



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

“Síntesis y evaluación del triacetato de (25*R*)-5-hidroxi-6,22-dioxo-5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo como promotor de la germinación de *Agave Guiesbreghtii*”

Tesis para obtener el título de  
**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

**LAURA ELIDEN LARA MORALES**

Director de tesis

DR. JÉSUS SANDOVAL RAMÍREZ

Codirector de tesis

DR. ALAN CARRASCO CARBALLO

2023





El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y el Dr. Alan Carrasco Carballo. Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en los siguientes congresos.

**54° Congreso Mexicano de Química y 38° Congreso Nacional de Educación Química Trabajos estudiantiles y profesionales de Química Orgánica (QORG)** Cartel “Síntesis del derivado 22 oxo-colestánico de la  $5\alpha$ OH-laxogenina con posible actividad promotora de crecimiento vegetal” presentado en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en 2019 bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y el Dr. Alan Carrasco Carballo.

**4th Iberoamerican Symposium on Organic Chemistry (SIBEAQO-IV)** Cartel “Derivados 22-oxocolestánicos como promotores de crecimiento vegetal al rescate del agave mexicano” presentado en Cayo, Santa Maria, Cuba en 2019 bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez, la M. C. Itzel Paulina Morales Sandoval y el Dr. Alan Carrasco Carballo.

Las siguientes páginas no son mi mayor orgullo ni tampoco representan absolutamente lo que soy, pero no hubiera podido terminar sin las personas a continuación.

Primero a mis padres, quienes hicieron posible este trabajo que yo había dado por perdido. Volqué muchos de mis traumas y problemas mentales en estas páginas, así que podré seguir adelante.

Alan, la mente maestra.

Mónica, mi mediadora y compañera.

Ana, por las mil estrellas, por el futuro.

Lyda, -quien ya no será capaz de leer esto- por tu apoyo estos años.

Jessy, por las nuevas -y efímeras- ilusiones.

## AGRADECIMIENTOS

Extiendo mis agradecimientos a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, al Laboratorio de Elucidación y Síntesis Orgánica por permitirme desarrollar este proyecto. A sí mismo a mis directores, asesores y comisión revisora, por su guía y paciencia durante el tiempo trabajado.

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez por la oportunidad de trabajar a su lado, su guía y su experiencia.

Al Dr. Alan Carrasco Carballo por permitirme explorar una pequeña fracción del amplio campo de la Química Orgánica, por dejarme trabajar y jugar en el laboratorio. Por su compañía y su enorme paciencia, ya que, sin su ayuda esto no sería posible.

A la M. C. Paulina por permitirme trabajar en su laboratorio, por su ayuda y sus consejos para mejorar.

A la Lic. en Biotecnología Mónica Delfín, por sus consejos, su amistad, su compañerismo, su confianza y su apoyo durante todos estos años.

A mi mejor amiga, por estar conmigo todo este tiempo, por todos esos recuerdos que llevo conmigo, por las nuevas experiencias, las risas y las lágrimas.

A la música, a SVT quien con Heng:garæ me salvó la vida.

A mis amigos de internet, quienes hicieron más divertidas mis madrugadas, Jess, Luna, Aby, Conny.

## Índice

RESUMEN .....	VI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Promotores de crecimiento vegetal .....	4
2.2 Brasinoesteroides .....	5
2.3 Germinación de semillas de Agave .....	10
3. Objetivos .....	14
3.1 Objetivo general .....	14
3.2 Objetivos particulares .....	14
4. METODOLOGÍA .....	15
4.1 Caracterización y purificación. ....	15
4.2 Síntesis.....	16
4.3 <i>Prueba de germinación de semilla en papel</i> .....	18
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	20
CONCLUSIONES .....	34
BIBLIOGRAFÍA .....	35

## RESUMEN

En México se encuentra el 75 % de las especies de Agave, desde la época prehispánica ha existido una intensa relación entre los humanos y este género de plantas, hoy en día hay variantes con importancia regional, nacional e internacional dentro de nuestro territorio, de las cuales hay un conocimiento tradicional considerable y una variación morfológica alta. Sin embargo, la diversidad genética de las plantas de Agave está amenazada por la reproducción comercial clonal y el cambio climático además de la reducción de la distribución y el número de poblaciones silvestres. La reproducción sexual es poco común y la investigación sobre la germinación de semillas es escasa. Se sabe que la reproducción sexual aumenta la variabilidad genética en las plantaciones cultivadas y también puede disminuir los daños derivados de las plagas y enfermedades.

Desde la biotecnología se han podido fabricar de manera sintética reguladores de crecimiento que pueden imitar el rol de las fitohormonas de manera natural, como consecuencia, estos reguladores han permitido potencializar el proceso de cultivo en los organismos vegetales. Por tal motivo se realizó la síntesis del compuesto triacetato de *(25R)-3 $\beta$ ,5,26-trihidroxi-5 $\alpha$ -colestano-6,22-diona*, utilizando como materia prima a la diosgenina, resultando en una ruta de síntesis rápida y reproducible, con buenos rendimientos de reacción.

Este compuesto fue evaluado como PCV mediante un piloto de bioensayos con semillas de *Agave Guiesbreghtii*, estas semillas fueron tratadas con un proceso de inmersión a distintos tiempos, partiendo desde los 30 min. hasta las 48 horas, posteriormente fueron sembradas bajo condiciones controladas para medir su germinación. Al final de la experimentación se obtuvieron resultados favorables y positivos para el uso del derivado 22-oxo-colestánico, debido a su alto porcentaje de germinación en 6 de los 8 bioensayos realizados, por lo que queda abiertas las posibilidades a reproducciones experimentales posteriores, funcionando como protocolo con la posibilidad de modificar las variables contempladas, tales como la especie del *Agave* o los tiempos de tratamiento de sus semillas.

# 1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población a nivel mundial conlleva a uno de los principales retos del siglo XXI, incrementar la producción de la industria agrícola a un nivel suficiente para cubrir necesidades alimenticias y de materia prima. Una de las principales estrategias que se han empleado ha sido el aumentar la cantidad de hectáreas utilizadas para la siembra. Sin embargo, es una práctica que pone en riesgo el equilibrio ambiental, potencia el desplazamiento de especies, así como la deforestación de selvas y bosques. Debido a esto existe una constante búsqueda de técnicas o métodos alternativos para mejorar los rendimientos o reducir pérdidas por hectáreas sin causar la reducción de áreas verdes.

En los últimos años parte de la investigación biotecnológica se ha centrado en la búsqueda y obtención de compuestos de origen natural capaces de aumentar, acelerar o mejorar la obtención de productos agrícolas o en la proliferación de especies de interés alimenticio o ambiental, como el Agave. Este tipo de compuestos fueron encontrados al estudiar el sistema de señalización propio de las plantas. Su propia investigación data de los años 1968 y 1979, a partir de ahí han mostrado gran potencial para la disminución de pérdidas y aumento de rendimientos gracias a los beneficios que ofrece a las plantas, por lo que comenzaron a utilizarse bajo la definición de “fitohormonas o promotores de crecimiento vegetal (PCV)” que se refieren a un grupo de sustancias orgánicas que tienen efecto en procesos fisiológicos de las plantas en bajas concentraciones [Fig. 1].

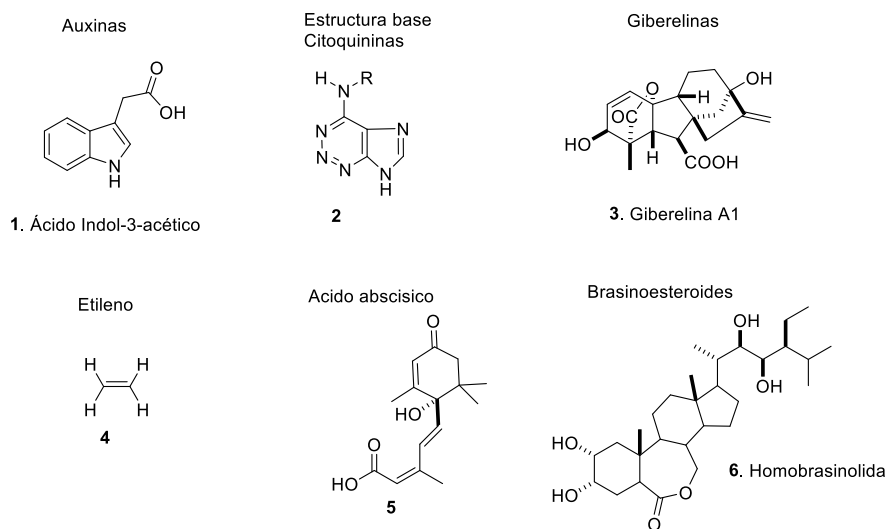


Figura 1 Ejemplos de Promotores de crecimiento vegetal



Parte de la diversidad genética actual del Agave corre el riesgo de perderse debido a la reproducción clonal comercial, el cambio climático y la reducción de la distribución y el número de poblaciones silvestres. La reproducción sexual aumenta la variabilidad genética en las plantaciones cultivadas y también puede disminuir los daños derivados de las plagas y enfermedades. [6]

En el presente trabajo, se puso a prueba bajo condiciones controladas a un compuesto tipo brasinoesteroide como un promotor de crecimiento vegetal ante semillas de la especie de *Agave Ghiesbreghtii* con la finalidad de comprobar si este tipo de compuestos ayudan también a la promoción de germinación de las semillas, además de sus múltiples beneficios a nivel vegetal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Promotores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos, son similares a las fitohormonas y cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos a nivel celular en los organismos vegetales. [7]

Existen distintos tipos de reguladores capaces de promover o inhibir el crecimiento vegetal. Algunos autores han sugerido que estos compuestos son capaces de controlar el crecimiento de manera específica, por lo que se han podido clasificar de acuerdo a la actividad o capacidad estimulante que cada uno pueda poseer en el crecimiento vegetal, en un órgano o procedimiento único como la fotosíntesis, maduración de frutos, etc. [8] [Tabla 1]

Tabla 1. Principales PCV (Alcantara et al. 2019)

Fitohormona	Efecto	Precursor
<b>Auxinas</b>	Floración y elongación de tallos Producción de raíces adventicias Aumento de dominancia apical	L-Triptofano
<b>Giberelinas</b>	Desarrollo de tejidos Alargamiento de segmentos nodales Iniciación floral Induce germinación de semillas Importancia para la fertilidad en las plantas Elongación de raíces	Ent-Kaureno
<b>Citoquininas</b>	Iniciación y elongación de raíces Activa la senescencia de las hojas Estimula la generación de brotes axilares Sustenta y puede iniciar la proliferación de tejidos vegetales madre	Adenina
<b>Etileno</b>	Regula la maduración y senescencia vegetal Desarrollo de órganos sexuales Mejorar las características en la maduración de frutos	Metionina

	Maduración de hojas Inicio de floración	
<b>Ácido abscísico</b>	Regula la transpiración celular (estomas) Puede inhibir el proceso de germinación vegetal Regula y mantiene la dormancia en las semillas, además de estimular su maduración Puede inducir senescencia vegetal y floración	Isopentil Pirofosfato Carotenoides
<b>Brasinoesteroides</b>	Controla el crecimiento de raíces Diferenciación de estomas y sistema vascular Control y adaptación a factores de estrés Regula la foto morfogénesis	Campesterol

Hoy en día estos reguladores han permitido potencializar el proceso de siembra y cosecha en algunos cultivos y organismos vegetales, siendo una de las principales fuentes ideales en función de lograr el objetivo que la biotecnología ha encaminado en los últimos años: la utilización de técnicas que logren eliminar muchas de las problemáticas que se presentan en los cultivos como la presencia de fitopatógenos microbianos, cambios ambientales, cambios en el medio de cultivo, entre otros, pero dado su gran diversidad y baja biodisponibilidad, es complicado diseñar alternativas de cada uno de ellos, por lo que se ha recurrido a la síntesis de los mismos o análogos, un grupo particular que destaca en esto, son los brasinoesteroides.[9]

## 2.2 Brasinoesteroides

Los primeros descubrimientos de la presencia de un nuevo tipo de hormona vegetal se encontraron en Japón, en una investigación Marumo et al. en 1968 [10] pudieron aislarse tres fracciones activas de hojas de *Distylium racemosum*, que es un árbol conocido en Japón como "Isunoki" [Fig. 3]. Durante el desarrollo se estudiaron pequeñas agallas de insectos (deformidades inusuales causadas por los químicos que regulan el crecimiento de las plantas o por un estímulo producido por un insecto u otra especie de plaga artrópoda) de este árbol como un intento de identificar las sustancias que inducían la proliferación y ampliación celular observada en la agalla del insecto [10]. Resultó que dicha sustancia activa no sólo se

encontraba en las agallas de los insectos, sino también en las hojas jóvenes del propio árbol, de las cuales se obtuvieron extractos y se identificaron fracciones nombradas como A1 y A2.



