



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE BRASINOESTREROIDES
PORTADORES DE LA AGRUPACIÓN 5 α -HIDROXI-6-OXO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ANIELKA ROSADO ABÓN

TUTOR PRINCIPAL:

DR. MARTÍN ANDRÉS IGLESIAS ARTEAGA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROSA LUISA SANTILLÁN BACA, CINVESTAV, IPN
DR. CECILIO ÁLVAREZ TOLEDANO, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio 100 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Martín A. Iglesias Arteaga, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de becario 223856.

Parte de este trabajo se presentó en el 44^o Congreso Mexicano de Química, en la 4^a Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica y en el QUIMIUNAM 2011. Como resultado del trabajo se publicaron los siguientes artículos:

1. Anielka Rosado-Abón, Margarita Romero-Avila y Martín A. Iglesias-Arteaga. An unexpected and useful E-ring oxidative cleavage in furostanes. *ARKIVOC*. **2008**, (xiv), 274-281.
2. Anielka Rosado-Abón, Margarita Romero-Ávila, Martín A. Iglesias-Arteaga. A rapid and simple one-pot procedure for the synthesis of 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids. *ARKIVOC*. **2010**, (x), 110-115.
3. Anielka Rosado-Abón, Guadalupe de Dios-Bravo, Rogelio Rodríguez-Sotres, Martín A. Iglesias-Arteaga. Synthesis and plant growth promoting activity of polyhydroxylated ketones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and cholestane side chain. *Steroids*, **2012**, 77, 461-466.
4. Anielka Rosado-Abón, Guadalupe de Dios-Bravo, Rogelio Rodríguez-Sotres, Martín A. Iglesias-Arteaga. Synthesis and plant growth promoting activity of dinorcholanic lactones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, 134, 45-50.
5. Anielka Rosado-Abón, Nuria Esturau-Escofet, Marcos Flores-Álamo, Rafael Moreno-Esparza y Martín A. Iglesias-Arteaga. The Crystal structure of diosgenin acetate and its 23-oxygenated derivatives. *J. Chem. Crystallogr.* **2013**, 43, (4), 187-196.

A mis padres, a mi hermana y a mi esposo.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos son para todas las personas que de algún modo hicieron posible la realización de este trabajo. En especial a mis padres, hermana y esposo que con su cariño me dieron ánimos para seguir adelante.

Agradezco a mi tutor el Dr. Martín A. Iglesias Arteaga por transmitirme el interés en la temática de los brasinoesteroides, así como por su orientación como asesor de tesis.

A los integrantes del comité tutelar la Dra. Rosa Luisa Santillán Baca y el Dr. Cecilio Álvarez Toledano por sus oportunas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de doctorado.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM y en especial a Josefina Tenopala y a Rosa María Viñas Solano por el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de este trabajo (No. de becario 223856).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA-UNAM por el apoyo financiero a través del proyecto IN221911.

A la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), en especial a Rosa I. del Villar, a Nuria Esturau-Escofet, a Georgina Duarte Lisci y a Margarita Guzmán Villanueva por el soporte técnico ofrecido.

A la Dra. Guadalupe de Dios-Bravo y al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por su colaboración al realizar las pruebas de actividad biológica.

Al Msc. Baldomero Esquivel, a la Msc. Margarita Romero Ávila, al Msc. Rafael Arcos, por su amistad, solidaridad y apoyo incondicional.

A los doctores y compañeros del laboratorio 100, en especial el Dr. Rafael Moreno, el Dr. Jesús Gracia, el Dr. Armando Marín, la Dra. María Josefa Bernard, el Dr. Benito Flores, el Dr. Nezahualcoyotl, Víctor Manuel Trujillo, Martha Flores y Mariana Macías.

A cada uno de los miembros del jurado asignado por sus valiosas sugerencias.

A todos mis amigos que me acompañaron, apoyaron y alentaron a seguir adelante.

GRACIAS!!!!

ÍNDICE

	ABSTRACT	I
	RESUMEN	III
	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS	V
	LISTA DE FIGURAS	IX
	LISTA DE ESQUEMAS	XII
	LISTA DE TABLAS	XIV
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Brasinoesteroides naturales, distribución en la naturaleza.	3
2.2	Bioensayos y técnicas microanalíticas para la determinación de su presencia y actividad.	7
2.3	Características estructurales de los brasinoesteroides. Relación estructura-actividad.	8
2.4	Síntesis de brasinoesteroides.	9
2.5	Análogos sintéticos de brasinoesteroides. Estructura y actividad biológica.	13
2.5.1	Análogos con modificaciones en el núcleo esteroidal.	13
2.5.2	Análogos con modificaciones en la cadena lateral.	18
2.5.3	Análogos con modificaciones en los anillos A/B y en la cadena lateral.	20
2.5.3.1	Análogos con núcleo de androstano, pregnano, colestano y bisnorcolano.	20
2.5.3.2	Análogos de brasinoesteroides con cadena lateral de tipo espirostánica.	26
2.5.3.3	Análogos de brasinoesteroides con cadena lateral de tipo furostánica	29

2.6	Métodos para la introducción de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo a partir de 3 β -acetoxi- Δ^5 esteroides.	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo general.	32
3.1.1	Objetivos específicos.	32
4	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	33
4.1	Síntesis de las cadenas laterales.	34
4.1.1	Obtención de cadenas laterales de tipo 23-oxo y 23-hidroxi espiroetano.	34
4.1.2	Obtención de la cadena lateral de tipo dinorcolano.	37
4.1.3	Obtención de la cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano.	38
4.1.4	Obtención de la cadena lateral de tipo furoetano.	39
4.2	Funcionalización de los anillos A y B.	40
4.2.1	Metodología para obtener la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo a partir de 3 β -acetoxi- Δ^5 esteroides mediante un procedimiento en dos pasos.	47
4.2.2	Obtención de análogos de BRs con la agrupación 2 α ,3 α ,5 α -trihidroxi-6-oxo y 2 β ,3 β ,5 α -trihidroxi-6-oxo.	48
4.3	Obtención de ABRs de androetano.	51
4.4	Obtención de ABRs con cadena lateral de tipo 23-hidroxi-espiroetano.	52
4.5	Características espectroscópicas generales de los compuestos obtenidos.	53
4.5.1	Características espectroscópicas en RMN derivadas de la cadena lateral.	54

ÍNDICE

4.5.1.1	Compuestos portadores de una agrupación carbonílica en C-23.	54
4.5.1.2	Compuestos portadores de una agrupación hidroxílica en C-23.	56
4.5.1.3	Compuestos con cadena lateral de tipo dinorcolánica.	59
4.5.1.4	Compuestos con cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxicolestano.	60
4.5.1.5	Compuestos con cadena lateral de tipo furostánicos.	63
4.5.1.6	Compuestos con cadena lateral de tipo colestano-16,22-diona.	65
4.5.2	Características espectroscópicas en RMN asociadas a la sustitución en los anillos A y B.	65
4.5.2.1	Características fundamentales en RMN derivadas de la sustitución en las posiciones C-5 y C-6.	65
4.5.2.2	Características fundamentales en RMN derivadas de la sustitución en el anillo A.	68
4.6	Actividad biológica de algunos de los compuestos sintetizados.	72
4.6.1	Actividad biológica de los análogos de BRs sintetizados con cadena lateral de tipo pregnano.	72
4.6.2	Actividad biológica de los análogos de BRs sintetizados con cadena lateral de tipo dinorcolano.	73
4.6.3	Actividad biológica de los análogos de BRs sintetizados con cadena lateral de tipo colestano.	75
5	PARTE EXPERIMENTAL	78
5.1	Condiciones Generales.	78
5.1.1	Preparación de la solución de OsO ₄ en <i>ter</i> -butanol.	78

5.2	Síntesis de las cadenas laterales.	79
5.2.1	(25 <i>R</i>)-3β-Acetoxi-espirost-5-en-23-ona (200).	79
5.2.2	3-Monoacetato de (23 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3β,23-diol (201) y 3-monoacetato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3β,23-diol (202).	80
5.2.2.1	3-Monoacetato de (23 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3β,23-diol (201)	80
5.2.2.2	3-Monoacetato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3β,23-diol (202).	81
5.2.3	Diacetato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3β,23-diol (203).	81
5.2.4	Acetato de (25 <i>R</i>)-23-hidroximino-espirost-5-en-3β-ol (204).	82
5.2.5	Lactona 22→16 del ácido 3β-acetoxi-16β-hidroxibisnorcol-5-énico, (acetato de vespertilina) (205).	83
5.2.6	Lactona 22→16 del ácido 3β,16β-dihidroxibisnorcol-5-énico, (vespertilina) (206).	84
5.2.7	(22 <i>S</i> ,23 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-16β,22:22,25-Diepoxi-23-carboximetil-24-metil-26,27-dinorcolest-5-en-3β-ol (207).	85
5.2.8	(22 <i>S</i> ,23 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-16β,22:22,25-Diepoxi-23-hidroximetil-24-metil-26,27-dinorcolest-5-en-3β-ol (208).	86
5.2.9	Diacetato de (22 <i>S</i> ,23 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-16β,22:22,25-diepoxi-23-hidroximetil-24-metil-26,27-dinorcolest-5-en-3β-ol (209).	87
5.2.10	3-Monoacetato de (22 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-furost-5-en-3β,26-diol (210).	88
5.2.11	Diacetato de (22 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-furost-5-en-3β,26-diol (211).	89
5.3	Funcionalización de los anillos A y B.	90
5.3.1	(25 <i>R</i>)-3β-Acetoxi-5α-espirostan-5,6β-diol (212) mediante un procedimiento de dos pasos: epoxidación y apertura del oxirano.	90
5.3.2	(25 <i>R</i>)-3β-Acetoxi-5-hidroxi-5α-espirostan-6-ona (213).	91

ÍNDICE

5.3.3	(25 <i>R</i>)-3 β -Acetoxi-5-hidroxi-5 α -espirostan-6-ona (213) mediante un procedimiento de tres pasos: epoxidación, apertura del oxirano y oxidación del alcohol.	92
5.3.4	(25 <i>R</i>)-3 β ,5-Dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (214).	93
5.3.5	3-Monoacetato de (22 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-5 α -furostan-3 β ,5,6 β ,26-tetraol (215).	94
5.3.6	(22 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-3 β -Acetoxi-5,26-dihidroxi-5 α -furostan-6-ona (216).	95
5.3.7	(22 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-3 β ,5,26-Trihidroxi-5 α -furostan-6-ona (217).	96
5.3.8	Acetato de 5 β ,6 β -epoxicolestan-3 β -ol (219).	97
5.3.9	3 β -Acetoxi-5-bromo-5 α -colestan-3 β ,6 β -diol (220).	97
5.3.10	3 β -Acetoxi-5-bromo-5 α -colestan-6-ona (221).	98
5.3.11	3 β -Acetoxi-5-bromo-5 α -colestan-6-ona (221) mediante un procedimiento de tres pasos: β -epoxidación, apertura del oxirano y oxidación del alcohol.	98
5.3.12	3 β -Acetoxi-5 α -colestan-6-ona (222).	99
5.3.13	3 β -Hidroxi-5 α -colestan-6-ona (223).	100
5.3.14	Diacetato de (25 <i>R</i>)-5 β ,6 β -epoxifurostan-3 β ,26-diol (224) y (25 <i>R</i>)-3 β ,26-diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestan-16,22-diona (225).	101
5.3.14.1	Diacetato de (25 <i>R</i>)-5 β ,6 β -epoxifurostan-3 β ,26-diol (224).	101
5.3.14.2	(25 <i>R</i>)-3 β ,26-Diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestan-16,22-diona (225).	102
5.3.15	(25 <i>R</i>)-3 β ,26-Diacetoxi-colest-5-en-16,22-diona, (acetato de criptogenina) (226).	102
5.3.16	3 β -Acetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestan-16,22-diona (228).	103
5.3.17	3 β -Acetoxi-colest-5-en-16,22-diona (229).	104

5.4	Síntesis de cetoles.	105
5.4.1	3,17-Diacetato de 3 β ,5,17 β -trihidroxi-5 α -androstan-6-ona (231).	105
5.4.2	3-Monoacetato de 3 β ,5-dihidroxi-5 α -pregnan-6,20-diona (233).	106
5.4.3	Lactona 22 \rightarrow 16 del ácido 3 β -acetoxi-5,16 β -dihidroxi-6-oxo-5 α -bisorcolánico (234).	107
5.4.4	3-Monoacetato de 3 β ,5-dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (235).	108
5.4.5	3-Monoacetato de (25 <i>R</i>)-3 β ,5-dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (213).	108
5.4.6	3-Monoacetato de (25 <i>R</i>)-3 β ,5-dihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (236).	109
5.4.7	3,23-Diacetato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-3 β ,5,23-trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (237).	110
5.4.8	3,23'-Diacetato de (22 <i>S</i> ,23 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-16 β ,22:22,25-diepoxi-23'-hidroximetil-3 β ,5 α -dihidroxi-24-metil-26,27-dinorcoleston-6-ona (238).	111
5.4.9	(22 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-3 β ,5 α ,26-Trihidroxi-5 α -furostan-6-ona (239).	112
5.5	Hidrólisis de cetoles acetilados.	113
5.5.1	3 β ,5,17 β -Trihidroxi-5 α -androstan-6-ona (240).	113
5.5.2	3 β ,5-Dihidroxi-5 α -pregnan-6,20-diona (241).	114
5.5.3	Lactona 22 \rightarrow 16 del ácido 3 β ,5,16 β -trihidroxi-6-oxo-5 α -bisorcolánico (242).	114
5.5.4	3 β ,5-Dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (243).	115
5.5.5	(25 <i>R</i>)-3 β ,5-Dihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (244).	116

5.5.6	(23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-3 β ,5,23-Trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (245).	117
5.5.7	(22 <i>S</i> ,23 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-16 β ,22:22,25-Diepoxi-23-hidroximetil-3 β ,5 α -dihidroxi-24-metil-26,27-dinorcolestán-6-ona (246).	118
5.5.8	(22 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-3 β ,5,26-Trihidroxi-5 α -furostan-6-ona (217).	119
5.6	Síntesis de cetoles insaturados.	119
5.6.1	5-Hidroxi-5 α -pregn-2-en-6,20-diona (247).	119
5.6.2	Lactona 22 \rightarrow 16 del ácido 5,16 β -dihidroxi-6-oxo-5 α -bisorcol-2-énico (248).	120
5.6.3	5-Hidroxi-5 α -colest-2-en-6-ona (249).	121
5.6.4	(25 <i>R</i>)-5-Hidroxi-5 α -espirost-2-en-6-ona (250).	122
5.6.5	(25 <i>R</i>)-5-Hidroxi-5 α -espirost-2-en-6,23-diona (251).	123
5.7	Dihidroxilación de cetoles insaturados.	124
5.7.1	2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -pregnan-6,20-diona (252).	124
5.7.2	Lactona 22 \rightarrow 16 del ácido 2 α ,3 α ,5,16 β -tetrahidroxi-6-oxo-5 α -bisorcolánico (253).	125
5.7.3	2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -colestán-6-ona (254) y 2 β ,3 β ,5-trihidroxi-5 α -colestán-6-ona (255).	126
5.7.3.1	2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -colestán-6-ona (254).	126
5.7.3.2	2 β ,3 β ,5-Trihidroxi-5 α -colestán-6-ona (255).	127
5.7.4	(25 <i>R</i>)-2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (256) y (25 <i>R</i>)-2 β ,3 β ,5-trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (257).	127
5.7.4.1	(25 <i>R</i>)-2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (256).	127
5.7.4.2	(25 <i>R</i>)-2 β ,3 β ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (257).	128
5.7.5	(25 <i>R</i>)-2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (258) y (25 <i>R</i>)-2 β ,3 β ,5-trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (259).	129

5.7.5.1	(25 <i>R</i>)-2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (258).	129
5.7.5.2	(25 <i>R</i>)-2 β ,3 β ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (259).	130
5.8	Obtención de análogos de brasinoesteroides de tipo androstano.	130
5.8.1	3 β ,5,17 β -Trihidroxi-5 α -androstano-6-ona (240) y 17-monoacetato de 3 β ,5,17 β -trihidroxi-5 α -androstano-6-ona (260).	130
5.8.1.1	3 β ,5,17 β -Trihidroxi-5 α -androstano-6-ona (240).	131
5.8.1.2	17-Monoacetato de 3 β ,5,17 β -trihidroxi-5 α -androstano-6-ona (260).	131
5.8.2	5,17 β -Dihidroxi-5 α -androst-2-en-6-ona (261).	131
5.8.3	5,17 β -Dihidroxi-5 α -androst-2-en-6-ona (262).	132
5.8.4	2 α ,3 α ,5,17 β -Tetrahidroxi-5 α -androstano-6-ona (263) y 2 β ,3 β ,5,17 β -tetrahidroxi-5 α -androstano-6-ona (264).	133
5.8.4.1	2 α ,3 α ,5,17 β -Tetrahidroxi-5 α -androstano-6-ona (263).	133
5.8.4.2	2 β ,3 β ,5,17 β -Tetrahidroxi-5 α -androstano-6-ona (264).	133
5.9	Obtención de ABRs con cadena lateral de tipo 23-hidroxi-espirostan.	134
5.9.1	(25 <i>R</i>)-3 β -Hidroxi-espirost-5-en-23-ona (265).	134
5.9.2	Tosilato de (25 <i>R</i>)-3 β -hidroxi-espirost-5-en-23-ona (266).	135
5.9.3	3-Tosilato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (267).	136
5.9.4	23-Acetato-3 β -tosilato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (268).	137
5.9.5	23-Acetato-3 β -tosilato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-5,23-dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (269).	138

ÍNDICE

5.9.6	23-Monoacetato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-5,23-dihidroxi-5 α -espirost-2-en-6-ona (270).	139
5.9.7	(23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-5,23-Dihidroxi-5 α -espirost-2-en-6-ona (271).	140
5.9.8	(23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-2 α ,3 α ,5,23-Tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (272) y (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-2 β ,3 β ,5,23-tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (273).	141
5.9.8.1	(23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-2 α ,3 α ,5,23-Tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (272).	141
5.9.8.2	(23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-2 β ,3 β ,5,23-Tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (273).	142
6	CONCLUSIONES	143
7	REFERENCIAS	144
8	ANEXOS	160
9	ARTÍCULOS PUBLICADOS	188

ABSTRACT

Brassinosteroids are compounds with steroidal structure which are present in plants tissues, promoting plant growth. The low concentration in which they are found in natural conditions has stimulated the synthesis of analogue compounds with simpler structures. In particular, some brassinosteroid analogues with the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety have shown good responses promoting plant growth and cytostatic activity.

In this work a method has been established that allows the synthesis of steroids with the 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo moiety and side chains of the types androstane, pregnane, cholestane, dinorcholane, spirostane, 23-oxo spirostane, 23-hydroxy spirostane, furostane and 16 β :22,22,25-diepoxy dinorcholestane. This was achieved by using a synthetic sequence involving the epoxidation, aperture and oxidation reactions in a quick manner and without the need to isolate the synthetic intermediates (Figure I).

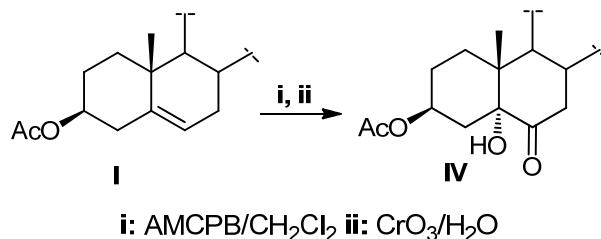
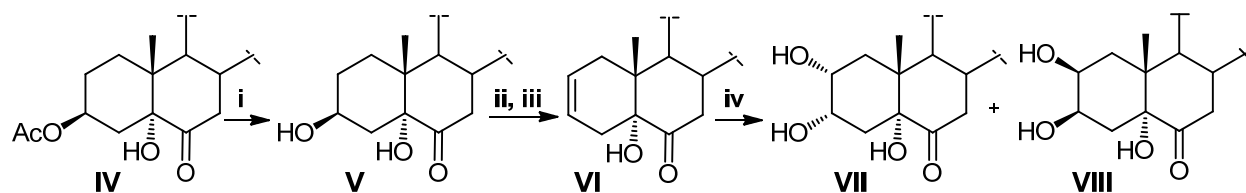


Figure I.

These compounds were used as synthetic intermediates in the preparation of analogues of brassinosteroids with 3 β ,5 α -dihydroxy-6-oxo and 2 α ,3 α ,5 α -trihydroxy-6-oxo moieties through a synthetic protocol that involves saponification reactions, tosylation, sulfonic ester elimination and dihydroxylation with OsO₄ (Figure. II).



i: $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ **ii:** TsCl/Pir **iii:** $\text{LiBr}/\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{DMF}$ Δ **iv:** $\text{OsO}_4/\text{NMMO}/\text{N}_2/\text{THF}$

Figure II.

Additionally, the different transformations carried out in the steroid skeleton and the side chain were verified using Nuclear Magnetic Resonance techniques and the results of the evaluation of the biological activity of some of the synthesized analogs are presented.

RESUMEN

Los brasinoesteroides son compuestos de estructura esteroidal que se encuentran en los tejidos de las plantas promoviendo su crecimiento. La baja concentración en la que se encuentran en sus fuentes naturales ha estimulado la síntesis de análogos de los mismos con estructuras más sencillas. En particular algunos análogos de brasinoesteroides con la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo han mostrado buena actividad promotora del crecimiento vegetal y actividad citostática.

En el presente trabajo se estableció un método de síntesis que permitió obtener esteroides con la agrupación 3β -acetoxi- 5α -hidroxi-6-oxo y cadenas laterales de tipo androstano, pregnano, colestano, dinorcolano, espirostando, 23-oxo espirostando, 23-hidroxi espirostando, furostanos y $16\beta:22,22,25$ -diepoxi dinorcolestando haciendo uso de un esquema de síntesis que involucra las reacciones de epoxidación, apertura y oxidación de forma rápida y sin necesidad de aislar los intermediarios sintéticos (Figura I).

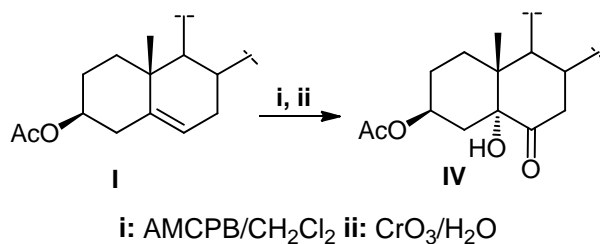
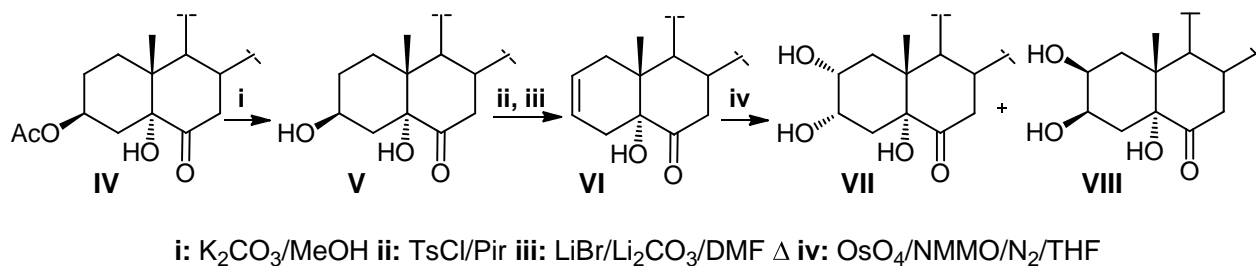


Figura I

Estos compuestos fueron utilizados como intermedios sintéticos en la preparación de análogos de brasinoesteroides con las agrupaciones $3\beta,5\alpha$ -dihidroxi-6-oxo y $2\alpha,3\alpha,5\alpha$ -trihidroxi-6-oxo mediante una secuencia de síntesis que involucra las reacciones de saponificación, tosilación, eliminación del ester sulfónico y dihidroxilación con OsO₄ (Figura II).

**Figura II**

Adicionalmente se verificaron las diferentes transformaciones realizadas en el esqueleto esteroidal y en la cadena lateral utilizando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear y se presentan los resultados de la evaluación de la actividad biológica de algunos de los análogos sintetizados.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

ABRs	Análogos de brasinoesteroides
AMCPB	Ácido metacloroperoxibenzóico
Ar	Argón
ax	axial
BRs	Brasinoesteroides
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
COSY	Experimento de correlación ¹ H- ¹ H (Correlation Spectroscopy)
Δ	reflujo
dd	doble de doble
ddd	doble de doble de dobles
DFS	Sector de Doble Foco
DHT	Desenrollamiento de la Hoja del Trigo
DIB	Diacetoxiyodobenceno
DMAP	N,N-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetil formamida
DMSO-d₆	Dimetil sulfóxido deuterado
dt	doble de triple
ec	ecuatorial
EM	Espectrometría de Masas
EM-AR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

EM-MSI	Espectrometría de Masas con Monitoreo Selectivo de Iones
ET	Enraizamiento del Tomate
e⁻V	Electrón volt
FAB	Bombardeo con Átomos Acelerados (Fast-Atoms Bombardment)
g	gramo
HMBC	Correlación Heteronuclear Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSQC	Coherencia Heteronuclear Simple Quantum (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz
IE	Impacto Electrónico
ILA	Inclinación de la Lámina de Arroz
IL_{MAX}	Longitud máxima del segundo internodo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	kilogramo
LDA	Diisopropilamiduro de Litio
LHR	Longitud del Hipocotilo del Rábano
Lit.	Literatura
m	multiplete
MeOH	Metanol
mg	miligramo
MHz	Megahertz

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

mL	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
MsCl	Cloruro de mesilo
NBS	N-bromosuccinimida
n-BuLi	n-Butil Litio
ng	nanogramo
NOESY	Efecto Nuclear Overhauser Espectroscópico (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
°C	Grados Celcius
ONMM	N-óxido de N-metilmorfolina
P.F.	Punto de fusión
PCC	Clorocromato de piridinio
PCR	Peso de los Cotiledones del Rábano
PDC	Dicromato de piridinio
pg	picogramo
Ph	Fenilo
PIF	Primer Internodo del Frijol
pir	piridina
ppm	partes por millón
PPTS	p-toluen sulfonato de piridinio
q	quintuplete
Rend	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN 2D	Resonancia Magnética Nuclear en dos Dimensiones
s	singulete
SD₅₀	Dosis que produce el 50% de la elongación máxima
SIF	Segundo Internodo del Frijol
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
td	triple de dobles
tdd	triple de dobles de dobles
TsCl	Cloruro de tosilo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Brasinoesteroides naturales.	4
Figura 2.	Esteroides utilizados como materia prima en la síntesis de BRs.	10
Figura 3.	Análogos de BRs con modificaciones en los anillos A y B.	14
Figura 4.	Análogos de BRs halogenados en el anillo A.	16
Figura 5.	Análogos de BRs con sustituyentes nitrogenados en el anillo A.	17
Figura 6.	Análogos de BRs portadores de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo.	18
Figura 7.	Análogos de BRs con modificaciones en la cadena lateral.	19
Figura 8.	Análogos de BRs con núcleo de androstano.	20
Figura 9.	Análogos de BRs con núcleo de pregnano.	23
Figura 10.	Análogos de BRs con núcleo de colestano.	25
Figura 11.	Análogos de BRs con núcleo de tipo bisnorcolano.	26
Figura 12.	Análogos de BRs espirostánicos.	27
Figura 13.	Análogos de BRs espirostánicos con funciones oxigenadas en C-23.	28
Figura 14.	Análogos de BRs con cadenas laterales furostánicas.	29
Figura 15.	Síntesis del potente antitumoral OSW-1 a partir de sapogeninas esteroidales.	45
Figura 16.	Estructura cristalina del 3-monoacetato de (23 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (201).	56
Figura 17.	Estructura cristalina del 3-monoacetato de (23 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (202).	57
Figura 18.	Correlaciones NOE.	61
Figura 19.	Determinación de la configuración <i>R</i> en C-22.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 20	Correlación NOE que corrobora la configuración 2 α ,3 α -diol (A) y 2 β ,3 β -diol (B).	69
Figura 21	Actividad biológica de los compuestos sintetizados 241 (\blacktriangle), 252 (\blacktriangledown), 274 (\bullet) y la homobrasinólida (30) (\blacksquare).	73
Figura 22	Actividad biológica de los compuestos sintetizados 206 (\bullet), 242 (\blacktriangle), 253 (\blacktriangledown) y la homobrasinólida (30) (\blacksquare).	75
Figura 23	Actividad biológica de los compuestos del colesterol 243 (\bullet), 254 (\blacktriangle), 255 (\blacktriangledown) y la homobrasinólida (30) (\blacksquare).	77
Figura 24	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 199 , 200 , 201 , 202 , que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados 23-oxo y 23-hidroxi espirostanos.	168
Figura 25	Espectros de ^{13}C de los compuestos 200 , 201 , 202 .	169
Figura 26	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 200 , 204 , 205 , que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados de tipo dinorcolano.	170
Figura 27	Espectros de ^{13}C de los compuestos 200 , 204 , 205 .	171
Figura 28	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 200 , 207 , 208 y 209 que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano.	172
Figura 29	Espectros de ^{13}C de los compuestos 207 , 208 , 209 .	173
Figura 30	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 199 , 210 y 211 que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados de tipo furostánicos.	174
Figura 31	Espectros de ^{13}C de los compuestos 199 , 210 , 211 .	175
Figura 32	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 231 , 240 y 260 que evidencian las transformaciones realizadas en los derivados de tipo androstano.	176
Figura 33	Espectros de ^{13}C de los compuestos 231 , 240 , 260 .	177
Figura 34	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 260 , 261 y 262 que evidencian las transformaciones realizadas para obtener los derivados de tipo androstano.	178

LISTA DE FIGURAS

Figura 35	Espectros de ^{13}C de los compuestos 260, 261, 262.	179
Figura 36	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 262, 263 y 264 que evidencian las transformaciones realizadas para obtener los ABRs de tipo androstano.	180
Figura 37	Espectros de ^{13}C de los compuestos 262, 263, 264.	181
Figura 38	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 200, 265 y 266 que evidencian las diferentes sustituciones en el anillo A.	182
Figura 39	Espectros de ^{13}C de los compuestos 200, 265, 266.	183
Figura 40	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 268, 269 y 270 que evidencian las diferentes sustituciones en los anillos A y B.	184
Figura 41	Espectros de ^{13}C de los compuestos 268, 269, 270.	185
Figura 42	Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 271, 272 y 273 que evidencian las diferentes sustituciones en los anillos A y B.	186
Figura 43	Espectros de ^{13}C de los compuestos 271, 272, 273.	187

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Metodologías utilizadas en la funcionalización de los anillos A y B.	11
Esquema 2	Introducción del sistema 22,23-diol a partir de Δ^{22} -esteroides manteniendo el esqueleto carbonado.	12
Esquema 3	Intermediarios obtenidos a partir de 22-aldehídos utilizados en la síntesis de la cadena lateral de BRs.	13
Esquema 4	Métodologías para la introducción de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo.	30
Esquema 5	Apertura oxidativa de la cadena lateral espiroestánica en medio ácido.	30
Esquema 6	Síntesis de las cadenas laterales de tipo 23-oxo espiroestano, 23-hidroxi espiroestano, bisnorcolano y 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano a partir de acetato de diosgenina.	34
Esquema 7	Procedimiento de síntesis seguido para la obtención de las cadenas laterales de tipo 23-oxo y 23-hidroxi espiroestano.	35
Esquema 8	Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo 23-oxodiosgenina.	36
Esquema 9	Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de la cadena lateral de tipo dinorcolano.	37
Esquema 10	Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo dinorcolano.	38
Esquema 11	Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de la cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano.	38
Esquema 12	Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxicolestano.	39
Esquema 13	Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de la cadena lateral de tipo furostano.	40
Esquema 14	Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo furoestánica.	40
Esquema 15	Procedimiento de síntesis empleado para iniciar el estudio de la funcionalización de los anillos A y B.	41
Esquema 16	Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de ABRs con la agrupación 3 β -hidroxi-6-oxo.	43

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 17	Reacción de β -epoxidación y apertura del anillo tetrahidrofurano mediante el empleo de $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.	44
Esquema 18	Mecanismo propuesto para realizar la apertura del anillo de tetrahidrofurano.	45
Esquema 19	Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de acetato de criptogenina y el precursor sintético del OSW-1.	46
Esquema 20	Método desarrollado para la obtención de los esteroides con la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo.	48
Esquema 21	Procedimiento general para la obtención de los esteroides con la agrupación $3\beta,5\alpha$ -dihidroxi-6-oxo.	49
Esquema 22	Procedimiento general para la obtención de ABRs con la agrupación $2\alpha,3\alpha,5\alpha$ -trihidroxi-6-oxo y $2\beta,3\beta,5\alpha$ -trihidroxi-6-oxo.	50
Esquema 23	Procedimiento sintético para la obtención de análogos de androstano.	52
Esquema 24	Procedimiento sintético para la obtención de ABRs con cadena lateral de tipo 23-hidroxi espirostando.	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Condiciones para la apertura oxidativa de furostanos.	46
Tabla 2	Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral de compuestos 23-carbonílicos (δ ppm).	55
Tabla 3	Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral de compuestos 23-carbonílicos (δ ppm).	56
Tabla 4	Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral de compuestos hidroxilados y acetilados en C-23 (δ ppm).	57
Tabla 5	Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral de compuestos hidroxilados y acetilados en C-23 (δ ppm).	58
Tabla 6	Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral del acetato de 23-oxodiosgenina (200) y sus derivados 204 y 205 (δ ppm).	59
Tabla 7	Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral del acetato de 23-oxodiosgenina (200) y sus derivados 204 y 205 (δ ppm).	60
Tabla 8	Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral de los compuestos furoespirostánicos 207 , 208 y 209 (δ ppm).	62
Tabla 9	Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral de los compuestos furoespirostánicos 207 , 208 y 209 (δ ppm).	62
Tabla 10	Señales protónicas características de la cadena lateral furostánica (δ ppm).	63
Tabla 11	Desplazamientos químicos característicos de los carbonos situados en la cadena lateral furostánica (δ ppm).	64
Tabla 12	Desplazamientos químicos característicos de los carbonos situados en la cadena lateral de tipo colestano-16,22-diona (δ ppm).	65
Tabla 13	Señales protónicas características de la sustitución en las posiciones C-5 y C-6 (δ ppm).	66
Tabla 14	Señales características en RMN ^{13}C asociadas a la sustitución en las posiciones C-5 y C-6 (δ ppm).	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 15	Señales protónicas características asociadas a la sustitución en el anillo A (δ ppm).	70
Tabla 16	Señales características en RMN ^{13}C asociadas a la sustitución en el anillo A (δ ppm).	71
Tabla 17	Diferencia relativa de la longitud del segundo internodo (%).	72
Tabla 18	Respuesta de la máxima elongación estimada (ILmax) y la dosis de estimulación media (SD_{50}) de la elongación del segundo internodo en plantas de frijol tratadas con los compuestos estudiados.	74
Tabla 19	Diferencias de la elongación del segundo internodo del frijol (mm).	76
Tabla 20	Datos del cristal y de la estructura refinada de 201 .	161
Tabla 21	Ángulos [$^{\circ}$] y longitudes de enlace [Å] de 201 .	162
Tabla 22	Datos del cristal y de la estructura refinada de 202 .	164
Tabla 23	Ángulos [$^{\circ}$] y longitudes de enlace [Å] de 202 .	165

1. INTRODUCCIÓN

Los brasinoesteroides (BRs) son una familia de compuestos, constituida por más de 70 productos naturales, considerada por muchos especialistas como la sexta clase de hormona vegetal, dada su extremada actividad promotora del crecimiento vegetal. Entre sus efectos se ha descrito que incrementan la biomasa, disminuyen los efectos del estrés causado por la falta de nutrientes, elevan la tolerancia a la salinidad y a las bajas temperaturas e incrementan la resistencia a herbicidas. Además se ha demostrado su función como estimuladores en la elongación y división celular.¹ Recientemente se han descrito BRs naturales que pueden inhibir el crecimiento de varias líneas de células cancerígenas en concentraciones micromolares ejerciendo efectos mínimos en células normales.²

Estos compuestos han sido encontrados en todos los órganos de un gran número de representantes de diferentes familias del reino vegetal. La baja concentración en la que se encuentran en sus fuentes naturales y las características estructurales con la presencia de grupos hidroxilos de diferente estereoquímica, han estimulado la síntesis de análogos estructurales no presentes en la naturaleza con estructuras más sencillas y fáciles de sintetizar.

Aunque los requisitos estructurales para una buena actividad biológica han sido claramente establecidos, el hecho de que una variedad de análogos de brasinoesteroides (ABRs) con modificaciones de leves a drásticas hayan mostrado una baja, moderada e incluso elevada actividad promotora del crecimiento vegetal, sugiere que los requisitos establecidos para una buena actividad son más flexibles y variables que los que se establecieron inicialmente.

Diversos grupos de investigadores han concentrado su atención en la obtención y el estudio de las propiedades estimuladoras del crecimiento vegetal de una amplia variedad de análogos de brasinoesteroides, portadores de algunas agrupaciones funcionales presentes en los compuestos naturales, las cuales han mostrado una marcada incidencia en la actividad biológica.^{1g,3} Adicionalmente se han publicado análogos de brasinoesteroides portadores de anillos A y B modificados que han presentado la actividad típica de los brasinoesteroides naturales.

