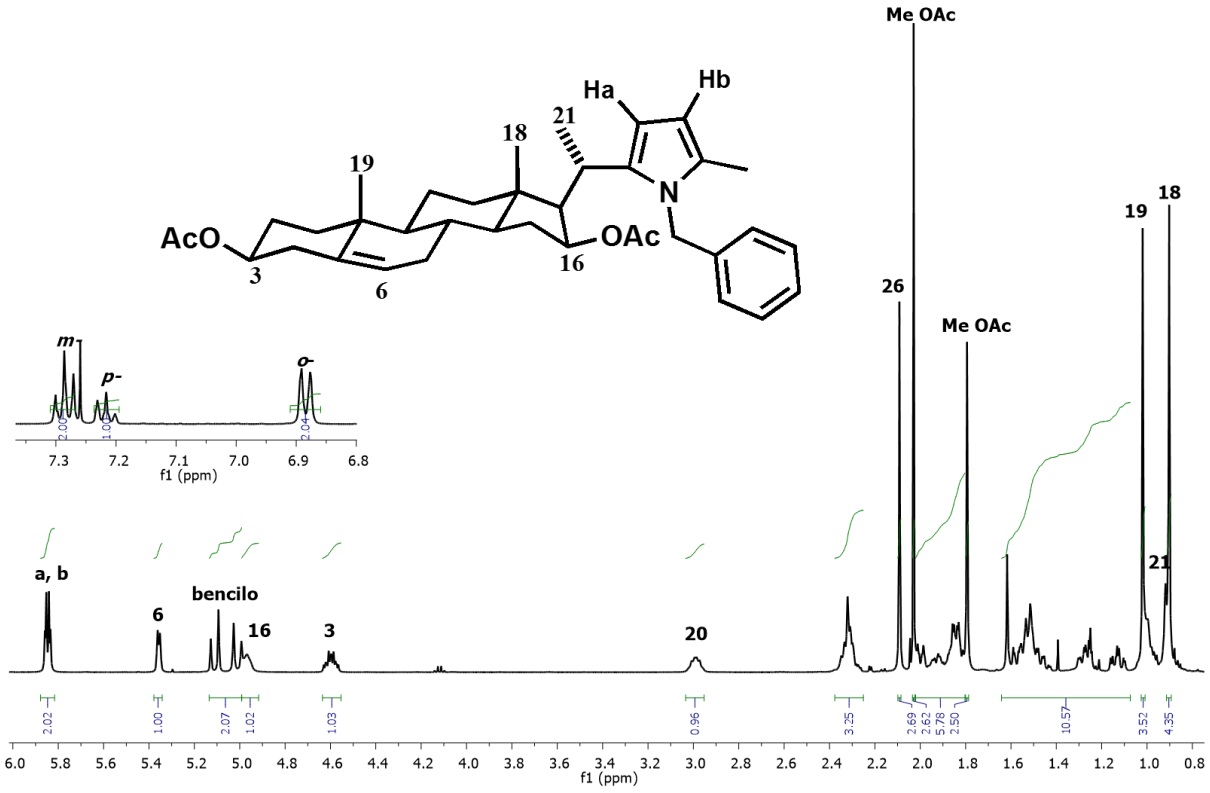


Figura 30. RMN de ^{1}H de **37**.

Se llevó a cabo una comparación de los espectros de ^{1}H de RMN para los compuestos **34** y **37**, con el propósito de recalcar los cambios significativos de las señales del nuevo compuesto. Observamos claramente las nuevas señales y pequeños desplazamientos que ya se mencionaron en el párrafo anterior.

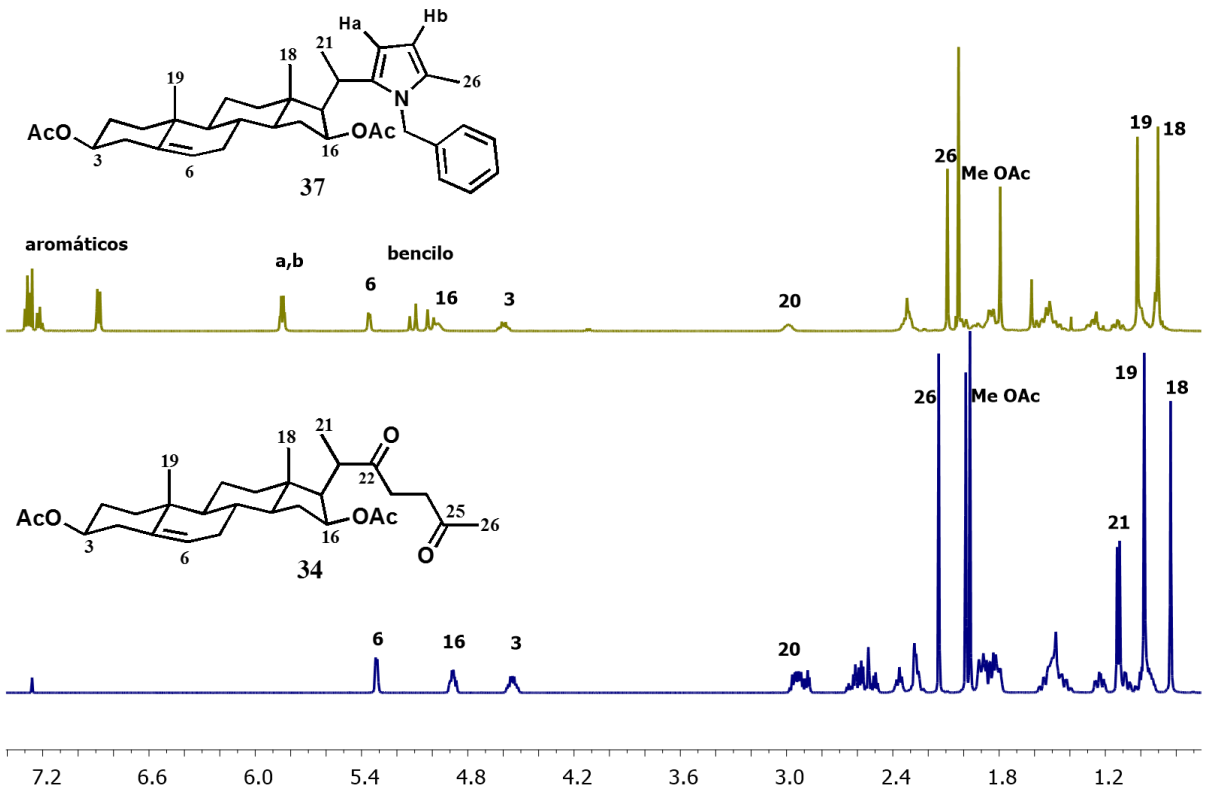


Figura 31. RMN de ^{1}H de **34** y **37**.

En la **figura 32** se muestra el experimento COSY. Donde se observan todas las correlaciones H-H pertenecientes al compuesto **37**. Dicho experimento ayudó a ubicar algunos protones, como por ejemplo, el H-21 que se correlaciona con el H-20.

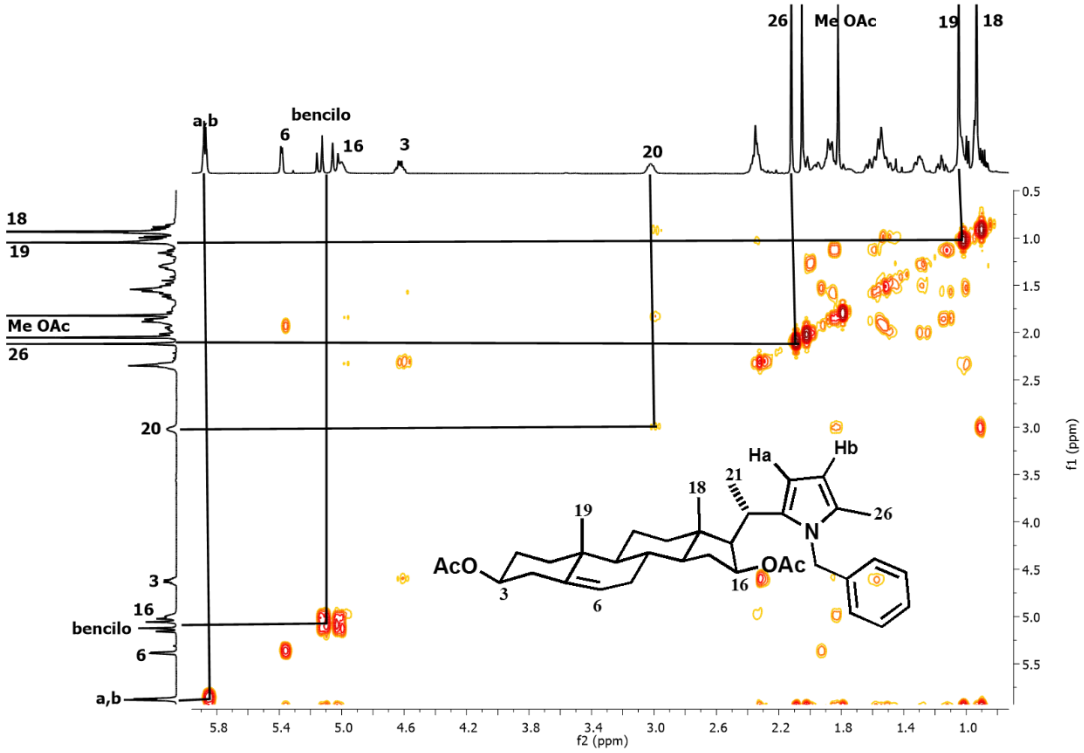


Figura 32. Experimento COSY de **37**.

Las señales de ^{1}H con su correspondiente señal de carbono, se asignaron gracias al experimento HSQC, **figura 33**. En la expansión se observa la correlación a un enlace de distancia. Todas las señales son características del compuesto, sin embargo, las más importantes son para C-22, C-23, C-24, C-25 y metilos de grupos acetatos, pues aparecen nuevas señales y pequeños desplazamientos, esto indica las respectivas modificaciones en la cadena lateral sin alterar el núcleo esteroidal.

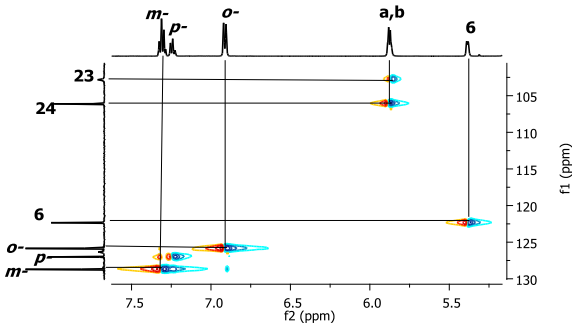


Figura 33. Experimento HSQC de **37**.

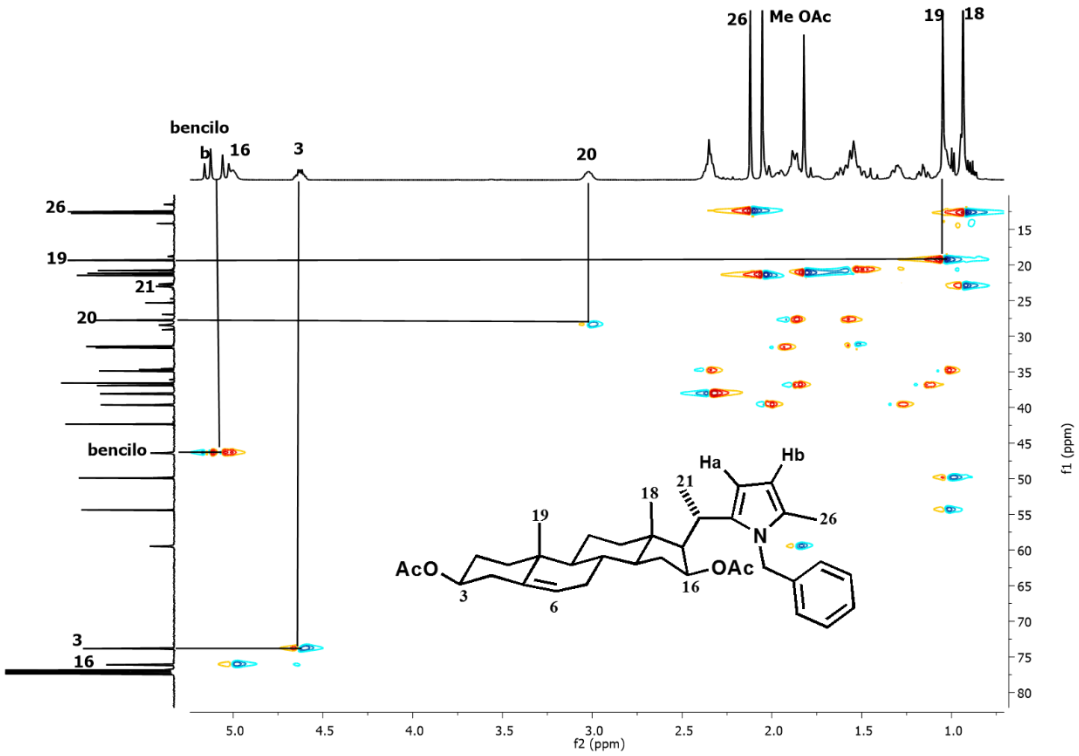


Figura 34. Experimento HSQC de **37**.

En el espectro de RMN de ^{13}C se asignan los 37 carbonos correspondientes al compuesto **37**, en el cual se encontraron las señales de los carbonos de carbonilo que corresponden a los esteres de las posiciones 3 y 16 en 170.5 y 169.8 ppm. Así mismo los metilos de dichos acetatos se observan en 21.1 y 21.4 ppm. Las señales de 5 y 22 en 139.6 y 138.9 ppm. Esto ayuda a demostrar que no hubo transformaciones en los anillos del esteroide. Sin embargo, se aprecian nuevas señales que corresponden a la estructura aromática, como el carbono *ipso* que se observa en 138.0 ppm, en 128.6 ppm C-*meta*, en 126.9 ppm el C-*para* y en 125.7 ppm el de C-*orto*. Otras señales nuevas y características son las que pertenecen al anillo pirrólico como; C-23, C-24 y C-25 que se encuentran en 102.5, 105.9 y 126.3 ppm respectivamente. También se observa un ligero desplazamiento a campo alto por parte del Me-26 en 12.4 ppm, característico de .

Los protones de 16 y 3 a 73.8 y 76.0 ppm respectivamente. Otra nueva señal es la correspondiente al bencilo que se encuentra unido al pirrol en 46.3 ppm, sin embargo, las señales que representan a los metilos se observan como sigue: 19 en 19.2 ppm, 18 en 12.6

ppm, y 21 en 22.9 ppm. Los metilos de los grupos acetatos se observan en 21.4 y 21.1 ppm, de todas estas señales indican que no hay grandes desplazamientos.

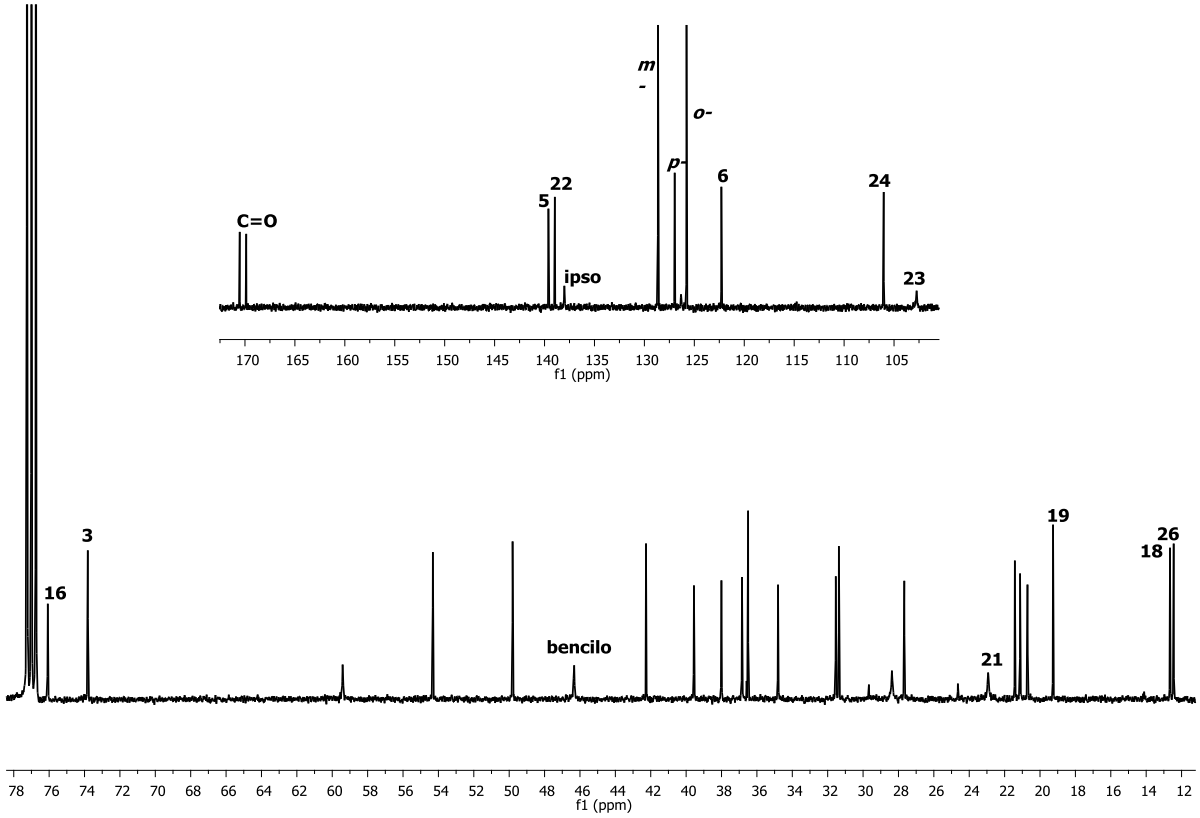


Figura 35. RMN de ^{13}C de **37**.

En la **figura 36**, se presenta una expansión del experimento HMBC del fragmento aromático, las correlaciones de los protones -*orto*, -*meta* y -*para* con C-*meta*, C-*orto* y C-*para*.

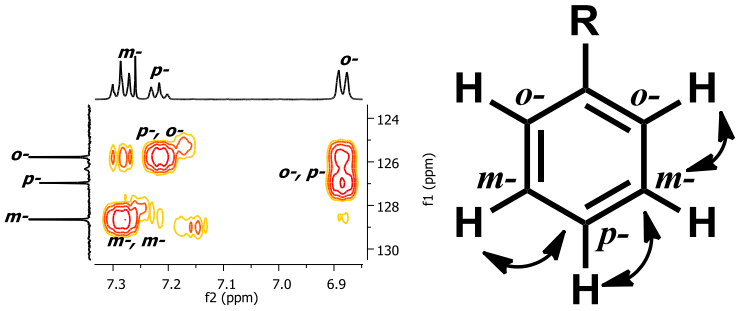


Figura 36. Experimento HMBC de **37**.

Se realizó otra expansión, en donde se observan las correlaciones de los Ha y Hb con C-bencilo, además las correlaciones de Ha y Hb con C-23 y C-24, ya que son primordiales por formar parte del anillo pirrólico.

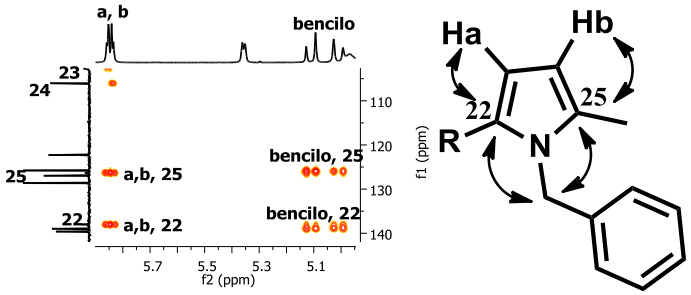


Figura 37. Experimento HMBC de **37**.

En la **figura 38**, se realizó otra expansión del experimento HMBC observándose las correlaciones H-C del esqueleto esteroidal, tales como; correlaciones de los metilos 19 y 18 que a pesar de no formar parte del anillo pirrólico, indican que se mantiene la estructura de los anillos A, B, C y D.

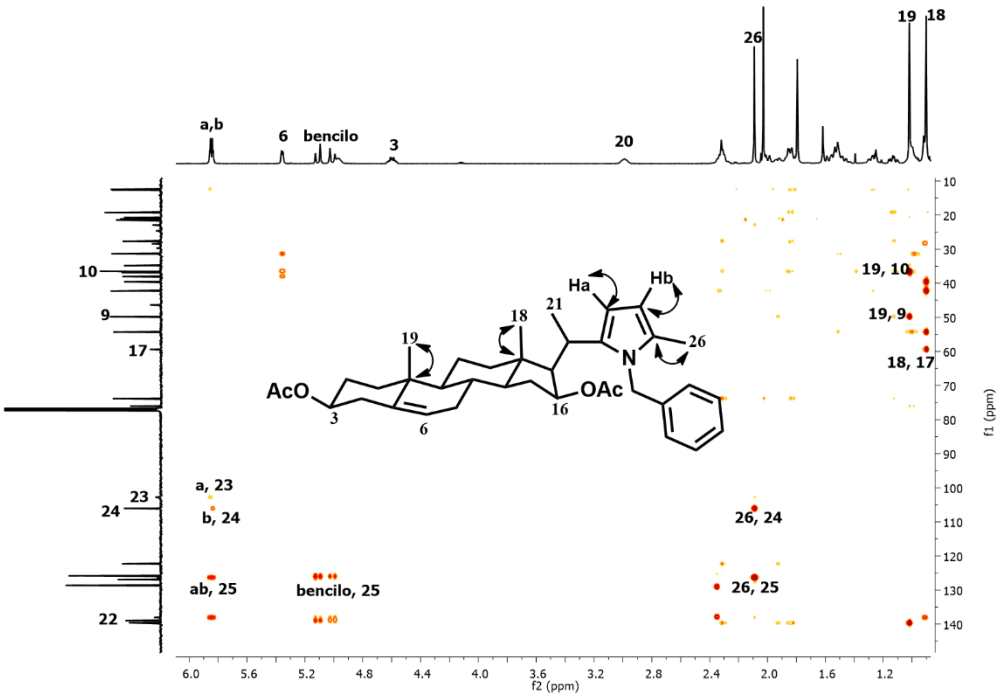


Figura 38. Experimento HMBC de **37**.

h) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-(3-hidroxi)propilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (38)

La siguiente estructura es otro pirroloesteroide que se obtuvo con buenos rendimientos. Sin embargo, se realizó un ensayo previo ya que la estructura de 3-aminopropanol, es una amina primaria carbonada con un grupo funcional hidroxilo, en donde ambos grupos funcionales pueden reaccionar. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo la reacción con las condiciones descritas en el desarrollo experimental.