Figura 3 *Distylium racemosum* Siebold & Zucc.

Luego de nuevas purificaciones se determinaron sus valores cromatográficos de Factor de Retardo (RF) y se comprobó que estos valores eran claramente diferentes de los de las fitohormonas conocidas. Continuando con las comparaciones, realizaron bioensayos de lámina de arroz de los cuales se concluyó que las fracciones contenían un nuevo tipo de hormona vegetal con una actividad similar a la de las auxinas y las citoquininas. [10] Más tarde en 1979 Grove et al. [11] aislaron del polen de colza, *Brassica napus*, a la brasinolida (BL). Su estructura se determinó mediante análisis espectroscópico (EI-MS, FAB-MS, NMR) y por difracción de rayos X [Fig. 4]. El segundo brasinoesteroide (BR), denominado castasterona (CS) [Fig. 5], fue aislado en 1982 por Yokota et al. de las agallas de insectos del castaño, *Castanea crenata*. [12]



Figura 4 *Brassica napus*.

Para el año 1988 se empezó a considerar a los brasinoesteroides como grupo de hormonas vegetales endógenas, únicos de tipo esteroidal y esenciales para el crecimiento normal de las plantas [13], dicha clasificación condujo a que para el año 2003 se hubieran determinado alrededor de 60 brasinoesteroides, muchos de ellos encontrados en brotes apicales y tejidos vegetativos activos de plantas jóvenes como también en semillas de un gran número de especies herbáceas y arbustivas [14], destacando a la brasinolida (BL), castasterona (CS), teasterona (TE) y tifasterol (TY), entre otras.

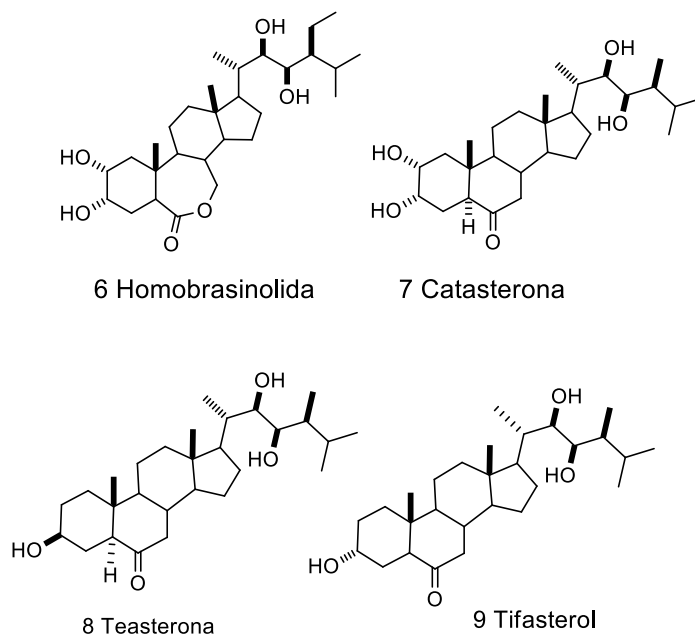


Figura 5 Principales PCV utilizados

La estructura básica de un brasinoesteroide natural está constituida por varios anillos, existiendo formas con 27, 28 y 29 carbonos. Todos los brasinoesteroides naturales hasta ahora conocidos son derivados polihidroxilados del 5 $\alpha$ -colestano. Las agrupaciones funcionales que se suponen sean las responsables de la actividad biológica de estos compuestos y sus variaciones estructurales provienen del tipo y la posición de la funcionalidad en los anillos A/B y la cadena lateral.[14] [Fig. 6]

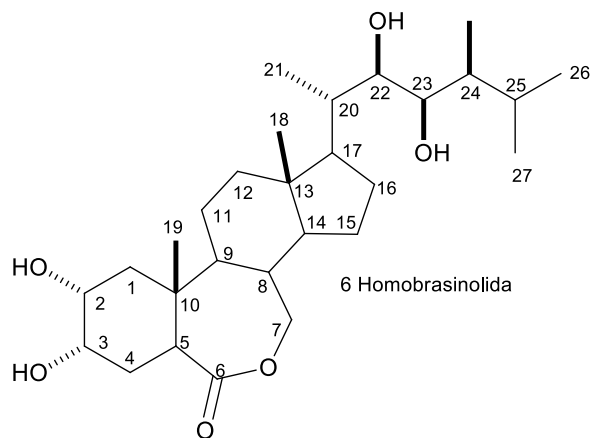


Figura 6 Estructura y numeración de carbonos de BR Homobrasinolida

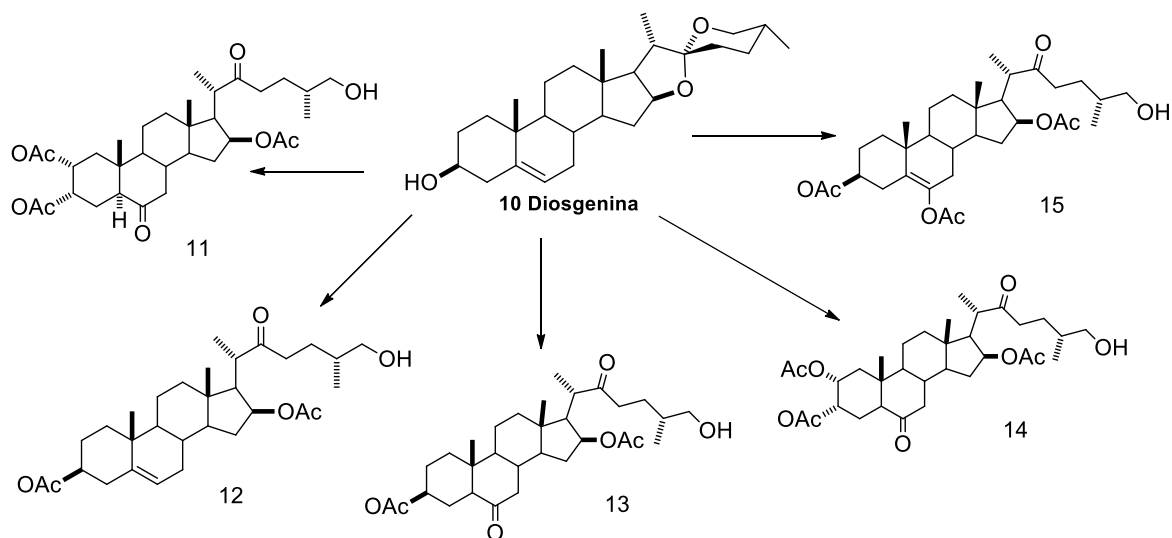
Los BRs provocan crecimiento por elongación de epicótilos, hipocótilos y pedúnculos en dicotiledóneas, mientras que en monocotiledóneas se expresa en coleoptilos y mesocotilos. Otros efectos de crecimiento relacionados corresponden a la reorientación transversal de microtúbulos, producción de metabolitos secundarios, crecimiento del tubo polínico, inclinación y enrollamiento de las hojas.[15] En forma sinérgica con auxina, los BRs promueven un incremento de la curvatura gravitrópica en maíz inducen la proliferación de callo in vitro y la inducción de raíces adventicias[16]. Se sabe que la aplicación exógena de diferentes tipos de brasinoesteroides puede emplearse en el mejoramiento de la germinación de semillas e inducir la promoción del crecimiento de hipocótilos, cotiledones, láminas de las hojas, elongación de raíz lateral y diferenciación del meristemo apical (todo ello depende de la concentración del metabolito dentro de la especie vegetal).

Diversos autores, tanto en Europa Occidental como Oriental, así como en Asia han informado acerca de los efectos beneficiosos que las aplicaciones de la brasinolida (BL), la 24-

epibrasinolida (EBL) y la 28-homobrasinolida (HBL) ejercen en el crecimiento y el rendimiento de diferentes cultivos. Una de las dificultades para el uso práctico de BRs es la baja estabilidad de sus efectos en condiciones de campo y por ese motivo, no se continuaron las aplicaciones de estos compuestos a gran escala en Europa Occidental y Japón. [17] Pero si se pudiera nombrar la principal limitante de trabajar con estos compuestos, serían sus bajos rendimientos de obtención y extracción, debido a esto, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar protocolos de síntesis de brasinoesteroides a partir de materias primas con mayor disponibilidad comercial.

En el año 1990, se informó, por primera vez, la obtención de análogos con un anillo espirocetálico en la cadena lateral, además del uso de sapogeninas esteroidales para la síntesis de estos reguladores del crecimiento vegetal. Krishna P. en el año 2003 [18] llevó a cabo la síntesis de la homobrasinólida y además encontró una relación entre la estructura del derivado y los análogos que presentaron actividad biológica, determinando así que es necesaria la presencia de grupos hidroxilos/polares, un grupo carbonilo y una cadena lateral hidroxilada para favorecer su actividad como promotor de crecimiento vegetal.

Recientemente, Sandoval Ramírez J. en colaboración con Zeferino Díaz R. y su equipo han diseñado, sintetizado y evaluado biológicamente una nueva familia de promotores de crecimiento vegetal, los cuales han presentado no solo rendimientos alto sino distintos usos potenciales, gracias a las nuevas rutas de síntesis propuestas y a la caracterización de distintos compuestos se han podido encontrar nuevos derivados del 22-oxocolestano a partir de las sapogeninas esteroidales diosgenina y hecogenina. [19] Mismos que presentaban un rendimiento global del 72-74% y una actividad similar a la de los brasinoesteroides por medio de bioensayos de inclinación de la lámina de arroz en dos variedades de arroz mexicano. [20] [Esquema 1]



Esquema 1 Ejemplos de derivados Oxocolestánicos sistetizados a partir de Diosgenina (Sandoval Ramírez, Zeferino Díaz et al. 2017).

Nuevas rutas de síntesis han sido propuestas a través del tiempo, conforme más herramientas tecnológicas se suman a la ecuación. Un modelamiento computacional podría reducir los tiempos además del efecto prueba y error, por ejemplo, predecir un intermediario específico en la reacción. En la investigación de Zeferino Díaz [19] se informó de la apertura regioselectiva del anillo E del esteroide de sapogeninas esteroidales a través de acetólisis, seguida de un trabajo básico hacia la síntesis de nuevos marcos esteroidales de dihidropirano (DHP). De manera práctica la actividad que poseen estos compuestos se ha enfocado a procesos de elongación para el aumento de biomasa, pero recientemente se ha reportado gran actividad contra fitopatógenos lo que incrementa su potencial, principalmente hacia vías de germinación, donde estos son el principal problema durante este proceso. [Fig. 7]

### 2.3 Germinación de semillas de Agave

Para el género de Agave la propagación asexual a través de hijuelos rizomatosos parece ser la estrategia de establecimiento natural más común y exitosa [21], dicha técnica es empleada en plantaciones comerciales y domésticas pues facilita el manejo agronómico. A pesar de la creencia común de que las semillas de Agave no son viables la producción de plántulas se

considera igualmente favorable con la práctica comercial de propagación.[22], este proceso garantiza una buena diversidad genética y la conservación de la especie.