En particular, algunos ABRs que presentan la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo han mostrado buena actividad promotora del crecimiento vegetal.⁴

La facilidad para introducir la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo a partir de 3β -acetoxi- Δ^5 esteroides comparada con la preparación de la agrupación 7-oxa-lactona que caracteriza al compuesto natural más activo, hace más factible la preparación a gran escala de análogos de brasinoesteroides con la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo que puedan aplicarse a la agricultura y prevalecer sobre los análogos 7-oxa lactona altamente activos, disponibles comercialmente, cuyos precios prohibitivos limitan la masiva y generalizada aplicación de brasinoesteroides en la agricultura.

La obtención de ABRs potencialmente bioactivos a través de métodos simples, permitirá reducir el costo de los productos que existen en el mercado para beneficiar varios cultivos de interés económico. El aumento de la disponibilidad de estos productos mejorará el rendimiento y la calidad de una gran variedad de cultivos, lo cual repercutirá en la disminución de los precios de los alimentos y por consiguiente en la economía del pueblo mexicano.

Es por ello que el presente trabajo centra su atención en la síntesis de esteroides potencialmente bioactivos que puedan actuar como ABRs y que permitan tanto evaluar su utilización en la agricultura como iniciar estudios dirigidos a establecer su actividad antitumoral.

2. ANTECEDENTES

2.1. Brasinoesteroides naturales, distribución en la naturaleza.

El estudio de los brasinoesteroides comenzó en 1941 cuando Mitchell y Whitehead informaron en el Centro de Investigaciones Agrícolas de Beltsville que la aplicación de extractos hexanólicos obtenidos del polen de maíz a plántulas de frijoles producía una marcada elongación en el internodo tratado,⁵ respuesta que también fue observada al utilizar extracto de semillas inmaduras.⁶ En 1960 Mitchell lideró un programa de investigación dirigido a encontrar nuevas hormonas vegetales, donde se estudió el polen extraído de alrededor de 60 especies de plantas diferentes utilizando el bioensayo del SIF. Los pólenes obtenidos de la *Brassica napus L* y del árbol conocido en EEUU como árbol de aliso (*Alnus glutinosa L.*) produjeron tanto elongación, como abultamiento y curvatura del internodo tratado. Estos resultados condujeron a que Mitchell y colaboradores informaran la existencia de un nuevo grupo de hormonas vegetales lipídicas compuestas principalmente por ésteres de ácidos grasos glicosilados a las cuales nombraron brasinas.⁷⁻⁸

Posteriormente se publicó que la brasina era capaz de aumentar el crecimiento de las plantas, el rendimiento del cultivo y la disponibilidad de las semillas.⁹ Con estos resultados, los investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos unieron esfuerzos para aislar la brasina de grandes cantidades de polen de la *Brassica napus L*, e iniciaron estudios para identificar y sintetizar los compuestos activos de la brasina, evaluar el efecto de los mismos en el rendimiento de los cultivos de trigo, maíz, soya y papa, además de evaluar sus propiedades reguladoras del crecimiento vegetal en invernaderos y en el campo.¹⁰

El trabajo en equipo de los investigadores americanos para aislar los compuestos activos de la brasina a partir de 250 Kg de polen del nabo colectado por abejas, condujo a la obtención de 10 mg de una sustancia cristalina a la cual nombraron brasinólida (**1**), cuya estructura fue determinada posteriormente mediante análisis espectroscópicos y de difracción de rayos X como la (22*R*,23*R*,24*S*)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxi-24-metil-B-homo-7-oxa-5 α -colestano-6-ona.^{1h}

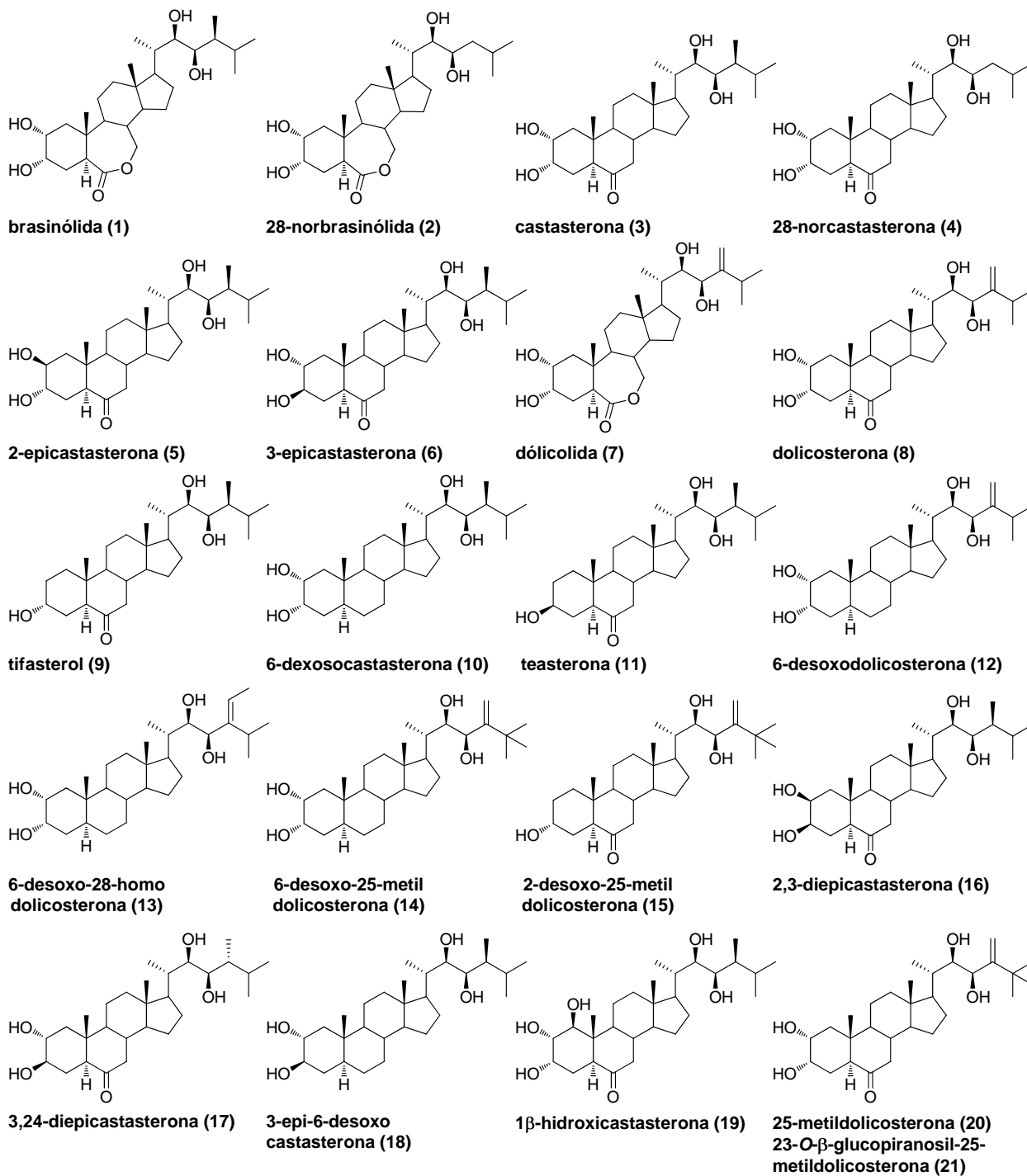
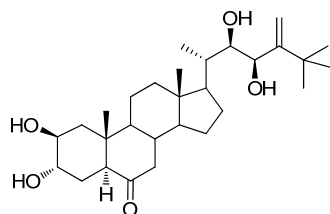
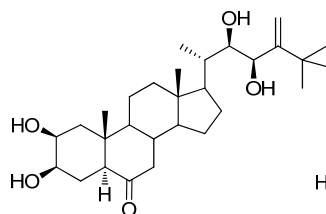


Figura 1. Brasioesteroides naturales.

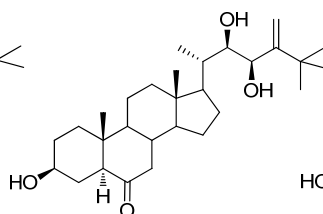
Continuación de la Figura 1.....



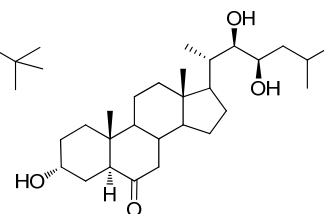
2-epi-25-metildolicosterona (22)
23-O-β-glucopiranosil-2-epi-25-metildolicosterona (23)



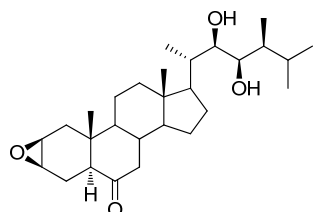
2,3-diepi-25-metil dolicosterona (24)



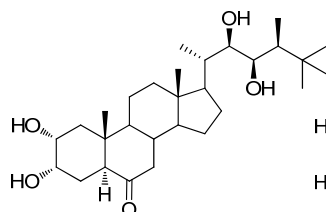
3-epi-2-desoxi-25-metil dolicosterona (25)



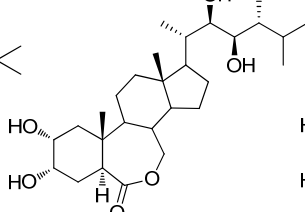
28-nortifasterol (26)



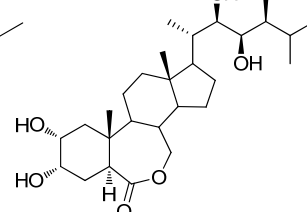
secasterona (27)



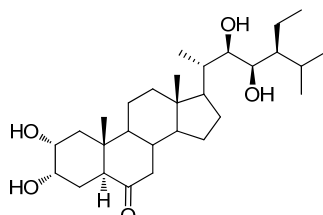
25-metilcastasterona (28)



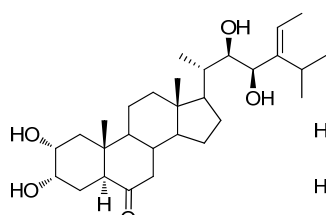
24-epibrasinólida (29)



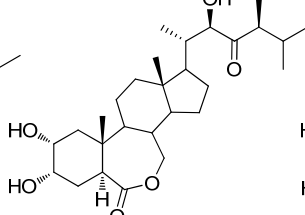
28-homobrasinólida (30)



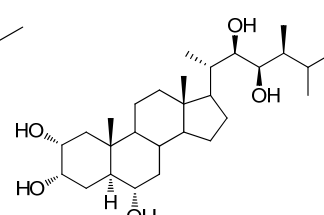
28-homocasterona (31)



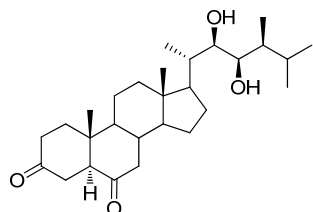
28-homodolicosterona (32)



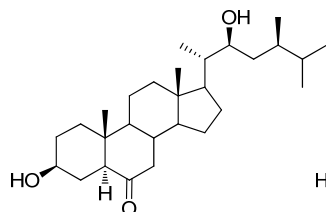
23-desidrobresinólida (33)



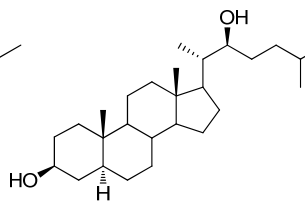
6α-hidroxicastasterona (34)



3-desidroteasterona (35)



catasterona (36)



6-desoxo-28-norcatasterona (37)

Desde el descubrimiento de la brasinólida (1) más de 60 BRs naturales han sido aislados e identificados de una gran variedad de fuentes vegetales. Los estudios realizados sobre la actividad biológica, las pruebas biológicas de campo y la síntesis química de los mismos llevaron a la conclusión de que los BRs eran un grupo de hormonas vegetales y actualmente son considerados la sexta clase de hormona vegetal (Figura 1).

Por otra parte, científicos japoneses aislaron de hojas sanas de la planta *Distylium racemosum* tres fracciones que mostraron actividad promotora del crecimiento vegetal en el bioensayo de la ILA, las cuales denominaron factores *Distylium* A₁, A₂ y B.¹¹ En 1984 se determinó mediante Espectrometría de Masas y Cromatografía de Gases, que el factor *Distylium* B era una mezcla de brasinólida **(1)** y 28-norbrasinólida **(2)**, mientras que el factor *Distylium* A₁ era una mezcla de castasterona **(3)** y 28-norcastasterona **(4)**. El comportamiento cromatográfico del factor *Distylium* A₂ no ayudó en su identificación pero se supuso que era un BR de tipo 2-desoxi.¹² Adicionalmente en 1982 Yokota y colaboradores aislaron la castasterona **(3)** de tejido del árbol de castaña y su estructura la determinaron utilizando técnicas de Espectrometría de Masas-FAB, Espectrometría de Masas de Alta Resolución y Resonancia Magnética Nuclear.¹³

En general los BRs se caracterizan por estimular el crecimiento vegetal, aumentar los rendimientos de las plantas y la resistencia de las mismas a factores de estrés como las bajas y altas temperaturas, la sequía, la salinidad, los metales pesados y los agentes químicos agresivos como herbicidas. También aceleran la maduración de las cosechas y recientemente se ha publicado su actividad anticancerígena.¹⁴

Los BRs han sido detectados en todos los órganos de las plantas como el polen, las semillas, las hojas, las flores, el tallo, las raíces y los granos. Los niveles endógenos de BRs varían de acuerdo al tipo de órgano de la planta, la edad y especie del tejido. Los tejidos jóvenes en crecimiento contienen mayores niveles de brasinoesteroides que los tejidos maduros.

En general el polen y las semillas inmaduras son los tejidos más ricos en BRs, con cantidades que oscilan entre 1-100 ng/g del peso fresco, mientras que en los tejidos vegetativos (raíces, tallos) las concentraciones son inferiores (0.01-0.1 ng/g del peso fresco).¹⁵

Estudios realizados en semillas inmaduras de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) han demostrado la presencia de brasinólida **(1)**, castasterona **(3)**, 2-epicastasterona **(5)**, 3-epicastasterona **(6)**, dolicólida **(7)**, dolicosterona **(8)**, tifasterol **(9)**, 6-desoxocastasterona **(10)**, teasterona **(11)**, 6-desoxodolicosterona **(12)**, 6-desoxo-28-homodolicosterona **(13)**, 6-desoxo-25-

metildolicosterona (14), 2-desoxi-25-metildolicosterona (15), 2,3-diepicasterona (16), 3,24-diepicasterona (17), 3-epi-6-desoxocasterona (18), 1 β -hidroxicasterona (19), 25-metildolicosterona (20), 23-O- β -glucopiranosil-25-metildolicosterona (21), 2-epi-25-metildolicosterona (22), 23-O- β -glucopiranosil-2-epi-25-metildolicosterona (23), 2,3-diepi-25-metildolicosterona (24), 3-epi-2-desoxi-25-metildolicosterona (25).¹⁵⁻¹⁶

Adicionalmente se ha publicado la presencia de brasinólida (1) y castasterona (3) en el tallo del chícharo (*Pisum sativum*), en las semillas y polen de la calabaza (*Cucurbita moschata Duch*) y en el polen de la naranja (*Citrus sinensis* Osbeck).¹⁷⁻¹⁸

Entre los BRs, la castasterona (3) es la que se encuentra más distribuida en la naturaleza, seguida por la brasinólida (1), el tifasterol (9), la 6-desoxocasterona (10), la teasterona (11) y la 28-norcasterona (4). La brasinólida (1) y la castasterona (3) son los BRs de mayor importancia debido a su amplia distribución en la naturaleza, así como a su potente actividad biológica.^{1f}

2.2. Bioensayos y técnicas microanalíticas para la determinación de su presencia y actividad.

La extracción y purificación de BRs depende de la partición del disolvente y las posteriores separaciones cromatográficas. Los métodos microanalíticos de separación como la CG y la HPLC en combinación con técnicas de determinación estructural como la EM-MSI y los bioensayos diseñados originalmente para evaluar la actividad de las auxinas, giberelinas y citoquininas, entre los que se destacan el bioensayo del ET, el PIF, el PCR y la LHR han contribuido al aislamiento e identificación de los BRs de sus fuentes naturales, así como a la evaluación de su actividad. Debido a la baja concentración en la que se encuentran en sus fuentes naturales, su identificación requiere de bioensayos específicos y de alta sensibilidad que sean capaces de discriminar los BRs del resto de las hormonas reguladoras del crecimiento vegetal como son la ILA, el SIF y el DHT.^{1b,19}

El cultivo de la planta, las condiciones de germinación y crecimiento, la fase de desarrollo, las condiciones de luz y el modo de tratamiento son de gran importancia en cada bioensayo para obtener resultados reproducibles.

2.3. Características estructurales de los brasinoesteroides. Relación estructura-actividad.

Los brasinoesteroides naturales son derivados polihidroxisados del 5α -colestano y pueden presentar desde veintisiete hasta veintinueve átomos de carbono. Sus variaciones estructurales dependen del tipo y orientación de las funciones oxigenadas tanto en los anillos A y B como en la cadena lateral.

Estos compuestos pueden ser clasificados en BRs de 27C [sin sustituyentes en C-24] (**2, 4 y 26**), 28C [con un grupo metilo en C-24] (**1, 3, 5, 6, 10, 9, 11, 16-19, 27-29**), 28C [con un grupo exometilideno en C-24] (**7, 8 y 12**), 29C [con un grupo etilo en C-24] (**30 y 31**) o 29C [con un grupo exoetilideno en C-24] (**13 y 32**) dependiendo del sustituyente alquílico en la cadena lateral. También han sido aislados algunos compuestos de 29C, que presentan un grupo metilo adicional en la posición C-25 (**14, 15, 20-25 y 28**).^{20,21}

Con respecto a la cadena lateral colestánica, los brasinoesteroides se encuentran divididos en 11 tipos con diferentes sustituyentes en C-23, C-24 y C-25 en: 23-oxo (**33**), 24*S*-metil (**1, 3, 5, 6, 10, 9, 11, 16, 18, 19, 27, 34, 35**), 24*R*-metil (**17, 29**), 24-metileno (**7, 8, 12**), 24*S*-etil (**27, 31**), 24-etilideno (**13, 32**), 24-metileno-25-metil (**14, 15, 20, 22, 24, 25**), 24-metil-25-metil (**28**), sin sustituyentes en C-23 (**36**), C-24 (**2, 4, 26**) y C-23–C-24 (**37**).²¹

Respecto al anillo A, los BRs presentan grupos hidroxilos vecinales en las posiciones C-2 y C-3, que pueden estar presentes en las cuatro orientaciones posibles ($2\alpha3\alpha$, $2\alpha3\beta$, $2\beta3\alpha$, $2\beta3\beta$). También se han encontrado BRs con un solo grupo hidroxilo en C-3 (**9, 11, 15, 25, 26, 36, 37**), un BR con un grupo 2,3-epóxido en el anillo A (**27**) y un BR que presenta un grupo hidroxilo adicional en el anillo A en la posición C-1 β (**19**). Los BRs con un grupo 3α -hidroxi (**9, 15, 26**), 3β -hidroxi (**11, 36 y 37**) o 3-oxo (**35**) en el anillo A son precursores de BRs que presentan el sistema $2\alpha,3\alpha$ -diol.

En diversas publicaciones se han descrito los diferentes grados de actividad de los compuestos portadores del sistema 2,3-diol, y en general se ha observado el siguiente orden decreciente de actividad biológica: $2\alpha3\alpha > 2\alpha3\beta > 2\beta3\alpha > 2\beta3\beta$. Los compuestos portadores de una sola función hidroxílica en el anillo A, presentan propiedades biológicas más débiles que los portadores del sistema diol. Esto sugiere que la orientación α del grupo hidroxilo en C-2 es esencial para una potente actividad biológica.²¹

Con respecto al estado de oxidación del anillo B, los BRs pueden ser clasificados en derivados 7-oxalactónicos (**1, 7, 29, 30, 33**)^{1h,22-23} 6-cetónicos (**3-6, 8, 9, 11, 15-17, 19-28, 31, 32, 35, 36**)^{13,24,25,26,27-28} 6-desoxigenados (**10, 12-14, 18, 37**)^{16a,27,29,30} y 6-hidroxilado (**34**).^{31,32} En general, los compuestos 7-oxalactónicos presentan mayor actividad biológica que los de tipo 6-cetónicos y 6-desoxigenados. En algunos casos, los brasinoesteroides 6-cetónicos presentan actividad similar a los 7-oxalactónicos, mientras que los derivados 6-desoxigenados han mostrado débiles propiedades como estimuladores del crecimiento vegetal.^{1f}

Los estudios realizados para determinar la relación estructura-actividad de los BRs han revelado una serie de características estructurales necesarias para su actividad biológica las cuales se resumen en: la presencia del sistema $2\alpha,3\alpha$ -diol en el anillo A, la fusión trans de los anillos A/B, la presencia del grupo 6-ceto-7-oxa o 6-ceto en el anillo B, la existencia de un sistema diol en las posiciones C-22, C-23 con configuración $22R,23R$ o $22S,23S$ y la presencia del grupo metilo o etilo en la posición C-24 de la cadena lateral.

2.4. Síntesis de brasinoesteroides.

La capacidad de los BRs para activar a muy bajas concentraciones el metabolismo y los procesos de crecimiento de las plantas, así como las características estructurales específicas y las bajas concentraciones en sus fuentes naturales, han hecho que la síntesis química de estos compuestos sea de gran interés para varios grupos de investigadores. Diferentes métodos de síntesis han sido desarrollados partiendo de esteroides naturales accesibles, con grupos funcionales que pueden ser transformados en las funciones características de los BRs.

Los compuestos de partida más adecuados son los esteroides que presentan un doble enlace en la posición C-22 como el estigmasterol (**38**) y el ergosterol (**39**), los cuales permiten preparar BRs con 29C y 28C sin necesidad de reconstruir la cadena lateral del esqueleto carbonado y que adicionalmente presentan la agrupación 3 β -hidroxi-5-en y 3 β -hidroxi-5,7-dien respectivamente, las cuales permiten introducir en los anillos A y B las funciones características de los BRs utilizando diferentes metodologías.^{1b,33-34} También se ha publicado la utilización como materia prima para la síntesis de BRs, el ácido hiedesoxicólico (**40**), que es un ácido biliar con grupos hidroxilos en las posiciones C-3 y C-6 (Figura 2)³⁵⁻³⁶.

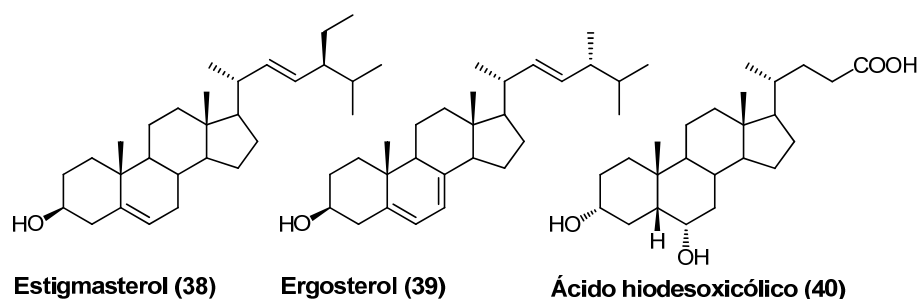
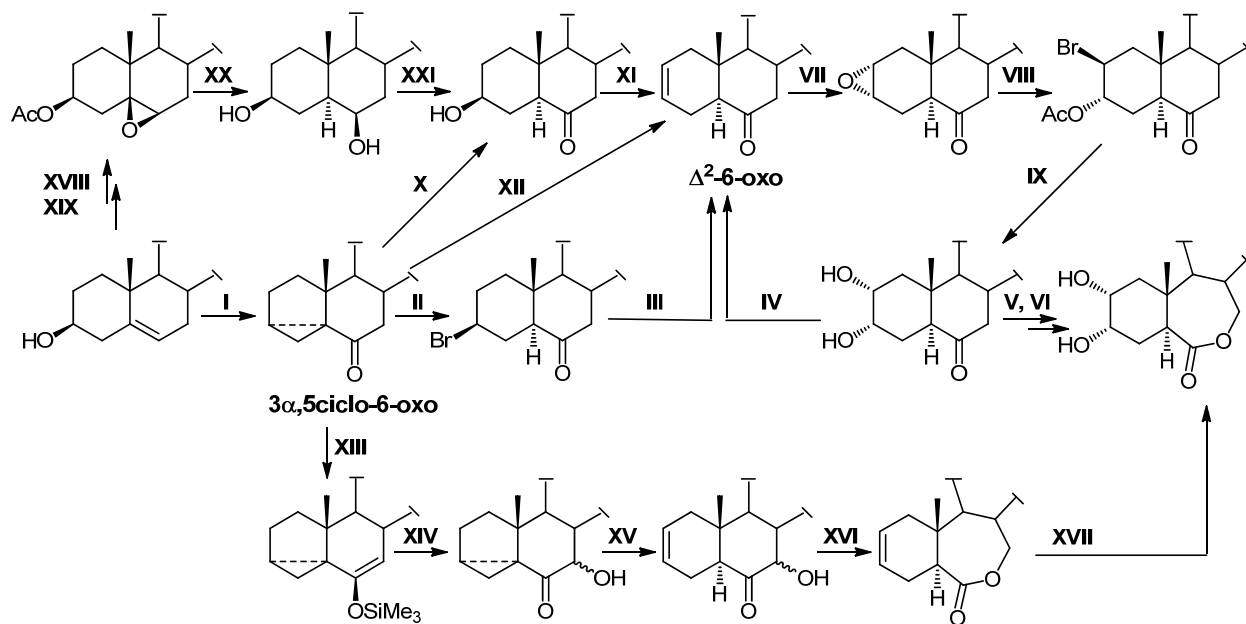


Figura 2. Esteroides utilizados como materia prima en la síntesis de BRs.

La funcionalización de los anillos A y B a partir de esteroides con la agrupación 3 β -hidroxi-5-en ha sido ampliamente estudiada y en la mayoría de las publicaciones se plantea la formación del intermediario 3 α ,5-ciclo-6-oxo esteroide el cual por diferentes metodologías es transformado en el derivado 2 α ,3 α -diol-6-oxo esteroide que posteriormente mediante la oxidación de Baeyer-Villiger permite la introducción de la agrupación lactona en el anillo B (Esquema 1).³⁷⁻³⁸



I: a) MsCl o TsCl/pir b) KAcO/acetona reflujo c) Jones, PCC o PDC **II:** HBr/AcOH **III:** Li₂CO₃/DMF reflujo **IV:** OsO₄/ONMM/THF **V:** a) Ac₂O/pir b) AMCPB o CF₃CO₃H **VI:** a) KOH/MeOH b) HCl 5% reflujo **VII:** AMCPB/beneno **VIII:** a) HBr/acetona b) Ac₂O/Pir **IX:** a) NaAcO/AcOH/Cu(AcO)₂ reflujo b) MeOH/KOH reflujo **X:** AcOH/H₂SO₄ 1M reflujo **XI:** a) TsCl/pir b) LiBr/DMF reflujo **XII:** LiBr/PPTS/DMF reflujo **XIII:** CF₃SO₂SiMe₃/Et₃N, 0°C **XIV:** O₃/CH₂Cl₂/pir -78°C **XV:** TsOH/LiBr/DMF reflujo **XVI:** a) HIO₄ b) NaBH₄/MeOH, 0°C c) HCl 2.6 N/THF **XVII:** OsO₄/ONMM/THF **XVIII:** Ac₂O/Pir **XIX:** KMnO₄/CuSO₄ **XX:** LiAlH₄/AlCl₃ **XXI:** a) TsCl/Pir b) PCC c) LiBr/DMF.

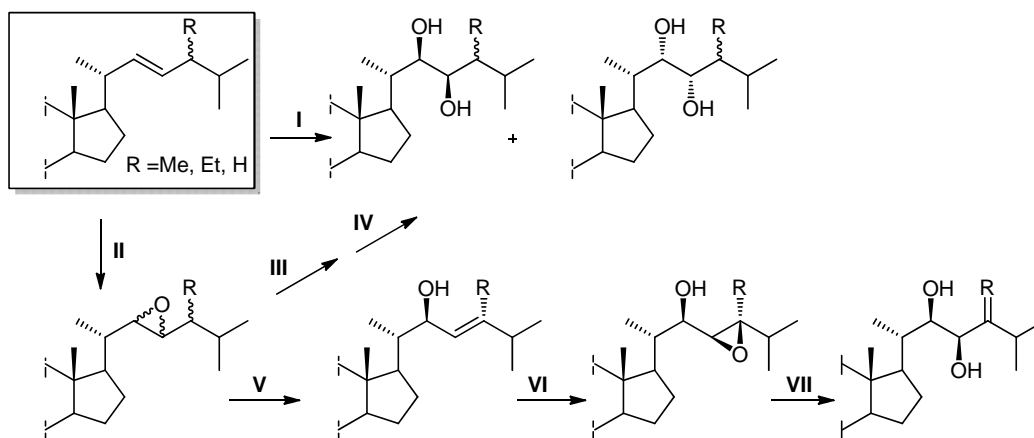
Esquema 1. Metodologías utilizadas en la funcionalización de los anillos A y B.

La construcción de la cadena lateral portadora de cuatro centros quirales contiguos es la tarea más compleja en la síntesis de los BRs. Dependiendo del compuesto de partida puede realizarse por dos vía diferentes:

- Mediante la hidroxilación directa del doble enlace en la posición C-22 y C-23 manteniendo el esqueleto carbonado del compuesto de partida.
- Mediante procesos de síntesis que involucren la formación de nuevos enlaces C-C en la cadena lateral.

La introducción del sistema 22,23-diol a partir de Δ²²-esteroides, manteniendo la cadena carbonada completa, puede realizarse siguiendo diferentes metodologías como son: la osmilación

del doble enlace en 22-23 (**I**),^{39,40,41} la epoxidación de Δ^{22} -esteroides (**II-IV**) o la epoxidación y apertura de epóxido en alcoholes alílicos (**II, V-VII**) (Esquema 2).^{42,43}



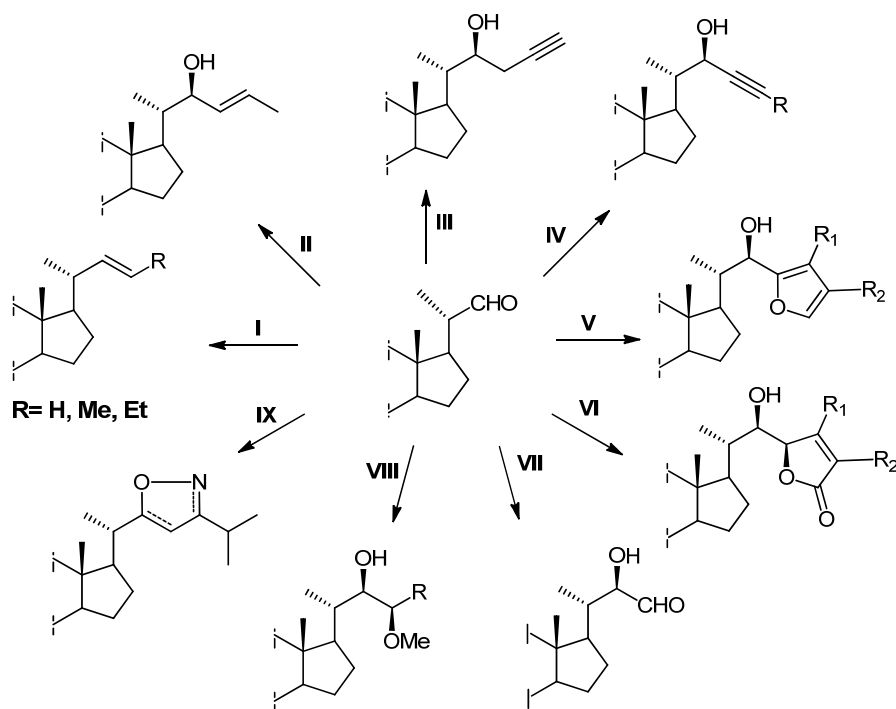
I: OsO₄/ONMM/THF **II:** AMCPB/CH₂Cl₂ **III:** a) HBr 30%/AcOH b) Ac₂O/Pir **IV:** a) AcOH-H₂O, Δ b) NaOH/H₂O/MeOH **V:** Ph₂Se₂/BuOH/NaBH₄, Δ **VI:** AMCPB/CH₂Cl₂ **VII:** Al(O-*i*-Pr)₃/Tolueno, Δ.

Esquema 2. Introducción del sistema 22,23-diol a partir de Δ^{22} -esteroides manteniendo el esqueleto carbonado.

Las metodologías más utilizadas para construir la cadena lateral de los BRs con sus cuatro centros quirales contiguos, emplean procesos de síntesis que involucran la formación de nuevos enlaces C-C, a partir de esteroides con la agrupación 22-aldehído. Entre los procedimientos más comunes para preparar estas materias primas se encuentran la ozonólisis de Δ^{22} -esteroides y la dihidroxilación del doble enlace 22,23 seguida por la ruptura del diol, aunque también se ha publicado el empleo de 17-oxoesteroides y derivados de ácido cólico.⁴⁴⁻⁴⁵ Adicionalmente se han descrito rutas alternativas donde se han utilizado derivados de pregnano como materias primas en la síntesis de la cadena lateral de los BRs.^{46,47}

Numerosas metodologías han sido diseñadas para construir la cadena lateral de los BRs a partir de 22-aldehídos, las cuales pueden ser agrupadas en aproximadamente 9 grupos según el tipo de intermediario involucrado en el proceso de síntesis como: Δ^{22} -olefinas (**I**), alcoholes alílicos (**II**), alcoholes homopropargílicos (**III**), alcoholes propargílicos (**IV**), hidroxifuranos (**V**), hidroxilactonas (**VI**), hidroxialdehídos (**VII**), hidroxiéteres (**VIII**) e isoxazol/isoxazolinas (**IX**) (Esquema 3).^{37,48-49} La estrategia general a seguir dependerá del intermediario involucrado en la

síntesis. En general los procedimientos descritos requieren de un gran número de pasos y los rendimientos alcanzados para obtener el producto final son bajos.



I: a) $\text{PhSO}_2\text{CH}_2\text{R}/\text{BuLi}$ b) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pir}$ c) Na/Hg **II:** $\text{nBuLi}/\text{PhSe}(\text{CH}_2)_3\text{SePh}/\text{THF}$ $-78^\circ\text{C}/\text{H}_2\text{O}_2$ **III:** $\text{LiCH}_2\text{C}\equiv\text{CSiMe}_3/\text{TBAF}$ **IV:** $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}\equiv\text{CLi}/\text{THF}$ $-78^\circ\text{C}/\text{Ar}$ **V:** 2-litio-3,4-dimetilfurano/ THF -78°C **VI:** 2,3-dimetilbutenólido/ LDA/THF -78°C **VII:** a) 1,3-ditiano/ $\text{n-BuLi}/\text{THF}$ b) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pir}$ c) $\text{NBS}/\text{BaCO}_3/\text{acetona}-\text{H}_2\text{O}$ **VIII:** a) $\text{Bu}_3\text{PbCH}(\text{OMe})\text{R}/\text{TiCl}_4$ b) H_3O^+ **IX:** a) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ b) $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}\equiv\text{NO}$.

Esquema 3. Intermediarios obtenidos a partir de 22-aldeídos utilizados en la síntesis de la cadena lateral de BRs.

