



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA.**

Facultad de Ciencias Químicas-Instituto de Ciencias.

Maestría en Ciencias Químicas.

Síntesis de nuevas fitohormonas colestánicas.

Tesis presentada para obtener el grado de: Maestra en Ciencias Químicas,

en el área de Química Orgánica

Presenta

Q. Bertha Fuentes Portillo

Director de tesis: Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Codirector: Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes

Mayo de 2017

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y la codirección del Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes.

Para el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo del al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el otorgamiento de una beca de nivel Maestría (número de registro 573633).

Aspectos relevantes de este trabajo fueron presentados en:

- 2016. XXI Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla.
- 2016. 12a Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Guanajuato.
- 2016. Foro de investigación multidisciplinaria sobre la biodiversidad: del laboratorio, al campo y la industria. Puebla.
- 2015. XX Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO I. Síntesis de nuevas fitohormonas colestánicas	
ANTECEDENTES.....	10
Brasinoesteroides	11
Marcadores de fluorescencia	14
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Equipos y técnicas utilizadas.....	18
Formación del 3,16-diacetato de (25 <i>R</i>)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (2).	19
Formación del 3,16-diacetato 26-indolacetato de (25 <i>R</i>)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -26- triilo (3).....	20
Formación del acetato de (25 <i>R</i>)-3 β ,26-dihidroxi-22-oxocolest-5-eno-16 β -ilo (36).....	21
Formación del 16-acetato 3,26-diindolacetato de (25 <i>R</i>)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26- triilo (4) y del 16-acetato 26-indolacetato de (25 <i>R</i>)-3 β -hidroxi-22-oxocolest-5-eno- 16 β ,26-diilo (5).....	22
Formación del 3,16-diacetato 26-benzoato de (25 <i>R</i>)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26- triilo (6).....	24
Formación del ácido β -naftoxiacético (38).....	25
Formación del 3,16-diacetato 26-naftoxiacetato de (25 <i>R</i>)-22-oxocolest-5-eno- 3 β ,16 β ,26-triilo (9).....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	56

CAPÍTULO II. Síntesis de lactonas bisnorcolánicas a partir de estructuras 22-oxocolestánicas.

ANTECEDENTES.....	56
Lactonas bisnorcolánicas	56
Importancia de las lactonas y su fuente de obtención.....	56
Formación de lactonas bisnorcolánicas.....	59
OBJETIVOS	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	¡Error! Marcador no definido. 1
Equipos y técnicas utilizadas.....	61
Formación del 3,16-diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (2).....	65
Formación del 3,16-diacetato-26-tosilato de (25R)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26-triilo (29).....	66
Formación del 3,16-diacetato de (25R)-22-oxo-26-yodocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (30).....	67
Formación del 3,16-diacetato de (25R)-22,26-epoxicolesta-5,22-dieno-3 β , 16 β -diilo (61)	68
Formación del 3,16-diacetato de (25R)-26-bromo-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (62)	69
Metodo general para la formación de (20R)-3 β -acetoxi-5-eno-pregnan-20,16 β -carbolactona . bajo la acción de Cs ₂ CO ₃ (11).....	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
CONCLUSIONES.....	97

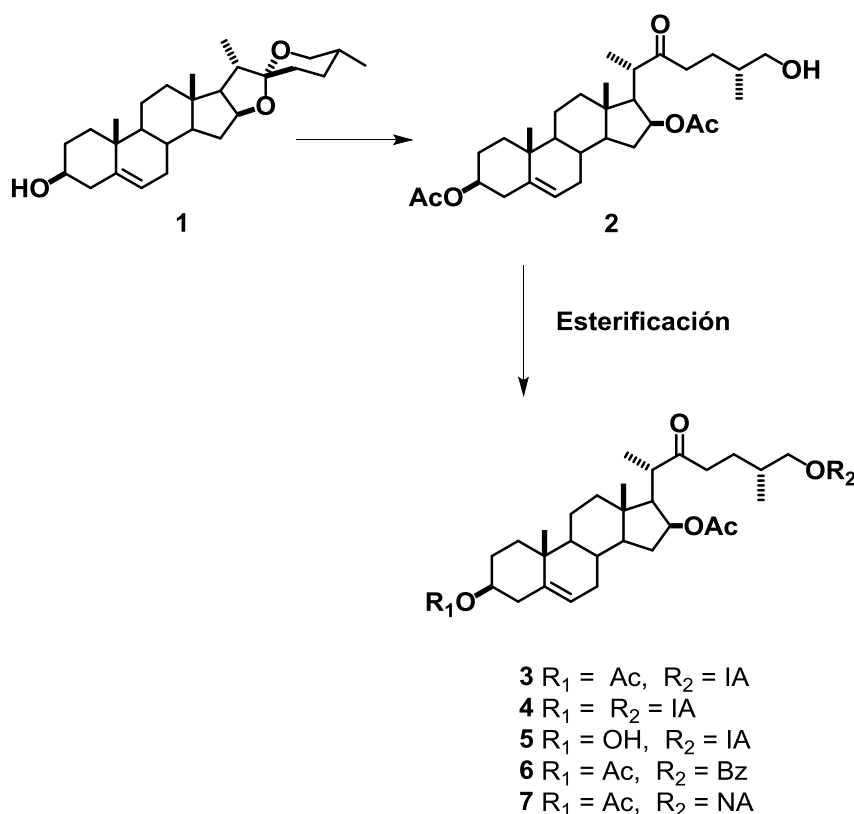
ABREVIATURAS

[α]_D	Rotación Óptica
δ	Desplazamiento químico en RMN.
AIA	Ácido 3-indolacético
ax	Axial
BRs	Brasinoesteroides
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	<i>CO</i> rrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
DMAP	4-(dimetilamino) piridina
DMF	Dimetilformamida
ec	Ecuatorial
HB	Homobrasinólida
HSQC	<i>H</i> eteronuclear <i>S</i> imple <i>Q</i> uantum <i>C</i> orrelation
HMBC	<i>H</i> eteronuclear <i>M</i> ultiple <i>B</i> ond <i>C</i> orrelation
Hz	Hertzios
IR	Infrarrojo.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento en RMN
LBCs	Lactonas Bisnorcolánicas
NOA	Ácido β -naftoxicético
ppm	Partes por millón
<i>p</i>-TsCl	Cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo
Py	Piridina
p.f.	Punto de Fusión
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de protón.
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13.
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

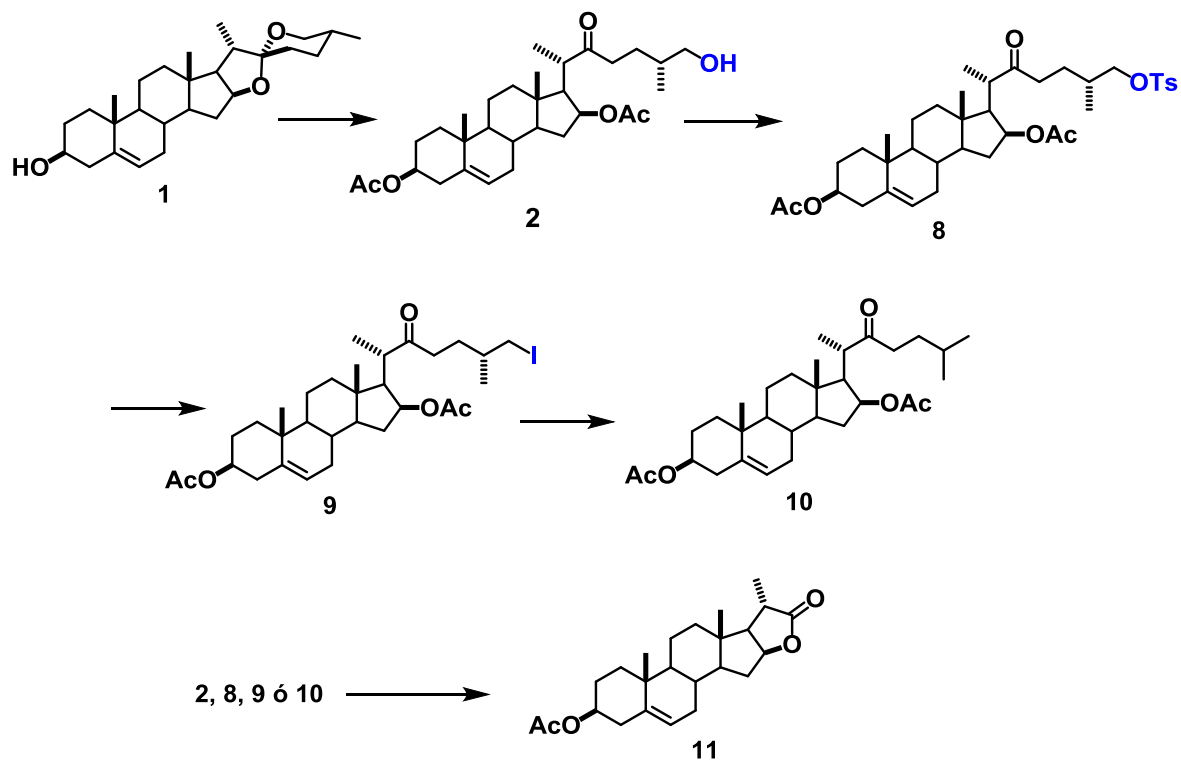
Este trabajo de tesis se enfocó en la síntesis de estructuras 22-oxocolestánicas. En el primer capítulo se aborda la síntesis de promotores de crecimiento vegetal a partir de la sapogenina diosgenina (**2**) y en el segundo la preparación de lactonas bisnorcolánicas.

Con respecto a la primera parte, los promotores de crecimiento vegetal obtenidos contienen estructuras fluorescentes: grupo benzoilo (Bz), β -naftoxiacetilo (NA) o 3-indolacetilo (IA), sobre la posición C-26 de la cadena lateral esteroidal. Las reacciones de esterificación son resumidas a continuación:



Como resultado de este trabajo se sintetizaron los compuestos **3-7** y su actividad como promotores de crecimiento vegetal se evaluó en plantas de cebolla. Para evaluar la actividad fluorescente de los grupos Bz, IA y NA se emplearon tejidos carentes de clorofila, para determinar cuál de los grupos anteriores facilitan un análisis en la ubicación de los promotores de crecimiento. Es importante hacer énfasis en que las plantas que fueron tratadas con los compuestos **3-7**, mostraron una mayor proliferación de raíces y tallo en comparación con las plantas no tratadas.

Por otra parte, en el capítulo II se describe el uso de las estructuras 22-oxocolestánicas como materia prima en la formación de LBCs, a través de una nueva metodología en medio básico, a alta temperatura. Estas condiciones de reacción condujeron a la fisión inusual del enlace entre C-22/C-23 para obtener el compuesto **11**. El esquema de síntesis se presenta a continuación:

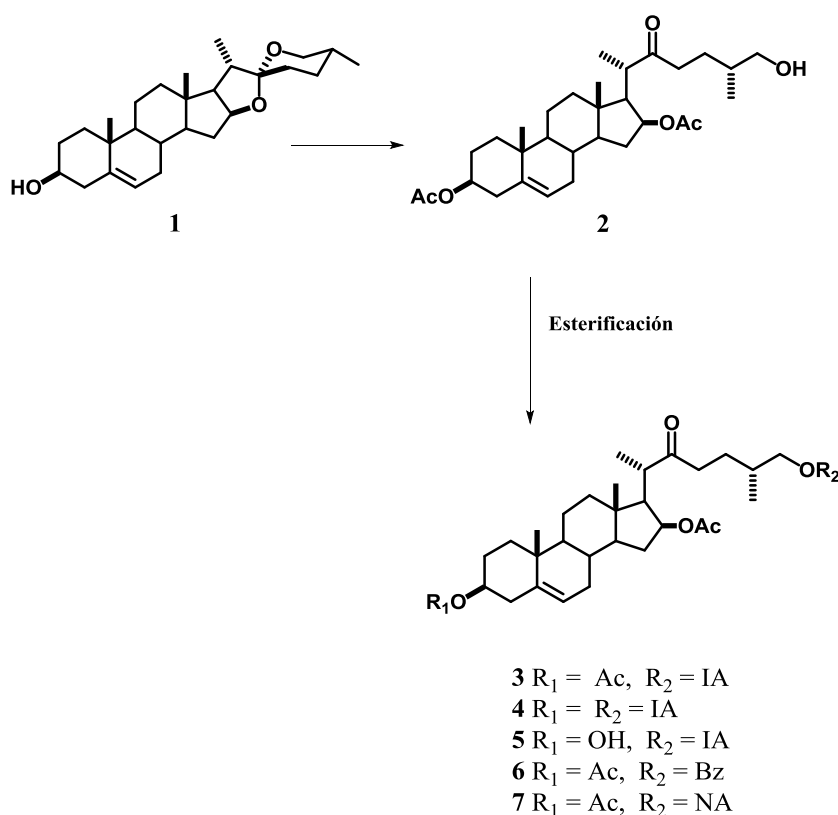


Palabras clave: Compuestos 22-oxocolestánicos. Promotor de crecimiento vegetal. Fluorescencia. Lactona bisnorcolánica. Ruptura inusual del enlace C-22/C-23 colestánico.

ABSTRACT

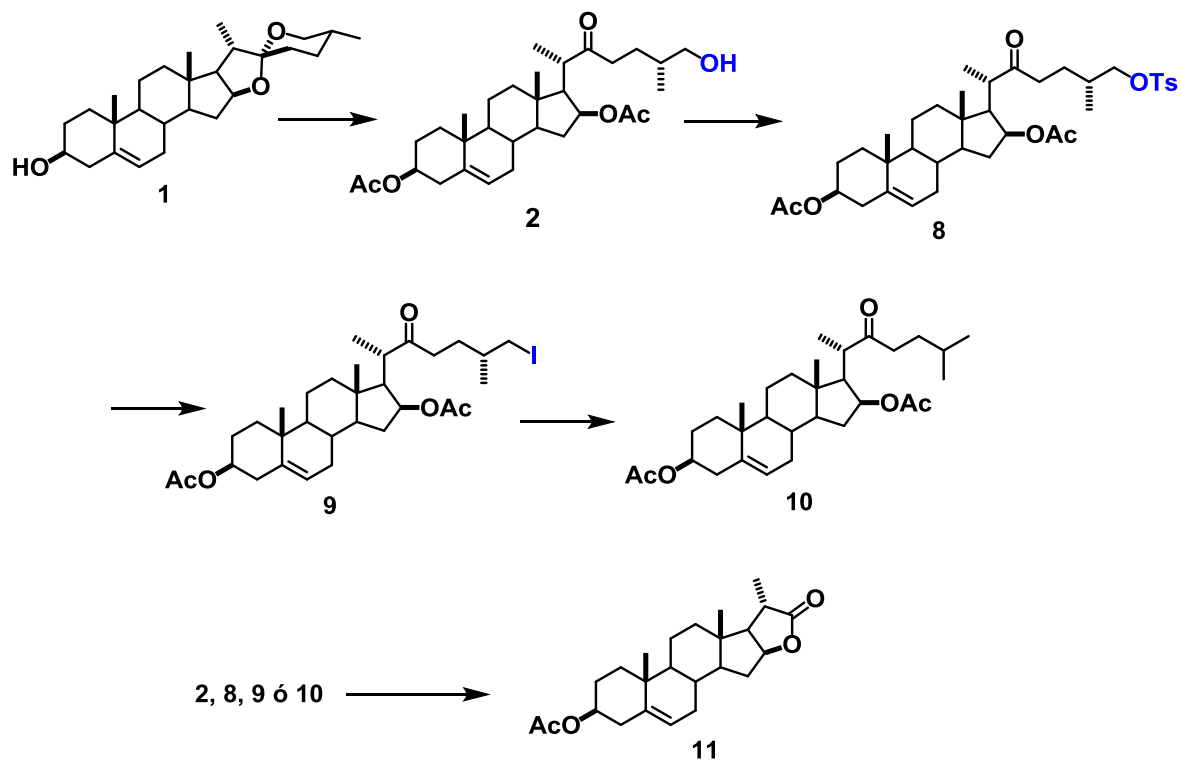
This thesis work focused on the synthesis of 22-oxocholestanic structures. The first chapter deals with the synthesis of plant growth promoters from the sapogenin diosgenin (**1**) and in the second the preparation of bisnorcholelanic lactones.

With respect to the first part, the plant growth promoters obtained contain fluorescent structures: benzoyl group (Bz), β -naphthoxyacetyl (NA) or 3-indoleacetyl (IA), on the C-26 position of the steroidal side chain. The esterification reactions are summarized below:



As a result of this work, compounds **3-7** were synthesized in good yield. All new 22-oxocholestanic derivatives were applied to onion plants to evaluate their effect as plant growth promoters. It is important to emphasize that a considerable proliferation of roots and stem (compared to untreated plants) was observed in all cases. Fluorescence analysis techniques were applied in tissues lacking Chlorophyll as well, in order to investigate the viability of the fluorophore as fluorescence marker.

On the other hand, Chapter II describes the transformation of 22-oxocolestane compounds into LBCs by the action of Cs_2CO_3 at high temperature. This novel methodology involves the unusual fission of the bond between C-22/C-23 to obtain compound **11** as described below:



Key words: 22-oxocolestane compounds. Plant growth promoter. Fluorescence. Bisnorcolanic lactone. Unusual rupture of the C-22/C-23 bond.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han sido estudiados desde la antigüedad debido a que presentan una diversidad de metabolitos secundarios de gran importancia. Por ello, importantes líneas de investigación han sido enfocadas sobre estructuras esteroidales.¹

Los esteroides son una familia de compuestos de diversa acción biológica, presentes en la naturaleza y forman parte esencial no solo en mamíferos sino también en plantas, hongos, levaduras, insectos y organismos marinos. Esta familia está caracterizada por poseer un núcleo derivado del ciclopenta[*a*]fenantreno (**12**), el cual está constituido por 3 anillos de 6 miembros y un anillo de cinco miembros, denominados A, B, C, D. Este núcleo se puede encontrar sustituido en las posiciones C-10 y C-13 por grupos metilo; en C-17 es frecuente encontrar una cadena lateral hidrocarbonada sustituida. La determinación de esta estructura se debe fundamentalmente al trabajo realizado por Windaus y Diels (Figura 1).² La numeración de **12** está dada por las reglas de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada).³

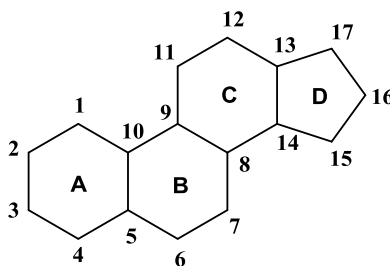


Figura 1. Esqueleto del ciclopenta[*a*]fenantreno en el cual se observa la distribución de los anillos A, B, C y D que lo conforman.

Numerosas sustancias han sido aisladas en la naturaleza que presentan el esqueleto del ciclopenta[*a*]fenantreno, ejemplos de estas sustancias son: esteroides, saponinas, ácidos biliares, corticosteroides, hormonas sexuales, brasinoesteroides, entre otros, los cuales poseen actividad tan diversa y específica (ver figura 2).⁴ Dentro de estos compuestos cabe destacar la importancia de las saponinas, las cuales se encuentran en un gran número de

plantas y están localizadas en diferentes partes como la raíz, tubérculos, corteza, semillas y frutos.⁵ Las saponinas están caracterizadas por presentar una estructura compleja anfifílica, la cual consiste en una parte hidrofóbica constituida por una aglicona esterooidal y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Estas saponinas al ser degradadas forman otros compuestos que son denominados sapogeninas esteroidales.

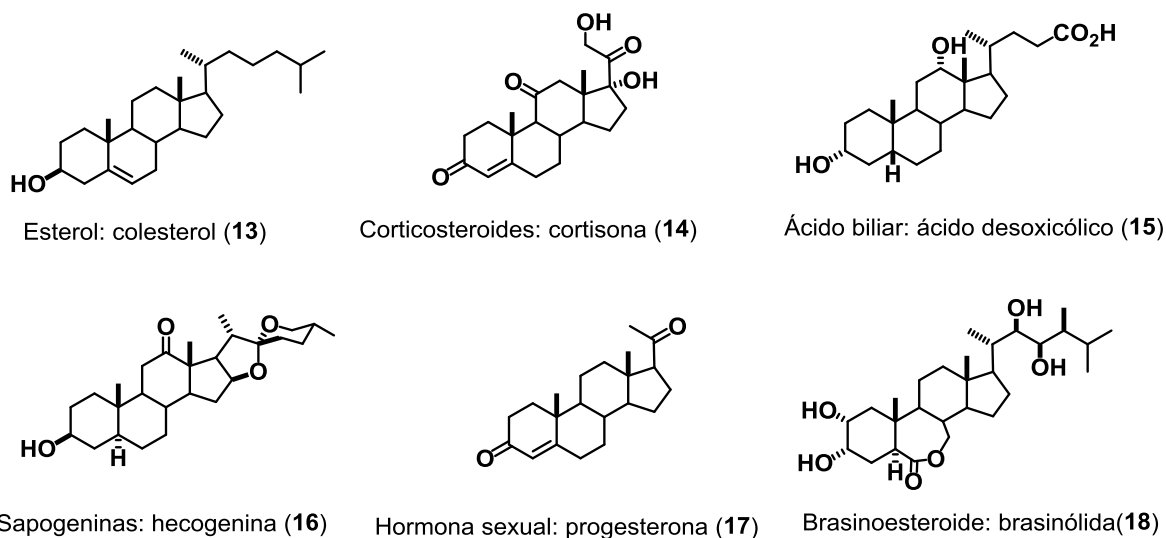


Figura 2. Ejemplos de compuestos que contienen en su estructura el esqueleto del ciclopenta[*a*]fenantreno.

Algunas especies de plantas, hongos y algunos animales⁶ producen cantidades apreciables de saponinas (en algunos casos se ha llegado a obtener hasta en un 10%, con respecto al peso seco del material), permitiendo realizar la preparación a gran escala de compuestos esteroidales con gran importancia biológica ampliando las perspectivas de su aplicación.⁷

En la actualidad se siguen realizando investigaciones sobre la transformación de sapogeninas para generar nuevas estructuras o nuevas vías de acceso a compuestos de interés químico/farmacológico, o para mejorar rendimientos de procesos ya conocidos. Entre los grupos de investigación que realizan transformaciones sobre la cadena lateral espiroestánica destaca nuestro grupo. Una de estas transformaciones está relacionada con la modificación del sistema espirocetálico^{8,9,10,11} de su cadena lateral; se han encontrado numerosas aplicaciones de estas transformaciones; sintetizando compuestos con un alto nivel

de acción biológica como promotores de crecimiento vegetal.¹² Por lo cual en el presente trabajo de tesis se retoma la transformación de los anillos E y F de la diosgenina con el objetivo de generar compuestos de interés químico y biológico.

CAPÍTULO I

Obtención de nuevas fitohormonas colestánicas

ANTECEDENTES

Las plantas poseen la habilidad de sintetizar una gran variedad de compuestos, los cuales regulan el desarrollo vegetal mediante diversos procesos fisiológicos,¹³ estas sustancias son denominadas fitohormonas u hormonas vegetales.

Las fitohormonas son producidas en prácticamente toda la planta interviniendo y regulando un gran número de procesos como la germinación, crecimiento celular, la producción de raíces secundarias, la floración, la formación del fruto, resistencia al estrés biótico y abiótico entre otras. Se conocen cinco tipos de familias de fitohormonas que se encuentran en la naturaleza las cuales son las auxinas (**19**), giberelinas (**20**), citoquininas (**21**), el ácido abscísico (**22**, ver figura 3) y otros compuestos, como el etileno, el ácido jasmónico (**23**).

Cada uno de estos compuestos producen diferentes efectos en la planta.¹⁴ Por mencionar algunos ejemplos: las auxinas se encuentran involucradas en el alargamiento celular, las citoquininas inducen la división celular y retardan el envejecimiento de las hojas, las giberelinas inducen la germinación de las semillas y la floración, el ácido abscísico induce la latencia de las semillas y el cierre de las estomas, el etileno es capaz de inducir la maduración de ciertos frutos.¹⁵

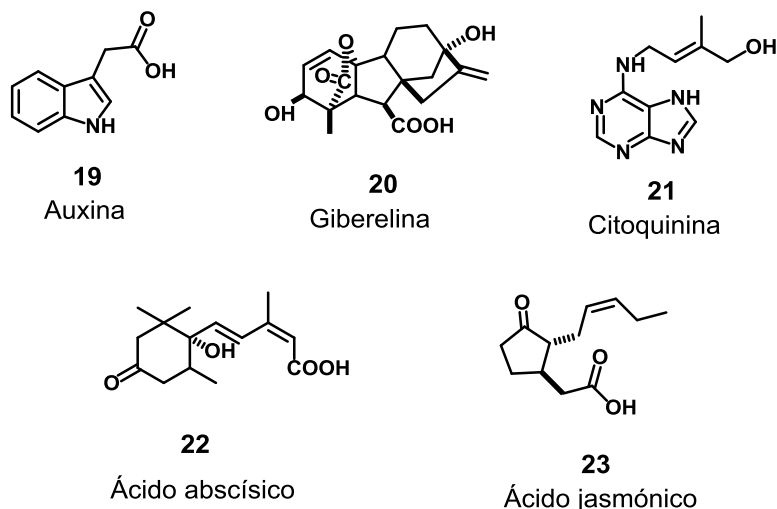


Figura 3. Estructuras básicas de diferentes fitohormonas y compuestos involucrados en el desarrollo de plantas.

En 1970 Mitchell y colaboradores aislaron un compuesto a partir del polen de *Brassica napus* L. observaron que favorecía la elongación en el tallo de frijol; sin embargo, su actividad era diferente a la de las giberelinas.¹⁶ Esta nueva sustancia que promovía el crecimiento se nombró brasinoesteroide y es catalogado como la sexta familia de hormonas vegetales; debido a que es un compuesto orgánico específico aislado de plantas y que induce el crecimiento vegetal aplicándolo en pequeñas cantidades sobre otras plantas.¹⁷

Brasinoesteroides

Los BRs se encuentran constituidos por una estructura química de tipo esteroidal constituida por 27, 28 o 29 átomos de carbono formando anillos (A, B, C y D) y una cadena lateral con diferentes sustituyentes. El anillo A, contiene generalmente en su estructura grupos hidroxilo en la posición C-2 α y C-3 α ; el anillo B puede ser un anillo de 7 miembros tipo 7-oxalactona como se muestra en la figura 4 o un anillo de 6 miembros con un grupo cetónico en la posición 6.¹⁸

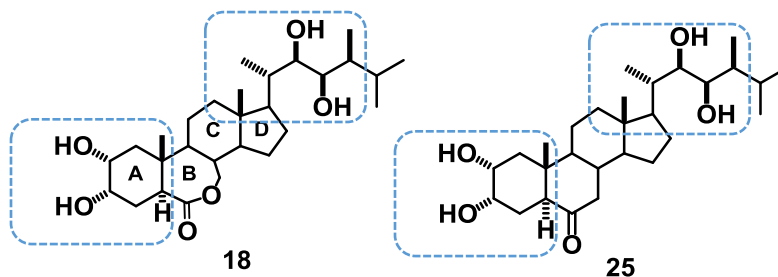


Figura 4. Estructura de la brasinólida y castasterona, fitohormonas de crecimiento.

Entre los principales brasinoesteroides con mayor actividad biológica que se han aislado, se encuentra la brasinólida⁹ (Figura 4, **18**) la cual tiene una participación elemental en los procesos de crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas en el medio ambiente.¹⁹

Posterior al descubrimiento de la brasinólida se han aislado aproximadamente 70 BRs de diferentes plantas,²⁰ los cuales presentan pequeñas variaciones tanto en el esqueleto como en la cadena lateral.²¹ Entre los compuestos frecuentemente encontrados está la castasterona, la 28-homobrasinólida, la 28-homocastasterona y 24-epibrasinólida (Figura 5).²²

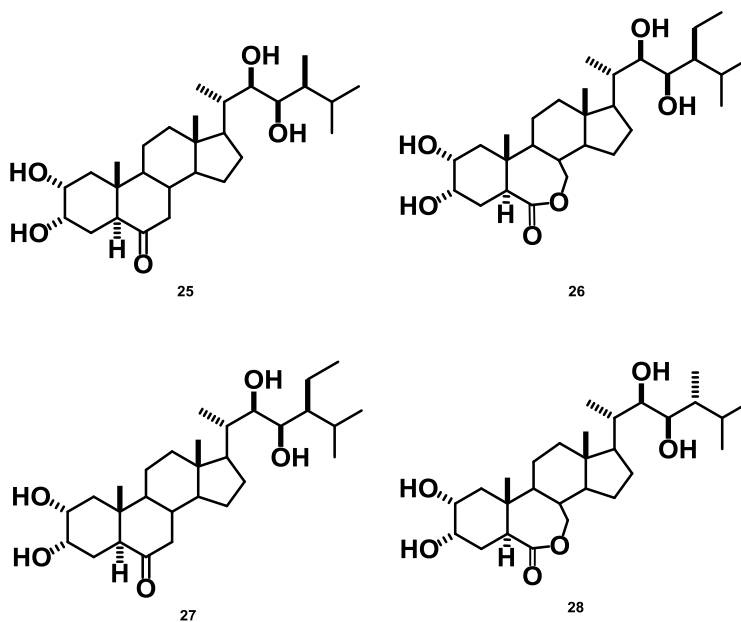


Figura 5. Ejemplos de algunos brasinoesteroides aislados de fuentes naturales castasterona (25), 28-homobrasinólida (26), 28-homocasterona (27) y 24-epibrasinólida (28).

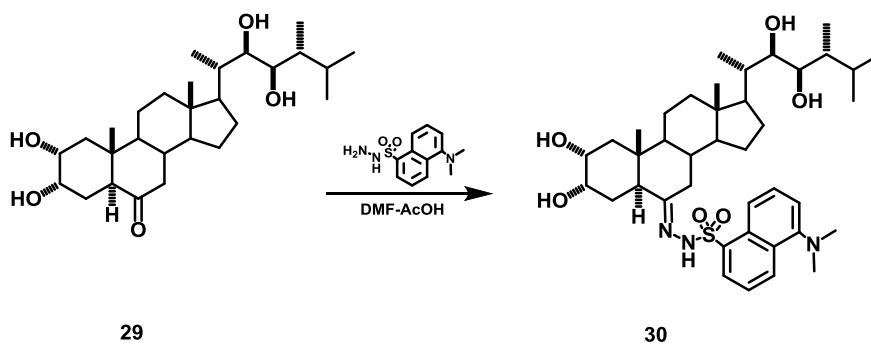
Cabe destacar que entre las propiedades de los BRs está ayudar a la planta a incrementar su resistencia a factores desfavorables del ambiente como temperaturas extremas, salinidad, sequía y pesticidas entre otros. Sin embargo, la concentración de estos compuestos en los organismos vegetales es muy baja, llegando a ser en muchos casos del orden de nanogramos por planta,²³ lo que dificulta su obtención a partir de fuentes naturales. La síntesis química es una alternativa para la obtención de estos compuestos y sus análogos con la finalidad de realizar diversos estudios biológicos.²⁴ En campos como la fitoquímica, fisiología vegetal, biología molecular, agricultura, entre otras.

En los últimos años se ha generado bastante información sobre la ruta de biosíntesis de los BRs²⁵ y sobre su modo de percepción;²⁶ sin embargo, aún falta mucho por estudiar.

Una técnica que permite observar el seguimiento de absorción de las fitohormonas es el uso de marcadores.²⁷ La presencia de marcadores de fluorescencia en el compuesto que se desea estudiar da una aproximación de su acumulación espaciotemporal, mediante su detección a través de microscopía.

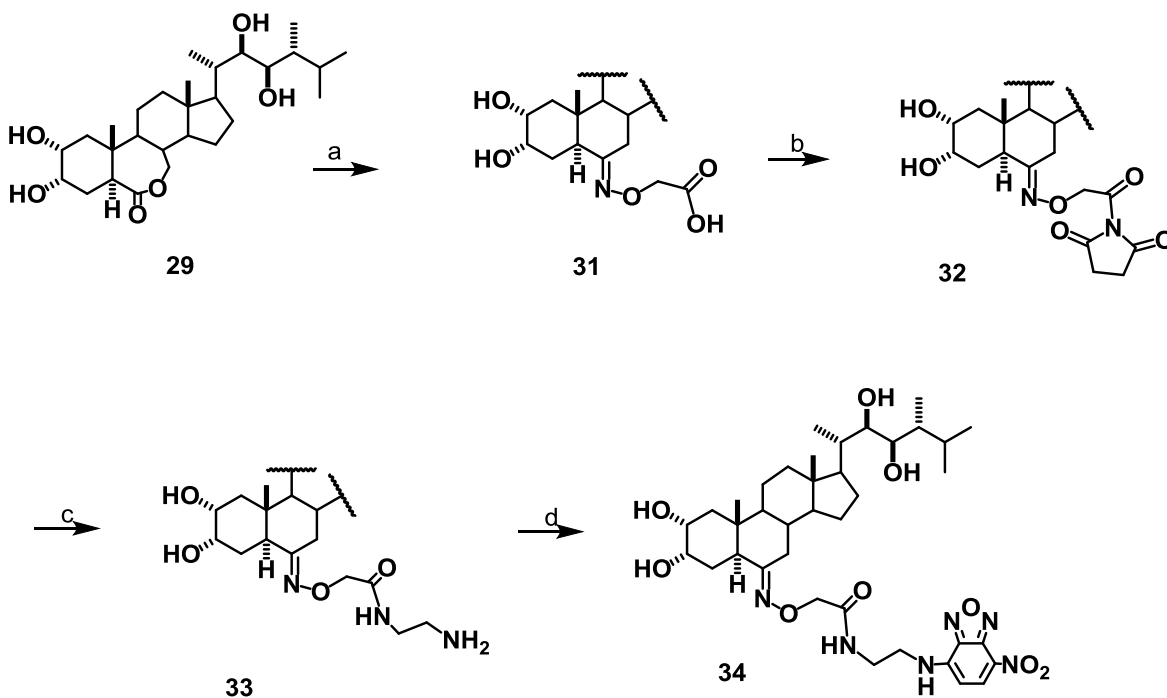
Marcadores de fluorescencia

En la literatura se ha descrito el empleo de diferentes marcadores de fluorescencia como es el caso del conjugado **30** de la 24-epicastasterona (**29**) que ha sido acoplado con la dansilhidrazina como se muestra en el esquema 1, mostrando la capacidad para ser detectado mediante técnicas de análisis de fluorescencia en cultivos de plantas.²⁸



Esquema 1. Síntesis del conjugado **30** de 24-epicastasterona con dansilhidrazina.