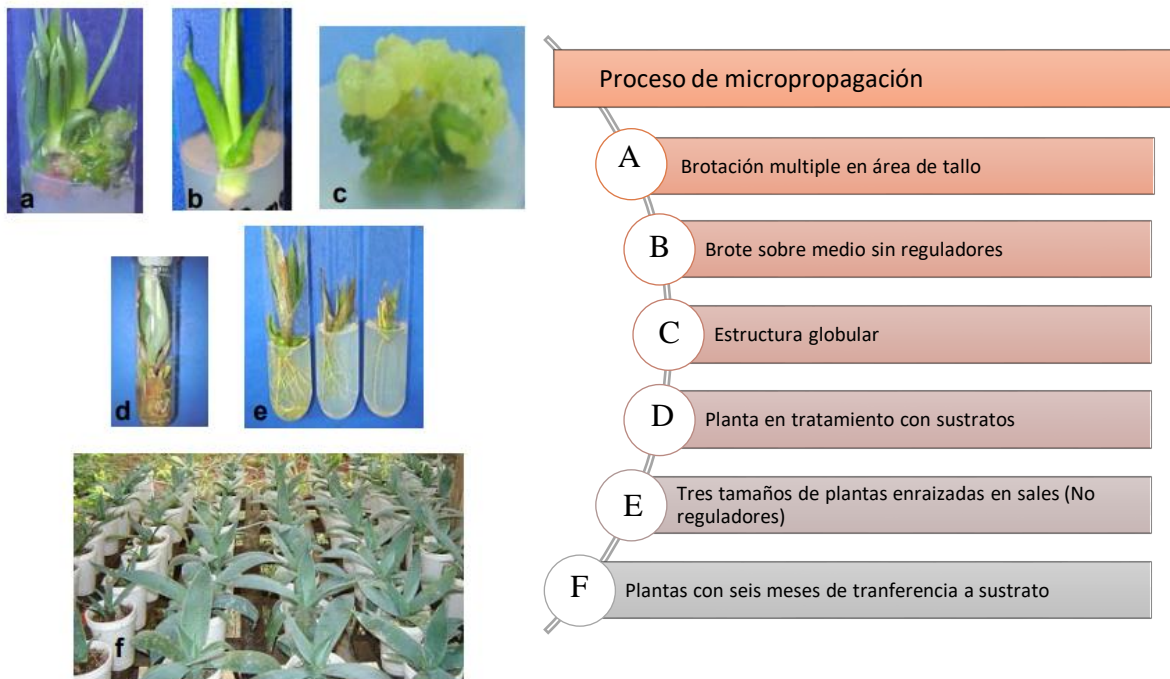


Figura 7. Modelo de reproducción de *Agave inaequidens* Koch (Rodríguez et. al. 2008)

La germinación es un proceso complejo que comienza con la absorción de agua por parte de la semilla seca (imbibición) y se completa cuando una parte del embrión, normalmente la radícula se extiende a través de las estructuras que lo rodean a este proceso suele llamarse “germinación visible”. Desde el punto de vista agronómico, se considera que una semilla ha germinado cuando a partir de ella se origina una planta adulta capaz de alcanzar la fase reproductora; es decir, capaz de producir nuevas semillas. [23] La International Seed Testing Association (ISTA), considera el proceso de germinación de una semilla como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, manifestado fisiológicamente por la división celular y por la diferenciación [24]. La primera expresión de este proceso es la emergencia de la radícula [Fig. 8]

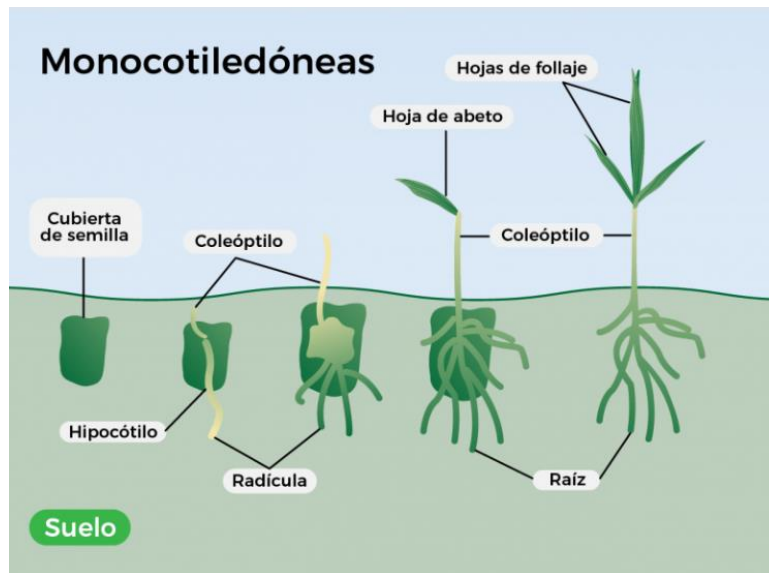


Figura 8 Proceso de germinación de las semillas, Ilustración por Ruiz E. Obtenido de: <https://historiadelavida.editorialaces.com/proceso-de-germinacion/>

El tiempo hasta el inicio de la germinación es el período hasta que comienza la germinación; puede denominarse latencia y puede indicar el umbral superado por una semilla para la germinación como resultado de los requisitos térmicos [25] [26]. El índice de germinación muestra la distribución de dicho proceso en el tiempo y la “germinación máxima acumulada” representa la capacidad germinativa de la población de semillas. Ambos parámetros dependen en gran medida de la temperatura. [27]

Experimentalmente se ha comprobado que las semillas de algunas especies de Agave carecen de latencia y pueden alcanzar una alta germinación dependiendo de la temperatura y otros factores ambientales. [28] [29] La temperatura es un factor importante en la regulación de la germinación de las semillas[30] ; sin embargo, las condiciones térmicas para la germinación óptima de Agave sólo han sido descritas para algunas especies, aunque esta suele variar entre los 25°C y los 27°C.

El conocimiento de cada fase del proceso nos ayuda a comprender la importancia de las características intrínsecas de las semillas, como el tamaño, el tipo, el origen, permeabilidad al agua y latencia. [26]

Un test de germinación estándar recoge como resultado el porcentaje de plántulas normales obtenido tras un análisis de germinación. Por lo tanto, es una prueba que informa sobre las semillas que más rápidamente han reanudado la actividad metabólica y el crecimiento propios de la germinación. [31]

Consiste básicamente en colocar las semillas sobre un sustrato adecuado, humedecerlas y controlar las condiciones de incubación durante un cierto período de tiempo, durante el cual se realizan conteos de germinación, observando el número de semillas que han iniciado dicho proceso. Se pueden evaluar también las plántulas obtenidas, identificando el número de plántulas normales y anormales. La representación del número total o más frecuentemente del porcentaje de semillas germinadas, frente al tiempo transcurrido desde la siembra, constituye una curva de germinación. Estas proporcionan toda la información que es posible solicitar una vez realizado un ensayo de este tipo. Sin embargo, para expresar los resultados obtenidos lo más frecuente es recurrir al cálculo de índices de germinación, que nos permiten estimar la calidad del lote y comparar cuantitativamente diferentes lotes de semillas o muestras sometidas a diferentes tratamientos, pero carecen reportes del uso de promotores o catalizadores que faciliten el proceso. Lo que destaca el gran potencial de estudio sobre el uso de compuestos esteroideos para favorecer la germinación y recuperación de esta especie, siendo el enfoque abordado en el presente trabajo.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

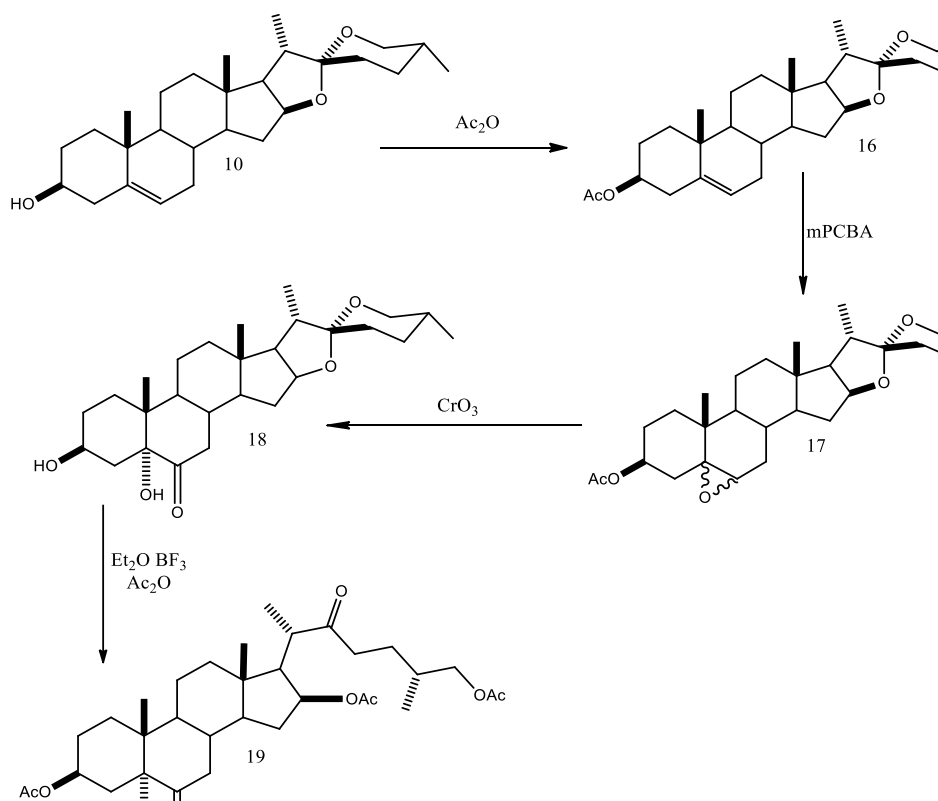
- Sintetizar y evaluar en piloto el efecto de la germinación de *Agave guiesbreghtii* la triacetato de (25*R*)-5-hidroxi-6,22-dioxo-5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo

#### 3.2 Objetivos particulares

- Sintetizar el triacetato de (25*R*)-5-hidroxi-6,22-dioxo-5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo derivado de diosgenina.
- Diseñar y evaluar una prueba piloto de germinación de semillas de la especie *Agave guiesbreghtii* tratadas con el compuesto sintetizado a diferentes concentraciones.

## 4. METODOLOGÍA

Se realizó la obtención del derivado 22 oxo-colestánico de la 5 $\alpha$ OH laxogenina (18) a partir de la Diosgenina (10) , pasando por un epóxido esteroidal (17) y su posterior oxidación para dar lugar a la materia prima para llevar a cabo la formación del derivado 5 $\alpha$ OH 6 oxo esteroidal (18), para su posterior apertura de los anillos e y f, como se observa en el esquema 2.



Esquema 2 . Síntesis del derivado 22-oxocholestanico de 5 $\alpha$ -hidroxilaxogenina

### 4.1 Caracterización y purificación.

#### ➤ Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 500 MHz se obtuvieron en el equipo Bruker para la obtención de experimentos de <sup>1</sup>H, utilizando cloroformo y metanol deuterado

conteniendo tetrametilsilano como referencia interna, presentando los desplazamientos químicos en ppm ( $\delta$ ).

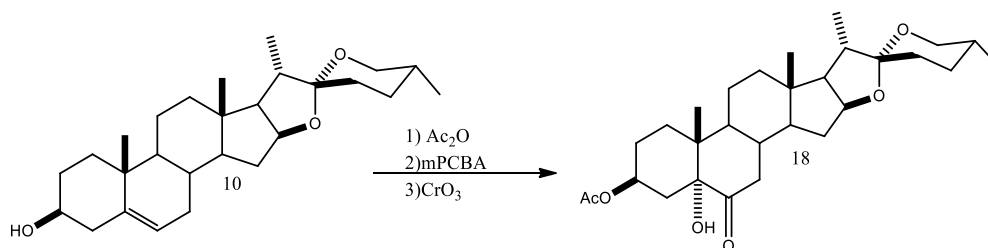
➤ Cromatografía en capa fina (CCF)

Para la cromatografía analítica en capa fina (CCF) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor ALUGRAM Xtra SIL F254 de Macherey-Nagel y como fase móvil sistemas de elución de hexano/ acetato de etilo. Para su revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara de UV) y por tratamiento con ácido sulfúrico al 50% con posterior calcinación de las placas.