2.5. Análogos sintéticos de brasinoesteroides. Estructura y actividad biológica.

2.5.1. Análogos con modificaciones en el núcleo esteroidal.

En un intento de reducir el costo de la síntesis de los BRs muchos tipos de análogos de BRs han sido sintetizados. Varios grupos de investigadores han descrito la síntesis de análogos de BRs con modificaciones en los anillos A y B (Figura 3), los cuales presentan diferentes fusiones de anillos A/B (*cis* o *trans*), además de variadas funcionalidades en el anillo B tales como 6-oxa-7-oxo (**41**), C-6 lactama (**42-45**), C-6 tiolactama (**46**), C-7 tioéster (**47, 48**), C-2 metoxilo (**49**), C-3 metoxilo (**50**), C-6 éter (**51, 52**), C-6 cetona (**53-56**), C-6 α o β hidroxilo (**57, 58**) y C-6 desoxo (**59**). La actividad observada por los compuestos **54** y **60** (ambos presentan la agrupación 2 β ,3 β -

diol y la fusión de anillos A/B cis) en el bioensayo de la ILA se alejó del comportamiento esperado según los criterios ya establecidos. La sustitución en la posición C-6 de la función cetona por un grupo β o α hidroxilo produjo disminución en la actividad, mientras que el análogo 6-desoxo (**59**) mostró muy baja actividad, estos resultados sugieren la necesidad de un grupo electronegativo (-O-, -NH-, -CO-, -OH) en la posición C-6 para una buena actividad biológica.^{50,51}

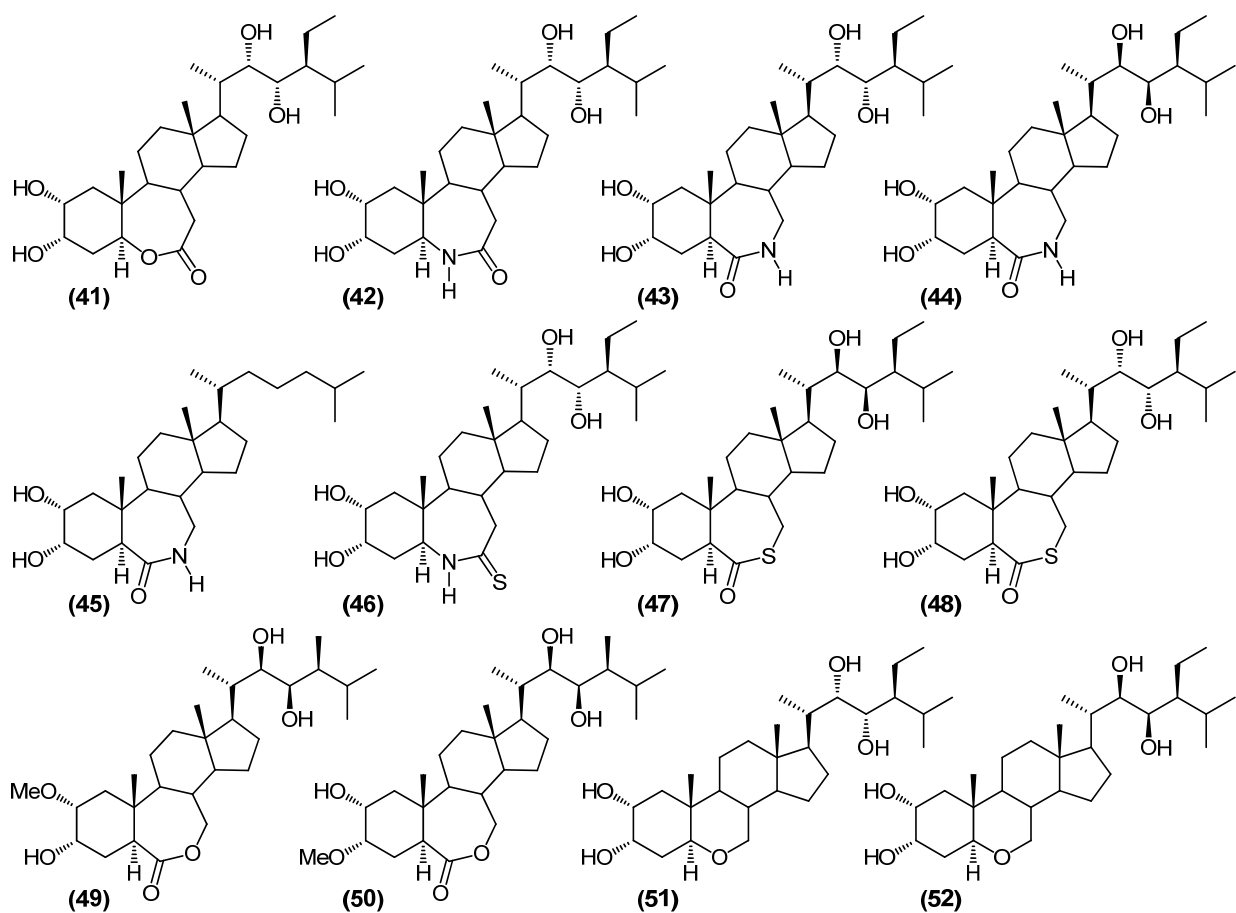
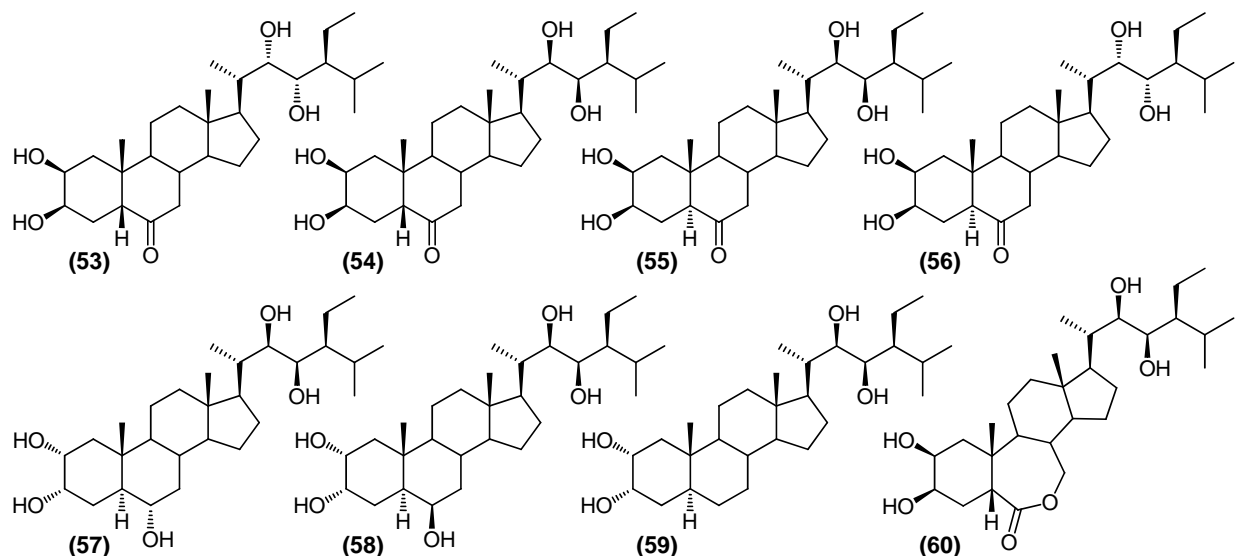


Figura 3. Análogos de BRs con modificaciones en los anillos A y B.

Continuación de la Figura 3.....



Los análogos con agrupaciones funcionales de tipo 6-oxa-7-oxo (**41**), lactama (**42-45**), tiolactama (**46**), tioéster (**47, 48**) y éter (**51, 52**) en el anillo B no superaron la actividad de la brasinólida (**1**) en el bioensayo de la ILA, hecho que corroboró la necesidad de funciones oxigenadas de determinada naturaleza en el anillo B del núcleo esteroidal para una buena actividad biológica.^{52,53} La elevada actividad mostrada por el análogo C-3 metoxilo (**50**) a altas dosis respecto al análogo C-2 metoxilo (**49**) sugiere que la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-2 es más necesaria que en C-3 para que estos compuestos sean bioactivos.⁵⁴

Adicionalmente se ha descrito la síntesis y evaluación de la actividad biológica de análogos de brasinoesteroides fluorados en las posiciones C-2, C-3, C-5 y C-6 (Figura 4).⁵⁵⁻⁵⁶ Los análogos fluorados en C-5 α (**61-63**) mostraron excelente bioactividad en el bioensayo de la ILA,⁵⁷ mientras que los análogos fluorados en las posiciones C-3 (**64, 65**) y C-6 (**66**) mostraron poca actividad.^{55, 58}

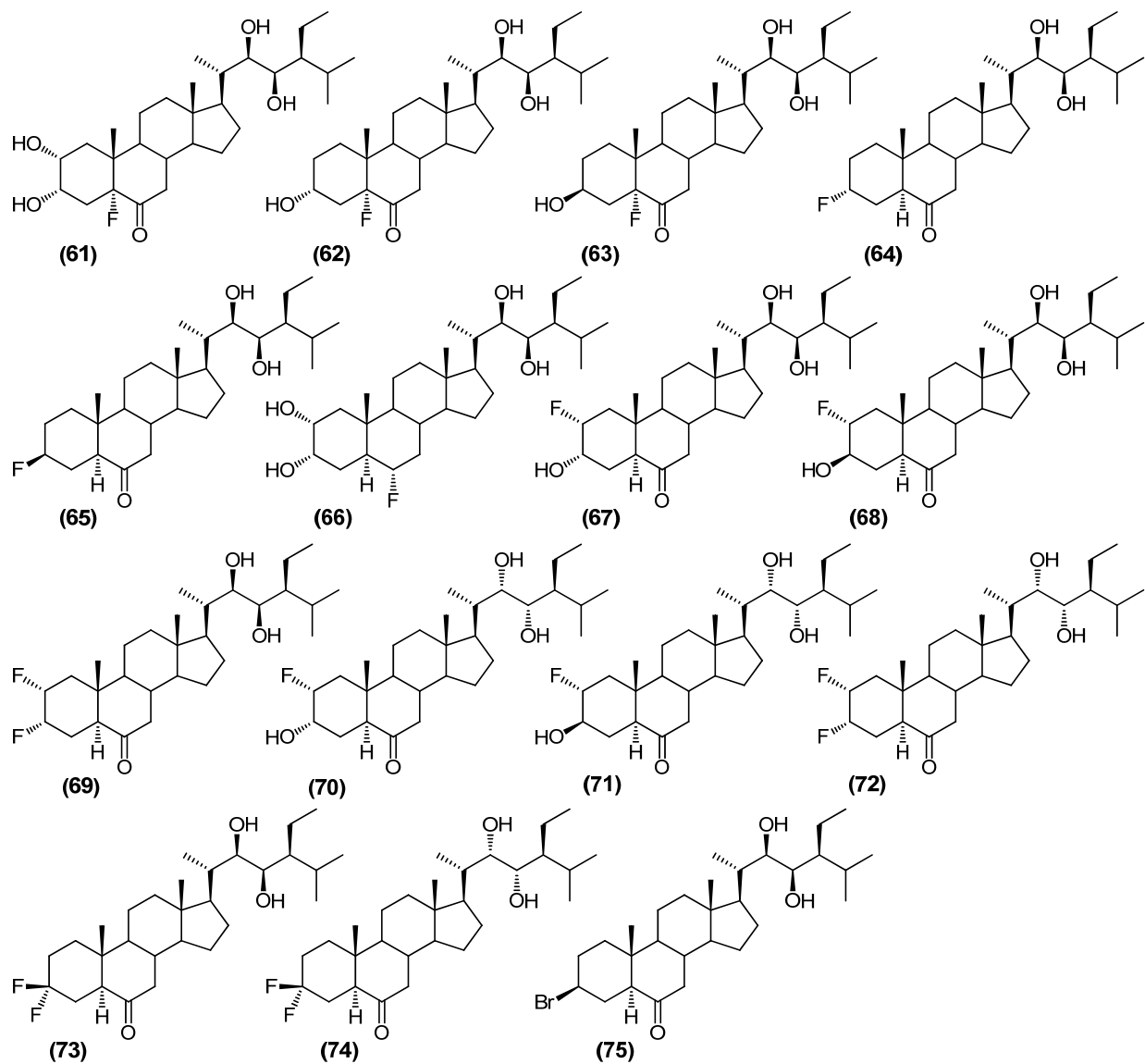


Figura 4. Análogos de BRs halogenados en el anillo A.

Por otra parte, los análogos fluorados en C-2 (**67**, **68**) mostraron elevada actividad a altas dosis, mientras que el compuesto difluorado en las posiciones C-2 y C-3 (**69**) mostró una actividad similar a la 28-homocastasterona (**31**). Los compuestos fluorados con el sistema 22*S*,23*S*-diol (**70**, **71**, **72**) y los análogos 3,3-difluorados (**73**, **74**) resultaron ser completamente inactivos en el bioensayo de la ILA.^{56,59} También se ha descrito la síntesis del análogo bromado **75**, el cual mostró actividad antiviral frente al virus del herpes simple (HSV-1).⁶⁰

En el 2004 Brosa y colaboradores describieron la síntesis y evaluación de análogos de brasinoesteroides nitrogenados en C-3 sin sustituyentes en C-2 (Figura 5). Los análogos con el grupo azido en la posición C-3 (**76**, **77**) fueron los más activos en el bioensayo de la ILA, mientras que los análogos con el sistema diol 22*S*,23*S* (**78**, **79**, **80**, **81**, **82**) en la cadena lateral mostraron menor actividad.⁶¹

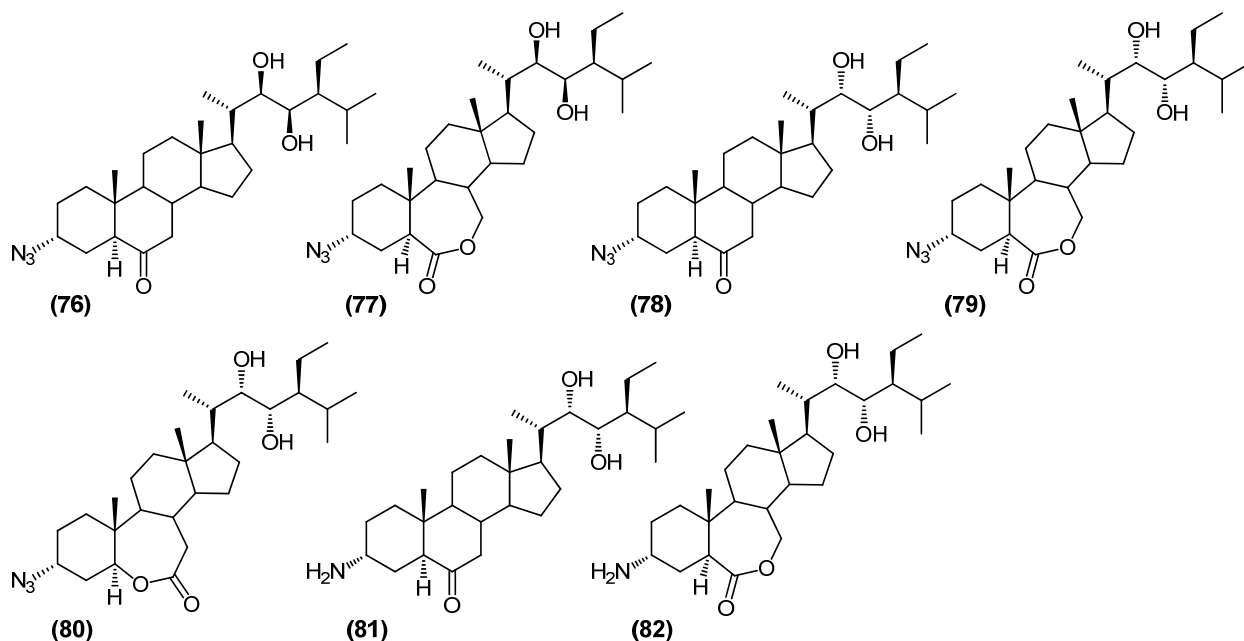


Figura 5. Análogos de BRs con sustituyentes nitrogenados en el anillo A.

La actividad mostrada por los análogos metoxilado (**50**), fluorado (**64**) y nitrogenados en la posición C-3 (**76**, **77**) sugiere que el grupo hidroxilo en C-3 α presente en los brasinoesteroides más activos pudiera actuar como aceptor de enlace de hidrógeno en el complejo brasinoesteroide–receptor.

Adicionalmente se ha informado la síntesis y evaluación de análogos de brasinoesteroides con la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo (Figura 6). La elevada actividad promotora del crecimiento vegetal mostrada por el compuesto **83** en el bioensayo de la ILA y en el ensayo de campo de cebada, así como su relativa facilidad de preparación comparado con otros análogos de BRs lo convirtió en un buen candidato para posteriores aplicaciones en la agricultura.^{4a} Los análogos **83** y **84**

mostraron citotoxicidad en las pruebas realizadas en células infectadas con el virus HSV-1, mientras que el análogo **85** mostró actividad antiviral frente al mismo virus.⁶⁰ Los compuestos con la agrupación 3,5-dihidroxi-6-oxo (**86**, **87**) mostraron respuesta similar a la de los compuestos naturales pero en menor grado.^{55, 57} Los resultados mostrados sugieren que la introducción de un grupo hidroxilo en la posición C-5 α afecta la bioactividad de estos compuesto de forma diferente dependiendo de la función presente en la posición C-3.

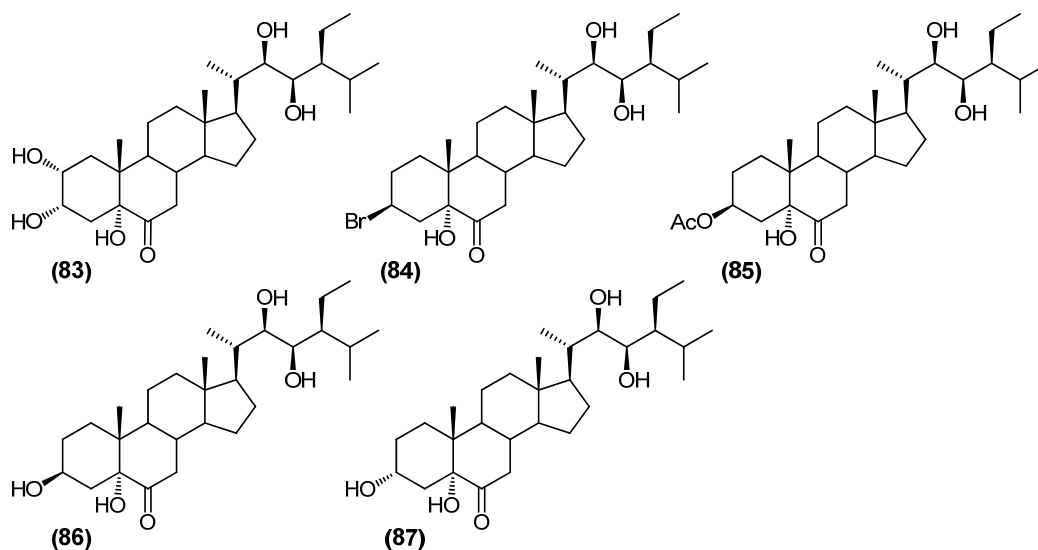


Figura 6. Análogos de BRs portadores de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo.

2.5.2. Análogos con modificaciones en la cadena lateral.

Con el objetivo de esclarecer la relación estructura-actividad de los BRs, varios grupos de investigadores han informado la influencia que ejerce la introducción de modificaciones en la cadena lateral. La eliminación del grupo metilo en C-24,⁶² la introducción de un grupo metilo en C-25⁶³ y la eliminación de la cadena lateral esteroideal⁶⁴ son modificaciones que han permitido sugerir que la presencia de un grupo *S*-alquilo en C-24 puede ser más importante que la configuración del sistema 22,23-diol, la cual puede ser 22*R*,23*R* o 22*S*,23*S*. Además corroboran que los compuestos con el sistema 22*R*,23*R* diol son más activos que sus isómeros correspondientes 22*S*,23*S* y estos a su vez más activos que los compuestos 22*S*,23*R* y 22*R*,23*S*. Adicionalmente, tanto la eliminación de alguno o de todos los sustituyentes en la cadena lateral, como la sustitución en C-25 ocasionan la disminución de la actividad biológica de estos

compuestos. En la figura 7 se muestran algunos de los análogos obtenidos con modificaciones en la cadena lateral.

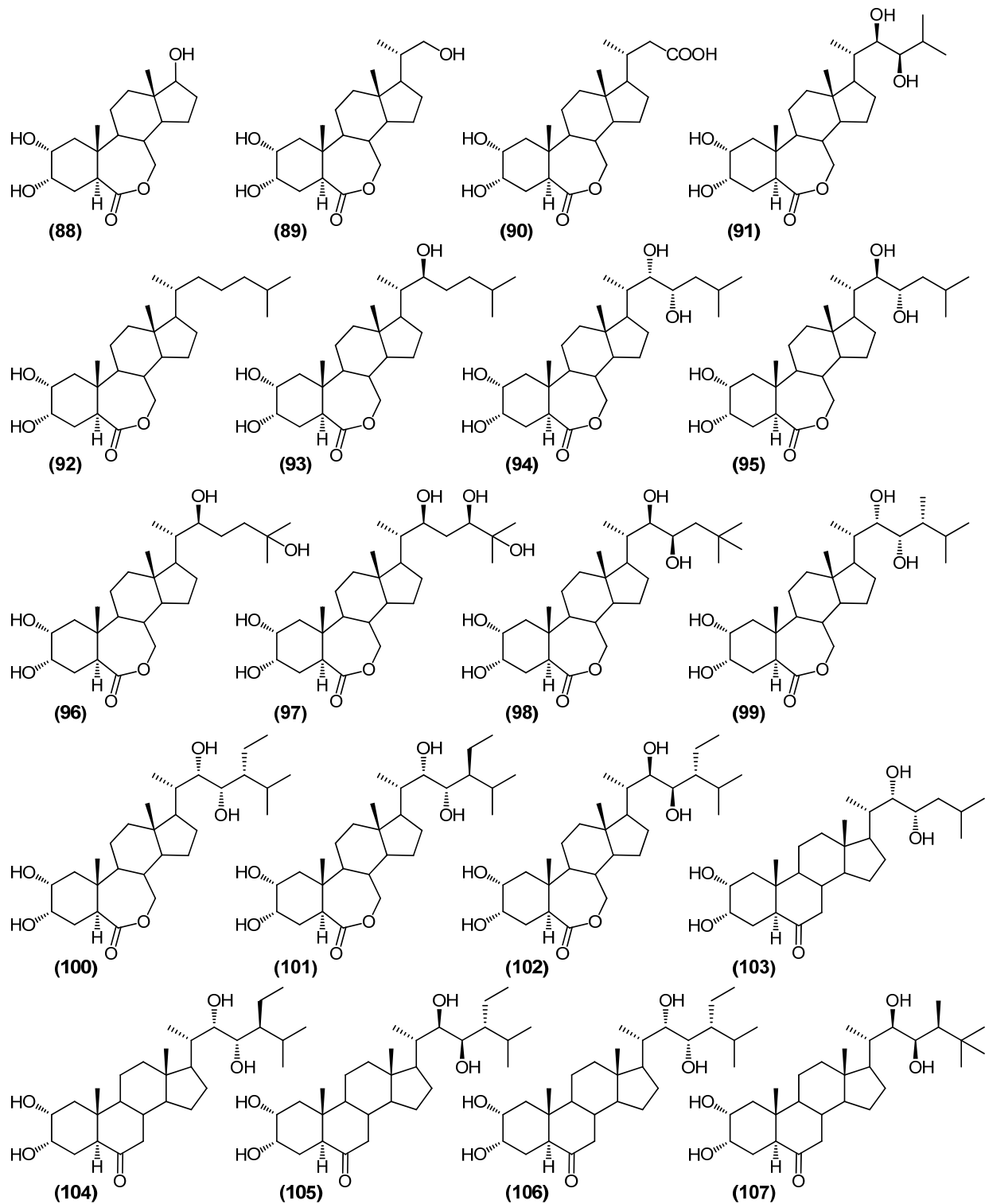


Figura 7. Análogos de BRs con modificaciones en la cadena lateral.

2.5.3. Análogos con modificaciones en los anillos A/B y en la cadena lateral.

Las diferencias en la actividad promotora del crecimiento vegetal, producidas por las ligeras diferencias estructurales encontradas en los BRs naturales, han conducido a la síntesis de análogos de BRs con modificaciones estructurales de moderadas a drásticas.

2.5.3.1 Análogos con núcleo de androstano, pregnano, colestano y bisnorcolano.

Algunos análogos de BRs con esqueleto de tipo androstano han mostrado variadas respuestas en el bioensayo del SIF. La figura 8 muestra algunos de los análogos obtenidos de tipo androstano.

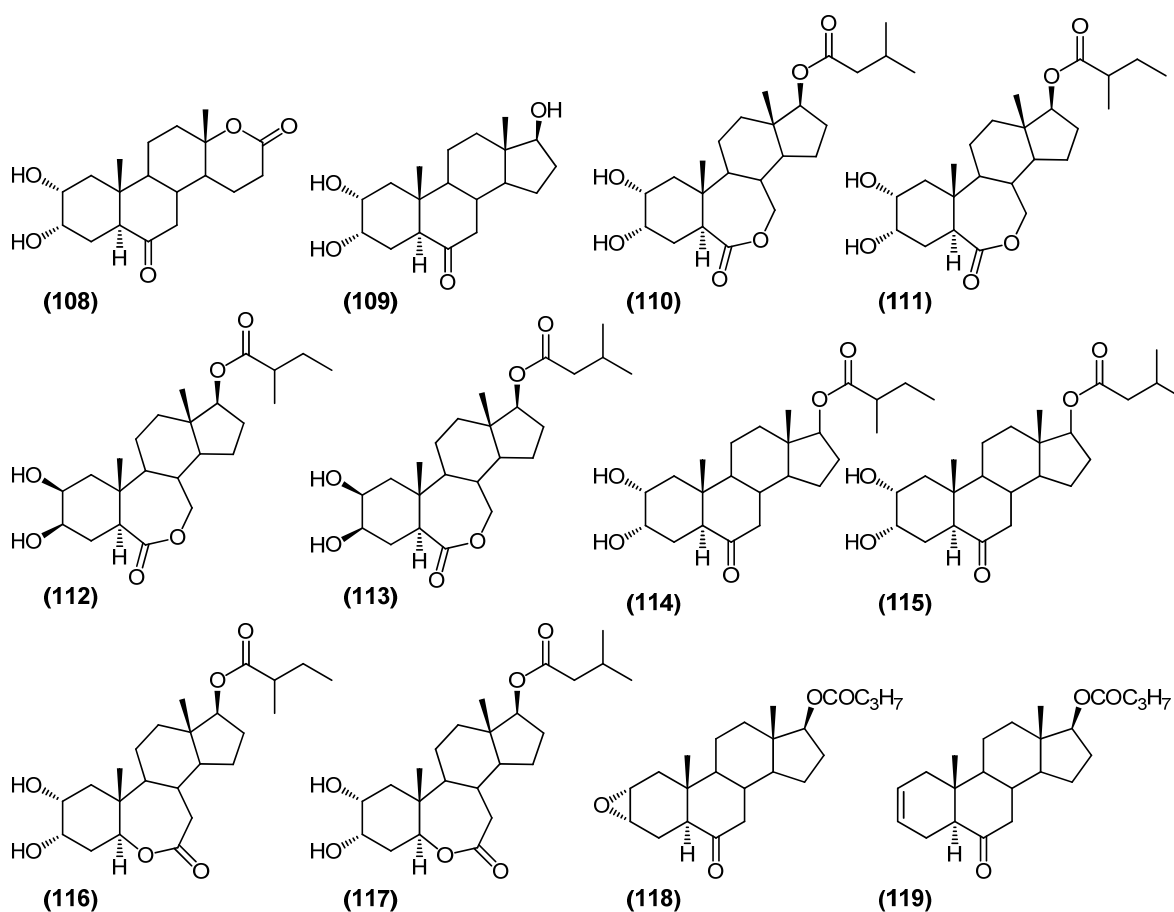
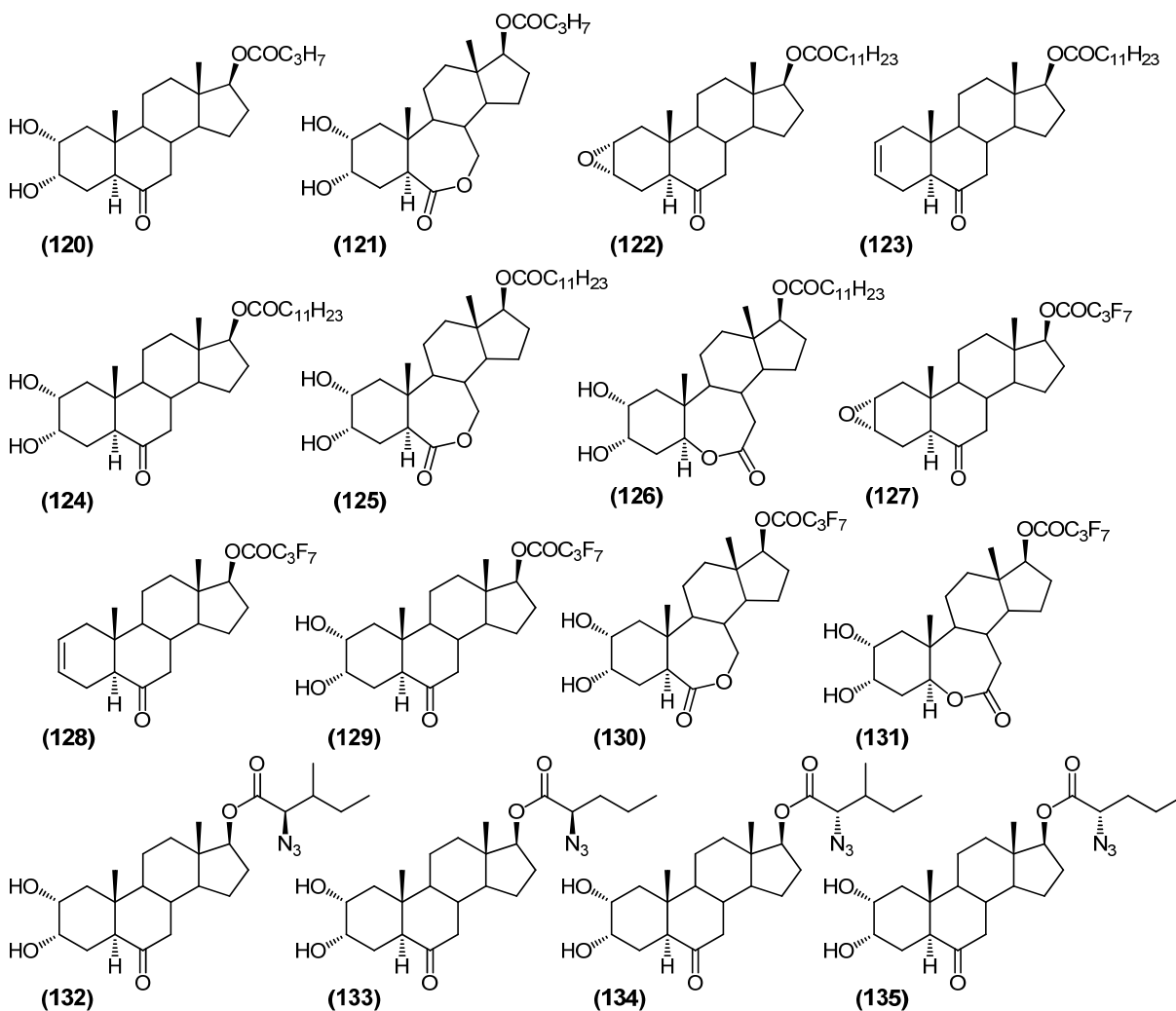


Figura 8. Análogos de BRs con núcleo de androstano.

Continuación de la Figura 8.....



Kohout y colaboradores han estudiado la síntesis y actividad biológica de varios análogos de tipo androstano, que han mostrado actividad menor o cercana a la 24-epibrasinólida (**29**). De los derivados con una lactona en el anillo D, el análogo **108** mostró un efecto retardador del crecimiento vegetal.⁶⁵⁻⁶⁶ También obtuvieron una serie de análogos de androstano con función éster en la posición C-17 que han inducido respuestas típicas de los BRs. Algunos de ellos además de estimular la elongación del segundo internodo del frijol como lo hizo el análogo **109** también indujeron la división (**110**) y el abultamiento (**111**) del mismo, efectos típicos de los BRs. Los análogos con grupos β hidroxilo en las posiciones C-2 y C-3 (**112**, **113**), un grupo 6-

cetona (**114, 115**) o un sistema 6-oxa-7-oxo lactona (**116, 117**) en el anillo B carecieron de la actividad como reguladores del crecimiento vegetal.^{67,68}

Adicionalmente, Šiša y colaboradores sintetizaron nuevos análogos de BRs con otros grupos ésteres en la posición C-17: con una cadena corta derivada de ácido butírico (**118, 119, 120, 121**), con una cadena larga derivada de ácido dodecanoico (**122, 123, 124, 125, 126**) y con una cadena fluorada derivada del ácido heptafluorobutírico (**127, 128, 129, 130, 131**). Sus actividades fueron evaluadas utilizando los bioensayos del SIF y la ILA. La lactona **125** y el epóxido **127** mostraron la mayor actividad en el bioensayo SIF, mientras que en el bioensayo de la ILA no se observó una marcada actividad de los compuestos sintetizados.⁶⁹ Estos resultados sugieren que la sustitución del grupo diol en la cadena lateral de los BRs por grupos ésteres puede mantener su actividad como reguladores del crecimiento vegetal.

Recientemente Hnilickova y colaboradores, describieron la síntesis y evaluación de la actividad biológica de ABRs con esqueleto de tipo androstano y un grupo azida en posición α al grupo éster en C-17. Los compuestos con la agrupación azida en la posición C-22 y configuración *R* (**132, 133**) mostraron mayor actividad que sus isómeros correspondientes (**134, 135**) en el bioensayo de la ILA, mientras que en el bioensayo del SIF todos mostraron débiles propiedades como estimuladores del crecimiento vegetal.⁷⁰

Por otra parte, se han obtenido ABRs con esqueleto de tipo pregnano que han mostrado diferentes respuestas como promotores del crecimiento vegetal (Figura 9). Kohout y colaboradores han descrito la síntesis de varios análogos de este tipo cuya actividad ha sido evaluada utilizando el bioensayo del SIF. Entre los compuestos de tipo 6-oxo los derivados más activos fueron **136, 137, 138, 139, 140, 141, 142** mostrando mayor actividad el compuesto **139** con la agrupación éster en la posición C-20 y 4 átomos de carbono en la cadena lateral, mientras que entre los compuestos de tipo 7-oxalactona los derivados que mostraron mayor actividad fueron **143 y 144**. Para la sorpresa de los autores, el derivado **145** retardó el crecimiento vegetal en todas las dosis aplicadas.^{65,71,72}

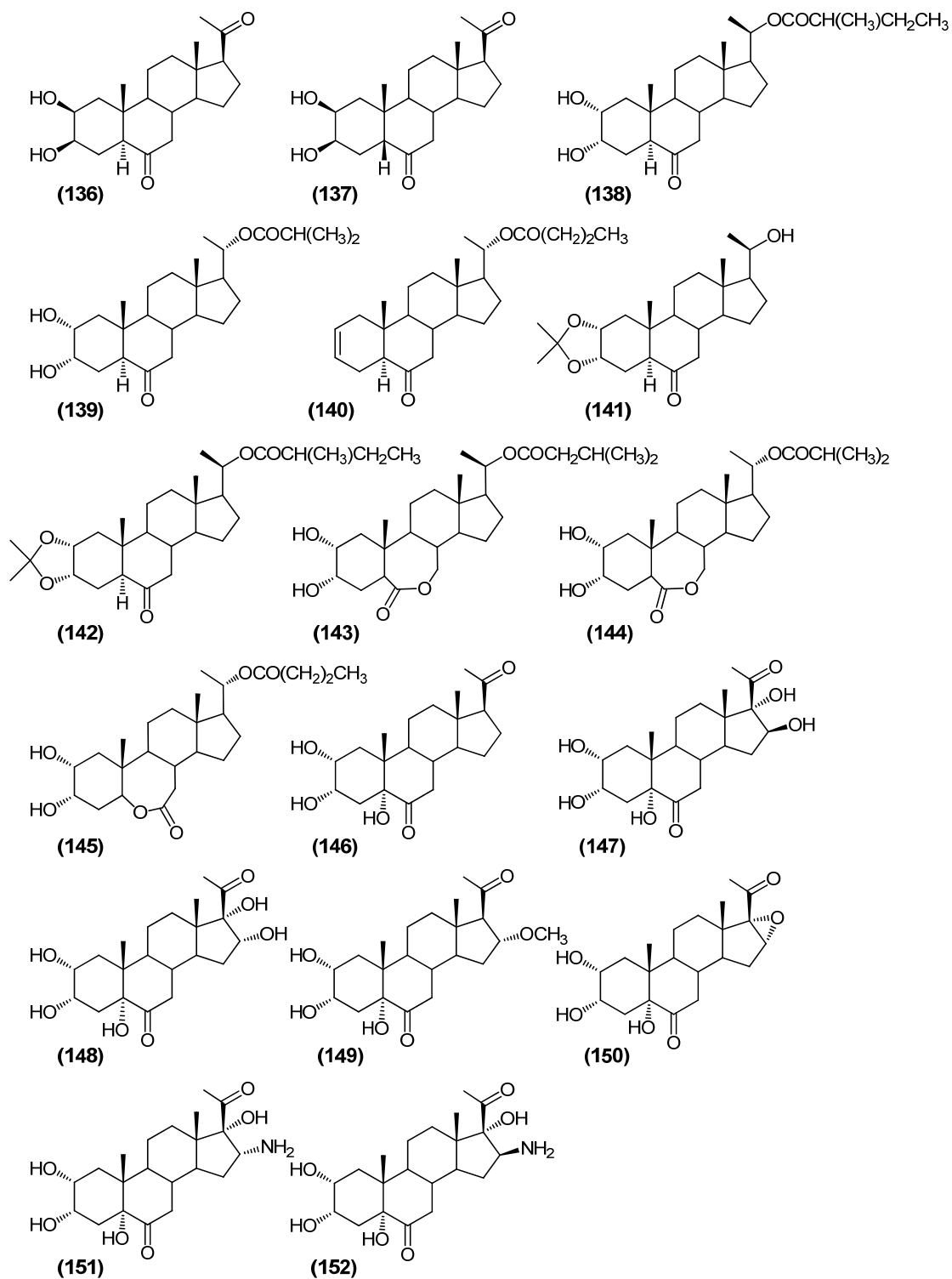


Figura 9. Análogos de BRs con núcleo de pregnano.