En la **figura 39** se muestra el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **38**, donde se puede apreciar a campo bajo los protones asignados como Ha y Hb correspondientes al anillo pirrólico en 5.75 ppm, como una señal simple que integra para dos protones. También se muestra a 5.37 ppm una señal doble de protón vinílico en C-6, el cual no sufre cambios significativos, así como los protones en las posiciones 3 y 16 (4.60 y 4.95 ppm, respectivamente). Posteriormente, se aprecia el protón de C-20 en 3.04 ppm, como una señal doble de cuádruple. Además se observan nuevas señales; que corresponden a los protones de 1” y 3” en 4.00 y 3.72 ppm, respectivamente. La señal de metilo 26 presenta un ligero desplazamiento, de en 2.14 a 2.18 ppm. Mientras que la señal del acetato en C-3 (2.03); sin embargo, se aprecia un pequeño desplazamiento de los hidrógenos del correspondiente acetato en C-16 desplazándose de 1.99 a 1.82 ppm. A campo alto se encuentran los metilos de 21, 19 y 18 en 1.23, 1.03 y 0.95 ppm, respectivamente.

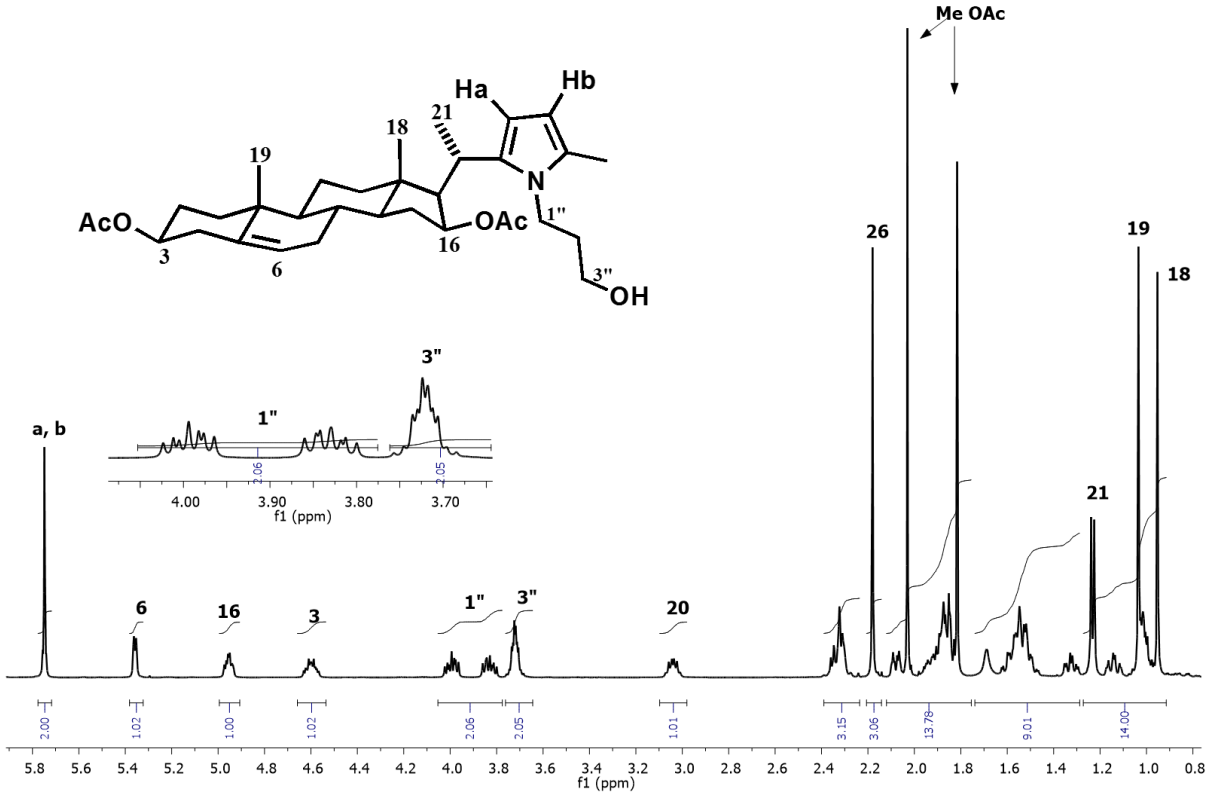


Figura 39. RMN de ^{1}H de **38.**

Empleando los espectros de ^{1}H de los compuestos **34** y **38** se realizó una comparación de los mismos, para observar aquellos desplazamientos que corroboren la formación del pirrol sin alterar los anillos A, B, C y D. Observamos claramente las nuevas señales de protón de C-1”, C-2”, Ha, Hb y pequeños desplazamientos de los metilos.

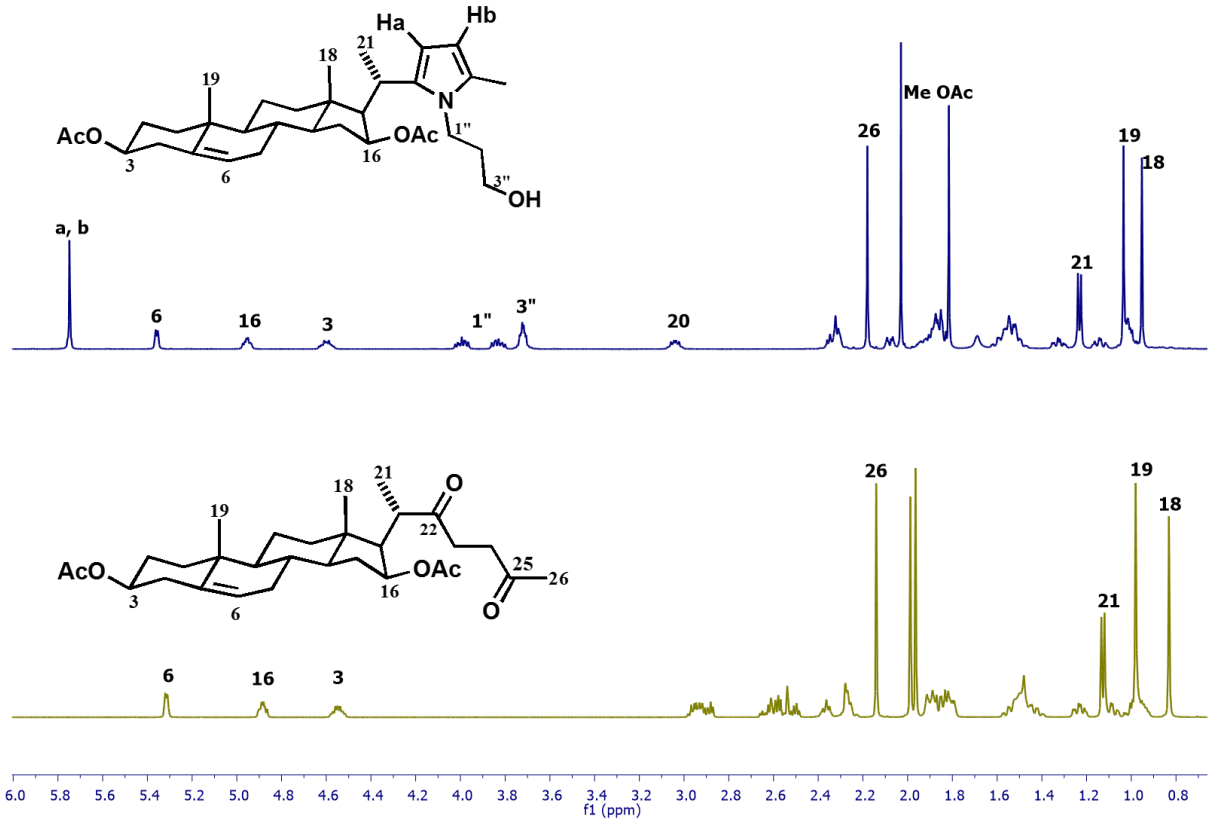


Figura 40. RMN de ^{1}H de **34** y **38**.

De acuerdo al experimento HMBC se observan las correlaciones a dos y tres enlaces de distancia, lo que condujo la confirmación del pirrol en la cadena lateral. Para apreciar las correlaciones se hizo una expansión y se obtuvo lo siguiente; donde 1" se correlaciona con C-22 y C-25. Lo mismo se observa para 3" que se correlaciona con 1", los protones a, b se encuentran correlacionados con C-22 y C25 respectivamente, pues se encuentra a 3 enlaces de distancia, estas correlaciones indican la formación del pirrol y la cadena carbonada es diferente a la bencilamina que ya fue discutida en su momento.

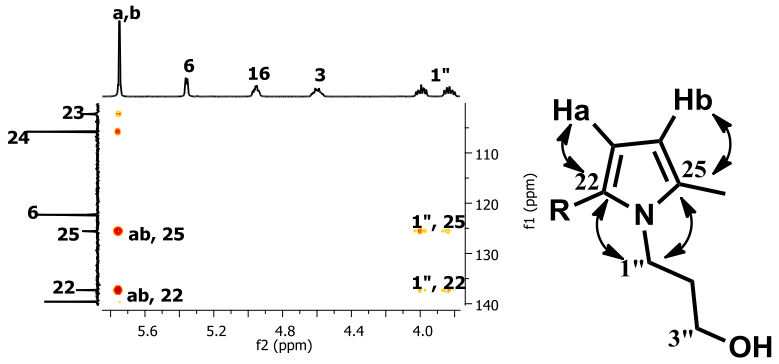


Figura 41. Experimento HMBC de **38**.

Podemos decir que lo siguiente confirmó la síntesis del pirrol y que el esqueleto esteroidal no tuvo modificación alguna. En el experimento HMBC se observan las correlaciones correspondientes al esqueleto esteroidal tales como; el protón de 21 se correlaciona con C-20 y C-17, posteriormente los protones de 19 y 18 se correlacionan con C-9 y C-13 respectivamente. De esta manera afirmamos que no hubo modificaciones en el núcleo esteroidal.

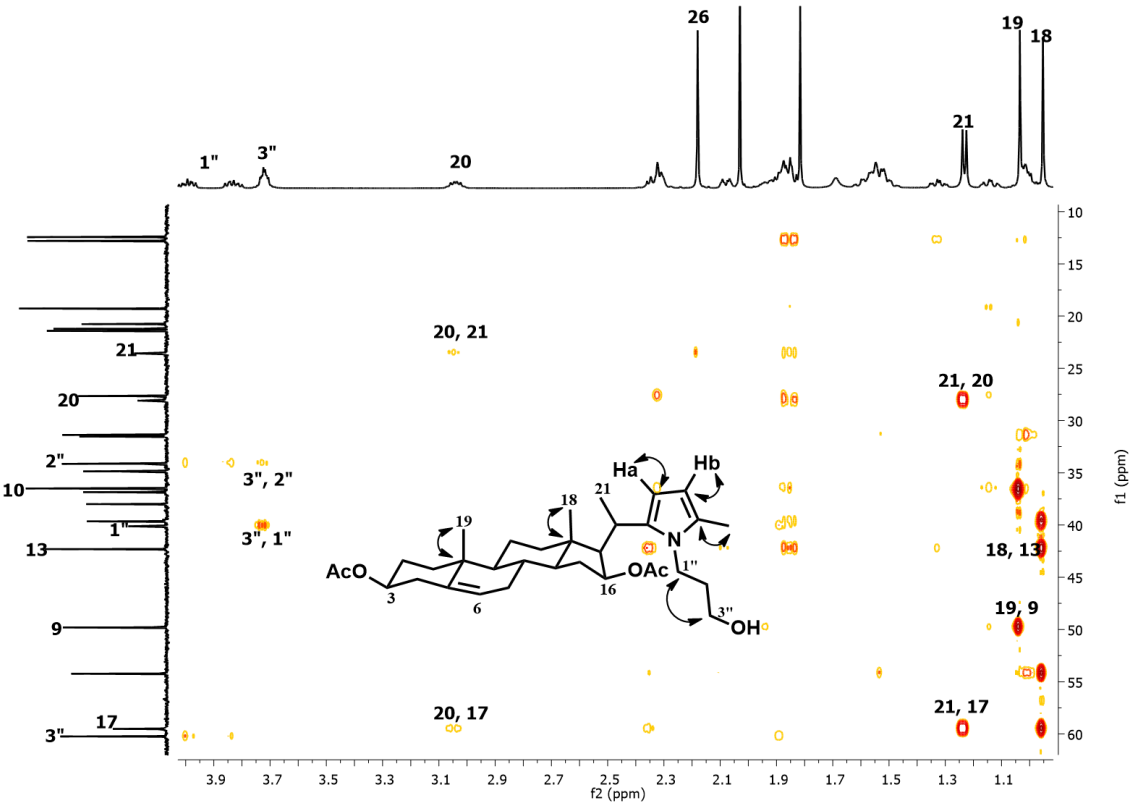


Figura 42. Experimento HMBC de **38**.

En la **figura 43**, se presenta el experimento COSY en el cual observamos las correlaciones de los protones 1" así como también las de los protones de 20 con 21.

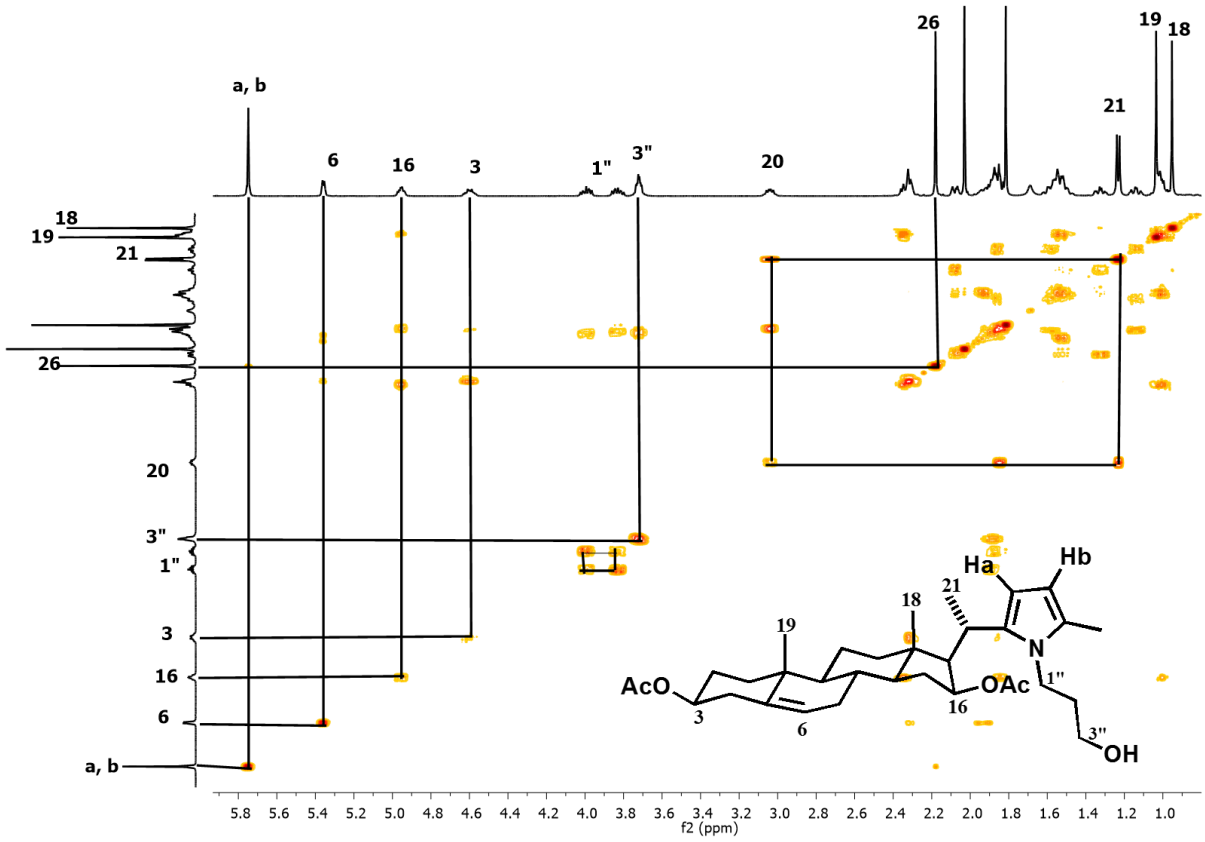


Figura 43. Experimento COSY de **38**.

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **38**, las señales de los carbonilos que corresponde a los ésteres de los C-3 y C-16 en 170.5 y 169.9 ppm respectivamente. Así mismo, los metilos de grupos acetatos se observan en 21.4 ppm y 21.2 ppm. La señal de C-6 se encuentra en 122.2 ppm. Luego se observan nuevas señales del fragmento propanol unido a pirrol a 40.1 ppm para C-1" y 60.2 ppm para C-3". Las señales que representan a los metilos se observan como sigue: 19 en 19.2 ppm, 18 en 12.8 ppm, y 21 en 23.5 ppm.

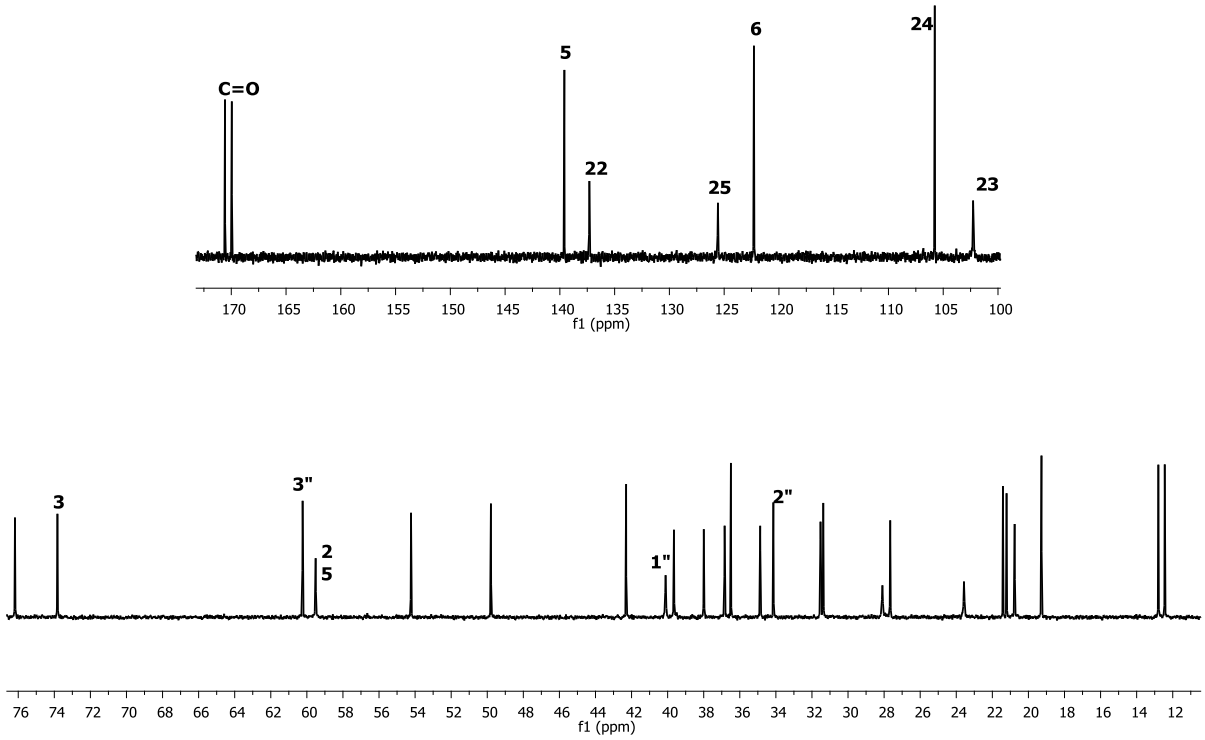


Figura 44. RMN de ^{13}C de **38**.

Con el experimento HSQC se pudo asignar a cada señal de protón su correspondiente carbono, (**ver figura 45)**. En este se aprecia la correlación a un enlace de distancia. Hemos de tomar en cuenta todas señales por ser características de la estructura propuesta, sin embargo, las más importantes son aquellas pertenecientes al pirrol, pues todos ellos proporcionarán nuevos desplazamientos y nuevas correlaciones.