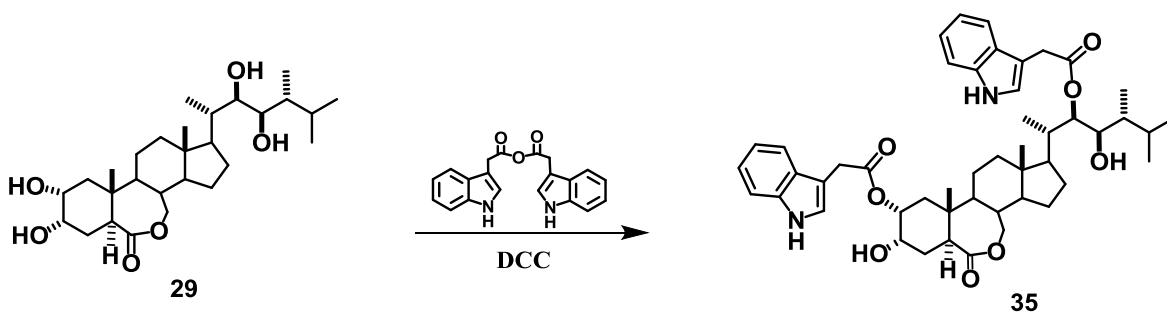
Otros conjugados de los BRs con diversos tipos de marcadores de fluorescencia han sido reportados por Raichenok y colaboradores²⁹ quienes lograron la síntesis del conjugado **34** de la 24-epicastasterona con nitrobenzofurazano, como se muestra en el esquema 2.



a) $\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{COOH}$; b) NOS/DCC ; c) $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; d) NBD-Cl/NaHCO_3

Esquema 2. Síntesis del conjugado 34 de la 24-epicastasterona con nitrobenzofurazano.

El conjugado 35 de la 24-epibrasinólida con ácido 3-indolacético como marcador de fluorescencia también fue sintetizado por Raichenok y colaboradores, como se muestra en el esquema 3.



Esquema 3. Síntesis del conjugado 35 de 24-epibrasinólida.

Debido a las propiedades que presentan los compuestos 29, 34 y 35, permiten que sean altamente sensibles para el estudio de su distribución espaciotemporal a nivel celular y tejido e incluso de las interacciones con componentes celulares; mediante ensayos de

fluorescencia. En este trabajo se ha planteado generar compuestos promotores de crecimiento vegetal con estas características.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Sintetizar compuestos 22-oxocolestánicos que contengan un indicador de fluorescencia en su estructura y desarrollen actividad promotora de crecimiento vegetal, a partir de la sapogenina diosgenina.

Objetivos particulares:

- Optimizar las condiciones de reacción para la síntesis de estos compuestos.
- Caracterizar los compuestos obtenidos mediante técnicas físicas y espectroscópicas.
- Evaluar el efecto como promotor de crecimiento y acumulación espacio temporal de los compuestos sintetizados sobre plantas de cebolla.

MATERIALES Y METODOS.

Equipos y técnicas utilizadas.

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

Los espectros infrarrojos se registran en un espectrofotómetro Agilent Cary 630 FTIR, los datos se expresan en números de onda $\bar{\nu}$ (cm^{-1}).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se obtuvieron en un espectrómetro Bruker multinuclear de 500 MHz para ^1H y de 125 MHz para ^{13}C . Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertzios (Hz). La multiplicidad de las señales de los espectros de ^1H está referida como: s para una señal simple, d para una señal doble, dd para una señal doble de dobles, ddd para una señal doble de doble de dobles, dc para una señal doble de cuartetos y m para una señal múltiple.

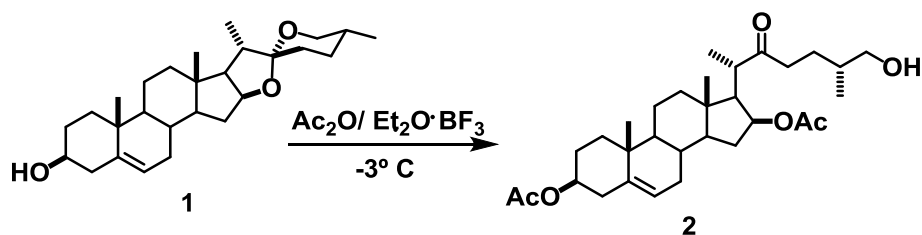
Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 empleando soluciones de cloroformo, en celdas de 10 cm de longitud y utilizando la línea D del sodio (589.3 nm), a temperatura ambiente.

Cada reacción que se realizó; se monitoreo mediante cromatografía en capa fina (CCF) en este caso se utilizan placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor que contienen indicador de fluorescencia (F_{254}). La detección de los compuestos en las placas se ha realizado por exposición de éstas a luz UV ($\lambda = 254$ nm, lámpara de UV-G-54) y mediante revelado por inmersión y por calcinación en disoluciones de ácido sulfúrico al 50% y una disolución reveladora de molibdato. Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas de vidrio las cuales fueron empacadas con gel de sílice grado 60 (230-400 mallas) de acuerdo a la técnica de cromatografía tipo *flash*,³⁰ utilizando un sistema de elución de acetato de etilo-hexano.

Para determinar la acumulación del compuesto in vivo, se realizaron cortes histológicos utilizando un micrótopo de rotación universal marca Leica RM2235. Las imágenes de microscopia fueron tomadas con un microscopio confocal marca Olympus en diferentes longitudes de onda desde 460 a 650 nm.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizaron directamente sin purificar, todos los disolventes se purificaron y secaron de acuerdo con las técnicas publicadas en la literatura.³¹

Formación del 3,16-diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (2).



Se disolvieron 5 g (12 mmol) de diosgenina en 35 mL de CH_2Cl_2 , se agregaron lentamente 12.5 mL (130 mmol) de anhídrido acético. La mezcla se enfrió a $-3\text{ }^\circ\text{C}$ y se agregaron gota a gota 10 mL (80 mmol) de $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se vertió sobre un baño de hielo. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con salmuera (2 x 100 mL), solución saturada de NaHCO_3 (4 x 100 mL) y finalmente con agua destilada (2 x 100 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/ AcOEt 7:3. Se obtuvo un polvo color blanco con un rendimiento de 56%. P.f.: $152\text{-}154\text{ }^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}: -0.3$ (c 1.0, CHCl_3).

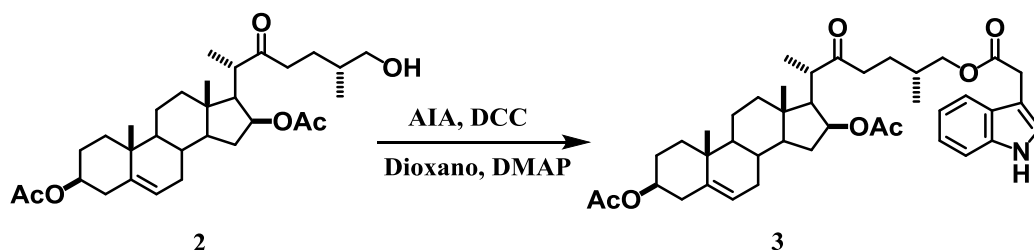
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.4 (1H, d, $J_{6-7}=5.2$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.6 (1H, m, H-3), 3.4 (2H, d, $J_{26-25}=6.2$ Hz, CH_2 -26), 2.9 (1H, dc, $J_{20-21}=6.8$ Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23a), 2.4 (1H, m, H-23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH_3COO -16), 1.9 (3H, s, CH_3COO -3), 0.9 (3H, d, $J_{27-25}=6.8$ Hz, CH_3 -27), 1.14 (3H, d, $J_{21-20}=7.2$ Hz, CH_3 -21), 1.0 (3H, s, CH_3 -19), 0.86 (3H, s, CH_3 -18).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 36.6 (C-1), 27.9 (C-2), 74.03 (C-3), 38.2 (C-4), 139.8(C-5), 122.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.45 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 38.7 (C-23), 26.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.8(C-26), 16.9 (C-27), 170.2 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -16), 169.9 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -3), 21.5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$ -16), 21.3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$ -3).

IR (cm^{-1}): 3497 (OH), 2936 (CH, alifático), 1728 (C=O, cetona), 1708 (C=O, acetato), 1596 (C=C).

EMAR (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{O}_7$ 517.3529, observado 517.3521.

Formación del 3,16-diacetato 26-indolacetato de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26-triilo (3).



Se disolvieron 100 mg (0.20 mmol) del compuesto **2** en 4 mL de dioxano, posteriormente se agregaron 114 mg (0.55 mmol) de DCC, 104 mg (0.60 mmol) de AIA y DMAP como catalizador. La mezcla de reacción se colocó en agitación durante 1 hora. Se filtró la dicitclohexilurea formada y se evaporó el dioxano a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con AcOEt y se realizaron lavados con agua destilada (2x50 mL) y salmuera (2x50 mL). Se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema 9:1 hexano/AcOEt. Se obtuvo un polvo color blanco con un rendimiento del 85%. p.f.: 162-165 °C, $[\alpha]_{\text{D}}$: +0.6 (c 1.0, CHCl_3).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.38 (1H, br s, N-H), 7.6 (1H, d, $J=8$ Hz H-1'), 7.35 (1H, d, H-9') 7.19-7.12 (2H, m, aromáticos) 7.16 (1H, d, $J_{4'-2'} = 2$ Hz, H-4') 5.4 (1H, d, $J_{6-7} = 5.2$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.6 (1H, m, H-3), 3.7 (2H, s, CH_2 -a), 3.4 (2H, d, $J_{26-25} = 6.2$ Hz, CH_2 -26), 2.9 (1H, dc, $J_{20-21} = 6.8$ Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23), 2.4 (1H, m, H-

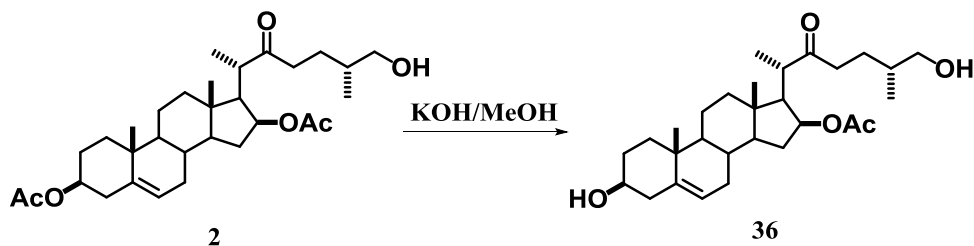
23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH_3COO -16), 1.9 (3H, s, CH_3COO -3), 0.9 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH_3 -27), 1.14 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH_3 -21), 1.0 (3H, s, CH_3 -19), 0.86 (3H, s, CH_3 -18).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 36.6 (C-1), 27.71 (C-2), 74.0 (C-3), 38.2 (C-4), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 31.6 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.7 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 38.7 (C-23), 26.7 (C-24), 35.6 (C-25), 69.2 (C-26), 16.8 (C-27), 170.2 (CH_3COO -16), 169.9 (CH_3COO -3), 21.5 (CH_3COO -16), 21.1 (CH_3COO -3), 172.2 (C-1'), 31.2 (C-2'), 108.07 (C-3'), 123.1 (C-4'), 136.0 (C-6'), 119.54 (C-7'), 122.15 (C-8'), 111.2 (C-9'), 118.7 (C-10'), 127.4 (C-11').

IR (cm^{-1}): 3384 (NH), 2935 (CH, alifático), 1726 (C=O, cetona), 1715 (C=O, éster), 1596 (C=C).

EMAR (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{NO}_7$ 674.3772, observado 674.3769.

Formación del 16-acetato de (25R)-3 β ,26-dihidroxi-22-oxocolest-5-eno-16 β -ilo (36).



Se disolvieron 100 mg (0.20 mmol) del compuesto **2** en 5 ml de MeOH, se agregaron 5 mL de una solución de KOH /MeOH al 5%; la mezcla de reacción se colocó en agitación durante 4 horas. Se evaporó el MeOH a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 , se realizaron lavados con agua destilada (2x50 mL) y salmuera (2x50 mL). Se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida. Se obtuvo un polvo color blanco con un rendimiento del 97%. p.f.: 142-144°C, $[\alpha]_D$: -0.4 (c 1.0, CHCl_3)

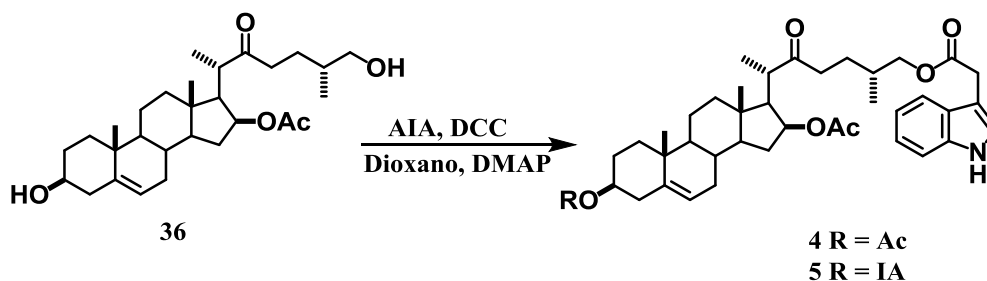
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.4 (1H, d, $J_{6-7} = 5.2$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 3.5 (1H, m, H-3), 3.4 (2H, d, $J_{26-25} = 6.2$ Hz, CH_2 -26), 2.9 (1H, dc, $J_{20-21} = 6.8$ Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23), 2.4 (1H, m, H-23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH_3COO -16), 1.9 (3H, s,

CH_3COO -3), 0.9 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH_3 -27), 1.14 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH_3 -21), 1.0 (3H, s, CH_3 -19), 0.86 (3H, s, CH_3 -18).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 36.6 (C-1), 31.3 (C-2), 71.5 (C-3), 42.1 (C-4), 139.8 (C-5), 122.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.45 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 38.7 (C-23), 26.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.8 (C-26), 16.9 (C-27), 170.2 (CH_3COO -16), 21.5 (CH_3COO -16).

IR (cm^{-1}): 3418 (OH), 2931 (CH, alifático), 1721 (C=O, cetona), 1711 (C=O, acetato), 1596 (C=C).

Formación del 16-acetato 3,26-diindolacetato de (25R)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26-triilo (4) y del 16-acetato 26-indolacetato de (25R)-3 β -hidroxi-22-oxocolest-5-eno-16 β ,26-diilo (5).



Se disolvieron 100 mg (0.21 mmol) del compuesto **36** en 4 mL de dioxano, se agregaron 114 mg (0.55 mmol) de DCC, 104 mg (0.60 mmol) de AIA y DMAP como catalizador; la mezcla de reacción se colocó en agitación durante 1 hora. Se filtró la dicitclohexilurea formada y se evaporó el dioxano a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con AcOEt y se realizaron lavados con agua destilada (2x50 mL) y salmuera (2x50 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema 9:1 hexano/AcOEt.

16-Acetato-3,26-diindolacetato de (25R)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26-triilo (4)

p.f.: 167-172°C, $[\alpha]_D -0.31$ (c 1.0, CHCl_3)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.2 (2H, br s, N-H), 7.6 (2H, d, $J=8$ Hz H-1'), 7.3 (2H, d, H-9') 7.19-7.12 (4H, m, aromáticos) 7.16 (2H, d, $J_{4'-2'} = 2$ Hz, H-4') 5.4 (1H, d, $J_{6-7} = 5.2$

Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.6 (1H, m, H-3), 3.7 (4H, s, CH₂-a), 3.4 (2H, d, $J_{26-25} = 6.2$ Hz, CH₂-26), 3.7 (1H, s, H-b) 2.9 (1H, dc, $J_{20-21} = 6.8$ Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23), 2.4 (1H, m, H-23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH₃COO-16), 1.9 (3H, s, CH₃COO-3), 0.9 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 1.14 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH₃-21), 1.0 (3H, s, CH₃-19), 0.86 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 36.6 (C-1), 27.71 (C-2), 74.2 (C-3), 38.1 (C-4), 139.8(C-5), 122.2 (C-6), 31.6 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.7 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 38.7 (C-23), 26.7 (C-24), 35.6 (C-25), 69.2 (C-26), 16.8 (C-27), 170.2 (CH₃C=O-16), 21.5 (CH₃COO-16), 172.2 (C-1'), 31.2 (C-2'), 108.07 (C-3'), 123.1 (C-4'), 136.0 (C-6'), 119.54 (C-7'), 122.15 (C-8'), 111.2 (C-9'), 118.7 (C-10'), 127.4 (C-11').

IR (cm⁻¹): 3407 (NH), 2945 (CH, alifático), 1727 (C=O, cetona), 1704 (C=O éster) 1596 (C=C)

EMAR (m/z):[M+H]⁺ calculado para C₄₉H₆₀N₂O₇ 788.4401, observado 788.4407.

16-Acetato 26-indolacetato de (25R)-3β-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo (5).

p.f.: 155-158°C, [α]_D +0.26 (c 1.0, CHCl₃)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.38 (1H, br s, N-H), 7.6 (1H, d, $J = 8$ Hz H-1'), 7.3 (1H, d, H-9') 7.19-7.12 (2H, m, aromáticos) 7.16 (1H, d, $J_{4'-2'} = 2$ Hz, H-4') 5.4 (1H, d, $J_{6-7} = 5.2$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 3.7 (2H, s, CH₂-a), 3.5 (1H, m, H-3), 3.4 (2H, d, $J_{26-25} = 6.2$ Hz, CH₂-26), 2.9 (1H, dc, $J_{20-21} = 6.8$ Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23), 2.4 (1H, m, H-23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH₃COO-16), 1.9 (3H, s, CH₃COO-3), 0.9 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 1.14 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH₃-21), 1.0 (3H, s, CH₃-19), 0.86 (3H, s, CH₃-18).

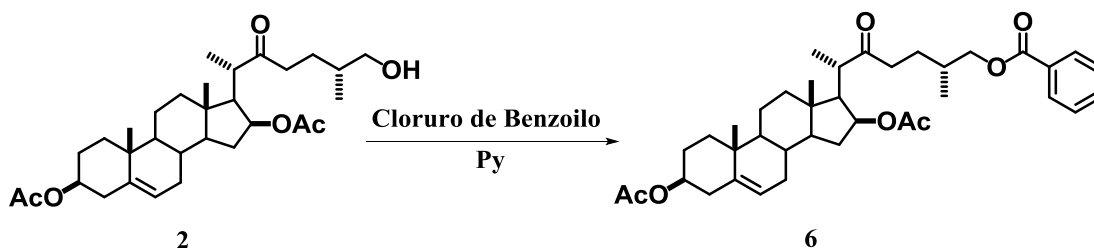
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 36.6 (C-1), 27.71 (C-2), 71.5 (C-3), 38.2 (C-4), 139.8(C-5), 122.2 (C-6), 31.6 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.7 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 38.7 (C-23), 26.7 (C-24), 35.6 (C-25), 69.2 (C-26), 16.8 (C-27), 170.2 (CH₃C=O-16), 169.9 (CH₃C=O-3), 21.5 (CH₃COO-16), 21.1

(CH_3COO -3), 172.2 (C-1'), 31.2 (C-2'), 108.07 (C-3'), 123.1 (C-4'), 136.0 (C-6'), 119.54 (C-7'), 122.15 (C-8'), 111.2 (C-9'), 118.7 (C-10'), 127.4 (C-11').

IR (cm^{-1}): 3407 (OH), 3365 (NH), 2932 (CH, alifático), 1735 (C=O, cetona), 1720 (C=O, acetato), 1596 (C=C).

EMAR (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{NO}_6$ 631.3873, observado 631.3851.

Formación del 3,16-diacetato 26-benzoato de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26-triilo (6).



Se disolvieron 100 mg (0.20 mmol) de **3** en 3 mL de piridina. Se colocaron en agitación a temperatura ambiente, se agregó 1 mL (8.6 mmol) de cloruro de benzoilo, posterior a la formación de un precipitado blanco se agregaron unas gotas de NaOH al 10%. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 y se lavó con solución HCl al 5% (2x 50 mL), salmuera (2 x 50 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 9:1. Se obtuvo un polvo color blanco con un rendimiento del 90%. P.f.: 152-156°C. $[\alpha]_{\text{D}}: -0.93$ (c 1.0, CHCl_3)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.0 (2H, dd, H-orto), 7.5 (1H, m, H-para), 7.4 (2H, m, H-meta), 5.3 (1H, d, $J_{6-7}=5.2$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.6 (1H, m, H-3), 3.4 (2H, m, H-26), 2.9 (1H, dc, $J_{20-21}=6.8$ Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23), 2.4 (1H, m, H-23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH_3COO -16), 1.9 (3H, s, CH_3COO -3), 0.9 (3H, d, $J_{27-25}=6.8$ Hz, CH_3 -27), 1.14 (3H, d, $J_{21-20}=7.2$ Hz, CH_3 -21), 1.0 (3H, s, CH_3 -19), 0.86 (3H, s, CH_3 -18).

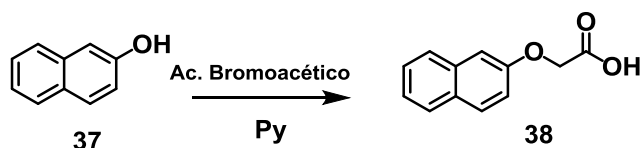
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 36.6 (C-1), 27.9 (C-2), 74.03 (C-3), 38.2 (C-4), 139.8 (C-5), 122.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.45 (C-18), 19.5 (C-19),

43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 212.8 (C-22), 38.7 (C-23), 26.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.8(C-26), 16.9 (C-27), 170.4 (CH₃C=O-16), 169.9 (CH₃C=O-3), 21.5 (CH₃COO-16), 21.3 (CH₃COO-3), 130.4 (C-*ipso*), 129.7 (C-*orto*), 128.3 (C-*meta*), 132.9 (C-*para*).

IR (cm⁻¹): 2937 (CH, alifático), 1729 (C=O, cetona), 1716 (C=O, éster), 1450 (C=C), 1236 (C-O), 1450, 712 (Bz).

EMAR (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₈H₅₂O₇ 620.3713, observado 620.3851.

Formación del ácido β-naftoxiacético (38).



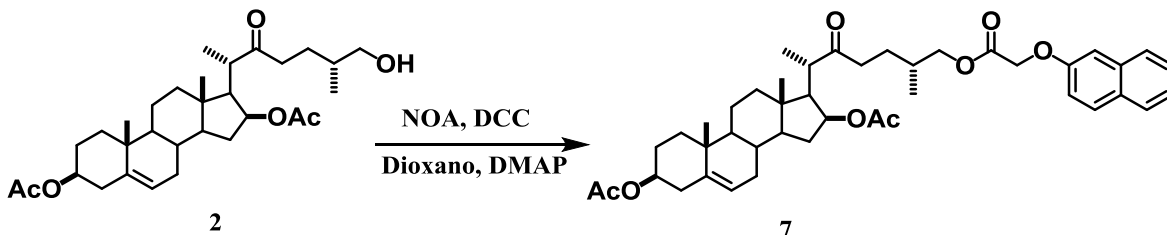
Se disolvieron 100 mg de β-naftol en NaOH al 30% se colocaron en agitación constante, se agregaron 300 mg de ácido bromoacético; la mezcla de reacción se calentó durante 10 min. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se enfrió a temperatura ambiente con agitación constante. La fase orgánica se lavó con salmuera (2 x 100 mL) y agua destilada (2 x 100 mL) se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida, se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 9:1. Se obtuvo un polvo color blanco con un rendimiento del 80%. p.f.: 155-158°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.8 (1H, m, H-12), 7.72 (1H, m, H-10), 7.76 (1H, m, H-9), 7.4 (1H, H-7), 7.3 (1H, H-8), 7.2 (1H, H-5), 7.09 (1H, H-4), 4.7 (2H, s, CH₂-2).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 65.4 (C-3), 155.7 (C-4), 107.1(C-5), 118.5 (C-6), 129.5 (C-7), 126.6 (C-8), 124.1 (C-9), 127.6 (C-10), 126.9(C-11), 134.3(C-12), 127.8 (C-13), 168.8 (CH₂C=O-1).

IR (cm⁻¹): 2917 (CH alifático), 2777 (OH), 1732 (C=O), 1599 (C=C).

Formación del 3,16-diacetato 26-naftoxiacetato de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26-triilo (9).



Se disolvieron 100 mg (0.20 mmol) de **2** en 5 mL de dioxano, se agregaron 160 mg (0.78 mmol) de DCC y 140 mg (0.72 mmol) de ácido β -naftoxiacético. La mezcla de reacción se colocó en agitación a temperatura ambiente, se agregó una cantidad catalítica de DMAP, durante 2 horas. Posteriormente se filtró la diciclohexilurea y se evaporó el dioxano a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con AcOEt. Se lavó con salmuera (2 x 100 mL) y agua destilada (2 x 100 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizado con un sistema hexano/AcOEt 8:2. Se obtuvo un polvo color blanco con un rendimiento del 85%. p.f.: 185-189°C, $[\alpha]_{\text{D}}: +0.9$ (c 1.0, CHCl_3)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.8 (1H, m, H-12'), 7.72 (1H, m, H-10'), 7.76 (1H, m, H-9'), 7.4 (1H, H-7'), 7.3 (1H, H-8'), 7.2 (1H, H-5'), 7.09 (1H, H-4'), 4.7 (2H, s, CH_2 -2'), 5.4 (1H, d, $J_{6-7}=5.2$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.6 (1H, m, H-3), 3.4 (2H, d, $J_{26-25}=6.2$ Hz, CH_2 -26), 2.9 (1H, dc, $J_{20-21}=6.8$ Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23), 2.4 (1H, m, H-23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH_3COO -16), 1.9 (3H, s, CH_3COO -3), 0.9 (3H, d, $J_{27-25}=6.8$ Hz, CH_3 -27), 1.14 (3H, d, $J_{21-20}=7.2$ Hz, CH_3 -21), 1.0 (3H, s, CH_3 -19), 0.86 (3H, s, CH_3 -18).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 36.6 (C-1), 27.9 (C-2), 74.03 (C-3), 38.2 (C-4), 139.8 (C-5), 122.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.45 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 38.7 (C-23), 26.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.8 (C-26), 16.9 (C-27), 170.2 (CH_3COO -16), 169.9 (CH_3COO -3), 21.5 (CH_3COO -16), 21.3 (CH_3COO -3), 65.4 (C-3'), 155.7 (C-4'), 107.1 (C-5'), 118.5 (C-6'), 129.5 (C-7'), 126.6 (C-

8'), 124.1 (C-9'), 127.6 (C-10'), 126.9 (C-11'), 134.3(C-12'), 127.8 (C-13'), 168.8 (CH₂COOH-1').

IR (cm⁻¹): 2937 (CH, alifático), 1727 (C=O, cetona), 1709 (C=O, éster), 1213 (C-O-C, éter), 1509 (C=C).

EMAR (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₄₃H₅₆O₈ 700.3955, observado 700.4064

Pruebas de actividad biológica de los compuestos.

Con la finalidad de analizar la asimilación de los compuestos generados y su acumulación *in vivo*, se utilizaron plantas de cebolla, las cuales fueron tratadas de la siguiente forma: se cortó el exceso de hojas, tallo y raíces de cada cebolla y se realizó un lavado con agua destilada.

Se prepararon soluciones con los compuestos **3**, **4** y **5**, se utilizó una dilución de 0.1 mg/L. Se colocaron las plantas de cebolla en las soluciones preparadas. La muestra control se preparó solamente usando acetona y agua.

Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento en la cual las condiciones de temperatura fueron a 25 ± 1 °C, con 12 horas-luz y 12 horas-oscuridad y una humedad relativa de 50%-60% durante 4 días.

Montaje Histológico

Para estudiar la estructura que constituyen a los organismos (células, tejidos y órganos) se requiere de diversos métodos y técnicas entre las más destacadas es el uso de microscopios los cuales permiten observar la morfología y los diferentes niveles de organización de la materia. Por medio de muestras que tengan un grosor de 5-8 micras aproximadamente, por lo que la muestra que requiere ser estudiada necesita ser muy fina. Para lograr cortes tan finos y con características propias para ser observados se debe realizar un tratamiento adecuado al tipo de muestra que se desea analizar, en ciertos procesos se utilizan técnicas histológicas.

Una técnica histológica es el conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfo-anatómicos a través de diferentes microscopios. Este proceso incluye una serie de procesos comenzando desde la toma de muestra de diferentes órganos que componen a la planta. Una vez obtenida la muestra a analizar es fijada con soluciones que permiten mantener las estructuras celulares y moleculares en su estructura inicial durante el tratamiento posterior. Sin embargo existen ciertos inconvenientes con el uso de las soluciones fijadoras ya que algunas afectan en ocasiones las características tisulares que se desean observar.

Posterior a la fijación se procede a incluir el tejido en parafina para obtener los cortes, cabe mencionar que cuanto más delgado se requiera el corte, la muestra debe endurecerse más. Una vez realizada la inclusión se llevan a cabo cortes por micrótomo lo que permite obtener secciones del tejido finas (0.5 a 2 micras), semi-finas (3-10 micras) y gruesas (>10 micras). Antes de poder observar los cortes las muestras deben ser procesadas, es decir, se debe eliminar el medio de inclusión.

Fijación del tejido vegetal

La fijación se realizó a vacío con una solución fijadora de paraformaldehído. La cual fue preparada de la siguiente manera: se calentaron 60 mL de agua a 60° C con agitación constante, se añadieron 4 g de paraformaldehído. Se agregaron algunas gotas de hidróxido sódico 10 M. Una vez que la solución se vuelve transparente se agregó 25 mL de una solución tampón fosfato 0.4 M pH 7.4, se aforó a 100 mL con agua destilada. La solución se enfrió a 4 antes de usarse.

Deshidratación

La deshidratación de las muestras se realizó utilizando concentraciones ascendentes de etanol (60, 70, 80, 90, 95 y 100%) cada 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó una infiltración en xileno, las muestras se colocaron dentro de viales y se sumergieron en una mezcla de etanol-xileno 3:1 durante media hora, se realizaron dos cambios usando mezclas etanol-xileno 1:1 y etanol-xileno 1:3. Finalmente

se realizó un cambio a xileno (2 veces), las muestras se dejaron en xileno durante toda una noche.

Infiltración en parafina

Las muestras son retiraron del xileno y se colocaron en viales con parafina histológica dentro de un horno a 56 °C, se agregó parafina cada hora con el fin de eliminar el xileno, se realiza el cambio de parafina cada 2 horas (4 veces) para lograr una buena infiltración y de esta forma el tejido (raíz y bulbo) sea lo suficientemente firme para realizar los cortes. Finalmente las muestras se colocan sobre moldes de inclusión dejando que la parafina solidifique totalmente.

Cortes de muestras en micrótopo

Los cortes se realizaron utilizando un micrótopo, cada corte se realizó con un tamaño de 12 micras, posteriormente los cortes se colocaron sobre porta-objetos previamente tratados con adhesivo Haupt para mantener firmes las muestras.

Desparafinación y rehidratación

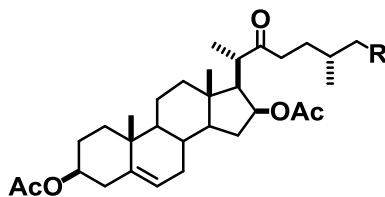
Antes de observar las muestras al microscopio se realiza un tratamiento de desparafinación en xileno 100% durante 20 min. Las muestras se rehidrataron utilizando concentraciones descendentes de etanol-NaCl 0.85% (100, 95, 85, 70, 50 y 30%) y se colocaron en una solución de NaCl al 0.85% a temperatura ambiente. Se realizó el montaje de los porta-objetos con las muestras para ser observados mediante microscopia de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El acelerado crecimiento de la población en el planeta ha causado una gran demanda de alimentos en nuestro país y el mundo.³² Por tanto, es de gran importancia aplicar nuevas estrategias agrícolas que permitan aumentar la productividad, la calidad y el valor nutricional de los productos. Un ejemplo es el del cultivo de maíz, el cual, es básico y el más importante en la dieta del mexicano; sin embargo, su producción anual a pesar de haber aumentado últimamente, es insuficiente para satisfacer la demanda nacional. Una opción que se tiene para elevar la producción agrícola, y en particular del maíz, es la aplicación de fitohormonas de crecimiento, como los BRs.³³ Desafortunadamente, los BRs son de alto costo; por ejemplo, 1 mg de homobrasinólida (**HB**) tiene un costo en el mercado de \$5350.00.³⁴

Por esta razón muchos grupos de investigación se encuentran desarrollando nuevas metodologías o modificando las ya conocidas para obtener compuestos que permitan mejorar la producción agrícola.