Adicionalmente Rivera y Coll describieron la síntesis de siete análogos de BRs con cadena lateral de pregnano y funcionalidades diferentes a la de los BRs en los anillos A, B y D (**146-152**). La actividad de los mismos fue evaluada utilizando los bioensayos de la LHR y el PCR. Todos los compuestos funcionalizados en el anillo D fueron más activos que el compuesto **146** sin funcionalizar en dicho anillo. El compuesto **147** con la función $16\beta,17\alpha$ -diol resultó ser el más activo en el bioensayo de la LHR. Los derivados con grupos hidroxilos en el anillo D (**147** y **148**) fueron más activos que los derivados con grupo metoxilo (**149**), epóxido (**150**) y 16-amino-17-hidroxilo (**151** y **152**). Todos estos compuestos excepto el derivado epóxido **150** mostraron mayor actividad en el bioensayo de la LHR que en el bioensayo del PCR. Los análogos de pregnanos 16β funcionalizados fueron ligeramente más activos que los 16α funcionalizados.⁷³

También se han sintetizado compuestos con esqueleto de colestano y bisnorcolano que han sido evaluados utilizando el bioensayo del SIF. Entre los compuestos de tipo colestano mostrados en la figura 10 se observó mayor actividad en los análogos con la agrupación $3\alpha,4\alpha$ -diol (**153**, **154**, **155**) que en los que presentaban la agrupación $2\alpha,3\alpha$ -diol (**156**, **157**, **158**, **159**, **160**, **161**, **162**), mientras que entre estos últimos la mayor actividad la mostró el análogo **156**. La contradicción de los resultados respecto a los requerimientos estructurales establecidos en muchas publicaciones previas, para una buena actividad reguladora del crecimiento vegetal, puede deberse a la torsión y distorsión del anillo B de siete u ocho miembros, así como a la posición del grupo carbonilo respecto al diol presente en el anillo A.^{74,75}

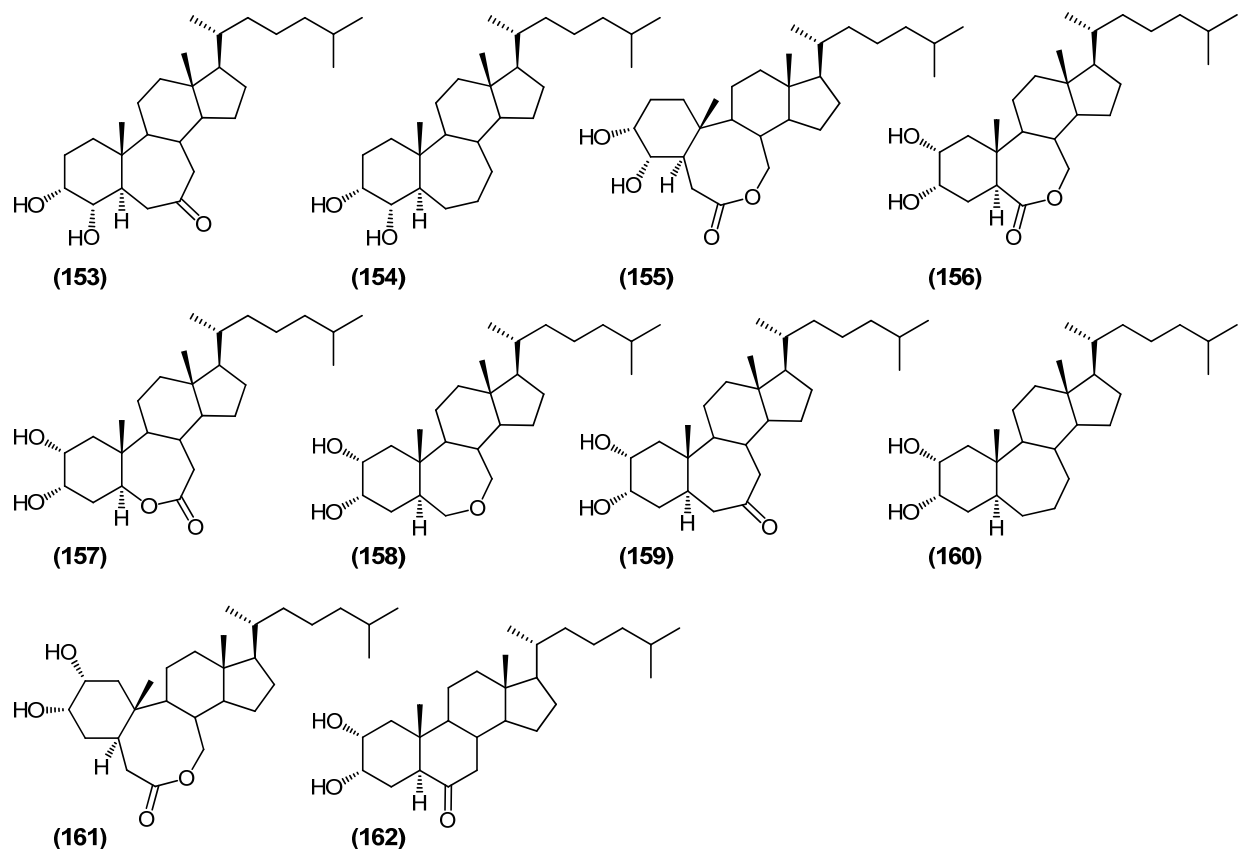


Figura 10. Análogos de BRs con núcleo de colestano.

Por su parte, los derivados de tipo bisnorcolano mostrados en la figura 11 fueron evaluados utilizando los bioensayos del PIF y el SIF, donde se observó la elevada actividad del ácido libre **(163)** en ambos biensayos y la disminución de la actividad de los ésteres **(164, 165)** y amidas **(166-169)**.⁷⁶

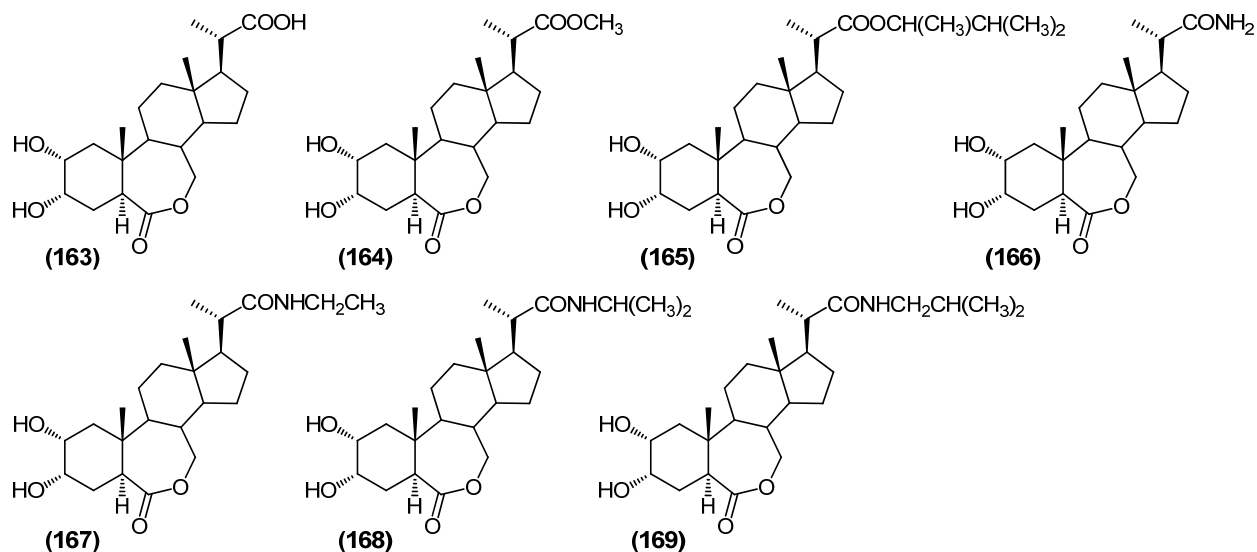


Figura 11. Análogos de BRs con núcleo de tipo bisnorcolano.

2.5.3.2 Análogos de brasinoesteroides con cadena lateral de tipo espiroestánica.

En varios artículos se ha informado la síntesis de análogos espiroestánicos de BRs que han mostrado actividad promotora del crecimiento vegetal. Las estructuras de algunos de los compuestos obtenidos se muestran en la figura 12. Las rutas de síntesis involucradas utilizan como materia prima sapogeninas esteroidales comercialmente disponibles que presentan adecuados grupos funcionales en el núcleo esteroidal para preparar los correspondientes análogos.⁷⁷⁻⁷⁸

Entre los derivados sintetizados los compuestos que mostraron mayor actividad en el bioensayo de la ILA fueron los de tipo 6-ceto (**170**, **171**) y 7-oxalactona (**172**, **173**) y entre estos compuestos los portadores de la agrupación 3 α -hidroxi (**171** y **173**) mostraron mayor actividad que los que presentan el sistema 2 α ,3 α -diol (**170** y **172**). La introducción de un grupo hidroxilo en C-12 (**174**) del compuesto de tipo 7-oxalactona portador del sistema 2 α ,3 α -diol, disminuyó la respuesta del compuesto original mientras que los análogos 6-desoxo (**175**, **176** y **177**) fueron inactivos.⁷⁷ Los análogos con la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo (**178**, **179** y **180**) fueron evaluados utilizando los bioensayos de la LHR y el PCR donde el epóxido **178** mostró actividad promotora del crecimiento vegetal mientras que el derivado metoxilado **179** mostró ser fitotóxico. El triol **180** no mostró actividad a las concentraciones utilizadas.⁷⁸ Estos resultados nos llevan a pensar

que la cadena lateral de tipo espirocetálica es capaz de sustituir parcialmente el sistema 22,23-diol en los análogos de BRs sin que pierdan sus propiedades como estimuladores del crecimiento vegetal.

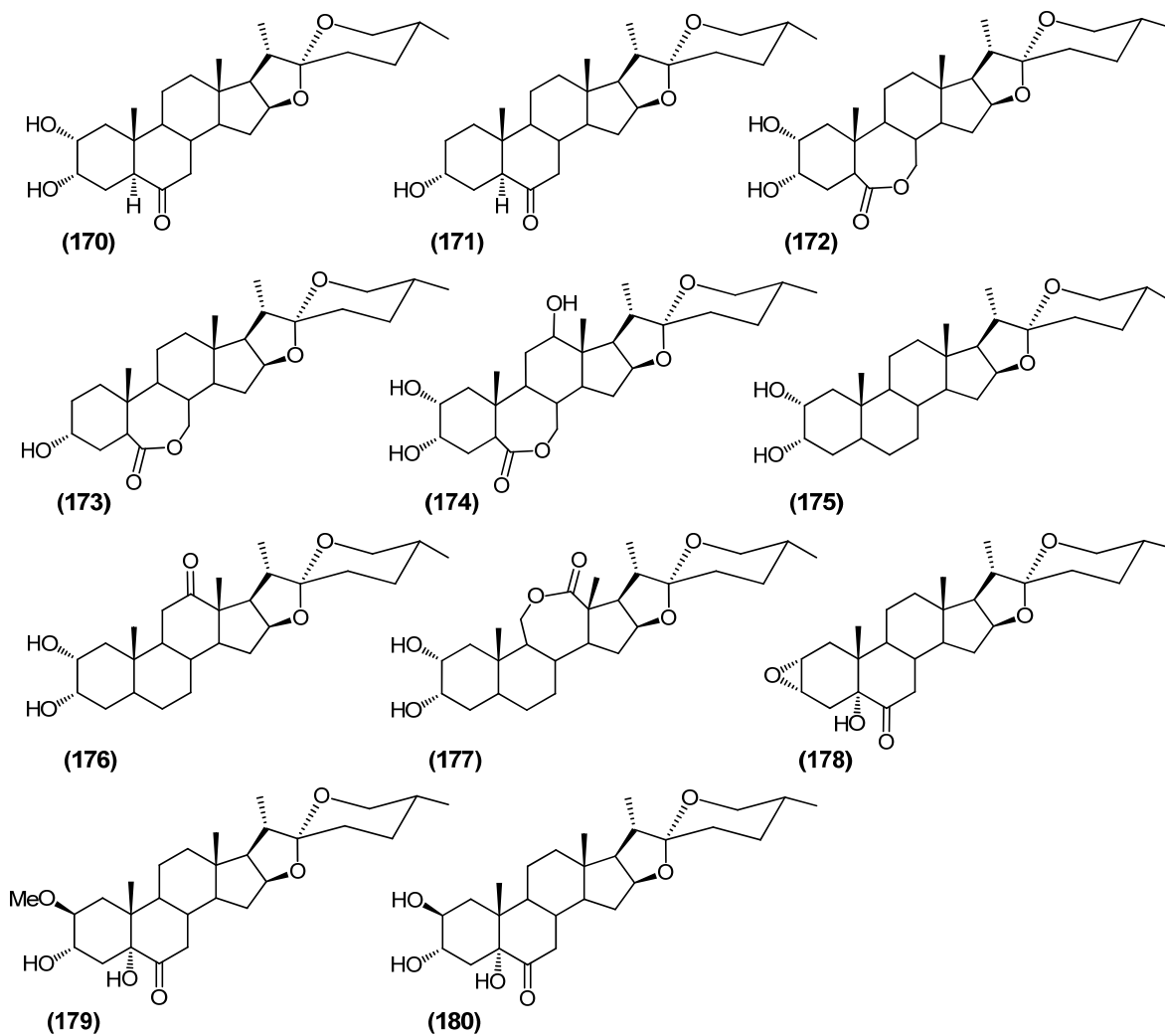


Figura 12. Análogos de BRs espiroestánicos.

Adicionalmente se han publicado compuestos bioactivos con esqueleto de tipo esteroídicos, con funciones oxigenadas en la posición C-23. En la figura 13 se muestran las estructuras de algunos de los compuestos obtenidos.⁷⁹⁻⁸⁰ Los compuestos esteroídicos funcionalizados en C-23 (181 y 182), mostraron mayor actividad estimuladora del crecimiento vegetal en los bioensayos de la LHR y el PCR. La actividad de los compuestos aumentó al aumentar la concentración de los mismos. Los resultados observados sugieren que la introducción de funciones oxigenadas en la posición C-23 produce aumento en la actividad biológica.^{3c,81}

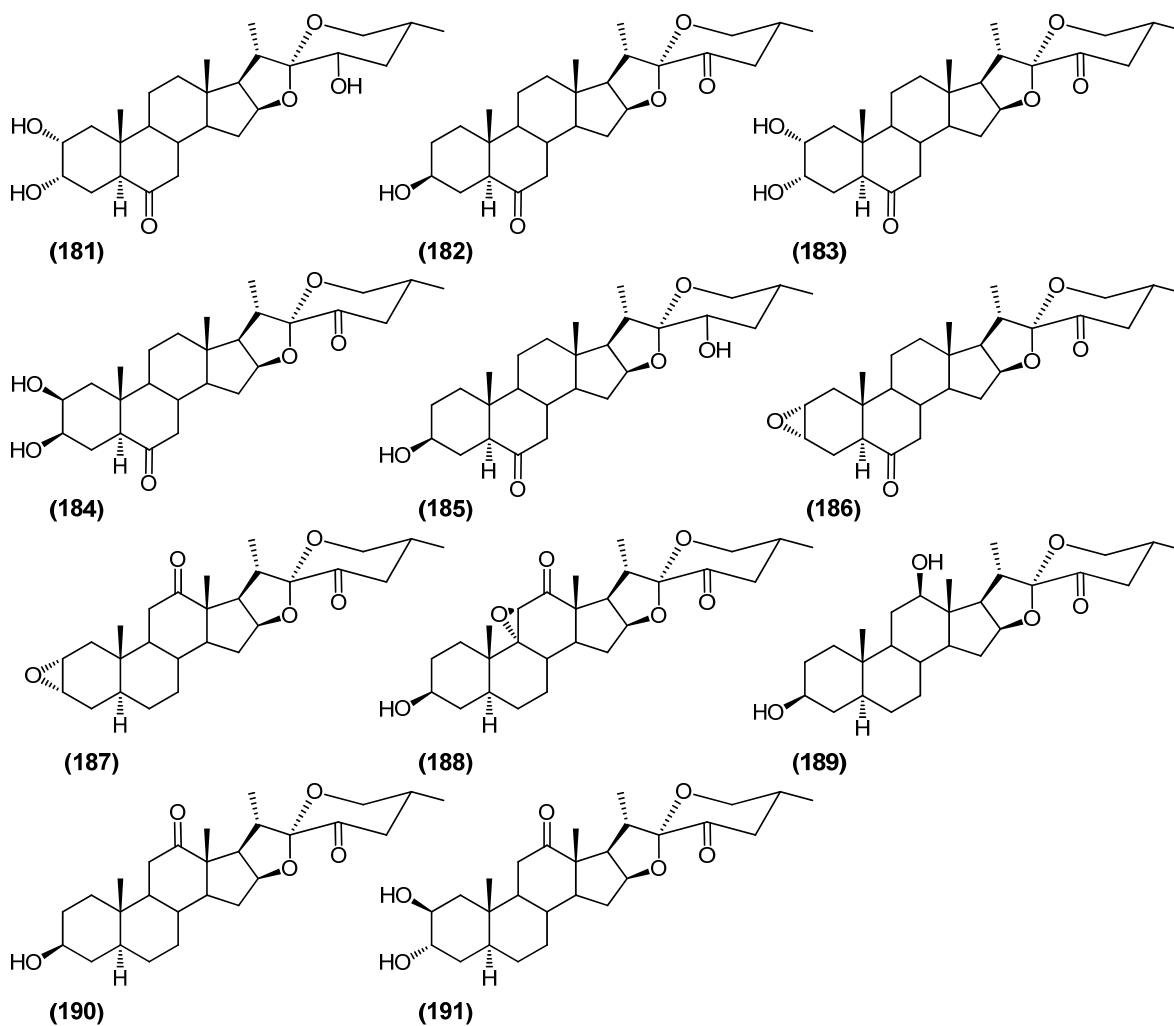


Figura 13. Análogos de BRs esteroídicos con funciones oxigenadas en C-23.

2.5.3.3 Análogos de brasinoesteroides con cadena lateral de tipo furostánica

Por otra parte, se han obtenido análogos bioactivos con esqueleto de tipo furostánico. La figura 14 muestra algunos de los análogos obtenidos. El análogo furostánico **192** mostró elevada actividad promotora del crecimiento vegetal en el bioensayo de germinación de Mandarina Cleopatra, mientras que el furostano **193** estimuló el crecimiento vegetal en semillas de naranja y en los bioensayos del Rábano.⁸¹⁻⁸² Adicionalmente, el análogo **194** fue fitotóxico en el bioensayo de la ILA, mientras que el análogo **195** produjo estimulación del crecimiento vegetal en el bioensayo del SIF.^{4b,83}

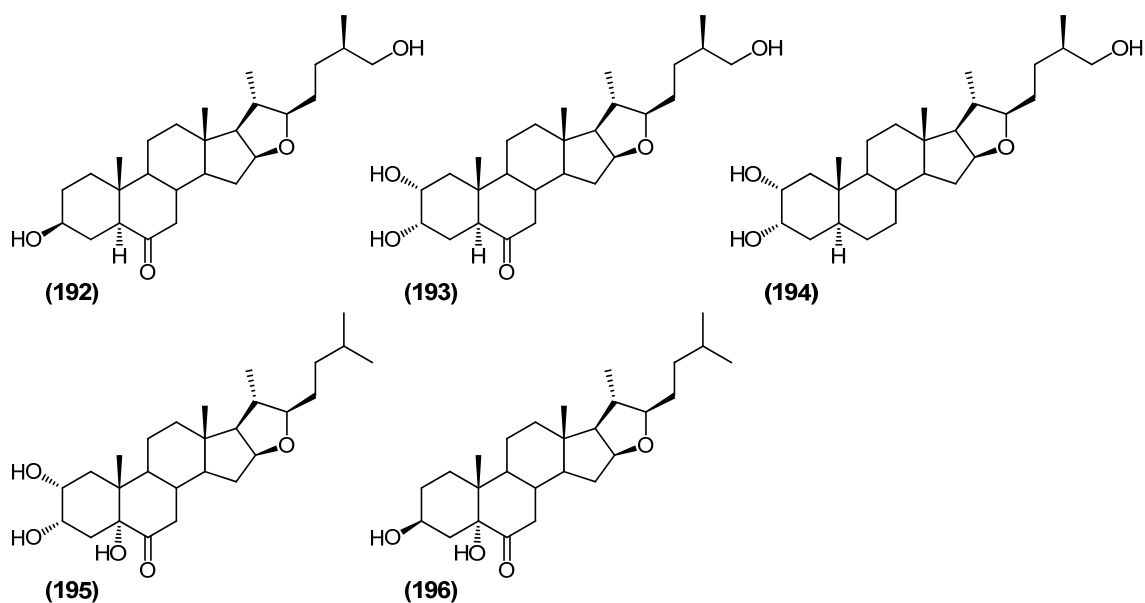
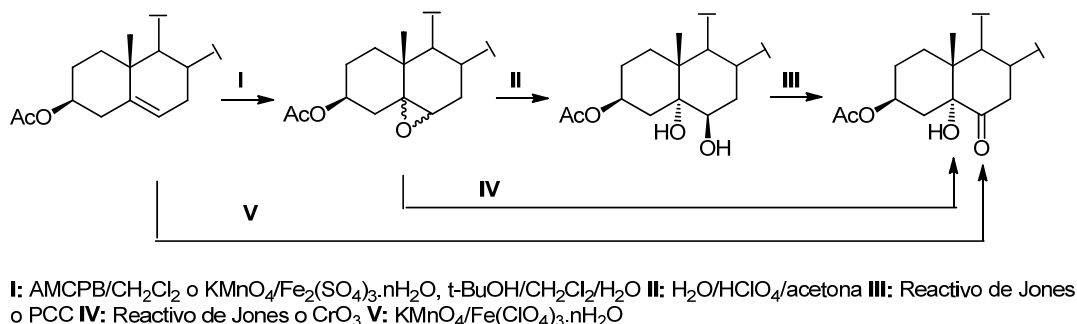


Figura 14. Análogos de BRs con cadenas laterales furostánicas.

2.6. Métodos para la introducción de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo a partir de 3 β -acetoxi- Δ^5 esteroides.

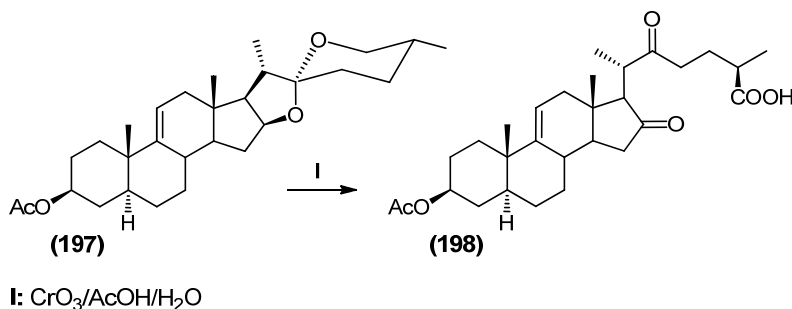
Los esteroides con la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo han servido como intermediarios en la síntesis de diferentes compuestos bioactivos como reguladores del crecimiento vegetal,^{60,4a} antagonistas de ecdisteroides,⁸⁴ inhibidores de 5 α -reductasa^{85,86} y antagonistas de los receptores de andrógeno⁸⁷ entre otros. En general los procedimientos empleados para preparar estos compuestos parten de 3 β -hidroxi- Δ^5 -esteroides e involucran la oxidación de 5,6-dioles (**III**)^{60,84} o

la apertura oxidativa de 5 ξ ,6 ξ -epóxido por el tratamiento con reactivo de Jones o CrO₃ (IV)^{4a,86} (Esquema 4).



Esquema 4. Metodologías para la introducción de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo.

Las condiciones ácidas utilizadas en la apertura oxidativa e hidrolítica de epóxidos o en la oxidación de dioles con reactivo de Jones, pueden afectar algunos esteroides que presenten cadenas laterales lábiles. Barton informó que el tratamiento de sapogeninas esteroidales con CrO₃ en ácido acético, produjo la apertura oxidativa de la cadena lateral espiroestánica (Esquema 5).⁸⁸



Esquema 5. Apertura oxidativa de la cadena lateral espiroestánica en medio ácido.

Son pocos los procedimientos descritos para la síntesis directa de cetoes a partir de olefinas esteroidales. Entre ellos se incluyen la oxidación de esteroides insaturados con RuO₄ en acetona/H₂O (se producen mezclas de la α -hidroxicetona con el producto dihidroxilado y en algunos casos el producto de la ruptura del doble enlace),⁸⁹⁻⁹⁰ la oxidación de olefinas esteroidales con ácido peroxiacético utilizando RuCl₃ como catalizador,⁹¹ la oxidación de las

mismas con el reactivo de Milas ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{ter-BuOH}$) y OsO_4 como catalizador⁹² y la oxidación de esteroides insaturados con NBS en acetona acuosa.⁹³ Adicionalmente, Salvador y colaboradores informaron que el tratamiento de diferentes 3β -acetoxi- Δ^5 -esteroides (de las series de androstano, pregnano y colestano) con $\text{KMnO}_4/\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ produjo los correspondientes 3β -acetoxi- 5α -hidroxi-6-oxo esteroides con rendimientos entre 70 y 81% (Esquema 4 V).⁹⁴ La toxicidad de los compuestos de rutenio y osmio, así como el riesgo relacionado con la naturaleza explosiva del $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ y el bajo rendimiento al emplear NBS, hacen a estos métodos poco prácticos para la preparación de grandes cantidades de cetoes.

La necesidad de disponer de grandes cantidades de análogos de brasinoesteroides para su aplicación en la agricultura, justifica la búsqueda continua de candidatos cuyas síntesis sean económicamente viables.

El hecho de que los compuestos con la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo hayan mostrado elevada actividad promotora del crecimiento vegetal, y que además sean más fáciles de preparar que los derivados 6-ceto o los 7-oxalactónicos, justifica la exploración detallada de la actividad biológica de series de estos compuestos portadores de diferentes cadenas laterales, en búsqueda de candidatos para su aplicación masiva en la agricultura.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Obtención de ABRs portadores de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo y diversas cadenas laterales, portadoras o no de grupos funcionales oxigenados, mediante el empleo de métodos simples.

3.1.1. Objetivos específicos.

- Modificación de la cadena lateral de diferentes esteroides, para obtener ABRs con cadena lateral de tipo 23-oxo espirostánica, 23-hidroxi espirostánica, dinorcolánica, 16 β ,22:22,25-diepoxicolestano y furostánica 26-hidroxilada.
- Modificación de los anillos A y B en esteroides portadores de la agrupación 3 β -acetoxi- Δ^5 , para la obtención de ABRs portadores de las agrupaciones 3 β ,5 α -dihidroxi-6-oxo y 2 α ,3 α ,5 α -trihidroxi-6-oxo.

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Debido a la actividad biológica mostrada por una serie de análogos de brasinoesteroides que presentan o no funciones oxigenadas en su cadena lateral (Figura 8-11) y modificaciones en los anillos A/B, como la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo (Figura 6), nos propusimos preparar análogos de brasinoesteroides portadores de dicha agrupación con diferentes cadenas laterales, utilizando esteroides y reactivos baratos y de mayor disponibilidad. Esto nos pareció importante pues la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo es más fácil de introducir que la 7-oxa-lactona, la cual caracteriza a los compuestos naturales más activos, lo que debe permitir prepararlos por rutas más cortas.

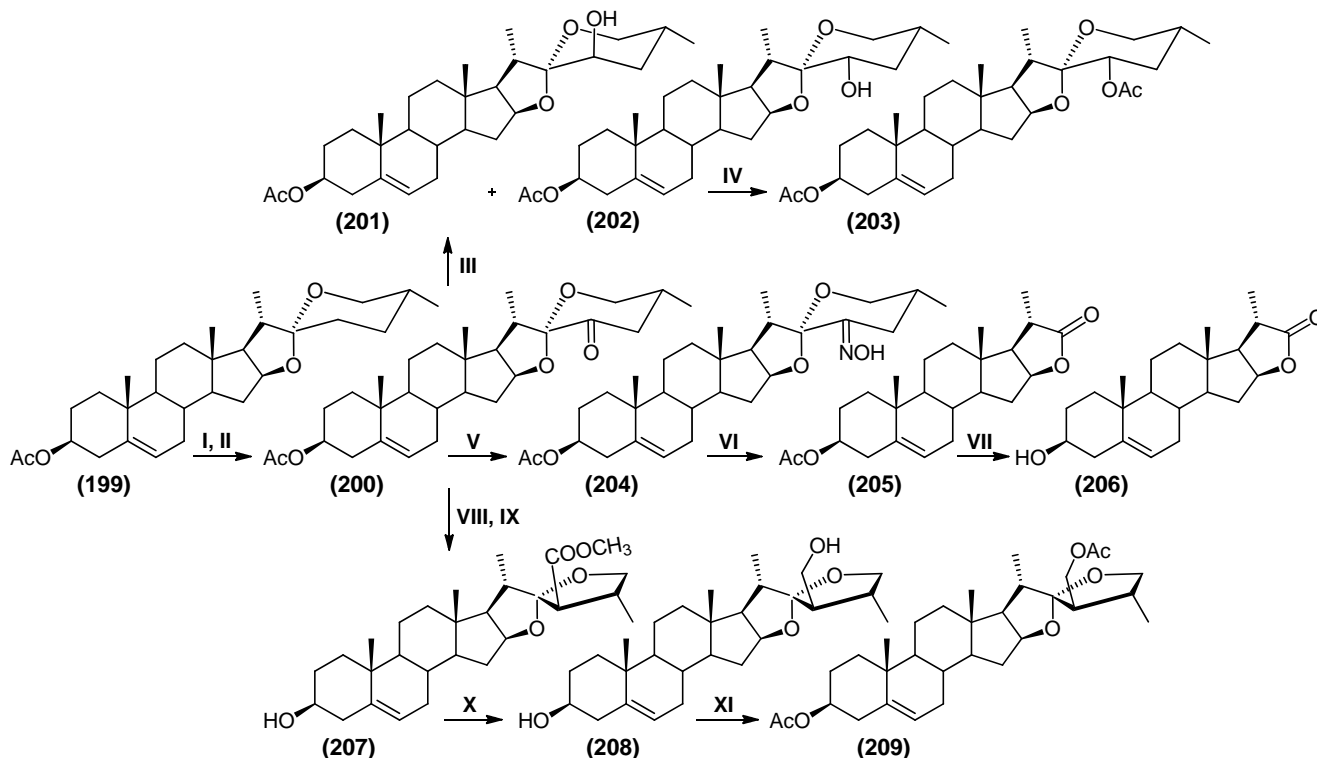
Por otra parte, teniendo en cuenta la influencia que ejercen las funciones oxigenadas, en las posiciones C-22 y C-23 de la cadena lateral de los brasinoesteroides en su actividad biológica, se decidió llevar a cabo transformaciones en la cadena lateral del acetato de la sapogenina esteroideal diosgenina (**199**), para la introducción de los grupos carbonílico y alcohólico en la posición C-23, así como, para producir cadenas laterales de tipo bisnorcolano y $16\beta,22:22,25$ -diepoxicolestano.

Además, la actividad biológica mostrada por análogos de brasinoesteroides con cadena lateral de tipo furostánica (Figura 14), nos condujo a realizar la apertura del anillo F del acetato de diosgenina (**199**), para preparar análogos de brasinoesteroides furostánicos 26-hidroxilados.

Los compuestos obtenidos en este trabajo pueden ser clasificados según el tipo de cadena lateral presente en ellos como análogos de androstano, pregnano, bisnorcolano, colestano, espirostando, 23-oxo espirostando, 23-hidroxi espirostando, 26-hidroxi furostando y $16\beta,22:22,25$ -diepoxi dinorcolestano.

4.1. Síntesis de las cadenas laterales.

La síntesis de las cadenas laterales de tipo 23-oxo espirostanos, 23-hidroxi espirostanos, bisnorcolanos y 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano se llevó a cabo utilizando acetato de diosgenina (**199**) como materia prima (Esquema 6).

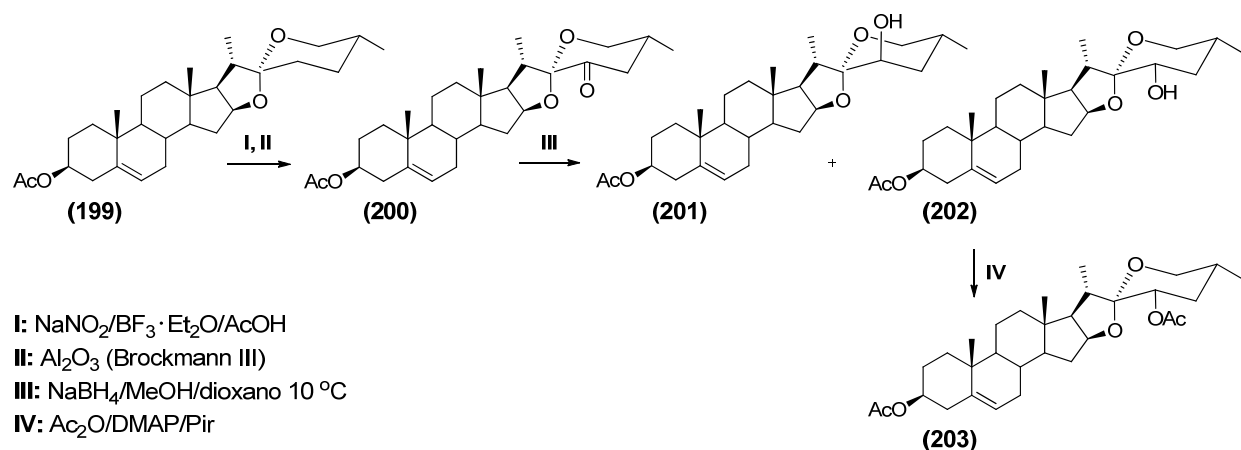


I: $\text{NaNO}_2/\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{AcOH}$ II: Al_2O_3 (Brockmann III) III: $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}/\text{dioxano}$ 10°C IV: $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pir}$ V: $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}/\text{NaAcO}/\text{EtOH}$ Δ VI: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{AcOH}$ 60°C VII: $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ 45°C VIII: KOH/MeOH IX: DIB X: $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$ Δ XI: $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMAP}/\text{Pir}$

Esquema 6. Síntesis de las cadenas laterales de tipo 23-oxo espirostanos, 23-hidroxi espirostanos, bisnorcolanos y 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano a partir de acetato de diosgenina.

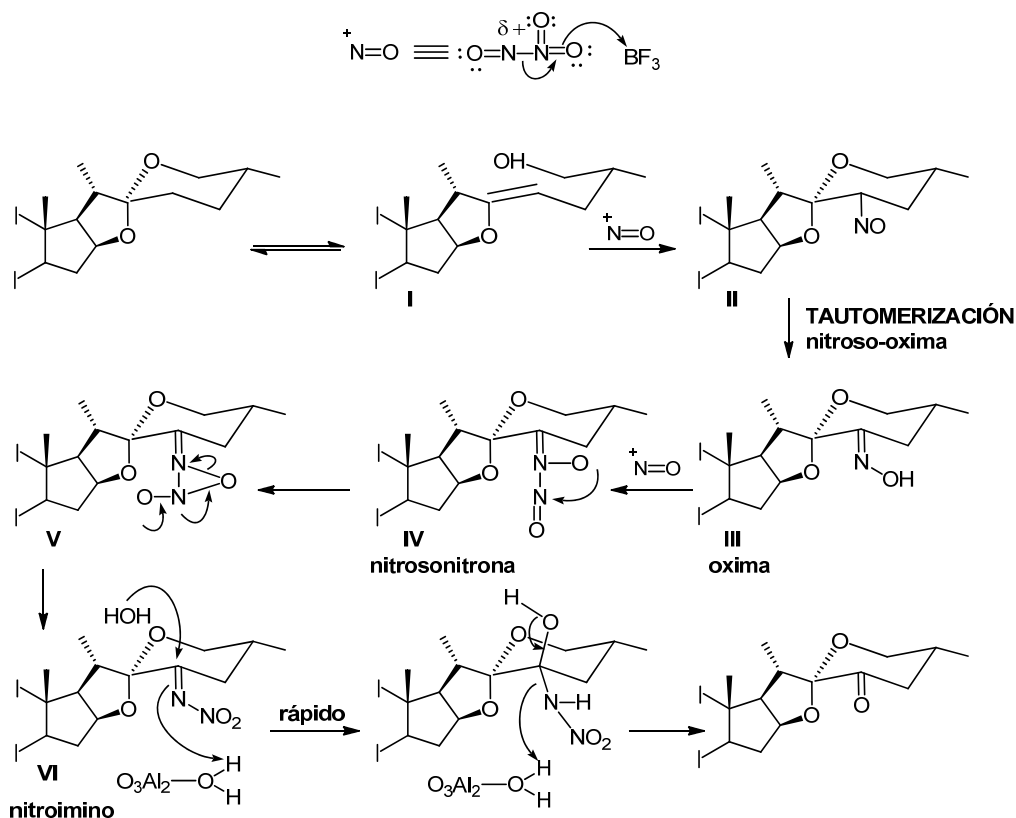
4.1.1. Obtención de cadenas laterales de tipo 23-oxo y 23-hidroxi espirostanos.

El acetato de diosgenina (**199**) fue transformado en el acetato de 23-oxidiosgenina (**200**) con un 35 % de rendimiento, por medio del método de Barton el cual ha sido utilizado previamente por nuestro grupo de investigación (Esquema 7).^{80, 88}



Esquema 7. Procedimiento de síntesis seguido para la obtención de las cadenas laterales de tipo 23-oxo y 23-hidroxi espirostando.