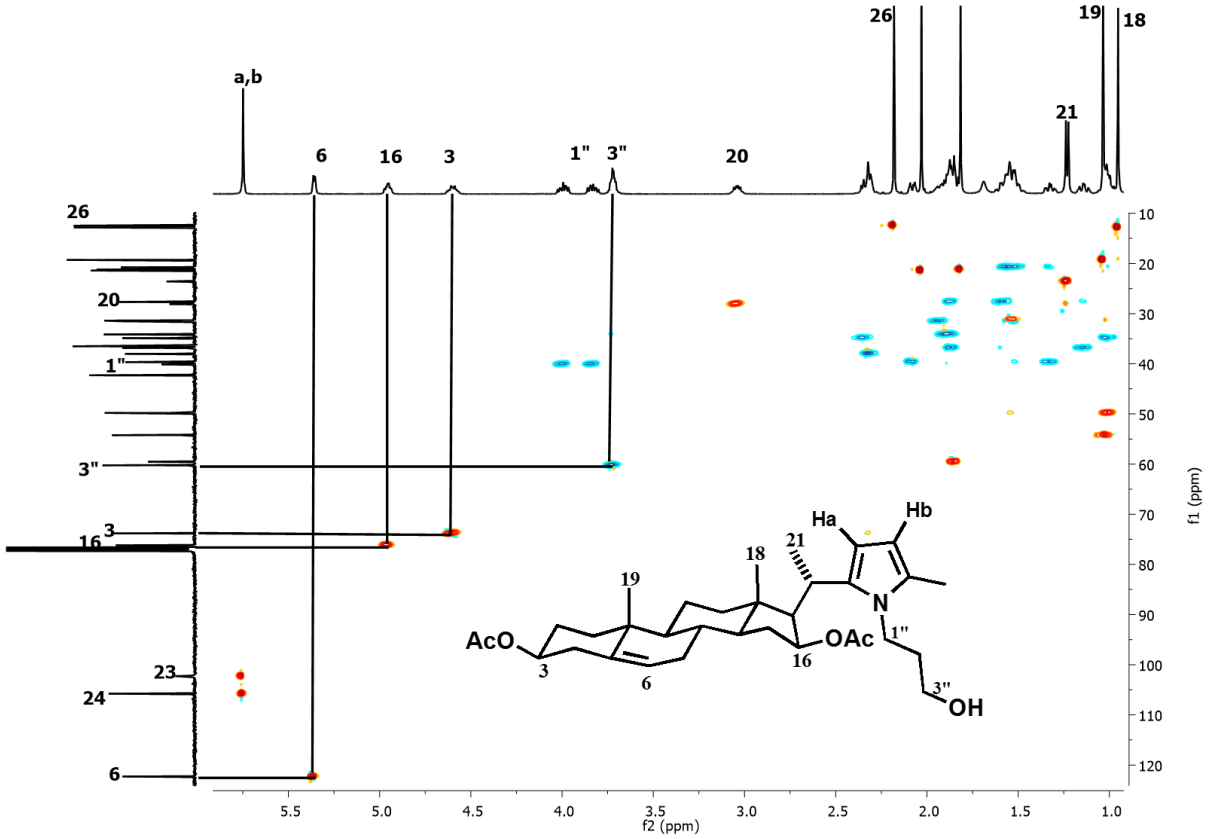


Figura 45. Experimento HSQC de **38**.

i) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5;22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (39a)

Además de leer la ficha de seguridad de los reactivos para cualquier reacción química, también es importante realizar los cálculos correspondientes de las cantidades a emplear, ya que un pequeño error puede ocasionar accidentes que ponen en riesgo nuestra salud.

A pesar de cuidar la manipulación de los reactivos, se presentaron algunas inconveniencias, tales como que la cantidad empleada fuera la adecuada (ver parte experimental). Pese a ello el producto deseado **39a**, se obtuvo en bajos rendimientos del 20%. Ya que las condiciones de reacción condujeron la formación de dos pirroloesteroides y la purificación no fue fácil.

Por lo que se asume lo siguiente; en cada ensayo, se agregaron las cantidades iguales de reactivos y materia prima, pero determinamos que el tiempo de reacción proporcionó dos compuestos, es decir, con 5 horas a calentamiento convencional sólo se observa consumo de

materia prima y otro compuesto, pero si son 7 horas de calentamiento convencional, se logra apreciar dos compuestos diferentes a la materia prima.

Para tales compuestos se describe a continuación la caracterización de ambos.

En el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **39a** se encuentran las señales de los protones de a, b en 5.77 ppm y se observa la señal del H-6 a 5.36 ppm. Los protones correspondientes a los C-3 y C-16 en 4.60 y 4.97 ppm. Posteriormente una nueva señal que pertenece a los protones de C-1”. En 3.79 ppm de los protones de C-2”. Otra señal del esteroide es la del H-20 que se encuentra en 3.05 ppm y de H-26 en 2.19 ppm. Las señales de los metilos de las posiciones acetiladas 3 y 16 se observan en 2.03 y 1.84 ppm. En 1.22 pm se observa al metilo 21 y para las señales de los metilos 19 a 1.03 ppm, 18 a 0.95 ppm respectivamente.

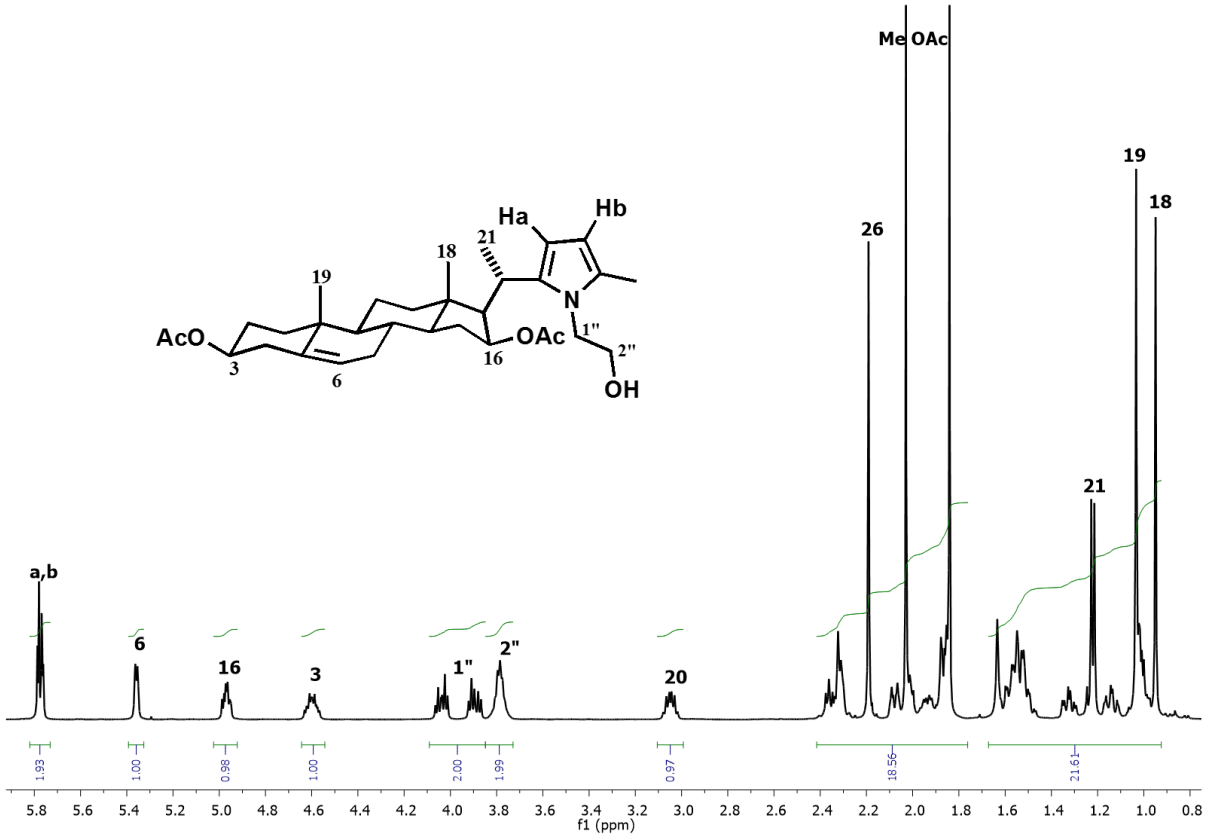


Figura 46. RMN de ^{1}H del compuesto **39a.**

Realizando una comparación de espectros de ^{1}H de la materia prima y el pirrol, se pudo observar aquellos cambios significativos de desplazamientos de señales tales como, los metilos de grupos OAc. Además, se aprecian las nuevas señales de protón Ha, Hb, 1" y 2" respectivamente.

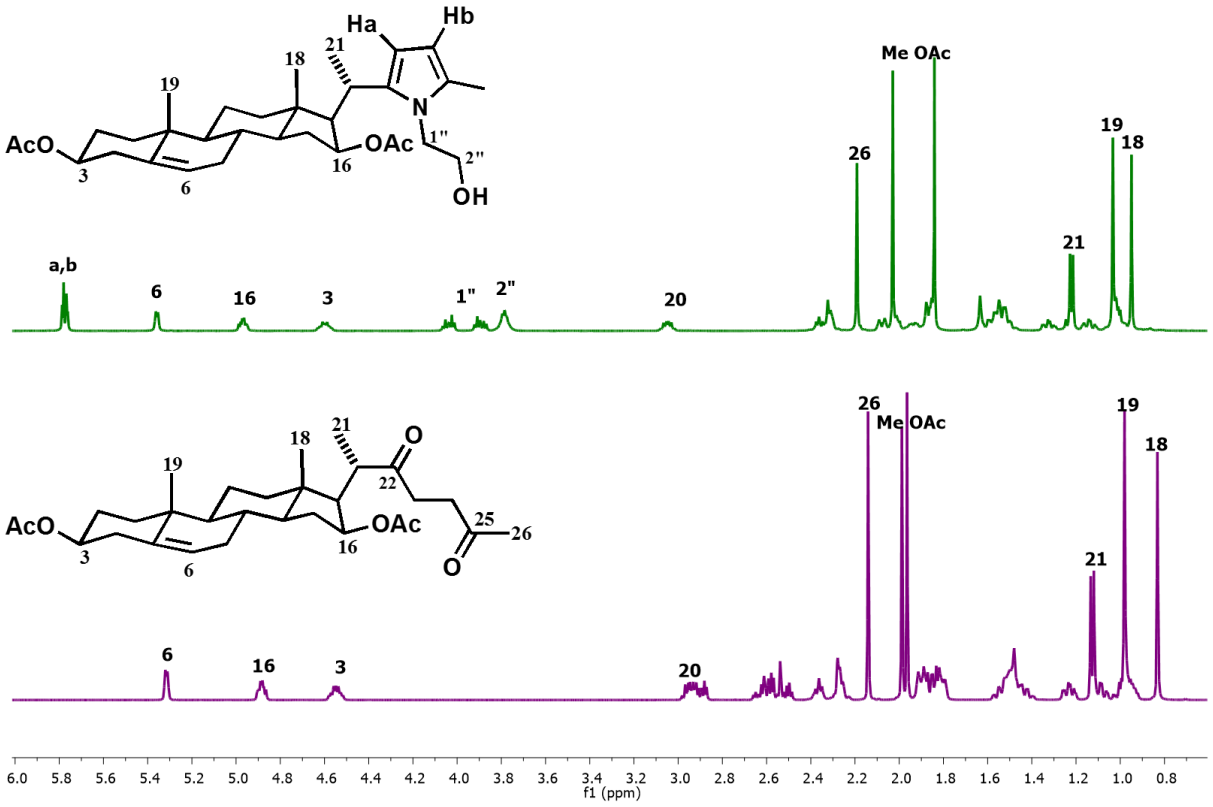


Figura 47. RMN de ^{1}H de **39a** y **34**.

En el experimento de ^{13}C del compuesto **39a** se asignó con ayuda de los experimentos de dos dimensiones. Para las señales de los grupos carbonilo que corresponden al grupo OAc de 3 y 16 en 170.0 y 170.5 ppm. La señal que pertenece al C-6 en 122.0 ppm. Las señales de los C-3 y C-16 en 73.8 y 76.3 ppm respectivamente. También se observan las señales de los metilos de grupos acetatos en 21.4 y 21.1 ppm. Las señales que representan a los metilos se observan como se indica a continuación; 18 en 12.8 ppm, 19 en 19.2 ppm, 21 en 23.4 ppm y 26 en 12.6 ppm. Pese a ello, hay cambios significativos de la formación del heterociclo, y se observan las

señales de C-22 en 137.5 ppm, C-23 en 102.5 ppm, C-24 en 106.1 ppm y C-25 en 126.3 ppm. También se aprecian nuevas señales que indican la formación del pirrol, que pertenecen al C-1" en 45.1 ppm y C-2" en 62.4 ppm.

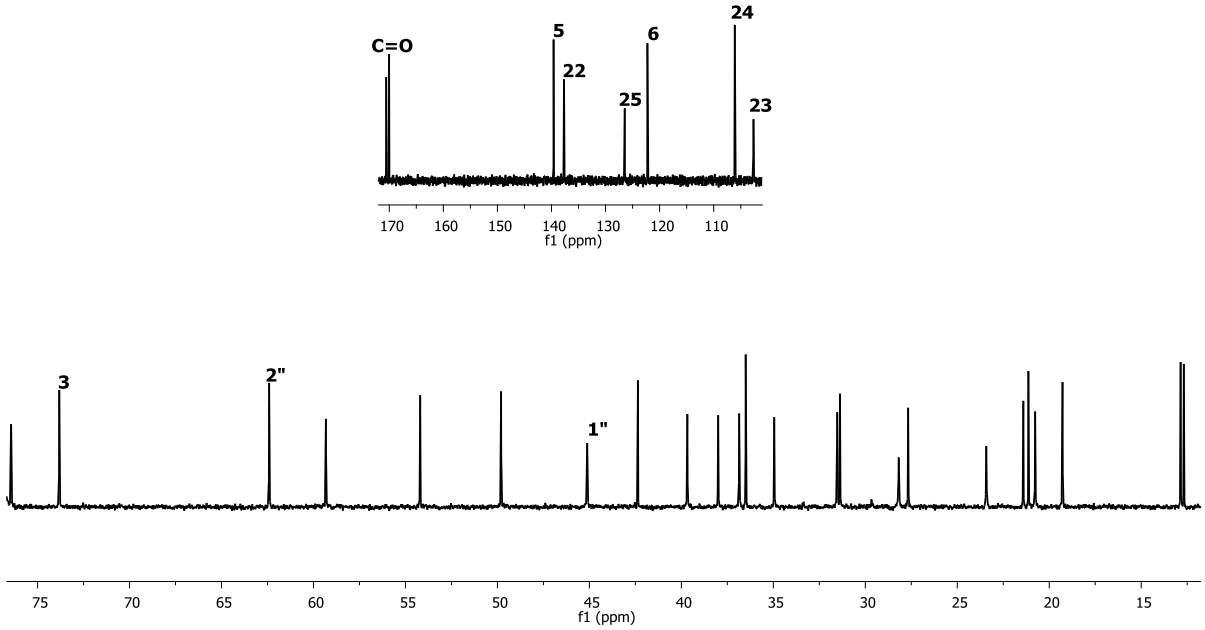


Figura 48. RMN de ^{13}C del compuesto **39a**.

Con el experimento de dos dimensiones HSQC se asignó a cada señal de protón su correspondiente señal de carbono. En la siguiente figura se observa las respectivas correlaciones a un enlace de distancia. Para tal compuesto, las señales importantes que corroboran la estructura propuesta son; C-22, C-25 indicando la formación del heterociclo de cinco miembros, además las correlaciones de metilos de grupos OAc.

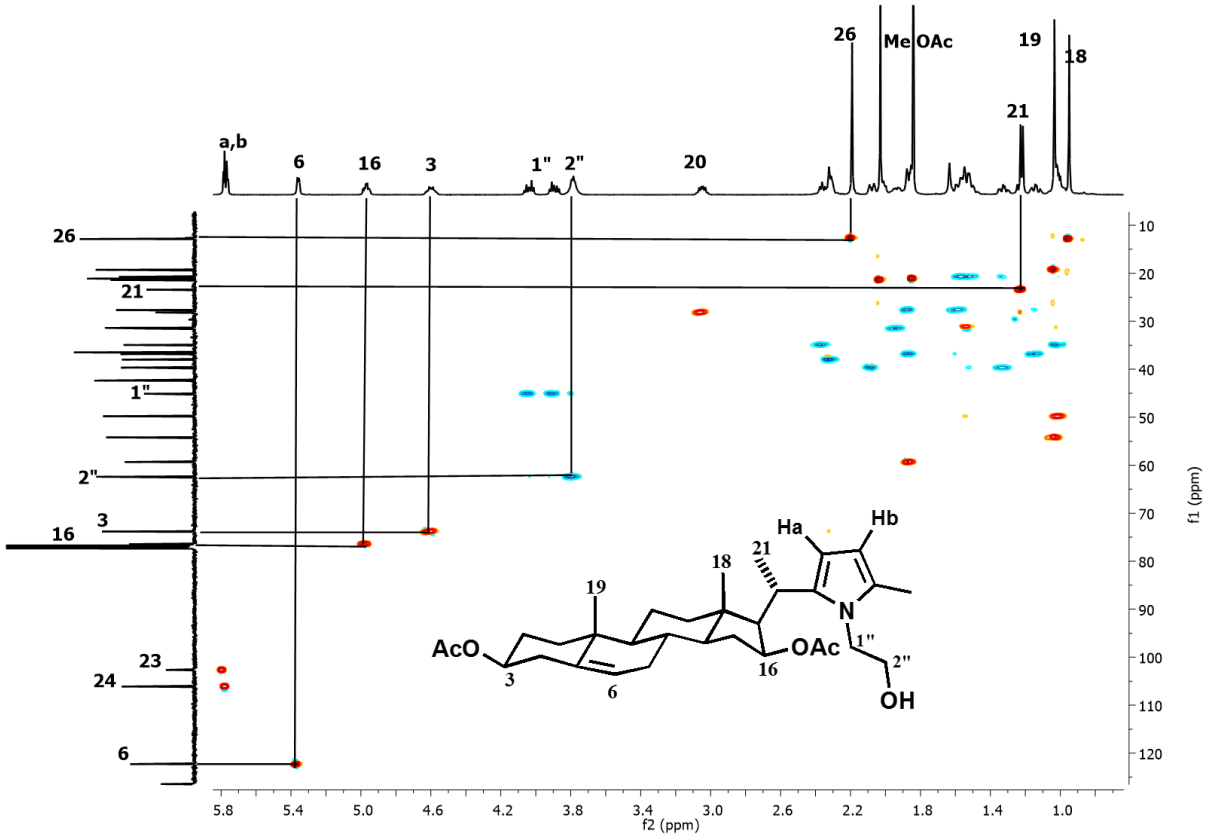


Figura 49. Experimento HSQC de **39a**.

j) Caracterización de 16β-acetoxi-3β-hidroxi-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5;22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (39b)

En el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **39b** se encuentran las principales señales que confirman la síntesis del pirrol, como la señal de los protones de a y b en 5.77 ppm, además se observa la señal del H-6 en 5.33 ppm. La señal del protón correspondiente al C-16 se aprecia en 4.95 ppm. También se observa una nueva señal la presencia de los protones de C-1”. Otra señal que demuestra la formación del pirrol es la correspondiente para los protones del C-2” que aparecen en 3.78 ppm. Sin embargo, en 3.50 ppm se encuentra el protón que pertenece al H del grupo hidroxilo en C-3, pues como hemos mencionado que durante la reacción hubo una desprotección del grupo OAc. Otra señal que corresponde a la estructura, es la señal del protón H-20 en 3.04 ppm y de H-26 en 2.19 ppm. La señal de metilo del grupo OAc de C-16 se

observa en 1.84 ppm. En 1.22 ppm se observa el metilo 21, del metilo 19 y 18 en 1.02 y 0.95 ppm respectivamente.

Con ayuda de los experimentos HMBC y HSQC se evidenció la formación del heterociclo de cinco miembros trisustituido y con una desprotección en el C-3.

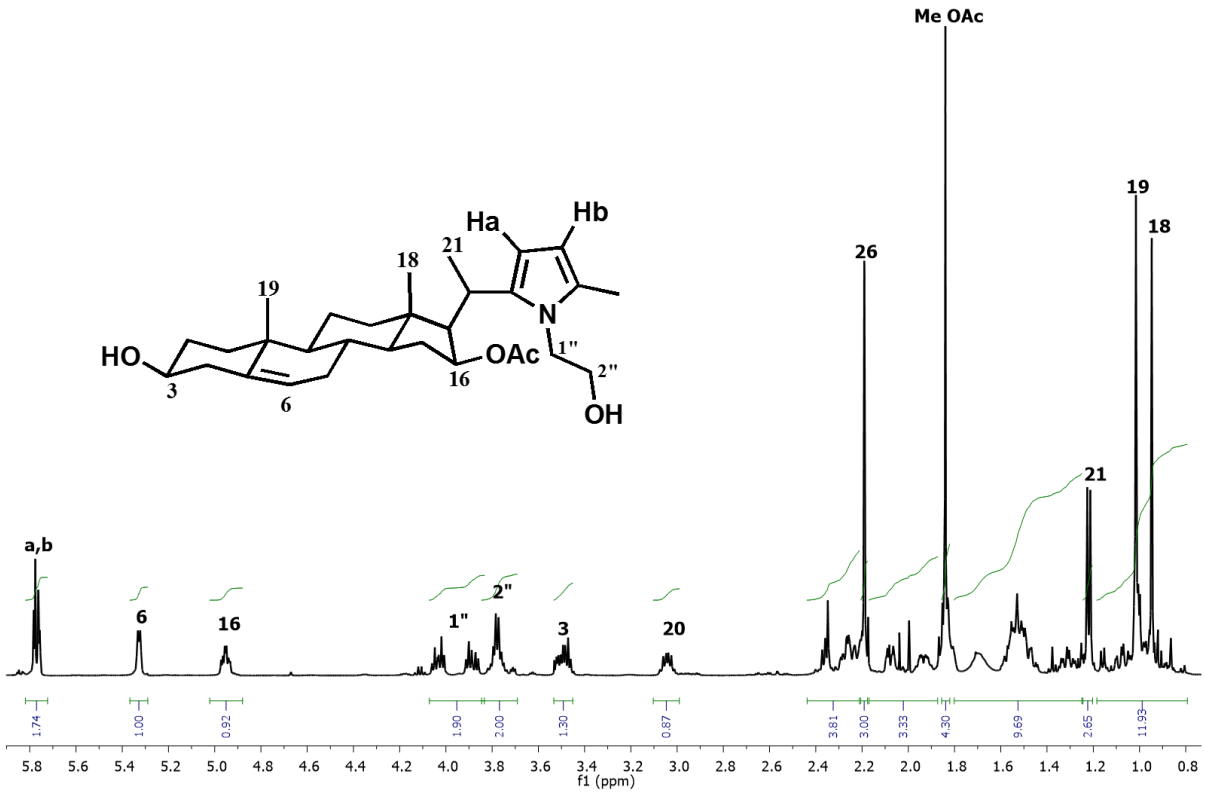


Figura 50. RMN de ^{1}H del compuesto **39b**.

En el experimento de ^{13}C del compuesto **39b** se observa la señal del carbonilo que corresponde al grupo OAc de C-16 en 170.0 ppm. La señal que pertenece al C-6 en 121.3 ppm También se observa la señal correspondiente del metilo de grupo acetato en 20.8 ppm. Las señales que representan a los metilos se observan como se indica a continuación; 18 en 12.8 ppm, 19 en 19.3 ppm, 21 en 23.4 ppm y 26 en 12.7 ppm. Como es de esperar, hay cambios significativos de la formación del heterociclo, y se observan las señales de C-22 en 137.8 ppm, C-23 en 102.7 ppm, C-24 en 106.0 ppm y C-25 en 125.2 ppm. Se aprecian nuevas señales que indican la formación del pirrol, que pertenecen al C-1" en 45.1 ppm y C-2" en 62.3 ppm.