En nuestro grupo de investigación se ha llevado cabo la síntesis y evaluación biológica de derivados esteroidales 22-oxocolestánicos como se muestra en la figura 7. Estos derivados han sido evaluados biológicamente y han presentado actividad como promotores de crecimiento vegetal en cultivos de variedades nativas de maíz (CPue-636 Ixtap-2012) e híbrido (CPue-631 Tlachi-2012), arroz (Morelos A-06)³⁵ y en jitomate híbrido (SUN 7705) en condiciones de invernadero.



- 38** R = OAc
2 R = OH
39 R = H

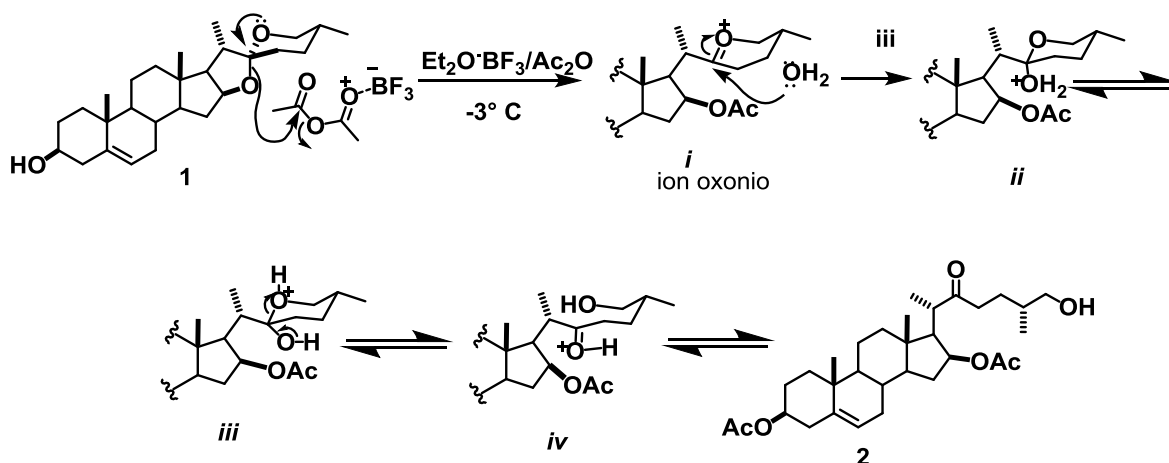
Figura 7. Derivados esteroidales con actividad promotora de crecimiento vegetal.

En particular, el compuesto **2** (Figura 7) se ha evaluado sobre semillas de variedades nativas de maíz (CPue-636 Ixtap-2012) y se demostró que tiene actividad como promotor de crecimiento vegetal comparado con la homobrasinólida (**HB**), como se muestra en la figura 8.³⁶



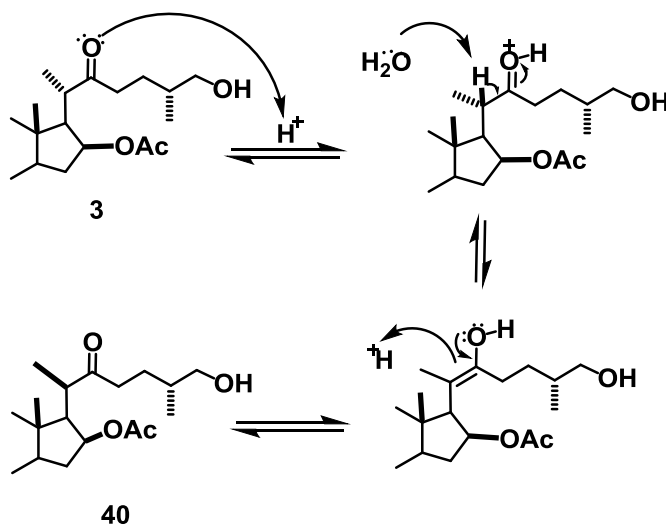
Figura 8. Crecimiento de plantas de maíz aplicando compuestos promotores de crecimiento vegetal comparado con la homobrasinólida.

El compuesto **2** se ha sintetizado a partir de la apertura regioselectiva de los anillos E y F de la diosgenina bajo la acción de $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$, en presencia de anhídrido acético a -3°C . Bajo estas condiciones de reacción, uno de los carbonilos del Ac_2O es activado por el ácido de Lewis y el otro grupo carbonilo es atacado por un par electrónico del átomo de oxígeno en C-16. De esta manera se forma el intermediario (i) denominado ion oxonio (ver esquema 4) el cual es atacado por una molécula de agua sobre el carbono 22; así el átomo de oxígeno tetrahidropiránico recupera su par electrónico y se forma el intermediario ii. La deprotonación de ii seguido de la protonación del átomo de oxígeno tetrahidropiránico conduce a la formación del intermediario hemiacetalico iii. El par electrónico del átomo de oxígeno del alcohol forma una cetona protonada iv y finalmente, su deprotonación conduce al compuesto 22-oxo-26-hidroxilado **2**.



Esquema 4. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 2.

Cabe mencionar que dentro de la reacción también se obtuvo como producto en menor rendimiento el compuesto acetilado en la posición C-26 (**38**), debido a que durante la formación del ion oxonio (**i**), este intermediario también puede ser atacado por el ion acetato formar el compuesto **38**. La cromatografía en capa fina (CCF) de la reacción mostró la formación de un compuesto con R_f muy cercano al compuesto **2** en pequeñas proporciones, planteándose que se trata del compuesto epimérico C-21 (**40**).



Esquema 5. Mecanismo de reacción para la formación del epímero C-21.

Este compuesto se forma en el transcurso de la reacción por la presencia de AcOH que se forma en el medio de reacción el cual cataliza la formación del enolato de acuerdo con el siguiente mecanismo de reacción (ver esquema 2) el oxígeno de la cetona en C-22 se

protona con el ácido del medio, una posterior eliminación del protón α al carbonilo da lugar a la formación del enolato, finalmente la tautomerización a la forma cetónica más estable conduce a la epimerización de C-21.

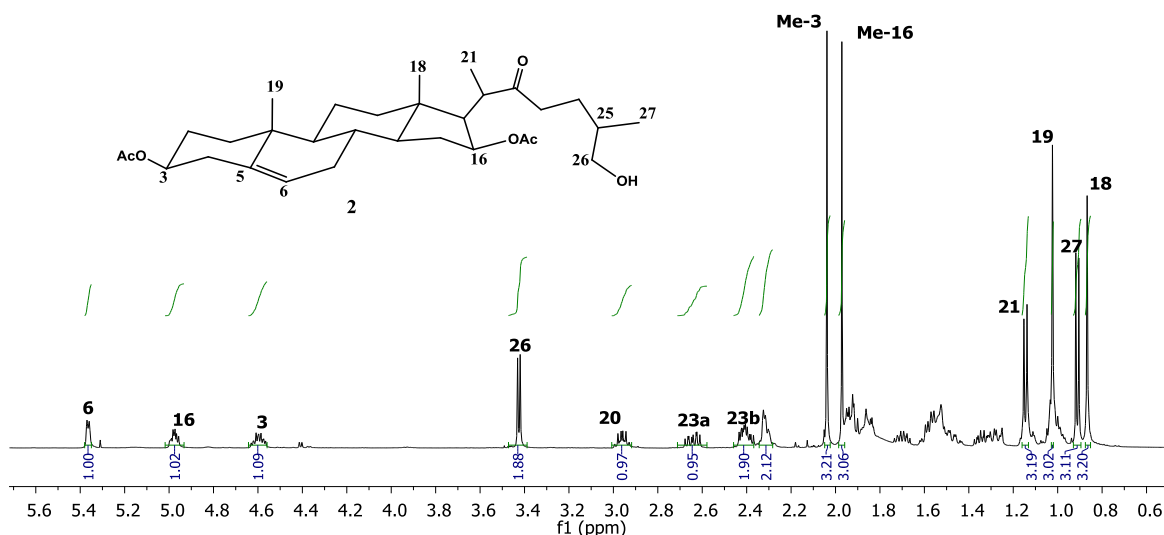


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **2**.

El espectro de RMN- ^1H del compuesto **2** (figura 9) se observa la señal del protón vinílico del H-6 como una señal doble en 5.36 ppm la cual se acopla con los dos protones de 7, el ecuatorial (*ec*) y el axial (*ax*), de acuerdo con la curva de Karplus, el ángulo diedro que se forma entre los protones 6 y 7_{ax} es prácticamente de 90° , por esta razón solamente se puede apreciar una constante de acoplamiento $J_{6-7} = 5.2$ Hz. El H-16 presenta una señal múltiple en 4.9 ppm, para la señal de H-3 también se observa una señal múltiple en 4.6 ppm. La señal de H-26 se observa en 3.4 ppm y se presentan como un *d*, esto es debido a que se acopla con el protón de H-25 con una constante de acoplamiento $J_{25-26} = 6.0$ Hz. En campos altos se observa una señal *dc* que pertenece al protón H-20 la cual se acopla con los protones del metilo de 21 y el protón de 17 en 2.9 ppm. Mientras que en 2.6 y 2.4 ppm se aprecian los protones H-23a y H-23b como señales múltiples.

Los protones de los metilos que pertenecen a los grupos acetatos en las posiciones de C-3 y C-16 se observan como señales simples, en 2.0 y 1.9 ppm mientras que los metilos 21 y 27 corresponden a señales dobles en 1.14 ppm ($J_{21-20} = 7.0$ Hz) y 0.92 ppm ($J_{27-25} = 6.5$

Hz) Los metilos 19 y 18 se observan como señales simples, en 1.02 y 0.86 ppm, respectivamente.

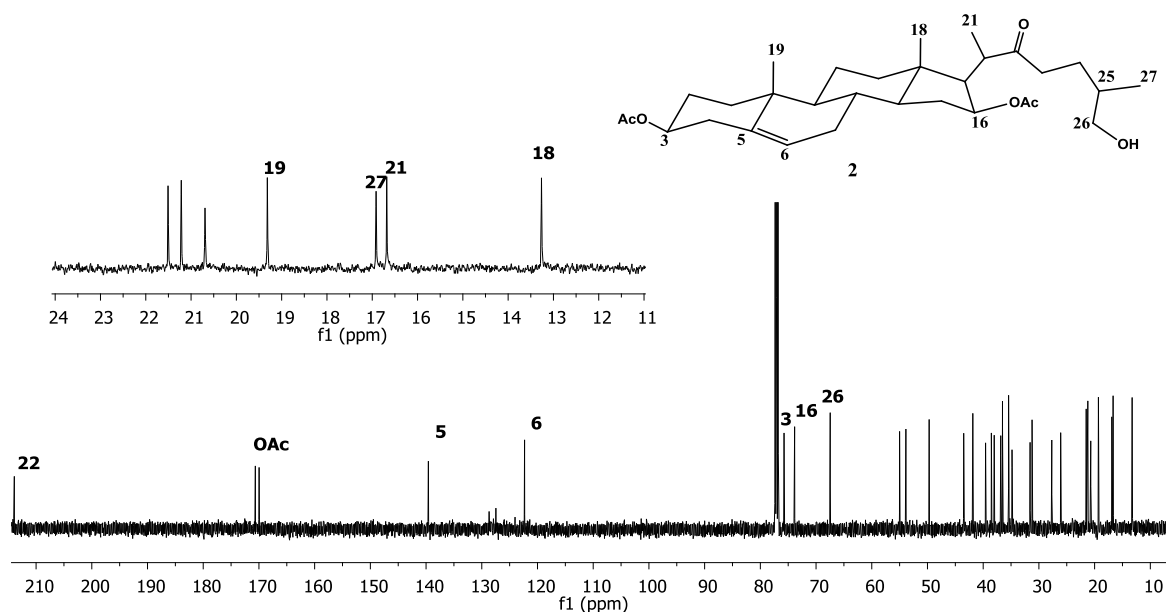
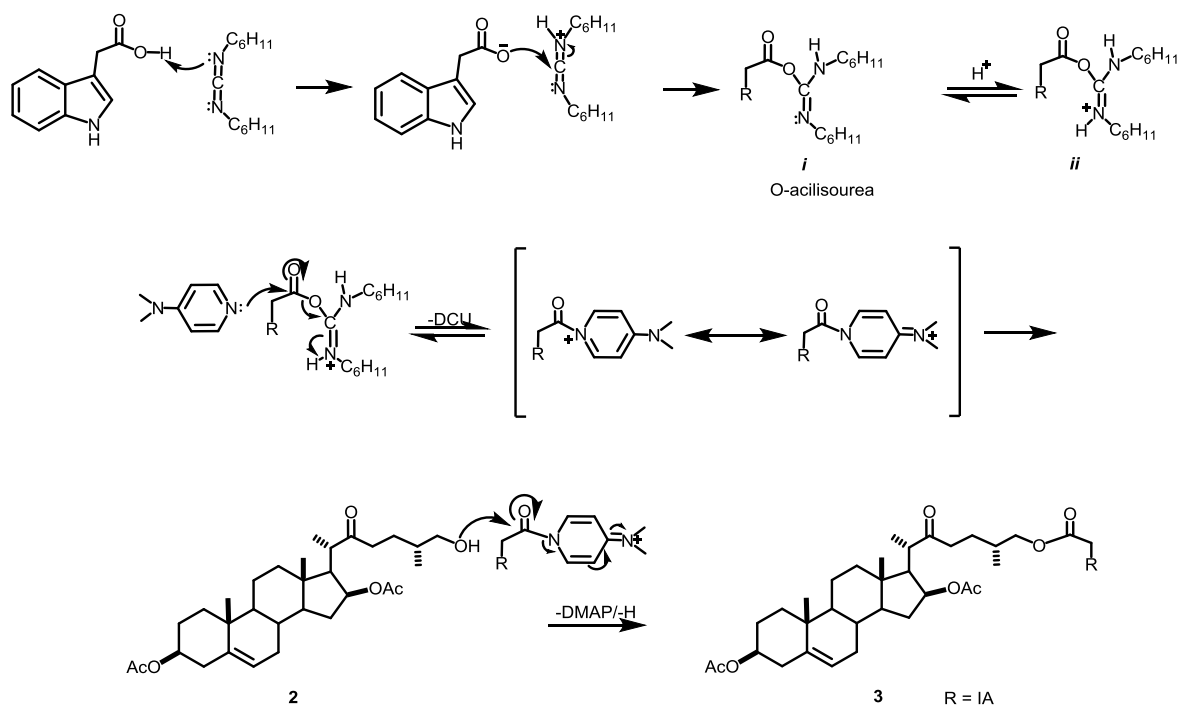


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del compuesto **2**.

En el espectro de RMN- ^{13}C (figura 10) del compuesto **2** se aprecia la señal en 213.9 ppm, característica de C-22, que pertenece a un carbonilo de cetona mientras que la señal de los carbonilos de los grupos acetatos en C-3 y C-16 se visualizan en 170.8 y 170.1 ppm. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecen en 139.8 y 122.5 ppm. Las señales para C-3 y C-16 se observan en 75.9 y 74.0 ppm y en 67.7 ppm se aprecia la señal de C-26. Ahora bien, las señales de los metilos correspondientes a los acetatos de C-3 y C-16 se encuentran a frecuencias más bajas, en 21.7 y 21.4 ppm. Los metilos restantes se presentan a frecuencias menores para C-27 en 17.0 ppm, C-21 en 16.9 ppm, C-19 y C-18 en 19.5 ppm y 13.5 ppm.

Una vez obtenido el compuesto promotor de crecimiento vegetal **2** es acoplado al ácido 3-indolacético; el cual tendrá la función de marcador de fluorescencia. El acoplamiento se ha realizado mediante una reacción de esterificación sobre el grupo hidroxilo libre C-26 del compuesto **2**. En la literatura³⁷ se ha descrito la inserción del ácido 3-indolacético preparando previamente al anhídrido correspondiente. En nuestro caso se

evitó ese paso y el acoplamiento con el grupo hidroxilo en C-26 del compuesto **2** se hizo directamente, mediante el uso de DCC en presencia de una cantidad catalítica de DMAP (ver esquema 6) para ello el ácido 3-indolacético reacciona con la carbodiimida produciendo el intermediario O-acilisourea (*i*); la DMAP reacciona con el intermediario *ii* debido a que es más nucleofílica que el alcohol del compuesto **2**; se genera una amida y se elimina dicitclohexilurea (DCU); la amida formada es fuertemente electrofílica, por lo cual el alcohol puede realizar un ataque nucleofílico fácilmente sobre el acilo formando el compuesto **3**.



Esquema 6. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 3.

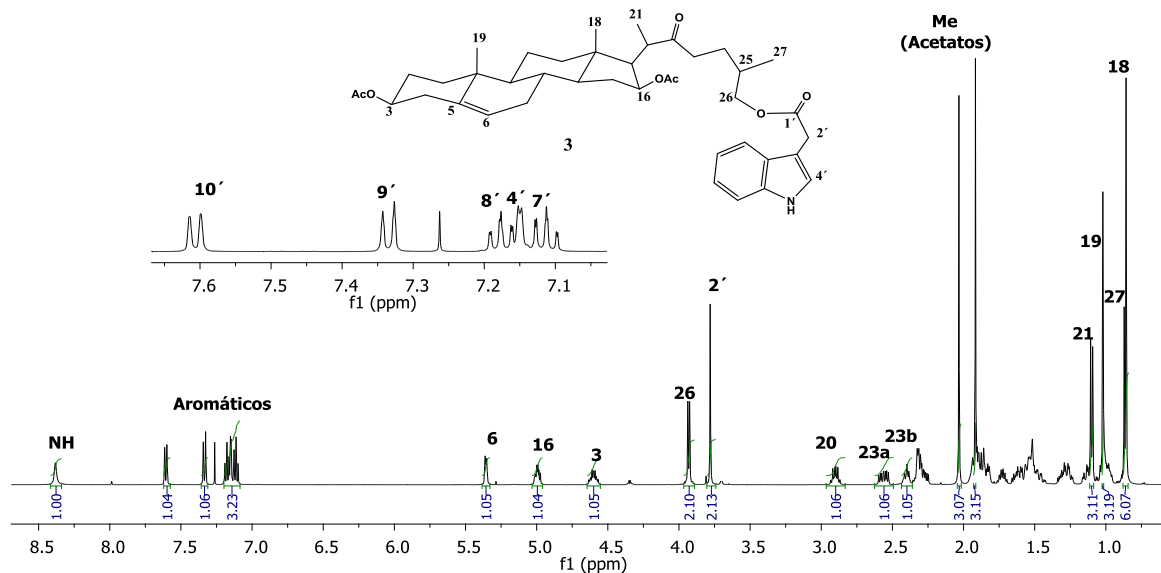


Figura 11. Espectro de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **3**.

El espectro de RMN- ^1H del compuesto **3** (ver figura 11) muestra a frecuencias altas una señal ancha característica en 8.38 ppm del protón unido al N-H del anillo indólico, los hidrógenos del sistema aromático se observan en 7.62-7.12 ppm, el protón vinílico del anillo indólico se observa en 7.16 ppm como una señal *d*, en 5.35 ppm se observa una señal doble del protón vinílico de H-6, una señal múltiple para H-16 y en 4.6 ppm una señal múltiple para el H-3, los protones H-26 se observa un cambio en su desplazamiento químico debido al acoplamiento con el IA ya que se desplazan a frecuencias altas observándose en 3.9 ppm como como señal doble con una constante de acoplamiento de $J_{25-26} = 6.0$ Hz, en 3.78 ppm se observa una señal simple la cual integra para dos hidrógenos que corresponden a los protones de H-2' a frecuencias bajas en la señal de H-27 se observa un cambio en su desplazamiento ahora se presenta que se observa en 0.88 ppm.

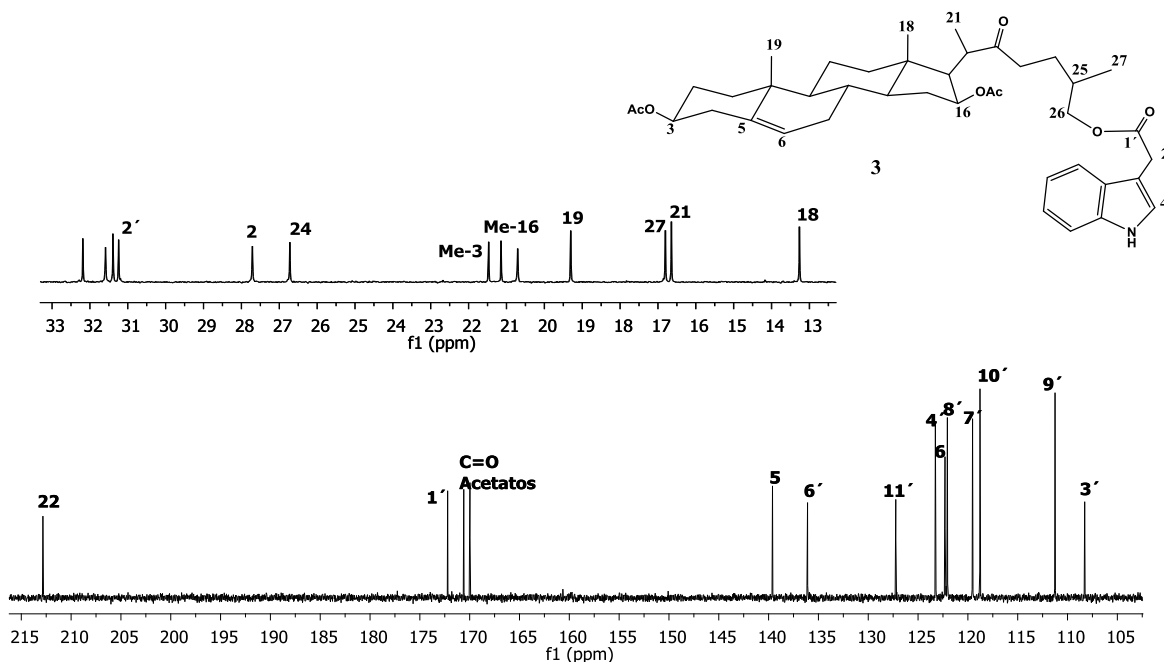


Figura 12. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para el compuesto 3

En el espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 3 se aprecia la señal en 213.9 ppm, característica de C-22, que pertenece a un carbonilo de cetona, la señal observada en 172.1 ppm corresponde a un carbonilo de éster producto del acoplamiento con el AIA; los carbonilos de los grupos acetatos en C-3 y C-16 se visualizan en 170.8 y 170.1 ppm. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecen en 139.8 y 122.5 ppm mientras que los carbonos vinílicos del IA C-3' y C-4' se aprecian en 108.0 y 123.1 ppm. Los carbonos del anillo aromático se observan como C-6' en 136.0 ppm, C-7' en 119.5 ppm, C-8' en 122.1 ppm, C-9' en 111.2 ppm, C-10' en 118.7 ppm, C-11' en 127.4 ppm, a frecuencias bajas en 31.2 ppm se observa el C-2'. Las señales para C-3 y C-16 se observan en 75.9 y 74.0 ppm y en 67.7 ppm se aprecia la señal de C-26. Las señales de los metilos correspondientes a los acetatos de C-3 y C-16 se encuentran a frecuencias más bajas, en 21.7 y 21.4 ppm. Los metilos restantes se presentan a frecuencias menores para C-27 en 17.0 ppm, C-21 en 16.9 ppm, C-19 y C-18 en 19.5 ppm y 13.5 ppm.

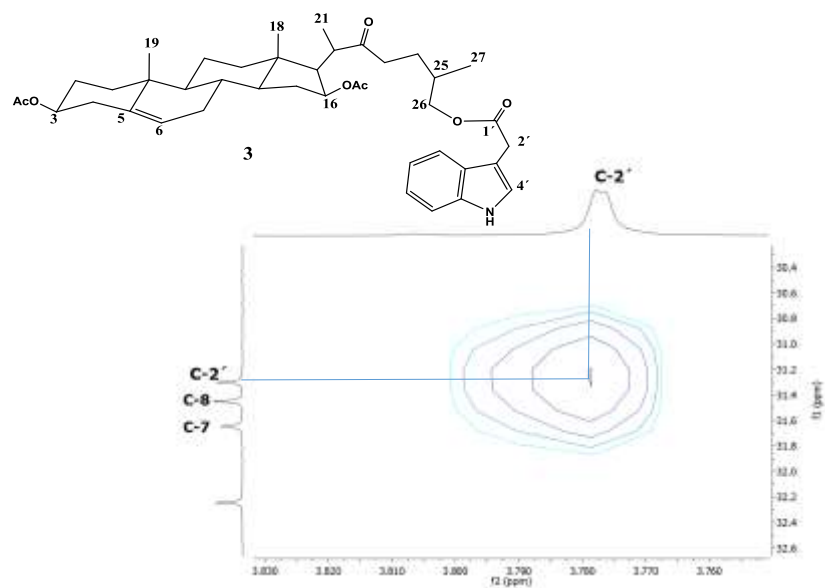
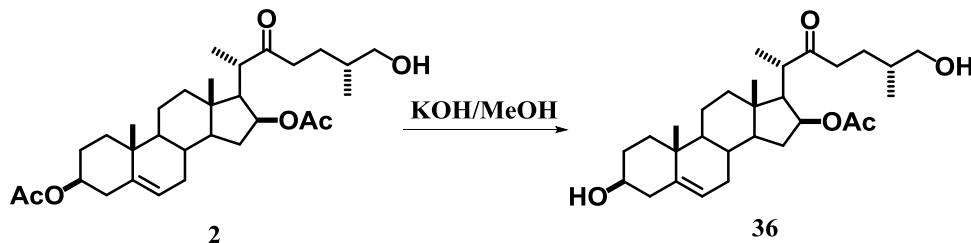


Figura 13. Expansión del experimento HSQC del compuesto 3.

El uso del experimento HSQC permitió asignar correctamente la señal que corresponde al C-2' que se encuentra en 31.2 ppm ya que correlaciona con respectivos protones H-2' en 3.78 ppm.

Para realizar un doble acoplamiento del AIA sobre la posición C-3 y C-26 del compuesto **2**, se realizó la hidrólisis regioselectiva del grupo acetato en C-3 de **2** mediante el uso de KOH al 5% la cual condujo a **36** cuantitativamente.



En el espectro de RMN-¹H del compuesto **36** (Figura 14) se puede observar un cambio significativo en el desplazamiento de la señal de H-3, ya que se observa a frecuencias más bajas debido a la presencia del grupo hidroxilo que ahora se encuentra en C-3 observándose como señal múltiple, las demás señales correspondientes a la estructura no presentan cambios significativos con respecto al espectro de ¹H de **36**.

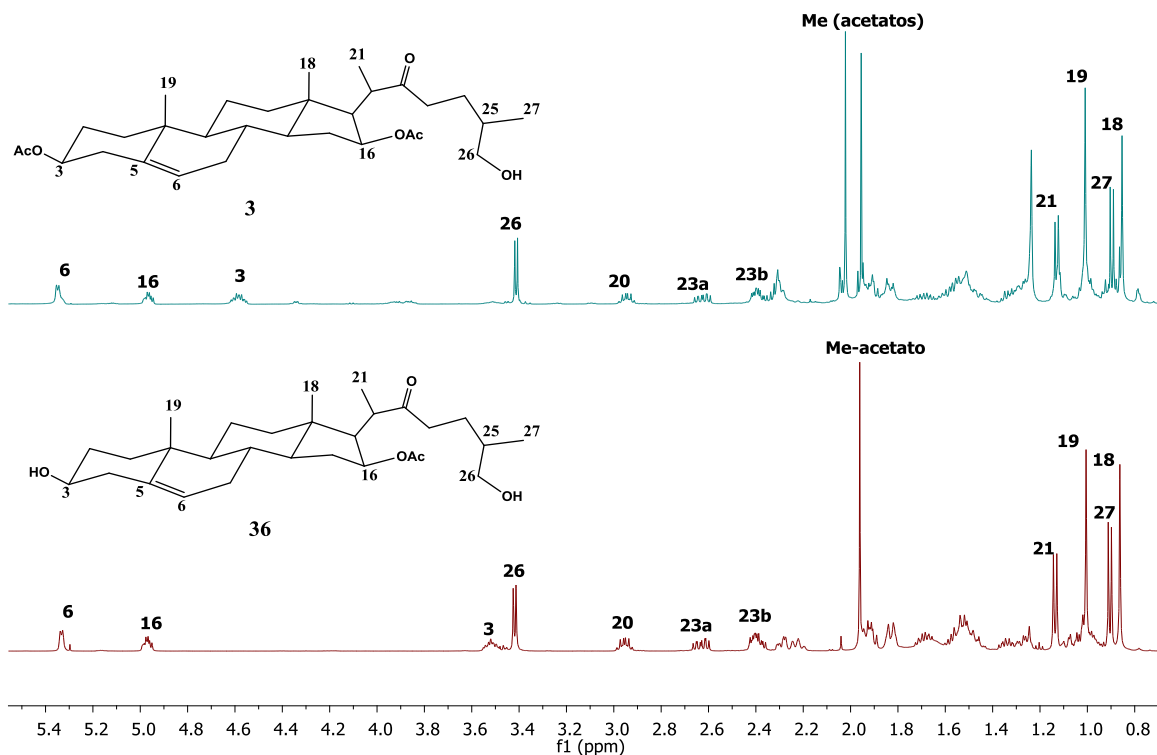


Figura.14 Espectro de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para el compuesto **36**.

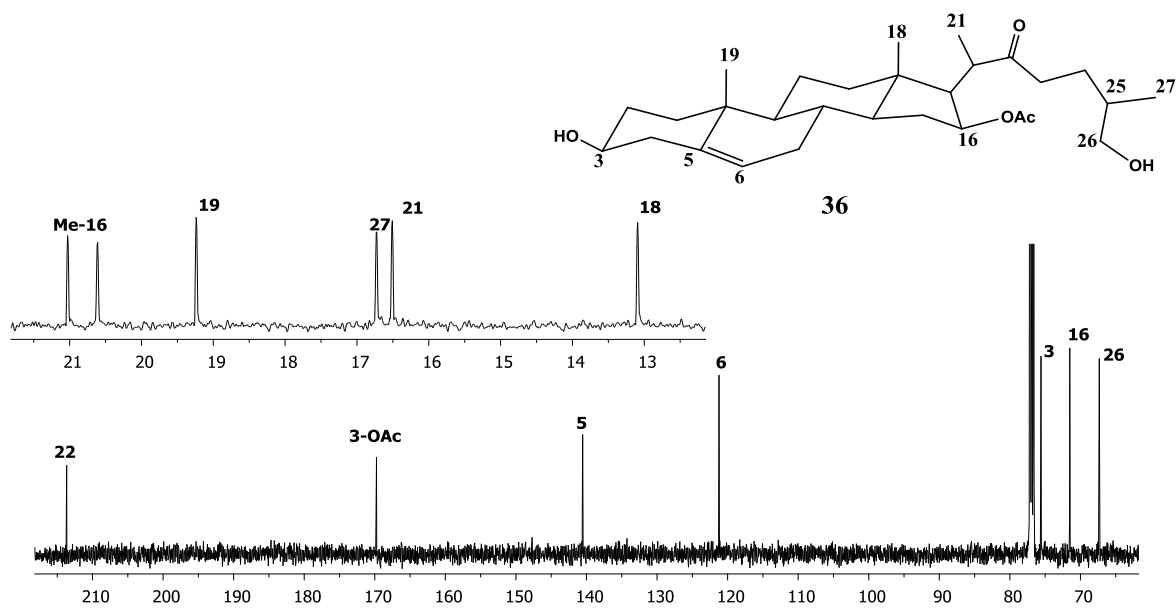
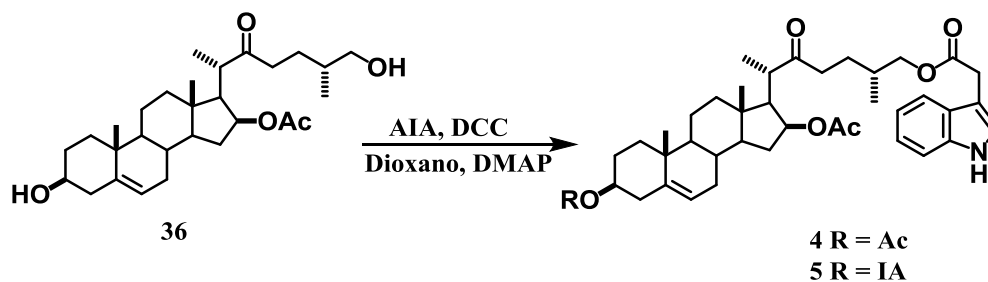


Figura 15. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para el compuesto **36**

En el espectro de RMN- ^{13}C (ver Figura 15) del compuesto **36** se aprecia la señal en 213.9 ppm, característica de C-22, que pertenece a un carbonilo de cetona y sólo se observa una señal de un carbonilo que corresponde al acetato de C-16 visualizándose en 170.1 ppm. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecen en 139.8 y 122.5 ppm. Las señales para C-3 y C-16 se observan en 75.9 y 74.0 ppm y en 67.7 ppm se aprecia la señal de C-26. En este compuesto sólo se observa la señal del metilo del acetato de C-16 en frecuencias más bajas 21.4 ppm. Los metilos restantes se presentan a frecuencias menores para C-27 en 17.0 ppm, C-21 en 16.9 ppm, C-19 y C-18 en 19.5 ppm y 13.5 ppm.