Recientemente se ha informado el estudio del mecanismo de dicha reacción donde se plantea que el tratamiento de la sapogenina esteroideal, en ácido acético con eterato de trifluoruro de boro y nitrito de sodio produce la 23-hidroxiiminosapogenina (III), la cual experimenta de manera competitiva por un lado un reordenamiento anormal de Beckman para producir la lactona dinorcolánica, y por otro un reordenamiento nitrosación/nitrosnitrona para producir la 23-nitroiminosapogenina (VI). La hidrólisis de VI produce el derivado 23-oxosapogenina en bajo rendimiento, debido a la competencia entre los dos procesos (Esquema 8).¹⁰⁷



Esquema 8. Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo 23-oxodiosgenina.

El control cromatográfico durante la reacción evidenció la presencia de la lactona dinorcolánica, que fue separada del producto deseado utilizando cromatografía en columna.

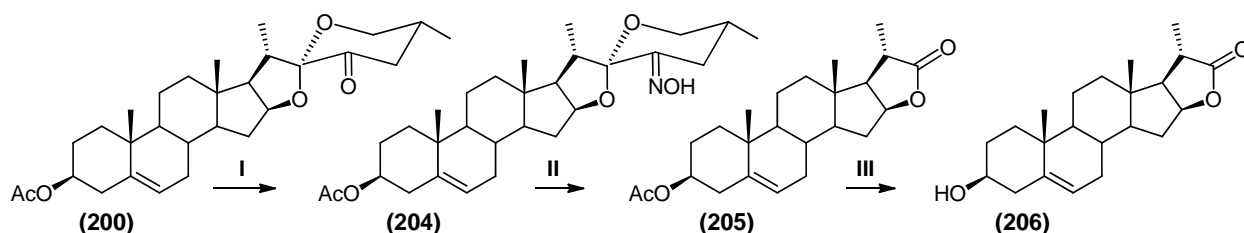
La reducción de la cetona **200** utilizando borohidruro de sodio en metanol a $10\text{ }^\circ\text{C}$ produjo la mezcla de los 3-monoacetatos de las 23*R*- y 23*S*-hidroxi diosgeninas **201** y **202**, los cuales fueron separados utilizando cromatografía en columna para producir 5 % del alcohol axial **201** y 80 % del alcohol ecuatorial **202**. Finalmente, la acetilación de **202** con anhídrido acético en piridina produjo el compuesto diacetilado **203** en 27 % de rendimiento a partir del acetato de diosgenina (**199**).

Estudios realizados por diferentes investigadores sobre la reducción de cetonas esteroideas utilizando hidruros metálicos y en particular borohidruro de sodio, han mostrado la influencia que ejercen los factores estéricos en la reacción. Esto es especialmente importante cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de disolventes alcohólicos, capaces de sustituir hidruros por alcóxidos para dar lugar a alcóxidos de boro de gran volumen.¹⁰⁸

El mayor rendimiento del alcohol ecuatorial 23*S* sobre el alcohol axial 23*R*, puede justificarse por el impedimento estérico que ejercen los hidrógenos α (axiales) en C-24 y C-26, así como la cercanía del átomo de oxígeno integrante del puente etéreo entre C-16 y C-22, que limitan el acercamiento del reductor por la cara α de la función carbonílica, quedando reprimida la producción del isómero 23*R* (axial).

4.1.2. Obtención de la cadena lateral de tipo dinorcolano.

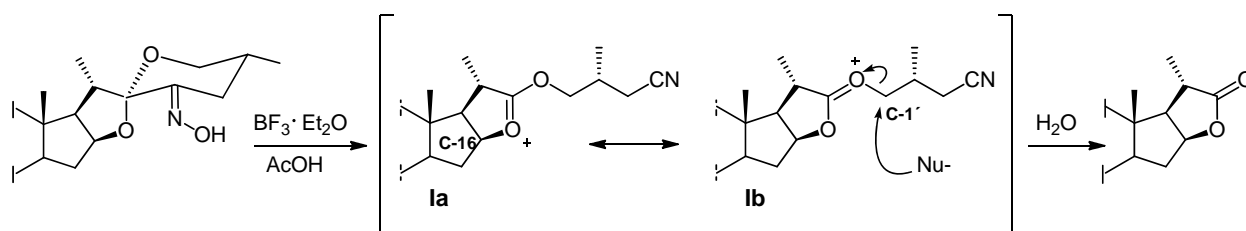
El tratamiento del acetato de 23-oxodiosgenina (**200**) con clorhidrato de hidroxilamina y acetato de sodio en etanol a reflujo, produjo la oxima **204** la cual fue convertida en acetato de vespertilina (**205**) en 93 % de rendimiento mediante la transposición de Beckmann, inducida con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a 60 °C y en 150 min (menor tiempo de reacción que el reportado).¹⁰⁹ La metanólisis de **205** produjo la vespertilina (**206**), la cual fue previamente obtenida por Mola y colaboradores a partir de solasodina, siguiendo el protocolo descrito por Sato e Ikekawa en los años 60 (Esquema 9).^{97, 110}



I: $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl} / \text{NaAcO} / \text{EtOH}$, Δ II: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O} / \text{AcOH}$, 60 °C III: $\text{K}_2\text{CO}_3 / \text{MeOH}$, 45 °C

Esquema 9. Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de la cadena lateral de tipo dinorcolano.

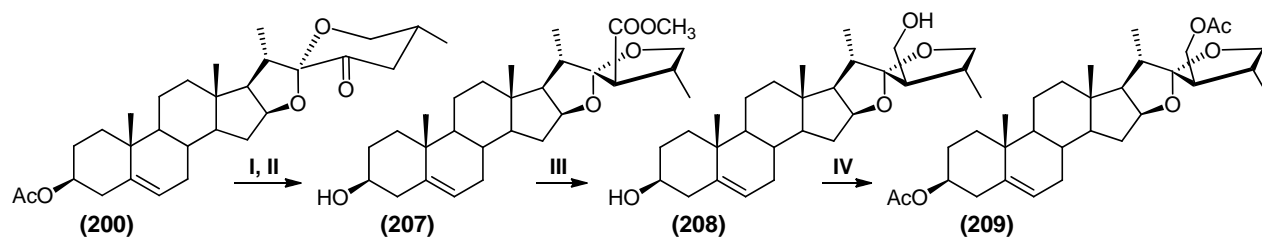
Estudios realizados recientemente por nuestro grupo de trabajo acerca de la transposición de Beckmann de la 23-hidroxiiminosapogenina, inducida con eterato de trifluoruro de boro, han conducido a la propuesta de un mecanismo de reacción, donde se indica que el ataque de un nucleófilo voluminoso (ácido acético) por la cara α del C-16 en el catión oxonio **Ia** puede estar impedida, favoreciendo el ataque del mismo al carbono C-1' en el catión oxonio **Ib**, lo cual justifica la formación del acetato de vespertilina como único producto de reacción (Esquema 10).^{95, 109}



Esquema 10. Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo dinorcolano.

4.1.3. Obtención de la cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano.

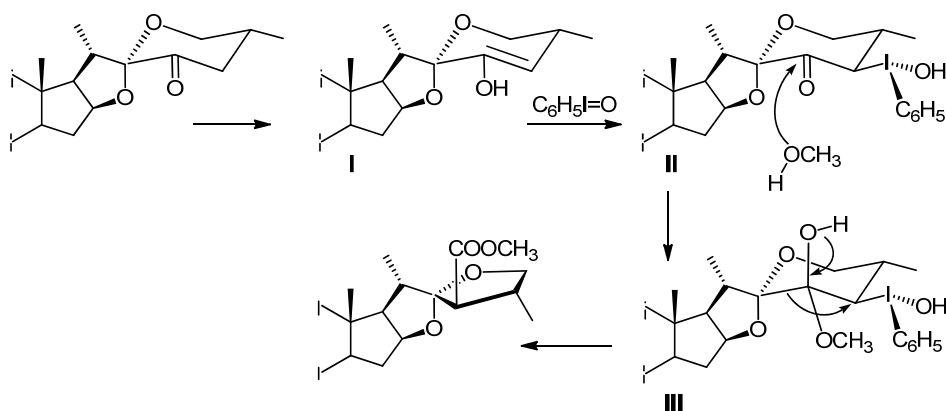
El acetato de 23-oxodiosgenina (**200**) también fue utilizado para producir el furoespiroetano **207** mediante el reordenamiento de Favorskii inducido con DIB en KOH/MeOH, el cual fue convertido en el diol diacetilado **209** por reducción con LiAlH₄ en THF a reflujo, seguido de acetilación con Ac₂O en piridina (Esquema 11).



I: KOH/MeOH II: DIB III: LiAlH₄/THF Δ IV: Ac₂O/DMAP/Pir

Esquema 11. Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de la cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano.

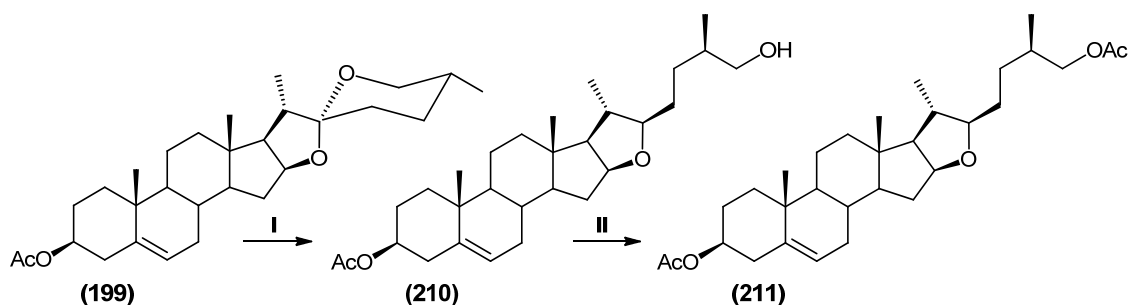
La contracción del anillo F de una 23-oxosapogenina mediante el reordenamiento de Favorskii inducido con diacetoxiyodobenceno en KOH/MeOH, ha sido descrito previamente por nuestro grupo, donde se ha propuesto un mecanismo que involucra el acercamiento por la cara β del yodosobenceno (generado por la acción del KOH sobre el diacetoxiyodobenceno) al enol **I**, para formar la cetona yodada **II**, a la cual se le adiciona un grupo metoxilo al carbonilo de C-23 para producir el hemicetal **III**. La disposición antiperiplanar de los enlaces C22–C23 y C24–I, favorece la migración de C-22, produciendo el reordenamiento de Favorskii que resulta en la contracción del anillo F y la generación de un nuevo centro estereogénico en C-23 (Esquema 12).¹¹¹



Esquema 12. Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxicolestano.

4.1.4. Obtención de la cadena lateral de tipo furostano.

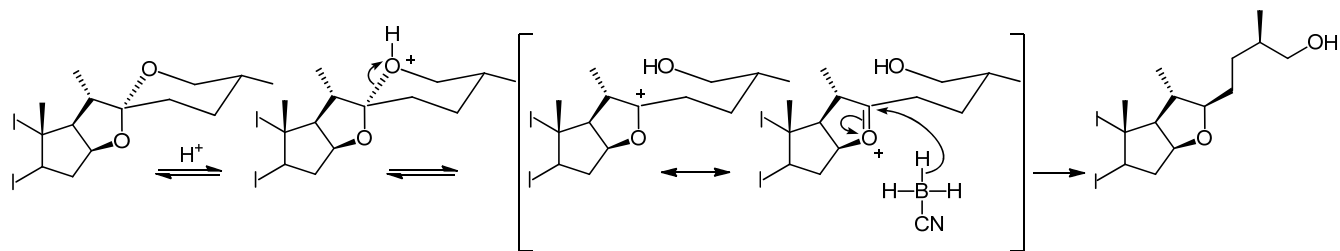
La síntesis de la cadena lateral de tipo furostano se llevó a cabo utilizando acetato de diosgenina (**199**) como materia prima (Esquema 13). El tratamiento de acetato de diosgenina (**199**) con $NaBH_3CN$ en ácido acético y diclorometano durante 24h, produce el furostenol monoacetilado **210**, el cual fue acetilado con Ac_2O en piridina, para producir el furostanol diacetilado **211** en 62 % de rendimiento a partir del acetato de diosgenina (**199**).



I: $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{AcOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ II: $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMAP}/\text{Pir}$

Esquema 13. Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de la cadena lateral de tipo furostano.

Se conoce que la reacción de apertura reductiva del anillo F, en sapogeninas esteroidales, genera esqueletos furostánicos con configuración 22R.^{83, 112} Este resultado puede explicarse a partir del hecho conocido de que en medio ácido, las sapogeninas esteroidales experimentan un proceso de tautomerismo que implica la apertura reversible del anillo F. La inserción de un hidruro al ión oxonio por la cara α , justifica la formación del derivado furostánico 22R (Esquema 14).

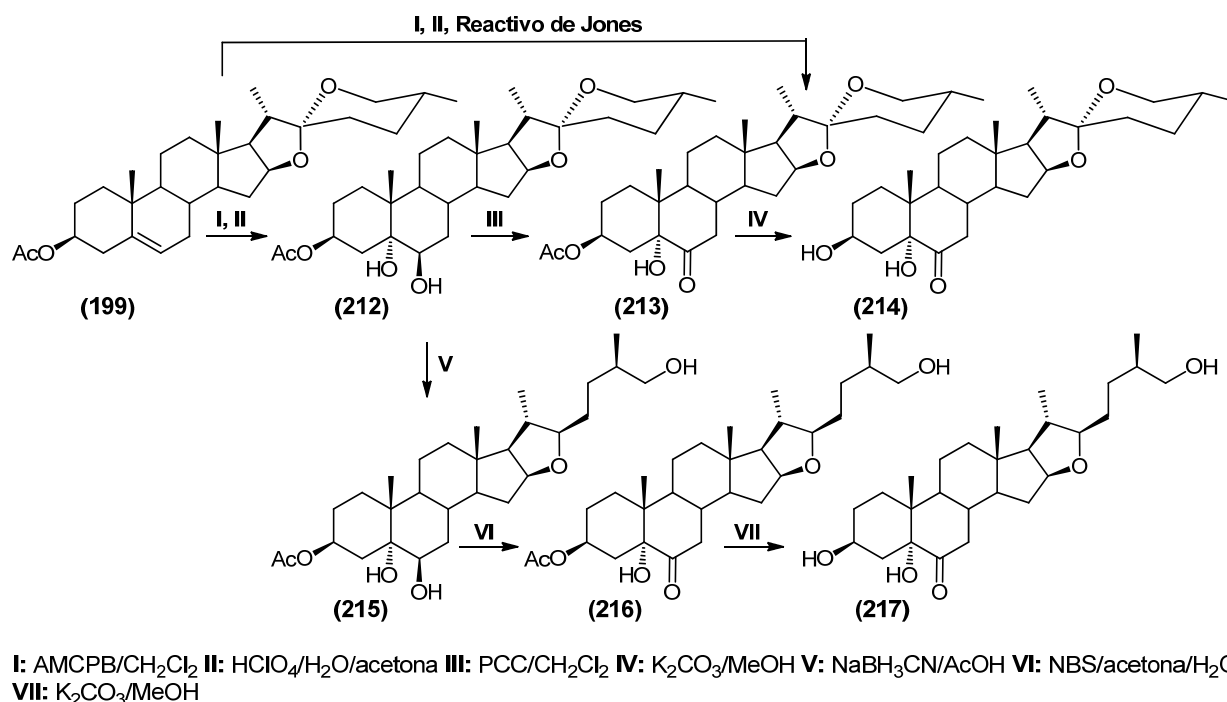


Esquema 14. Mecanismo propuesto para obtener la cadena lateral de tipo furostánica.

4.2. Funcionalización de los anillos A y B.

La actividad promotora del crecimiento vegetal mostrada por una serie de análogos espiroestánicos y furostánicos de BRs (**Figuras 12 y 14**), nos condujo a utilizar el acetato de diosgenina (**199**) como materia prima, para comenzar el estudio de la funcionalización de los anillos A y B.

Utilizando el protocolo más comúnmente empleado para introducir la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo a partir de Δ^5 -esteroides, se realizó la epoxidación del doble enlace 5,6 con AMCPB en CH₂Cl₂ y la apertura del oxirano con HClO₄ acuoso y acetona, para producir el diol **212** sin que se afectara la cadena lateral espirocetálica. En el esquema 15 se muestra el procedimiento de síntesis empleado para comenzar el estudio de la funcionalización de los anillos A y B.



Esquema 15. Procedimiento de síntesis empleado para iniciar el estudio de la funcionalización de los anillos A y B .

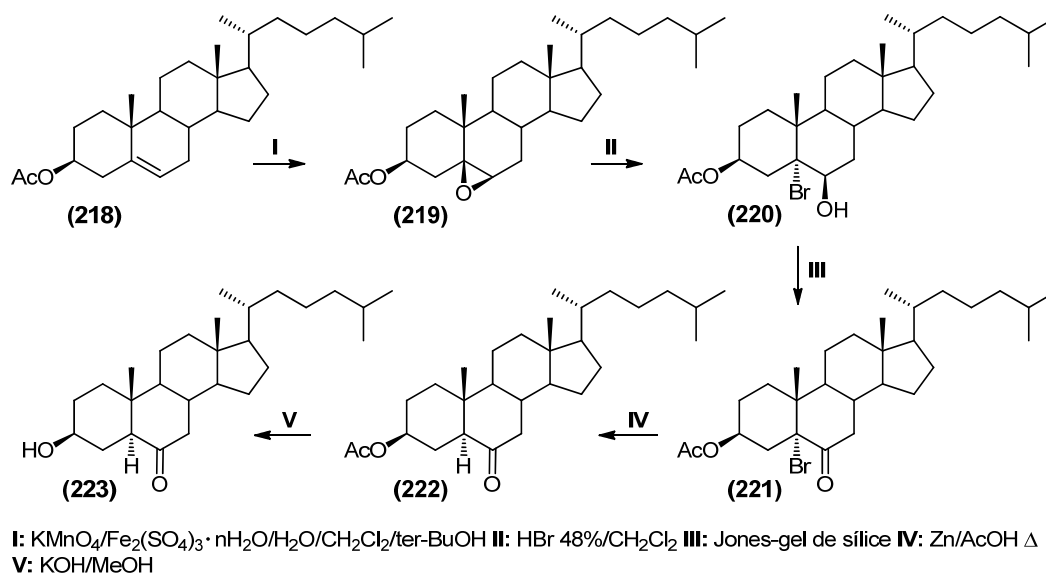
La epoxidación del doble enlace en 5,6 (Δ^5) utilizando AMCPB ha sido ampliamente estudiada, y se conoce que la reacción produce la mezcla de los epóxidos 5 α ,6 α y 5 β ,6 β , prevaleciendo como producto mayoritario el epóxido α , debido al impedimento estérico que ejerce el metilo β en la posición C-10, que dirige el acercamiento del peroxiácido al doble enlace por la cara α menos impedida.

La oxidación de **212** con PCC produjo el cetol **213** el cual fue obtenido en menor rendimiento, que cuando se llevó a cabo la oxidación de **212** con reactivo de Jones, sin separar los intermediarios de reacción. El tratamiento del cetol **213** con metanol saturado con K_2CO_3 , produjo la cetona dihidroxilada **214** con un rendimiento total del 34%.

Por otra parte, la apertura reductiva del anillo F del diol **212**, se realizó utilizando $NaBH_3CN$ en ácido acético y produjo el triol **215**. La oxidación selectiva del grupo 6β -OH axial del triol **215** con NBS produjo la cetona **216**, sin afectar el alcohol primario en C-26, la cual fue saponificada con metanol saturado con K_2CO_3 para dar lugar a la cetona trihidroxilada **217** con un rendimiento total del 48%.

La reacción de oxidación de alcoholes esteroideos, ha sido ampliamente estudiada por diferentes investigadores, quienes coinciden en que los alcoholes axiales se oxidan con mayor rapidez que los alcoholes ecuatoriales, debido a que el paso determinante en la velocidad de la reacción es la ruptura del enlace $C_{\text{carbinólico}}-H$ y en un alcohol ecuatorial, este enlace es menos accesible. Adicionalmente se ha publicado que la transformación de un carbono tetraédrico con un grupo hidroxilo a un carbono carbonílico de geometría trigonal plana, elimina algunas interacciones de repulsión 1,3 diaxiales, que producen inestabilidad en la molécula.¹¹³ Se han utilizado diferentes reactivos para llevar a cabo dicha reacción y entre ellos, la NBS ha sido de gran utilidad para oxidar alcoholes secundarios en presencia de alcoholes primarios. La oxidación selectiva de la agrupación hidroxilo 6β axial, puede justificarse por las interacciones 1,3 diaxiales que presenta dicho grupo, con el grupo metilo en C-10 y los dos hidrógenos β axiales H-4 y H-8.

Con el objetivo de preparar un análogo de brasinoesteroide con la agrupación 3β -hidroxi-6-oxo a partir del acetato de colesterol (**218**) y emplearlo como compuesto de referencia para comparar la actividad biológica, se decidió utilizar un procedimiento previamente publicado por nuestro grupo de trabajo que permite la fácil obtención de dicha agrupación.¹⁰⁰ Este consistió en tratar el acetato de colesterol (**218**) con $KMnO_4$ y $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$ en una mezcla de CH_2Cl_2 , *tert*-butanol y agua para producir la β -epoxidación diastereoselectiva del doble enlace 5,6 según fue publicado (Esquema 16).¹⁰⁰

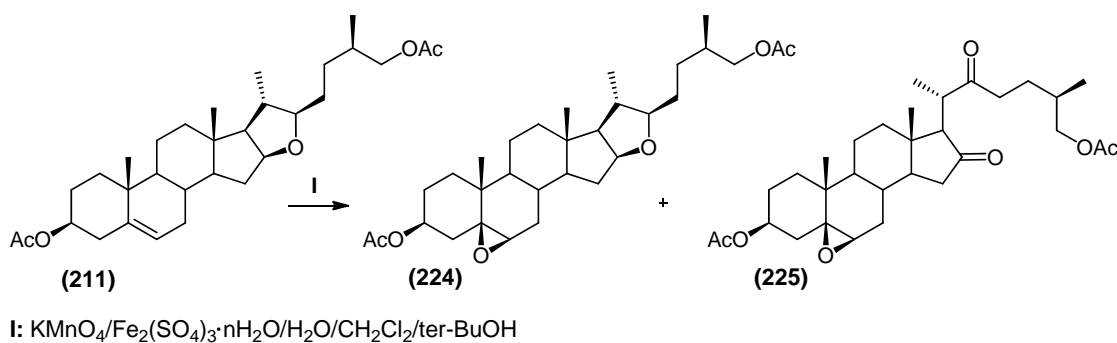


Esquema 16. Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de ABRs con la agrupación 3β-hidroxi-6-oxo.

La reacción de β-epoxidación del doble enlace 5,6 seguida de la apertura del anillo oxirano como paso clave para la introducción de un átomo de oxígeno en la posición C-6, ha sido considerada un método alternativo para la introducción de la agrupación 3β-hidroxi-6-oxo. Muchos métodos han sido empleados para llevar a cabo la reacción y entre ellos se ha destacado el uso de KMnO_4 mezclado con sales de hierro o cobre hidratadas, que actúan como catalizadores de transferencia de fases.¹¹⁴ Los reportes sugieren que la selectividad por la cara β del agente oxidante, se debe a que el ión metálico se coordina al doble enlace por la cara α menos impedida del doble enlace formando un complejo π, lo cual dirige el ataque del permanganato de potasio por la cara β, y por consiguiente la formación del epóxido β.

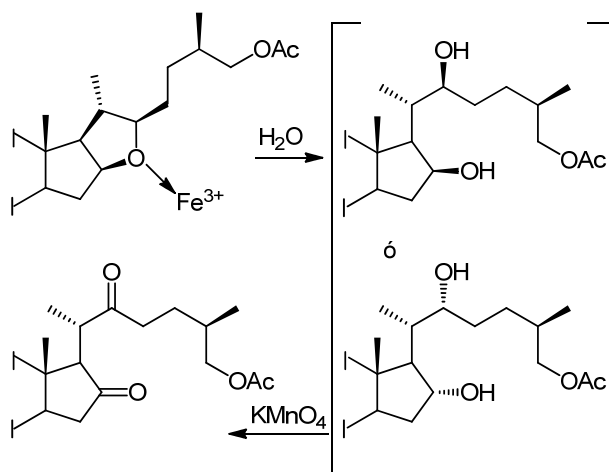
La apertura regioselectiva del anillo β-oxirano con HBr acuoso, seguida de la oxidación con reactivo de Jones soportado sobre gel de sílice produjo la bromocetona **221**. La secuencia de tres pasos sin separar los intermediarios epóxido (**219**) y bromohidrina (**220**) produjo la bromocetona **221** con buen rendimiento. El tratamiento de **221** con Zn en ácido acético a reflujo produjo la cetona acetilada **222**, la cual al saponificar con MeOH y KOH produjo la cetona hidroxilada **223** con un rendimiento total del 45 %.

Al aplicar la secuencia descrita en el Esquema 16 al furosteno diacetilado **211**, cuya síntesis ha sido previamente descrita, se obtuvieron resultados inesperados (Tabla 1, línea 1). El intento de realizar la β -epoxidación del furosteno diacetilado **211** con $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ produjo una mezcla del furostano epoxidado **224** y la dicetona colestánica epoxidada **225** (Esquema 17). Al realizar la reacción en ausencia de la sal de hierro se recuperó la materia prima sin reaccionar después de 24 h.



Esquema 17. Reacción de β -epoxidación y apertura del anillo tetrahydrofurano mediante el empleo de $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

El hecho de que en ausencia de la sal de hierro no se observó reacción, sugiere un mecanismo que involucra la coordinación del catión de hierro con el oxígeno tetrahydrofuránico, enlazado tanto a C-16 como a C-22, el cual puede ser desplazado por el agua presente en el medio de reacción para producir un diol, que rápidamente se oxida a la 16,22-dicetona observada (Esquema 18).



Esquema 18. Mecanismo propuesto para realizar la apertura del anillo de tetrahydrofurano.

Algunas secuencias sintéticas descritas para la síntesis del potente antitumoral OSW-1 a partir de sapogeninas esteroidales, emplean 16,22-dionas como intermediarios sintéticos (Figura 15).¹¹⁵

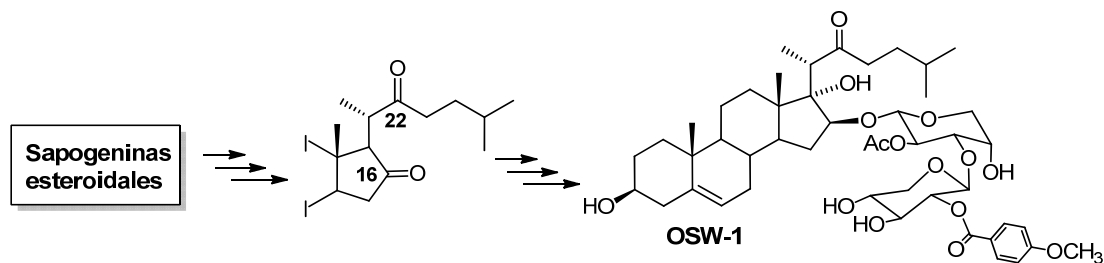


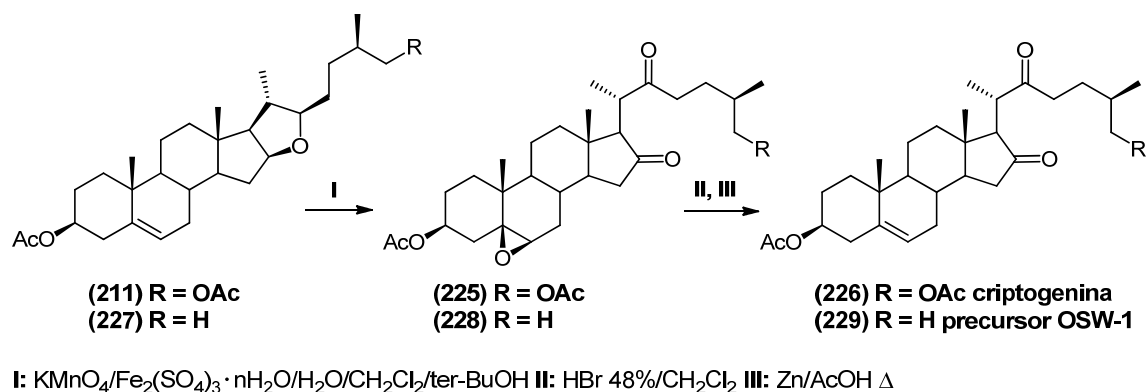
Figura 15. Síntesis del potente antitumoral OSW-1 a partir de sapogeninas esteroidales.

Considerando que la nueva reacción encontrada constituye una alternativa conveniente para la obtención de estas dicetonas, se decidió entonces optimizar las condiciones de reacción para lograr la apertura del anillo de tetrahydrofurano (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones para la apertura oxidativa de furostanos.

	KMnO ₄ (g)	H ₂ O (ml)	Fe ₂ (SO ₄) ₃ .nH ₂ O (g)	TIEMPO (min.)	RENDIMIENTO %	
					224	225
1	4	0.4	2	20	16.6	49.3
2	5	0.5	2.5	120	-	84.4

Concluida la optimización de las condiciones de reacción, se diseñó una secuencia sintética que permite la obtención de un precursor sintético del OSW-1 y de la criptogenina, sapogenina esteroidal de utilidad para la síntesis de otros derivados bioactivos. El tratamiento del furostenol acetilado **211** en las condiciones optimizadas para la apertura oxidativa (Tabla 1, línea 2) dio lugar a la dicetona epoxidada **225**. La recuperación de la doble ligadura Δ^5 , se logró por tratamientos consecutivos con HBr en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente y Zn en ácido acético a reflujo para producir el acetato de criptogenina (**226**). Al aplicar la misma secuencia de síntesis optimizada al furostenol acetilado **227**^{4b} se produjo la dicetona epoxidada **228**, la cual mediante el tratamiento consecutivo con HBr en CH₂Cl₂ y Zn en ácido acético a reflujo produjo el precursor sintético del OSW-1 **229** (Esquema 19).



Esquema 19. Procedimiento de síntesis empleado para la obtención de acetato de criptogenina y el precursor sintético del OSW-1.

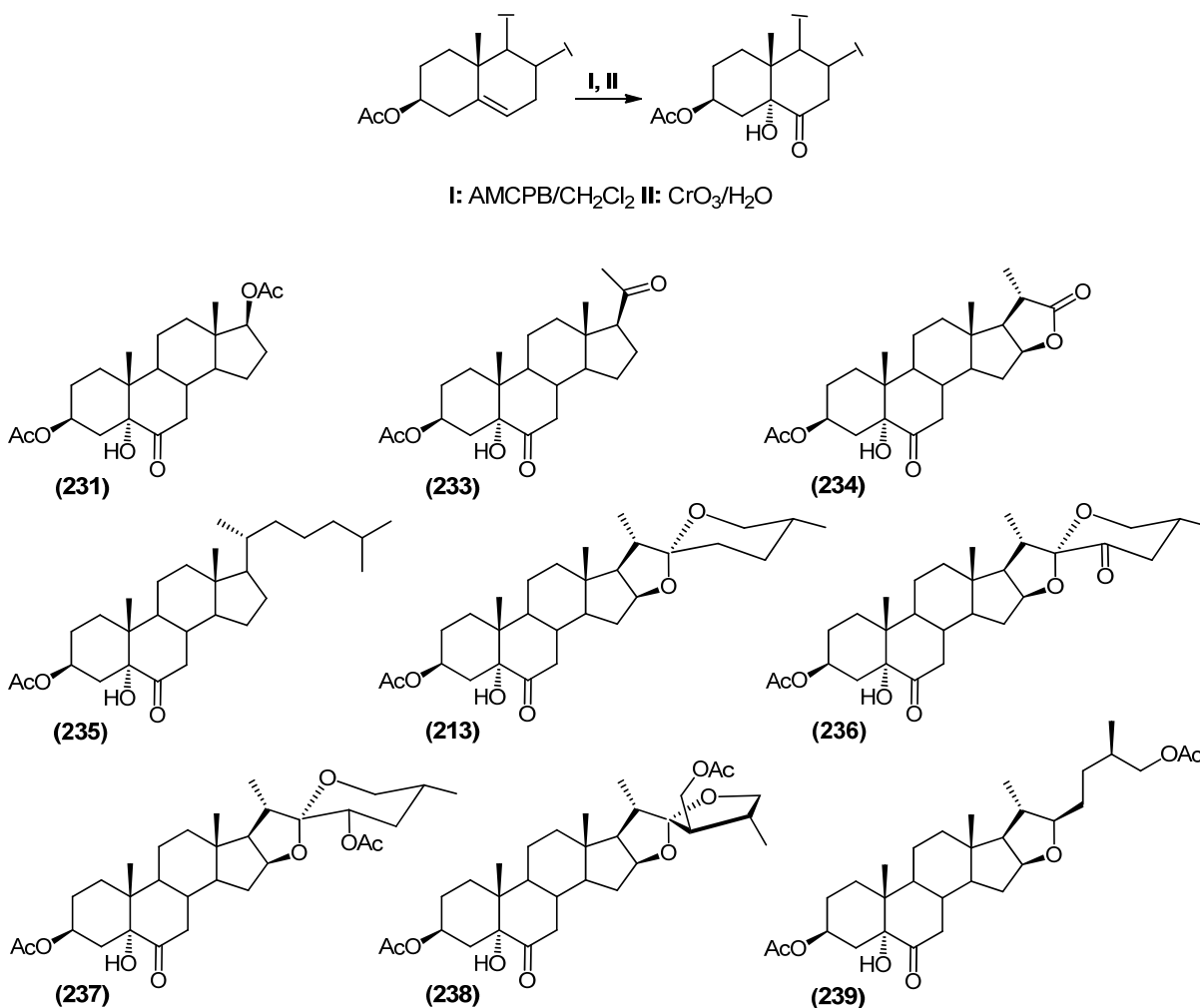
4.2.1. Metodología para obtener la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo a partir de 3 β -acetoxi- Δ^5 esteroides mediante un procedimiento en dos pasos.

Debido a los inconvenientes que se pueden presentar al tratar esteroides que poseen cadenas laterales lábiles, a las condiciones ácidas empleadas en la apertura oxidativa e hidrolítica de epóxidos, o en la oxidación de dioles con reactivo de Jones, unido al hecho de que al tratar los furostenoles acetilados **211** y **227** con una mezcla húmeda de KMnO_4 y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ en CH_2Cl_2 /*ter*-butanol se produjo la inesperada apertura oxidativa del anillo E, se decidió buscar las condiciones experimentales óptimas para evitar las limitaciones antes mencionadas, que impiden la elaboración de esteroides con la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo y cadenas laterales lábiles.

La fácil preparación a gran escala de estos compuestos, puede llevar a la aplicación de los mismos en la agricultura, prevaleciendo sobre los análogos 7-oxa-6-oxo comercialmente disponibles y altamente activos, cuyos precios prohibitivos encarecen la aplicación masiva y generalizada de brasinoesteroides en la agricultura.

Como se esperaba, el tratamiento de 3 β -acetoxi- Δ^5 -esteroides con AMCPB en CH_2Cl_2 , produjo la mezcla de los correspondientes 5 α - y 5 β -epóxidos. La sustitución del reactivo de Jones por una solución de CrO_3 en agua para evitar las condiciones fuertemente ácidas, evitó la reacción de apertura del anillo tetrahidrofuránico E y de la cadena lateral espiroestánica sensibles al medio ácido, produciéndose los cetoles deseados con elevados rendimientos y purezas (Esquema 20).