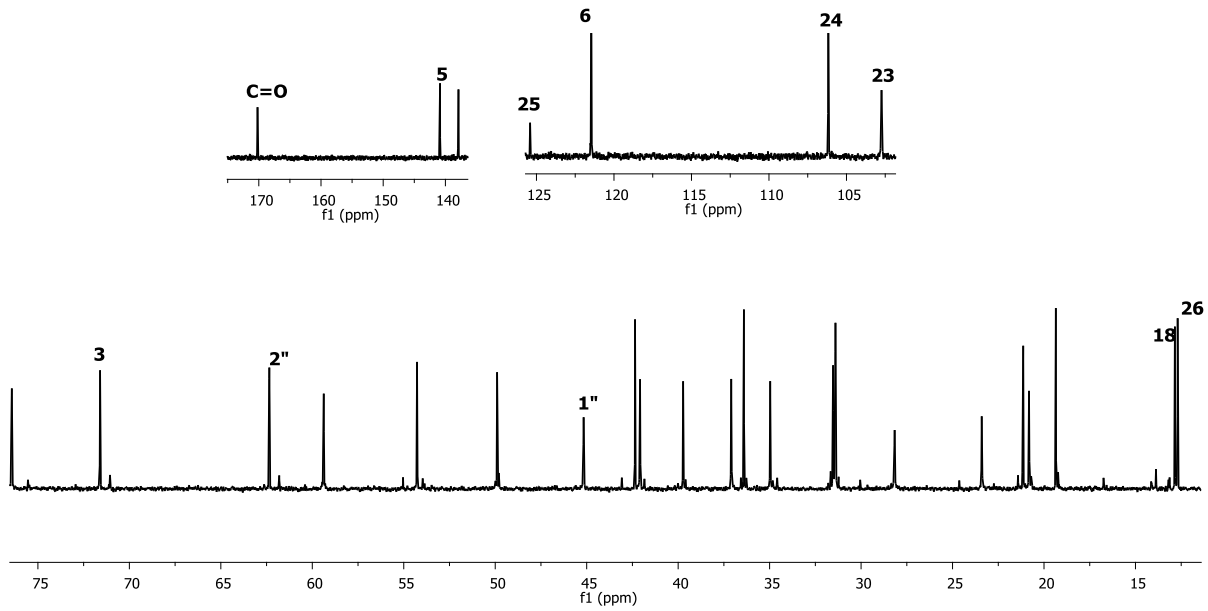


Figura 51 RMN de ^{13}C del compuesto **39b**.

En la **figura 52**, se presenta el experimento COSY, en el cual observamos las correlaciones H-H del pirroloesteroide, ya que ayudó a localizar los protones de Me-21.

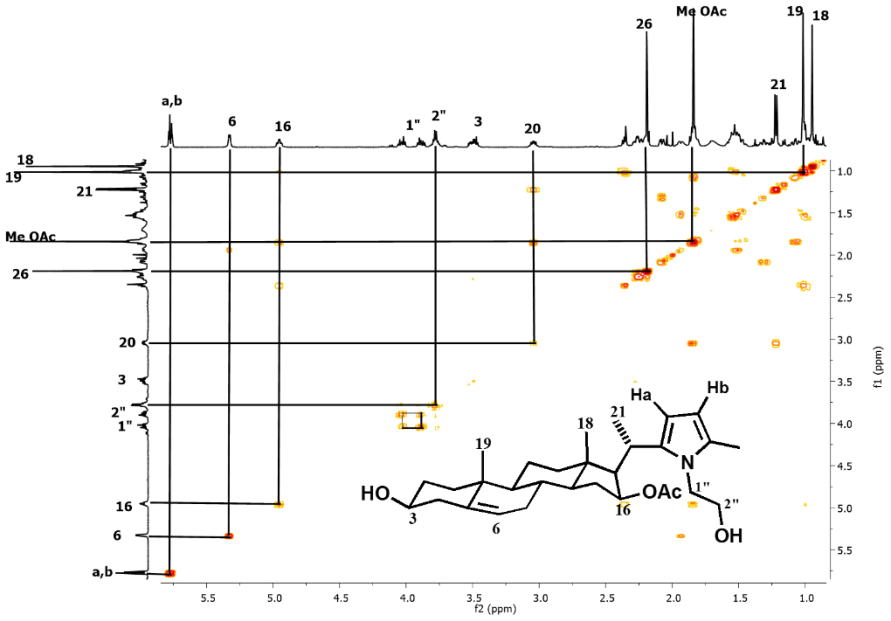


Figura 52. Experimento COSY de **39b**.

El experimento de dos dimensiones HSQC nos ayudó a determinar la señal de cada protón con su correspondiente señal de carbono, así como confirmar la formación del pirrol. En este

experimento se ve claramente la correlación de los protones de C-2”, los protones Ha, Hb con C-23 y C-24, entre otras.

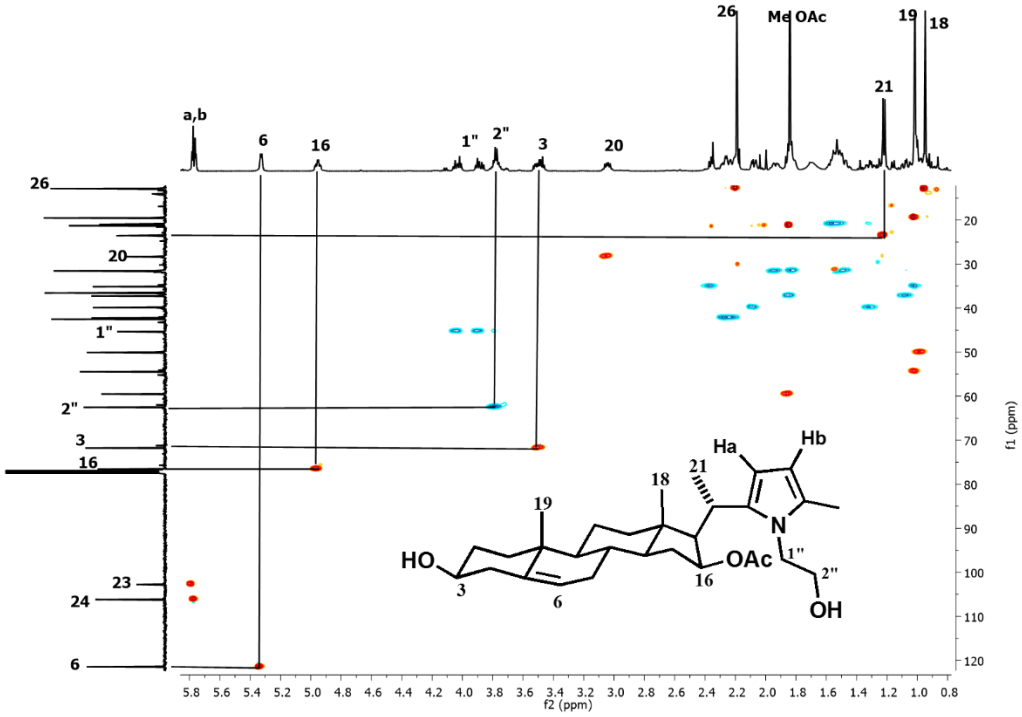


Figura 53. Experimento HSQC de **39b**.

k) Caracterización de 3β,16β-diacetoxi-*N*-(4-hidroxi)fenetilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (40)

Durante la síntesis del siguiente pirroloesteroide, se presentaron algunos problemas, principalmente la solubilidad de la amina a emplear. Como se ha observado en la síntesis de los pirroles esteroidales anteriores, se empleó como disolvente tolueno, por lo que en un primer ensayo con 4-hidroxifenetilamina, la reacción no procedió y la amina cristalizó. En base a ello, fue necesario evaluar la solubilidad de la amina. Donde encontramos que el disolvente DMF es el indicado para realizar la reacción.

La síntesis de pirrol con 4-hidroxifenetilamina se obtuvo con bajos rendimientos.

En la figura **68** se muestra el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **40**, a campo bajo se aprecian señales de los protones del fragmento aromático; en 6.98 y 6,78 ppm corresponden a *orto*- y *meta*-. La señal perteneciente a los protones a y b del anillo pirrólico en 5.77 ppm. La

señal de protón del alcohol de la posición *para*- en 5.46 ppm. Mientras que la señal de protón vinílico de 6 en 5.38 ppm. Las señales de 3 y 16 se observan en 4.60 ppm y 5.25 ppm. Posteriormente una nueva señal de los protones de 1". La siguiente señal pertenece al protón de 20 en 3.11 ppm. Otra señal nueva que corresponde a los protones de 2" que se muestran en 2.81 ppm. La señal de 26 se encuentra en 2.05 ppm. También se observan dos señales que corresponden a los metilos de acetatos de las posiciones 3 y 16 en 2.11 y 2.04 ppm respectivamente. El metilo 21 muestra una señal en 1.25 ppm, el metilo 19 en 1.05 ppm y por último la señal de metilo 18 en 0.99 ppm respectivamente. Todas las señales antes mencionadas se pudieron correlacionar gracias a los experimentos de dos dimensiones HMC y HSQC, ya que se evidencia la formación del heterociclo de cinco miembros, sin alteración en el esqueleto esteroidal.

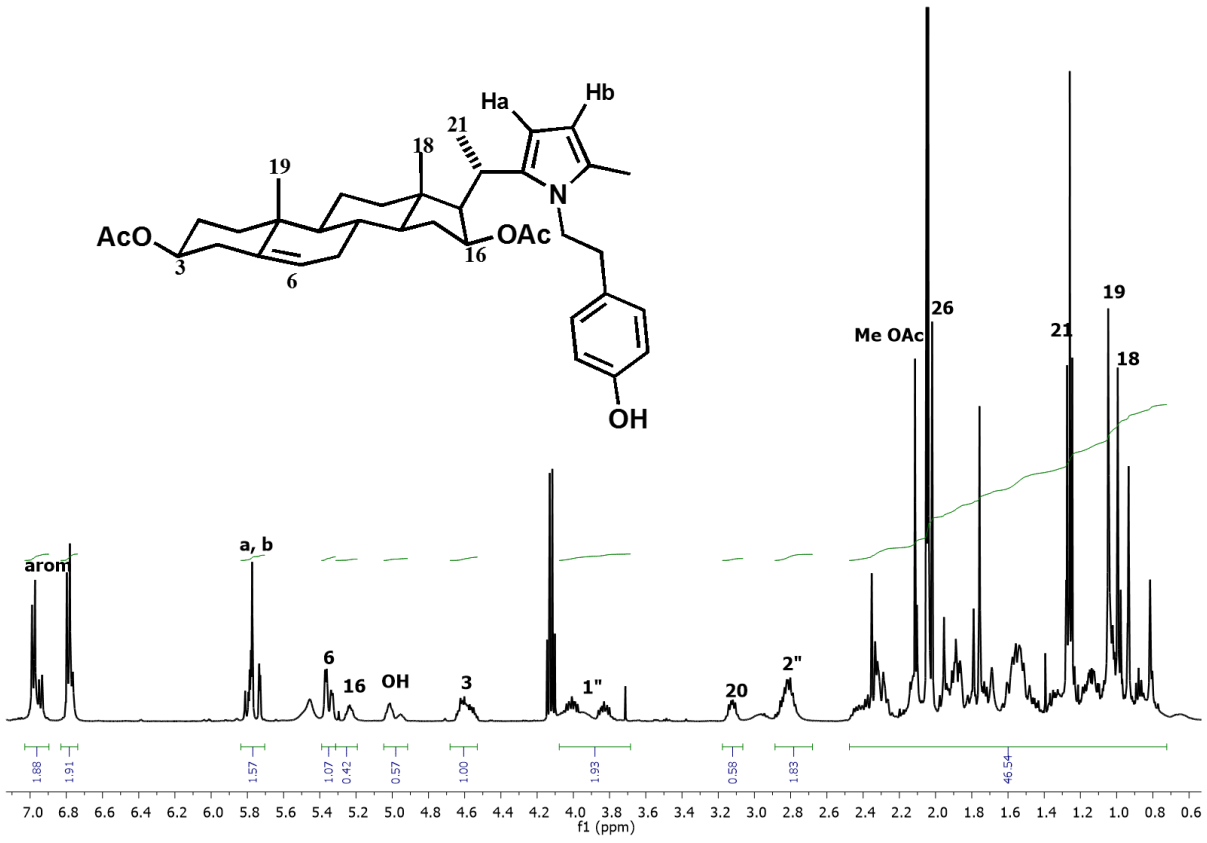


Figura 54. RMN de ^{1}H de 40.

Además de emplear Resonancia Magnética Nuclear de 2 dimensiones que ayudaron a correlacionar las señales de protón con su correspondiente señal de carbono de esta nueva

molécula, se utilizaron los espectros de una dimensión, como la de ^{1}H de RMN, para comparar el compuesto **34** y el pirroloesteroide sintetizado, en el cual se observan nuevas señales y pequeños desplazamientos pero significativos que demuestran la formación del compuesto **40**.

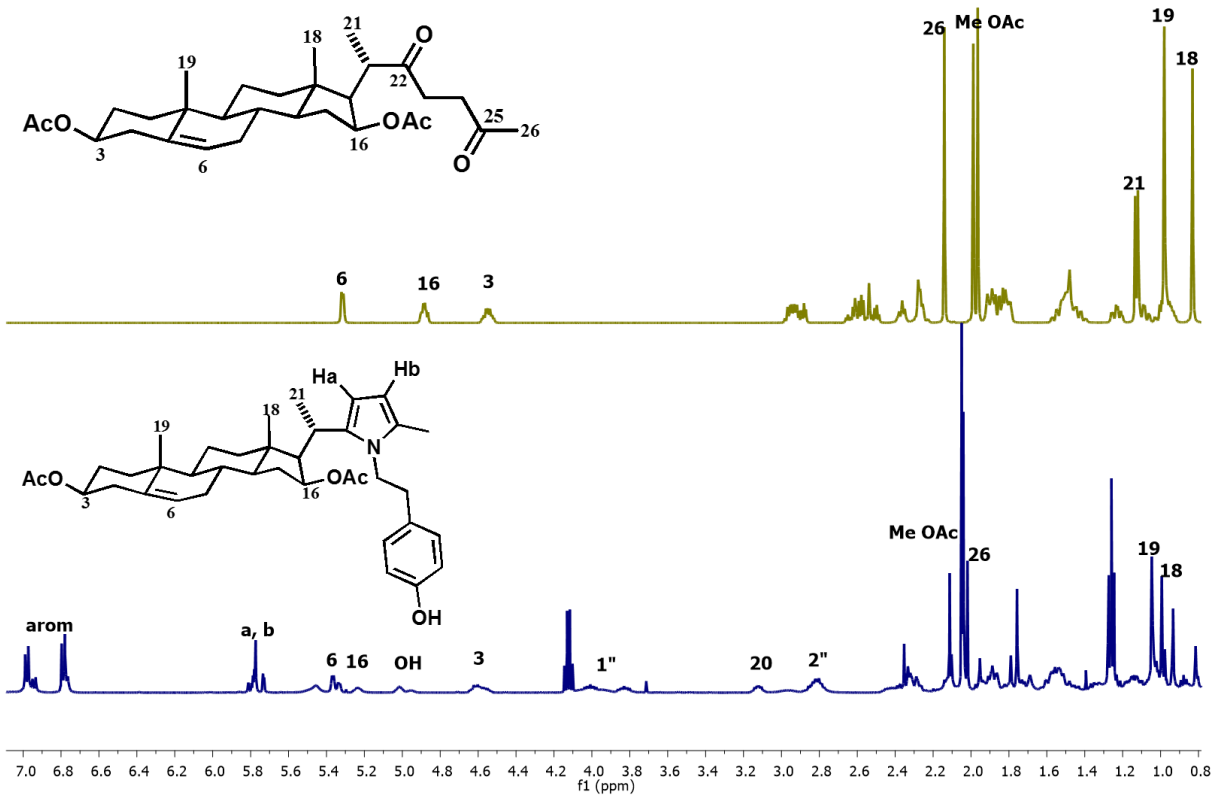


Figura 55. RMN de ^{1}H de **34** y **40**.

En el espectro de RMN de ^{13}C se asignaron los 38 átomos de carbono correspondientes a **40** observando las señales de carbonos de carbonilo de las posiciones 3 y 16 en 169.9 y 170.9 ppm. Los metilos de estos grupos acetatos en 21.3 y 21.2 ppm. Otras señales que indican el núcleo esteroidal y la formación del heterociclo es 5 y 22 en 154.5 y 126.0 ppm. También se logran observar nuevas señales que pertenecen al fragmento aromático, como el carbono *ipso* en 130.0 ppm, en 129.8 ppm el C-*orto*-, en 115.3 ppm para C-*meta*- y en 154.6 ppm el C-*para*-. Las señales del heterociclo de cinco miembros son los siguientes; C-23, C-24 y C-25 se

observan en 105.6, 108.3 y 122.0 ppm respectivamente. La siguiente señal corresponde al metilo 26 en 12.4 ppm.

Las señales de protones de 3 y 16 en 73.8 y 76.3 ppm. Así mismo, se aprecian dos nuevas señales correspondientes a C-1" y C-2" en 42.4 y 36.8 ppm. Posteriormente, las señales de metilos se nombran a continuación; 19 en 19.3 ppm, 18 en 13.9 ppm y 21 en 21.4 ppm. Los metilos de grupos acetatos en 21.3 y 21.2 ppm.

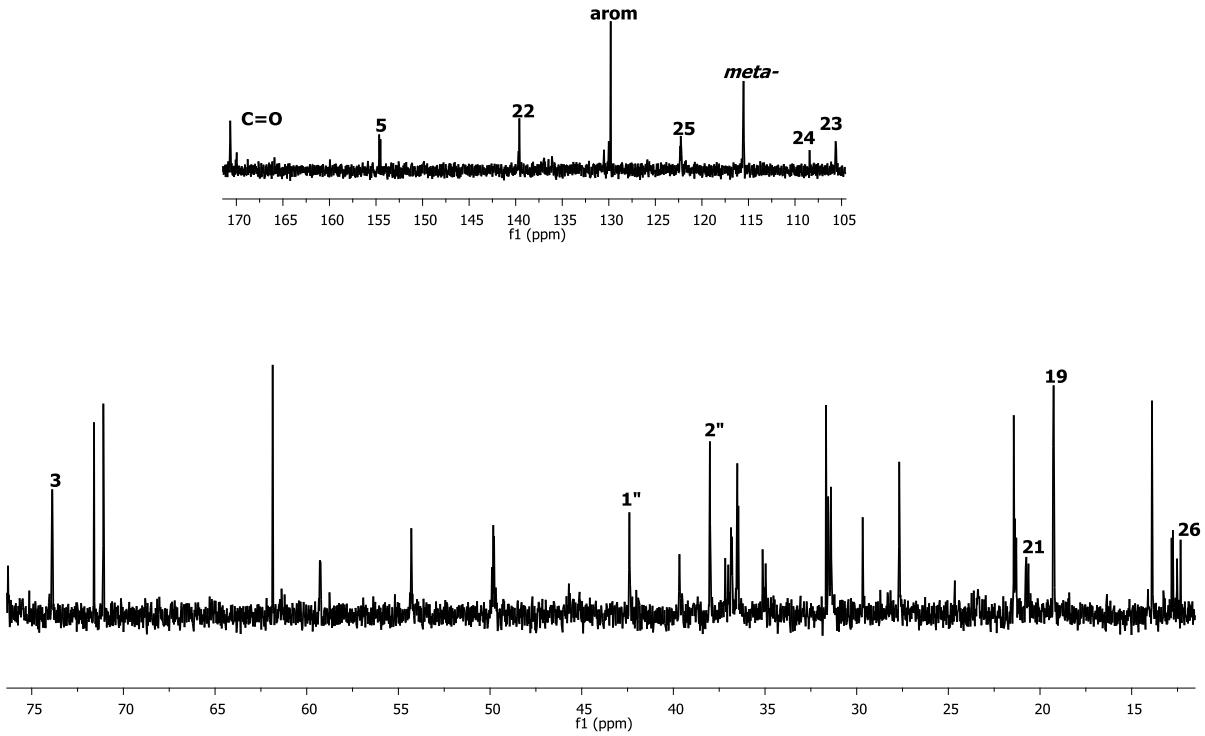


Figura 56. RMN de ^{13}C del compuesto **40**.

Como se ha discutido, la asignación de las señales se llevó a cabo gracias a los experimentos de dos dimensiones y uno de ellos es por ejemplo, el HSQC. Para complementar la información también se utilizó el experimento HMBC, con el propósito de confirmar la estructura del compuesto **40.** Dado que las condiciones de reacción para su obtención son diferentes, pero ello no imposibilitó a que se sintetizara del pirrol.