Una vez hidrolizada la posición C-3 se realiza la reacción de diesterificación de los alcoholes que se encuentran en las posiciones C-3 y C-26 de **36** para generar **4**.



La CCF de la reacción permitió observar la formación de un compuesto más polar que el diéster, obteniéndose como producto minoritario el compuesto **5** en el cual está ausente el éster en C-3.

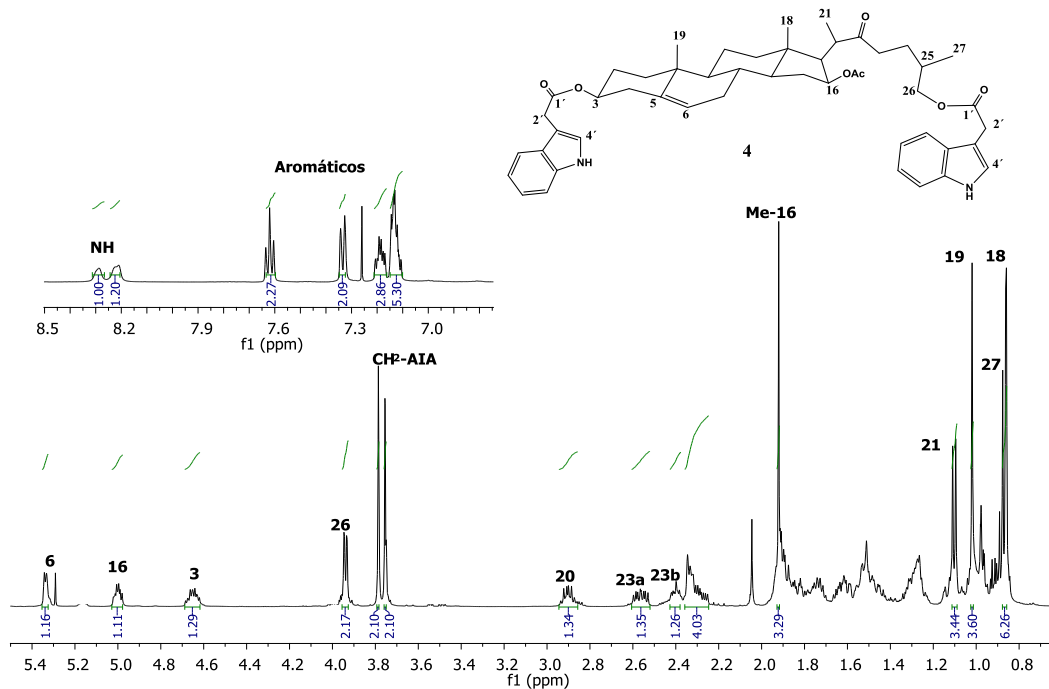


Figura 16. Espectro de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para el compuesto **4**.

El espectro de ^1H del compuesto **4** (Figura 16) se observa a frecuencias altas dos señales en 8.38 ppm de los protones unidos al N-H de los anillos indólicos mientras que los hidrógenos de los anillos aromáticos se encuentran en 7.62-7.12 ppm, los protones vinílicos de los anillos indólicos caen en la región de los aromáticos en 7.16 ppm, en 5.35 ppm se observa una señal doble del protón vinílico de H-6, una señal múltiple para H-16, el H-3 tiene un cambio significativo debido a la formación del éster desplazándose a campos bajos encontrándose en 4.6 ppm como una señal múltiple, posteriormente en los protones de H-26 se observa un cambio en su desplazamiento químico por el éster y se desplazan a frecuencias altas observándose en 3.9 ppm como señal doble con una constante de acoplamiento de $J_{25-26} = 6$ Hz, en 3.78 ppm se observan dos señales simples cada una íntegra para dos hidrógenos que corresponden a los protones de H-2' mientras que las señales a campos altos corresponden a la estructura del esteroide sin cambios notables en su desplazamiento.

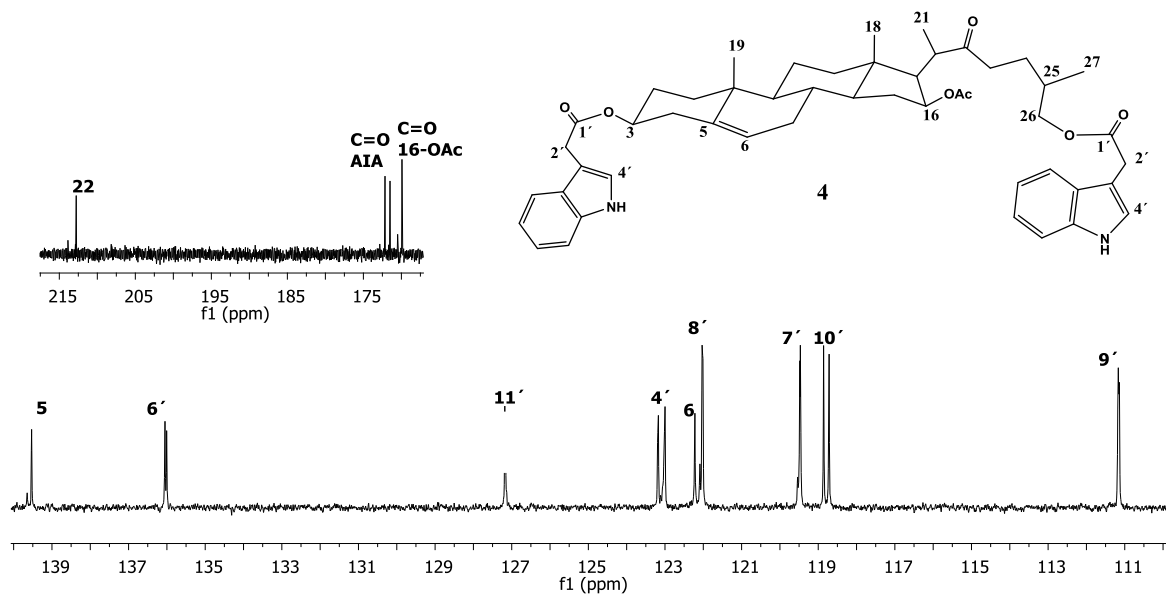


Figura 17. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para el compuesto **4**.

En el espectro de ^{13}C del compuesto **4** (Figura 17) se aprecia la señal en 213.9 ppm, característica de C-22, que pertenece a un carbonilo de cetona mientras que las señales observadas en 172.1 y 172.3 ppm corresponden a los carbonilos del diéster; el carbonilo del grupo acetato de C-16 se visualiza en 170.1 ppm. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecen en 139.8 y 122.5 ppm. Cabe mencionar que el compuesto **4** contiene en su estructura dos moléculas de IA acopladas. No se muestran cambios significantes en los desplazamientos, por lo que caen en la misma región, los carbonos vinílicos del IA C-3' y C-4' se aprecian en 108.0 ppm y 123.1 ppm. Los carbonos correspondientes al anillo aromático indólico se observan como C-6' en 136.0 ppm, C-7' en 119.5 ppm, C-8' en 122.1 ppm, C-9' en 111.2 ppm, C-10' en 118.7 ppm, C-11' en 127.4 ppm, mientras que a campos altos en 31.2 ppm se observan los C-2'. Las señales C-16 se observan en 74.0 ppm y en 67.7 ppm se aprecia la señal de C-26. Ahora bien, las señales del metilo correspondiente al acetato de C-16 se encuentra a frecuencias más bajas en 21.4 ppm. Los metilos restantes se presentan a frecuencias menores para C-27 en 17.0 ppm, C-21 en 16.9 ppm, C-19 y C-18 en 19.5 ppm y 13.5 ppm.

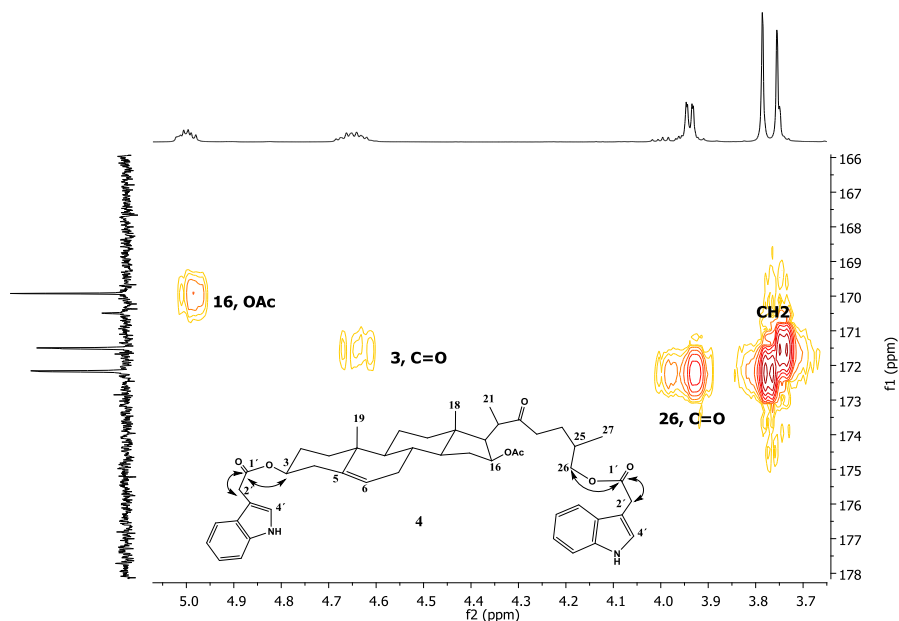


Figura 18. Experimento HMBC para el compuesto 4.

El experimento HMBC permitió asignar correctamente las señales para el carbonilo del grupo IA acoplado en la posición C-3 el cual se observa en 171.4 ppm, también se muestra un acoplamiento con su respectivo CH₂ el cual se encuentra en 3.76 ppm, el carbonilo del grupo IA acoplado en la posición C-26 se observa en 172.13 ppm el cual también acopla con su respectivo CH₂ que se encuentra en 3.78 ppm.

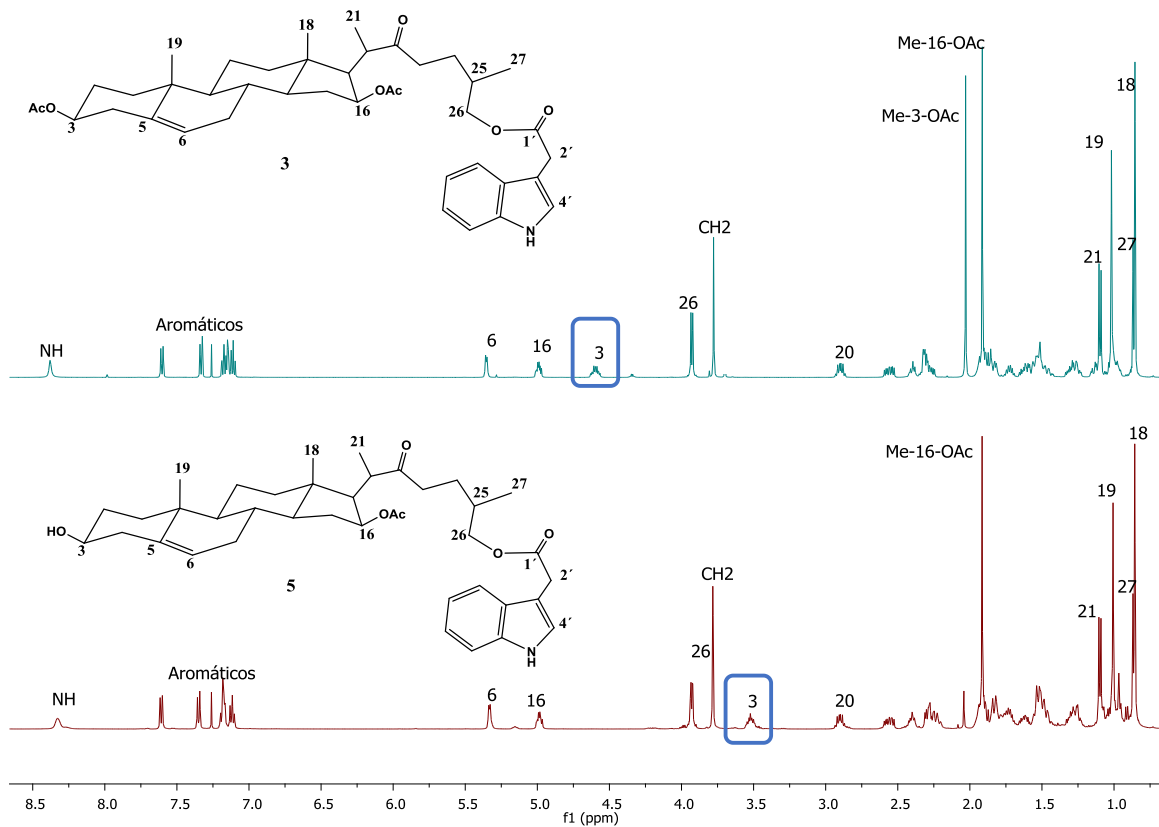


Figura 19. Espectro de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para el compuesto 5.

El espectro de RMN- ^1H del compuesto 5 (ver figura 19) se ha comparado con el espectro del compuesto 4 observando solamente el cambio significativo en la señal del H-3 el cual se desplaza a frecuencias bajas, observándose en 3.52 ppm como una señal múltiple las señales a frecuencias altas corresponden a la estructura del esteroide sin cambios notables en su desplazamiento.

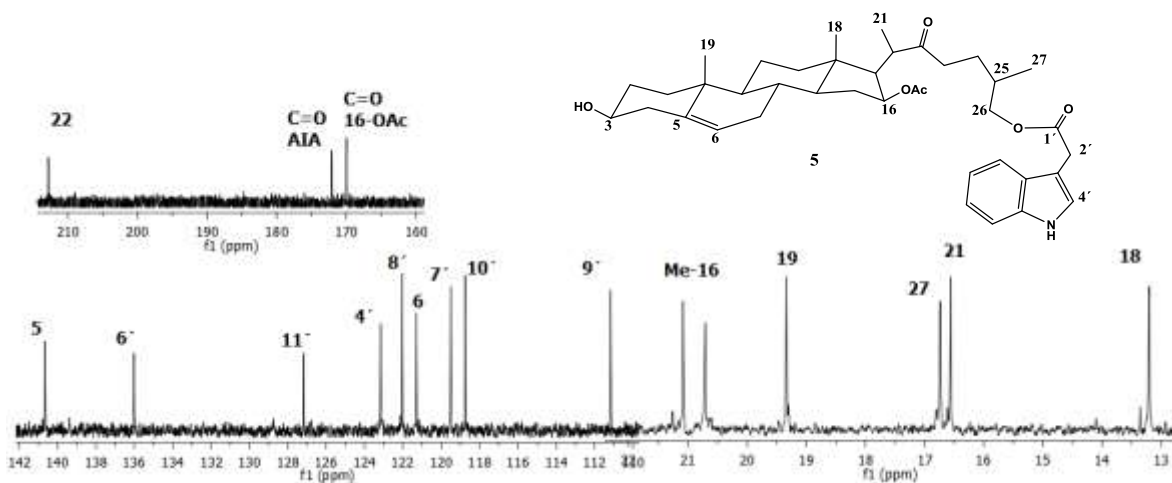
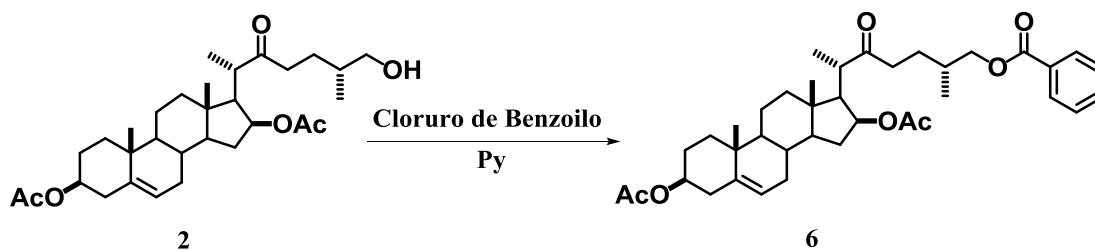


Figura 20. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para el compuesto **5**

En el espectro ^{13}C de RMN del compuesto **5** (ver figura 20) se aprecia la señal en 213.9 ppm, característica de C-22, la señal en 172.1 corresponde al carbonilo de éster; el carbonilo del grupo acetato de C-16 se visualiza 170.1 ppm. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecen en 139.8 y 122.5 ppm, los carbonos vinílicos del AIA C-3' y C-4' se aprecian en 108.0 y 123.1. Los carbonos correspondientes al anillo aromático indólico se observan como C-6' en 136.0 ppm, C-7' en 119.5 ppm, C-8' en 122.1 ppm, C-9' en 111.2 ppm, C-10' en 118.7 ppm, C-11' en 127.4 ppm, mientras que a campos altos en 31.2 ppm se observa el C-2'. Las señales para C-3 y C-16 se observan en 75.9 y 74.0 ppm y en 67.7 ppm se aprecia la señal de C-26. Las señales de los metilos correspondientes a los acetatos de C-3 y C-16 se encuentran a frecuencias más bajas, en 21.7 y 21.4 ppm. Los metilos restantes se presentan a frecuencias menores para C-27 en 17.0 ppm, C-21 en 16.9 ppm, C-19 y C-18 en 19.5 ppm y 13.5 ppm.



El grupo benzoilo ha sido utilizado como fluoróforo; éste se acoplo a la posición C-26 del compuesto **2** obteniendo el compuesto **6** en un 90% de rendimiento.

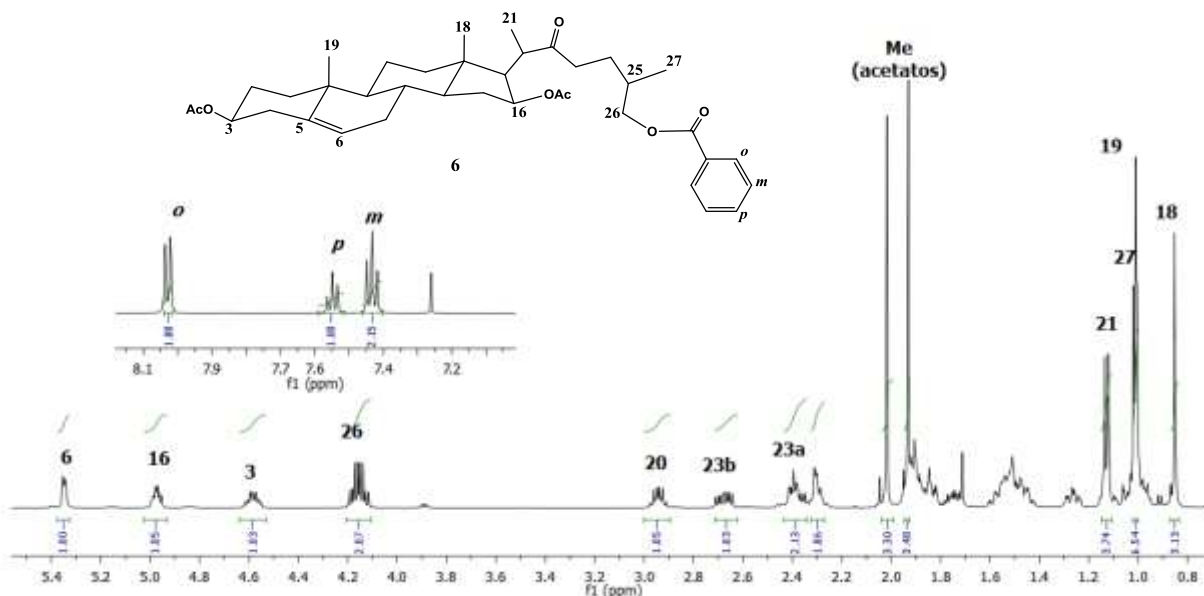


Figura 21. Espectro de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **6**.

El espectro de $\text{rmn-}^1\text{H}$ se observan las señales más características para el compuesto **6** (ver figura 21) a frecuencias altas las señales correspondientes a los protones del anillo aromático, los H-orto se observan en 8.04 ppm como una señal *d*, en 7.55 ppm se aprecia una señal *dd*, en 7.43 ppm se observa una señal *dd*, para los H-meta, posteriormente se observa la señal del protón vinílico del H-6 como una señal doble en 5.36 ppm $J_{6-7}=5.2$ Hz. El H-16 presenta una señal múltiple en 4.9 ppm, para la señal de H-3 también se observa una señal múltiple en 4.6 ppm. La señal de H-26 se observa frecuencias más altas debido a la presencia del éster en 4.16 ppm y se presentan como un sistema ABX. En frecuencias bajas se observa una señal *dc* que pertenece al protón H-20. Mientras que en 2.6 y 2.4 ppm se aprecian los protones H-23a y H-23b como señales múltiples. Los

protones de los metilos que pertenecen a los grupos acetatos en las posiciones de C-3 y C-16 se observan como señales simples, en 2.0 y 1.9 ppm mientras que los metilos 21 y 27 corresponden a señales dobles en 1.14 ppm ($J_{21-20} = 7.0$ Hz) y 0.92 ppm ($J_{27-25} = 6.5$ Hz). Los metilos 19 y 18 se observan como señales simples, en 1.02 y 0.86 ppm, respectivamente.

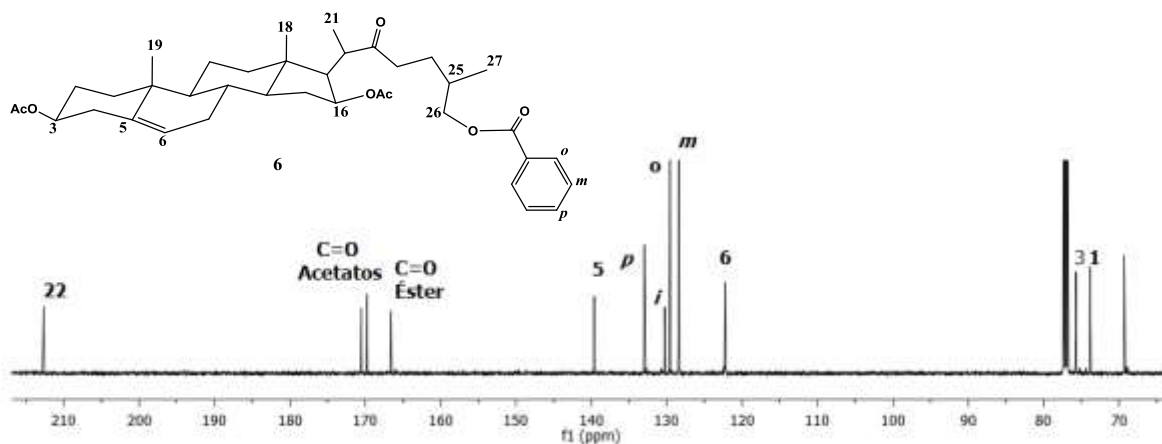


Figura 22. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del compuesto **6**.

Los fragmentos del espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **6** (ver figura 22) se observa a frecuencias altas el carbonilo de 22 en 212.8 ppm posteriormente las señales de los carbonilos de los grupos acetatos de C-3 en 170.4 y de C-16 en 169.9 ppm, las señales características del anillo aromático del benzoato en 132.9 ppm se observa el carbono *para*, en 130.4 ppm el carbono *ipso*, y en 129.7 y 128.3 ppm las señales correspondiente para los carbonos *orto* y *meta*.

vinílico del H-6 como una señal doble en 5.36 ppm se puede apreciar una constante de acoplamiento $J_{6-7} = 5.2$ Hz. el H-16 presenta una señal múltiple en 4.9 ppm, posteriormente se observa una señal *s* que integra para dos protones de CH₂ del grupo NA, para la señal de H-3 también se observa una señal múltiple en 4.6 ppm. La señal de H-26 se desplaza a frecuencias altas debido a la formación del éster observándose en 4.0 ppm y se presenta como un *d*, esto es debido a que se acopla con el protón de H-25 con una constante de acoplamiento $J_{25-26} = 6.0$ Hz. En campos altos se observa una señal *dc* que pertenece al protón H-20 que se acopla con los protones del metilo de 21 y el protón de 17 en 2.9 ppm. Mientras que en 2.6 y 2.4 ppm se aprecian los protones H-23a y H-23b como señales múltiples. Las señales en frecuencias bajas no presentan cambio en su desplazamiento y corresponden al esteroide.

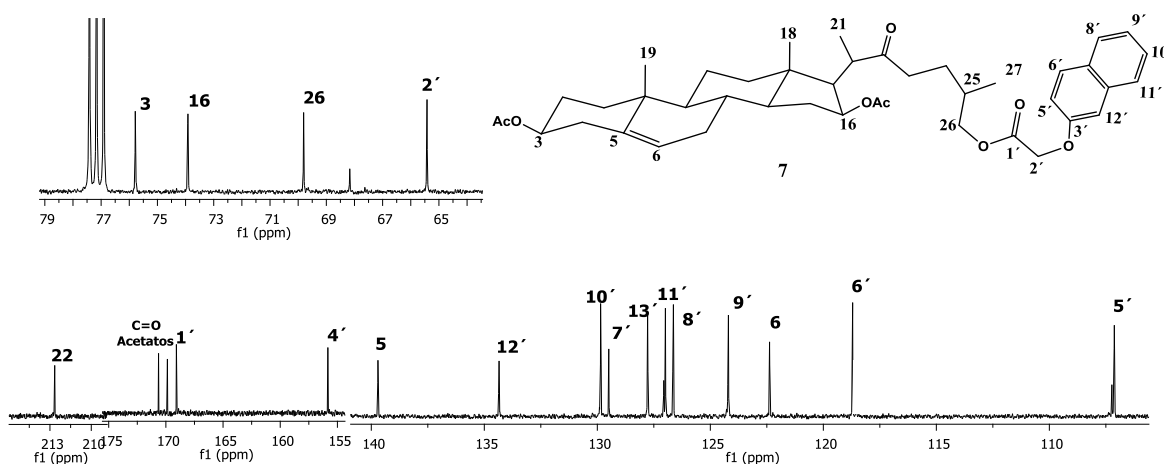


Figura 24. Espectro de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) del compuesto 7.

Los fragmentos del espectro de RMN-¹³C del compuesto **7** (Figura 24) permiten apreciar la señal del carbonilo de C-22 en 212.6 ppm posteriormente los carbonos de los carbonilos para los grupos acetato de C-3 y C-16 se visualizan en 170.8 y 170.1 ppm, la señal del grupo carbonilo del grupo NA se observa en 168.4 ppm. Las señales correspondientes al protones aromáticos se aprecian en un rango de 155.7 ppm - 127.85 ppm. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecen en 139.6 y 122.5 ppm. Las señales para C-3 y C-16 se observan en 75.9 y 74.0 ppm y en 67.7 ppm se aprecia la señal de C-26. La señal correspondiente para el CH₂ del grupo NA se observa en 65.4 ppm. Mientras que las señales de los metilos correspondientes a los acetatos de C-3 y C-16 se

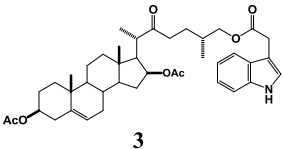
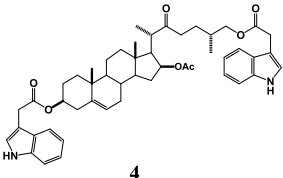
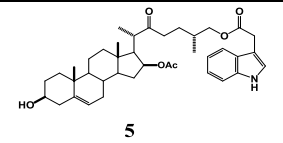
encuentran a frecuencias más bajas, en 21.7 y 21.4 ppm. Los metilos restantes se presentan a frecuencias menores para C-27 en 17.0 ppm, C-21 en 16.9 ppm, C-19 y C-18 en 19.5 ppm y 13.5 ppm.

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Con la finalidad de conocer la longitud de onda a la que los compuestos sintetizados tienen la mayor absorptividad, se midió la absorbancia de cada compuesto a diferentes longitudes de onda y se estimó la longitud de onda a la cual emiten fluorescencia dichos compuestos. Estos valores permitirán saber a qué determinada longitud de onda se puede irradiar la muestra una vez que se encuentre en tejido vegetal.

Para el caso de los compuestos **3**, **4** y **5**, se encontró que presentan mayor absorptividad entre los 303 y 307 nm, mientras que la fluorescencia emitida va desde los 433 a los 437 nm (Tabla 1).

Tabla 1. Valores λ de emisión de fluorescencia máxima obtenidos para los compuestos 3, 4 y 5.

Compuesto	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$, nm	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$, nm	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
AIA	307	350	--
 3	303	435	22389.31
 4	305	437	10683.59
 5	305	433	21962.02

El efecto de como los compuestos **3-7** como promotores de crecimiento vegetal se evaluó aplicándolo sobre plantas de *Allium cepa* L. comúnmente conocida como cebolla. En las siguientes imágenes se puede observar el crecimiento de las cebollas a 4 días de tratamiento con los compuestos promotores de crecimiento vegetal y una muestra control. Es evidente la diferencia en el crecimiento del tallo y raíz para las plantas de cebolla tratadas con los compuestos **3-7** como se observa en la figura 27.

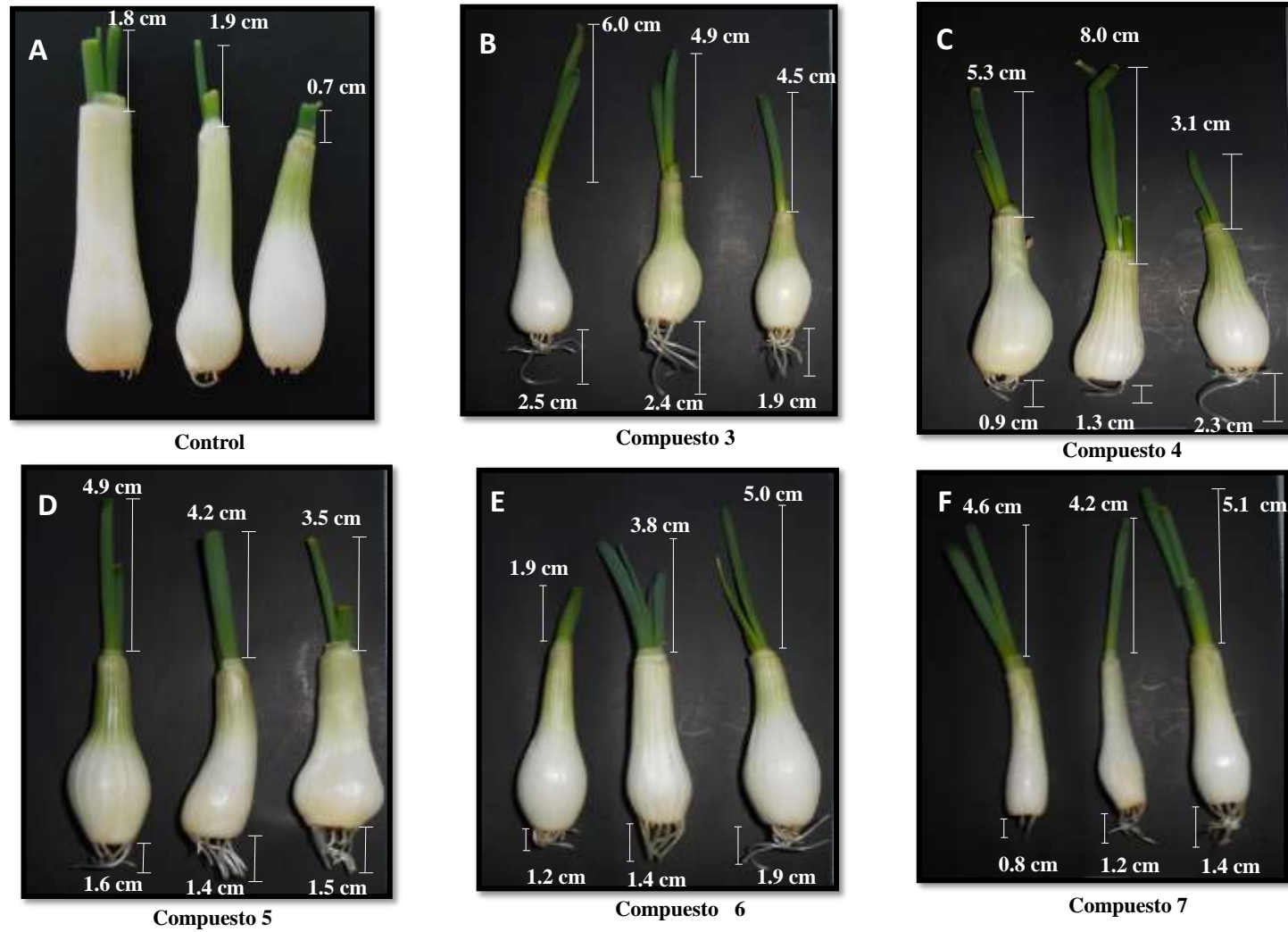


Figura 27. Efecto de los compuestos 3-7 en plantas de cebolla a 4 días de tratamiento.