➤ Cromatografía en columna

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, de acuerdo a la técnica “flash” utilizando un sistema de eluyente de hexano/acetato de etilo con polaridad creciente

## 4.2 Síntesis

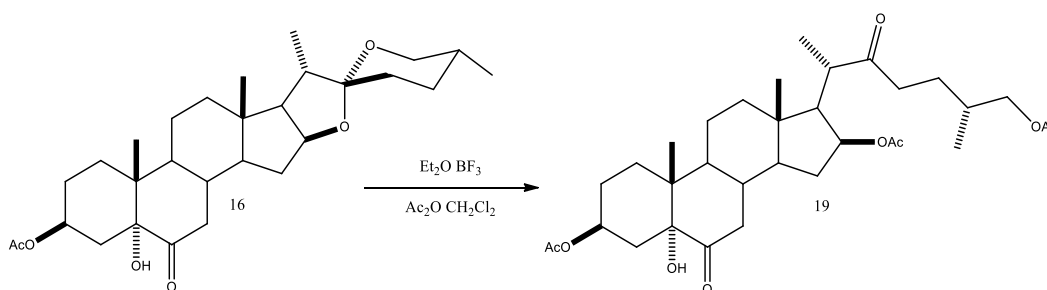


Esquema 3 Reacción in situ de la obtención de Laxogenina

Se utilizó diosgenina (10) comercial de Química Meyer con una pureza  $\geq 92\%$ . Una solución de 2g (4.82 mmol) de diosgenina en 10 mL de anhídrido acético (106 mmol) se colocó a reflujo por 1 h. transcurrido el tiempo se le adicionó agua con hielo para formar un precipitado blanco, el cual fue lavado con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y posteriormente con agua. El compuesto 18 después de obtenerse en forma sólida se utilizó para la siguiente etapa de la síntesis.

Se preparó una solución del crudo (comp. 18) anterior en 15 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , posteriormente se adicionaron 600 mg de mCPBA, la mezcla se dejó a temperatura ambiente hasta la desaparición de la materia prima, la reacción fue monitoreada por CCF, posteriormente se extrajo con 25 ml de AcOEt y se realizaron lavados con salmuera, solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y agua, finalmente la fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhídrido y evaporó el disolvente. Se obtuvieron 1.45g de compuesto crudo de la reacción, mismo que se utilizó para la tercera etapa.

En un matraz de bola provisto de agitación magnética se colocó 1.4g el crudo anterior, los cuales se disolvieron en 1.5 ml de acetona, posteriormente se le agregó 500 mg de  $\text{CrO}_3$  que estaban disueltos en 0.25 mL de agua y se colocó el matraz en condiciones de calentamiento el no sobrepasar los  $55^\circ\text{C}$  durante 40 minutos. La reacción fue monitoreada a la media hora por CCF en un sistema 6:4(hexano-AcOEt) y al comprobar la desaparición de la materia prima, fue detenida después de 2 horas de reacción. El crudo de la reacción fue vertido en un matraz erlenmeyer con agua fría, el sólido precipitado fue filtrado y recristalizado en metanol, se evaporó el solvente en un rota vapor y se dejó secar en el alto vacío para eliminar los residuos del solvente utilizado. El crudo de la reacción fue purificado por cromatografía en columna utilizando como eluyente un sistema 6:4 (hexano-AcOEt) y como fase estacionaria gel de sílice y obteniendo un rendimiento global del 52%.



Esquema 4 Reacción in situ de la obtención del compuesto 5a partir de acetato de Diosgenina

Se disolvieron 1.0 g del acetato de 5 $\alpha$ hidroxi-laxogenina en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ , paralelamente se preparó una solución de 2.5 mL de  $\text{Ac}_2\text{O}$  y 3 mL de  $\text{Et}_2\text{OBF}_3$ , posteriormente se le añadió a la solución esteroidea y se mantuvo en agitación durante 15

min, después se vertió sobre agua con hielo y extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y agua destilada, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhídrido y concentró a presión reducida, el crudo fue purificado por columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice y fase móvil sistema 4:6 (hexano: acetato de etilo) obteniendo el producto triacetilado como mayoritario, un total de .663 g.

### 4.3 Prueba de germinación de semilla en papel

La prueba de germinación estándar en papel se desarrolló en condiciones de laboratorio, consistió en evaluar la semilla tratada con los compuestos sintetizados en condiciones controladas de humedad, temperatura ( $25^\circ \text{C}$ ) y luz, para determinar el porcentaje de plántulas normales que determinan la capacidad germinativa.

#### ➤ Semillas y condiciones generales

Se realizó un bioensayo de una muestra total de 1600 semillas viables de Agave G. que se encontraran en un rango de 0.00365 – 0.00417g, fueron divididas en pequeños lotes de 50 semillas cada uno para su posterior periodo de imbibición con duraciones de 30 min, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas. El proceso de imbibición se realizó con ambos compuestos obtenidos a una concentración del brassinoide BSS4 y dos controles (uno con agua tridestilada y el otro en semilla seca).

#### ➤ Germinación y seguimiento

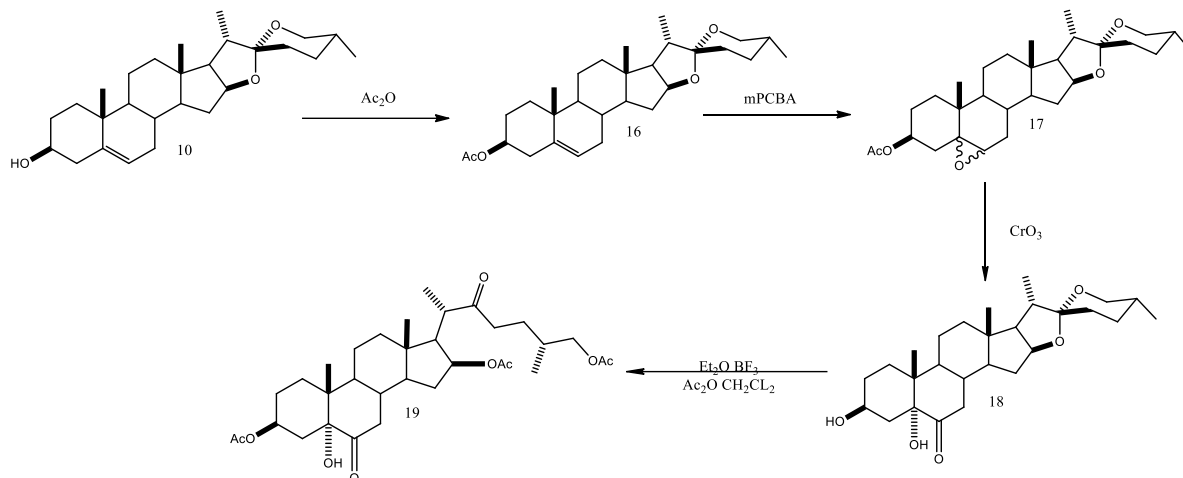
Para la óptima humedad requerida por la semilla esta prueba de germinación, fue utilizado como sustrato un papel filtro de alta calidad que permitió un óptimo desarrollo de la germinación y que abre la posibilidad a la reproductibilidad posterior de los resultados. El papel se eligió conforme con las características marcadas la ISTA (2004): no debe ser tóxico para las plántulas en desarrollo, debe de absorber y suministrar humedad suficiente para que las semillas germinen y debe ser lo suficientemente fuerte para que no se deshaga mientras se manipula, además de que no lo penetren las raíces de las plántulas en desarrollo [24].

Dicho papel fue colocado como base en cajas Petri de 100x35mm estériles, en cada una de las cajas se sembraron lotes de 50 semillas de manera homogénea, guardando espacios entre

ellas de entre 5-6 mm, con el compuesto y los controles, esto bajo condiciones de esterilidad. Dichas cajas fueron incubadas durante 7 días a 25° C y fueron monitoreadas cada 24 horas.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 Síntesis



Esquema 5. Obtención del triacetato de (25R)-3β,5,26-trihidroxi-5α-colestano-6,22-diona.

Si bien la 5α-hidroxilaxogenina es un esteroide conocido, su baja biodisponibilidad y alto costo, no resulta factible su uso de origen natural, por lo que una alternativa es sintetizarlo a partir de otros esteroides comerciales, como es el caso de la diosgenina (10), por lo que se propuso funcionalizar el doble enlace de esta para posteriormente realizar la apertura del espiroacetel. Para una primera etapa de la síntesis, se partió de la diosgenina (10) llevando a cabo una reacción de acetilación en posición tres, dicha etapa constó de una esterificación vía anhídrido acético. Posteriormente se realizó la preparación de un epóxido en los C-5 y C-6 mediante el uso de un peroxiácido (mPCBA), reteniendo el grupo acetilo en posición 3 con la finalidad de protección para oxidaciones posteriores.

Durante la segunda reacción el acetato de diosgenina reaccionó con un peroxiácido para formar un epóxido, el reactivo utilizado en esta reacción fue el *m*-CPBA, en este caso no resultó en una reacción estereoselectiva pues se obtuvo una mezcla de los epóxidos en las caras α y β, dicha mezcla fue confirmada por medio de espectros de resonancia magnética nuclear. La oxidación del epóxido fue realizada con el fin de lograr una protonación del oxígeno del anillo, seguida de un ataque nucleofílico, dando lugar a grupos hidroxilos en las

posiciones 5 y 6, que sufrieron una oxidación inmediata, esto mediante el uso de  $\text{CrO}_3$  para dar lugar a un grupo cetónico en C-6. Hasta este paso se realizó de manera *in situ* (con las reacciones secuenciadas sin purificación en cada una de las fases), dada la continuidad de las reacciones sin cruce entre ellas, primero en la acetilación posterior a la filtración se obtiene un sólido que es el mismo que se puede disolver en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y adicionar el peroxiácido y, posterior al tratamiento de este en mismo solido se logró oxidar, hasta previo a esta reacción los rendimientos fueron cuantitativos y sin la formación de subproductos, pero en esta reacción de oxidación fue donde se observaron una mayor cantidad de subproductos, aunque mayoritario el acetato de 5 $\alpha$ hidroxi laxogenina (Figura 9), por lo que fue necesario realizar cromatografía en columna para obtener el producto puro.

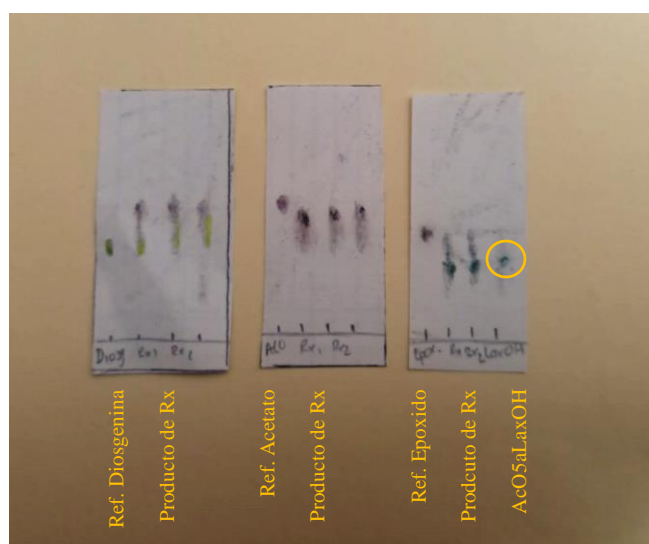


Figura 9 Placas cromatograficas de proceso de reacciones

Para la última reacción de esta ruta el anhídrido acético involucrado favoreció que, en lugar de generarse el compuesto 22-oxo-26 OH de forma mayoritaria tras la formación de la cetona en el carbono 22, se diera una reacción de acetilación que conllevara a la mayor formación de 22-oxo-26Oac-5-hidroxilaxogenina (18) dándonos una condición limitante para obtener la mayor proporción del compuesto está en duplicar la cantidad de anhídrido. Por otra parte, la temperatura permitió regular la velocidad de la reacción y dirigir el proceso a la obtención de este compuesto en específico.