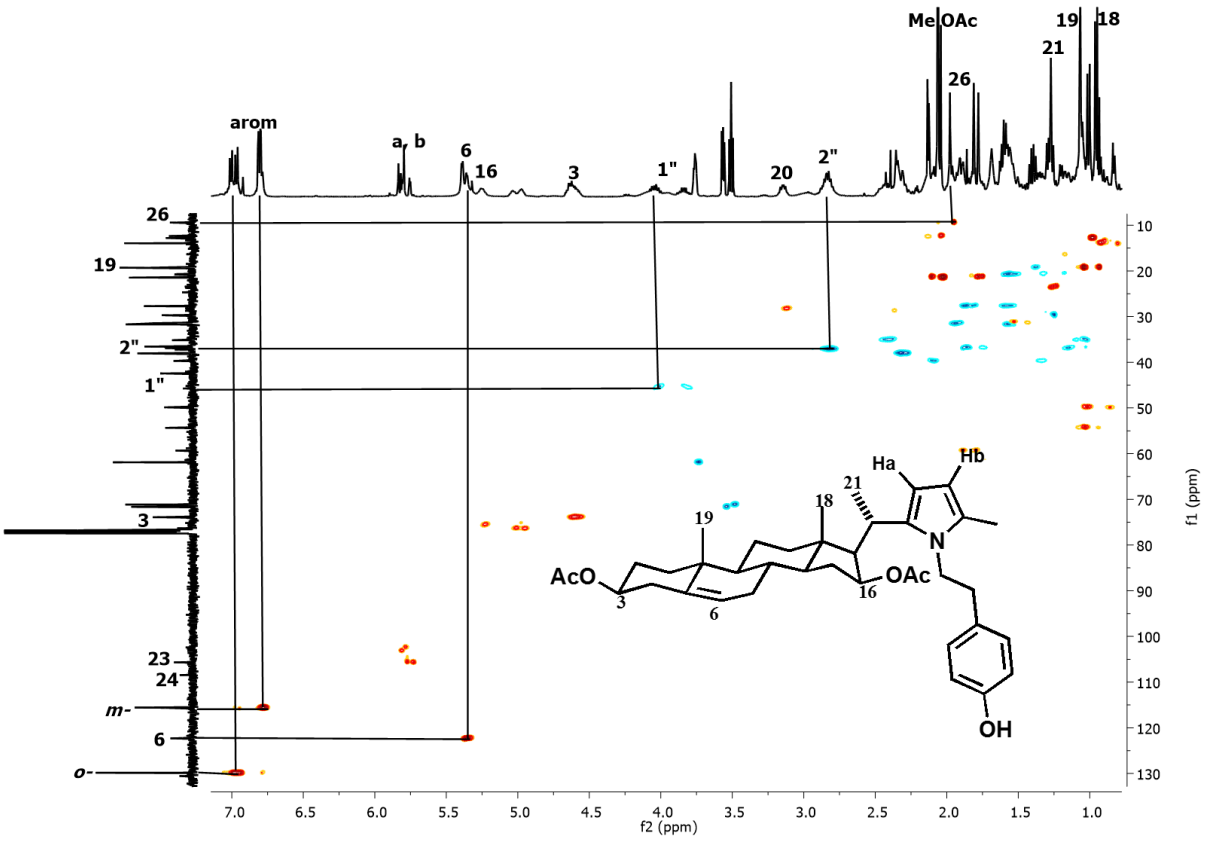


Figura 57. Experimento HSQC de **40**

Evaluación biológica

Se sabe que algunas saponinas nitrogenadas con una cadena azucarada en C-3, tienen gran actividad microbicida y esta actividad depende de la presencia de los azúcares, tal como la chaconina (**11**), que ya fue mencionada en el capítulo 1, Sin embargo, no se conoce si el efecto permanece cuando se modifica la cadena lateral y el sustituyente del C-3. Dado que en este trabajo, las estructuras a evaluar no presentan una cadena azucara en C-3 y el átomo de carbono del anillo E está sustituido por un átomo de nitrógeno y por ello no se descarta la posibilidad de que tenga actividad biológica.

Por lo tanto, los ensayos se realizaron en cepas de *Candida sp*, una cepa es tipo ATCC 65027 y otras cepas aisladas y caracterizadas por Quintero G. B. 2017, del CICM-ICUAP.

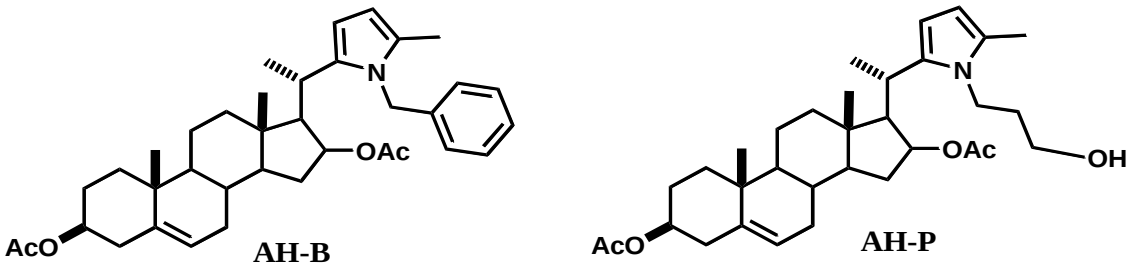


Figura 58. Compuestos evaluados en su actividad antifúngica.

Cabe mencionar que los compuestos se evaluaron a diferentes concentraciones para encontrar la concentración inhibitoria adecuada.

Se prepararon las soluciones patrón de los compuestos **AH-B** y **AH-P** (200 µg/mL) y a partir de estas se prepararon las diluciones con diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL), respectivamente. Posteriormente se tomaron 100 µL de cada solución preparada a probar para obtener una solución final. En base a ello, se realizaron los respectivos ensayos y se encontró que los compuestos mostraron actividad a la concentración más alta de 200 µg/mL. El porcentaje de actividad se midió respecto al porcentaje de UFC recuperadas posterior al tratamiento con cada compuesto correspondiente y comparado con la cantidad de UFC inicial.

El método cuantitativo se basa en determinar la CMI.

Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 2** y **3**.

Tabla 2. Porcentaje de actividad del compuesto AH-P en cepas de *Candida sp*.

Cepa *Candida sp*	Concentración inhibitoria del compuesto en µg/ml	Porcentaje de actividad de acuerdo a las células viables
ATCC	200 µg/mL	90%
TZ12	200 µg/mL	90%
TZ17	200 µg/mL	100%
2	200 µg/mL	100%
3	200 µg/mL	100%
7	200 µg/mL	90%
9	200 µg/mL	90%
11	200 µg/mL	100%
13	200 µg/mL	90%

Tabla 3. Porcentaje de actividad del compuesto AH-B en cepas de *Candida sp*.

Cepa *Candida sp*	Concentración inhibitoria del compuesto en µg/ml	Porcentaje de actividad de acuerdo a las células viables
ATCC	200 µg/mL	100%
TZ12	200 µg/mL	60%
TZ17	200 µg/mL	100%
2	200 µg/mL	80%
3	200 µg/mL	70%
5	200 µg/mL	50%
7	200 µg/mL	90%

9	200 µg/mL	50%

En los resultados obtenidos de inhibición de levadura se observa que ambos compuestos evaluados presentaron actividad en varias cepas de *Candida sp.*, sin embargo se considera que el pirroloesteroide **AH-P** posee mejor actividad antimicrobiana en 9 cepas por el porcentaje de actividad ubicado en un rango del 90 al 100%. Mientras que el pirroloesteroide **AH-B** sólo posee actividad en ocho cepas, con porcentaje de actividad menor, en un rango del 60 al 100%.

Metodologías y equipos empleados

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{1}H y ^{13}C se adquirieron en los equipos Varian–Mercury (300 MHz) y Bruker AVANCE (500 MHz). Como disolvente se empleó cloroformo deuterado ($CDCl_3$). Los desplazamientos químicos se presentan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz. La multiplicidad de las señales de los espectros de ^{1}H se describe como: *s* para una señal simple, *d* para una señal doble, *dd* para una señal doble de doble, *ddd* para una señal doble de doble de doble, *dc* para una señal doble de cuádruple, *t* para una señal triple y *m* para una señal múltiple.

Polarimetría

Las rotaciones ópticas se midieron en dos polarímetros diferentes;

- Polarímetro Circular Modular en soluciones de diclorometano, empleando celdas de 10 cm de longitud y como fuente una lámpara de sodio, de donde se selecciona la línea D (589 nm).
- Polarímetro Perkin-Elmer 241 en soluciones de cloroformo, empleando celdas de 10 cm de longitud y como fuente una lámpara de sodio, de donde se selecciona la línea D (589 nm).

Espectroscopia Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Agilent Cary 630 FTIR; los datos se expresan en números de onda (cm^{-1}).

Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados por la técnica de capilar abierto en un equipo Melt-temp, utilizando la escala de grados Celsius.

Espectrometría de Masas

Los espectros de masas se realizaron en el equipo HPLC Agilent Technologies 6230 TOF LC/MS.

Cromatografía

Para monitorear las reacciones se utilizó la cromatografía en capa fina (CCF) y placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor con indicador de fluorescencia.

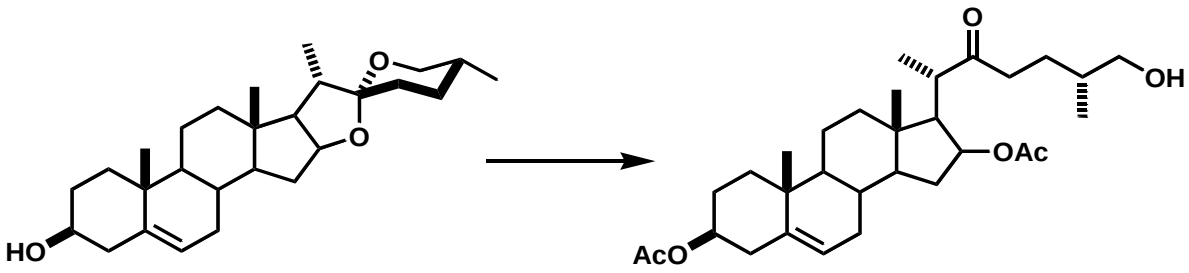
Para su revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara de UV-G-54) y por calcinación, revelador con ácido molíbdico, sulfato de cerio y ácido sulfúrico. Para la cromatografía en columna se empleó un aparato de cromatografía en columna a presión media (Combiflash) o la cromatografía en columna de vidrio, tipo *flash.* [15]

Disolventes y reactivos

Los reactivos que se utilizaron fueron destilados, sellados y aislados de la humedad. Todos los disolventes se purificaron y secaron de acuerdo a las técnicas publicadas en la literatura. [16]

Desarrollo experimental

Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo. (32)



En un matraz de fondo redondo se disolvió 1 g de diosgenina en 7 mL de CH_2Cl_2 y 2 mL de anhídrido acético, bajo atmósfera de argón. La solución se enfrió a 0 °C y se agregaron gota a gota 2 mL de $BF_3{\cdot}OEt_2$. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 15 min y transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo y se extrajo con CH_2Cl_2 (100 mL). La fase orgánica se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$ (6 x 50 mL) y con agua (2 x 50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La fase orgánica se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna.

El compuesto **32** se purificó con un sistema hexano/AcOEt 7:3 obteniéndose un sólido blanco (0.530 g, 53 %).

RMN ^{1}H(500 MHz)δ: 5.34 (1H, *d*, *J* = 4.8,H-6), 4.96 (1H, *m*, H16), 4.58 (1H, *m*, H-3), 3.40 (2H, *d*,$J_{25,26}$ = 5, H-26), 2.94 (1H, *dc*,$J_{20\text{-}21}$= 15 Hz, $J_{20\text{-}17}$= 10 Hz, H-20), 2.62 (2H, *m*, H-23a),2.39 (2H, m, H-23a), 2.35 (1H, *m*, H-15a), 2.01 (3H, *s*, CH3COO-16), 1.95 (3H, *s*, CH3CCO-3), 0.89 (3H, *d*, $J_{27\text{-}25}$= 10 Hz, CH3-27),1.12 (3H, *d*, $J_{21\text{-}20}$= 5 Hz, CH3-21), 1.01 (3H, *s*, CH3-19), 0.85 (3H, *s*, CH3-18).

RMN ^{13}C (125 MHz) δ:37.0 (C-1), 27.9 (C-2), 74.3 (C-3), 38.2 (C-4), 139.7 (C-5), 122.4 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 35.0 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17),13.4 (C-18),19.5 (C-19),43.7 (C-20), (16.8 C-

21),213.8 (C-22), 38.7 (C-23), 27.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.6 (C-26), 17.1 (C-27),170.7 (C-C=O 16), 170.0 (C-C=O 3),21.6 (CH3COO-3), 21.3 (CH3COO-16).

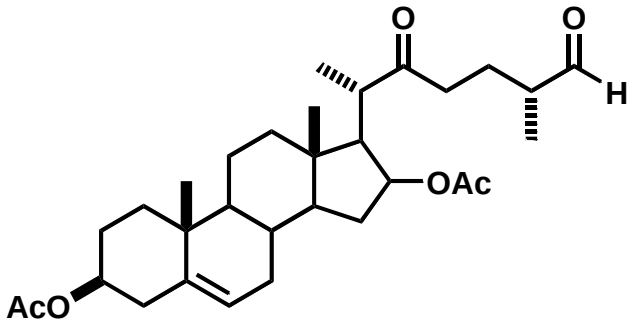
$[\alpha]_D$ = - 0.3º (c 1, $CHCl_3$)

Punto de fusión: 152-154 ºC

IR (cm^{-1}): 3497 (OH); 2936 (CH, alifático); 1728 (C=O, cetona); 1708(C=O, acetato).

EMAR (m/z): $[M+H]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{31}H_{48}O_6$ 517.3529; observado 517.3521.

Diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (33)



Se disolvieron 0.530 g de **32** en 10 mL de CH_2Cl_2 y posteriormente con una pipeta se adicionó a un matraz de bola que contenía 0.442 g de PCC. La mezcla de reacción se dejó en agitación continua por 1 h a temperatura ambiente. La reacción se monitoreo cada 20 min por CCF hasta que se observó el consumo parcial de la materia prima. Una vez transcurrido este tiempo se agregaron 20 mL de éter etílico y la fase orgánica se filtró empleando un embudo Büchner que contenía una cama de celita y se eluyó con CH_2Cl_2. El filtrado se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna.

El compuesto **33** se purificó empleando un sistema hexano/AcOEt 9:1 obteniéndose un sólido de color blanco (0.424 mg, 80%).

RMN ^{1}H (500 MHz) δ: 9.56 (1H, *d*, $J_{26\text{-}25}$= 5 Hz, H-26), 5.34 (1H, *d*, $J_{6\text{-}7}$= 5 Hz, H-6), 4.95 (1H, *m*, H-16), 4.57 (1H, *m*, H-3), 2.90 (1H, *dc*, H-20), 2.6 (1H, *m*, H-23a), 2.4 (1H, *m*, H-15), 2.2 (1H, *m*, H-23b), 2.01 (3H, *s*, CH3COO-16), 1.94 (3H, *s*, CH3COO-3), 1.11 (3H, *d*, CH3-27), 1.09 (3H, *d*, CH3-21), 1.00 (3H, *s*, CH3-19), 0.84 (3H, *s*, CH3 18).

RMN ^{13}C (125 MHz) δ: 36.4 (C-1), 27.6 (C-2), 73.7 (C-3), 37.9 (C-4), 139.5 (C-5), 122.1 (C-6), 31.5 (C-7), 31.1 (C-8), 49.6 (C-9), 37.7 (C-10), 20.6 (C-11), 41.8 (C-12), 43.3 (C-13), 53.8 (C-14), 34.7 (C-15), 75.5 (C-16), 54.9 (C-17), 13.1 (C-18), 19.2 (C-19), 45.5 (C-20), 16.6 (C-21), 212.1 (C-22), 39.5 (C-23), 23.7(C-24), 36.8 (C-25), 204.4 (C-26), 13.4 (C-27), 170.4 (C-C=O 16), 169.7 (C-C=O-3), 21.3 (CH3COO-16), 21.1 (CH3COO-3).

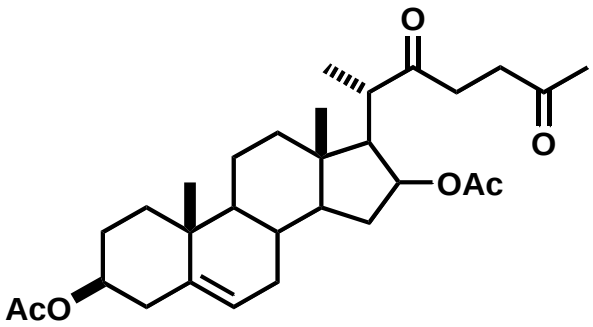
$[\alpha]_D$ = + 0.32º (c 1, $CHCl_3$)

Punto de fusión: 180-183ºC

IR (cm^{-1}): 2937 (CH, alifático); 1727 (C=O, cetona); 1239 (C=C).

EMAR (m/z): $[M+H]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{31}H_{46}O_6$ 514.6933; observado 514.6909.

Diacetato de 27-nor-22,25-dioxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (34)



En un matraz de fondo redondo se disolvieron 0.424 g de **33** en 20 mL de etanol y se agregaron 0.755 g de TMAn. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación, a reflujo durante 3 horas y transcurrido este tiempo se detuvo el calentamiento. La reacción se monitoreo cada 30 minutos por CCF. Posteriormente se evaporó el disolvente. La fase orgánica se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$ (2 x 50 mL), NaCl (2 x 50 ml) y con agua (2 x 50 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La fase orgánica se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna.

El compuesto **34** se purificó con un sistema hexano/AcOEt 85:15 obteniéndose un sólido blanco (0.254 g, 65%).

RMN ^{1}H (500 MHz)δ: 5.32 (1H, *d*, $J_{6\text{-}7}$= 5 Hz, H-6), 4.88 (1H, *m*, H-16), 4.55 (1H, *m*, H-3), 2.96 (1H, *m*, H-20), 2.90 (1H, *m*, H-23a), 2.50 (1H, *m*, H-23b), 2.14 (3H, *s*, CH3-26), 1.99 (3H, *s*, CH3COO-16), 1.97 (3H, *s*, CH3COO-3), 1.13 (3H, *d*, $J_{21\text{-}20}$= 5 Hz, CH3-21), 0.98 (3H, *s*, CH3-19), 0.83 (3H, *s*, CH3-18).

RMN ^{13}C (125 MHz) δ: 36.7(C-1), (C-2), 73.7 (C-3), 37.9 (C-4), 139.4 (C-5), 122.0 (C-6), 31.4 (C-7), 31.1 (C-8), 49.6 (C-9), 36.4 (C-10), 20.5 (C-11), 39.4 (C-12), 41.7 (C-13), 53.8 (C-14), 36.1 (C-15), 75.4(C-16), 54.9 (C-17), 13.0(C-18), 19.1 (C-19), 42.9 (C-20), 16.6 (C-21), 211.2 (C-22), 34.5 (C-23), 34.7 (C-24), 206.9 (C-25), 29.9 (C-26), 21.1 (CH3COO 16), 21.3 (CH3COO 3), 170.1 (C-C=O 16), 169.8 (C-C=O 3).

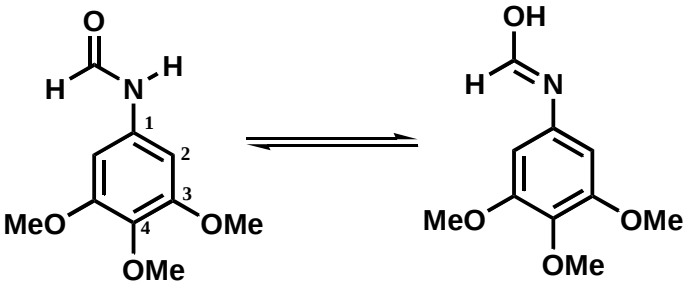
$[\alpha]_D$ = + 3.9º (c 1, $CHCl_3$)

Punto de fusión: 182-185ºC

IR (cm^{-1}): 2936 (CH, alifático); 1727 (C=O, cetona); 1241 (C=C, doble enlace).

EMAR (m/z): $[M+H]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{30}H_{44}O_6$ 501.3216; observado 501.3188.

***N*-(3,4,5-trimetoxifenil)formamida (35)**



Con las mismas condiciones de reacción para obtener el compuesto **34** se obtuvo la *N*-(3,4,5-trimetoxifenil)formamida.

El compuesto **35** se purificó con un sistema hexano/AcOEt 6:4 obteniéndose un sólido café (0.043 g, 6%).

RMN ^{1}H (500 MHz) δ: 8.79 (1H, *ancha*, NH), 8.59 (1H, *d*, H-C=O), 8.27 (1H, *s*, H-CO), 6.84 (4H. *s*, 2), 6.28 (2H, *s*, 2), 3.76 (27H, *m*, -OMe).

RMN ^{13}C (125 MHz) δ: 162.7 (C=O), 153.0 (C-3), 134.3 (C-4), 133.3 (C-1), 97.5 (C-2), 60.9 (CH3O-4), 55.8 (CH3-3).

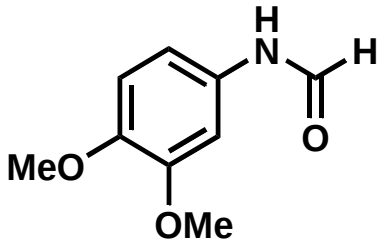
$[\alpha]_D$ = + .3.9º (c 1, $CHCl_3$)

Punto de fusión: 73-75ºC

IR (cm^{-1}): 3267 (NH); 2937 (CH); 1668 (C=O); 1210 (C=C).

EMAR (m/z): $[M+H]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{10}H_{13}NO_4$ 211.2145; observado 211.2145.

N-(3,4,-dimetoxifenil)formamida (36)



Utilizando las mismas condiciones de reacción para obtener el compuesto **34** se obtuvo la *N*-(3,4,-dimetoxifenil)formamida.

El compuesto **36** se purificó con un sistema hexano/AcOEt 6:4 obteniéndose un sólido café (0.123 g, 15%).

RMN ^{1}H (500 MHz) δ: 8.53 (1H, *d*, H-CO), 8.30 (1H, *s*, NH), 7.33 (1H, d, H-2), 6.92 (1H, *d*, H-6), 6.89 (1H, *dd*, H-5), 3.84 (9H, *m*, -OCH_3).

RMN ^{13}C (125 MHz) δ: 163.0 (C=O), 148.9 (C-*3*), 145.9 (C-4), 130.6 (C-1), 111.9 (C-6), 111.1 (C-5), 105.0 (C-2), 55.9 (-OCH3).

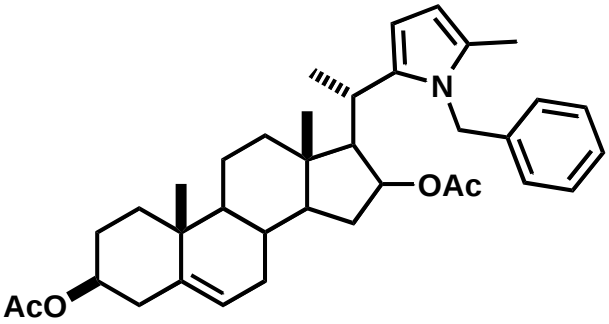
$[\alpha]_D$ = +3.9º (c 1, $CHCl_3$)

Punto de fusión: 71-73ºC

IR (cm^{-1}): 3252 (NH); 2879 (CH); 1700 (C=O); 1227 (C=C).