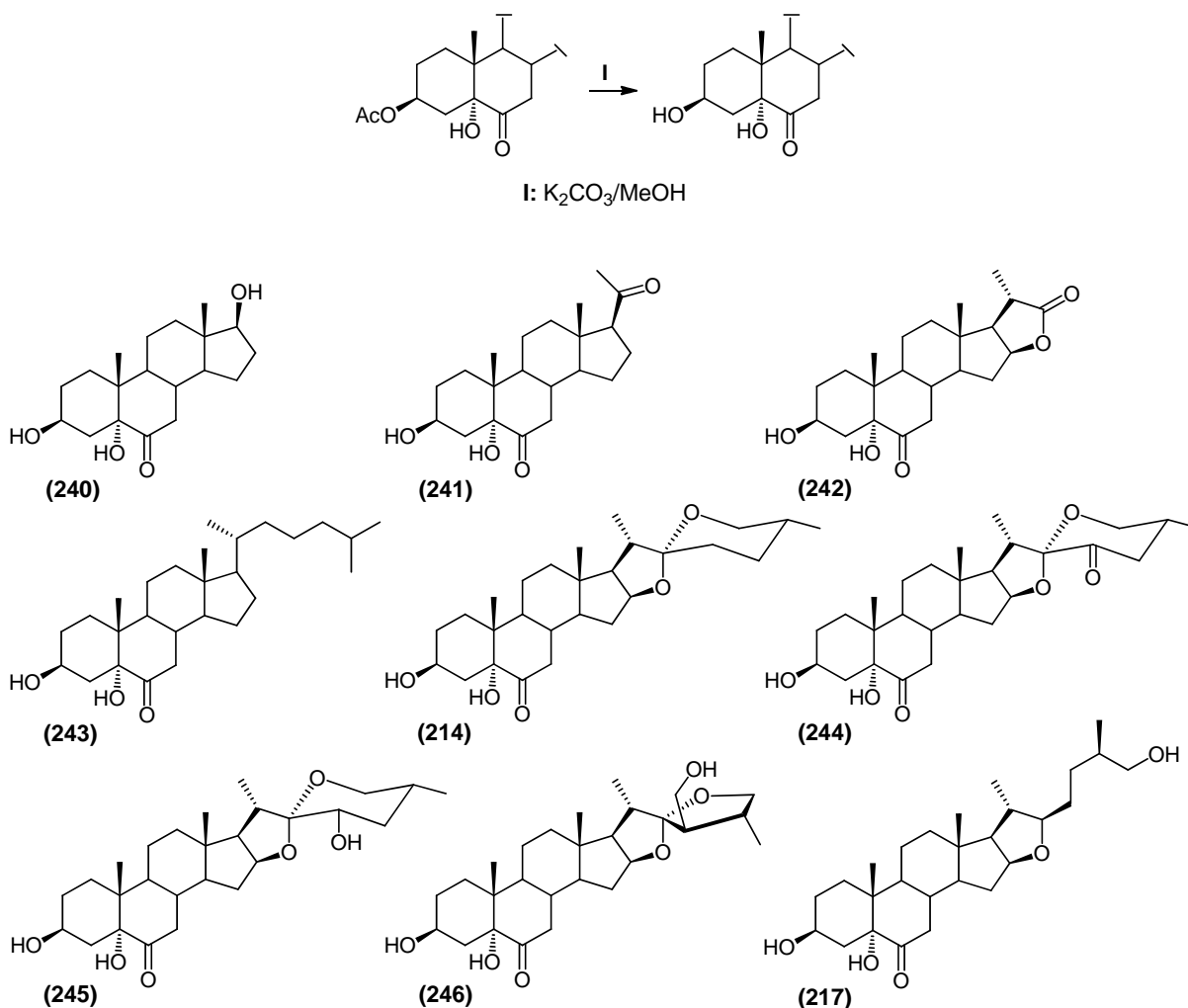
En estas nuevas condiciones, la adición de acetona a la solución de CH_2Cl_2 resultante de la reacción de epoxidación, seguido de enfriamiento y tratamiento con CrO_3 en agua produjo la conversión de los epóxidos en los cetoles correspondientes, con rendimientos que oscilaron entre 77-95% de una forma rápida y conveniente, en un solo recipiente sin afectar las cadenas laterales lábiles estudiadas.



Esquema 20. Método desarrollado para la obtención de los esteroides con la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo.

4.2.2. Obtención de análogos de BRs con la agrupación 2 α ,3 α ,5 α -trihidroxi-6-oxo y 2 β ,3 β ,5 α -trihidroxi-6-oxo.

La metanólisis de los cetoles cuya descripción se describió en el epígrafe anterior, utilizando metanol saturado con K₂CO₃ a temperatura ambiente, produjo los correspondientes cetoles hidroxilados con rendimientos entre 72-98% (Esquema 21).

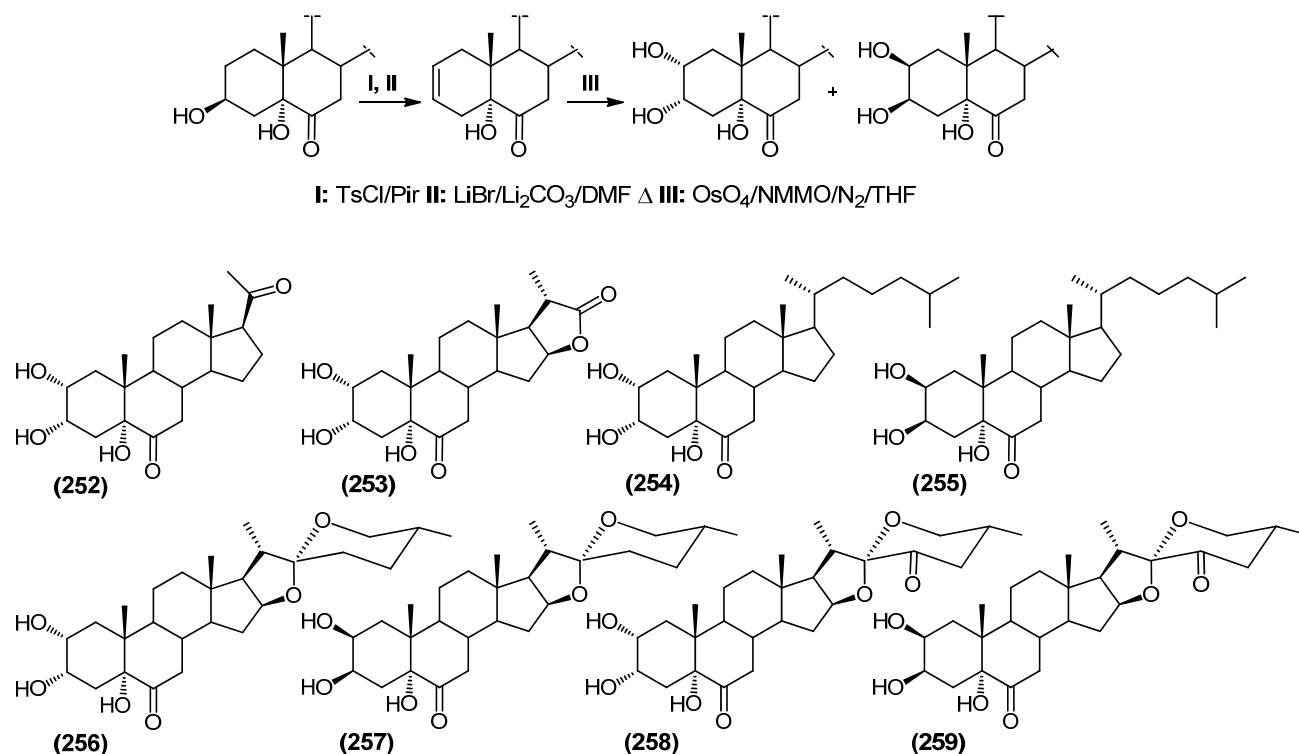


Esquema 21. Procedimiento general para la obtención de los esteroides con la agrupación 3 β ,5 α -dihidroxi-6-oxo.

La posterior tosilación del alcohol en C-3 seguida de la eliminación del éster sulfónico formado (sin previa purificación), condujo a los correspondientes cetoles insaturados que fueron dihidroxilados utilizando OsO₄ en presencia de óxido de N-metilmorfolina como co-oxidante (Esquema 22).

El control cromatográfico realizado durante las reacciones de eliminación del éster sulfónico en la posición C-3, mediante el tratamiento del mismo con LiBr y Li₂CO₃ en DMF caliente, evidenció la formación del compuesto portador de la insaturación Δ^2 y la de un compuesto

menos polar que se presumió que podría ser el compuesto portador de la insaturación Δ^3 , los cuales fueron separados utilizando cromatografía en columna.



Esquema 22. Procedimiento general para la obtención de ABRs con la agrupación $2\alpha,3\alpha,5\alpha$ -trihidroxi-6-oxo y $2\beta,3\beta,5\alpha$ -trihidroxi-6-oxo.

Durante la dihidroxilación con OsO₄-ONMM de los cetoles insaturados con cadena lateral de tipo pregnano y bisnorcolano, no se detectó la formación de los dioles $2\beta,3\beta$ según ha sido descrito por Brosa y colaboradores, al dihidroxilar los sistemas Δ^{22} y Δ^2 - 5α -hidroxi-6-oxo en los análogos del estigmasterol.^{4a}

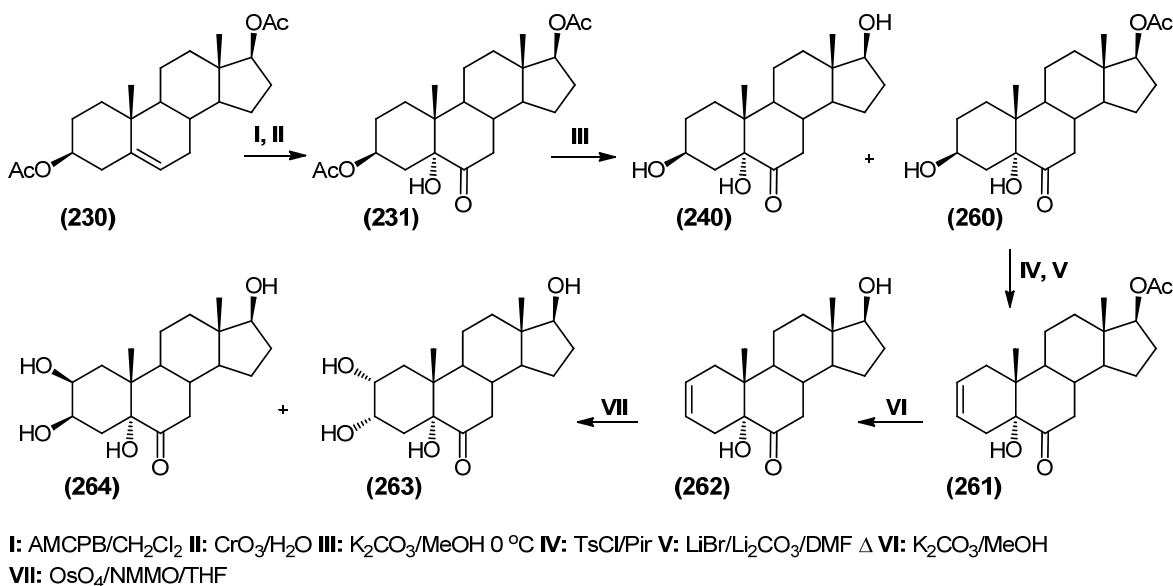
Por el contrario, los cetoles insaturados de tipo colestano, espirostano y 23 -oxo espirostano al someterse al procedimiento de dihidroxilación con OsO₄ en presencia de óxido de N-metilmorfolina como co-oxidante, condujeron a la mezcla de los dioles $2\alpha,3\alpha$ - y $2\beta,3\beta$ - con predominio de los primeros, los cuales fueron separados utilizando columnas cromatográficas.

El mayor rendimiento del diol vecinal $2\alpha,3\alpha$ sobre el $2\beta,3\beta$, puede justificarse por el mayor impedimento que ejerce el grupo metilo en C-19 con orientación β , comparado con el grupo hidroxilo en C-5 con orientación α .

El grupo 17-hidroxilo de los derivados de androstano y el 23-hidroxilo en los derivados de tipo espiroetano, dificultaron el esquema general de síntesis empleado anteriormente para obtener los compuestos finales deseados, por lo que decidimos utilizar una vía alternativa para obtener los ABRs con dichas cadenas.

4.3. Obtención de ABRs de androstano.

El esquema de trabajo seguido para obtener los análogos de tipo androstano, se llevó a cabo inicialmente utilizando la metodología establecida por nuestro grupo de trabajo, para introducir la agrupación 5α -hidroxi-6-oxo en el androstano diacetilado **230**.¹¹⁶ La metanólisis selectiva del cetol diacetilado **231** obtenido, utilizando metanol saturado con K_2CO_3 a $0^\circ C$, produjo la mezcla de las cetonas trihidroxilada **240** y dihidroxilada **260** con rendimientos de 9 % y 57 % respectivamente. La posterior tosilación en C-3 de **260** seguida de la eliminación del éster sulfónico formado, condujo al cetol insaturado **261**, el cual se trató con metanol saturado con K_2CO_3 para producir el diol insaturado **262** con un rendimiento del 41 % a partir del androstano diacetilado **230**. La dihidroxilación de **262** con OsO_4 -ONMM produjo la mezcla de los tetraoles **263** y **264** con rendimientos totales del 20 % y 7 % respectivamente, después de ser separados en una columna cromatográfica (Esquema 23). Las Figuras 32-37 (ANEXOS) muestran evidencias de las transformaciones realizadas.



Esquema 23. Procedimiento sintético para la obtención de análogos de androstano.

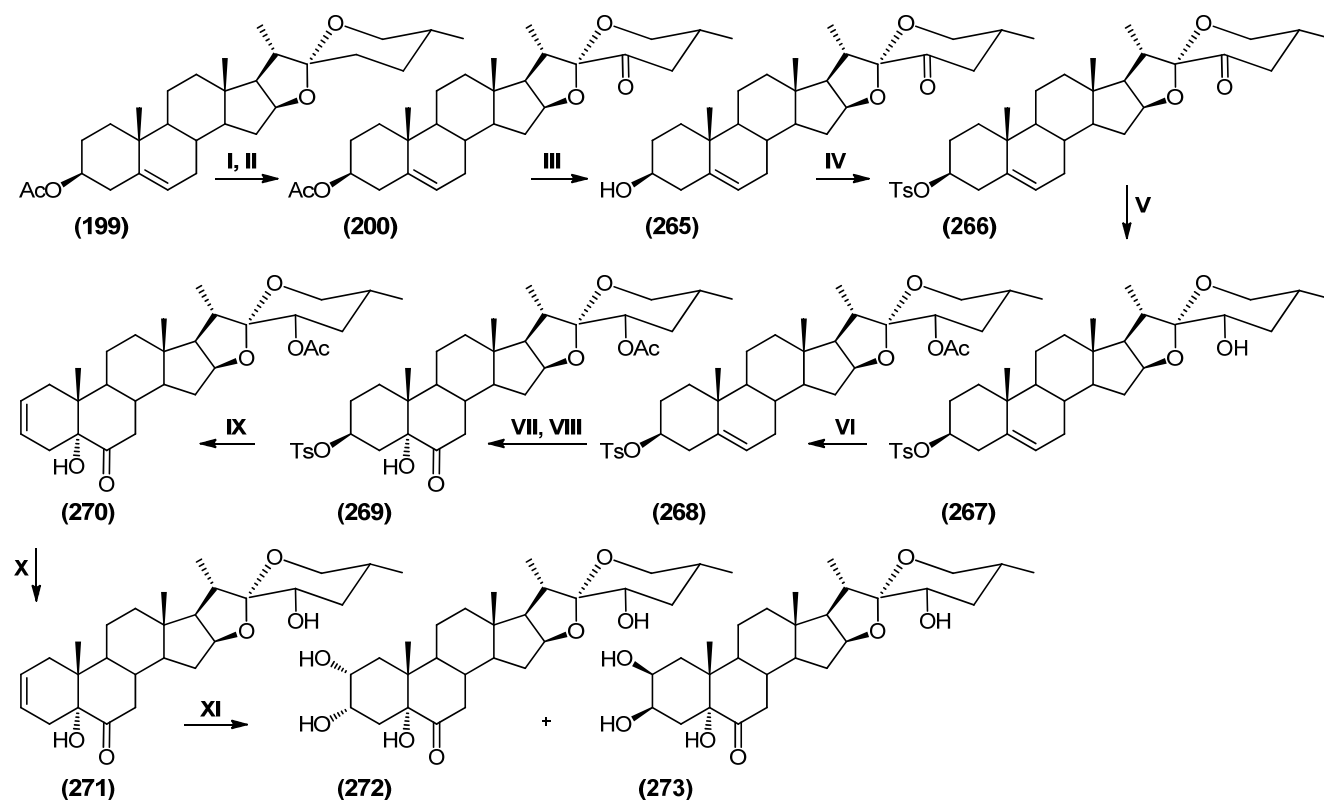
La metanólisis preferente del 3β-acetato a bajas temperaturas sugiere que el 17β-acetato se encuentra más impedido debido a su cercanía con el metilo CH₃-18, lo que hace posible la selectividad observada.

4.4. Obtención de ABRs con cadena lateral de tipo 23-hidroxi-espirostando.

Para la obtención de los análogos con cadena lateral de tipo 23-hidroxi espirostando, la ruta de síntesis consistió en la metanólisis del acetato de 23-oxodiosgenina (**200**), obtenido según se describió en el epígrafe 4.1.1. La formación del éster sulfónico en C-3 con cloruro de tosilo en piridina produjo la cetona tosilada **266** con un rendimiento del 89 % a partir de **200**, cuya reducción con borohidruro de sodio en metanol–dioxano a 0 °C y acetilación del alcohol formado produjo el compuesto acetilado **268** con un rendimiento total del 15%.

El empleo de la metodología desarrollada por nuestro grupo de trabajo para la introducción de la agrupación 5α-hidroxi-6-oxo sobre **268**, produjo el cetol **269** en 91 % de rendimiento sin que se afectara el éster sulfónico en C-3. El tratamiento de **269** con bromuro de litio y carbonato de litio en DMF caliente produjo el cetol insaturado **270** con 81 % de rendimiento, que fue metanolizado para conducir al diol insaturado **271**. Finalmente la dihidroxilación de **271** con OsO₄ y ONMM

produjo la mezcla de los tetraoles **272** y **273**, con rendimientos totales del 5 % para cada uno después de ser separados en una columna cromatográfica (Esquema 24). Las Figuras 38-43 (ANEXOS) muestran evidencias de las transformaciones realizadas.



I: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{NaNO}_2/\text{AcOH}$ **II:** Al_2O_3 (Brockmann) **III:** $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ **IV:** TsCl/Pir **V:** $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}/\text{dioxano } 0^\circ\text{C}$ **VI:** $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pir}$ **VII:** $\text{AMCPB}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ **VIII:** $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}$ **IX:** $\text{LiBr}/\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{DMF}$ Δ **X:** $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ **XI:** $\text{OsO}_4/\text{NMMO}/\text{THF}$

Esquema 24. Procedimiento sintético para la obtención de ABRs con cadena lateral de tipo 23-hidroxi espirostano.

4.5. Características espectroscópicas generales de los compuestos obtenidos.

Todos los compuestos fueron caracterizados empleando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear y espectroscopía de masas. La asignación de las señales de ^{13}C se realizó con la ayuda de la técnica auxiliar HSQC, para diferenciar los metilos, metilenos y metinos. Los espectros bidimensionales COSY, NOESY y HMBC fueron registrados sólo para los compuestos finales.

En varias publicaciones se han detallado las asignaciones de las señales en RMN de una gran variedad de esteroides, lo cual sirvió de referencia para caracterizar los compuestos obtenidos. Debido a las diferentes transformaciones realizadas al núcleo esteroideal, se discutirán las características espectroscópicas de los compuestos obtenidos, agrupados según las modificaciones presentes en la cadena lateral y en los anillos A y B.

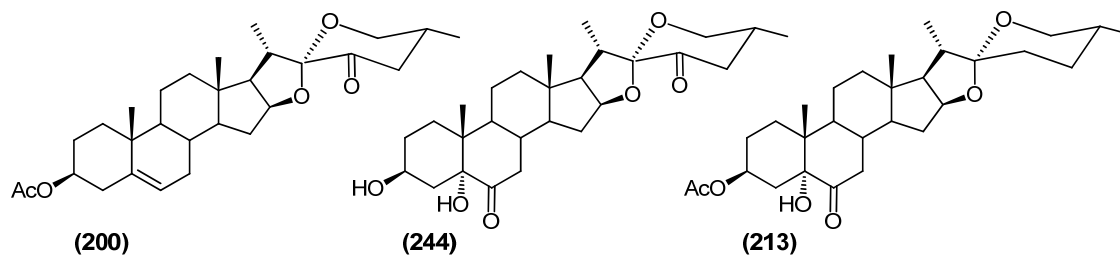
4.5.1. Características espectroscópicas en RMN derivadas de la cadena lateral.

Las características espectroscópicas de un gran número de sapogeninas esteroidales han sido ampliamente estudiadas.^{95, 117} Las diferentes transformaciones en sus cadenas laterales pueden corroborarse mediante la comparación de los espectros correspondientes a los compuestos obtenidos con los de la sapogenina de partida.

4.5.1.1 Compuestos portadores de una agrupación carbonílica en C-23.

En los espectros de RMN ¹H de los compuestos portadores de una agrupación carbonílica en C-23, se observaron marcados cambios en el desplazamiento químico de los protones de la cadena lateral. El desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes a los H-26 ax y H-26 ec, además de la inversión de sus posiciones relativas y el desplazamiento a campo bajo de los protones H-20, H-24, H-25 y H-27 evidenció la transformación realizada. En la Tabla 2 se muestra con fines de comparación los desplazamientos químicos de los protones de la cadena lateral de dos de los compuestos obtenidos, con la agrupación 23-oxo (**200** y **244**) y los correspondientes al compuesto sin transformación en su cadena lateral (**213**). La Figura 24 (ANEXOS) muestra evidencias de las transformaciones realizadas.

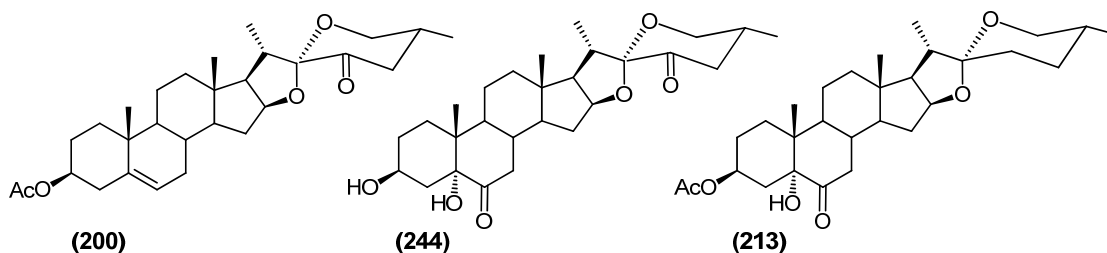
Tabla 2. Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral de compuestos 23-carbonílicos (δ ppm).



Compuestos	H-20	H-21	H-24ax/ec	H-25	H-26ax	H-26ec	H-27
200	2.87	0.93	2.44	2.29	3.78	3.58	0.93
244	2.88	0.93	2.46	2.28	3.77	3.58	0.93
213	1.85	0.96	1.61/1.43	1.62	3.35	3.46	0.78

En los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos portadores de una agrupación carbonílica en C-23 se observó una señal adicional a 201.8 ppm, correspondiente al carbono carbonílico en la posición C-23 y el desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes a los carbonos C-24 y C-25, debido al efecto de la sustitución en β y a la pérdida de la interacción 1,3 diaxial entre los protones H-23 y H-25, respectivamente. Adicionalmente se observó el desplazamiento a campo alto de la señal correspondiente a C-20, debido a una interacción δ -syn entre el H-20 y el oxígeno carbonílico. En la Tabla 3 se muestran los desplazamientos químicos de los carbonos integrantes del sistema espirocetálico, de dos de los compuestos que presentan la agrupación 23-oxo (**200** y **244**) y los correspondientes al compuesto **213**. La Figura 25 (ANEXOS) muestra evidencias que corroboran las transformaciones realizadas.

Tabla 3. Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral de compuestos 23-carbonílicos (δ ppm).



Compuestos	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27
200	34.8	14.4	109.8	201.8	45.3	35.8	65.6	17.1
244	34.7	14.3	109.8	201.7	45.2	35.8	65.7	17.1
213	41.6	14.4	109.3	31.3	28.8	30.3	66.8	17.1

4.5.1.2 Compuestos portadores de una agrupación hidroxílica en C-23.

Los espectros de ^1H de los compuestos con un grupo hidroxilo en C-23 se caracterizan por la presencia de la señal a campo bajo del protón H-23, que generalmente aparece superpuesta con la señal correspondiente al H-26 ec, lo cual dificulta determinar la configuración en la posición C-23. En los compuestos portadores de un grupo hidroxilo ecuatorial en C-23 se observa un mayor desblindaje del protón H-20, atribuible a la proximidad espacial y a la compresión de van der Waals de dicho protón con el grupo hidroxilo.

Los estudios cristalográficos corroboraron la configuración asignada para ambos alcoholes **201** y **202** (Figuras 16 y 17).

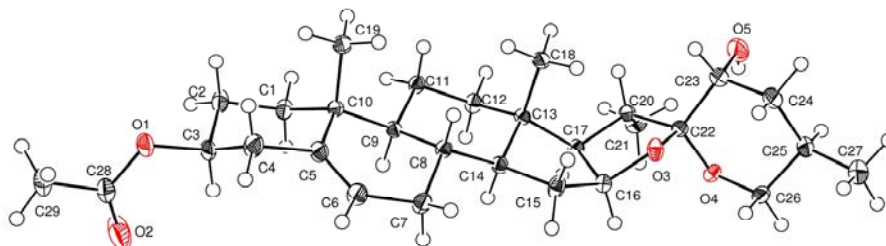


Figura 16. Estructura cristalina del 3-monoacetato de (23*R*,25*R*)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (**201**).

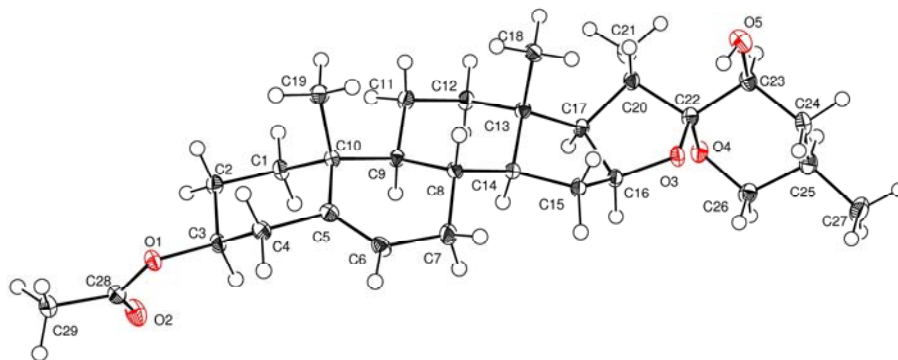
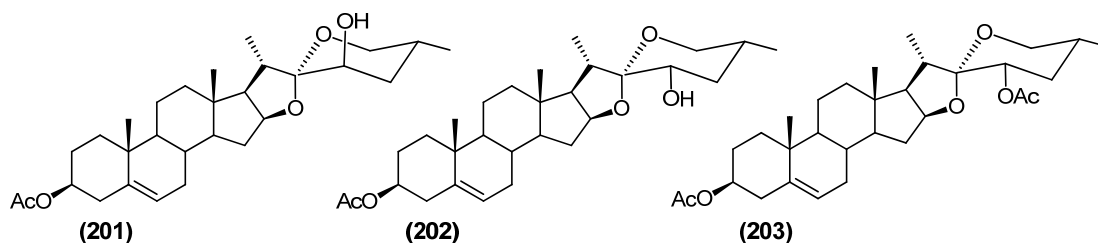


Figura 17. Estructura cristalina del 3-monoacetato de (23S,25R)-espirost-5-en-3β,23-diol (202).

La acetilación del alcohol **202** produce en RMN ¹H el desplazamiento de la señal asociada a H-23 hasta 4.82 ppm como un dd ($J = 11.8, 4.8$ Hz), que sugiere la orientación ecuatorial del grupo hidroxilo y por lo tanto corrobora la configuración *S* en C-23. También se observa la señal adicional alrededor de 2.00 ppm del singlete correspondiente al metilo del grupo acetilo introducido. La Tabla 4 muestra los desplazamientos químicos de los protones integrantes de la cadena lateral de los compuestos 23-hidroxilados **201**, **202** y el derivado acetilado **203**. La Figura 24 (ANEXOS) muestra evidencias de las transformaciones realizadas.

Tabla 4. Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral de compuestos hidroxilados y acetilados en C-23 (δ ppm).

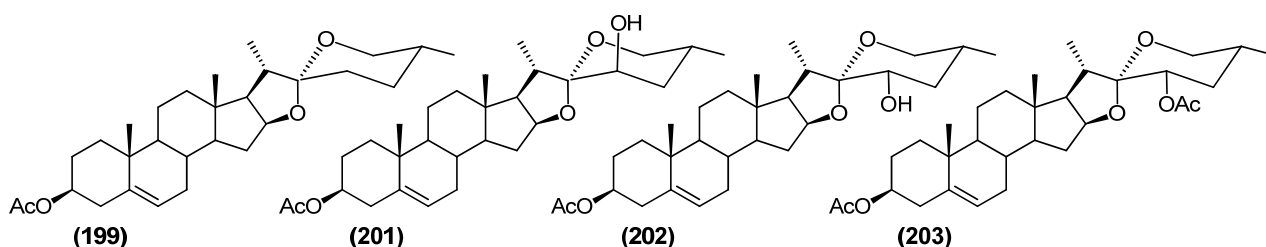


Compuestos	H-20	H-21	H-23	H-24ax/ec	H-25	H-26ax	H-26ec	H-27
201	2.25	1.11	3.60	1.68	1.95	3.43	3.50	0.80
202	2.54	0.94	3.46	1.95/1.25	1.77	3.24	3.40	0.81
203	2.09	0.95	4.82	1.89/1.49	1.88	3.35	3.42	0.82

Los espectros de RMN ^{13}C de los alcoholes **201** y **202** se caracterizan por las señales a 70.8 y 67.0 ppm respectivamente, correspondientes al carbono carbinólico en C-23. En el alcohol **201** la señal de C-25 observada a campo alto respecto a la del acetato de diosgenina (**199**), sugiere una interacción 1,3 diaxial entre el grupo hidroxilo en C-23 y el protón axial H-25, indicando la configuración *R* en C-23. Por otra parte, el desplazamiento a campo alto de la señal de C-20 observado en el alcohol **202** respecto al acetato de diosgenina (**199**), puede atribuirse a una interacción δ -syn entre el grupo hidroxilo en C-23 y el protón H-20, que indica su orientación ecuatorial y por consiguiente la configuración *S* en C-23.

La acetilación puede reconocerse por la presencia de las señales adicionales en 170.6 ppm y 21.1 ppm asociadas al carbono carbonílico y al metilo del grupo acetilo introducido, respectivamente. El desplazamiento a campo bajo (desblindaje) de la señal correspondiente a C-23, respecto al compuesto con el grupo hidroxilo libre, corrobora la transformación realizada. La Tabla 5 muestra con fines de comparación los desplazamientos químicos de los carbonos integrantes de la cadena lateral espirocetálica del acetato de diosgenina (**199**), y las señales correspondientes a los compuestos 23-hidroxilados **201**, **202** y el derivado acetilado **203**. La Figura 25 (ANEXOS) muestra evidencias que corroboran las transformaciones realizadas.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral de compuestos hidroxilados y acetilados en C-23 (δ ppm).



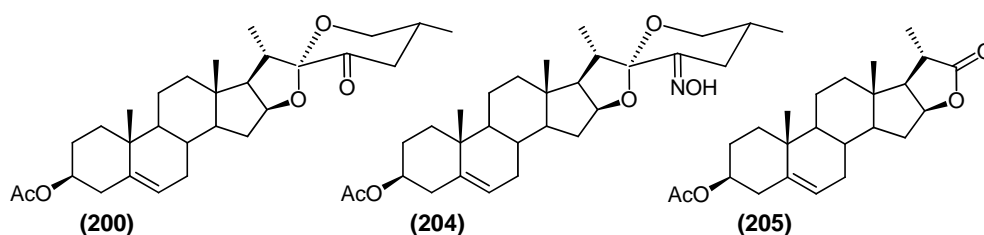
Compuestos	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27
199	41.6	14.5	109.2	31.4	28.8	30.3	66.8	17.1
201	40.6	16.8	108.4	70.8	36.3	24.2	66.3	16.8
202	35.5	14.1	110.6	67.0	38.5	30.8	65.9	16.6
203	35.9	14.1	108.6	68.7	34.0	30.7	65.7	15.9

4.5.1.3 Compuestos con cadena lateral de tipo dinorcolánica.

La transformación del derivado 23-oxodiosgenina (**200**) en la oxima **204** fue corroborada mediante RMN ^1H y ^{13}C , por el desblindaje del protón H-24 ec (de 2.44 ppm en **200** a 3.31 ppm en **204**) y el blindaje del carbono C-24 (a 27.7 ppm en la oxima **204** y a 45.3 ppm en la cetona **200**). El marcado desplazamiento a campo bajo de la señal de H-24 ec y el desplazamiento a campo alto de C-24, se asocian con la proximidad espacial del grupo hidroxilo de la función hidroximino con el protón H-24 ec provocando compresión de van der Waals, lo cual evidencia la configuración anti de la oxima **204**.

El espectro de ^1H de la lactona dinorcolánica **205** producida a partir de la oxima **204**, se caracteriza por la ausencia de las señales correspondientes a los protones del anillo F y por el desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes al protón H-16 (que ahora es parte de la agrupación lactona) y H-21 (debido a la anisotropía magnética que ejerce el grupo carbonilo presente en C-22). El blindaje del protón H-20, también puede atribuirse a la anisotropía magnética que ejerce el grupo carbonilo. La Tabla 6 muestra con fines de comparación, las características en RMN ^1H de la cadena lateral del acetato de 23-oxodiosgenina (**200**) y sus derivados **204** y **205**. Las Figuras 26 y 27 (ANEXOS) muestran evidencias que corroboran las transformaciones realizadas.

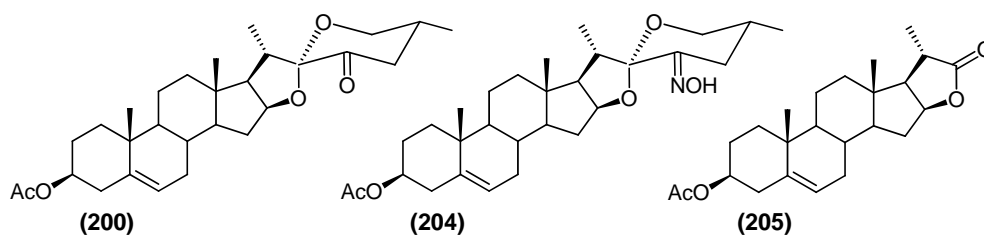
Tabla 6. Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral del acetato de 23-oxodiosgenina (200) y sus derivados 204 y 205 (δ ppm).



Compuestos	H-20	H-21	H-24	H-25	H-26ax	H-26ec	H-27
200	2.87	0.93	2.44	2.29	3.78	3.58	0.93
204	2.79	0.97	3.31	1.63	3.60	3.51	0.88
205	2.58	1.31	-	-	-	-	-

De manera similar, en el espectro de RMN ^{13}C de la lactona dinorcolánica **205**, se observa la ausencia de las señales correspondientes a los carbonos del anillo F. El desplazamiento a campo bajo de C-22 (ahora carbonílico), C-21 y C-20, así como el desplazamiento a campo alto del metilo en C-13 y el carbono C-17 respecto a las señales correspondientes en la oxima **204**, fueron evidencias adicionales de la formación de la lactona dinorcolánica **205**, a partir de dicha oxima. La Tabla 7 muestra con fines de comparación las características en RMN ^{13}C de la cadena lateral del acetato de 23-oxodiosgenina (**200**) y sus derivados **204** y **205**.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral del acetato de 23-oxodiosgenina (200) y sus derivados 204 y 205 (δ ppm).



Compuestos	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27
200	34.8	14.4	109.8	201.8	45.3	35.8	65.6	17.1
204	35.9	14.4	108.6	154.5	27.7	31.3	65.7	17.0
205	36.0	18.0	181.3	-	-	-	-	-

4.5.1.4 Compuestos con cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxicolestano.

La conversión del anillo F en un anillo de cinco miembros para producir la cadena lateral de tipo 16 β ,22:22,25-diepoxicolestano, se caracteriza en RMN ^1H por la presencia de la señal en 3.73 ppm con la apariencia de un singlete, correspondiente a los protones del metoxilo del éster en C-23' y por el desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes a los protones H-24 y H-25. La aparición de la señal a campo bajo del protón H-23 en 2.85 ppm con la apariencia de un doblete, debido al acoplamiento con el protón H-24 contribuye a corroborar la transformación realizada.

La configuración del centro estereogénico en C-23 puede establecerse con la ayuda de un experimento NOESY. La fuerte correlación entre H-23 y el metilo CH₃-24' indica la disposición cis de los mismos y por consiguiente la configuración *R* en C-23. Las correlaciones adicionales entre los sustituyentes de C-24 y los protones en C-25 permiten diferenciar los protones pro-*R* y pro-*S* unidos a C-25 (Figura 18).

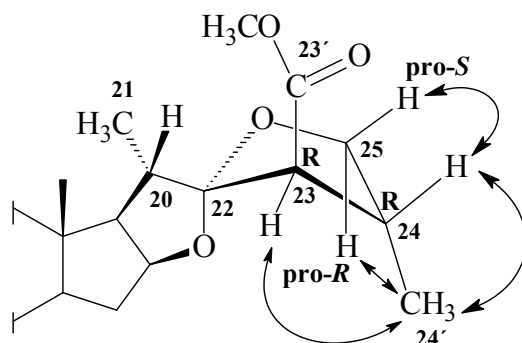
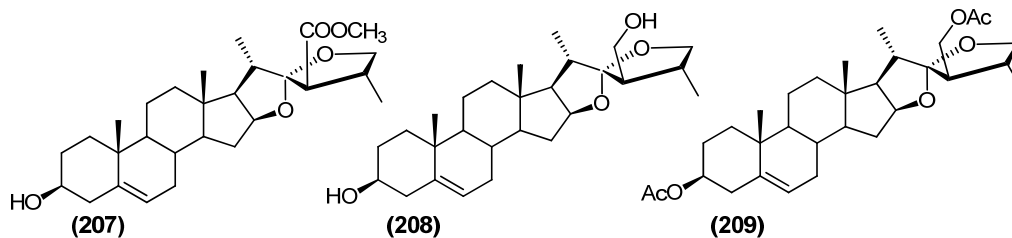


Figura 18. Correlaciones NOE.