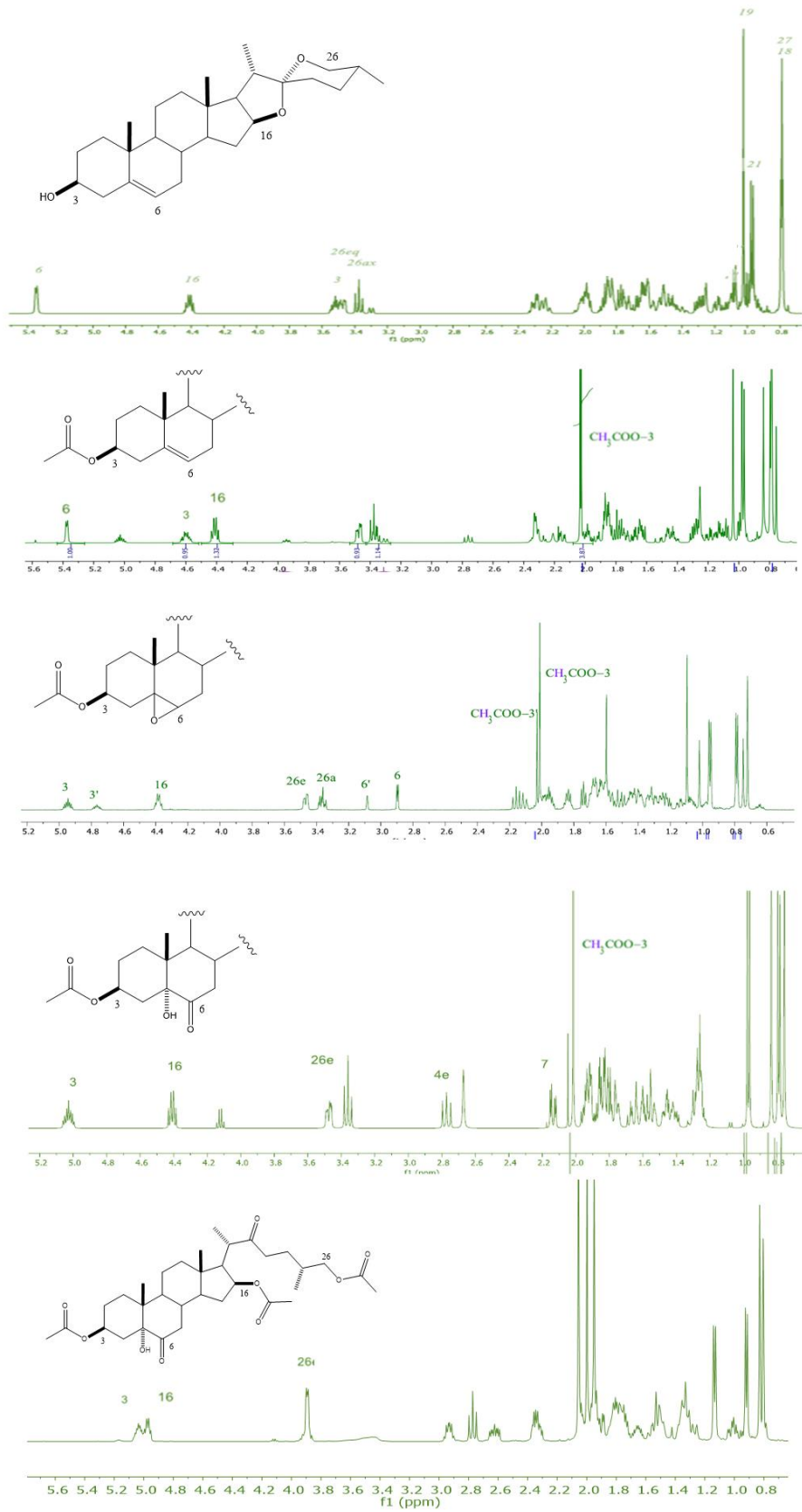


Figura 10 Espectro de 500 MHz de los productos obtenidos en cada etapa

Los compuestos obtenidos fueron caracterizados por la técnica espectroscópica RMN, esto es esencial ya que en muchas de las reacciones realizadas los cambios estructurales son muy específicos y centralizados, es importante la caracterización incluyendo la materia prima, que a través de la comparación de los espectros permitió analizar y elucidar la estructura de los productos obtenidos. En el espectro de la diosgenina podemos observar varias señales características, de mayor a menor frecuencia encontramos primero la señal correspondiente al H-6 vinílico, después encontramos la señal de H-16 correspondiente al hidrogeno en el anillo E del espiroacetal, ligeramente a mayor frecuencia se encuentran las señales de los H-26 correspondientes al anillo F, de igual forma en esta frecuencia se encuentra la señal del H-3 traslapada con las de H-26, y finalmente a menor frecuencia se encuentran los 4 metilos de la estructura, entre estas señales se encuentra una región compleja que comprende al resto de hidrógenos de la estructura que en este caso particular no son modificados.

Al realizar la acetilación en el C-3 se denota que el espectro solo sufre dos modificaciones significativas, la primera es la señal en 2.05 ppm que corresponde al metilo del acetato agregado y el segundo efecto es el desplazamiento de la señal de H-3 a mayor frecuencia esto debido al efecto desprotector del acetato en esta posición, corroborando así la formación del éster. Posteriormente al realizar la epoxidación el espectro presenta varios cambios, el primero es el desplazamiento a baja frecuencia de la señal de H-6 ya que pasa de ser vinilo a ser base de oxígeno, no obstante, se observan dos señales etiquetadas para H-6, esto debido a la formación de la mezcla de los diastereoisómeros  $\alpha$  y  $\beta$  del epóxido.

Para el cuarto espectro se aprecia la desaparición de la señal del H-6 mismo que indica el rompimiento del epóxido y por lo tanto la pérdida de tensión en el anillo B para la formación del doble enlace en el carbono 6. Continuando con las observaciones podemos notar que el H-3 mantienen las señales en 5 y 2ppm, indicando que el grupo acetato aún continua en el C3. En este espectro se denotan también las dos señales correspondientes a los H-7 lo que indica que pasa a ser base del nuevo carbonilo; para los protones H26a y H26e se siguen observando ambas señales lo que confirma la presencia de los anillos E y F, reforzando esta idea aparece H-16.

Las señales en el último espectro cambian considerablemente, comenzando por la señal del protón H-16 la cual sufre un desplazamiento menor indicando la apertura del anillo E, así mismo un ligero desplazamiento pero con intensificación de la señal del H-26e que confirma la apertura de la cadena lateral y la formación mayoritaria del compuesto  $\alpha$ . De igual forma se puede notar la presencia de tres señales de acetato que corresponden a la triacetilación del espectro.

## 5.2 Germinación

Durante este proceso se utilizaron muestras de 200 semillas por cada tiempo de imbibición, estas semillas fueron repartidas en 4 lotes de 50 semillas cada uno, para el compuesto  $5\alpha$  y los controles. Se utilizaron 3 controles, el primero que consistió en semillas sin un tratamiento previo, es decir sin imbibición (SI). Estas semillas fueron sembradas directamente a las placas. Como segundo control se utilizó agua ( $H_2O$ ) para determinar el efecto único del proceso de imbibición y como control positivo el BSS4, referido en la literatura como un PCV, que tiene una estructura química similar al compuesto  $5\alpha$ . Se decidió utilizar agua ya es referida en protocolos de germinación de semillas y el BSS4 se agregó como un indicador comparativo de la actividad del compuesto  $5\alpha$

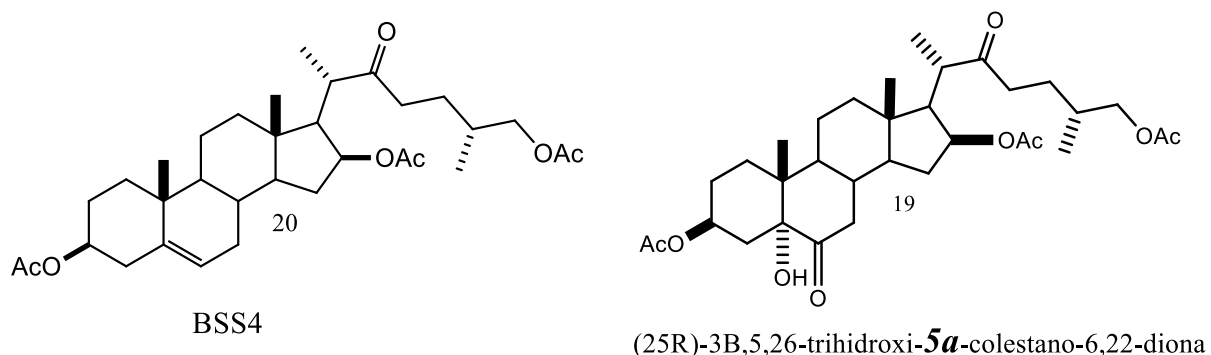


Figura 11 BRs utilizados en bioensayo de germinación de semillas

El sembrado de las semillas después de su imbibición se realizó en condiciones de esterilidad. Sobre la observación después del sembrado de las semillas en el que se realizó el conteo de aquellas que tenían una radícula emergente y se contaban como germinadas, el proceso se

realizó cada 24 horas. Para el conteo fue necesario sacar las placas de la cámara de incubación durante 1 o 2 mins aproximadamente. El conteo de “semilla germinada” se realizó a cuando la radícula de la semilla apareció al exterior de la semilla, tal y como lo muestra la siguiente imagen (Fig.12).

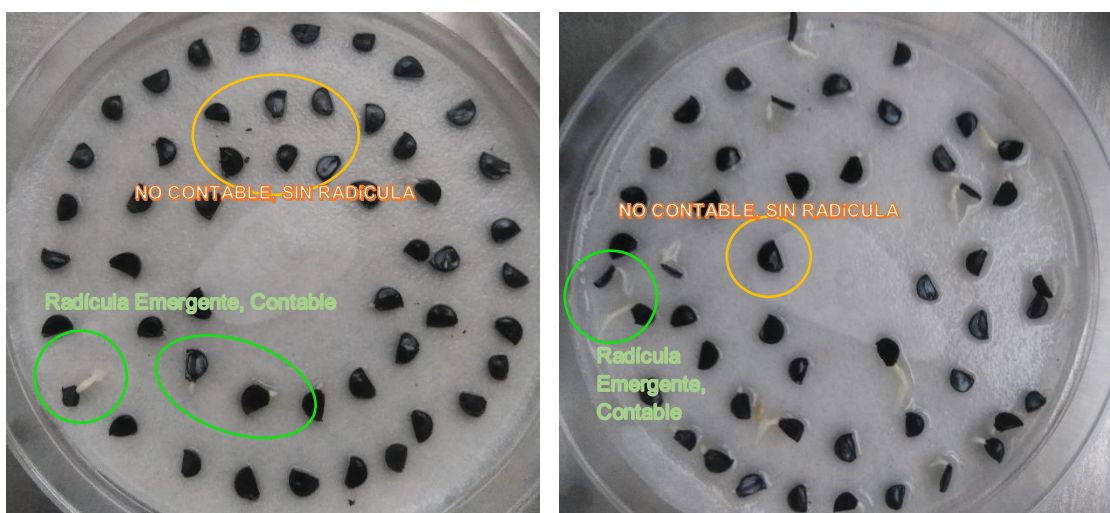


Figura 12 Aparición de las primeras radículas en la semilla para ser contables

El primer tiempo obtenido fue el de 30 minutos de imbibición, como podemos ver en la TABLA 2 el compuesto 5 $\alpha$  mostró un porcentaje de germinación por encima del 90% para el lote de 50 semillas con la ayuda del compuesto sintetizado, en un lapso de 5 días. Este tiempo en general resultó ser bastante adecuado para las semillas, incluso con los controles manejados, mostrando que esta mínima cantidad de tiempo es suficiente para lograr una alta germinación de lote.

TABLA 2 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN 30 MIN DE IMBIBICIÓN

Día	SI	H <sub>2</sub> O	BSS4	5 $\alpha$
1	0%	24%	28%	30%
2	20%	34%	42%	50%
3	22%	64%	62%	66%
4	40%	86%	76%	80%
5	52%	86%	86%	94%

En la Figura 13 podemos observar un desempeño constante del compuesto oxo-colestánico (19) por encima de los controles utilizados, así como un óptima cantidad de semillas germinadas en un periodo menor a una semana.