EMAR (m/z): $[M+H]^{+\cdot}$ Calculado para $C_9H_{11}NO_3$ 181.1885; observado 181.1885.

3β,16β-diacetoxi-*N*-bencilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]-27-norcolest-5-eno. (37)



Se disolvieron 100 mg de **34** en 15 mL de tolueno, posteriormente se le adicionaron 0.052 g (0.3 mmol) de ácido *p*-TsOH y 0.8 mL (5.12 mmol) de bencilamina. La mezcla de reacción se dejó condensar (reflujo-método convencional) a temperatura de (100-110 ºC), con agitación continua por 5 h. La reacción se estuvo monitoreando hasta que la CCF mostrara reacción y consumo de materia prima. Una vez transcurrido este tiempo el crudo de reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se extrajo con CH_2Cl_2. La fase orgánica se lavó con HCl al 5% (1 x 100 mL), solución saturada de $NaHCO_3$ (1 x 100 mL), salmuera (2 x 100 mL), agua (1 x 100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna.

El compuesto **37** se purificó empleando un sistema hexano/AcOEt 9:1 obteniéndose un líquido denso de color amarillo (50 mg, 50%).

RMN ^{1}H(500 MHz)δ: 7.29 (2H, *dd*, H-meta), 7.22 (2H, *t*, H-para), 6.88 (1H, *d*, *J*= 5.0, H-orto), 5.85 (2H, *dd*, $J_{a\text{-}b}$= 5 Hz, H-a,b), 5.36 (2H, *d*, *J* = 5.0, H-6), 5.06 (2H, *dd*, $J_{bencilo}$= 20 Hz, H-bencilo), 4.95 (1H, *ancha*, H-16), 4.60 (1H, *m*, H-3), 2.99 (1H, *m*, H-20), 2.09 (3H, *s*, H-26), 2.03 (3H, *s*, CH3COO-3), 1.79 (3H, *s*, CH3COO-16), 1.02 (3H, *s*, H-19), 0.91 (1H, *s*, H-21), 0.90 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125 MHz)δ: 36.8(C-1), 27.6 (C-2), 73.8 (C-3), 38.0 (C-4), 139.6 (C-5), 122.2 (C-6), 31.5 (C-7), 31.3 (C-8), 49.8 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 42.2 (C-13), 54.3 (C-14), 34.8 (C-15), 76.0 (C-16), 59.4 (C-17), 12.6 (C-18), 19.2 (C-19), 28.3 (C-20), 22.9 (C-21), 138.9 (C-22), 102.5 (C-23), 105.9 (C-24), 126.3 (C-25), 12.4 (C-26),46.3(C-bencilo), 138.0 (C-ipso), 128.6 (C-meta-), 126.9 (C-para-), 125.7 (C-orto-), 21.4 (CH3COO-3), 21.1 (CH3COO 16), 170.6 (C=O 16), 169.8 (C=O 3).

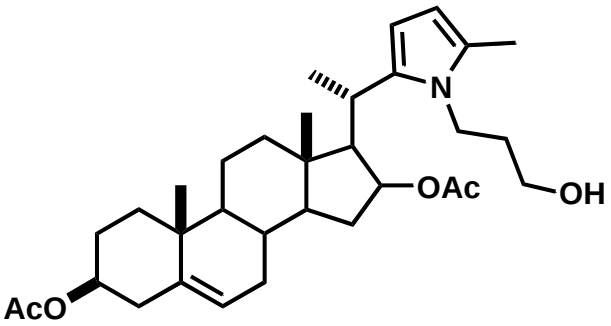
$[\alpha]_D$= -56º (*c* 0.1)

Punto de fusión: 83-85 °C

IR (cm^{-1}): 2938 (C-H); 1726 (C=O) de OAc; 1373 (C-N) de pirrol; 1242 (C=C).

EMAR(m/z): [M]$^{+\cdot}$ Calculado para $C_{37}H_{49}NO_4$ 571.3664; observado 572.3736

3β,16β-diacetoxi-*N*-(3-hidroxi)propilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno. (38)



Se utilizó el método empleado para sintetizar el compuesto **37**, sólo que ahora con 3-amino-1-propanol.

El compuesto **38** se purificó empleando un sistema hexano/AcOEt 8:2 obteniéndose un polvo blanco (40 mg, 40%).

RMN ^{1}H(500 MHz)δ: 5.75 (2H, *s*, H-a,b), 5.36 (1H, *d*, *J*= 5 Hz, H-6), 4.95(1H, *m*, H-16), 4.60 (1H, *m*, H-3), 3.99 (1H, *tdd*, J_{gem}=10 Hz,$J_{1"-2"}$= 5 Hz, H-1"a), 3.83 (1H, *tdd*, J_{gem} = 10 Hz,$J_{1"-2"}$= 5 Hz, H-1"b), 3.72 (2H, *dddd*, *J*= 5 Hz, H-3"), 3.04 (1H, *dddd*, *J*= 15 Hz, H-20), 2.18 (3H, *s*, H-26), 1.82 (3H, *s*, CH3COO-16), 2.03 (3H, *s*, CH3COO-3), 1.23 (3H, d, CH3-21), 1.03 (3H, *s*, CH3-19), 0.95 (3H, *s*, CH3-18).

RMN ^{13}C(125 MHz)δ: 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 73.8 (C-3), 37.9 (C-4), 139.5 (C-5), 122.2 (C-6), 31.5 (C-7), 31.3 (C-8), 49.8 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.6 (C-12), 42.3 (C-13), 54.2 (C-14), 34.8 (C-15), 76.1 (C-16), 59.5 (C-17), 12.8 (C-18), 19.2 (C-19), 28.1 (C-20), 23.5 (C-21), 137.3 (C-22), 102.3 (C-23), 105.8 (C-24), 125.5 (C-25), 12.4 (C-26). 170.5 (C-C=O 16), 169.9 (C-C=O 3), 21.4 (CH3COO-3), 21.2 (CH3COO-16), 40.1 (C-1"), 34.1 (C-2"), 60.2 (C-3").

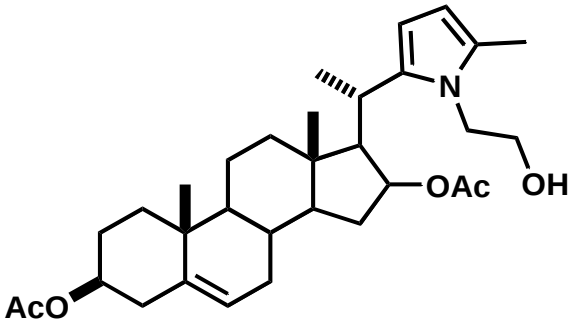
$[\alpha]_D$=-53.9º (c 0.1)

Punto de fusión: 205-207 °C

IR (cm^{-1}): 3400 (O-H); 2941 (C-H); 1725 (C=O) de OAc; 1373 (C-N) de pirrol; 1239 (C=C).

EMAR(m/z): $[M+H]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{33}H_{49}NO_5$ 539.76; observado 539.3611.

3β,16β-diacetoxi-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno. (39a)



Se utilizó el método llevado a cabo para sintetizar el compuesto **38**, solo que ahora con 2-aminoetanol.

El compuesto **39a** se purificó empleando un sistema hexano: AcOEt 8:2 obteniéndose un polvo blanco (20 mg, 20%).

RMN ^{1}H (500 MHz)δ: 5.77 (2H, *dd*, $J_{a\text{-}b}$= 10 Hz, H-a,b), 5.36 (1H, *d*, *J*= 5 Hz, H-6), 4.97 (1H, *m*, H-16), 4.60 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, *td*, J_{gem}= 10 Hz, $J_{1"\text{-}2"}$= 5 Hz, H-1"a), 3.89 (1H, *td*, J_{gem} = 10 Hz, $J_{1"\text{-}2"}$= 5 Hz, H-1"b), 3.79 (2H, *dddd*, *J*= 10 Hz, H-2"), 3.05 (1H, *dddd*, *J*= 5 Hz, H-20), 2.19 (3H, *s*, H-26), 2.03 (3H, *s*, CH3COO-3), 1.84 (3H, *s*, CH3COO-16), 1.22 (3H, *d*, *J*= 10 Hz, CH3-21), 1.03 (3H, *s*, CH3-19), 0.95 (3H, *s*, CH3-18).

RMN ^{13}C (125 MHz)δ: 36.8 (C-1), 27.6 (C-2),73.8 (C-3), 38.0 (C-4), 139.5 (C-5), 122.0 (C-6), 31.5 (C-7), 31.3 (C-8), 49.8 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.6 (C-12), 42.3 (C-13), 54.2 (C-14), 34.9 (C-15), 76.3 (C-16), 59.3 (C-17), 12.8 (C-18), 19.2 (C-19), 28.1 (C-20), 23.4 (C-21), 137.5 (C-22), 102.5 (C-23), 106.1 (C-24), 126.3 (C-25), 12.6 (C-26), 170.5 (C-C=O 16), 170.0 (C-C=O 3), 21.4 (CH3COO-3), 21.1 (CH3COO-16), 45.1 (C-1"), 62.4 (C-2").

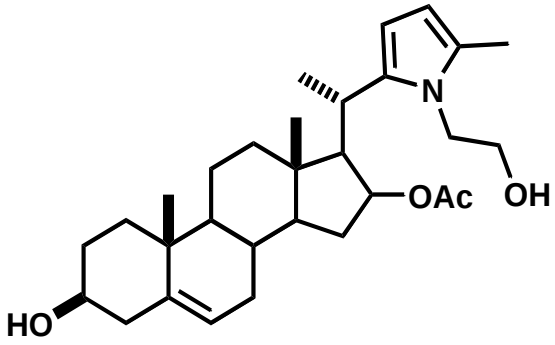
$[\alpha]_D$= -24.1º (*c* 0.1)

Punto de fusión: 230-232 °C

IR (cm^{-1}): 3300 (O-H); 2942 (C-H); 1722 (C=O) de OAc; 1373 (C-N) de pirrol; 1239 (C=C).

EMAR (m/z): $[M]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{32}H_{47}NO_5$ 525.7193; observado 525.1340.

Acetato de *N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno-3β-hidroxi,26-ilo. (39b)



Se llevó a cabo la metodología para sintetizar el compuesto **39a**, con 2-aminoetanol.

El compuesto **39b** se purificó empleando un sistema hexano/AcOEt 7:3 obteniéndose un polvo blanco (20 mg, 20%).

RMN ^{1}H(500 MHz)δ: 5.77 (2H, *dd*, $J_{a\text{-}b}$= 5 Hz, H-a,b), 5.33 (1H, *d*, *J*= 5 Hz, H-6), 4.95 (1H, *m*, H-16), 4.03 (1H, *td*, J_{gem}= 10 Hz, $J_{1"\text{-}2"}$= 5 Hz, H-1"a), 3.89 (1H, *td*, J_{gem} = 10 Hz, $J_{1"\text{-}2"}$= 5 Hz, H-1"b), 3.78 (2H, *dddd*, *J*= 10 Hz, H-2"), 3.50 (1H, m, H-3), 3.04 (1H, *dddd*, *J*= 5 Hz, H-20), 2.19 (3H, *s*, H-26), 1.84 (3H, *s*, CH3COO-16), 1.22 (3H, *d*,*J*= 5 Hz, CH3-21), 1.02 (3H, *s*, CH3-19), 0.95 (3H, *s*, CH3-18).

RMN ^{13}C (125 MHz)δ: 39.7 (C-1), 21.1 (C-2),71.6 (C-3), 37.1 (C-4), 140.7 (C-5), 121.3 (C-6), 31.5 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.4 (C-10), 20.8 (C-11), 42.0 (C-12), 42.3 (C-13), 54.2

(C-14), 34.9 (C-15), 76.4 (C-16), 59.3 (C-17), 12.8 (C-18), 19.3 (C-19), 28.1 (C-20), 23.4 (C-21), 137.8 (C-22), 102.7 (C-23), 106.0 (C-24), 125.2 (C-25), 12.7 (C-26), 170.0 (C-C=O 16), 20.8 (CH3COO-16), 45.1 (C-1”), 62.3 (C-2”).

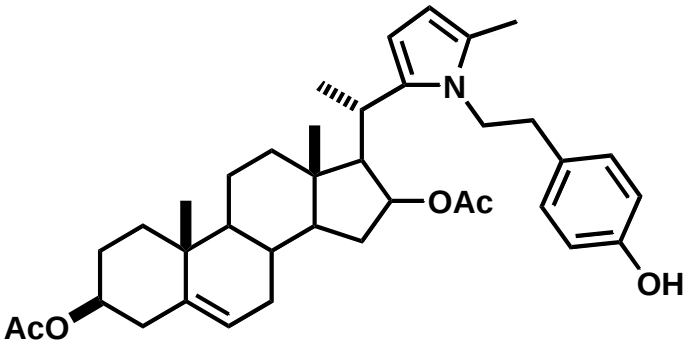
$[\alpha]_D$= -13.6º (*c* 0.81)

Punto de fusión: 222-224 °C

IR (cm^{-1}): 3466 (O-H); 2933 (C-H); 1726 (C=O) de OAc; 1373 (C-N) de pirrol; 1247 (C=C).

EMAR(m/z): $[M]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{30}H_{45}NO_4$ 483.6826; observado 483.

3β,16β-diacetoxi-*N*-(4-hidroxi)fenetilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno. (40)



Se disolvieron 100 mg de **34** en 15 mL de DMF, posteriormente se le adicionaron 0.052 g (0.3 mmol) de ácido *p*-TsOH y 0.055 g (1.4 mmol) de 4-hidroxifenetilamina. La mezcla de reacción se sometió a reflujo (140-150 º C), con agitación continua por 5 h. La reacción se monitoreo cada 60 min por CCF hasta observar consumo de materia prima. Una vez transcurrido el tiempo con AcOEt el producto formado. Por lo que la fase orgánica se lavó con HCl al 5% (1 x 100 mL), solución saturada de $NaHCO_3$ (1 x 100 mL), salmuera (2 x 100 mL), agua (1 x 100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro a continuación, la fase orgánica se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna.

El compuesto **40** se purificó empleando un sistema hexano/AcOEt 9:1 obteniéndose un líquido denso de color amarillo (15 mg, 15%).

RMN ^{1}H(500 MHz)δ: 6.98 (2H, *m*, H-orto), 6.78 (2H, *m*, H-meta), 5.77 (2H, m, H-a,b), 5.46 (1H, *ancha*, OH), 5.38 (1H, *m*, H-6), 5.25 (1H, *m*, H-16), 4.60 (1H, *m*, H-3), 4.01 (1H, *m*, H-1"), 3.82 (1H, *m*, H-1"),sacar J. 3.11 (1H, *m*, H-20), 2.81 (2H, *m*, H-2")sacar J. , 2.11 (3H, *s*, CH3COO-3), 2.05 (3H, *s*, CH3-26), 2.04 (3H, s, CH3COO-16), 1.25 (3H, *d*, H-21), 1.05 (3H, *s*, H-19), 0.99 (3H, *s*, H-18).

RMN ^{13}C (125 MHz)δ: 36.8 (C-1), 27.7 (C-2), 73.8 (C-3), 37.9 (C-4), 154.5 (C-5), 122.2 (C-6), 31.7 (C-7), 31.4 (C-8), 49.8 (C-9), 36.4 (C-10), 20.7 (C-11), 39.6 (C-12), 42.4 (C-13), 54.4 (C-14), 35.1 (C-15), 76.3 (C-16), 59.3 (C-17), 13.9 (C-18), 19.3 (C-19), 27.7 (C-20), 21.4 (C-21), 139.5 (C-22), 105.6 (C-23), 108.3 (C-24), 126.0 (C-25), 12.4 (C-26), 130.0 (C-ipso), 129.8 (C-orto-), 115.3 (C-meta-), 154.6 (C-para-), 21.3 (CH3COO-3), 21.2 (CH3COO 16). 170.9 (C=O 16), 169.9 (C=O 3), 42.4 (CH2-1"), 36.8 (CH2-2").

$[\alpha]_D$= -7.2º (*c* 0.1)

Punto de fusión: 108-110 °C

IR (cm^{-1}): 3450 (OH); 2937 (C-H); 1727 (C=O) de OAc; 1373 (C-N) de pirrol; 1239 (C=C).

EMAR (m/z): $[M]^{+\cdot}$ Calculado para $C_{38}H_{51}NO_5$ 601.8152; observado 601.8152.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE NUEVAS ESTRUCTURAS COLESTÁNICAS NITROGENADAS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Introducción

En México se cultiva mayoritariamente maíz, sorgo, frijol, trigo, soja y otros, pero el maíz es el de mayor importancia, por ser la principal fuente de consumo humano, animal y uso industrial. Sin embargo, nuestro país presenta un déficit de producción de maíz, provocando incremento en la importación y precio para el consumidor. [17]

La demanda en el mercado y los factores ambientales que son difíciles de controlar en condiciones de campo, han obligado al hombre emplear recursos que aumenten la calidad y el rendimiento de los cultivos a través de estimuladores de crecimiento vegetal, pero los resultados no han sido favorables, ya que algunas zonas agrícolas con temperatura y humedad variada, son una limitante para su producción. [18]

Recientes investigaciones muestran que los análogos de brasinoesteroides proveen mejora en rendimientos de los cultivos de maíz así como mayor resistencia ante el estrés, de aquí resulta la necesidad de impulsar la investigación química.

Dado que una parte fundamental de la actividad de los brasinoesteroides radica en su estructura esteroidal, es de esperarse que otros compuestos que incluyen esta estructura puedan ser igualmente activos.

Con este propósito, fueron sintetizados nuevos compuestos que mantienen el núcleo esteroidal, con modificaciones en la cadena lateral, ya que poseen un pirrol, cuyo efecto promotor de crecimiento vegetal no ha sido evaluado en condiciones de laboratorio ni de campo, a pesar de tener un efecto antifúngico, como ya se discutió en el capítulo I.

Por tal motivo es de gran interés, realizar las pruebas contundentes para investigar si estos nuevos compuestos (pirroloesteroides) tienen o no efecto del crecimiento vegetal, al igual que los brasinoesteroides.

Justificación

Ante el incremento poblacional, la erosión de terrenos y la migración poblacional del campo a la ciudad, es necesario buscar alternativas que satisfagan las necesidades de producción de alimentos para satisfacer la demanda del mercado.

Se sabe que los brasinoesteroides actúan favorablemente en el rendimiento de cultivos agrícolas, incrementando y favoreciendo el crecimiento de los mismos en condiciones de estrés, sin embargo, no se conoce si su efecto se mantiene cuando la cadena lateral se modifica.

Por tal motivo, se propone en este trabajo la evaluación de los pirroles esteroidales, que conservan su núcleo esteroidal.

Antecedentes

Hormonas de crecimiento vegetal

Las hormonas de crecimiento vegetal son sintetizadas en determinados sitios estratégicos de la planta, actuando a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. Las fitohormonas pueden tener actividad inductora o inhibidora y estos procesos son regulados porque actúan en general en conjunto. [19]

Los trabajos científicos publicados sobre el crecimiento vegetal respaldan el hecho de que los procesos de crecimiento son controlados por cinco tipos de fitohormonas; el ácido absícico, la giberelina, la auxina, el etileno y la kinetina, (**ver figura 59),** sin embargo, no se puede descartar la presencia de otras hormonas con características similares a las ya mencionadas como es el caso de los brasinoesteroides.

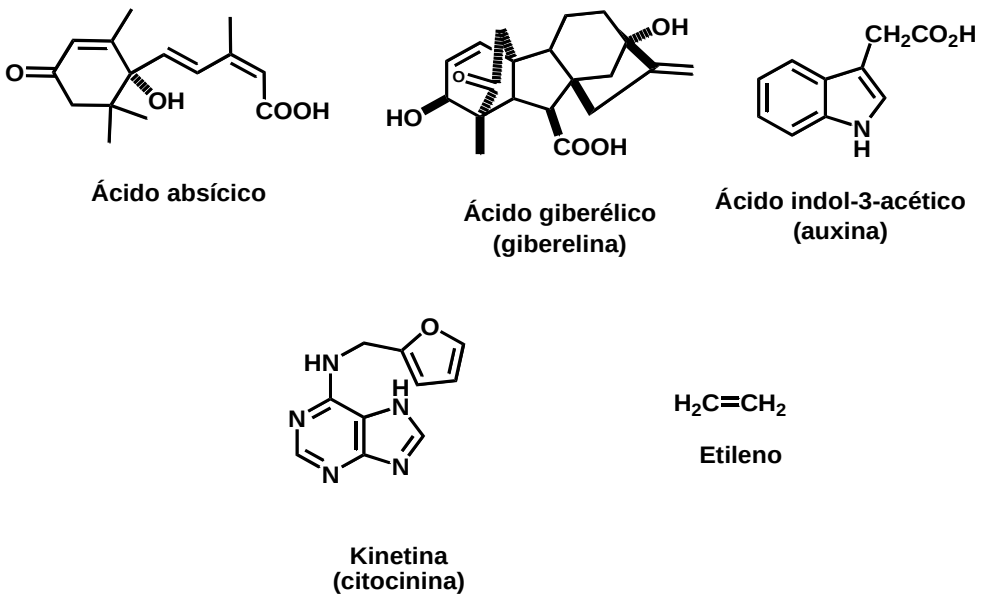


Figura 59. Estructura de los cinco tipos de fitohormonas.

Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides son hormonas esteroidales de las plantas, que son esenciales para su crecimiento y desarrollo; el componente activo de estas sustancias fue descubierta en 1979 por

científicos estadounidenses, la cual fue reportada como lactona esteroidal brasinólida (**ver figura 60**), aislada a partir del polen de *Brassica napus* L. [20]

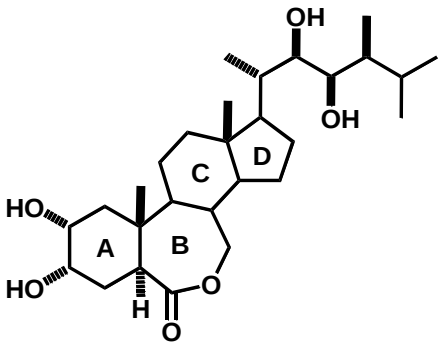


Figura 60. Estructura de la brasinólida.

Hace más de dos décadas que se investiga sobre los brasinoesteroides, y se ha demostrado su importancia en un amplio grupo de procesos fisiológicos. Los brasinoesteroides se han encontrado principalmente en polen, hojas, flores y semillas en proporciones y formas diferentes.