En el espectro de ¹³C se observó el desplazamiento a campo alto de C-23 (de 201.8 ppm en la cetona **200** a 59.7 ppm en el furoespiroetano **207**) y la aparición de la señal en 51.8 ppm correspondiente al carbono del metoxilo en la posición C-23'. Adicionalmente se observó el blindaje de C-24, asociado a la pérdida de anisotropía magnética del grupo carbonilo, presente en la cetona **200** y el desblindaje de C-25 debido al efecto inductivo del oxígeno en posición α.

La reducción del éster al alcohol primario se caracteriza en RMN ¹H por la aparición de la señal entre 3.81-3.68 ppm con la aparición de un multiplete asociado a los protones H-23', y por el blindaje de las señales correspondiente a los protones H-25. En RMN ¹³C el blindaje de la señal asociada al carbono C-23' (de 172.5 ppm en el éster **207** a 62.5 ppm en el diol **208**) evidencia la transformación realizada. La Tabla 8 muestra los desplazamientos químicos de los protones integrantes de la cadena lateral en los compuestos furoespiroestánicos **207**, **208** y el derivado acetilado **209**. Ver Figura 28 (ANEXOS).

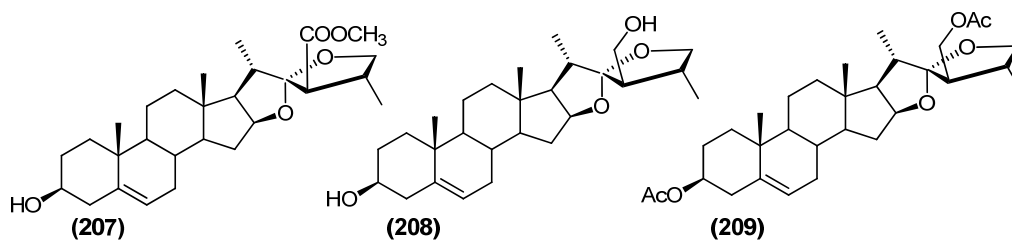
Tabla 8. Desplazamientos químicos de los protones situados en la cadena lateral de los compuestos furoespiroestánicos 207, 208 y 209 (δ ppm).



Compuestos	H-20	H-21	H-23	H-23'	H-24	H-24'	H-25 pro-S/pro-R
207	2.13	0.95	2.85	-	2.65	1.03	4.03/3.51
208	2.43	1.01	2.02	3.75	1.96	1.08	3.96/3.43
209	2.30	0.98	2.15	4.13	1.89	1.05	3.92/3.41

La acetilación del diol **208** puede ser reconocida por el desblindaje de los protones y carbonos carbinólicos en C-3 y C-23', así como por las señales adicionales correspondientes a los metilos y carbonos carbonilos de los grupos acetilos introducidos. La Tabla 9 muestra los desplazamientos químicos de los carbonos integrantes de la cadena lateral en los compuestos furoespiroestánicos **207**, **208** y el derivado acetilado **209**. Ver Figura 29 (ANEXOS).

Tabla 9. Desplazamientos químicos de los carbonos situados en la cadena lateral de los compuestos furoespiroestánicos 207, 208 y 209 (δ ppm).

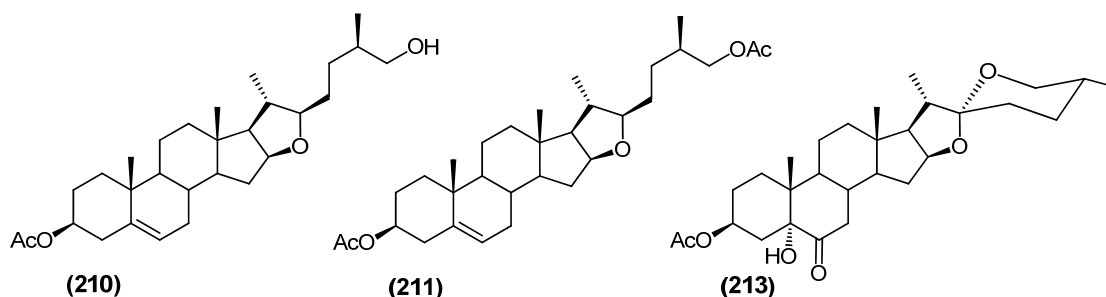


Compuestos	C-20	C-21	C-22	C-23	C-23'	C-24	C-24'	C-25
207	37.4	15.5	119.4	59.7	172.5	37.5	15.4	72.5
208	35.8	16.2	120.2	55.7	62.5	36.9	16.4	72.2
209	35.9	16.1	119.7	52.6	63.6	37.5	15.7	71.8

4.5.1.5 Compuestos con cadena lateral de tipo furostánicos.

La apertura del anillo F para dar lugar a una cadena lateral de tipo furostánica 26-hidroxilada se caracteriza en RMN ^1H , por la presencia de una señal en 3.31 ppm asociada al protón enlazado a C-22, que aparece como un td ($J = 8.1, 3.9$ Hz) debido a los acoplamiento con los protones H-20 y H-23. Las señales con la apariencia característica de un sistema ABX correspondientes a los protones en C-26, también corroboran la transformación realizada (ver Figura 30 en ANEXOS). En la Tabla 10 se muestra con fines de comparación, los desplazamientos químicos de los protones que caracterizan la cadena lateral furostánica de los compuestos **210**, **211** y las correspondientes señales de la cadena lateral del compuesto **213**, portador de la cadena lateral sin modificación.

Tabla 10. Señales protónicas características de la cadena lateral furostánica (δ ppm).



Compuestos	H-16	H-18	H-20	H-21	H-22	H-26	H-27
210	4.28	0.79	1.73	0.98	3.31	3.45	0.89
211	4.28	0.79	1.73	0.98	3.29	3.84/3.94	0.92
213	4.40	0.75	1.85	0.96	-	3.35/3.46	0.78

El aumento de la señal correspondiente a H-22 al irradiar la señal de H-21 en el experimento NOE diferencial sin afectar la señal del metilo 18, indicó la cercanía espacial cis de H-22 y el metilo en C-21 y por consiguiente, la configuración *R* del carbono en C-22, (Figura 19).

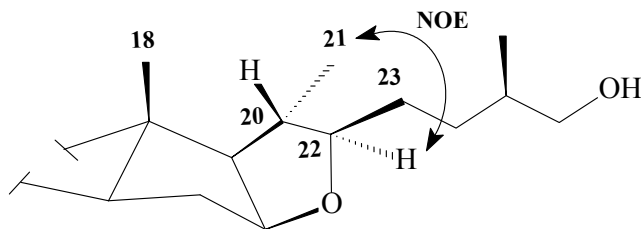
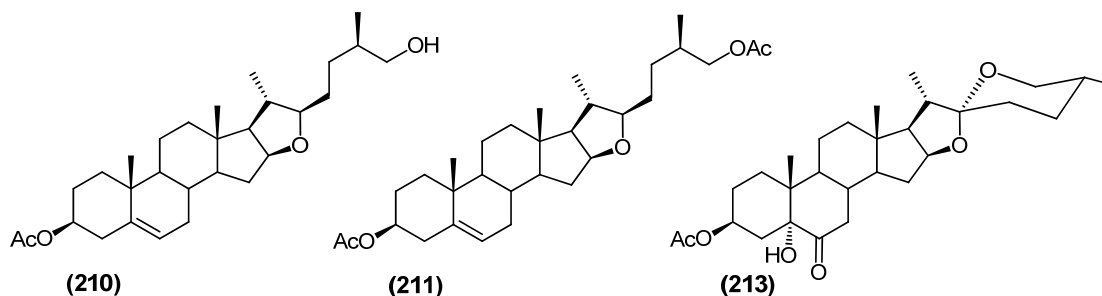


Figura 19. Determinación de la configuración *R* en C-22.

Adicionalmente, la conversión del anillo F en una cadena alifática produce la pérdida de interacciones protectoras 1,3 diaxial y gauche, que provocan el desplazamiento significativo a campo bajo de las señales correspondientes a C-16, C-17, C-21, C-24, C-25 y C-26. El blindaje de la posición C-22 asociado a la transformación de un cetal cíclico a un éter cíclico, así como el blindaje de las posiciones C-22 y C-23 debido a la libre rotación del enlace entre C-22 y C-23 que provoca interacción gauche entre el carbono C-24 y el metilo en C-21, fueron elementos adicionales que evidenciaron la transformación realizada. La acetilación del furostenol monoacetilado **210** puede ser reconocida por el desblindaje de los protones y el carbono carbinólico en C-26, así como por las señales adicionales correspondientes al metilo y carbono carbonilo del grupo acetilo introducido (ver Figura 31 en ANEXOS). En la Tabla 11 se muestra con fines de comparación los desplazamientos químicos de los carbonos que caracterizan la cadena lateral furostánica de los compuestos **210**, **211** así como las correspondientes señales de la cadena lateral del compuesto **213**, portador de la cadena lateral sin modificación.

Tabla 11. Desplazamientos químicos característicos de los carbonos situados en la cadena lateral furostánica (δ ppm).



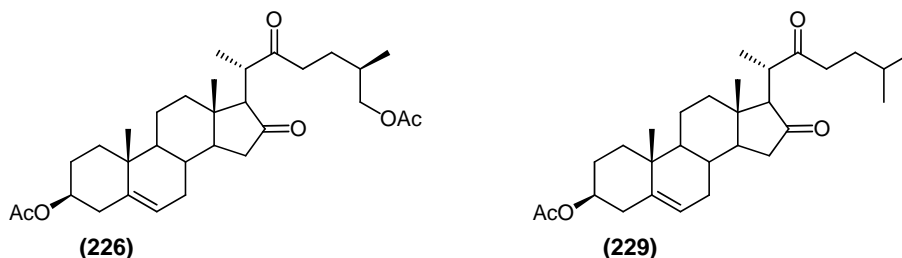
Compuestos	C-16	C-17	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27
210	83.1	65.0	37.9	18.9	90.3	30.4	30.1	35.7	67.9	16.6
211	83.2	65.1	37.9	18.9	90.1	30.4	30.8	32.7	69.3	16.7
213	80.5	62.0	41.6	14.4	109.3	31.3	28.8	30.3	66.8	17.1

4.5.1.6 Compuestos con cadena lateral de tipo colestan-16,22-diona.

Los espectros de ^1H de los compuestos producidos de la apertura oxidativa del anillo E de los furostenos **211** y **227**, se caracterizaron por la desaparición de las señales correspondientes a los protones en H-16, H-22, y por el desblindaje de la señal del metilo en C-21 debido a la anisotropía magnética que ejerce el grupo carbonilo de C-22.

En los espectros de RMN ^{13}C se observaron dos nuevas señales a campo bajo asociadas a los nuevos carbonos carbonílicos en las posiciones C-16 y C-22, además del desblindaje de las señales correspondientes a los carbonos C-15, C-20 y C-23 asociado al efecto de la sustitución en β . La Tabla 12 muestra los desplazamientos químicos de los carbonos que caracterizan la cadena lateral 16,22-diona colestánica de los compuestos **226** y **229**.

Tabla 12. Desplazamientos químicos característicos de los carbonos situados en la cadena lateral de tipo colestan-16,22-diona (δ ppm).



Compuestos	C-16	C-17	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27
226	213.2	66.1	43.3	12.9	217.9	37.1	26.7	32.0	69.0	16.8
229	217.9	66.0	43.3	15.4	213.9	37.2	32.2	27.6	21.4	22.4

4.5.2. Características espectroscópicas en RMN asociadas a la sustitución en los anillos A y B.

4.5.2.1 Características fundamentales en RMN derivadas de la sustitución en las posiciones C-5 y C-6.

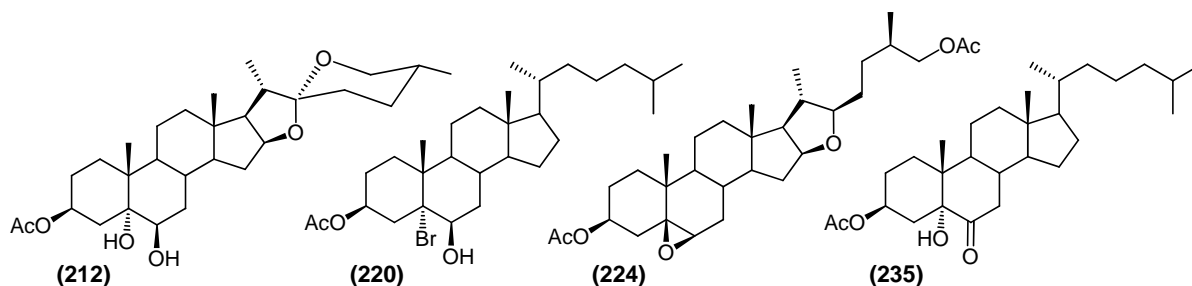
La sustitución en las posiciones C-5 y C-6 está asociada a una serie de características que permiten la identificación y orientación espacial de los sustituyentes. En general los espectros protónicos de los compuestos con la agrupación $5\alpha,6\beta$ -diol se caracterizan por la presencia del

multiplete correspondiente al protón carbinólico ecuatorial H-6 α . El desblindaje de las señales correspondientes a los protones del metilo CH₃-19 y al protón H-3 ax, sugieren las orientaciones de los hidroxilos en las posiciones C-5 y C-6. De manera semejante, la sustitución en la posición C-5 por un bromo produce el desblindaje del protón H-3 ax, efecto que corrobora la orientación α del sustituyente en C-5.

La introducción de la agrupación β -epóxido entre C-5–C-6 se caracteriza en el espectro de ¹H por la señal correspondiente al protón H-6 ec con la apariencia de doblete ($J = 2.4$ Hz), que indica su acoplamiento con el protón H-7 ec.

Por su parte, los espectros protónicos de los compuestos de tipo 6-ceto con sustituyentes (OH, Br) en la posición C-5, se caracterizan fundamentalmente por el desblindaje de las señales correspondientes a H-7 debido a la presencia de la agrupación carbonílica en C-6. La Tabla 13 muestra las características en RMN ¹H asociadas a la sustitución en las posiciones C-5 y C-6.

Tabla 13. Señales protónicas características de la sustitución en las posiciones C-5 y C-6 (δ ppm).



Compuestos	H-3	H-6	H-7	CH ₃ -19
212	5.16	3.54	2.18	1.20
220	5.47	4.18	2.18	1.31
224	4.75	3.08	2.17	1.02
235	5.03	-	2.75/2.09	0.80

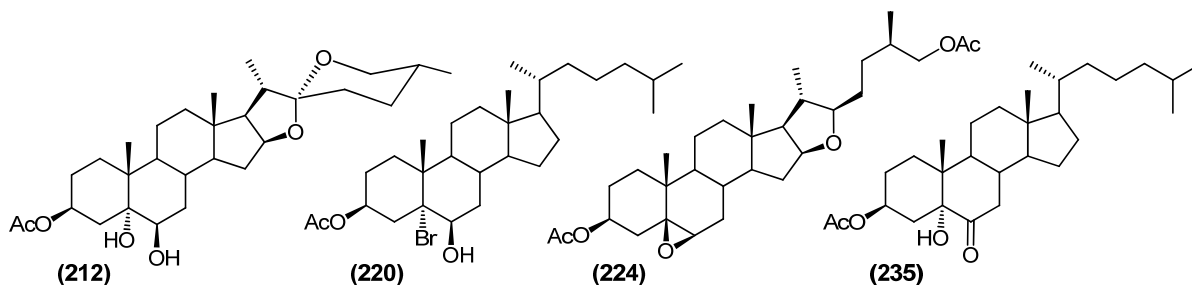
Los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos con el grupo $5\alpha,6\beta$ -diol presentan las señales asociadas a las agrupaciones hidroxílicas en C-5 y C-6. Además de apreciarse el desblindaje de las posiciones C-7 (debido al efecto que ejerce la función oxigenada en la posición β) y C-19 (asociado a la interacción 1,3 diaxial con el grupo hidroxilo en C-6), se observa el blindaje por el efecto γ de C-3, C-4 y C-8. Estos elementos corroboraron la orientación de los sustituyentes en C-5 y C-6.

La presencia de un átomo de Br en C-5 puede reconocerse en RMN ^{13}C por la presencia de la señal correspondiente a un carbono cuaternario alrededor de 86.7 ppm asociado a C-5 y por el desblindaje de C-4 y C-10 asociado al efecto β del átomo de bromo. El desblindaje de C-19 puede ser atribuido al efecto γ antiperiplanar que ejerce el átomo de bromo electronegativo sobre C-19, que unido al efecto producido por la interacción 1,3 diaxial entre el grupo hidroxilo en C-6 y el metilo en C-19, proporcionan elementos adicionales para asignar las orientaciones α y β axial de los sustituyentes en C-5 y C-6 respectivamente.

Por su parte, los espectros de ^{13}C de los compuestos $5\beta,6\beta$ -epóxido se caracterizan fundamentalmente por las señales blindadas de los carbonos C-5 y C-6, portadores de la nueva agrupación, y por el blindaje del metilo CH_3 -19 asociado a la interacción γ gauche, efecto que corrobora la orientación β del anillo oxirano.

La presencia de la agrupación carbonílica en C-6 está caracterizada en el espectro de RMN ^{13}C por la señal a campo bajo asociada al carbono carbonílico. Se destaca además el desblindaje de la posición C-7, debido al efecto que ejerce la función oxigenada en la posición β y el blindaje del metilo en la posición C-19, atribuido a la interacción γ gauche. La Tabla 14 muestra las características en RMN ^{13}C asociadas a la sustitución en las posiciones C-5 y C-6.

Tabla 14. Señales características en RMN ¹³C asociadas a la sustitución en las posiciones C-5 y C-6 (δ ppm).



Compuestos	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-19
212	26.7	71.1	37.0	75.6	76.1	34.9	29.9	16.5
220	26.4	72.2	38.4	86.7	75.7	34.6	30.6	18.2
224	27.1	71.2	37.9	62.4	63.3	36.6	29.4	17.0
235	26.3	70.7	32.4	80.3	212.4	41.7	37.3	13.9

4.5.2.2 Características fundamentales en RMN derivadas de la sustitución en el anillo A.

La sustitución ecuatorial 3β se caracteriza en RMN ¹H por la presencia de la señal correspondiente al protón H-3 ax, cuyo desplazamiento químico depende de la naturaleza del grupo enlazado a C-3. La apariencia de dddd no resuelto, asociado al acoplamiento axial-ecuatorial con los protones H-2α y H-4α y axial-axial con los protones H-2β y H-4β, corrobora la orientación del sustituyente en C-3.

En particular la sustitución ecuatorial por un grupo hidroxilo en C-3 está caracterizada por el blindaje de la señal correspondiente a H-3, la cual aparece alrededor de 4.46 ppm al sustituir el grupo hidroxilo en dicha posición por un grupo tosilato. Las señales desblindadas alrededor de 7.77 ppm y 7.32 ppm con la apariencia de doblete ($J= 8.2$ Hz) cada una, atribuidas respectivamente a los protones H-orto y H-meta del anillo aromático del éster sulfónico y la señal blindada en 2.43 ppm del singlete correspondiente al metilo del éster sulfónico introducido, evidencian la transformación realizada.

Por su parte, los espectros protónicos de los compuestos insaturados en la posición C-2, C-3 se caracterizan por la presencia de la señal con apariencia de multiplete, correspondiente a los protones olefinicos H-2 y H-3 que aparece desblindada alrededor de 5.60 ppm. Esta señal junto con las observadas en el espectro de RMN ^{13}C alrededor de 125.1 ppm y 122.3 ppm (asociadas a C-2 y C-3 respectivamente), constituyen los elementos fundamentales que caracterizan a los alquenos obtenidos.

En los espectros de RMN ^1H , la introducción de grupos hidroxilos orientados hacia la cara α en las posiciones C-2 y C-3 se caracterizan por las señales desblindadas correspondientes a H-2 y H-3. La señal del protón H-2 alrededor de 3.61 ppm con la apariencia de doble de doble de doble ($J= 11.1, 8.5, 5.3$ Hz) asociado al acoplamiento axial-axial con el protón H-1 α y axial-ecuatorial con los protones H-1 β y H-3 β , sugiere la orientación α ecuatorial del grupo hidroxilo enlazado a C-2, mientras que la señal del protón H-3 alrededor de 3.92 ppm con la apariencia de multiplete, sugiere la orientación α axial del grupo hidroxilo en C-3.

La configuración de los centros estereogénicos en C-2 y C-3 puede corroborarse con la ayuda del experimento NOESY. La fuerte correlación entre los protones H-2 β y el metilo CH₃-19 así como la correlación entre los hidroxilos en las posiciones C-3 y C-5 indican la orientación α cis de los grupos hidroxilos en las posiciones C-2 y C-3, (Figura 20 A).

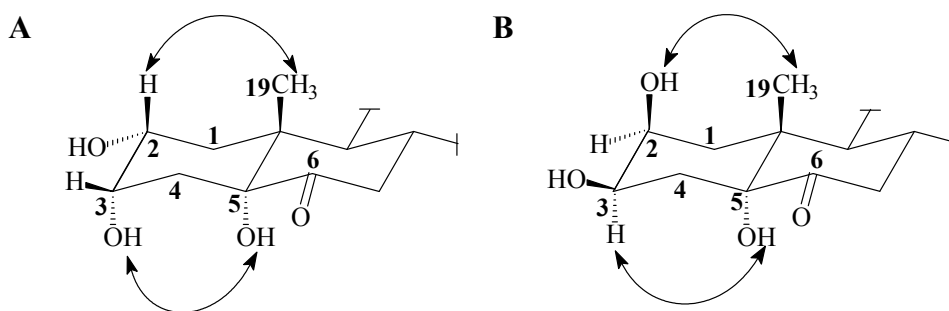
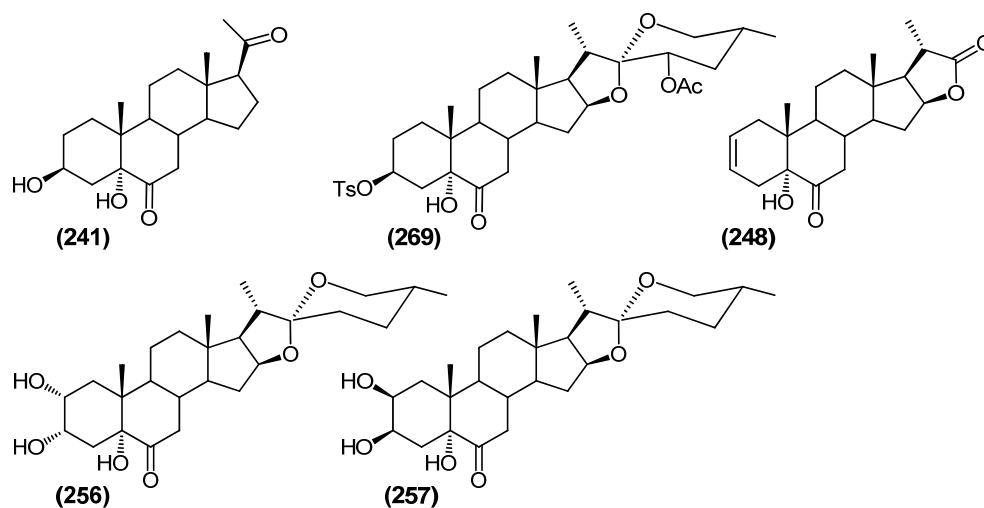


Figura 20. Correlación NOE que corrobora la configuración 2 α ,3 α -diol (A) y 2 β ,3 β -diol (B).

De manera semejante, la sustitución de grupos hidroxilos orientados hacia la cara β en las posiciones C-2 y C-3, se caracteriza en el espectro de RMN ^1H por la señal desblindada alrededor de 3.75 ppm con la apariencia de multiplete correspondiente a los protones H-2 y H-3. La fuerte correlación observada en el experimento NOESY entre los protones del OH-2 β y el metilo CH₃-19, así como entre el protón H-3 α y OH-5 α evidencia la orientación β cis de los sustituyentes en C-2 y C-3, (Figura 20 B). En la Tabla 15 se muestran los desplazamientos químicos en RMN ^1H que caracterizan los patrones de sustitución en el anillo A.

Tabla 15. Señales protónicas características asociadas a la sustitución en el anillo A (δ ppm).



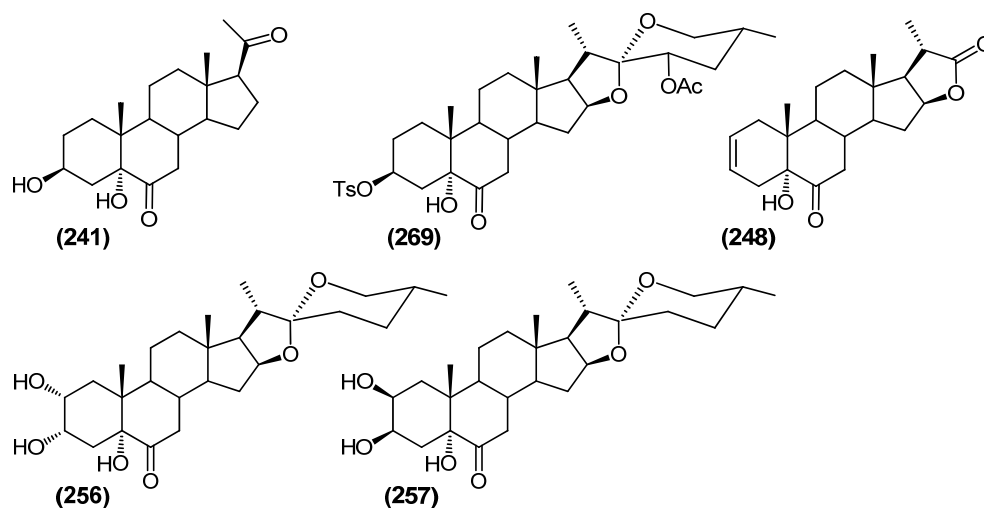
Compuestos	H-2	H-3	H-7ax	CH ₃ -19
241	1.26	3.70	2.71	0.66
269	1.75/1.64	4.46	2.71	0.77
248	5.60	5.60	2.72	0.67
256	3.61	3.92	2.56	0.69
257	3.75	3.75	2.67	0.88

El espectro de RMN ^{13}C de los compuestos sustituidos en el anillo A, se caracteriza por las señales desblindadas de los carbonos portadores de las modificaciones en dicho anillo. En particular la sustitución por el grupo sulfonilo en C-3, se caracteriza por las señales alrededor de 144.6 ppm, 127.6 ppm, 129.8 ppm, 134.3 ppm y 21.6 ppm asociadas al anillo aromático y metilo

del ester sulfónico. Adicionalmente, la señal desblindada alrededor de 79.2 ppm asociada al carbono C-3 portador de la modificación, corrobora la transformación realizada.

Por su parte, los compuestos sustituidos por grupos hidroxilos en C-2 y C-3, se caracterizan en RMN ^{13}C por las señales desblindadas de los carbonos carbinólicos. La orientación α y β cis de los sustituyentes en C-2 y C-3 puede diferenciarse por la señal del CH_3 -19, la cual se blindada en los compuestos con la agrupación $2\alpha,3\alpha$ -diol respecto a su isómero con orientación β , debido a la ausencia de la interacción 1,3 diaxial (efecto δ) entre el CH_3 -19 y el hidroxilo en C-2, que se presenta en los compuestos con la agrupación $2\beta,3\beta$ -diol. En la Tabla 16 se muestran los desplazamientos químicos en RMN ^{13}C que caracterizan la sustitución en el anillo A. Las Figuras 32-43 (ANEXOS) muestran evidencias de las transformaciones realizadas.

Tabla 16. Señales características en RMN ^{13}C asociadas a la sustitución en el anillo A (δ ppm).



Compuestos	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	CH_3 -19
241	30.4	65.2	35.7	79.1	212.1	41.3	13.6
248	125.1	122.3	34.3	82.4	211.0	42.3	14.4
256	66.4	69.3	34.4	79.1	210.3	41.1	14.5
257	68.2	67.0	36.6	79.3	212.1	41.3	15.8

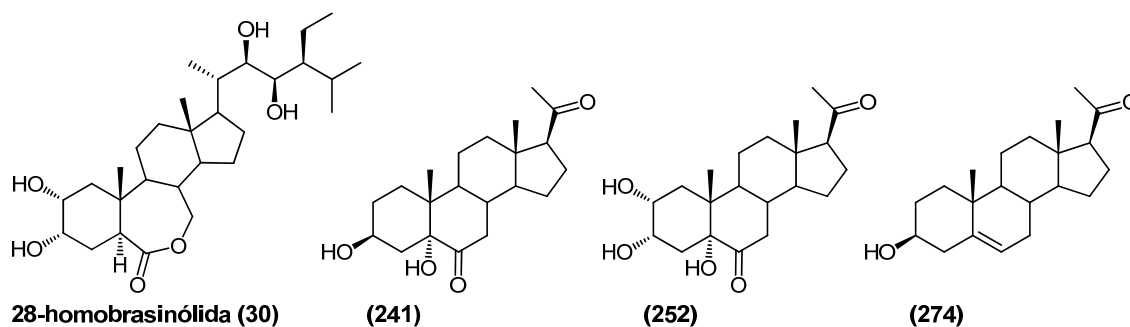
4.6. Actividad biológica de algunos de los compuestos sintetizados.

Varios de los compuestos sintetizados fueron sometidos al ensayo biológico del SIF. Algunos resultados que se muestran, manifiestan diferencias estadísticamente significativas con los correspondientes valores de las plantas control.

4.6.1. Actividad biológica de los análogos de BRs sintetizados con cadena lateral de tipo pregnano.

Los derivados con cadena lateral de tipo pregnano **241** y **252**, así como la pregnenolona (**274**) disponible en nuestro laboratorio, fueron sometidos al ensayo biológico del SIF, donde se utilizó homobrasinólida (**30**) como control positivo y el vehículo (lanolina) como control negativo. Los compuestos fueron probados a concentraciones desde 1 pg hasta 1 ng por planta, y los resultados obtenidos del análisis estadístico evidenciaron que sólo la homobrasinólida (**30**) a la concentración más baja probada y el derivado **241** a dos de las concentraciones probadas, fueron estadísticamente significativos. Los derivados **252** y **274** fueron inactivos a las concentraciones probadas. En la Tabla 17 y en la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 17. Diferencia relativa de la longitud del segundo internodo (%).



Dosis(ng/planta)	Homobrasinólida (30)	241	252	274
0.001	29.95 ± 3.15	24.90 ± 2.40	20.20 ± 2.12	27.57 ± 2.64
0.010	21.57 ± 2.26	38.87 ± 3.83	26.87 ± 2.77	25.26 ± 2.62
0.100	24.34 ± 2.33	33.26 ± 2.92	31.15 ± 3.03	30.46 ± 2.48
1.000	25.68 ± 2.40	33.49 ± 2.85	24.90 ± 2.40	30.62 ± 2.91

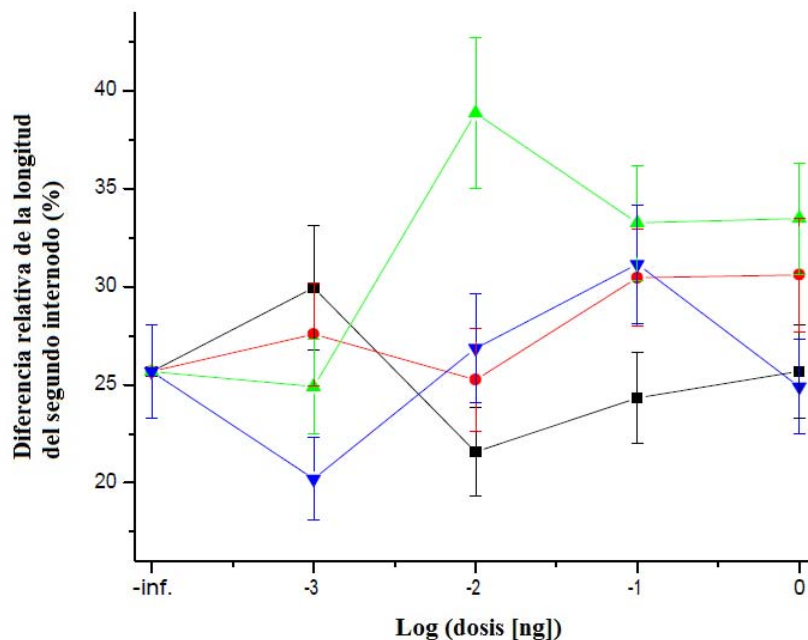
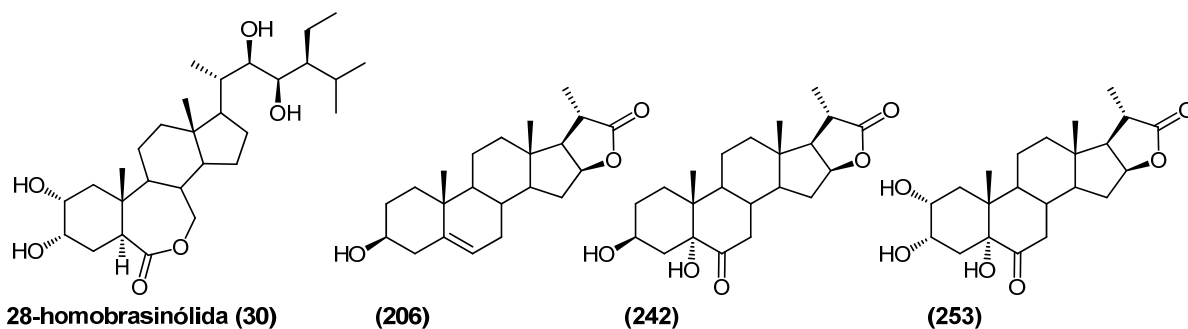


Figura 21. Actividad biológica de los compuestos sintetizados 241 (▲), 252 (▼), 274 (●) y la homobrasinólida (30) (■).

4.6.2. Actividad biológica de los análogos de BRs sintetizados con cadena lateral de tipo dinorcolano.

De manera semejante a la descrita en el epígrafe anterior, se evaluó la actividad de la vespertilina (206) y los derivados con cadena lateral de tipo dinorcolano 242 y 253 utilizando el ensayo biológico SIF. En la Tabla 18 y en la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos. El derivado 242 mostró una actividad similar a la de la homobrasinólida (30), aunque las estimaciones correspondientes de SD_{50} (dosis del compuesto que produce el 50% de elongación máxima) fueron de alguna manera inciertas, ya que estuvieron por debajo de la dosis más baja probada. Adicionalmente la vespertilina (206) y el derivado 253 fueron efectivos a dosis de un orden mayor de magnitud que los otros compuestos probados, pero indujeron una fuerte respuesta de máxima elongación.

Tabla 18. Respuesta de la máxima elongación estimada (IL_{max}) y la dosis de estimulación media (SD_{50}) de la elongación del segundo internodo en plantas de frijol tratadas con los compuestos estudiados.



Compuestos	$IL_{MAX}(mm)$	$SD_{50}(pg)$
30	5.7 ± 0.2	$< 1^*$
206	11.2 ± 1.1	11.3 ± 6.8
242	7.5 ± 1.3	$< 1^*$
253	9.0 ± 0.9	7.0 ± 4.5

* Debido a que la estimación estuvo por debajo de la menor dosis aplicada, el valor exacto es incierto.

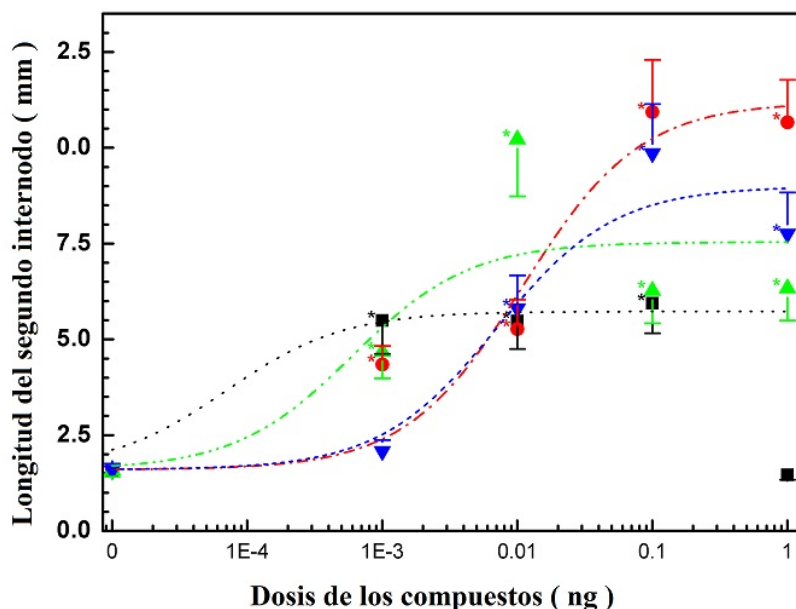
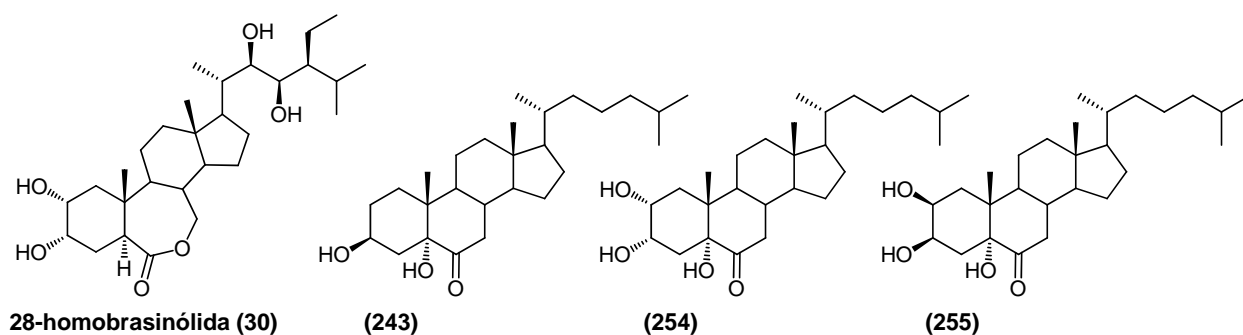


Figura 22. Actividad biológica de los compuestos sintetizados 206 (●), 242 (▲), 253 (▼) y la homobrasinólida (30) (■). La escala de la abscisa es logarítmica, por lo que la dosis cero fue arbitrariamente colocada como el comienzo de la gráfica. Los valores de longitud graficados son el resultado de las diferencias de longitud entre las plantas control y las plantas tratadas con los compuestos estudiados

4.6.3. Actividad biológica de los análogos de BRs sintetizados con cadena lateral de tipo colestano.

Por su parte los derivados del colesterol **243**, **254** y **255** también fueron sometidos al ensayo biológico del SIF, donde se utilizó homobrasinólida (**30**) como control positivo y el vehículo (lanolina) como control negativo. Los compuestos fueron probados a concentraciones desde 1 pg hasta 1 ng por planta, y los resultados obtenidos del análisis estadístico, evidenciaron la actividad promotora del crecimiento vegetal de los compuestos **243** y **254**. Ambos compuestos provocaron la máxima respuesta (mayor diferencia en la longitud del internodo medido para cada compuesto) cerca de la mostrada por la fitohormona natural **30** y su efecto en la menor dosis probada (1 pg/planta), fue al menos tan grande como el efecto observado por la homobrasinólida (**30**) (a esta dosis no hubo diferencia estadísticamente significativas entre los datos correspondientes a **30** y los datos de los compuestos **243** y **254**). En la Tabla 19 y en la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 19. Diferencias de la elongación del segundo internodo del frijol (mm).