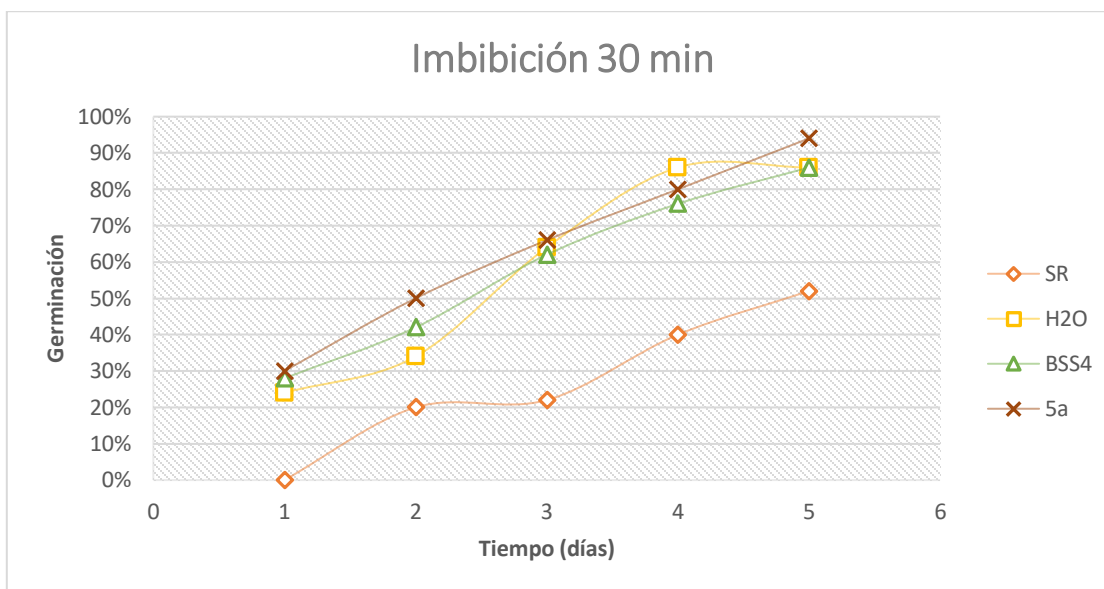


Figura 13 Gráfica de germinación 30 min

Este lapso de tiempo sería ideal para realizar repeticiones de los bioensayos ya que los resultados se nos muestran como la mínima cantidad de tiempo necesaria para la imbibición de la semilla en condiciones controladas, proyectando a futuro un proceso rápido y con buenos resultados si se quisiera trasladar a lotes más grandes o proyectos con determinadas duraciones. Sin embargo, para la imbibición de una hora observamos un decrecimiento del 3% de germinación en las mismas 120 horas de incubación para el compuesto 5a y casi un 10% para los controles en comparación con el de 30 min de imbibición. Observamos en la **Error! Reference source not found.** el mayor crecimiento de germinación entre los días 2 y 3, al igual que el tiempo de imbibición anterior.

TABLA 3 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN 1H DE IMBIBICIÓN

Día	SI	H <sub>2</sub> O	BSS4	5a
1	10%	22%	28%	24%
2	22%	46%	38%	44%
3	34%	64%	64%	70%
4	40%	70%	78%	82%
5	48%	70%	78%	90%

Para este periodo podemos observar sobre la Figura 14 una diferencia más marcada del desempeño de los compuestos y los controles, se logra que el compuesto 5 $\alpha$  mantenga crecimiento su porcentaje de germinación, pero es destacable que a partir del día 5 (pág. 28) los controles comienzan a tener una disminución de la actividad. Este lapso aún es manejable si se requiriera para cantidades más grandes de semillas.

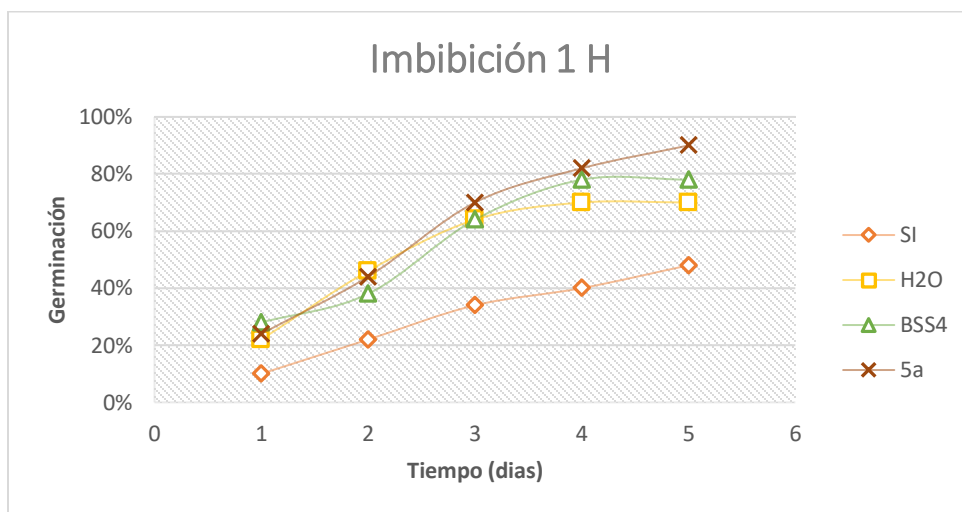


Figura 14 Gráfica de germinación para 1H

Para el tiempo de imbibición de 2 H lo primero a destacar es que la germinación se da a partir del segundo día de siembra, algo que no ocurrió con los dos tiempos anteriores, en la TABLA 4 se denota que los porcentajes crecen significativamente de un día a otro entre las 24 y 36 H, alcanzando los mismos números después de 6 días, lo que también implica un retraso respecto a tiempos anteriores.

TABLA 4 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN POR 2H DE IMBIBICIÓN

Día	SI	H <sub>2</sub> O	BSS4	5 $\alpha$
1	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	0%	0%
3	14%	24%	34%	34%
4	24%	56%	64%	68%
5	46%	78%	78%	82%
6	60%	80%	78%	90%

Para este tiempo cabe recalcar que se repite el patrón de decrecimiento en los controles a partir del día 5, el compuesto 5a al contrario se mantiene aún con una actividad. En la Figura 15 se nos muestra los primeros indicios de que dicho compuesto continua funcionando aún después de 120 horas del contacto con la semilla. Podríamos decir que el aumento del tiempo de imbibición está relacionado con el día de la primera racha de germinación.

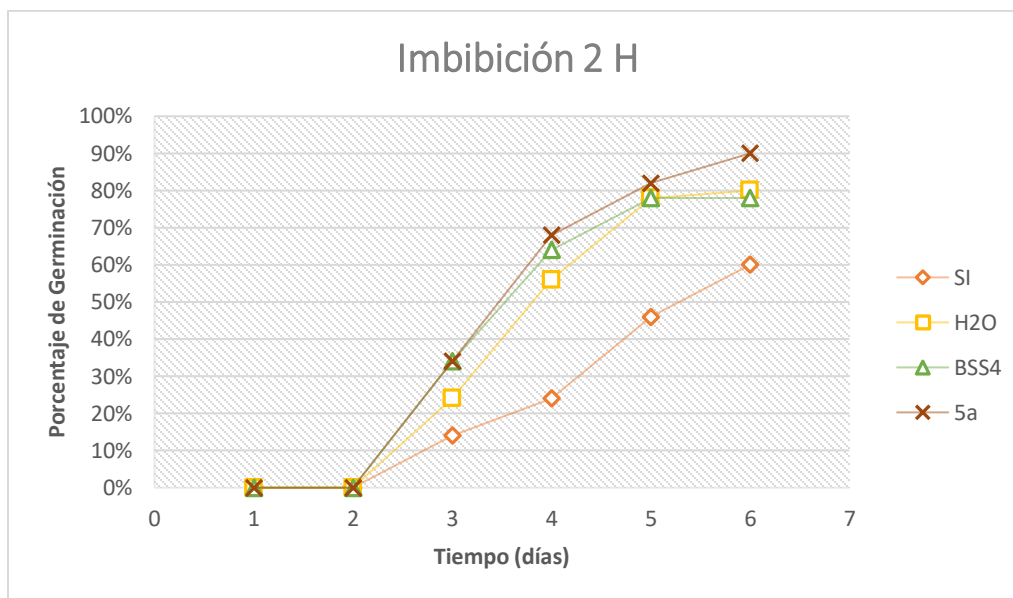


Figura 15 Gráfica de germinación para 2 H

Para el tiempo de 4 H que podemos observar sobre la TABLA 5 el mismo patrón de actividad en el cual la germinación comienza a partir del día tres (pág. 29), es este caso es necesario observar que el control H<sub>2</sub>O mostró un mejor porcentaje de germinación al final de los 6 días. Podemos inferir que para las semillas es el tiempo adecuado para lograr alcanzar su estado óptimo de manera “natural”. Para este periodo de imbibición sería necesario repetir el ensayo y observar por más tiempo las semillas para determinar si después de 24 u 48 horas más el compuesto 5a es capaz de alcanzar un porcentaje mínimo de 90% como en los tiempos discutidos anteriormente.

TABLA 5 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN POR 4H DE IMBIBICIÓN

Día	SI	H <sub>2</sub> O	BSS4	5a
1	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	0%	0%
3	12%	28%	28%	32%
4	54%	58%	52%	54%
5	54%	64%	64%	58%
6	72%	80%	70%	66%

El comportamiento del compuesto 5a y los controles es un poco diferente al observado con anterioridad, puesto que incluso nuestro control negativo tuvo un desempeño similar a los positivos. En la Figura 16 podemos observar que a partir del día 4 todos los compuestos y controles tienen una actividad bastante similar entre ellos, pero se puede recalcar el comportamiento del control negativo entre el día 3 y 4, ya que el crecimiento en ese lapso fue bastante grande y deja abierta la posibilidad de que las condiciones en esas 24 horas pudieran interferir en el porcentaje de germinación del lote.

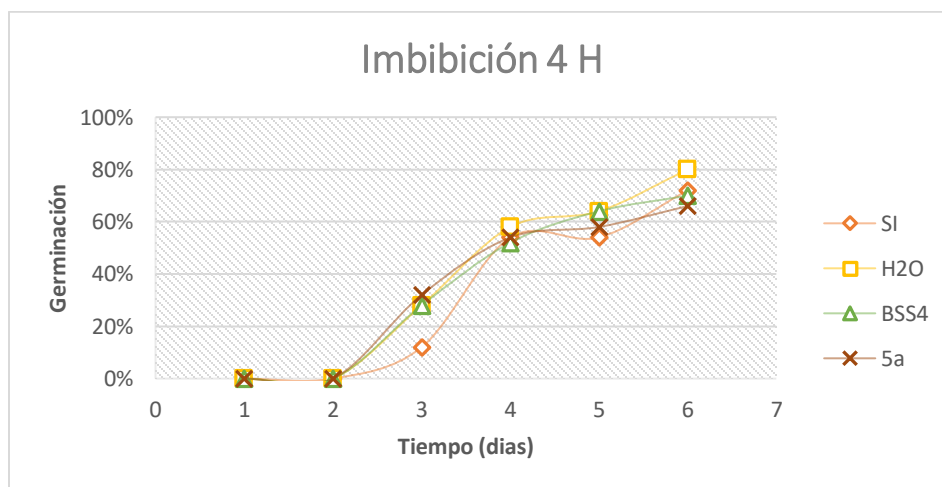


Figura 16 Gráfica de germinación para 4 H

Para el siguiente caso el periodo de tiempo se ha duplicado, y podemos seguir observando el crecimiento a partir del día 3 a excepción del control BSS4 que mostró una mínima de actividad en el segundo día. En este caso el compuesto 5a tampoco logró un porcentaje de germinación mayor al de los controles positivos. Hasta este punto según la información de la TABLA 6 podríamos inferir que este compuesto es absorbido mejor por las semillas en su primera hora de aplicación y que por lo tanto su tasa de imbibición dentro de la semilla comienza a decrecer después de cierto tiempo. Aunque para comprobarlo se necesitaría agregar un paso previo más en el que se mida la tasa de imbibición de todas las semillas por medio del peso antes y después de su contacto con el compuesto.