La aplicación de los brasinoesteroides induce un amplio rango de respuestas, incluyendo la elongación celular, división celular, así como diferenciación celular, la función durante todo el desarrollo de plantas, incluyendo el crecimiento de las plántulas a la luz y la oscuridad, brote y expansión de las raíces, la floración, desarrollo del fruto y la senescencia. Además, al igual que otras hormonas, los brasinoesteroides buscan integrar los estímulos percibidos desde el medio ambiente en los programas de desarrollo endógeno y por lo tanto conferir las plantas y los factores ambientales potenciales de adaptación y cambios, es decir, son sustancias que influyen positivamente ante el estrés biótico y abiótico. [21]

De acuerdo a la literatura, existen reportes donde algunos grupos de investigación se han dado a la tarea de sintetizar análogos de brasinólida y otros realizan modificaciones en la cadena lateral para evaluar su actividad como promotores de crecimiento vegetal. Sin embargo, no se encuentran publicaciones acerca de pirroloesteroides evaluados en su actividad de crecimiento.

Tal es el caso del grupo de investigación de McMorris, en donde mostró la síntesis de un análogo de brasinólida pero no realizó si este análogo posee actividad. En la **figura 61**, se presenta el esquema para obtener un diol (análogo de brasinólida). [22]

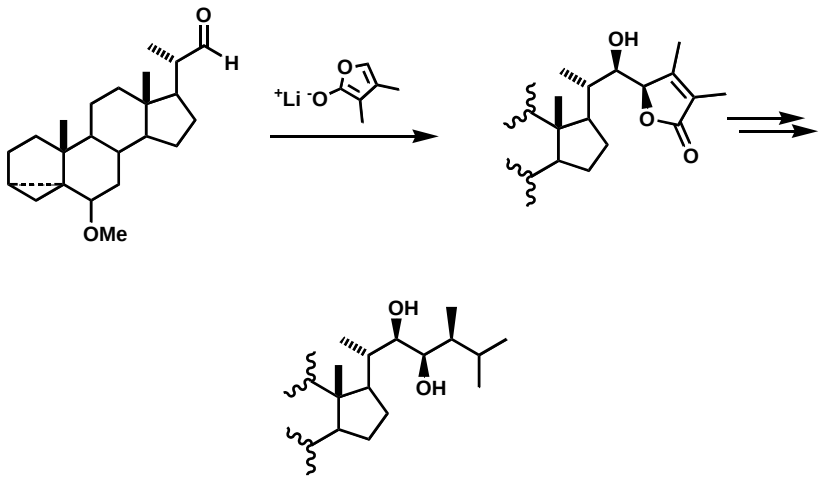


Figura 61. Síntesis de un análogo de brasinólida.

Recientes investigaciones han mostrado que las transformaciones en la cadena lateral con funciones oxigenadas promueven el crecimiento vegetal, tal como lo indica Díaz *et. al.*, donde llevaron a cabo la síntesis y evaluación de compuestos 22-oxocolestánicos por inclinación en lámina de arroz a partir de la diosgenina, realizando únicamente modificaciones en la cadena lateral y conservando el núcleo esteroidal (**ver figura 62**). [23]

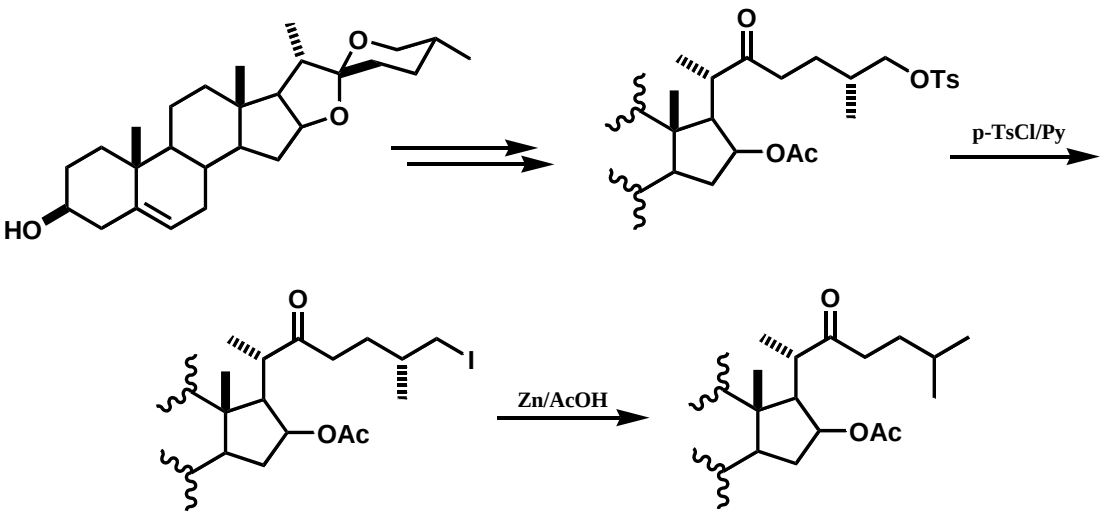


Figura 62. Síntesis de compuestos 22-oxocolestánicos.

Objetivos

- Determinar los efectos de tres pirroloesteroides en semillas de maíz a diferentes concentraciones, en condiciones de laboratorio.

- Determinar la concentración del pirroloesteroide que proporcione mayor efecto en la planta, a través de mediciones de longitud de plúmula, raíz y peso seco.

- Evaluar el efecto de los tres pirroloesteroides en la biomasa del maíz a los 45 días de cultivo.

Evaluación como promotores de crecimiento vegetal

Materiales utilizados.

Se utilizaron semillas de maíz híbrido Ixtap-CP-12, Pue-636, P. L. Las semillas fueron proporcionadas por el Jardín Botánico, B.U. A. P.

Se proporcionaron 10 mg de cada compuesto:

AH-B; 3β,16β-diacetoxi-*N*-bencilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (**37**)

AH-P; 3β,16β-diacetoxi-*N*-(3-hidroxi)propilpirrolo[2´,3´4,´5,:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (**38**)

AH-E; 3β,16β-diacetpxo-*N*-(2-hidroxi)etilpirrolo[2´,3´,4´,5´:22,23,24,25]27-norcolest-5-eno (**39a**)

A continuación se presentan las estructuras de los compuestos a evaluar así como de la epibrasinólida.

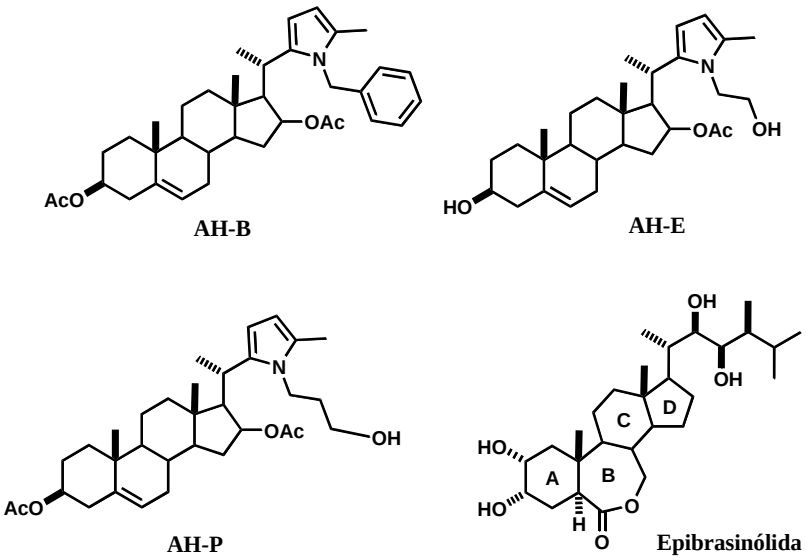


Figura 63. Estructuras de los compuestos empleados para la técnica de las muñecas.

Se evaluó la actividad promotora de los compuestos **AH-B**, **AH-P** y **AH-E**, con la técnica de las muñecas a nivel laboratorio, ya que es una prueba eficaz y muy confiable.

Diseño experimental y diagrama de flujo.

El trabajo de investigación consistió en lo siguiente;

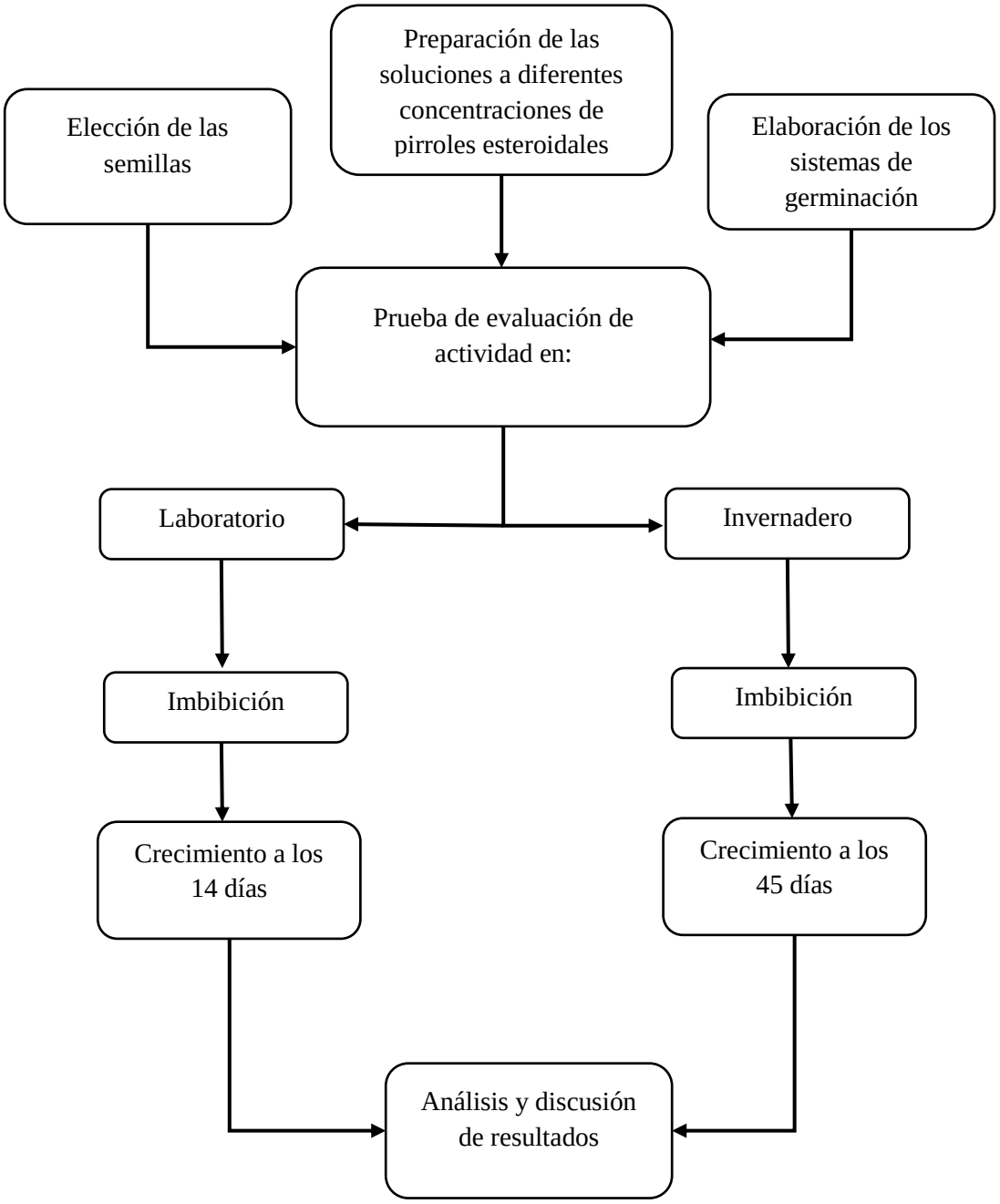
1) Primera etapa: prueba en laboratorio.

1) La prueba en laboratorio se realizó con un proceso de 14 días de germinación, el diseño experimental fue; 2 concentraciones, un control, tres repeticiones de 5 semillas, dando un total de 105 semillas.

   Los compuestos AH-B, AH-P, AH-E, se emplearon en dos concentraciones de 1 mg/L y 0.1 mg/L. El control fue acetona acuosa al 2%.

2) Segunda etapa: prueba en invernadero.

2) La prueba en invernadero se llevó a cabo con un proceso de 45 días de germinación, el diseño experimental fue; una concentración, tres tratamientos, un control, tres repeticiones con tres réplicas de dos semillas, con un total de 360 semillas. Las semillas embebidas con AH-B fueron evaluadas a 90% y 40% de humedad, empleando la concentración de 0.1 mg/mL. El control fue epibrasinólida y agua.



1

Figura 66. Diagrama de flujo de las pruebas en laboratorio e invernadero.

Método.

Previo a la evaluación de las semillas en laboratorio y en invernadero se realizaron los siguientes pasos.

Selección de semillas.

Se pesaron 500 g de semillas, posteriormente se extienden sobre una superficie lisa y limpia para separar los granos buenos de los dañados; es decir, separar aquellas semillas que presentan otras coloraciones o que contengan materia extraña como insectos, pilos de mazorca, etc., (**ver apéndice 1**).

Solubilidad de los compuestos a evaluar.

Con el fin de preparar soluciones acuosas, fue necesario evaluar la solubilidad de los compuestos con diferentes disolventes, encontrándose lo siguiente; Tabla A.

Tabla A.

Disolvente	AH-B	AH-P	AH-E
Agua	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Acetona	Soluble	Soluble	Soluble
Metanol	Soluble	Soluble	Soluble
Etanol	Soluble	Soluble	Soluble
DMSO	Soluble	Soluble	Soluble

Como se puede observar en la **tabla A**, los compuestos son insolubles en agua, por lo tanto, se utilizó acetona como disolvente óptimo para disolver los compuestos e incrementar su solubilidad en agua. Posteriormente se prepararon soluciones de los tres compuestos a evaluar, tomando como solución stock la de 10 mg/L de cada compuesto y consecutivamente se prepararon las diluciones en serie de estos al 10%, hasta obtener concentraciones de; 1 mg/L y 0.1 mg/L, que son las que constituyen los tratamientos, (**ver apéndice 2**)

Preparación de los sistemas de germinación.

Dado que el sustrato tiene la función de proveer humedad constante y sostén a las semillas, se empleó como sustrato hojas de papel filtro y la técnica de germinación fue la técnica de las muñecas que consiste en adherir las semillas entre papel filtro, de tal manera que estas contengan humedad constante y se pueda evaluar la raíz principal y la plúmula, (**ver apéndice 3**).

Desinfección e imbibición de las semillas.

Una vez seleccionadas las semillas, se sumergieron en la solución de hipoclorito de sodio al 33%, con el propósito de prevenir o en dado caso disminuir la aparición de infección micótica. Posterior a la desinfección, se llevó a cabo la imbibición en vasos de plástico de 100 mL. Cada vaso contiene 30 ml de las concentraciones previamente preparadas y se llevaron a la cámara de germinación. El tiempo de imbibición comenzó con el lavado en hipoclorito de sodio hasta transcurrir 5 horas a nivel laboratorio y 8 horas a nivel invernadero, a una temperatura de 26 °C, con humedad controlada. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se sacaron de la cámara de germinación y se procedió a colocarlas en los sistemas de germinación correspondientes al experimento en laboratorio o invernadero, (**ver apéndice 4, 5 y 3a**).

Etapa 1: Prueba de laboratorio.

Evaluación de las plántulas a los 14 días de germinación.

Una vez transcurridos los 14 días, las muestras se retiraron de la cámara de germinación y tanto las plúmulas como las raíces se colocaron en bolsas de papel. Posteriormente se metieron en una estufa por 48 horas a 60 °C, y al final se registró el peso seco de la parte aérea y de la raíz.

Por último, se procedió a organizar los resultados para su análisis.

Las plantas se cultivaron a 26 °C en una cámara de crecimiento hasta cumplir 14 días, (**ver apéndice 6**).

Discusión de resultados; Evaluación de los efectos de los pirroloesteroides en el crecimiento de las plántulas de maíz.

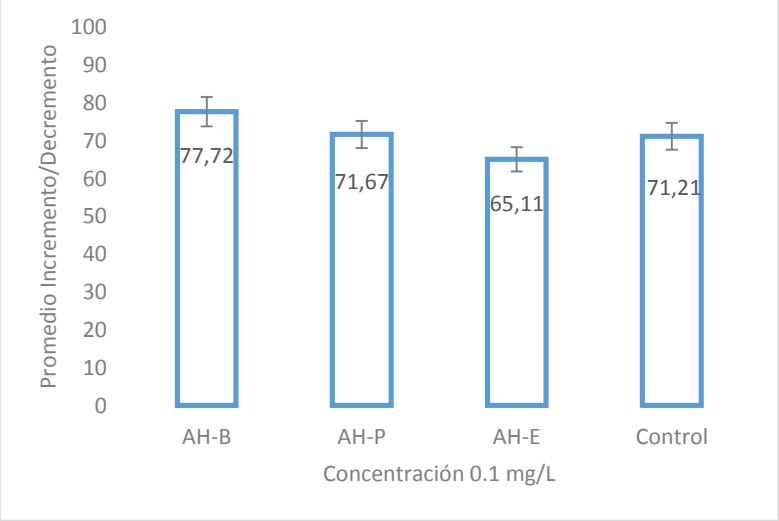
Dado la importancia de los brasinoesteroides en el desarrollo de las plantas, se estudió el efecto que causan los pirroloesteroides sobre el crecimiento de las plantas en semillas de maíz.

En la siguiente tabla, se presentan los resultados de los promedios de biomasa seca de las plúmulas a los 14 días.

Compuesto		Promedio
AH-B		77.72
AH-P		71.67
AH-E		65.11
Control		71.21

En el **gráfico 1** se observa que a la concentración de 0.1 mg/L el compuesto **AH-B** produce un ligero incremento de biomasa respecto al control, ya que AH-P tiene el mismo comportamiento que el control. Mientras que en los resultados de peso seco de la raíces, los resultados no fueron tan visibles como el de las plúmulas.

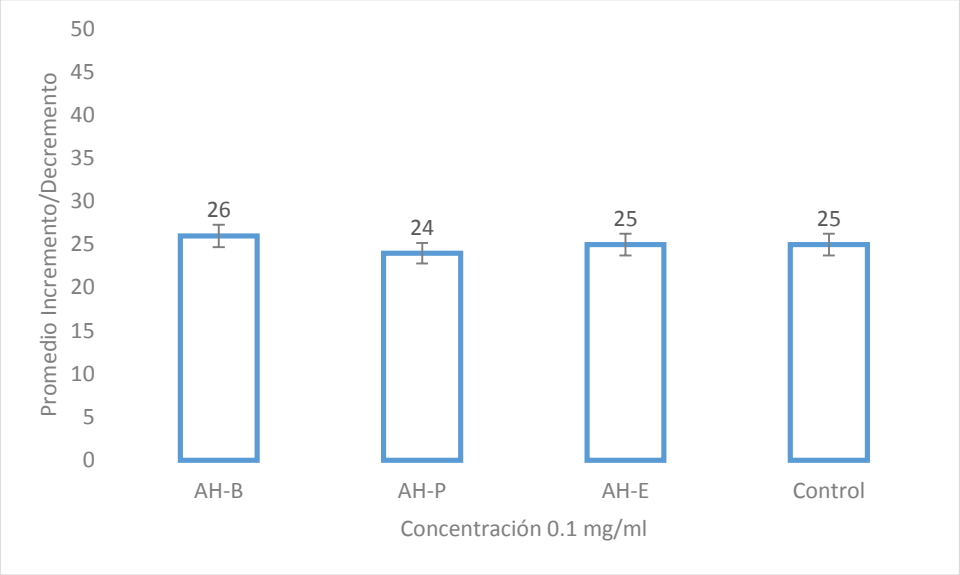
Los efectos de los pirroloesteroides sobre el peso seco de las plúmulas evidenciaron que a concentración de 1 mg/L fueron negativas ya que promovieron la muerte de las plántulas a los 7 días.



Gráfica 1. Evaluación de tres pirroloesteroides en la biomasa seca de plántulas de maíz a los 14 días. (n= 105, Intervalos de confianza a p<0,05).

Los resultados del primer ensayo demostraron que el compuesto **AH-B** tiene efecto positivo en el crecimiento de la planta, expresado como biomasa seca, en comparación con el control (agua).

En el **gráfico 2** se observan los incrementos de longitud de la plúmula a la concentración de 0.1 mg/L. Donde el compuesto AH-B tiene ligeramente mejor desarrollo de la parte aérea, sin embargo, los resultados no indican una gran diferencia respecto al control.



Gráfica 2. Evaluación de tres pirroloesteroides en longitud de las plántulas de maíz a 14 días. (n= 105, Intervalos de confianza a p<0,05).

De acuerdo a los resultados mostrados de los gráficos 1 y 2, se considera que debe hacerse la evaluación del compuesto **AH-B** a la concentración de 0.1 mg/mL en condiciones de invernadero, ya que a concentraciones elevadas (1 mg/L) se observa un efecto tóxico

Etapa 2; Prueba de invernadero.

Evaluación de las plántulas a los 45 días.

En esta etapa las semillas se trataron al igual que en la etapa 1, con la diferencia de que las semillas se sometieron a imbibición durante 8 h. Los compuestos evaluados fueron para AH-B y epibrasinólida, teniendo como control las semillas embebidas únicamente con agua.

Sistemas de germinación.

Una vez desinfectadas las semillas, se procedió a la siembra en macetas con diámetro de 26 cm enterrando las semillas a una profundidad de 3 cm, utilizando un sustrato óptimo para retener la humedad y a la vez permeable. Dicho sustrato consistió, en 30% arena, 30% cacahuatillo, 20% composta y 20% peat moss.

Riego.