Puede observarse que después de 4 días de tratamiento, la muestra control no presenta gran crecimiento de raíz, mientras que las muestras tratadas con los compuestos sintetizados 3-7 presentan mayor proliferación; el crecimiento de raíz se observó desde 0.8 cm para el tratamiento con el compuesto 7 hasta 2.3 cm con el tratamiento del compuesto 4. Por otra parte el crecimiento de tallo también presenta un mayor crecimiento para las muestras tratadas con los compuestos promotores de crecimiento, observando un crecimiento en tallo de 1.9 para la muestra tratada con el compuesto 6 hasta 8 cm para la muestra tratada con el compuesto 4; para las muestras control el tallo alcanzó una altura máxima de 1.9 cm.

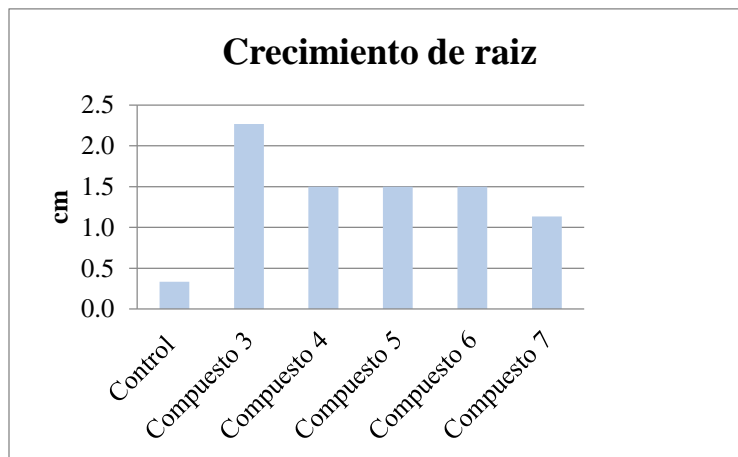


Grafico 1. Crecimiento promedio de raíz para la muestra control y el tratamientos con los compuestos 3-7

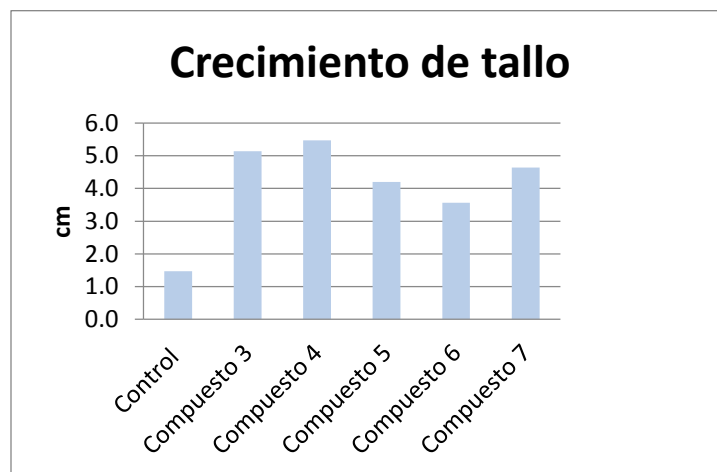


Grafico 2. Crecimiento promedio de tallo para la muestra control y el tratamientos con los compuestos 3-7

En los gráficos mostrados, se observa que el compuesto que favoreció el crecimiento en raíz fue el compuesto 3 (Grafico 1); mientras que el compuesto 4 se favoreció al aplicar el compuesto 4 (Grafico 2); demostrando que estos compuestos tienen efectos positivos al ser usados como promotores de crecimiento en plantas.

Las muestras de raíz de cebolla tratadas con los compuestos 3, 4, y 5, se observaron por microscopia de fluorescencia; uno fenómeno que se presentó al irradiar la muestra a diferentes longitudes de onda (405-646 nm) fue autofluorescencia (Figura 25).

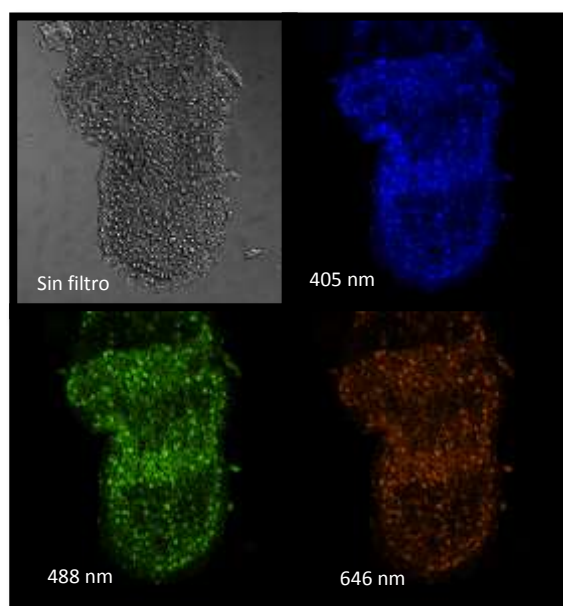


Figura 25. Imágenes tomadas por microscopio de fluorescencia para una muestra tratada con el compuesto que contiene el marcador de fluorescencia.

Se irradia la muestra control en el mismo rango de longitud de onda (405-646 nm), y también se observó autofluorescencia en la muestra control (Figura 26), este tipo de comportamiento se debe a la presencia de tejido vascular, el cual actúa en el transporte de diversas sustancias a través de la planta, desde las raíces hasta las hojas y desde las hojas a las otras partes.

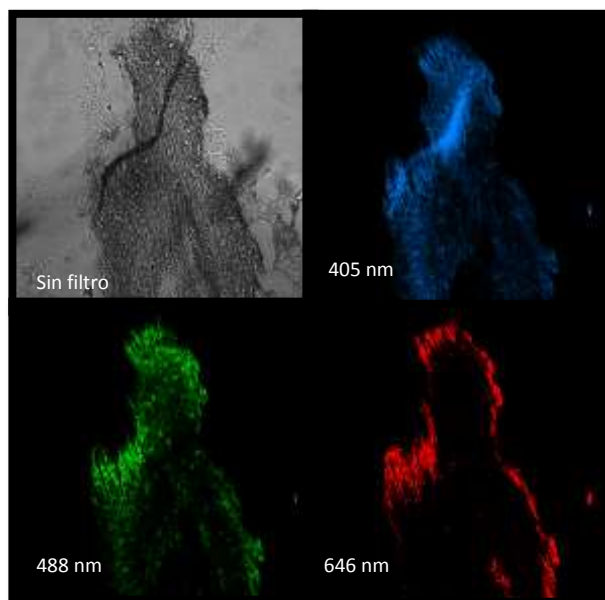


Figura 26. Imágenes tomadas por microscopio de fluorescencia para la muestra control.

Se tomaron nuevas muestras de tejido vegetal tratadas con los compuestos **3-7**, utilizando nuevamente raíz y tomando como muestra la catáfila de la cebolla, cuya función es de protección y almacenamiento de nutrientes y probablemente no se encuentre tanta clorofila o algún otro compuesto que pueda intervenir en su observación.

Las imágenes que se muestran en la siguiente figura, se puede observar que para las muestras de catáfila, no se observó fluorescencia con ninguno de los compuestos, ni en la muestra control.

Por su parte las muestras de raíz aunque presentan autofluorescencia, al realizar cortes con el microscopio se puede observar fluorescencia en una pequeña región de la muestra.

CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología para la síntesis de promotores de crecimiento vegetal que presentan en su estructura marcadores de fluorescencia, mediante rutas sintéticas de trabajo sencillas, accesibles y reproducibles.

Se evaluó el efecto de los compuestos sintetizados **3-7**, en una concentración de 0.1 mg/L, como promotores de crecimiento vegetal sobre plantas de cebolla. Los compuestos sintetizados demostraron tener efectos positivos al promover el crecimiento de raíz y tallo en plantas de cebolla, sin embargo se recomienda continuar con su evaluación en diferentes cultivos.

Se analizó por microscopia de fluorescencia la raíz de cebolla que se trató con los compuestos **3, 4 y 5**, sin embargo estas muestras y el control presentaron autofluorescencia. Se evaluó nuevamente raíz y la catáfila de plantas de cebolla tratadas con los compuestos **3-7**; el compuesto **4** pudo observarse en tejido vegetal.

Cada uno de los compuestos que se sintetizó en este trabajo fue caracterizado mediante técnicas físicas y espectroscópicas.

CAPÍTULO II

Síntesis de lactonas bisnorcolánicas a partir de estructuras 22-oxocolestánicas.

ANTECEDENTES

Lactonas bisnorcolánicas

En los últimos años se ha demostrado que muchas lactonas insaturadas de origen natural poseen actividad biológica importante; la mayoría de estos compuestos son del tipo γ -lactona. Las lactonas bisnorcolánicas (LBCs) son unidades estructurales de gran importancia ya que son precursores para la síntesis de diversos compuestos potencialmente activos³⁸ ya que presentan una actividad biológica relevante actuando como antitumorales, antimicóticos, citotóxicos, antipiréticos, anticancerígenos, etc.; un ejemplo claro de este tipo de compuestos es la vespertilina (**41**, ver figura 27).^{39,40,41,42}

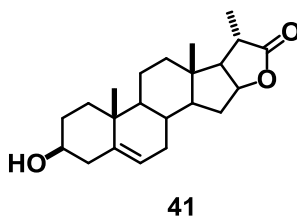


Figura 28. Estructura de la vespertilina aislada de los frutos del *Solanum vespertilio* Ait.

Importancia de las lactonas y su fuente de obtención

En años recientes se han aislado compuestos de diferentes fuentes naturales; que poseen en su estructura este tipo de lactonas las cuales se encuentran acopladas a otros compuestos permitiendo tener actividad biológica importante, como es el caso de la saponina **42**, cuya aglicona es un análogo de la vespertilina (hidroxilado en C-2) fue aislada de las hojas de *Cestrum nocturnum* L. (*Solanaceae*) un arbusto nativo de Sudamérica. Este nuevo análogo mostró buenos resultados en su evaluación citotóxica contra células tumorales.⁴³

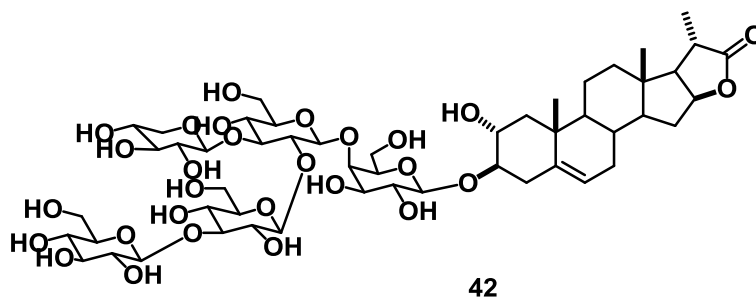


Figura 29. Compuesto 42 aislado del *Cestrum nocturnum* L.

El compuesto **43**, hidroxilado en C-3 y en C-1 glicosilado, se aisló de la especie *Paris polyphylla* var. *chinensis* la cual se encuentra distribuida en el suroeste de China. Esta saponina ha presentado actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer gástrico.⁴⁴

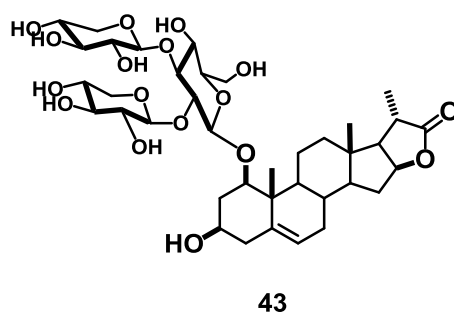
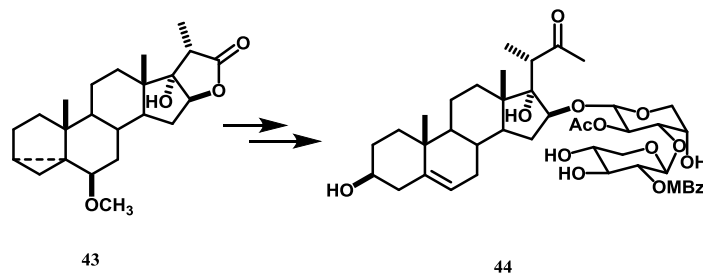


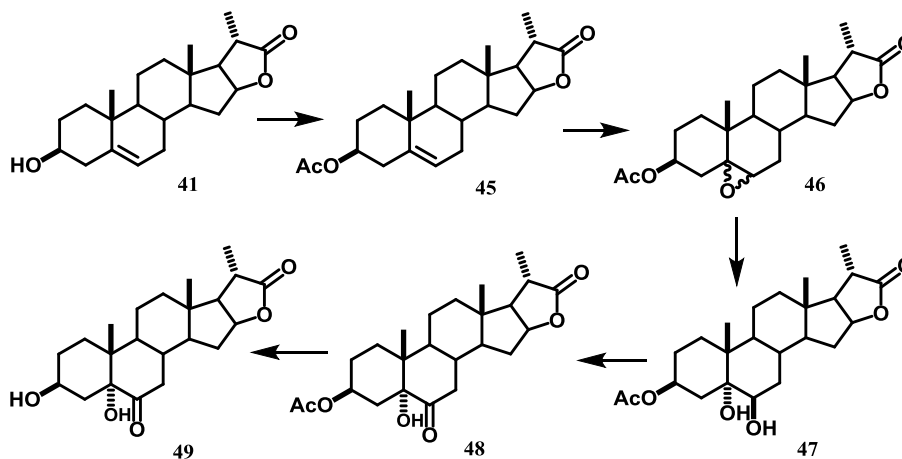
Figura 30. Lactona bisnorcolánica glicosilada, con importante actividad biológica.

La importancia de la vespertilina y sus análogos ha permitido sintetizar novedosos compuestos bioactivos. Tal es el caso de un análogo de vespertilina que contiene un grupo hidroxilo en C-17 (**43**) ha sido empleado para sintetizar análogos del OSW-1 (**44**), los cuales al comparar su actividad citotóxica contra la del OSW-1 mostraron tener mayor actividad anticancerígena.⁴⁵

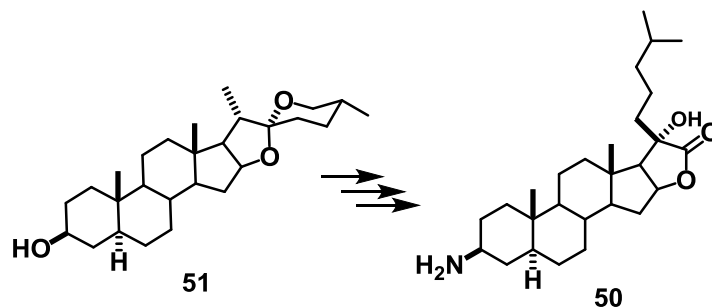


Esquema 31. Formación de análogos del compuesto OSW-1.

Otro ejemplo de estas transformaciones sobre el esqueleto de la vespertilina y análogos se describe por Mola-Garate⁴⁶ en el 2003 junto con su grupo de investigación sintetizó una nueva lactona bisnorcolánica **49**, (ver esquema 9), este compuesto presentó actividad biológica reguladora de crecimiento vegetal. La síntesis inicia con la vespertilina (**41**), la cual fue acetilada con anhídrido acético/piridina, siguiendo con una epoxidación del doble enlace que se encuentra en C-5, mediante un tratamiento con MCPBA, para generar la mezcla 70/30 de los epóxidos α y β (**46**). Posteriormente el anillo de ambos epóxidos se abre mediante una reacción con acetona-acuosa y ácido perclórico lo cual condujo mayoritariamente al 5α , 6β -diol el cual fue oxidado con reactivo de Jones para formar la cetona en C-6 (**48**). Después se realizó la hidrólisis básica del 3β -acetato para producir la lactona bisnorcolánica (20*S*)- 3β , 5α -dihidroxi-6-oxopregnano-20,16 β -carbolutona (**49**), en un 53%.

**Esquema 9. Síntesis de una nueva lactona bisnorcolánica, a partir de vespertilina.**

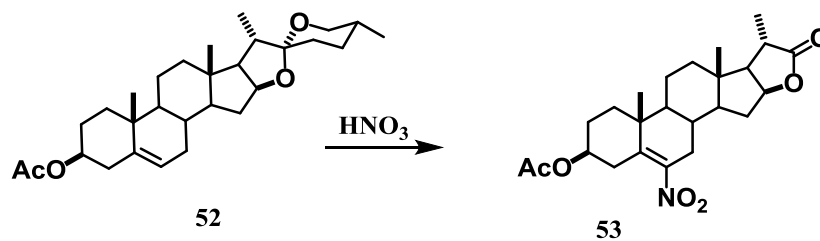
Forestieri⁴⁷ y colaboradores sintetizaron la clionamina B (**50**, ver esquema 10) a partir de derivados bisnorcolánicos mismos que fueron sintetizados a partir de la tigogenina (**51**). El compuesto **50** en pruebas biológicas estimuló fuertemente la autofagia en las células MCF-7 de cáncer de mama.



Esquema 10. Formación de la clionamina B (50).

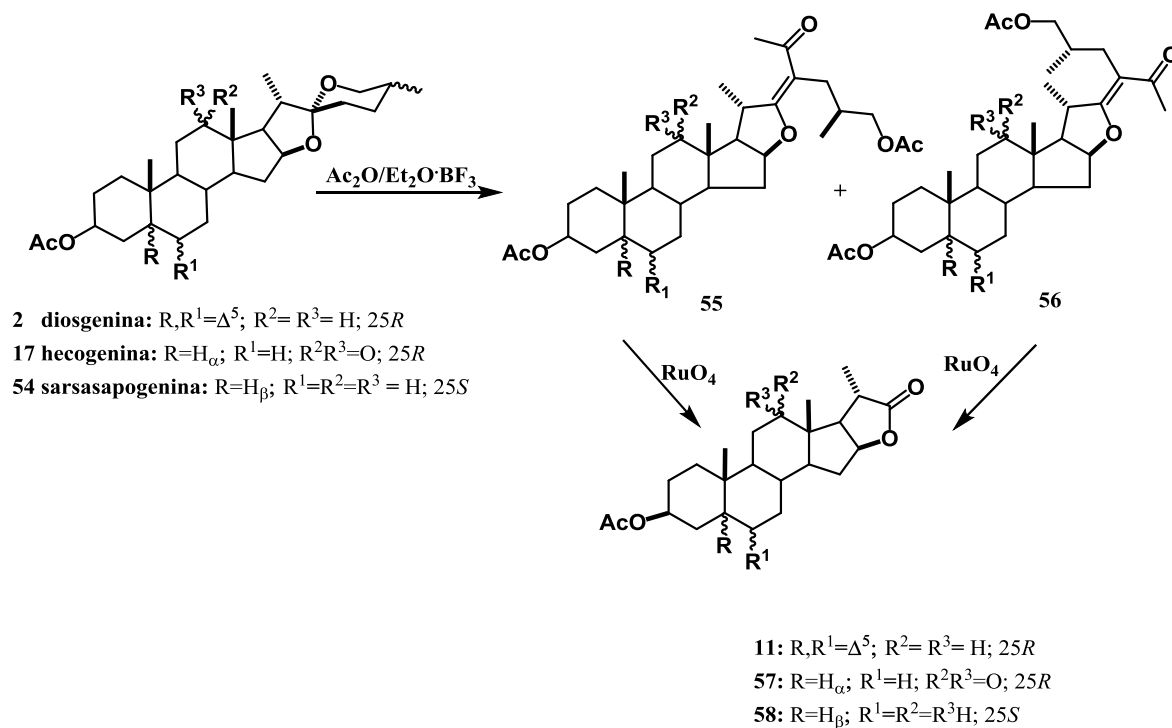
Formación de lactonas bisnorcolánicas.

Se han reportado varias síntesis para obtener LBCs y sus análogos a partir de otras sapogeninas esteroidales. En el 2004 Iglesias-Arteaga⁴⁸ mediante un tratamiento con ácido nítrico fumante sobre acetato de diosgenina (52) formo la lactona bisnorcolánica 53 con un grupo nitro en la posición C-6 como se muestra en el esquema 11.



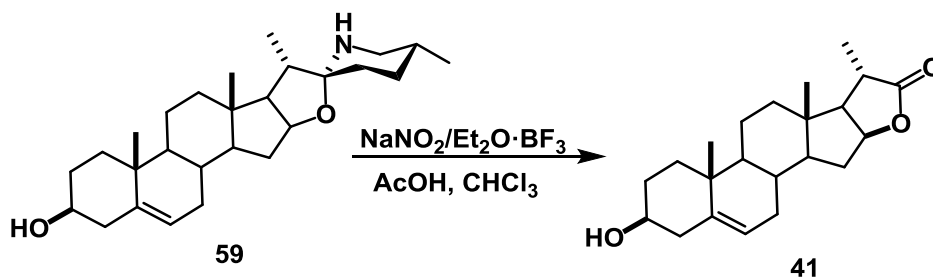
Esquema 11. Formación de una lactona bisnorcolánica en medio ácido.

Hernández-Linares⁴⁹ a partir de derivados 23-acetilfurost-22-enos (obtenidos a partir de diosgenina (2), hecogenina (17) y sarsapogenina (54) reportó la síntesis de lactonas bisnorcolánicas (ver esquema 12). Los furostenos (55, 56) se obtuvieron al hacer reaccionar una sapogenina esteroidal con $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ a temperatura ambiente, esto dio como resultado varios compuestos encontrando una apertura regioselectiva del anillo E en diferente proporción. Los dobles enlaces que se presentan en la cetona α, β -insaturada son oxidados selectivamente mediante RuO_4 dando como resultado la lactonas bisnorcolánicas con excelentes rendimientos.



Esquema 12. Formación de LBCs a partir de 23-acetilfurost-22-enos.

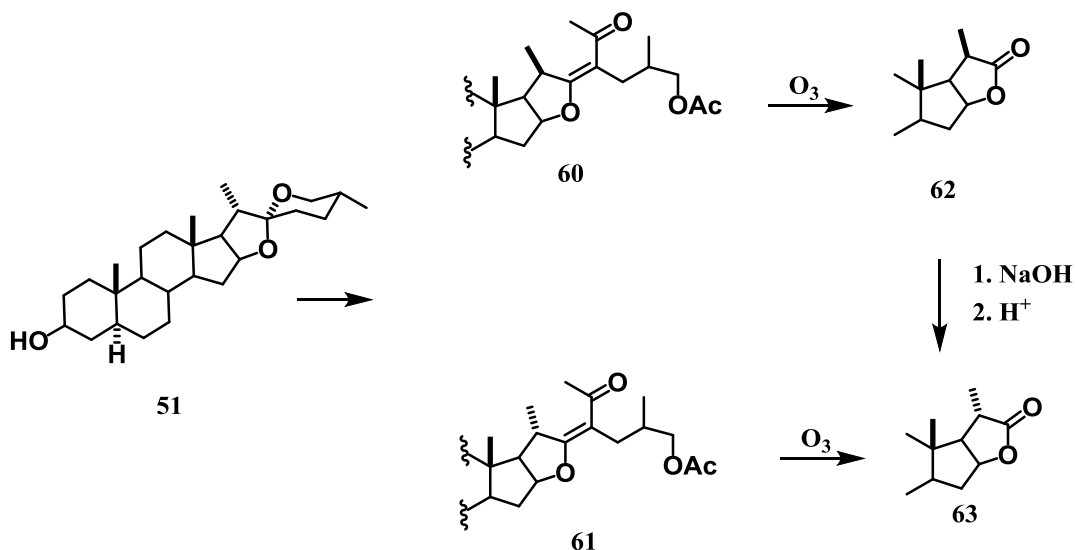
En el 2012 Nakata⁵⁰ a partir de alcaloides como la solasodina (**59**) obtuvo vespertilina en un solo paso preparó **41** empleando $\text{NaNO}_2/\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ en AcOH y CHCl_3 con un rendimiento de 48% (ver esquema 13).



Esquema 13. Formación de vespertilina a partir de solasodina.

Tian⁵¹ en 1994 hizo reaccionar tigogenina (**51**, esquema 14) con anhídrido acético en presencia de un ácido de Lewis y obtuvo 2 productos (**60** y **61**), los cuales al ser

sometidos a ozonización produjeron las lactonas 20*R* (**62**) y 20*S* (**63**). La lactona 20*R* pudo ser convertida en la lactona 20*S* en presencia de NaOH, a reflujo.



Esquema 14. Formación de una lactona bisnorcolánica 20*S* (62**) y su epímero 20*R* (**63**), a partir de tigogenina.**

Se han obtenido LBCs al tratar diferentes espirostanos en medio ácido u oxidante también se han obtenido a partir de alcaloides como la solasodina usando un medio ácido; sin embargo, aún hace falta investigar su obtención a partir derivados 22-oxocolestánicos, bajo la acción de diferentes medios básicos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Obtener LBCs mediante una nueva metodología, usando estructuras 22-oxocolestánicas en medio básico. Estas condiciones de reacción implican efectuar una ruptura inusual del enlace entre los átomos de carbono C-22/C-23.

Objetivos específicos:

- Usar estructuras 22-oxocolestánicas con diferentes sustituyentes en C-26 para observar la reactividad de la cadena lateral para la formación del compuesto (20*S*)-3*β*-acetoxipregn-5-eno-20,16*β*-carbolactona.
- Proponer un mecanismo de reacción adecuado para la formación del compuesto (20*S*)-3*β*-acetoxipregn-5-eno-20,16*β*-carbolactona.
- Caracterizar los compuestos obtenidos mediante técnicas físicas y espectroscópicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos y técnicas utilizadas.

Los puntos de fusión son determinados por la técnica de capilar abierto en un equipo Melt-temp, utilizando la escala de grados centígrados; no fueron corregidos.

Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrofotómetro Agilent Cary 630 FTIR, los datos se expresaran en números de onda $\bar{\nu}$ (cm^{-1}).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se obtuvieron en un espectrómetro Varian-Mercury multinuclear de 400 MHz para ^1H y de 100 MHz para ^{13}C . Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertzios (Hz). La multiplicidad de las señales de los espectros de ^1H está referida como: *s* para una señal simple, *d* para una señal doble, *dd* para una señal doble de dobles, *ddd* para una señal doble de doble de dobles, *dc* para una señal doble de cuartetos y *m* para una señal múltiple.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 empleando soluciones de cloroformo, en celdas de 10 cm de longitud y utilizando la línea D del sodio (589.3 nm), a temperatura ambiente.

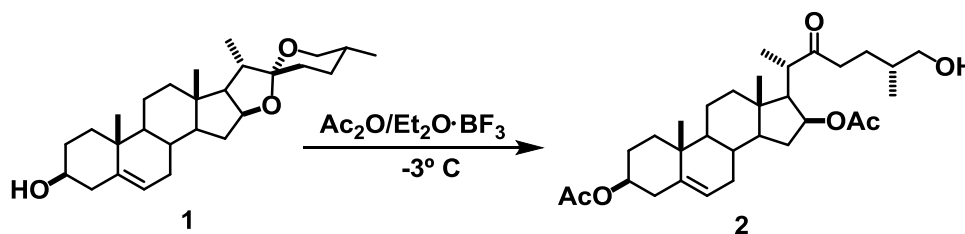
Cada reacción que se realizó se monitoreo mediante cromatografía en capa fina (CCF) en este caso se utilizan placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor que contienen indicador de fluorescencia (F_{254}). Para su revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara de UV-G-54) y por calcinación, previo tratamiento con ácido sulfúrico al 50%.

Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas de vidrio las cuales fueron empacadas con gel de sílice grado 60 (230-400 mallas) de acuerdo a la técnica de cromatografía tipo *flash*,¹ utilizando sistemas de elución de acetato de etilo-hexano.

¹ Still, W. C.; Kahn, M; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, 14, 2923-2925.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizaron directamente sin purificar, todos los disolventes se purificaron y secaron de acuerdo con las técnicas publicadas en la literatura.²

Formación del diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (2).



Se disolvieron 5 g (12 mmol) de diosgenina en 35 mL de CH₂Cl₂, se agregaron lentamente 12.5 mL (130 mmol) de anhídrido acético. La mezcla se enfrió a -3 °C y se agregaron gota a gota 10 mL (80 mmol) de Et₂O·BF₃. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se vertió sobre un baño de hielo. La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂, se lavó con salmuera (2 x 100 mL), solución saturada de NaHCO₃ (4 x 100 mL) y finalmente con agua destilada (2 x 100 mL) se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 7:3. Se obtuvo un polvo color blanco con un rendimiento de 56%. p.f.: 152-154°C, [α]_D: -0.3(c 1.0, CHCl₃).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.4 (1H, d, J_{6-7} =5.2 Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.6 (1H, m, H-3), 3.4 (2H, d, J_{26-25} =6.2 Hz, CH₂-26), 2.9 (1H, dc, J_{20-21} =6.8 Hz H-20), 2.6 (1H, m, H-23), 2.4 (1H, m, H-23b), 2.4 (1H, m, H-15a), 2.0 (3H, s, CH₃COO-16), 1.9 (3H, s, CH₃COO-3), 0.9 (3H, d, J_{27-25} =6.8 Hz, CH₃-27), 1.14 (3H, d, J_{21-20} =7.2 Hz, CH₃-21), 1.0 (3H, s, CH₃-19), 0.86 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 36.6 (C-1), 27.9 (C-2), 74.03 (C-3), 38.2 (C-4), 139.8 (C-5), 122.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.0 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.45 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 38.7 (C-23), 26.3 (C-24), 35.6 (C-25), 67.8 (C-26),

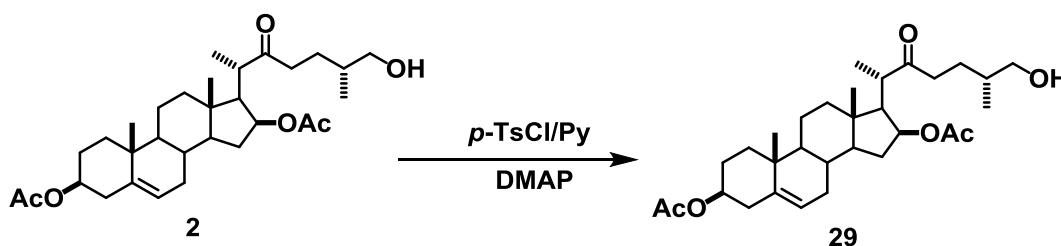
² Perrin, D. P.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. 4th. Ed. Butterworth-Heinemann Press: Oxford, 1996.

16.9 (C-27), 170.2 (CH₃COO-16), 169.9 (CH₃COO-3), 21.5 (CH₃COO-16), 21.3 (CH₃COO-3).

IR (cm⁻¹): 3456 (OH), 2931 (CH, alifático), 1719 (C=O, cetona), 1708 (C=O, acetato), 1596 (C=C).

EMAR (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₄₉O₇ 517.3529, observado 517.3521.

Formación del 3,16-diacetato-26-tosilato de (25R)-22-oxocolest-5-eno-3β,16β,26-triilo (29).



Se disolvieron 3 g (2.0 mmol) del compuesto **3** en 15 ml de CH₂Cl₂ y se agregaron 0.5 g (16.4 mmol) de DMAP y 5.2 g (26.2 mmol) de *p*-TsCl. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación, aislada de cualquier fuente de luz, durante 8 h. Posteriormente se lavó con HCl al 5% (3 x 50 mL), solución saturada de NaHCO₃ (1 x 50 mL), salmuera (2 x 50 mL) y agua (2 x 50 mL). Se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 8:2. El producto puro es un polvo fino color blanco con un rendimiento del 90% que presentó un p.f.: 129-131 °C. [α]_D: -3.05 (c 1.0, CHCl₃).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.76 (2H, m, H-orto), 7.34 (2H, m, H-meta), 5.4 (1H, d, *J*₆₋₇ = 4.8 Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.6 (1H, m, H-3), 3.8 (2H, m, CH₂-26), 2.9 (1H, dc, *J*₂₀₋₂₁ = 6.8 Hz, H-20), 2.57 (1H, m, H-23), 2.4 (3H, s, CH₃-OTs), 2.0 (3H, s, CH₃COO-16), 1.9 (3H, s, CH₃COO-3), 1.14 (3H, d, *J*₂₁₋₂₀ = 6.8 Hz, CH₃-21), 1.0 (3H, s, CH₃-19), 0.86 (3H, s, CH₃-18).