TABLA 6 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN 8H DE IMBIBICIÓN

Día	SI	H <sub>2</sub> O	BSS4	5a
1	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	2%	0%
3	16%	26%	28%	8%
4	22%	34%	36%	36%

<b>5</b>	48%	74%	50%	58%
<b>6</b>	52%	82%	80%	74%

Durante este periodo tenemos una actividad mucho más variada, en la Figura 17 podemos observar que el mayor crecimiento de germinación se da entre los días 4 y 5 para H<sub>2</sub>O, esto se podría atribuir a una completa absorción de agua ideal para la semilla. Hasta el día 6 no se denota un decrecimiento de la actividad del compuesto 5 $\alpha$ , por lo cual, nuevamente se propondría la repetición del mismo ensayo, esta vez aumentando los tiempos de incubación por unas 24 o 48 horas más.

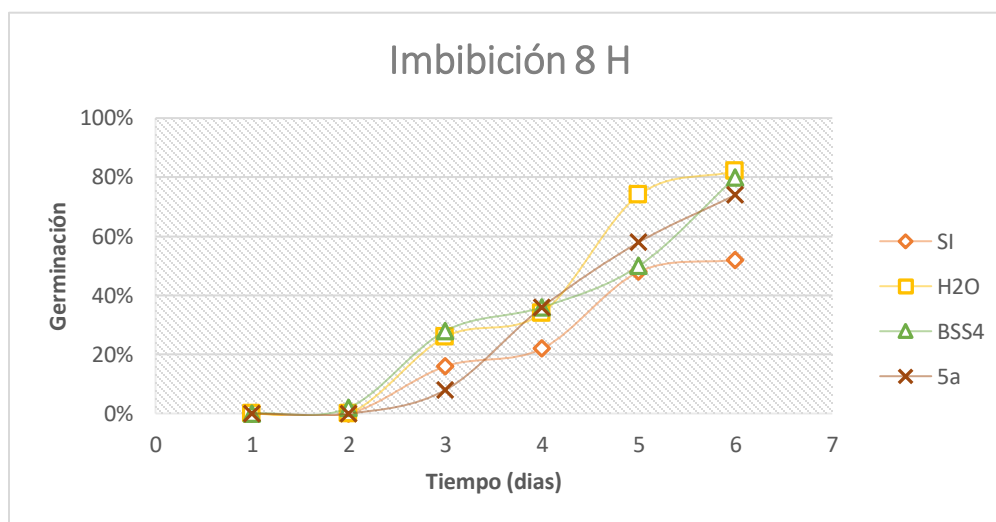


Figura 17 Gráfica de imbibición para 8 H

Durante el periodo de 12 H de imbibición se dio el cambio más drástico respecto al patrón de comportamiento de las semillas con respecto al compuesto 5 $\alpha$  y los controles como denota la TABLA 7. Para este tiempo no se logró una germinación ni del 20% en ningún caso además de que el día del primer crecimiento volvió a fluctuar entre los días 3 y 5. Esto podría reforzar el planteamiento anterior sobre el decrecimiento de la tasa de germinación de las semillas, sin embargo el control negativo también tuvo un porcentaje más bajo de lo obtenido hasta ahora, un comportamiento que debería continuar similar al de los lapsos anteriores. A pesar de estas circunstancias, el compuesto 5 $\alpha$  mostró un mayor porcentaje de germinación sobre los controles, lo que nos orienta de nuevo a la posibilidad de que mantenga su tiempo de acción más tiempo y que en posteriores días la germinación continuara en crecimiento.

TABLA 7 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE 12H DE IMBIBICIÓN

<b>Día</b>	<b>SI</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>BSS4</b>	<b>5<math>\alpha</math></b>
<b>1</b>	0%	0%	0%	0%
<b>2</b>	0%	0%	0%	0%

<b>3</b>	0%	0%	4%	6%
<b>4</b>	2%	4%	8%	8%
<b>5</b>	4%	6%	14%	16%
<b>6</b>	4%	10%	14%	16%

A pesar del bajo porcentaje de germinación, la actividad de compuesto 5 $\alpha$  no presenta un decrecimiento de actividad como se muestra en la Figura 18.

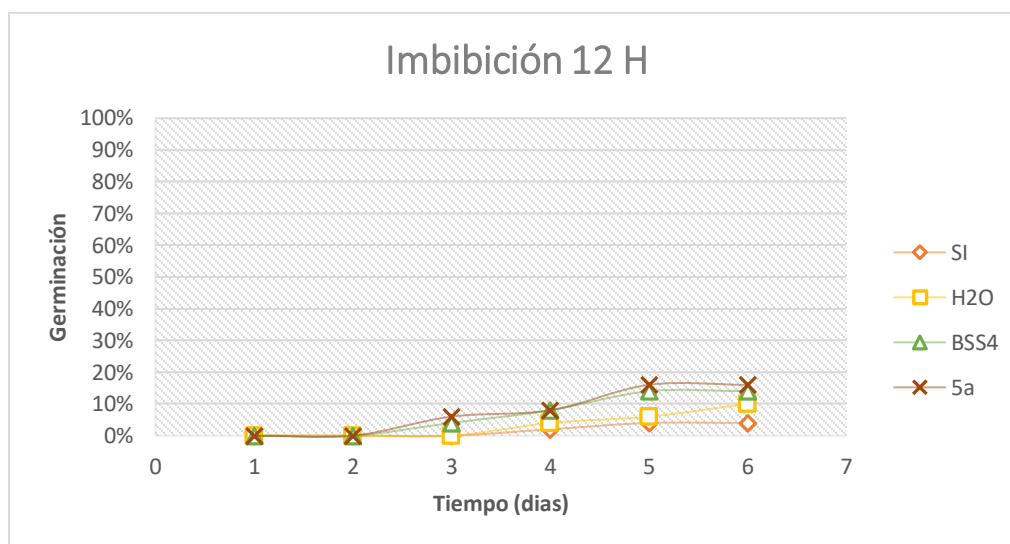


Figura 18 Gráfica de germinación para 12 H

El comportamiento del periodo de imbibición de 24 H rompe el patrón mostrado con anterioridad, ya que como puede verse en la **Error! Reference source not found.**, los porcentajes de germinación fueron similares a los primero tiempos de imbibición. El compuesto 5 $\alpha$  nuevamente obtuvo un porcentaje mayor al 90% en la germinación del lote. Para explicar estas circunstancias es necesario hacer un análisis más amplio en el proceso de imbibición de la semilla, y estudiar su tasa de absorción para ciclos de 8, 12 y 24 horas, que son los tiempos que han tenido mayores variaciones con respecto a la germinación.

TABLA 8 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN 24H DE IMBIBICIÓN

<b>Día</b>	<b>SI</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>BSS4</b>	<b>5<math>\alpha</math></b>
<b>1</b>	0%	0%	0%	0%
<b>2</b>	0%	8%	10%	0%
<b>3</b>	8%	52%	36%	24%
<b>4</b>	22%	54%	44%	70%
<b>5</b>	58%	72%	62%	90%

El comportamiento del compuesto 5 $\alpha$  es bueno para este periodo tal como lo muestra la Figura 19, mostrando un crecimiento a partir de día 2 y sin un deceso de actividad hasta el día 6, un desempeño esperado por encima de los controles.

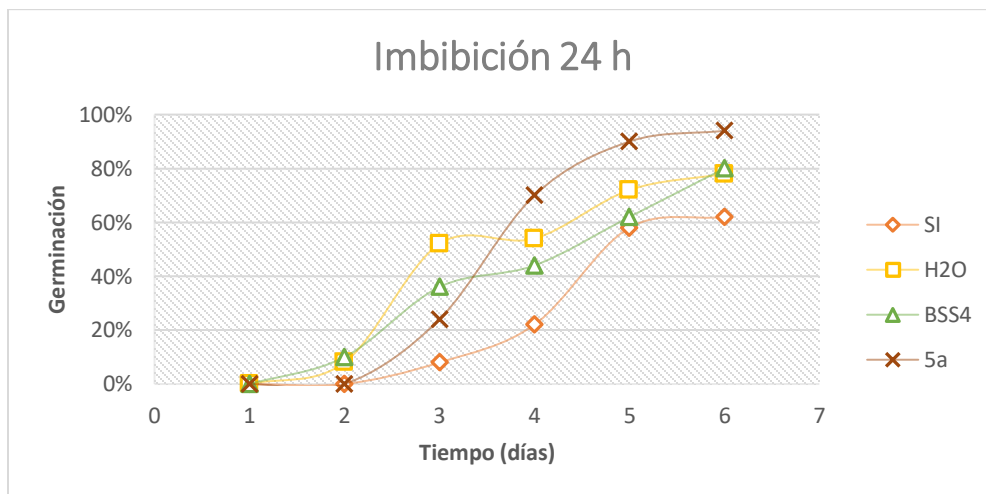


Figura 19 Gráfica de germinacion para 24h

Para el último lapso de imbibición podemos observar un porcentaje bastante bajo de germinación para todos los controles y el compuesto 5 $\alpha$ , como puede verse en la Figura 20, pudiéndose interpretar un daño en las semillas antes de su siembra.

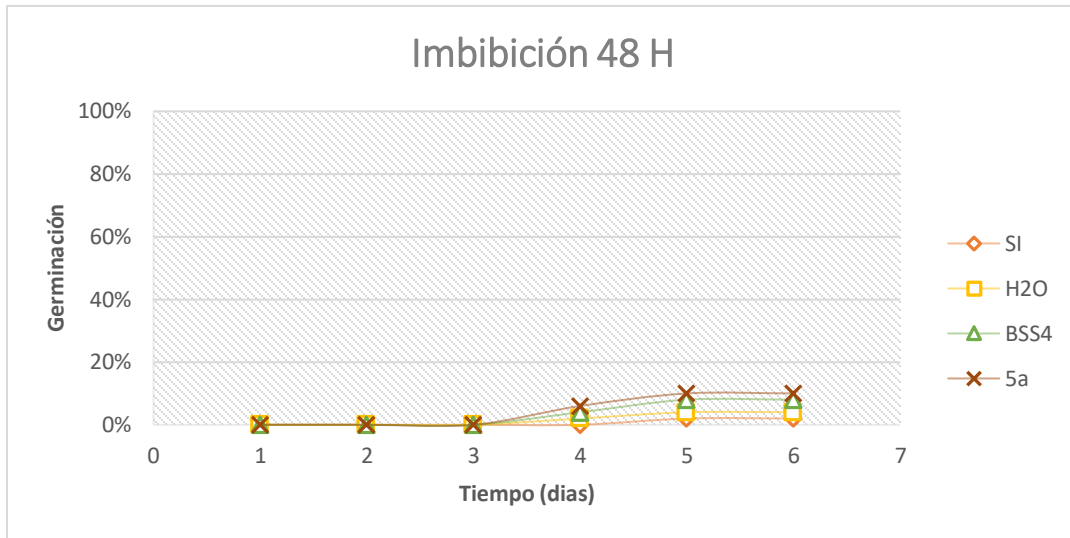


Figura 20 Grafica de germinación para 48 H

## CONCLUSIONES

Se sintetizó el compuesto 22-oxo-colestanico, triacetato de (25R)-3 $\beta$ ,5,26-trihidroxi-5 $\alpha$ -colestano-6,22-diona (19) a partir de diosgenina (10), con una metodología rápida de 4 principales reacciones y rendimientos de reacción altos. Esta ruta de síntesis muestra un alto grado de reproductibilidad debido a la materia prima utilizada la diosgenina, como compuesto comercial, se sobrepone a la baja disponibilidad de la 5 $\alpha$ -hidroxi-laxogenina. El compuesto obtenido pudo caracterizarse y posteriormente se utilizó en ensayos piloto para probar su -esperado- efecto como PVC ante la germinación de *Agave Guiesbreghtii*.

Durante esta prueba piloto de germinación, se sembraron en total 1600 semillas que fueron previamente tratadas con el compuesto sintetizado a distintos tiempos de imbibición además de 3 controles, mostrando como resultado que el compuesto (25R)-3 $\beta$ ,5,26-trihidroxi-5 $\alpha$ -colestano-6,22-diona tiene un efecto promotor vegetal. Dicho efecto quedó demostrado en los porcentajes de germinación de los lotes de semillas, el compuesto 5 $\alpha$  logró un porcentaje mayor al 90% en los periodos de imbibición de 1, 3, 2 y 24 horas.