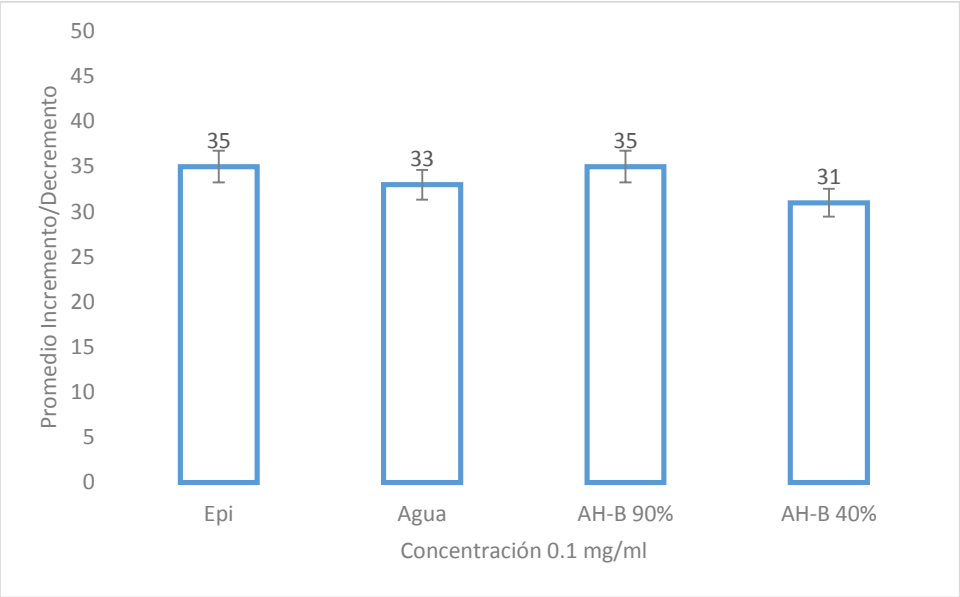
El riego fue determinado de tal manera que se controlara la humedad de cada maceta y tratamiento, aplicando (500 mL) de agua a cada maceta, cada tercer día o según se requiera para mantener el 90% y 40% de humedad.

Una vez transcurridos los 45 días, se mide la parte aérea de cada plántula y subsecuentemente las muestras se extraen de las macetas para limpiar las raíces y se divide la parte aérea de la raíz para su posterior deshidratación, en una estufa por 5 días a 60 °C. Por último se registró el peso de parte aérea y raíz.

Discusión de resultados; Evaluación de los efectos del pirroloesteroide en el crecimiento de las plántulas de maíz.

De acuerdo a nuestro diagrama de flujo se obtuvieron los siguientes resultados de la prueba en invernadero.

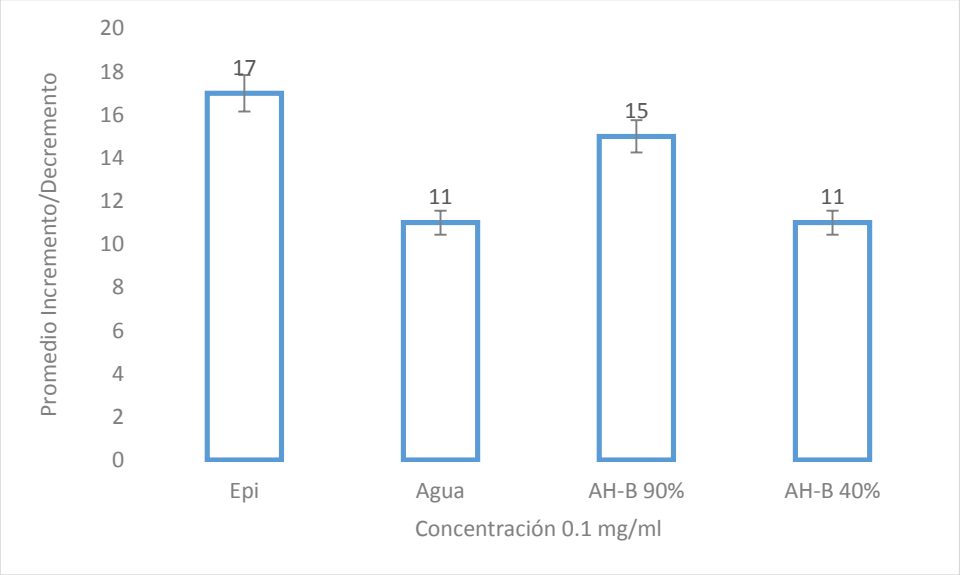
En el gráfico 3 se observa un ligero incremento de longitud de la plúmula de epibrasinólida y AH-B (90%) respecto de Agua y AH-B (40%). Esto indica que el compuesto AH-B (90%) tiene efecto similar a la epibrasinólida cuando se emplean a una concentración de 0.1 mg/mL.



Gráfica 3. Evaluación de dos compuestos de la longitud de la plúmula a los 45 días. (n= 360, Intervalos de confianza a p<0,05).

Posterior a la deshidratación de las plántulas, estas se pesaron y se registró el peso seco, encontrándose lo siguiente;

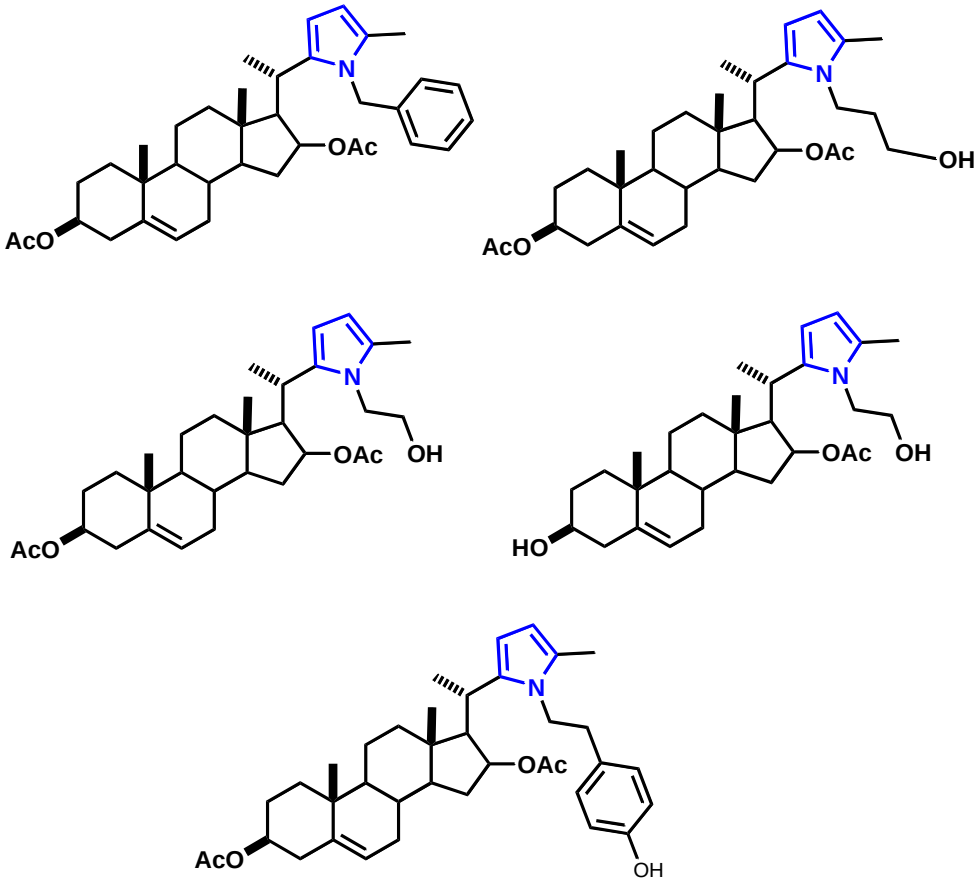
A los 45 días, AH-B (90%) el efecto en biomasa presenta un valor cercano a epibrasinólida, pero las plantas con AH-B (40%) el peso seco es muy similar al control (Agua). Esto puede deberse a que, el compuesto AH-B proporciona estabilidad ante el estrés hídrico.



Gráfica 4. Evaluación de dos compuestos en la biomasa seca de las plántulas de maíz a los 45 días. (n= 360, Intervalos de confianza a p<0,05).

Conclusiones

- Se establecieron las condiciones óptimas de reacción para realizar la síntesis de cinco pirroloesteroides.



- Los productos presentados en este trabajo se obtuvieron con rendimientos moderados que van de 40% a 50% y se caracterizaron por las distintas técnicas físicas (rotación óptica y punto de fusión) así como espectroscópicas (RMN 1 y 2 dimensiones, Espectrometría de masas e Infrarrojo), que nos permitieron corroborar las estructuras de los pirroloesteroides.

- Con dos nuevos pirroloesteroides se emprendió su evaluación por el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias BUAP en su actividad antifúngica y fueron activos ante varias cepas de *Candida sp*.

- El compuesto **AH-P** es considerado como un agente antimicrobiano, por presentar mayor actividad sobre nueve cepas diferentes de *Candida sp.* con excelentes rendimientos.

- Con la técnica de las muñecas se continúa estudiando al pirroloesteroide **AH-B**.

- Mejor desarrollo de la plántula es empleando una concentración de 0.1 mg/L del pirroloesteroide **AH-B**.

Apéndices

A.1 Toma de muestra y pureza de semilla.

Deben tomarse cantidades iguales de semillas de arriba, de en medio y de abajo del costal.

Se consideran semillas puras las pertenecientes a la especie analizada.

A.2 Preparación de las soluciones de pirroles esteroidales.

Solución de acetona; para el control, se diluyó 2 mL de acetona en agua destilada aforando a 100 mL.

Solución stock (10 mg/L); se disolvió 1 mg de cada compuesto en 2 mL de solución de acetona y se aforó en 100 mL de agua destilada.

Disoluciones seriadas al 10%; se tomó una alícuota de 10 mL de solución stock y se aforó en 100 mL de agua destilada para obtener la dilución de 1 mg/L, se repitió el mismo procedimiento hasta obtener una dilución de 0.1 mg/L.

Solución de hipoclorito de sodio (NaClO); se preparó una disolución de hipoclorito de sodio comercial a 33% en agua destilada.

A.3 Elaboración de los sistemas de germinación a nivel laboratorio.

Los sistemas de germinación empleados se elaboraron a partir de hojas de papel filtro medida 50 x 25 cm. En el eje de 50 cm se marcaron 16 líneas paralelas con intervalos de 3 cm de línea en línea. En cada intervalo de 3 cm se marcaron líneas horizontales de 2.5 cm a partir del segundo segmento, con un total de 7 segmentos, con ayuda de una regla se dobló el papel filtro (**ver figura a**).

Como podemos observar tenemos un acordeón y en los siete segmentos se pegaron las semillas empleando adhesivo, cinta de doble capa Scotch, en donde la testa de cada semilla quedó hacia arriba y la pirroliza hacia abajo.

Figura a. Sistemas de germinación.

Para ello, las hojas se segmentaron y doblaron a modo de formar un acordeón. Cada grupo de 15 semillas se dividió en 3 y se colocaron en acordeones, cada uno contenía 5 semillas de maíz.

Para el soporte y crecimiento unidireccional de las plántulas, cada acordeón se compactó y se introdujeron en los tubos de PVC de 25 cm de largo por 6 de diámetro. Luego los tubos de PVC se insertaron en vasos colectores de plástico con agua destilada 80 mL cada uno, (**ver figura b**).

Por último, las muestras se llevaron a la cámara de germinación, permaneciendo 14 días a temperatura de 26 °C.

Figura b. Acordeones en tubos de PVC.

A.3a Elaboración de los sistemas de germinación a nivel invernadero.

Las macetas empleadas tuvieron las siguientes características;

26 cm de diámetro superior

17 cm de diámetro inferior

21 cm de altura

Se emplearon macetas de 21 cm de altura. Cada maceta contenía; 30% de cacahuatillo, 30% de arena, 20% de composta y 20% de peat moss. El sustrato es adecuado para retener la humedad y el área es óptima para el desarrollo de la planta. Además se utilizó un medidor de humedad.

Como podemos observar tenemos macetas con sustrato y en cada maceta se sembraron dos semillas ya embebidas respectivamente, (**ver figura c**).

Figura c. Sistemas de germinación.

Riegos.

Los riegos se llevaron a cabo cada tercer día, controlando la humedad (90% y 40% de humedad). Al aplicar el riego fuer con las mismas proporciones a cada maceta.

A.4 Desinfección de semillas.

Para llevar a cabo la técnica de las muñecas, es necesario realizar la prueba de flotación, a través de la desinfección de semillas, con la finalidad de evaluar la viabilidad de cada semilla, pues si durante la prueba la semilla flota, es probable que no germine.

El objetivo de desinfección de las semillas es para eliminar materia extraña presente ya sea pilos de la mazorca, insectos, etc. Así como disminuir la presencia de cualquier tipo de hongos en la prueba de germinación.

Procedimiento:

1. Se colocaron 15 semillas en tubos de PVC (10 cm de largo por 3 cm de diámetro).
2. Cada tubo es sumergido en solución de NaClO al 33% durante 15 segundos, de inmediato se retiran de la solución y se mantienen al aire libre por 15 segundos.

3. Posteriormente se realiza la prueba de imbibición en la cámara de germinación.

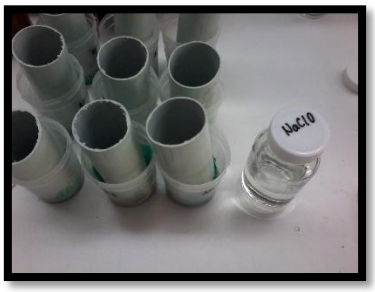


Figura d. Desinfección de las semillas.

A.5 Imbibición de semillas en soluciones de AH-P, AH-B, AH-E, Control.

Una vez desinfectadas las semillas, se procedió a embeberlas en las concentraciones indicadas para cada tubo. Las concentraciones utilizadas son las siguientes; 0.1 mg/L, 0.01 mg/L, 0.001 mg/L y se introdujeron en la cámara de germinación. A partir de éste paso comenzó la imbibición y se concluyó al trascurrir 5 horas a una temperatura controlada de 26 °C. Posteriormente las semillas se sacaron de la cámara de germinación y se colocaron en los sistemas de germinación.

Para la prueba en invernadero, se emplearon concentraciones de 0.1 mg/mL y se introdujeron en la cámara de germinación y se sacaron al concluir 8 horas a una temperatura controlada de 26 °C para sembrarlas en las macetas a 3 cm de profundidad.

Figura d. Solución stock y disoluciones.

A.6 Porcentaje de semillas viables; germinadas y no germinadas.

Para determinar el porcentaje de semillas germinadas y no germinadas, se registra el número de plántulas normales y semillas muertas, duras o en estado de latencia. Al término de la prueba de germinación se determinan las semillas no germinadas.

- Semillas en latencia; son aquellas semillas viables (diferentes de las semillas duras) que no germinan aun cuando estén en condiciones adecuadas.
- Semillas duras; son aquellas semillas que permanecen duras al final de la prueba de germinación, pues no absorben agua por que poseen una cubierta impermeable.
- Semillas muertas; son aquellas semillas que no germinan y no se consideran como latentes o duras.

En las siguientes tabla y gráfica se muestra el porcentaje de semillas germinadas y no germinadas.

Tabla 1. Porcentaje total de semillas germinadas y no germinadas a 26° C.

Semillas	Compuesto AH-B	Compuesto AH-P	Compuesto AH-E	Control	Germinadas	No germinadas	Porcentaje
Germinadas	30	29	28	13	100		**95.23%**
No germinadas	0	1	2	2		5	**4.76%**

A.7 Análisis y evaluación de las plántulas.

Una vez transcurrido los 14 días, se procedió a la evaluación cuantitativa de las plántulas, separándolas del papel filtro.

Se desprendió el hipocótilo del embrión de las semillas, empleando un bisturí para separar las raíces de la plúmula.

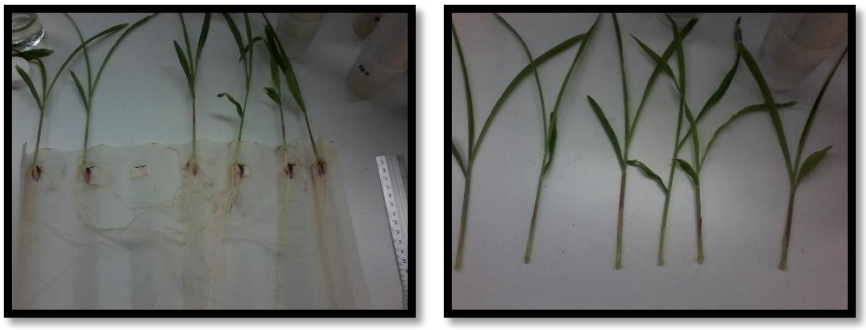


Figura e. Plántulas a los 14 días.

Las plúmulas y raíces se midieron su longitud y se metieron en bolsas de papel para deshidratarlas en la estufa de convección natural de aire caliente a 60 °C por 48 horas.

Al término del secado se pesaron tanto la raíz como la plúmula y se registró el peso seco.

Figura f. Plántulas en deshidratación.

Las plántulas se retiraron de la estufa convencional y se pesaron, registrando, posteriormente el peso seco total de las plántulas.

A.8 Análisis y evaluación de las plántulas en invernadero

Transcurrido los 45 días, se llevó a cabo una evaluación cuantitativa de las plántulas, extrayéndolas de los sistemas de germinación, desprendiendo la plántula del sustrato.

Las plántulas se envolvieron en bolsas de papel para su secado en la estufa de convección natural de aire caliente a 60 °C por 5 días.

Al término del secado se pesaron y se registró el peso seco.

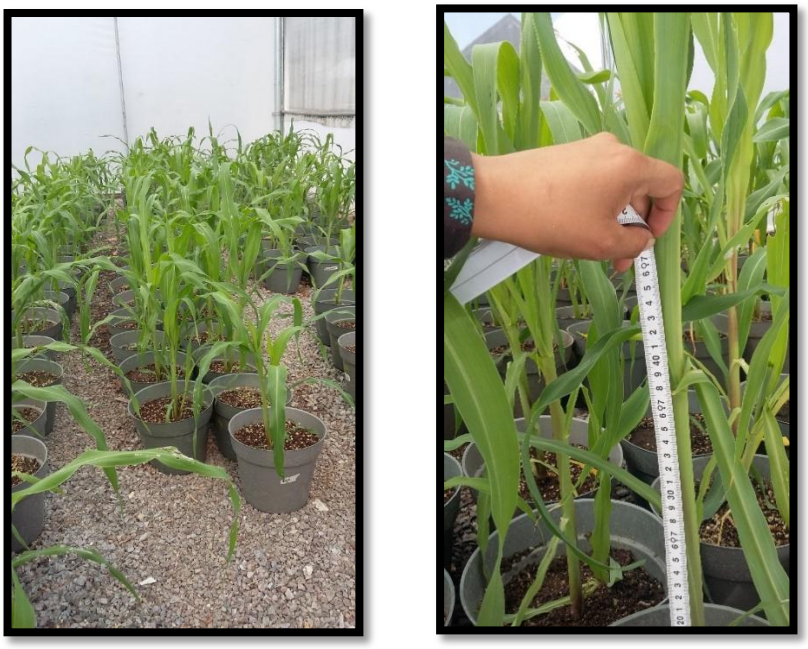


Figura g. Plántulas a los 45 días.

Figura h. Peso seco de la planta a los 45 días.

Referencias

[1] Zaitsev A. B.; Vasilt´sov A. M.; Shmidt E. Y.; Mikhaleva A. I.; Afonin A. V.; Il´icheva L. N. Trofimov. *Rus. J. Org. Chem***. 2003**, 39, 1406.

[2] Casar, Zdenko. *Curr. Org. Chem*. **2010**, 14, 816.

[3] Carbone, M.; Irace, C.; Costagliola, F.; Castelluccio, F.; Villani, G.; Calado, G.; Padula, V.; Cimino, G.; Cervera, J. L.; Santamaria, R.; Gavagnin, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2010**, *20*, 2668.

[4] Alois F. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2003**, *42*, 3582.

[5] Morrissey, J. P.; Osbourn, A. E. *Am. Soc. Microbiol.***1999**, *63*, 708.

[6] Dumbacher, J. P.; Spande, T. F.; Daly, J. W. *PNAS*, **2000**, *97*, 12970.

[7] Marino, S.; Iorizzi, M.; Zollo, F.; Roussakis, C.; Debitus, C. *Eur. J. Org. Chem*. **1997**, *3*, 697.

[8] Ridley, C. P.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1536.

[9] Abbat, S.; Dhaked, D.; Arfeen, M.; Bharatam, P. V. *RSC. Adv*. **2015**, *5*, 88353.

[10] Kim, B. H.; Bae, S.; Go, A.; Lee, H.; Gonga, C.; Lee. B. M. *Org. Biomel. Chem*. **2016**, *14*, 265.

[11] Krzeszewski, M.; Thorsted, B.; Brewer, J.; Gryko, D. T. *J. Org. Chem*. **2014**, *79*, 3119.

[12] Minetto G.; Raveglia, L. F.; Taddei, M. *Org. Lett*. **2004**, *6*, 389.

[13] Huepalcalco Guevara Anallely, Tesis de Lic. 2014.

[14] Fernández, M. A.; López, H.; Hernández, J. M. V.; López, M.; Escobar, M. L.; Sánchez, L.; Pinto, B. M.; Sandoval, J. *Bioorg. Med. Chem*. **2010**, *18*, 2474.

[15] Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem*. **1978**, *14*, 2923.

[16] Perrin, D. P.; Amarego, W. D. F. *Purification of Laboratory Chemicals.* Fourth Edition; Pergamon Press: Oxford, 1988.

[17] Cruz, L. A. F.; Salazar, J. A. G.; Flores, J. S. M.; Soto, F. P. *ASyD*, **2014**, *11*, 223

[18] Rojas, K. G.; Salazar, J. A. G.; Gardea, J. A. M.; Saldaña, T. M. *Agrociencia*, **2011**, *45*, 733.

[19] Fundamentos de fisiología vegetal, J. Azcón Bieto; M. Talón., 2ª edición, pag. 349-360.

[20] Zimmerman, P. W.; *J. Chem. Educ*. **1951**, *28*, 113.

[21] Wei, Z.; Li, J. *Mol. Plant*.**2016**, *9*, 86

[22] McMorris, T. C.; Donaubauer, J. R.; Silveira, M. H.; Molinski, T. F. **1991**, *J. Am. Chem. Soc. 4*, 36.

[23] Díaz, Z. R.; Martínez, H. J. C.; Acosta, R. M.; Ramírez, S. J.; Herrera, F. M. A.; *Steroids*, **2015**, *98*, 126.