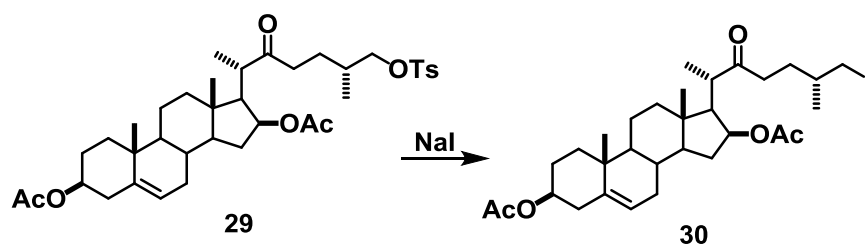
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 37 (C-1), 27.9 (C-2), 73.8 (C-3), 38.2 (C-4), 139.8 (C-5), 122.5 (C-6), 31.8 (C-7), 31.4 (C-8), 49.7 (C-9), 36.6 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.7

(C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.9 (C-16), 55.2 (C-17), 13.45 (C-18), 19.5 (C-19), 43.7 (C-20), 16.7 (C-21), 213.9 (C-22), 32.7 (C-23), 26.5 (C-24), 32.6 (C-25), 74.4 (C-26), 17.2 (C-27), 170.2 (CH_3COO -16), 169.9 (CH_3COO -3), 21.5 (CH_3COO -16), 21.3 (CH_3COO -3).

IR (cm^{-1}): 2936 (CH, alifático), 1719 (C=O, cetona), 1708 (C=O, acetato), 1449 (C=C), 1347, 1238, 932 (OTs).

EMAR (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{O}_8$ 671.3618, observado 671.3621.

Formación del 3,16-diacetato de (25R)-22-oxo-26-yodocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (30).



Se disolvieron 2.77g (1.5 mmol) de **29** en 20 mL de acetona, se agregaron 3.74 g (15 mmol) de NaI; la mezcla se mantuvo a reflujo durante 7 h y posteriormente se evaporó la acetona. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 (100 ml) y se lavó con solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 x 50 mL) y agua destilada (5 x 50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna con un sistema 9:1 hexano/AcOEt. El compuesto se obtuvo en 85% presentó un color blanco-nácar. p.f.: 188-190°C, $[\alpha]_{\text{D}}: +4.70$ (c 1.0, CHCl_3).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.3 (1H, d, $J_{6-7}=4.8$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.56 (1H, m, H-3), 3.19 (1H, dd H-26a), 3.12 (1H, dd, H-26b), 2.9 (1H, dc, $J_{20-21}=6.8$ Hz, H-20), 2.64 (1H, m, H-23), 1.94 (3H, s, CH_3COO -16), 2.03 (3H, s, CH_3COO -3), 1.1 (3H, d, $J_{21-20}=6.8$ Hz, CH_3 -21), 1.0 (3H, s, CH_3 -19), 0.84 (3H, s, CH_3 -18).

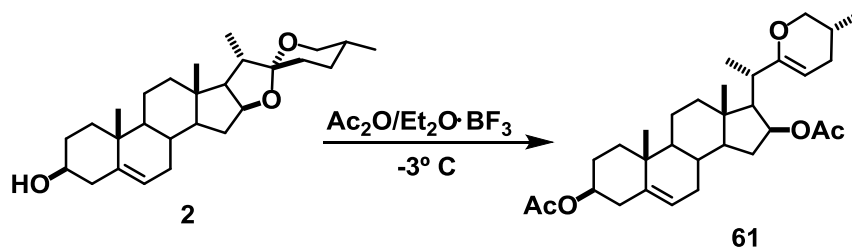
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 36.9 (C-1), 27.9 (C-2), 73.8 (C-3), 38.2 (C-4), 139.4 (C-5), 122.1 (C-6), 31.7 (C-7), 31.4 (C-8), 49.8 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.8 (C-12), 41.9 (C-13), 53.9 (C-14), 34.8 (C-15), 75.7 (C-16), 55.0 (C-17), 13.45 (C-18), 19.5 (C-19), 43.5 (C-20), 16.9 (C-21), 212.1 (C-22), 38.3 (C-23), 30.2 (C-24), 34.3 (C-25), 17.2 (C-26),

20.5 (C-27), 160.5 (CH₃COO-16), 170.3 (CH₃COO-3), 21.4 (CH₃COO-16), 21.6 (CH₃COO-3).

IR (cm⁻¹): 2942 (CH, alifático), 1722 (C=O, cetona), 1709 (C=O, acetato), 1597 (C=C), 1235 (C-I).

EMAR (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₄₈O₅ 627.2546, observado 627.2535.

Formación del 3,16-diacetato de (25R)-22,26-epoxicolesta-5,22-dieno-3β, 16β-diilo (61)



Se disolvieron 1 gr (2.4 mmol) del compuesto **2** en 10 mL de CH₂Cl₂, la solución se enfrió a -3 °C. Se preparó inmediatamente una solución de 2.3 mL (24.3 mmol) de anhídrido acético y 3 mL (21.1 mmol) de Et₂O·BF₃ y se enfrió a -3 °C. La solución antes preparada se agregó a la solución que contiene a **2**. La reacción se mantuvo en agitación durante 5 min. Posteriormente se le agregaron 6.7 mL (48 mmol) de Et₃N. Para terminar la reacción agregaron 10 ml de NH₄OH y se dejó en agitación durante 10 min. La fase orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (3x50 mL), con agua destilada (2x50 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna con un sistema hexano/AcOEt 97:3 obteniendo un polvo blanco. p.f.: 159-162 °C, [α]_D: -21.7° (c 1.0, CHCl₃).

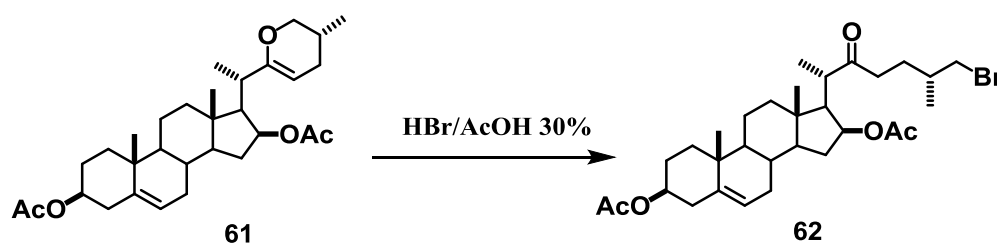
RMN ¹H (400 MHz, δ): 5.35 (1H, d, *J*_{6,7_{ec}} = 4.3, H-6), 5.12 (1H, m, H-16), 4.59 (1H, m, H-3), 4.35 (1H, dd, *J*_{23, 24_{ax}} = 4.7, *J*_{23, 24_{ec}} = 2.5, H-23), 3.90 (1H, ddd, *J*_{gem} = 10.2, *J*_{26_{ec},25} = 3.2, *J*_{26_{ec},24_{ec}} = 1.6, H-26_{ec}), 3.38 (1H, dd, *J*_{gem} = *J*_{26_{ax},25} = 10.0, H-26_{ax}), 2.41 (1H, dc, *J*_{20,21} = 11.2, *J*_{20,17} = 7.2, H-20), 2.32 (1H, m, H-4), 2.30 (1H, m, H-15_a), 2.03 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.97 (3H, s, CH₃CO₂-16), 1.13 (3H, d, *J*_{21,20} = 7.0, CH₃-21), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.88 (3H, d, *J*_{27,25} = 6.5, CH₃-27), 0.87 (3H, s, CH₃-18).

RMN ^{13}C (100 MHz, δ): 36.9 (C-1), 27.7 (C-2), 73.8 (C-3), 38.0 (C-4), 139.7 (C-5), 122.3 (C-6), 31.6 (C-7), 31.4 (C-8), 49.9 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 42.0 (C-13), 54.4 (C-14), 34.7 (C-15), 75.0 (C-16), 56.1 (C-17), 12.6 (C-18), 19.3 (C-19), 36.0 (C-20), 19.6 (C-21), 157.8 (C-22), 93.4 (C-23), 28.7 (C-24), 27.3 (C-25), 71.7 (C-26), 17.1 (C-27), 170.3 (CH_3CO_2 -3), 170.6 (CH_3CO_2 -16), 21.5 (CH_3CO_2 -3), 21.4 (CH_3CO_2 -16).

IR (cm^{-1}): 2939 (CH, alifático), 1729 (C=O, acetato), 1671 (C=C).

EMAR: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5$ 498.3345; observado 499.3420.

Formación del 3,16-diacetato de (25R)-26-bromo-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β -diilo (62)



Se disolvieron 1 gr (2.5 mmol) del compuesto **61** en 50 mL de CH_2Cl_2 , se agregaron 10 mL de HBr/AcOH , al 30%. La reacción se mantuvo en agitación durante 3 h. La fase orgánica se extrajo CH_2Cl_2 , se lavó con solución saturada de NaHCO_3 (2 x 50 mL), salmuera (2 x 50 mL) y agua destilada (2 x 50 mL). La solución orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida. El compuesto **62** se obtuvo como un sólido blanco (rendimiento 45%). p.f.: 190-192 °C

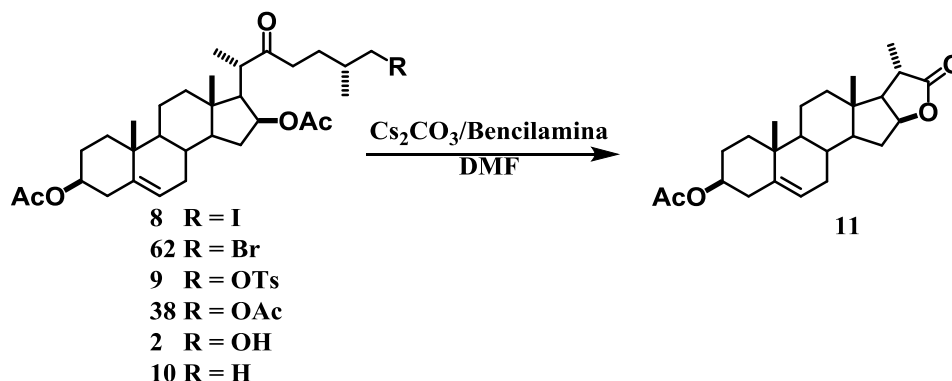
RMN ^1H (400 MHz, δ): 5.36 (1H, d, $J_{6,7ec} = 5.11$, H-6), 4.98 (1H, m, H-16), 4.59 (1H, m, H-3), 3.38 (1H, dd, $J_{26a,25} = 4.85$, $J_{gem} = 9.7$, H-26_a), 3.31 (1H, dd, $J_{26a,25} = 5.87$, $J_{gem} = 9.96$, H-26_b), 2.95 (1H, dc, $J_{20,21} = 14.3$, $J_{20,17} = 7.0$, H-20), 2.62 (1H, m, H-23_a), 2.41 (1H, m, H-15_a), 2.03 (3H, s, CH_3CO_2 -3), 1.96 (3H, s, CH_3CO_2 -16), 1.14 (3H, d, $J_{21,20} = 7.2$, CH_3 -21), 1.02 (3H, s, CH_3 -18), 1.01 (3H, d, $J_{27,25} = 6.6$, CH_3 -27), 0.86 (3H, s, CH_3 -19).

RMN ^{13}C (100 MHz, δ): 36.8 (C-1), 27.7 (C-2), 73.8 (C-3), 38.0 (C-4), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 31.6 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.6 (C-12), 41.8 (C-13), 53.9 (C-14), 34.8 (C-15), 75.7 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-

20), 16.7 (C-21), 212.5 (C-22), 38.2 (C-23), 28.4 (C-24), 34.5 (C-25), 40.8 (C-26), 18.5 (C-27), 169.8 (CH₃CO₂-3), 170.5 (CH₃CO₂-16), 21.2 (CH₃CO₂-3), 21.4 (CH₃CO₂-16).

IR (cm⁻¹): 2935 (CH, alifático), 1729 (C=O, cetona), 1709 (C=O, acetato), 1597 (C=C), 1237 (C-Br).

Metodo general para la formación de (20S)-3β-acetoxi-5-eno-pregnan-20,16β-carbolactona utilizando como medio básico Cs₂CO₃ (11).



Se disolvieron 100 mg (0.1597 mmol) de **2**, **8**, **9**, **10**, **38** o **62** en 3 ml de DMF anhidro, se agregaron 116 mg (0.32 mmol) de base inorgánica, posteriormente se agregaron 34 μL (0.32 mmol) de bencilamina. La mezcla de reacción se colocó a reflujo con agitación constante alcanzando una temperatura de 140° C durante 2 horas. La fase orgánica se extrajo con AcOEt, se lavó con agua destilada (2x50 mL) y HCl 5% (2x 50mL) se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema hexano/AcOEt 9:1, obteniendo un sólido color blanco. p.f.: 35-38°C, [α]_D: -24.1° (c = 1.0, CHCl₃).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.3 (1H, d, *J*₆₋₇ = 5.2 Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-16), 4.5 (1H, m, H-3), 2.5 (1H, dc, *J*₂₀₋₂₁ = 7.6 Hz H-20), 2.29 (1H, m, H-15a), 2.0 (2H, m, H-4), 2.0 (3H, s, CH₃COO-3), 1.2 (3H, d, *J*₂₁₋₂₀ = 8 Hz, CH₃-21), 1.0 (3H, s, CH₃-19), 0.86 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 36.6 (C-1), 27.6 (C-2), 73.67 (C-3), 38.1 (C-4), 139.7 (C-5), 121.8 (C-6), 31.8 (C-7), 31.1 (C-8), 49.9 (C-9), 36.9 (C-10), 21.3 (C-11), 37.9 (C-12), 41.39 (C-13), 54.68 (C-14), 33.0 (C-15), 82.66 (C-16), 58.87 (C-17), 13.65 (C-18), 19.27

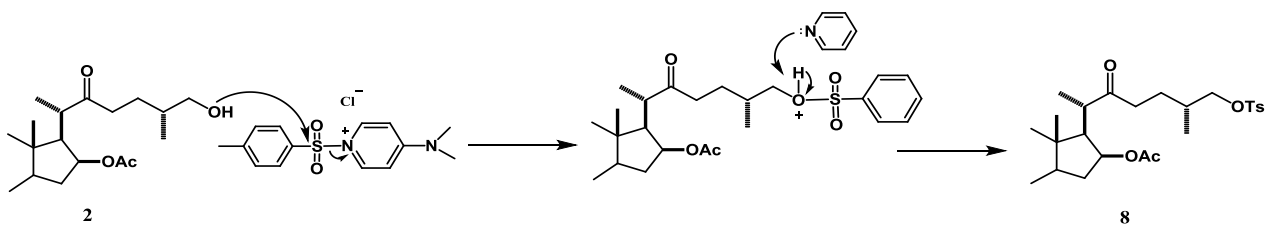
(C-19), 35.99 (C-20), 17.95 (C-21), 181.27 (C-22), 170.512 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ O-3), 20.24 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-3}$).

IR (cm^{-1}): 2937 (C-H alifático), 1739 (C=O, lactona de 5 miembros), 1709 (C=O, acetato), 1451 (C=C), 1183 (O-C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la literatura existen reportes de síntesis de lactonas bisnorcolánicas al tratar diferentes espirostanos en condiciones de reacción ácidas u oxidantes. En este trabajo de tesis se describe una nueva vía de formación de LBCs partiendo del 3,16-diacetato de (25*R*)-22-oxo-26-yodocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (**30**), mediante una fisión sorprendente, del enlace C-22/C-23. Este hallazgo condujo a preparar una serie de compuestos 22-oxocolestánicos, para determinar la influencia de sustituyentes en el carbono C-26. Para lograr lo anterior, como primer paso se realizó la apertura regioselectiva de los anillos E y F de la diosgenina bajo la acción de Et₂O·BF₃, en presencia de anhídrido acético, a -3 °C (ver esquema 4, del capítulo I). Bajo las condiciones mencionadas se obtuvo el compuesto 3,16-diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (**2**), el cual se caracterizó debidamente mediante sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C (Figuras 9 y 10).

Un segundo derivado sintetizado fue el tosilato **8**, cuya preparación fue rápidamente efectuada a partir del alcohol **2** y el cloruro de tosilo empleando piridina como disolvente y DMAP como catalizador de esterificación. La piridina sustituida en la posición 4 con un grupo dimetil amino (DMAP) es un mejor catalizador que la piridina debido al efecto electrodonador del sustituyente dimetilamino (ver esquema 15).



Esquema 15. Mecanismo de formación del derivado tosilato 8.

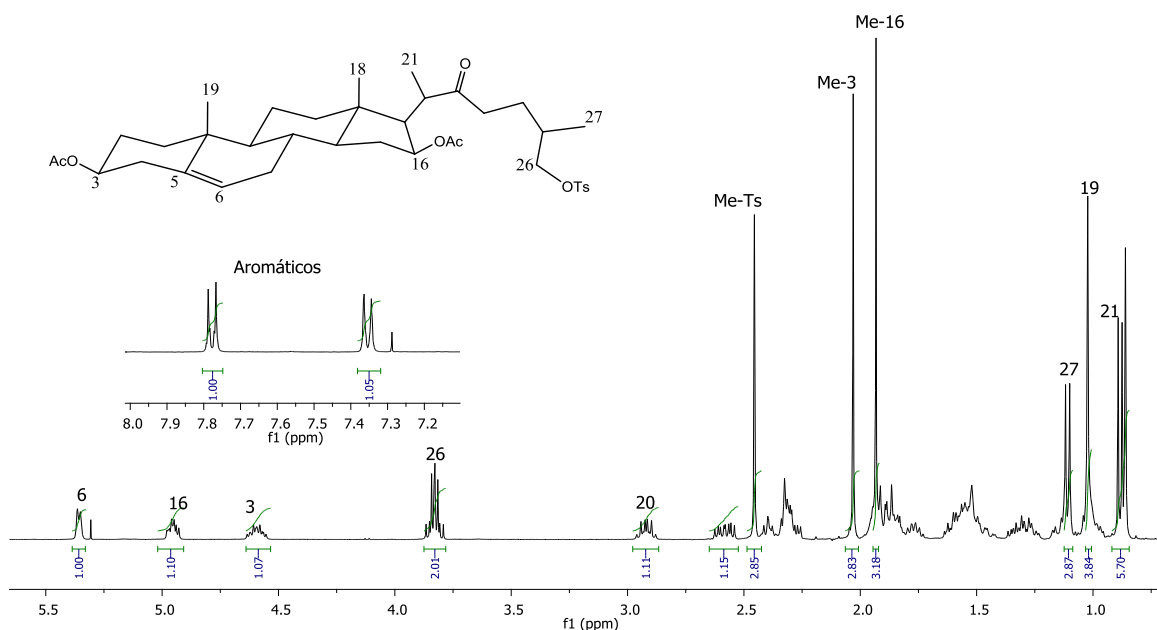


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del tosilato **8**

Para la caracterización del compuesto **8** se analizó el espectro de RMN- ^1H (ver figura 45) apreciando hacia frecuencias altas un sistema A_2X_2 en 7.8 ppm (protones *orto*) y 7.3 ppm (protones *meta*) del grupo tosilo observando en la molécula esta diferencia al compararlo con el compuesto **2** en el cual no estaban presentes dichas señales. Posteriormente se muestra la señal del protón vinílico de H-6 como una señal doble en 5.4 ppm, con una $J_{6-7} = 4.8$ Hz, también se observa una señal múltiple para el H-16 en 4.9 ppm, el protón H-3 se muestra hacia 4.6 ppm como una señal múltiple, los protones de la posición 26 se muestran como un sistema ABX, H-26a se ubica en 3.83 ppm $J_{26a,25} = 6$ Hz y H-26b se ubica en 3.81 ppm con $J_{26a,25} = 5.6$ Hz, estas señales tienen un pequeño cambio en el desplazamiento a frecuencias altas en comparación con el compuesto **3** debido a la presencia del grupo tosilo, mientras que a frecuencias bajas se observan las siguientes señales: el protón H-20 a 2.9 ppm como una señal *dc* y una señal simple para el metilo que pertenece al grupo tosilo en 2.4 ppm. Los metilos que pertenecen a los grupos acetatos de C-3 y C-16 se observan como señales simples a 2.0 y 1.9 ppm, el metilo de 21 se muestra como una señal doble a 1.0 ppm con una $J_{21-20} = 7.2$ Hz, para el metilo de C-27 se observa

una señal doble en 0.9 ppm con una $J_{27-25} = 6.8$ Hz. Finalmente, los metilos de 19 y 18 se aprecian como señales simples en 1.0 y 0.9 ppm.

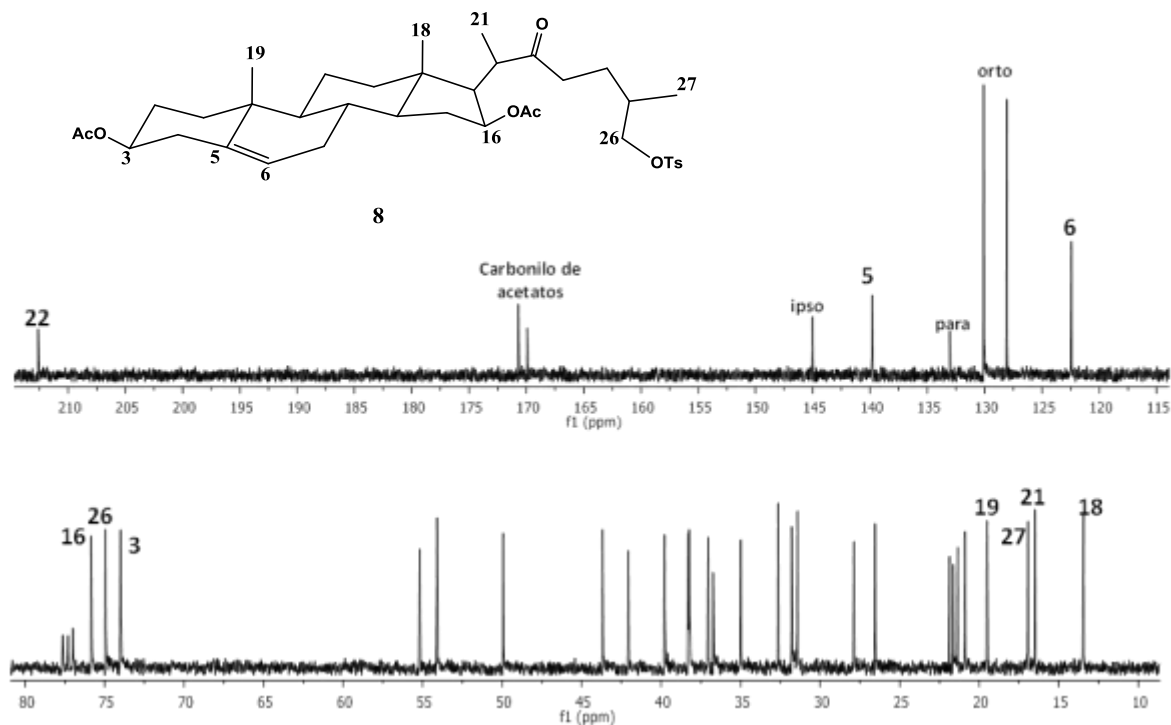
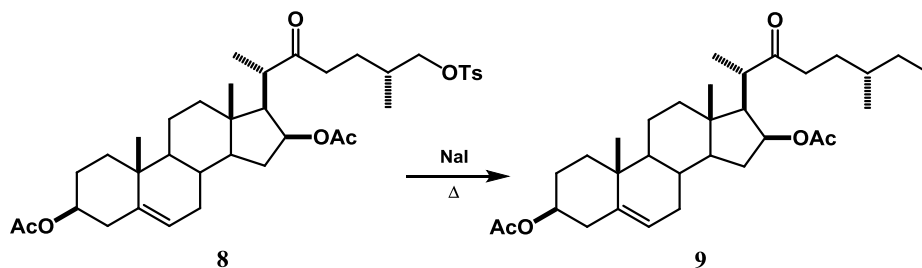


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del tosilato 8.

En el espectro de RMN de ^{13}C de 8 (ver figura 31) se aprecia la señal característica de C-22, una señal de carbonilo de cetona en 212.8 ppm. La señal de los carbonilos de los grupos acetato se aprecian a 170.7 y 169.9 ppm correspondientes a dichos ésteres en las posiciones C-3 y C-16, las señales correspondientes a los carbonos vinílicos se observan en 139.8 y 122.5 ppm. El anillo aromático presenta las siguientes señales: el carbono *ipso* aparece en 144.9 ppm, el carbono *para* en 132.0 ppm y finalmente carbonos *meta* y *orto* se aprecian en 130.1 y 128.0 ppm, respectivamente. Los carbonos C-16, C-26 y C-3 se muestran en 77.0, 74.5 y 73.9 ppm; mientras que a frecuencias más bajas se observan las señales que corresponden a los carbonos de los metilos de los acetatos de C-3 y C-16 a 21.9 y 21.6 ppm. En 19.7 se encuentra C-19, mientras que las señales de C-18, C-21 y C-27 se observan en 13.15, 16.8 y 17.2 ppm, respectivamente.

Un tercer compuesto sintetizado fue el derivado yodado **9** mediante una reacción de Finkelstein³ para ello el compuesto **8** se hizo reaccionar con NaI en acetona a reflujo durante 7 horas, de esta forma se lleva a cabo la sustitución del grupo tosilo por el halógeno vía una S_N2, obteniendo de esa forma el derivado yodado **9** (Esquema 16).



Esquema 16: Formación del compuesto **9**.

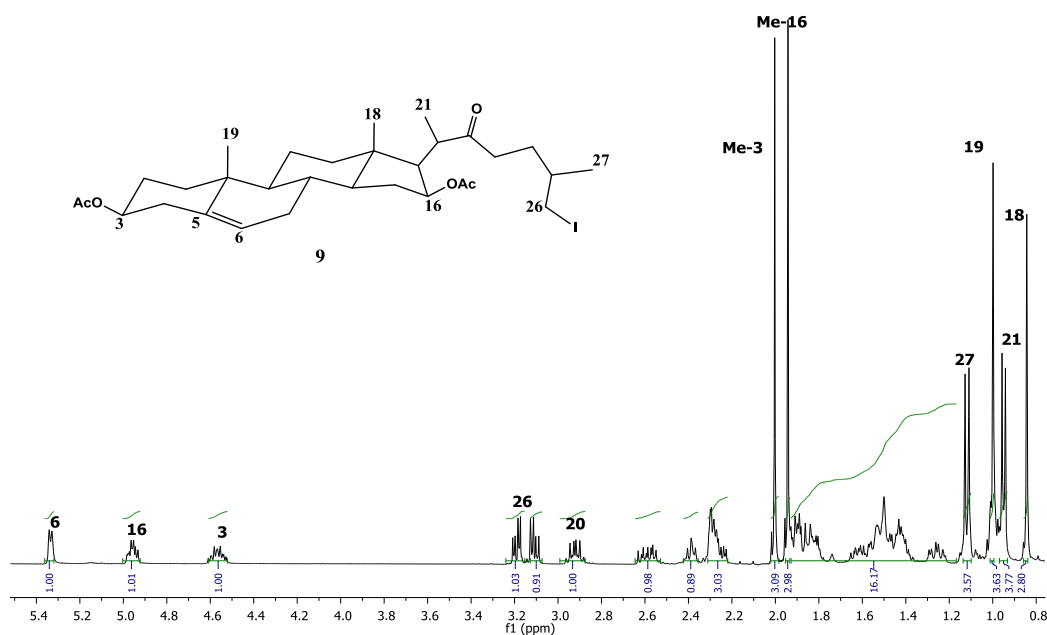


Figura 33. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto **9**.

Para el compuesto **9** se pueden apreciar las siguientes señales en el espectro de RMN de ¹H (ver figura 33) hacia frecuencias altas en 5.34 ppm se muestra la señal del protón vinílico H-6 como una señal doble y con una $J_{6-7} = 5.2$ Hz, también se observa el H-16 en 4.9 ppm como un multiplete y en 4.6 ppm se observa otra señal múltiple

³ Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. Elsevier Academic Press: San Diego. 2005, pp.170.

perteneciente al H-3. Los protones de la posición 26 se observan como una señal *dd* a 3.2 ppm para H-26a y 3.1 ppm para H-26b. Mientras que a frecuencias bajas en 2.93 ppm se aprecia a H-20 como una señal *dc*; los metilos de los grupos acetatos están en 2.0 y 1.9 ppm como señales simples y corresponden a los ésteres de las posiciones C-3 y C-16. El metilo de 21 se encuentra en 1.1 ppm como señal doble con una $J_{21-20}=7.2$ Hz; el metilo de 27 se observa a 0.96 ppm como una señal doble con una $J_{27-25}=6$ Hz, y se observan dos señales simples para los metilos de 19 y 18 en 1.0 y 0.8 ppm.

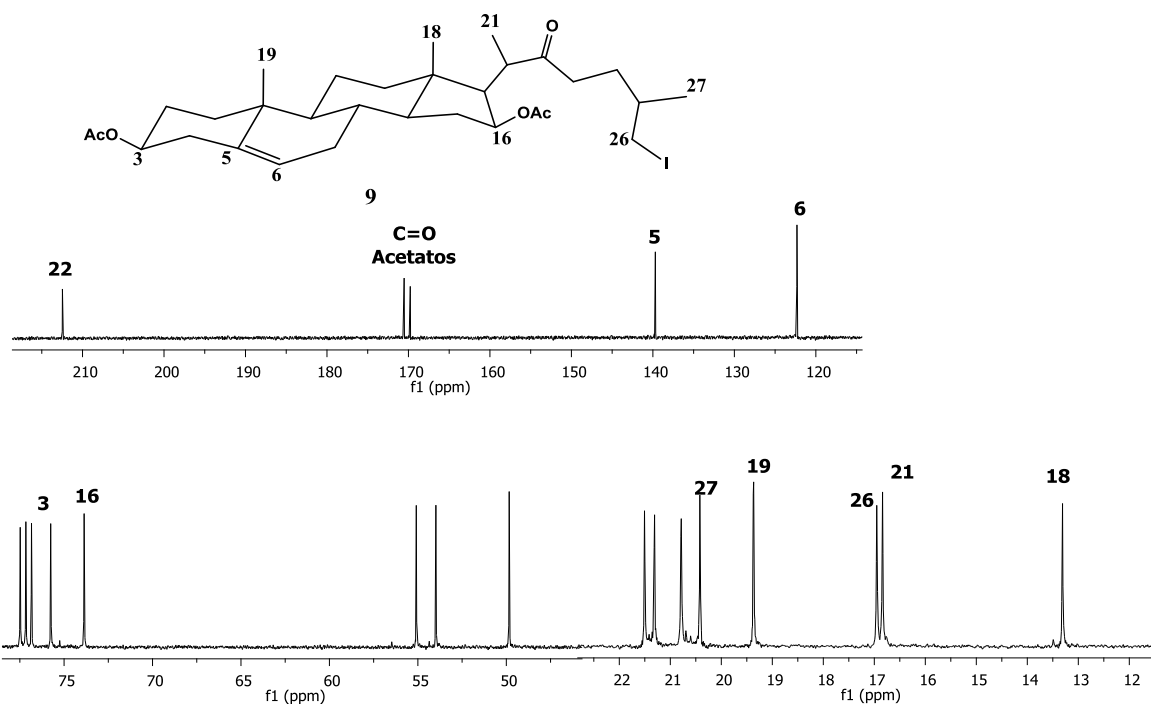
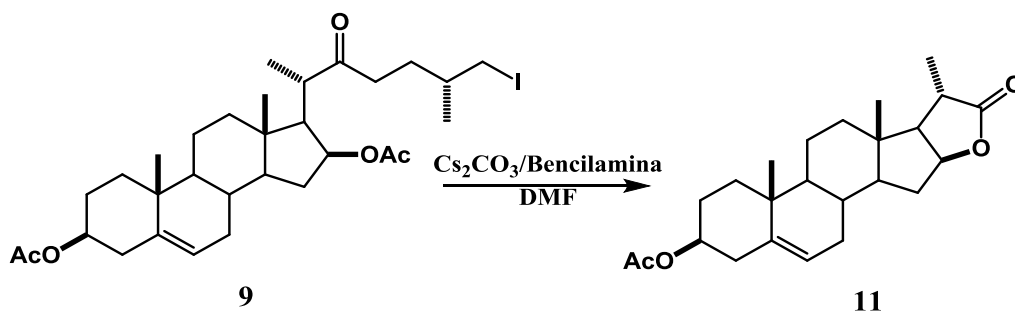


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto yodado **9**

En el espectro de RMN de ^{13}C (ver figura 34) para el compuesto **9** ya no se observan las señales correspondientes al anillo aromático del tosilato y se aprecia a frecuencias altas la señal de C-22 que pertenece al carbonilo de cetona a 212.6 ppm posteriormente las señales de C-3 y C-16 de los carbonilos de los grupos acetatos se encuentran en 170.8 y 170.0 ppm. Los carbonos que forman el doble enlace en C-5 y C-6 se observan a 139.8 y 122.5 ppm las señales de C-3 y C-16 se aprecian en 75.9 y 74.1 ppm. A frecuencias bajas son apreciables señales como las de C-26 en 17.2 ppm al igual que los carbonos de los metilos que corresponden a los grupos acetatos de las posiciones C-3 y C-

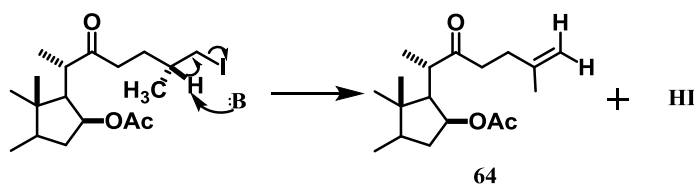
16 en 21.7 y 21.5 ppm. También se observan los carbonos de los grupos metilos de C-27 en 20.5 ppm, de C-21 en 17.0 ppm, de C-19 en 19.5 y de C-18 en 13.5 ppm.