Quedando así abierta la posibilidad de reproducciones experimentales posteriores a este proyecto, ya sea con nuevos tiempos de imbibición o con distintas especies del género *Agave*.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.L. Villaseñor Ríos, Checklist of the native vascular plants of Mexico, *Rev. Mex. Biodivers.* 87 (2016) 559–902. [www.sciencedirect.com/revistas/RevistaMexicanadeBiodiversidad](http://www.sciencedirect.com/revistas/RevistaMexicanadeBiodiversidad) 7.
- [2] A. García, Los agaves de México, *Ciencias.* 87 (2007) 14–23. <http://revistas.unam.mx/index.php/cns/article/viewFile/12113/11435>.
- [3] A. Delgado-Lemus, I. Torres, J. Blancas, A. Casas, Vulnerability and risk management of Agave species in the Tehuacán Valley, México, *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 10 (2014) 1–15. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-53>.
- [4] P.S. Nobel, *Environmental biology of agaves and cacti*, 1ST ed., Cambridge University Press, Los Angeles, California, USA, 1988.
- [5] Al. Sanchez-Lopez, *Oaxaca, tierra de maguey y mezcal*, 2. ed., Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, México, 2005.
- [6] A.A.G. Valenzuela-zapata, I. Lopez-muraira, M.S. Gaytán, A.G. Valenzuela-zapata, I. Lopez-muraira, M.S. Gaytán, Traditional Knowledge , Agave *Inaequidens* ( Koch ) Conservation , and the Charro Lariat Artisans of San Miguel Cuyutlán , Mexico, 2 (2011) 72–80.
- [7] J.S. Alcántara Cortes, J. Acero Godoy, J.D. Alcantara Cortes, R.M. Sánchez Mora, Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal, *Nova.* 17 (2019) 109–129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>.
- [8] M. Isabirye, D.V.. Raju, M. Kitutu, V. Yemeline, J. Deckers, J. Poesen Additional, In vitro Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of Plants Subjected to Abiotic Stress Conditions, *Intech.* (2012) 13. <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00172J><https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics><http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>.
- [9] G. Vert, J.L. Nemhauser, N. Geldner, F. Hong, J. Chory, Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005) 177–201. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151241>.
- [10] S. Marumo, H. Hattori, H. Abe, Y. Nonoyama, The presence of novel plant growth regulators in leaves of *distylium racemosum sieb et zucc*, *Agric. Biol. Chem.* 32 (1968) 528–529. <https://doi.org/10.1080/00021369.1968.10859091>.
- [11] M. Grove, S. Gayland, W. Rohwedder, Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature.* 281 (1979) 216, 217.
- [12] T. Yokota, The structure , biosynthesis and function of brassinosteroids, *Elsevier Sci.* 2 (1997) 0–6.
- [13] Mi. J.W, M. N., W. j. f., Brassins- a New family of Plant Hormones from Rape Pollen,

Nat. Publ. Gr. 228 (1970) 726–734. <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>.

- [14] A. Bajguz, A. Tretyn, *Brassinosteroids*, Springer-science Business Media, 2003.
- [15] R. Salgado Garciglia, M. a Cortés Rodríguez, R.E. Del Río, *Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura*, *Biológicas*. (2008) 18–27.
- [16] D.R. Vuelta-lorenzo, Y. Vidal-cuevas, M. Rizo-mustelier, *Efecto del brasinoesteroide Foliar (Biobras 16) sobre el crecimiento y la producción del cultivo de frijol (Phaseolus Vulgaris, L.)*, *Cienc. En Su PC*. 1 (2017) 12.
- [17] V. Khripach, V. Zhabinskii, A. De Groot, *Twenty Years of Brassinosteroids : Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century*, *Ann. Bot.* 86 (2000) 441–447. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1227>.
- [18] P. Krishna, *Brassinosteroid-Mediated Stress Responses*, *J. Plant Growth Regul.* 22 (2003) 289–297. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0058-z>.
- [19] J.C. Hilario-Martínez, R. Zeferino-Díaz, M.A. Muñoz-Hernández, M.G. Hernández-Linares, J.L. Cabellos, G. Merino, J. Sandoval-Ramírez, Z. Jin, M.A. Fernández-Herrera, *Regioselective Spirostan E-Ring Opening for the Synthesis of Dihydropyran Steroidal Frameworks*, *Org. Lett.* 18 (2016) 1772–1775. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00492>.
- [20] R. Zeferino-Diaz, J.C. Hilario-Martinez, M. Rodriguez-Acosta, A. Carrasco-Carballo, M.G. Hernandez-Linares, J. Sandoval-Ramirez, M.A. Fernandez-Herrera, *Mimicking natural phytohormones. 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as plant growth promoters*, *Steroids*. 125 (2017) 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.06.004>.
- [21] S. Rosette, S.A.A. Rizaga, E.X.E. Zcurra, ( a Gavaceae ), *a Tropical Arid - Land*, 89 (2002) 632–641.
- [22] J.L. Mora-López, J.A. Reyes-Agüero, J.L. Flores-Flores, C.B. Peña-Valdivia, J.R. Aguirre-Rivera, *Morphological variation and humanization of Agave genus, Salmianae section*, *Agrociencia*. 45 (2011) 465–477.
- [23] F. Perez-García, J.. Iriondo, J.. Martinez-Laborde, *Germination behaviour in seeds otDiplotaxis erucoides and*, *Weed Res.* 3 (1995) 495–502.
- [24] ISTA, *International Rules for Seed Testing*, in: *Int. Seed Test. Assoc.*, 2022nd ed., ISTA, Bassersdorf, Switzerland, 2022: p. 14. <https://www.seedtest.org/en/publications/international-rules-seed-testing-1168.html>.
- [25] R.J. Gummerson, B. Experimental, *The Effect of Constant Temperatures and Osmotic Potentials on the Germination of Sugar Beet*, *J. Exp. Bot.* 37 (1986) 729–741.
- [26] B. J. Derek, B. Michael, *SEEDS: 5.1 Dormancy and the Control of Germination*, Springer New York. 1 (1994) 199–200.
- [27] B. J. Derek, B. Michael, *SEEDS: 3.1 Development-Regulation and Maturation*, Springer New York. 1 (1994) 117–118.

- [28] E.V. Díaz, J.R. García Nava, C.B. Peña Valdivia, H.M. Ramírez Tobías, V.M. Ramos, Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck), *Rev. Fitotec. Mex.* 34 (2011) 167–173. <https://doi.org/10.35196/rfm.2011.3.167>.
- [29] H.W. Pritchard, A.P. Miller, The effects of constant temperatures , light and seed quality on the germination characteristics of *Agave americana*, 14 (1995) 11–14. <https://doi.org/10.17129/botsci.1472>.
- [30] Henk W. M. Hilhorst, The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited, *Seed Sci. Res.* 10 (1998) 260.
- [31] I. Rodríguez, G. Adam, J.M. Durán, Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas, *Agric. Technol.* (2008) 7. [https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/37372/1/articulo\\_definitivo\\_agricultura\\_nov.pdf](https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/37372/1/articulo_definitivo_agricultura_nov.pdf).

## ANEXOS

Tabla 9 Distribución de semillas para ensayo de germinación

Tiempo IB	Control (-)	H <sub>2</sub> O	BSS4	Compuesto 5 $\alpha$	Subtotal por bioensayo
30 min	50	50	50	50	200
1 h	50	50	50	50	200
2 h	50	50	50	50	200
4 h	50	50	50	50	200
8 h	50	50	50	50	200
12 h	50	50	50	50	200
24 h	50	50	50	50	200
48 h	50	50	50	50	200
				Total semillas sembradas	<b>1600</b>



Figura 21 Proceso de imbibición y sembrado de semillas

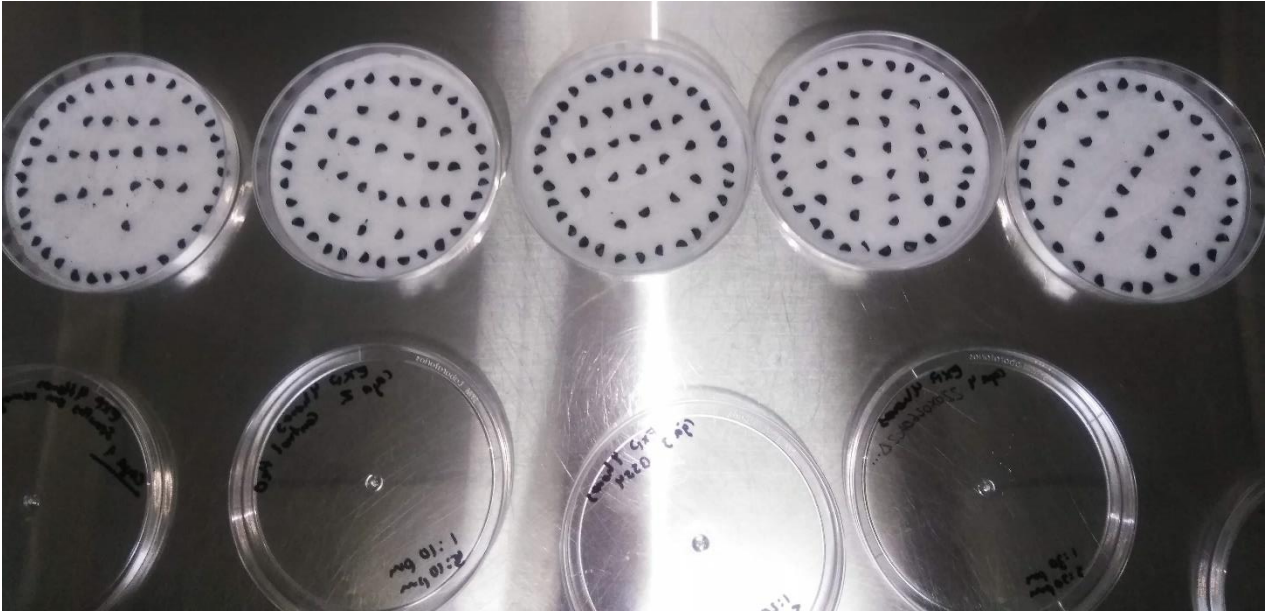


Figura 22 Lotes de semilla de Agave sembrados

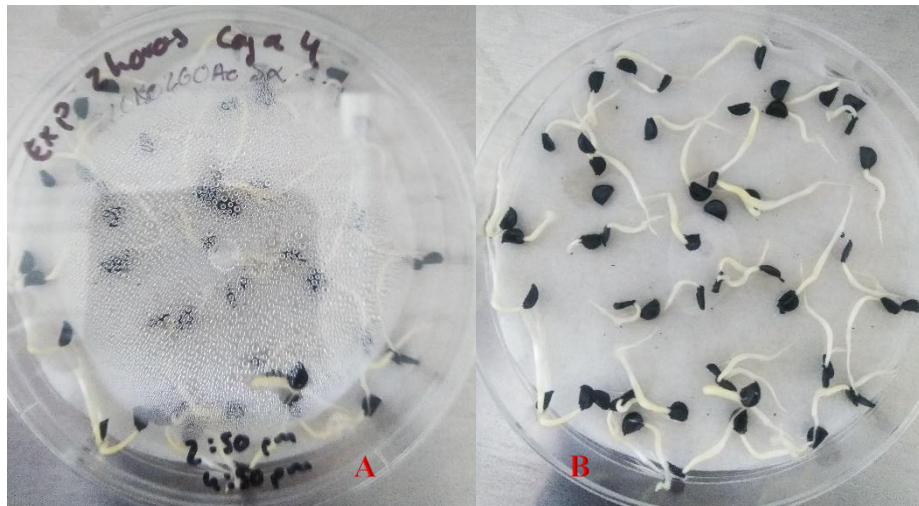


Figura 23 Semillas de Agave en ensayo de 2h de imbibición: A) Rotulado de cajas  
B) Germinación y crecimiento de raíces luego de 6 días de incubación