La formación del compuesto **11** a partir del derivado 22-yodocolestano **9** implica la ruptura inusual del enlace C-22/C-23, lo cual se logra a alta temperatura en medio básico obteniendo a **11**.



Esquema 16. Síntesis de la lactona bisnorcolánica **11**.

En el transcurso de la reacción se observó la formación de un compuesto con menor polaridad comparado con el compuesto **11** al analizar sus espectros de ^1H y ^{13}C se concluyó de que se trata de un compuesto que contiene una doble insaturación en las posiciones C-25/C-26. El grupo metilénico se formó como producto de eliminación del protón de la posición C-25 (Esquema 17).



Esquema 17. Mecanismo para la formación del compuesto **64**

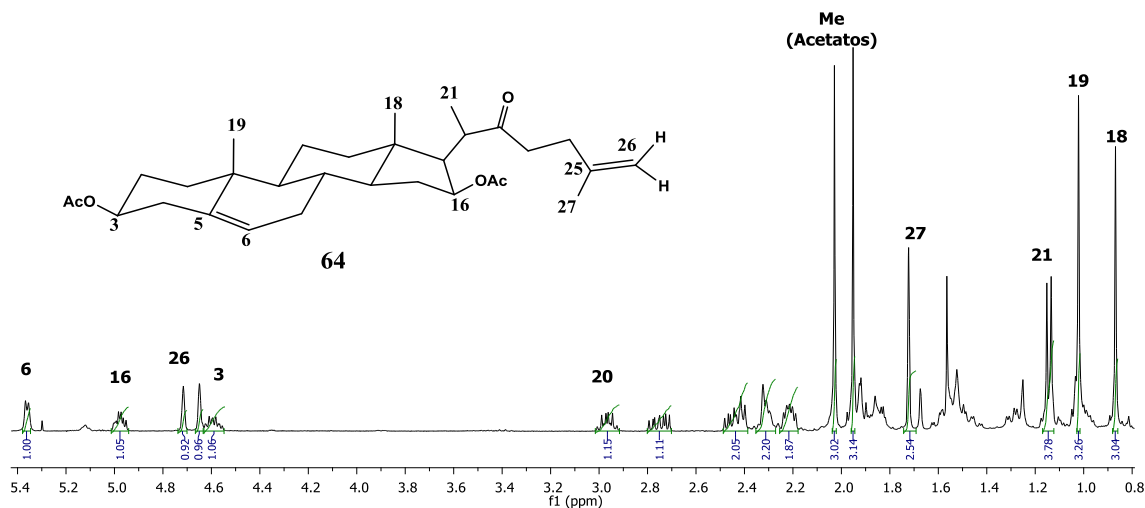


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **64**

Para el compuesto **64** se pueden apreciar las siguientes señales en el espectro de RMN- ^1H (Figura 35) en frecuencias altas en 5.34 ppm se muestra la señal del protón vinílico H-6 como una señal doble y con una $J_{6-7}=5.2$ Hz, también se observa el H-16 en 4.9 ppm como una señal múltiple, en 4.6 ppm se observa otra señal múltiple perteneciente al H-3. Para los protones de la posición 26 se observan un cambio en su desplazamiento debido a la formación del doble enlace observando a frecuencias altas dos señales simples para los hidrógenos geminales en 4.7 ppm y 4.6 ppm. Mientras que a frecuencias bajas en 2.93 ppm se aprecia a H-20 como una señal *dc*; los metilos de los grupos acetatos están en 2.0 y 1.9 ppm como señales simples y corresponden a los ésteres de las posiciones C-3 y C-16. El metilo de 21 se encuentra en 1.1 ppm como señal doble con una $J_{21-20}=7.2$ Hz; el metilo de 27 se observa a 1.72 ppm como una señal simple, al igual que las dos señales simples para los metilos de 19 y 18 en 1.0 y 0.8 ppm.

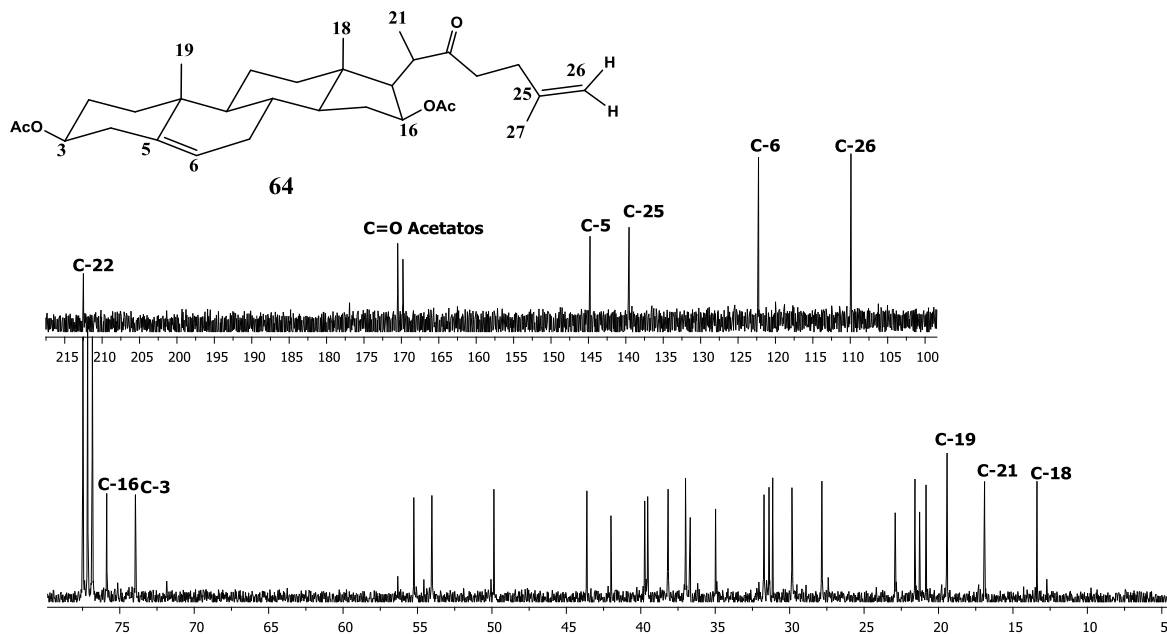


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **64**

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 36) para el compuesto **64** se observa la señal de C-22 que pertenece al carbonilo de cetona a 212.6 ppm posteriormente las señales de C-3 y C-16 de los carbonilos de los grupos acetatos que se encuentran en 170.8 y 170.0 ppm. Los carbonos que forman el doble enlace en C-5 y C-6 se observan a 139.8 y 122.5 ppm las y como señales correspondientes al nuevo doble enlace formado en C-25 y C-26 se observan en 139.5 ppm y en 109.9 ppm. Las señales de C-3 y C-16 se aprecian en 75.9 y 74.1 ppm. A frecuencias bajas son apreciables para los carbonos de los metilos que corresponden a los grupos acetatos de las posiciones C-3 y C-16 en 21.7 y 21.5 ppm. También se observan los carbonos de los grupos metilos de C-21 en 17.0 ppm, de C-19 en 19.5 ppm y de C-18 en 13.5 ppm.

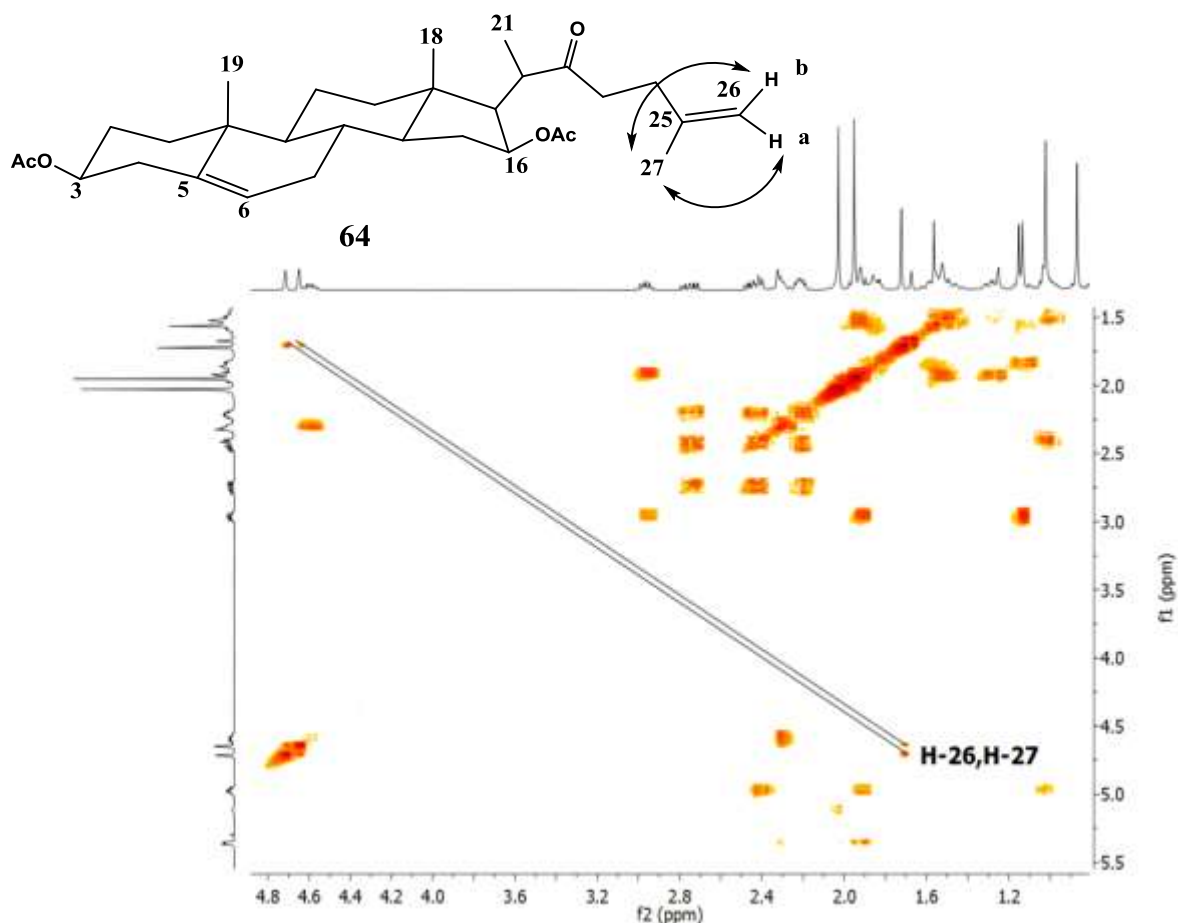
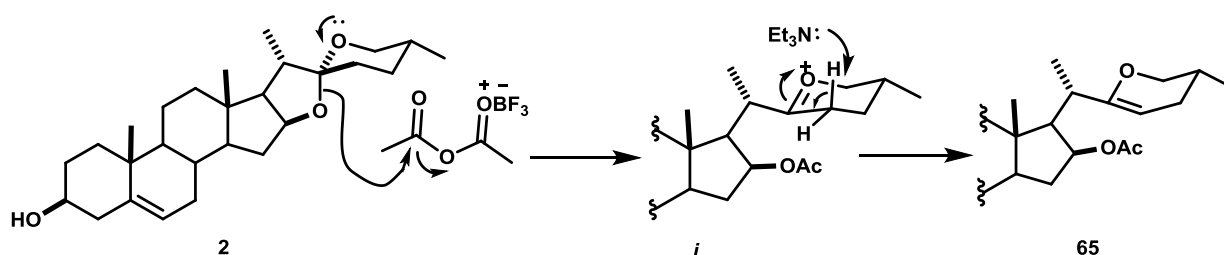


Figura 37. Experimentos COSY del compuesto **64**

El experimento COSY (Figura 37) del compuesto **64** permitió correlacionar las señales de H-26 con H-27 los cuales se observan como una señal simple tentativamente, sin embargo, es importante mencionar que estos protones tienen una constante de acoplamiento geminal, el valor de esta constante es muy pequeño por lo que estas señales se aprecian un poco anchas. En el experimento COSY se puede apreciar una interacción más fuerte para el protón que se encuentra en 4.7 ppm, lo que permite asignar esta señal como protón a, el cual está más cercano al grupo metilo 27, por su parte la señal para el protón que se observa en 4.6 ppm la interacción es más débil, esta interacción se ha asignado para el protón b.

El derivado 26-yodado (**9**) es característico por tener en la posición C-26 un buen grupo saliente; para comparar cómo influye el tamaño del halógeno en la formación de **11**, se realizó la síntesis de otro derivado halogenado en la misma posición. Para la síntesis se formó como primer paso el derivado dihidropiránico **65** mediante una reacción de acetólisis en el cual se realiza la apertura del anillo E de la diosgenina y la acetilación del grupo hidroxilo de la posición C-16, posteriormente se realiza un work-up alcalino con trietilamina (Esquema 18) en esta etapa se realiza una β -eliminación de un protón del C-23 del intermediario **i** dando lugar a la formación del compuesto **65**.



Esquema 18. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto **65**.

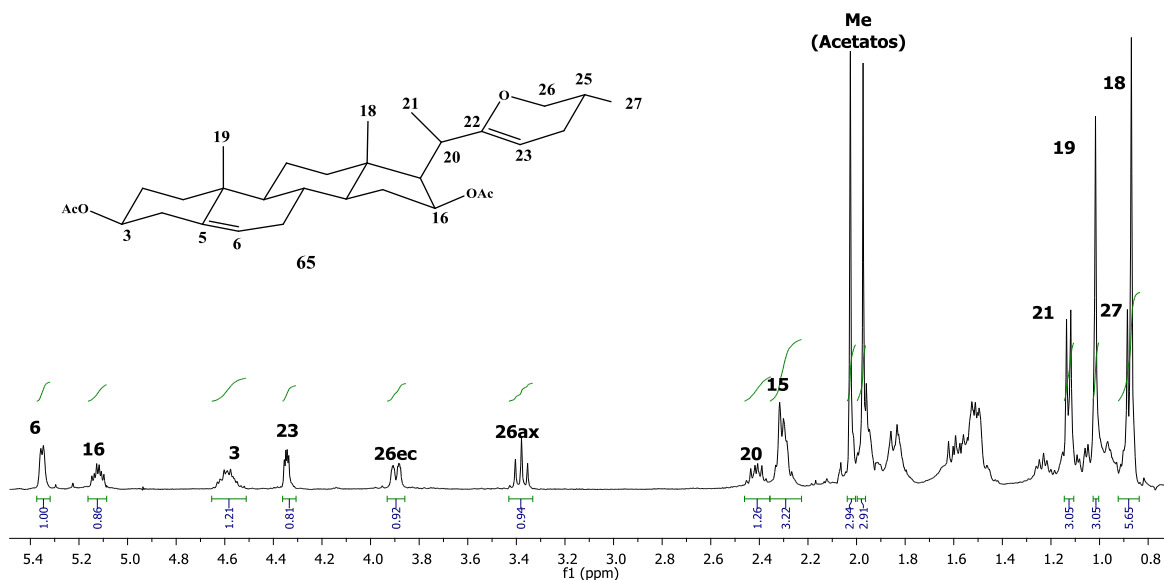


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **65**.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **65** (ver figura 38) se observa el protón vinílico de H-6 en 5.35 ppm como una señal doble con $J_{6, 7ec} = 4.3$ Hz. La señal de H-23

(4.34 ppm) aparece desplazada hacia frecuencias bajas esto se debe a la influencia de la densidad electrónica del oxígeno del anillo dihidropiránico, que se encuentra en resonancia con el doble enlace C-23. La señal del protón H-23 se aprecia como una señal *dd* con $J_{23, 24ax} = 4.7$ Hz y $J_{23, 24ec} = 2.5$ Hz, constantes que están de acuerdo a la curva de Karplus dado que forman ángulos diedros con el plano de H-24 de 42 y 53 grados, respectivamente. La presencia del anillo piránico se demuestra por la presencia de dos protones diastereotópicos de H-26 en 3.9 ppm que se observa como señal *dd* con $J_{gem} = J_{26ax, 25ax} = 10.2$ Hz y el H-26e en 3.38 ppm que presenta una señal *ddd* con $J_{gem} = 10.2$ Hz, $J_{26ec, 25ax} = 3.2$ Hz y $J_{26ec, 24ec} = 1.6$ Hz.

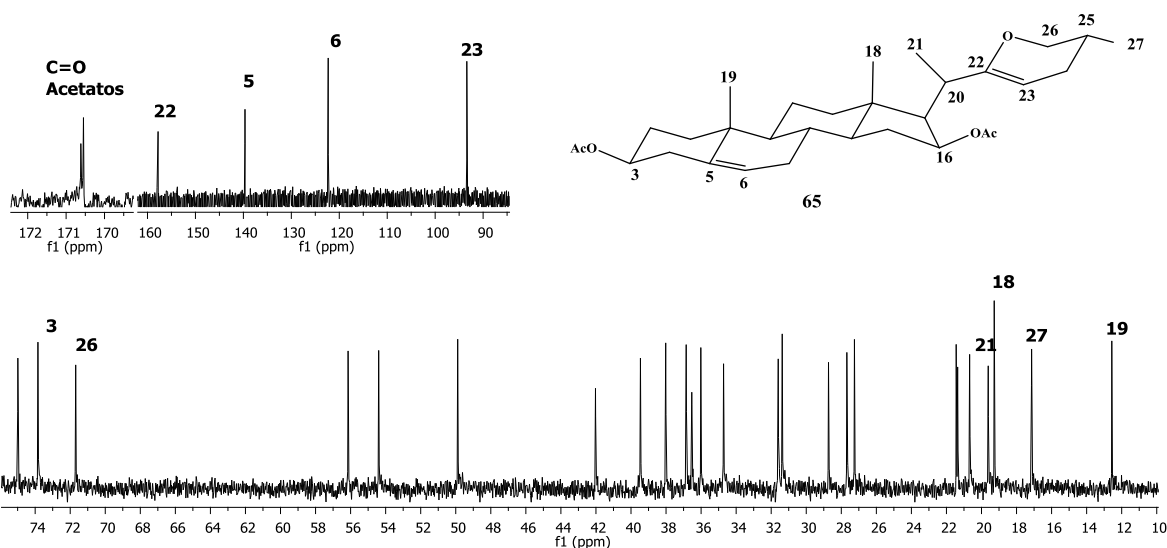
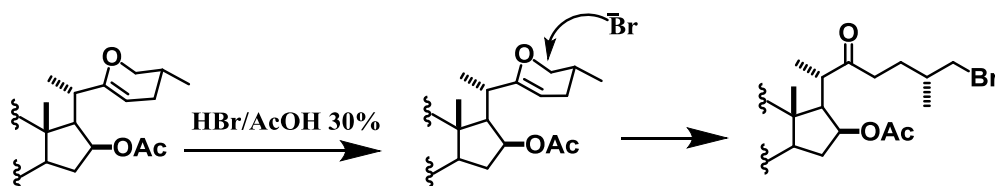


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto 65.

En el espectro de ^{13}C del compuesto 65 (Figura 39) la señal del carbono vinílico C-22 aparece en 157.8 ppm, más desprotegido que otros carbonos vinílicos por estar directamente ligado al átomo de oxígeno piránico. Por el contrario, la señal del carbono vinílico C-23 está protegido, ubicado en 93.4 ppm por la influencia de la densidad electrónica del sistema éter vinílico. Además, en ^{13}C en la región típica de los carbonos base de oxígeno, aparece el carbono 26 (71.7 ppm) que precede a C-3 (73.8 ppm) y C-16 (75.0 ppm) lo que confirma que C-26 está ligado a un átomo de oxígeno. El CH_3 -27 se ubica en posición ecuatorial y en posición axial se encuentra H-25. La señal del protón H-20 se observa como una señal doble de cuádruple en 2.41 con $J_{20, 21} = 11.2$ Hz y $J_{20, 17} = 7.2$

Hz. La señal H-20 de **65** se observa a frecuencias más bajas en comparación de su correspondiente en el compuesto yodado **9** (δ 2.93) debido a que H-20 está influenciado por el cono de protección de del doble enlace en C-22.

Una vez obtenido el compuesto dihidropiránico este se transformó al derivado 26-bromado (**66**) por la acción de un ácido prótico para generar el ion oxonio *i* de esta forma se realiza un ataque nucleofílico sobre la posición C-26 (Esquema 19). El producto que se obtuvo en mayor rendimiento fue el derivado 26-bromo-22-oxocolestánico (**66**) sin embargo también se observó en el transcurso de la reacción la formación del compuesto 26-hidroxi-22-oxocolestánico (**2**) ya que el ataque nucleofílico al intermediario *i* lo realiza una molécula de agua en este caso no es posible saber si reaccionó en C-26 o C-22 puesto que el producto de ataque en ambas posiciones es el compuesto **2**.



Esquema 19. Transformación del compuesto dihidropiránico al derivado 26-bromado.

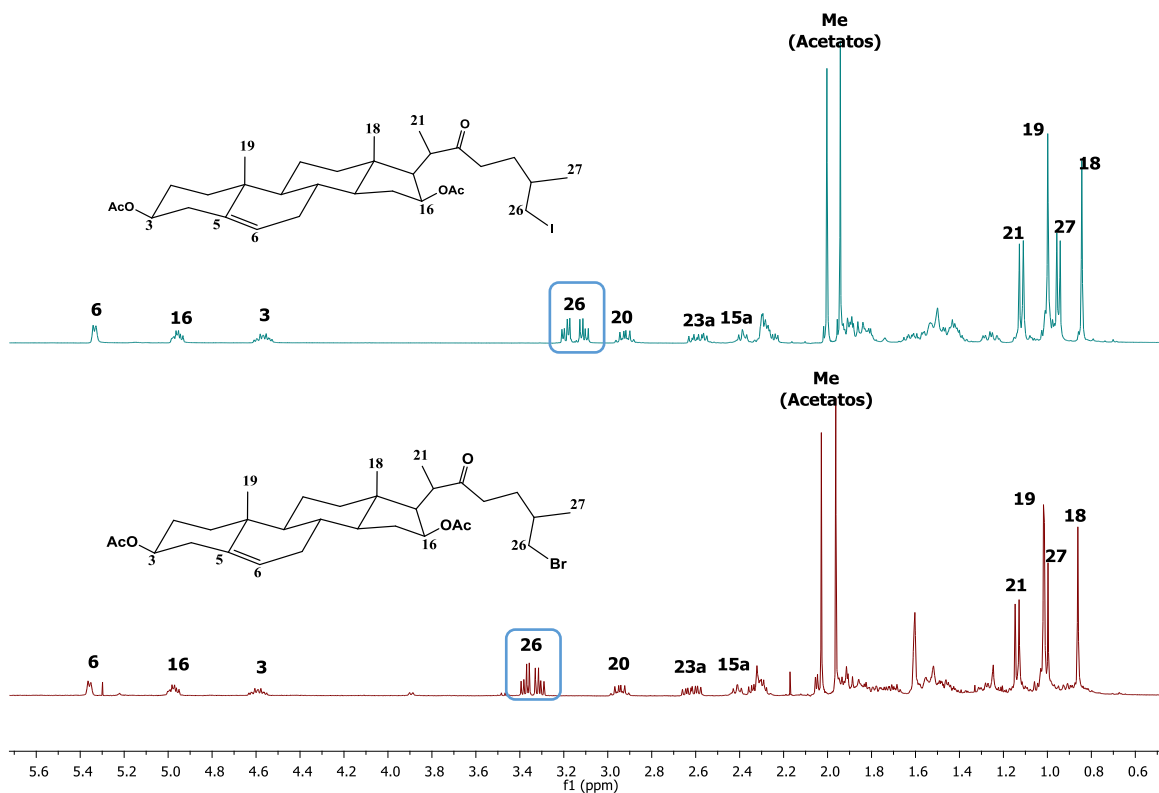


Figura 40. Comparación de los espectros de RMN de ¹H de los compuestos **9** y **66**.

El compuesto **66** es un derivado halogenado para su análisis por RMN se ha realizado una comparación con el derivado 26-I (**9**) (ver figura 40) ya presentan la misma estructura sin embargo el halógeno en la posición C-26 es diferente como se puede observar en el espectro de ¹H las señales en los núcleos del esqueleto del esteroide no presentan variaciones significativas, pero se observan cambios significativos en los desplazamientos de los protones de las posiciones, H-26 para el compuesto **9** se observan como una señal *dd* a 3.2 ppm para H-26a y 3.1 ppm para H-26b, para el compuesto **66** debido a que el bromo es un elemento más electronegativo que el yodo las señales para H-26 se observan a frecuencias más altas los H-26 se observan como una señal *dd* a 3.3 ppm para H-26a y 3.4 ppm para H-26b.

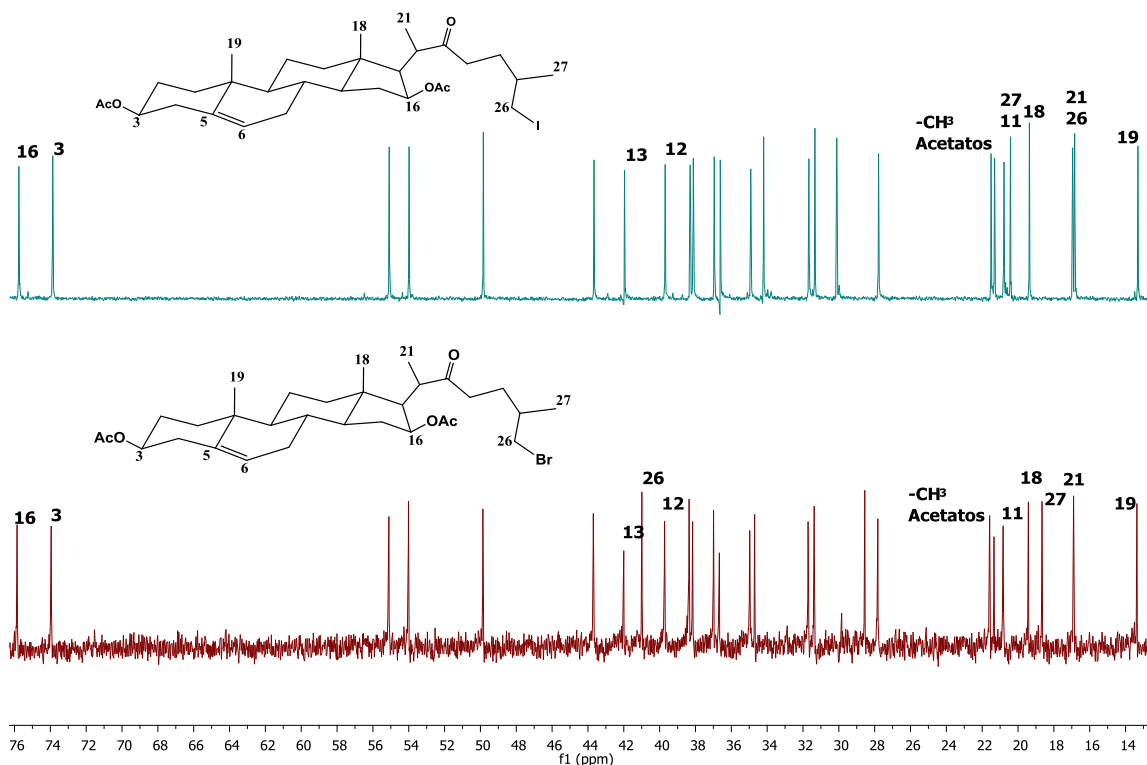


Figura 41. Comparación de los espectros de RMN de ^{13}C de los compuestos **9** y **66**.

En el caso del espectro de ^{13}C la señal de carbono del metilo CH_3 -27 en el compuesto yodado aparece en 20.3 y en el compuesto bromado en 18.5 ppm (ver figura 41). Las señales dobles del metilo CH_3 -27 en el espectro ^1H se aprecian en 0.95 (compuesto **9**) y 1.01 (compuesto **66**). Una diferencia notable se presenta el desplazamiento del C-26 ya que el bromo es ligeramente más electronegativo que el yodo generando un efecto desprotector en el C-26 observando la diferencia en el desplazamientos de C-26 en el compuesto yodado **9** (16.9 ppm) y el correspondiente del compuesto bromado **66** (40.83 ppm).

Una vez obtenido el derivado C-26 Bromado (**66**) se hizo reaccionar en condiciones básicas para obtener la carbolactona (**11**), usando Cs_2CO_3 en DMF anhidro en esta reacción se observó la formación de la lactona bisnorcolánica en un rendimiento del 34%, el cual es relativamente menor que al usar como al derivado 26-I con el cual se obtuvo un rendimiento del 38%.

Los derivados halogenado **9** y **66**, que contienen en su estructura un buen grupo saliente, se llevó a cabo la formación del compuesto **11**. Se realizaron las siguientes pruebas utilizando diferentes sustituyentes en la posición C-26 de la cadena lateral para observar que influencia tiene el sustituyente en C-26 (Tabla 3). Bajo las mismas condiciones de reacción usando Cs_2CO_3 se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 2. Rendimientos para la formación de 11 utilizando diferentes sustituyentes en C-26

Compuesto	Cantidad	Cs_2CO_3 2eq.	Bencilamina	Rendimiento
29	100 mg (0.1492 mmol)	97 mg (0.2985 mmol)	31 μL	27%
25	100 mg (0.1788 mmol)	116 mg (0.3579 mmol)	38 μL	25%
3	100 mg (0.1937 mmol)	126 mg (0.3392 mmol)	39 μL	21%

Los compuestos que se utilizaron no contienen en su estructura un buen grupo saliente pero esto no fue un factor de impedimento para que se obtuviera **11**, sin embargo, se obtuvo en menores rendimientos. Se realizó la formación del derivado 22-oxocolestánico **10** el cual se caracteriza por presentar en su estructura solamente la cadena lateral hidrocarbonada. Con el fin de saber si se lleva a cabo la ruptura C-22/C-23 sin la influencia de un grupo en la posición C-26. Este compuesto se obtuvo a partir del derivado yodado **9** realizando una reducción la cual es promovida por Zn en ácido acético durante 2 horas.

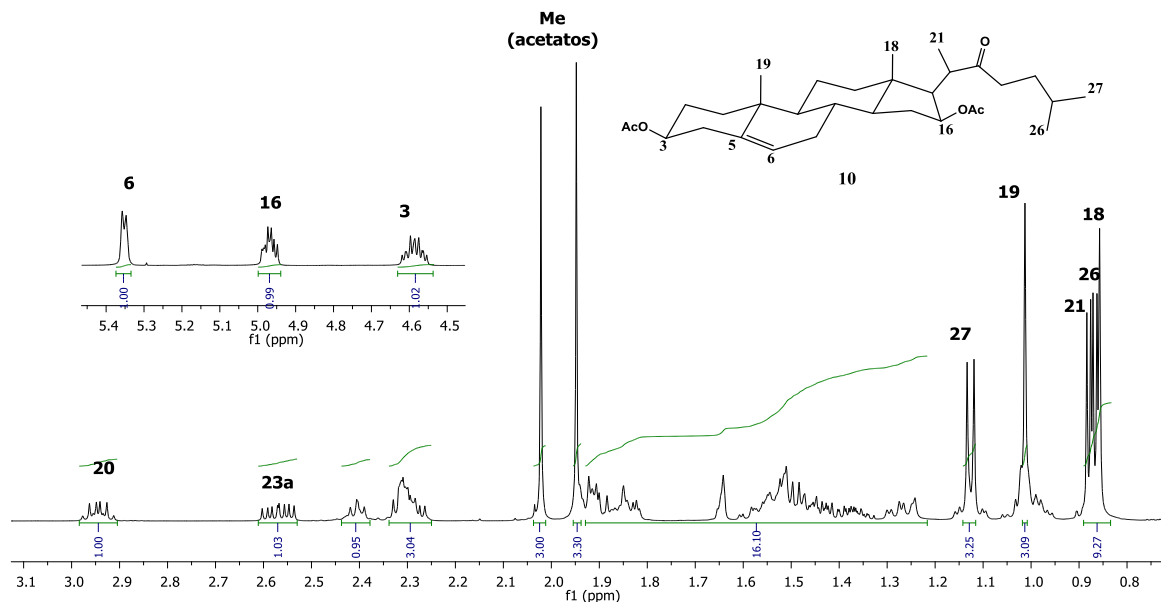


Figura 42. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **10**.

Para el compuesto **10** se observan en el espectro de ^1H (ver figura 42) las siguientes señales a frecuencias altas se observa una señal doble correspondiente al protón vinílico H-6 con $J_{6-7} = 5.2$ Hz posteriormente se observan las señales múltiples correspondientes para H-6 y H-3 en 4.97 y 4.58 ppm. En 2.95 ppm se encuentra la señal de H-20 como una señal *dc* con una $J_{20-21} = 7.6$ Hz y $J_{20-17} = 3.2$ Hz, se observa la señal de H-23^a como una señal múltiple en 2.5 ppm. En frecuencias bajas se observan las señales correspondientes de los metilos de los acetatos en C-3 y C-16 en 2.0 ppm y 1.9 ppm, para los hidrógenos de los metilos H-26 y H-27 se observan dos señales dobles en 0.89 y 0.88 ppm con una constante de acoplamiento para ambos de 6.4 Hz debido a su acoplamiento con H-25, finalmente se observan dos señales simples en 1.02 y 0.87 ppm correspondientes a los metilos de 18 y 19.

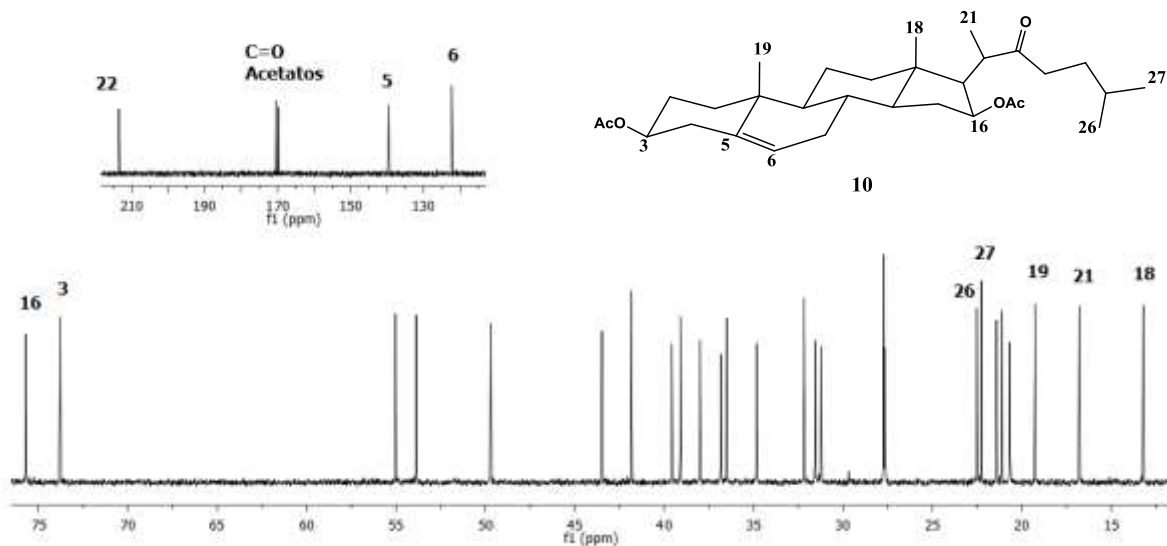
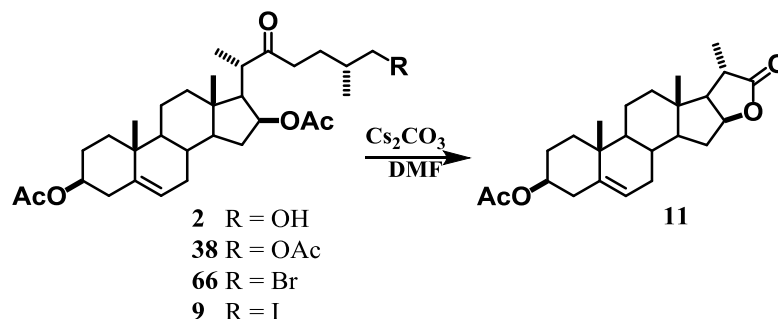


Figura 43. Espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **10**.

Mientras que en RMN ^{13}C (ver figura 43) se observan en frecuencias altas las señales para el carbonilo de C-22 en 213.1 ppm y los carbonilos de los acetatos en 170.3 y 169.6 ppm, las señales correspondientes para los carbonos vinílicos C-5 y C-6 se aprecian en 139.4 y 122.1 ppm y las correspondientes a los carbonos metílicos de los acetatos se observan en 75.7 y 73.8 ppm. Las señales para los metilos de 18 y 19 se observan en 13.3 y 19.4 ppm y las de 21, 26 y 27 en 16.9, 22.6 y 22.4 ppm respectivamente.

Una vez obtenido el compuesto **10** se sometió a las condiciones básicas para obtener la carbolactona **11**, también se observó que al utilizar solamente la cadena hidrocarbonada la formación de **11** obteniéndose en un menor rendimiento 18%.

Finalmente se realizaron pruebas mediante síntesis asistida por microondas focalizadas, utilizando los compuestos **2**, **9**, **38** y **66**, realizando variaciones en temperatura y utilizando diferente disolvente.



Esquema 20. Formación del compuesto 11 a partir de estructuras 22-oxocholestanicas con diferente sustituyente en C-26.

Estas pruebas se llevaron a cabo a 190° C durante 5 min. Se observó que al utilizar los compuestos halogenados **9** y **66** se favoreció la formación del compuesto metilénico **64** en un 90% de rendimiento, mientras que al utilizar los compuestos **2** y **38**, se favoreció la formación de **31** en un 90% y 70% como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la formación del compuesto 11 usando los compuestos 2, 9, 38, y 66.

Compuestos	Cantidad	Cs ₂ CO ₃ 2 eq	Temperatura	Tiempo	Rendimiento
2	30 mg (0.0581 mmol)	38 mg 0.1162 mmol	190 °C	5 min.	Carbolactona 70%
38	30 mg (0.0537 mmol)	35 mg (0.1075 mmol)	190 °C	5 min.	Carbolactona 90%
66	30 mg (0.05181 mmol)	34 mg 0.1036 mmol	190 °C	5 min.	Compuesto 64 90% Carbolactona <10%
9	30 mg (0.0479 mmol)	31 mg 0.0958 mmol	190 °C	5 min.	Compuesto 64 90% Lactona <10%

Se realizaron pruebas utilizando diferentes disolventes para la formación de **11**, observando que la reacción es favorecida utilizando DMF como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Uso de diferentes disolventes para la formación del compuesto 11.

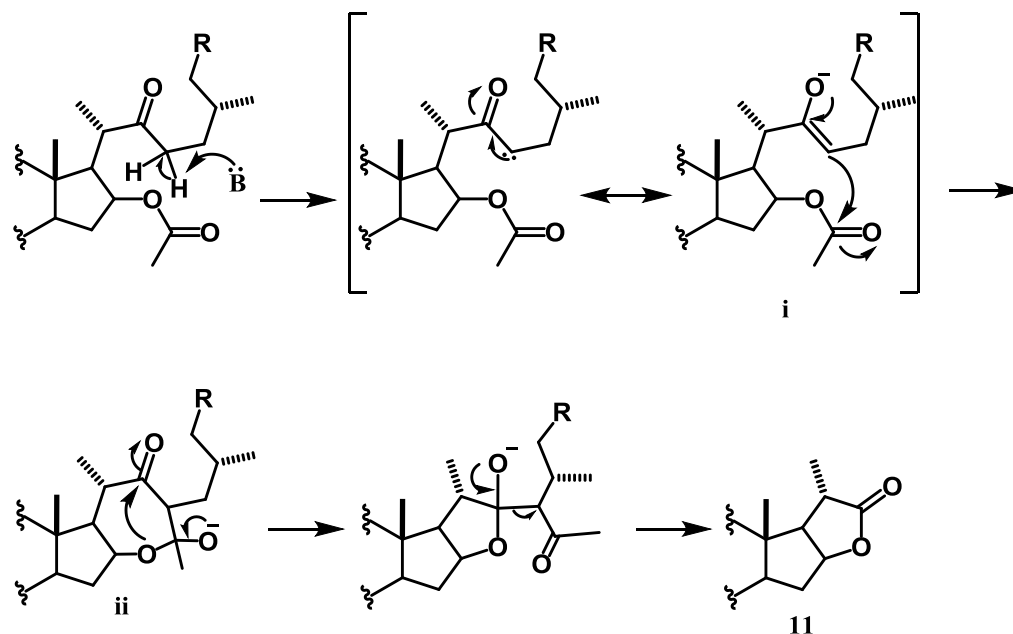
Compuesto	Disolvente	Temperatura	Rendimiento
38	DMF	190 °C	90%
	H ₂ O	170 °C	Sin formación
	CH ₃ CN	190 °C	Sin formación
	AcOEt	170 °C	Sin formación

Se usaron diferentes carbonatos para la formación de **11** utilizando DMF como disolvente a una temperatura de 190°C usando como materia prima a **38**, se observó que la reacción es favorecida con Cs₂CO₃.

Tabla 5. Uso de diferentes carbonatos para obtener el compuesto 11.

Compuesto	Carbonato 2 eq	Formación
38	Li ₂ CO ₃ (8 mg)	Sin formación
	Na ₂ CO ₃ (11 mg)	Sin formación
	K ₂ CO ₃ (15 mg)	Se observa formación de 11
	Cs ₂ CO ₃ (38 mg)	Lactona 90%

Con base a estos resultados obtenidos, y al utilizar diferentes grupos en la posición C-26 se ha propuesto el siguiente mecanismo de reacción (Esquema 21) iniciando con la formación de un enolato **i** debido a la proximidad con el grupo acetato de la posición C-16 se realiza un ataque formando el intermediario **ii**, se realiza un rearrreglo y posteriormente se rompe el enlace C-22/C-23 obteniendo como producto final una lactona de 5 miembros. Del ataque anterior se elimina 2-metildihidropirano, sin embargo este no ha sido detectado en la reacción.



Esquema 21. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 11

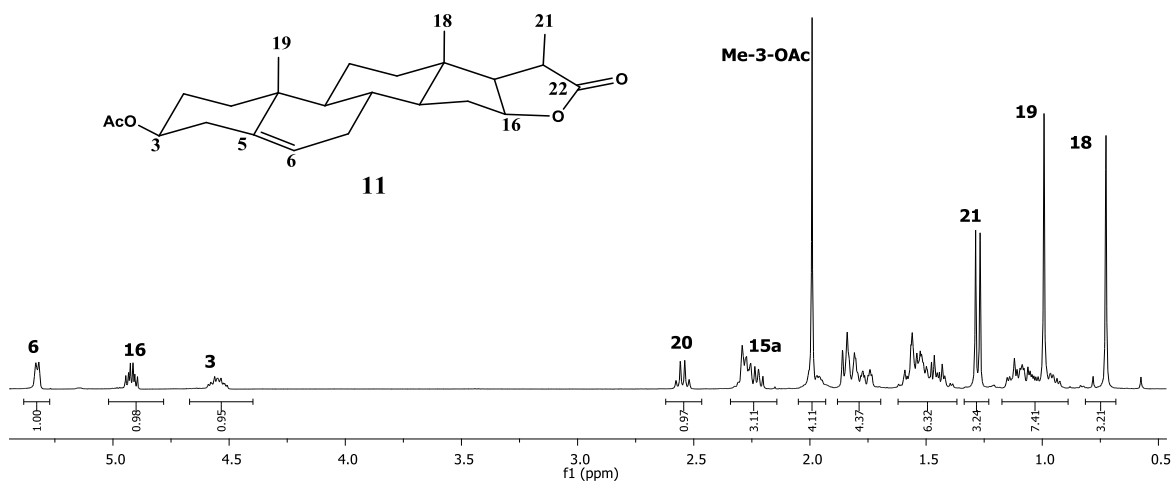


Figura 44. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 11.

Para el compuesto 11 se puede observar en el espectro de ¹H (Figura 44) la disminución de señales debido a la pérdida de la cadena lateral, Entre las señales características se aprecia en 5.34 ppm una señal *d* que pertenece a H-6 $J_{6-7ec} = 5.2$ Hz característica de compuestos con un Δ^5 , también se aprecian H-3 y H-16 como señales múltiples en 4.9 ppm y 4.55 ppm, respectivamente. A campo alto se observa la señal de H-20 como un *dc* en 2.55 ppm la cual se acopla con los protones del metilo de 21 y el protón

de 17. Posteriormente para H-15a se observa en 2.29 ppm una señal múltiple. En 2.00 ppm se aprecia una señal *s* para los protones del metilo del acetato de C-3 y en 1.28 ppm se observa una señal *d* perteneciente a los protones de H-21 con $J_{22-21} = 8.0$ Hz. Finalmente se aprecian entre 0.99 y 0.73 ppm como señales simples que integran para 3 protones los metilos de 18 y 19.

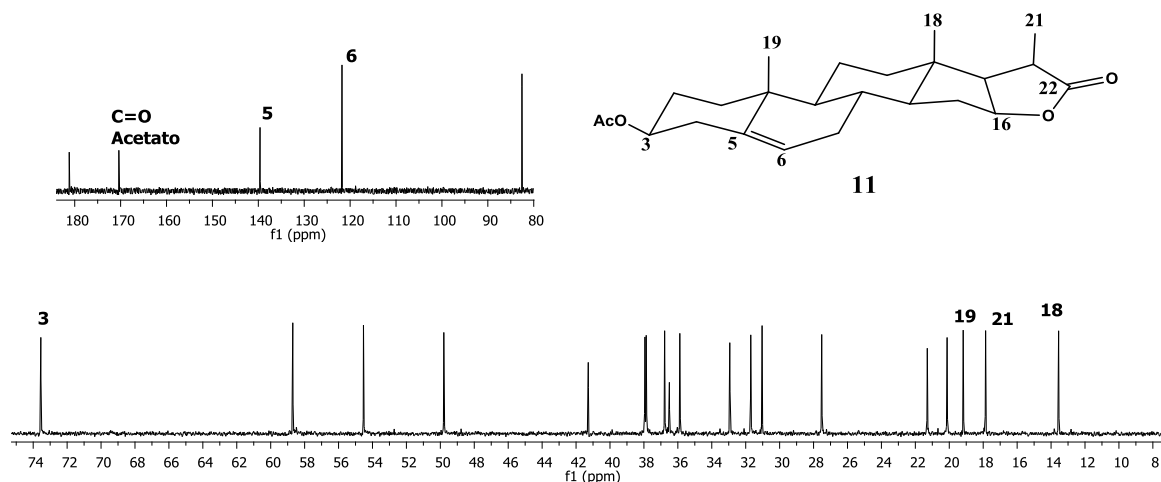


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 11

En el espectro de ^{13}C (Figura 45) se pueden apreciar la disminución de señales en los carbonos ya que de 31 señales que se observan en el compuesto **30**, para el compuesto **11** solo se observan 24 señales. A 181.2 ppm se observa la señal del carbonilo de lactona del C-22, mientras que a 170.38 ppm se aprecia el carbonilo correspondiente al acetato de C-3, también se destacan la señales de 139.7 y 121.8 ppm del doble enlace que se encuentra en C-5 y C-6 y en 85.57 ppm se encuentra la señal de C-16 el cual se encuentra unido al oxígeno del nuevo éster cíclico. En 73.6 ppm se encuentra e C-3 y a frecuencias bajas se observan las señales correspondientes a los carbonos de los metilos 19, 21 y 18 en 19.2, 17.9 y 13.2 ppm, respectivamente.

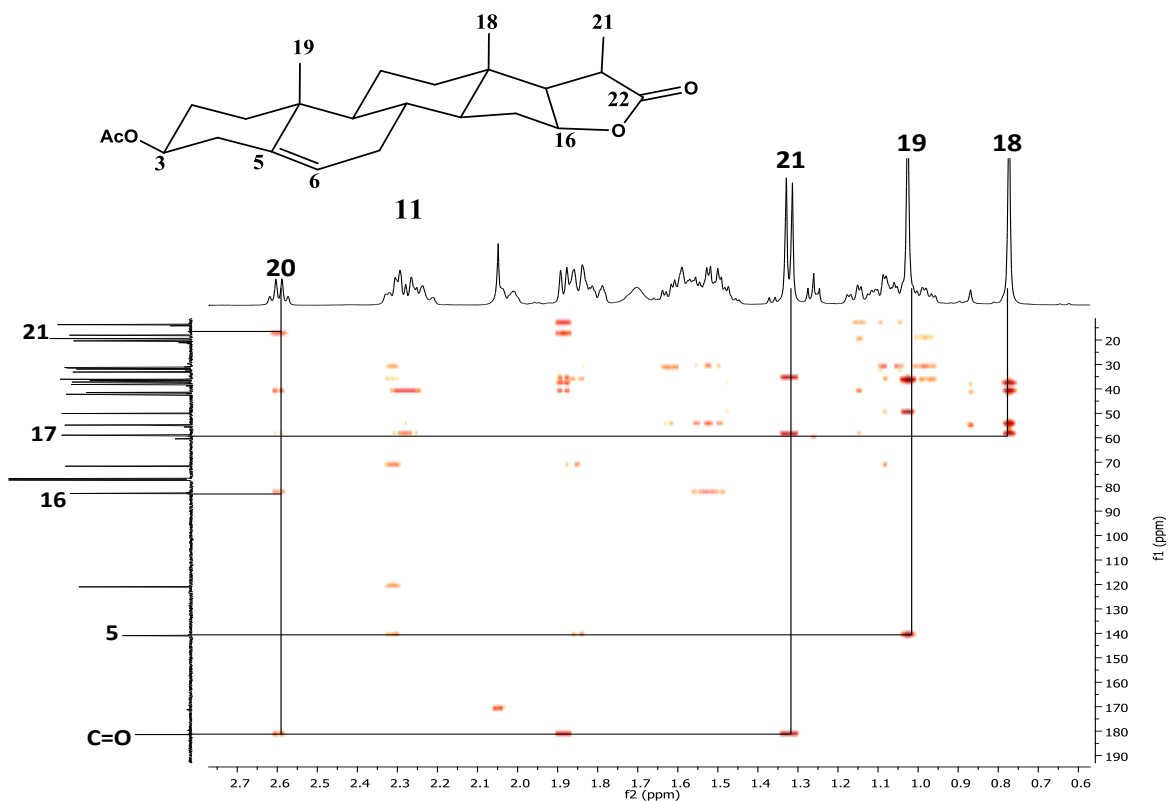


Figura 46 Experimento HMBC del compuesto **11**.

El experimento heteronuclear de dos dimensiones HMBC (Figura 46) permite correlacionar las señales protón-carbono a dos y tres enlaces para asignar de manera indirecta la posición de los metilos 18 y 19: el metilo de 18 correlaciona con los carbonos de 14 y 17 y de la misma manera se observa la correlación del metilo 19 con el carbono vinílico que se encuentra en la posición 5. También es apreciable la correlación de los protones del grupo metilo de 21 con el carbono 17 y a su vez con el carbonilo de la lactona en la posición 22. Los protones del metilo del acetato de la posición 3 correlacionan con su respectivo carbonilo. Para el protón asignado a 20 se observan correlaciones con el carbono del metilo 21, de 17 y de 16.

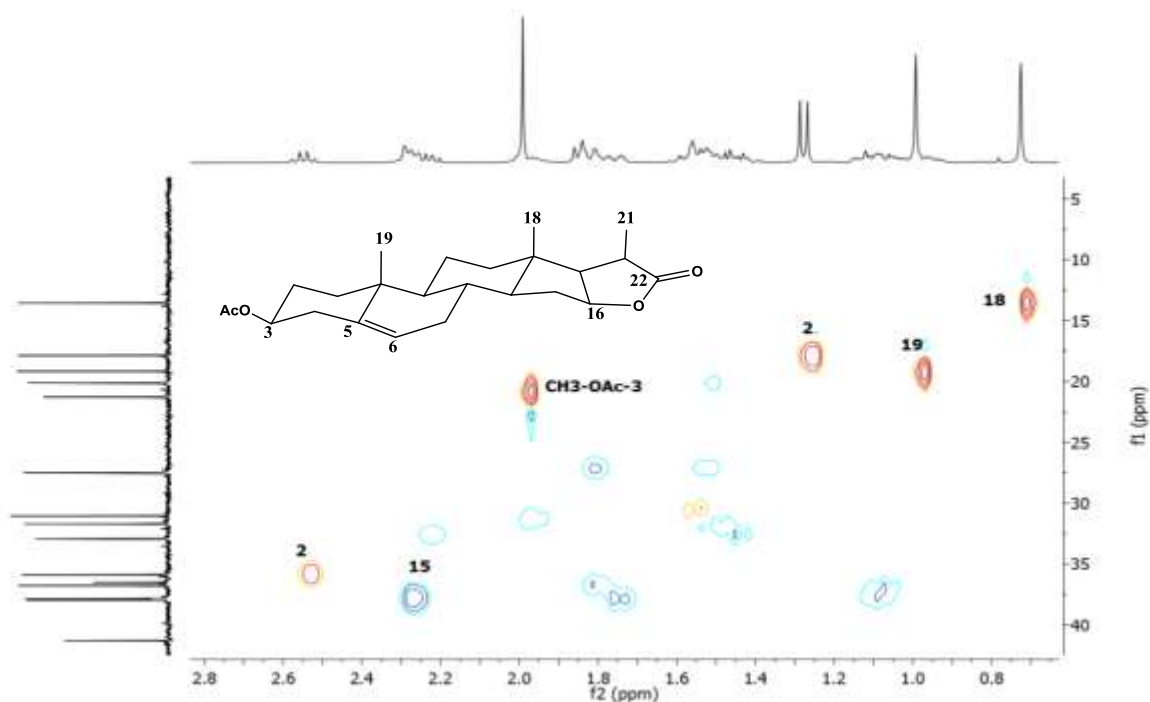
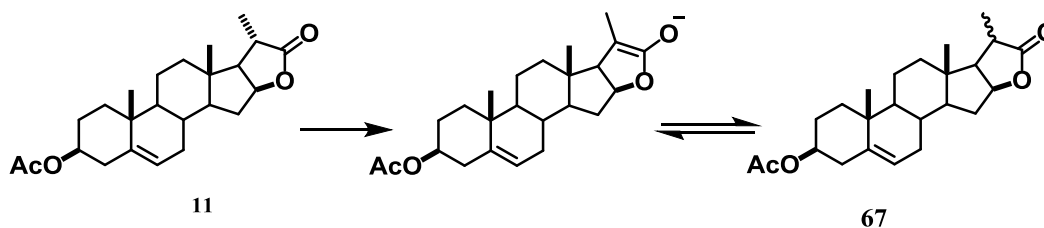


Figura 47. Expansión del espectro de correlación HSQC del compuesto 11

El experimento heteronuclear de dos dimensiones HSQC (Figura 47) nos permite asignar las señales de los protones de los grupos CH_3 con su correspondiente carbono, así fueron asignados 21, 19, 18 y el grupo metilo del OAc de la posición 3. También se asignó el metileno de la posición 15 y se observó la correlación protón-carbono para los metinos de 16, 6 y 3. Este tipo de experimento permite saber cuáles son los carbonos cuaternarios de la molécula debido a que no presentan correlación con protón alguno, entre ellos destacan: el carbono del grupo carbonilo de la lactona, del carbonilo del acetato en la posición 3, el carbono cuaternario que se encuentra en la posición 5.

En el transcurso de la reacción se observó la formación de un compuesto más polar que **11** al caracterizarlo se observó que se trata de vespertilina (**41**) el cual se formó por la desprotección del grupo acetato de la posición C-3; debido a que la reacción se realizó en medio básico. Otro de los productos formado dentro de la reacción fue el epímero en C-20 de **11**, confirmando su estructura mediante RMN de ^1H y ^{13}C , este producto se puede formar por formación de un nuevo enolato, en el cual se forma una doble ligadura entre C-

20 y C-22 (Esquema 22) la protonación puede ser efectuada por ambas caras del doble enlace, lo cual conduce al par epimérico en C-20.



Esquema 22. Epimerización del acetato de vespertilina.

En la tabla 5 se indican los desplazamientos químicos para las señales más representativas de las lactonas bisnorcolánicas que se obtuvieron en este trabajo comparando las δ del compuesto **41** y su epímero **67**; se aprecia un cambio en la señal del protón H-20 y los protones del Me-18, mientras que en los desplazamientos para las señales de carbono los cambios más importantes se visualizan en el C-18 y C-21. Mientras que la lactona **11** se distingue por no presentar el desplazamiento correspondiente para el metilo del acetato en C-3, en comparación con las lactonas **41** y **67** y al mismo tiempo, constatando un cambio en el desplazamiento para el H-3 hacia frecuencias más bajas (de 4.92 a 3.52 ppm).

Tabla 6. Valores selectos de δ para los compuestos epiméricos (20R)-3 β -acetoxipregn-5-eno-20,16 β -carbolactona (67**), (20S)-3 β -acetoxipregn-5-eno-20,16 β -carbolactona (**41**) y (20S)-3 β -hidroxipregn-5-eno-20,16 β -carbolactona (**11**).**

Señal ^1H	20S-(17)	20R-(67)	20S-(11)	Señal ^{13}C	20S-(17)	20R-(67)	20S-(11)
	δ ppm	δ ppm	δ ppm		δ ppm	δ ppm	δ ppm
H-3	4.92	4.78	3.52	C-14	54.3	41.8	50.0
H-6	5.34	5.37	5.34	C-15	33.0	32.6	33.1
H-16	4.55	4.60	4.97	C-16	85.5	82.3	82.7
H-15	2.29	2.33	2.23	C-17	58.5	55.5	58.9
H-20	2.55	2.88	2.61	C-18	13.2	10.2	13.7

Me-OAc-3	2.00	2.00	---	C-19	19.1	19.4	19.4
Me-18	0.73	0.88	0.77	C-20	35.8	36.9	36.0
Me-19	0.99	1.00	1.01	C-21	17.8	13.6	18.0
Me-21	1.28	1.30	1.32	C-22	181.9	179.5	181.5

CONCLUSIONES

- Se realizó la síntesis del compuesto (20*S*)-3 β -acetoxipregn-5-eno-20,16 β -carbolactona (**11**), a partir de diferentes derivados 22-oxocolestánicos.
- Se propone un mecanismo de reacción para explicar la ruptura inusual del enlace C-22/C-23 con la consecuente eliminación de una porción de la cadena lateral para la formación del compuesto **11**.
- El uso de síntesis asistida por microondas permitió obtener mejores rendimientos en menor tiempo para la formación de **11** a partir del compuesto 3,16, 26-triacetato de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β ,26-triilo (**38**) usando como base Cs₂CO₃ y DMF como disolvente. Bajo las mismas condiciones los derivados halogenados **9** y **66** proporcionaron el compuesto **64** en un 90% de rendimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, a biosynthetic approach*. 2nd. Ed. John Wiley & Sons Ltd: Chichester. **2009**. pp. 247-297.
2. Fieser, L.; Fieser, M. *Steroids*. Reinhold: New York. **1959**.
3. Panico, R.; Powell, W. H.; Richer J. C. *A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds*. Blackwell Scientific Publications: Oxford. **1993**.
4. Saxena, M.; Saxena, J.; Nema, R.; Singh, D.; Gupta, A. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, *1*, 168-182.
5. Hostettmann, K.; Marston A. *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press: New York. **2002**. pp. 141-152.
6. Riguera, R. *J. Mar. Biotechnol.* **1997**, *5*, 187-193
7. Sandoval Ramírez, J.; Fernández Herrera, M. A. *Utilidad sintética de las saponinas espirostánicas*, en Delgado, G.; Romo de Vivar, A.; *Temas Selectos de Química de los Productos Naturales*. UNAM: México D.F. **2015**. pp. 493-515.
8. Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, *53*, 126-130.
9. Sandoval-Ramírez, J.; Castro-Méndez, A.; Meza-Reyes, S.; Reyes-Vázquez, F.; Santillán, R.; Farfán, N. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5143-5146.
10. Iglesias-Arteaga, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Mata-Esma, M. Y.; Viñas-Bravo, O.; Bernès, S. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4921-4926.
11. Sandoval-R. J.; Meza-R. S.; Del Rio-R. E.; Hernández-L. M. G.; Suarez-R. A.; Rincón, S.; Farfán, N.; Santillán R. L. *Steroids* **2003**, *68*, 199-204.
12. Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J. C.; Rodríguez-Acosta, M.; Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M. A. *Steroids* **2015**, *98*, 126-131.
13. Khripach, V.; Zhabinskii, V.; De Groot, A. *Annals of Botany* **2000**, *86*, 441-447.
14. Lan, L.; Ren-Xiang, T. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2734-2760.
15. Torres-Zabala, M.; Bennett, M. H.; Truman, W. H.; Grant. M. R. *J. Plant.* **2009**, *59*, 375-386.
16. Mitchell, J. W.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Plimmer, J. R.; Smith, M. V. *Nature* **1970**, *225*, 1065-1066.

-
17. Srivastava, L. M. *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. Academic Press: Oxford. **2002**. pp. 141-152.
 18. G. Adam; V. Marquardt. *Phytochemistry* **1986**, 25, 1787-1799.
 19. Fujioka, S.; Noguchi, T.; Takatsuto, S.; Yoshida, S. *Phytochemistry* **1998**, 49, 1841-1848
 20. Bajguz, A. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, 45, 95–107.
 21. Clouse, D., S.; Sasse, M. J.; *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 427-511.
 22. Bajguz, A.; Tretyn, A. *Phytochemistry* **2003**, 62, 1027–1046.
 23. Takatsuto, S. *J. Chromatogr. A.* **1994**, 658, 3-15.
 24. Sasse, J. M. *Physiol. Plant.* **1997**, 100, 696-701.
 25. Dejonghe, W.; Mishev, K.; Russinova, E. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2014**, 22, 48-55.
 26. Li, J, Chory, J. *J. Exp. Bot.* **1999**, 50, 332-340.
 27. Irani, N. G.; Di Rubbo, S.; Mylle, E.; Van den Begin, J.; Schneider-Pizoń, J.; Hniliková, J.; Šiša, M.; Buyst, D.; Vilarrasa-Blasi, J.; Szatmári, A. M.; Van Damme, D.; Mishev, K.; Codreanu, M. C.; Kohout, L.; Strnad, M.; Caño-Delgado, A. I.; Friml, J.; Madder, A.; Russinova, E. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 583-589.
 28. Borisevich, N. A.; Raichenok, T. F.; Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; Ivanova, G. *V. J. Appl. Spectr.* **2008**, 75, 75-79.
 29. Raichenok, T. F.; Litvinovskaya, R. P.; Zhabinskii, V. N.; Raiman, M. E.; Kurtikova, A. L.; Minin, P. S. *Chem. Nat. Comp.* **2012**, 48, 267-271.
 30. Still, W. C.; Kahn, M; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, 14, 2923- 2925.
 31. Perrin, D. P.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. 4th. Ed. Butterworth-Heinemann Press: Oxford. **1996**.
 32. <https://ourworldindata.org/world-population-growth/>
 33. Holá, D.; Rothová, O.; Kocová, M.; Kohout, L.; Kvasnica, M. *Plant Growth Regul.* **2010**, 61, 29-43.
 34. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h1267?lang=es®ion=MX>
[consulta: Abril de 2017]
 35. Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J. C.; Rodríguez-Acosta, M.; Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M. A. *Steroids* **2015**, 98, 126-131.

-
36. Cruz-Hernández, A. E. *Efecto de una serie de análogos de brasinoesteroides en el desarrollo celular y crecimiento de mono y dicotiledóneas*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, BUAP. **2015**
37. Raichenok, T. F.; Litvinovskaya, R. P.; Zhabinskii, V. N.; Raiman, M. E.; Kurtikova, A. L.; Minin, P. S. *Chem. Nat. Comp.* **2012**, *48*, 267-271.
38. Crane, G. B.; Khaidem, I. R.; Leighton, S. I.; Scott, R.; Newaz, S.S.; Smyser, E. T. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 640-644.
39. Gonzáles, A. G.; García, F. C.; Freire, B. R.; Suarez, L. E. *Anal. Real Soc. Esp. Fís. Quím.* **1971**, *67*, 433-439.
40. Gonzáles, A. G.; Freire, C. G.; Francisco, J. A.; Salazar, L. S. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 1731-1735.
41. Anderson, G. J.; Bernardello, G.; Bohs L.; Weese, T.; Santos, G. A. *Anal. Jardín Bot. Madrid* **2006**, *63*, 159-167.
42. Ahmad, U. V.; Khaliq-uz-Zaman, M. S.; Shameel, S.; Perveen, S. Ali Z. *Phytochemistry* **1998**, *50*, 481-485.
43. Mimaki, Y.; Watanabe, K.; Sakagami, H.; Sashida, Y. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1863-1868.
44. Yun, H.; Lijian, L.; Wenhong, Z.; Yuhong, D.; Yongli, W.; Qiang, W.; Ding, Z. *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43*, 672-677.
45. Wojtkielewicz, A.; Dlugosz, M.; Maj, J.; Morzycki, W. J.; Nowakowski, M.; Renkiewicz, J.; Strnad, M.; Swaczynová, J.; Wilczewska, Z. A.; Wójcik, J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3667-3673.
46. Mola-Garate, J. L.; Suarez, G. L.; Martínez- Pérez S. C.; Iglesias- Arteaga, A. M.; Coll Herrera, D.; Coll Machado, F. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1203-1209.
47. Forestieri, R.; Donohue, E.; Balgi, A.; Roberge, M.; Andersen, J. R. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3918-3921.
48. Iglesias-Arteaga M. A.; Sandoval-Ramírez J.; Mata-Esma M. Y.; Viñas-Bravo O.; Bernès S. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4921-4926.
49. Hernández-Linares, G.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S.; Sandoval-Ramírez, J.; Gómez-Calvario, V.; Bernès, S. *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**, *51*, 217-221.

-
- 50.** Nakata, N.; Tokudome, A.; Yanai, H.; Nohara, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *60*, 150-153.
- 51.** Tian, W. S.; Guan, H. P.; Pan, X. F. *Chin. Chem. Lett.* **1994**, *15*, 1013-1016.