Dosis(ng/planta)	Homobrasinólida 30	243	254	255
0.001	1.01 ± 0.28	2.25 ± 0.44 (*)	2.18 ± 0.29 (*)	0.72 ± 0.22
0.010	2.83 ± 0.68 (*)	2.04 ± 0.45 (*)	1.60 ± 0.40	0.72 ± 0.15
0.100	2.09 ± 0.41 (*)	2.15 ± 0.64	2.61 ± 0.37 (*)	1.26 ± 0.25
1.000	1.86 ± 0.22 (*)	1.48 ± 0.26	1.56 ± 0.28	1.39 ± 0.24

(*) Diferencia estadísticamente significativa del control en un ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de Dunn ($p < 0.05$). La longitud de los internodos de las plantas control fue sustraída de la longitud de los internodos de las plantas tratadas con los compuestos estudiados.

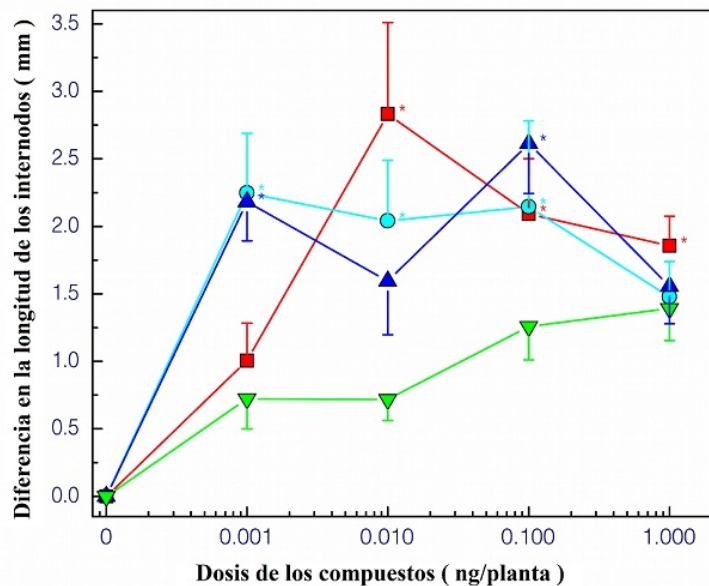


Figura 23. Actividad biológica de los compuestos del colesterol 243 (●), 254 (▲), 255 (▼) y la homobrasinólida (30) (■). La escala de la abscisa es logarítmica, por lo que la dosis cero fue arbitrariamente colocada como el comienzo de la gráfica. Los valores de longitud graficados son el resultado, de las diferencias de longitud entre las plantas control y las plantas tratadas con los compuestos estudiados, por lo que a dosis cero, la longitud es cero.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Condiciones Generales.

Las reacciones fueron monitoreadas utilizando cromatografía de capa delgada (CCD) en cromatoplasmas de gel de sílice (ALUGRAM[®] SIL G/UV254) de MACHEREY-NAGEL con 0.1 mm de espesor. Las placas cromatográficas fueron reveladas con solución de vainillina al 1% en ácido perclórico al 50% y calentadas hasta aparición de color.

Los puntos de fusión fueron medidos con un equipo Melt-Temp II y no fueron corregidos.

Los espectros de RMN fueron registrados en CDCl₃ o solución de DMSO-d₆ en un espectrómetro Varian INOVA de 400 o 300 MHz utilizando la señal del disolvente no deuterado como referencia. En algunos casos fue necesaria la adición de gotas de metanol deuterado para lograr la disolución del compuesto. La asignación de las señales en RMN fue realizada con la ayuda de la técnica en 2D HSQC y en los compuestos finales se empleó la combinación de técnicas de correlación homonuclear (¹H-¹H) y heteronuclear (¹H-¹³C) en 2D, donde se incluyeron las técnicas COSY, NOESY y HMBC. Todos los espectros de RMN 2D se registraron con las secuencias de pulsos estándares y los parámetros recomendados por el fabricante.

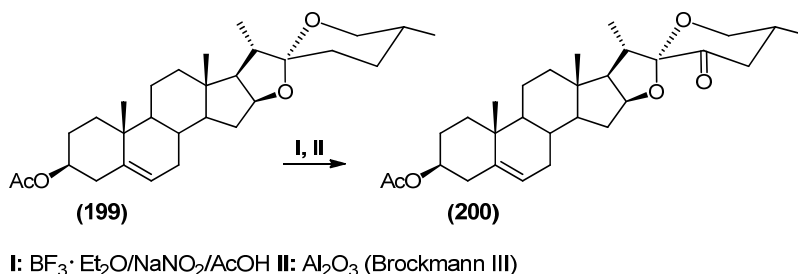
Los EM fueron registrados en un espectrómetro de masa Termo-Electrón modelo DFS. Las mediciones de rayos X se realizaron en un difractor Oxford Diffraction Atlas (Gemini).

5.1.1. Preparación de la solución de OsO₄ en *ter*-butanol.

A una disolución de tetróxido de osmio (1.00 g) en alcohol *ter*butílico (80 mL) se le añade 10 gotas de hidroperóxido de *ter*butilo al 70 % produciéndose una solución de concentración 12.5 mg/mL.

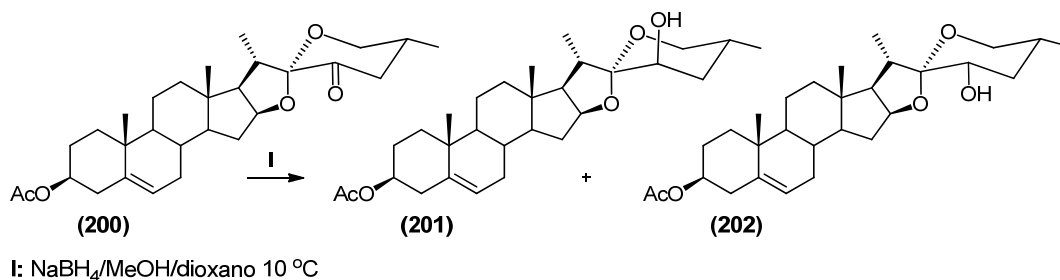
5.2. Síntesis de las cadenas laterales.

5.2.1. (25*R*)-3β-Acetoxi-espirost-5-en-23-ona (200).



A una suspensión de acetato de diosgenina **199** (3.00 g, 6.57 mmol) en ácido acético (75 mL), se le adiciona $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.69 mL) y durante 45 min se adiciona en pequeñas porciones NaNO_2 (0.53 g). Se repite la adición de las mismas cantidades de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y NaNO_2 , se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 1h y se vierte la mezcla de reacción sobre 200 mL de H_2O /hielo. El sólido formado se filtra al vacío, se lava con abundante agua, se disuelve en acetato de etilo (200 mL) y se lava con disolución de Na_2CO_3 5% (2 x 50 mL), con H_2O (1 x 50 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 50 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora al vacío obteniendo un aceite amarillo que se disuelve en la menor cantidad de benceno y unas gotas de hexano. Se vierte en una columna previamente empaquetada con Al_2O_3 actividad Brockman III, la columna se deja cerrada y tapada durante toda la noche y se eluye utilizando el sistema de solvente hexano/acetato de etilo 10:1 para obtener 1.09 g (2.32 mmol, 35 %) del acetato de 23-oxo diosgenina **200**. P.F. 190-192 °C (*de acetato de etilo/hexano*). Lit. 191-192.5 °C (*de acetato de etilo/hexano*)⁹⁵ **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.35 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-6), 4.64 – 4.54 (m, 2H, H-16, H-3), 3.78 (dd, $J = 11.3, 11.3$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.58 (ddd, $J = 11.2, 4.6, 1.4$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 2.87 (q, $J = 6.9$ Hz, H-20), 2.49 – 2.38 (m, 2H, H-24), 2.36 – 2.21 (m, 3H, H-4, H-25), 2.02 (s, 3H, CH_3COO -3), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19), 0.93 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3 -27), 0.78 (s, 3H, CH_3 -18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.8 C-5, 122.2 C-6, 32.0 C-7, 31.4 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.5 C-12, 40.7 C-13, 56.5 C-14, 31.8 C-15, 83.3 C-16, 61.7 C-17, 16.0 C-18, 19.3 C-19, 34.8 C-20, 14.4 C-21, 109.8 C-22, 201.8 C-23, 45.3 C-24, 35.8 C-25, 65.6 C-26, 17.1 C-27, 170.5 CH_3COO -3, 21.4 CH_3COO -3. **Análisis Elemental.** observado C 73.84 % H 8.58 %, estimado para $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_5$ C 74.01 % H 8.99 %.

5.2.2. 3-Monoacetato de (23*R*,25*R*)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (201) y 3-monoacetato de (23*S*,25*R*)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (202).



A una disolución fría (10 °C) de acetato de 23-oxo diosgenina **200** (561.7 mg, 1.2 mmol) en MeOH (21 mL) y dioxano (4 mL), se le adiciona lentamente NaBH₄ (180 mg) y la mezcla se agita durante 180 min. Se repite la adición de NaBH₄ (18.0 mg) y se mantiene la agitación durante 10 min antes de adicionar acetona (2 mL). Se evapora el disolvente al vacío y el sólido obtenido se disuelve en acetato de etilo (50 mL). La fase orgánica se lava con H₂O (4 x 15 mL), con disolución saturada de NaCl (3 x 15 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora para obtener 567.3 mg de la mezcla de los alcoholes **201** y **202**, los cuales se separan en una columna cromatográfica utilizando como eluyente el sistema de solvente hexano/acetato de etilo 8:1.

5.2.2.1 3-Monoacetato de (23*R*,25*R*)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (201)

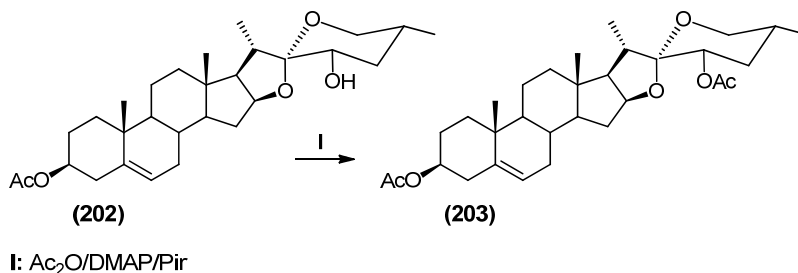
Rend. 27.2 mg, (0.058 mmol, 5 %). **P.F.** 240-242 °C (*de acetona/agua*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.37 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.60 (tdd, J = 10.3, 6.1, 4.2 Hz, 1H, H-3), 4.47 (td, J = 7.8, 5.7 Hz, 1H, H-16), 3.60 (dt, J = 9.6, 2.6 Hz, 1H, H-23), 3.50 (ddd, J = 10.8, 5.1, 1.4 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.43 (dd, J = 11.2, 11.2 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.31 (dd, J = 9.0, 3.7 Hz, 2H, H-4), 2.25 (td, J = 12.7, 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.11 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃-21), 1.03 (s, 3H, CH₃-19), 0.81 (s, 3H, CH₃-18), 0.80 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃-27). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 37.0 C-1, 27.7 C-2, 73.9 C-3, 38.1 C-4, 139.7 C-5, 122.3 C-6, 32.1 C-7, 31.5 C-8, 50.0 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.4 C-12, 40.7 C-13, 56.5 C-14, 32.0 C-15, 81.4 C-16, 64.0 C-17, 16.1 C-18, 19.3 C-19, 40.6 C-20, 16.8 C-21, 108.4 C-22, 70.8 C-23, 36.3 C-24, 24.2 C-25, 66.3 C-26, 16.8 C-27, 170.5 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3. **EM** (IE, 70 eV): 472 M⁺, 456, 455, 454, 439, 412, 395, 394, 387, 379, 377, 329, 328, 327, 326, 313, 296, 282, 255, 254, 253 (100%), 237, 213,

197, 175, 161, 157, 145, 141, 133, 109, 95, 85, 81, 69. **EM-AR** (IE): observado 472.3183, estimado para $C_{29}H_{44}O_5$ 472.3183.

5.2.2.2 3-Monoacetato de (23S,25R)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (202).

Rend 451.7 mg (0.96 mmol, 80 %). **P.F.** 166-168 °C (*de metanol*). **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 5.36 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-6), 4.59 (tdd, $J = 10.4, 6.2, 4.2$ Hz, 1H, H-3), 4.46 (dt, $J = 8.9, 7.2$ Hz, 1H, H-16), 3.46 (td, $J = 11.4, 5.0$ Hz, 1H, H-23), 3.40 (ddd, $J = 10.8, 4.7, 2.0$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.24 (dd, $J = 11.1, 11.1$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.58 – 2.49 (m, 1H, H-20), 2.30 (dd, $J = 9.2, 3.7$ Hz, 2H, H-4), 2.02 (s, 3H, CH_3 -3), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19), 0.94 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.82 (s, 3H, CH_3 -18), 0.81 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 -27). **RMN ^{13}C** (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.7 C-5, 122.2 C-6, 32.0 C-7, 31.2 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.8 C-12, 40.7 C-13, 56.3 C-14, 31.8 C-15, 81.5 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 19.3 C-19, 35.5 C-20, 14.1 C-21, 110.6 C-22, 67.0 C-23, 38.5 C-24, 30.8 C-25, 65.9 C-26, 16.6 C-27, 170.5 CH_3 -COO-3, 21.4 CH_3 -COO-3. **Análisis Elemental** observado C 73.54 % H 9.30 %, estimado para $C_{29}H_{44}O_5$ C 73.69 % H 9.38 %.

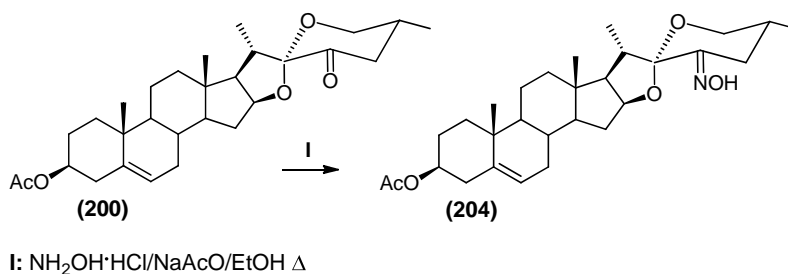
5.2.3. Diacetato de (23S,25R)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (203).



A una disolución del alcohol **202** (947.4 mg, 2 mmol) en piridina (15 mL) y anhídrido acético (3 mL) se le adicionan unos cristales de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche antes de verterla sobre agua/hielo. El sólido formado se filtra al vacío y se lava con abundante agua antes de disolverlo en acetato de etilo (200 mL). El extracto orgánico resultante se lava con disolución de $CuSO_4$ 10% (2 x 50 mL), con H_2O (2 x 50 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 50 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora para obtener 1.01 g (1.95 mmol, 98 %) del compuesto diacetilado **203**. **P.F.** 188-190 °C (*de*

acetona). **RMN ¹H** (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm 5.37 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.82 (dd, *J* = 11.8, 4.8 Hz, 1H, H-23), 4.59 (tdd, *J* = 10.3, 5.8, 4.3 Hz, 1H, H-3), 4.46 (td, *J* = 7.7, 6.4 Hz, 1H, H-16), 3.42 (ddd, *J* = 10.8, 4.7, 1.8 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.35 (dd, *J* = 11.0, 11.0 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.30 (dd, *J* = 9.8, 3.3 Hz, 1H, 2H, H-4), 2.13 – 2.05 (m, 1H, H-20), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-23), 2.02 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.03 (s, 3H, CH₃-19), 0.95 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.82 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH₃-27), 0.82 (s, 3H, CH₃-18). **RMN ¹³C** (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.7 C-5, 122.3 C-6, 32.0 C-7, 31.4 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.6 C-12, 40.7 C-13, 56.4 C-14, 31.8 C-15, 81.2 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 19.3 C-19, 35.9 C-20, 14.1 C-21, 108.6 C-22, 68.7 C-23, 34.0 C-24, 30.7 C-25, 65.7 C-26, 15.9 C-27, 170.6 CH₃COO-23, 170.5 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3, 21.1 CH₃COO-23. **EM** (IE, 70 e⁻V): 514 M⁺, 456, 455, 454, 400, 388, 387, 369, 329, 328, 327 (100 %), 326, 313, 283, 282, 267, 254, 253, 214, 213, 197, 173, 159, 145, 133, 105, 85, 83, 81, 67. **EM-AR** (IE): observado 514.3263 calculado para C₃₁H₄₆O₆ 514.3289.

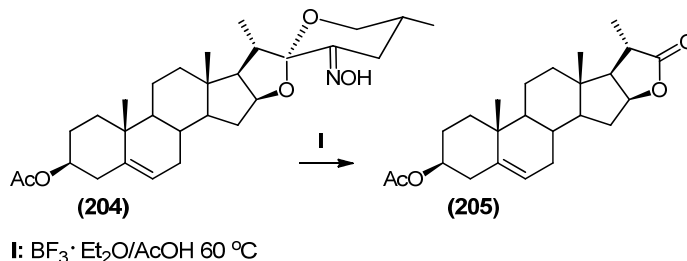
5.2.4. Acetato de (25*R*)-23-hidroximino-espirost-5-en-3β-ol (204).



A una suspensión de acetato de 23-oxo diosgenina **200** (1.58 g, 3.59 mmol) en EtOH (100 mL) y 1,4-dioxano (5 mL), se le adiciona una disolución de NaAcO (0.60 g, 7.32 mmol) en agua (5 mL) y una disolución de NH₂OH·HCl (0.6 g, 8.63 mmol) en agua (3 mL). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 h, se evapora la mitad del disolvente al vacío y se vierte sobre H₂O/hielo. El sólido formado se filtra al vacío y se lava con abundante agua para obtener 1.59 g (3.27 mmol, 91 %) de la oxima **204**. **P.F.** 208-210 °C (*de acetato de etilo/hexano*). Lit. 208.5-211 °C (*de acetato de etilo/hexano*)⁹⁵ **RMN ¹H** (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm 8.38 (s, 1H, C=N-OH), 5.35 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-6), 4.63-4.52 (m, 1H, H-3), 4.46 (dd, *J* = 15.2 Hz, 7.4 Hz, 1H, H-16), 3.60 (dd, *J* = 11.2, 11.2 Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.51 (dd, *J* = 10.7 Hz, 3.6 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.31 (dd, *J* = 14.0 Hz, 2.5 Hz, 1H, H-24_{ec}), 2.83-2.75 (m, 1H, H-20), 2.31 (m, 2H, H-4), 2.02 (s, 3H,

$\text{CH}_3\text{COO-3}$) 1.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-19}$), 0.97 (d, $J=7.0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-21}$), 0.88 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-27}$), 0.79 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-18}$). **RMN** ^{13}C (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 28.2 C-2, 73.9 C-3, 38.0 C-4, 139.7 C-5, 122.2 C-6, 32.0 C-7, 31.8 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.8 C-11, 39.7 C-12, 40.6 C-13, 56.4 C-14, 31.6 C-15, 81.5 C-16, 61.1 C-17, 16.2 C-18, 19.3 C-19, 35.9 C-20, 14.4 C-21, 108.6 C-22, 154.5 C-23, 27.7 C-24, 31.3 C-25, 65.7 C-26, 17.0 C-27, 170.5 $\text{CH}_3\text{COO-3}$, 21.4 $\text{CH}_3\text{COO-3}$. **EM** (IE, 70 e $^-$ V): 487 $[\text{M}+2]^+$, 485 M^+ , 470, 469, 468, 450, 438, 426, 425, 408, 392, 390, 378, 364, 328, 327, 326, 284, 283, 282 (100%), 267, 253, 239, 225, 214, 213, 197, 183, 175, 168, 145, 133, 121, 107, 105, 91, 83, 81, 79, 55.

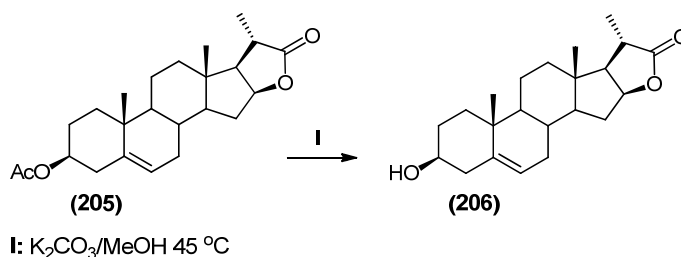
5.2.5. Lactona 22 \rightarrow 16 del ácido 3 β -acetoxi-16 β -hidroxibisnorcol-5-énico, (acetato de vespertilina) (205).



A una disolución de la oxima **204** (1.36 g, 2.81 mmol) en AcOH (28 mL) se le adiciona $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1.46 mL) y la mezcla se calienta a 60 °C durante 150 min antes de precipitarla sobre H_2O /hielo (40 mL) y filtrarla al vacío. El sólido obtenido se lava con abundante agua y se disuelve con acetato de etilo (100 mL). El extracto orgánico se lava con H_2O (2 x 25 mL), con disolución de Na_2CO_3 5% (3 x 25 mL), con H_2O (2 x 25 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 25 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora al vacío para obtener 1.12 g del producto crudo el cual se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente el sistema hexano/acetato de etilo 8.5:1.5 para obtener 1.02 g (2.6 mmol, 93 %) del acetato de vespertilina **205**. **P.F.** 210-212 °C (*de acetato de etilo/hexano*). Lit. 212-215 °C (*de acetona/hexano*)⁹⁶ **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.36 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-6), 4.94 (td, $J=7.8, 4.7$ Hz, 1H, H-16), 4.58 (tdd, $J=10.4, 6.3, 4.2$ Hz, 1H, H-3), 2.58 (qd, $J=7.6, 0.8$ Hz, 1H, H-20), 2.31 (dd, $J=8.6, 4.3$ Hz, 2H, H-4), 2.26 (dd, $J=13.7, 7.6$ Hz, 1H, H-15), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-3}$), 1.31 (d, $J=7.7$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-21}$), 1.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-19}$), 0.76 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-18}$). **RMN** ^{13}C (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.7 C-3, 38.0 C-4, 139.8 C-5, 121.9 C-6, 31.8 C-7, 31.2 C-8, 50.0 C-9, 36.6 C-10,

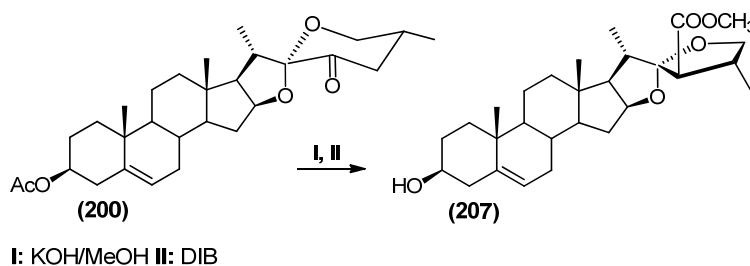
20.3 C-11, 38.1 C-12, 41.4 C-13, 54.7 C-14, 33.1 C-15, 82.7 C-16, 58.9 C-17, 13.7 C-18, 19.3 C-19, 36.0 C-20, 18.0 C-21, 181.3 C-22, 170.5 $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}\text{O}-3$, 21.4 $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C}\underline{\text{O}}\text{O}-3$.

5.2.6. Lactona 22→16 del ácido 3β,16β-dihidroxibisnorcol-5-énico, (vespertilina) (206).



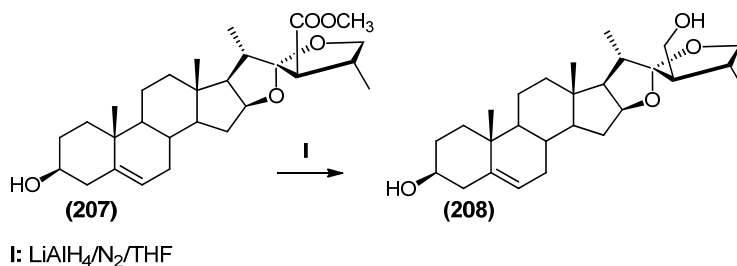
Una suspensión del acetato de vespertilina **205** (68.0 mg, 0.18 mmol) en una disolución de metanol (2 mL) saturada con K_2CO_3 se agitó a 45 °C durante 40 min y se vertió en agua. Después de acidular con HCl 6N hasta $\text{pH} = 1$, la mezcla se deja en reposo durante 20 min y se enfría. El sólido producido se filtra al vacío, se disuelve en una mezcla de acetato de etilo/éter etílico, se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora para obtener 60.0 mg (0.17 mmol, 97 %) de vespertilina **206**. **P.F.** 224-226 °C (*de acetato de etilo/hexano*). Lit. 225-226 °C⁹⁷ **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.33 (m, 1H, H-6), 4.94 (ddd, $J=7.8$ Hz, 4.7 Hz, 1H, H-16), 3.50 (m, 1H, H-3), 2.58 (qd, $J=7.6$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H-20), 1.30 (d, $J=7.6$ Hz, 3H, CH_3 -21), 1.01 (s, 3H, CH_3 -19), 0.75 (s, 3H, CH_3 -18). **RMN** ^{13}C (100 MHz) δ ppm 37.2 C-1, 31.5 C-2, 71.6 C-3, 42.1 C-4, 140.9 C-5, 120.9 C-6, 31.8 C-7, 31.2 C-8, 50.1 C-9, 36.5 C-10, 20.3 C-11, 38.2 C-12, 41.4 C-13, 54.8 C-14, 33.1 C-15, 82.7 C-16, 58.9 C-17, 13.7 C-18, 19.4 C-19, 36.0 C-20, 18.0 C-21, 181.4 C-22.

5.2.7. (2*S*,23*R*,24*R*)-16 β ,22:22,25-Diepoxi-23-carboximetil-24-metil-26,27-dinorcolest-5-en-3 β -ol (207).



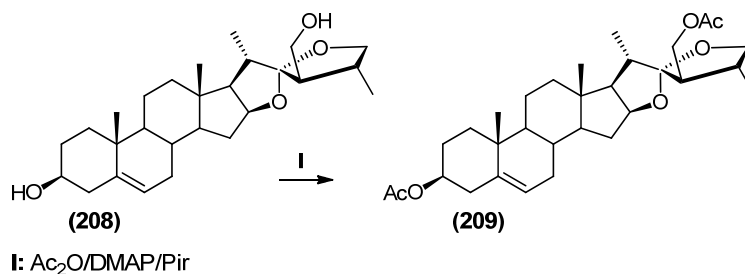
A una suspensión de acetato de 23-oxo diosgenina **200** (1.30 g, 2.77 mmol) en MeOH (89 mL) se le adiciona KOH (1.39 g) y la mezcla se calienta en baño de agua hasta disolución total de la materia prima. La mezcla se enfría a temperatura ambiente, se adiciona DIB (892.5 mg, 2.77 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 15 min antes de evaporar la mitad del disolvente y verterla sobre agua/hielo. El sólido producido se filtra al vacío, se lava con abundante agua y se seca para obtener 1.30 g del producto crudo el cual se purifica por cromatografía en columna utilizando un gradiente del sistema diclorometano/acetona de 10:1 a 8:1 para obtener 532.4 mg (1.16 mmol, 42 %) del éster **207**. **P.F.** 166-168 °C (*de acetato de etilo/hexano*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ ppm 5.36 – 5.32 (m, 1H, H-6), 4.43 (td, *J* = 7.6, 6.1 Hz, 1H, H-16), 4.03 (dd, *J* = 7.7, 7.7 Hz, 1H, H-25 *pro-S*), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.56 – 3.45 (m, 2H, H-3 y H-25 *pro-R*), 2.85 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-23), 2.71 – 2.59 (m, 1H, H-24), 1.03 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-24'), 1.02 (s, 3H, CH₃-19), 0.95 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃-21), 0.79 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 37.2 C-1, 31.6 C-2, 71.7 C-3, 42.3 C-4, 140.8 C-5, 121.4 C-6, 32.0 C-7, 31.5 C-8, 50.0 C-9, 36.6 C-10, 20.8 C-11, 39.6 C-12, 40.8 C-13, 56.4 C-14, 31.9 C-15, 81.4 C-16, 62.6 C-17, 15.9 C-18, 19.4 C-19, 37.4 C-20, 15.5 C-21, 119.4 C-22, 59.7 C-23, 172.5 C-23', 37.5 C-24, 15.4 C-24', 72.5 C-25, 51.8 OCH₃. **EM** (EI, 70 e⁻V): 458 M⁺, 440, 428, 411, 393, 369, 345, 327, 301, 300, 282, 267, 253, 241, 230, 213, 184, 183 (100%), 171, 159, 145, 133, 105, 86, 83, 69. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 458.3022 calculado para C₂₈H₄₂O₅ 458.3027

5.2.8. (2*S*,23*R*,24*R*)-16 β ,22:22,25-Diepoxi-23-hidroxi-24-metil-26,27-dinorcolest-5-en-3 β -ol (208).

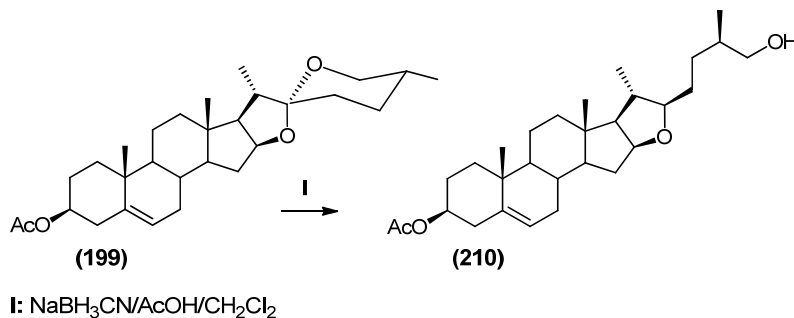


Una solución del éster **207** (430.0 mg, 0.94 mmol) en THF seco (15 mL) se adiciona lentamente a una suspensión en reflujo de LiAlH₄ (325 mg) en THF (18 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se calienta a reflujo durante 30 min, se enfría en un baño de hielo y se adiciona lentamente acetato de etilo (50 mL) para destruir el exceso de LiAlH₄. La fase orgánica se lava con agua (5 x 20 mL), con disolución saturada de NaCl (2 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora para obtener 366.9 mg (0.85 mmol, 90 %) del diol **208**. **P.F.** 206-208 °C (*de metanol*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.34 (dd, $J = 3.1, 2.1$ Hz, 1H, H-6), 4.44 (ddd, $J = 8.4, 7.6, 6.5$ Hz, 1H, H-16), 3.96 (dd, $J = 7.7, 7.5$ Hz, 1H, H-25 *pro-S*), 3.81 – 3.68 (m, 2H, H-23'a y H-23'b), 3.51 (m, 1H, H-3), 3.43 (dd, $J = 9.2, 8.3$ Hz, 1H, H-25 *pro-R*), 2.43 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-20), 2.32 – 2.19 (m, 2H, H-4), 1.08 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃-24'), 1.02 (s, 3H, CH₃-19), 1.01 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.83 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 37.2 C-1, 31.6 C-2, 71.7 C-3, 42.3 C-4, 140.8 C-5, 121.4 C-6, 32.0 C-7, 31.5 C-8, 50.0 C-9, 36.6 C-10, 20.8 C-11, 39.7 C-12, 40.8 C-13, 56.4 C-14, 31.9 C-15, 80.9 C-16, 62.7 C-17, 16.3 C-18, 19.4 C-19, 35.8 C-20, 16.2 C-21, 120.2 C-22, 55.7 C-23, 62.5 C-23', 36.9 C-24, 16.4 C-24', 72.2 C-25. **EM** (EI, 70 eV): 430 M⁺, 413, 412, 397, 370, 369, 346, 345, 328, 327, 302, 301, 300, 282, 267, 253, 241, 227, 197, 189, 161, 159, 156, 155 (100%), 135, 105, 91, 69, 67. **EM-AR** (EI, 70 eV): observado 430.3084 calculado para C₂₇H₄₂O₄ 430.3078.

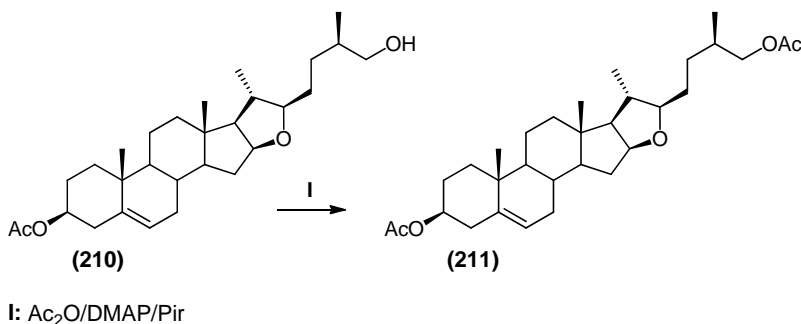
5.2.9. Diacetato de (22*S*,23*R*,24*R*)-16 β ,22:22,25-diepoxi-23-hidroxi-24-metil-26,27-dinorcolest-5-en-3 β -ol (209).



A una disolución del diol **208** (366.9 mg, 0.85 mmol) en piridina (3.3 mL) se le adiciona anhídrido acético (0.68 mL) y unos cristales de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche antes de verterla sobre disolución de HCl 3%/hielo (23 mL). La mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 25 mL) y el extracto orgánico resultante se lava con H₂O (5 x 25 mL), con disolución de CuSO₄ 10% (2x 25 mL), con H₂O (2 x 25 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 25 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora para obtener 413.3 mg (0.80 mmol, 94 %) del compuesto diacetilado **209**. **P.F.** 142-144 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.35 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H-6), 4.58 (tdd, J = 10.4, 6.1, 4.2 Hz, 1H, H-3), 4.42 (td, J = 7.6, 6.2 Hz, 1H, H-16), 4.13 (dd, J = 6.8, 3.1 Hz, 2H, H-23'a y H-23'b), 3.92 (dd, J = 7.7, 7.7 Hz, 1H, H-25 *pro-S*), 3.41 (dd, J = 10.0, 8.3 Hz, 1H, H-25 *pro-R*), 2.35 – 2.24 (m, 3H, H-4 y H-20), 2.19 – 2.10 (m, 1H, H-23), 2.05 (s, 3H, CH₃COO-3), 2.01 (s, 3H, CH₃COO-23'), 1.05 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃-24'), 1.02 (s, 3H, CH₃-19), 0.98 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃-21), 0.81 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.6 C-5, 122.3 C-6, 32.0 C-7, 31.4 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.5 C-12, 40.8 C-13, 56.3 C-14, 31.8 C-15, 80.9 C-16, 62.8 C-17, 16.2 C-18, 19.3 C-19, 35.9 C-20, 16.1 C-21, 119.7 C-22, 52.6 C-23, 63.6 C-23', 37.5 C-24, 15.7 C-24', 71.8 C-25, 20.9 CH₃COO-23', 21.4 CH₃COO-3, 170.4 CH₃COO-3, 170.9 CH₃COO-23'. **EM** (EI, 70 eV): 515 [M+1]⁺, 514 M⁺, 511, 509, 502, 501, 500, 484, 455, 454, 424, 395, 394, 363, 328, 327, 326, 296, 283, 282 (100%), 267, 253, 227, 213, 158, 145, 137, 131, 105, 91, 81. **EM-AR** (EI, 70 eV): observado 514.3267 calculado para C₃₁H₄₆O₆ 514.3289

5.2.10. 3-Monoacetato de (22*R*,25*R*)-furost-5-en-3 β ,26-diol (210).

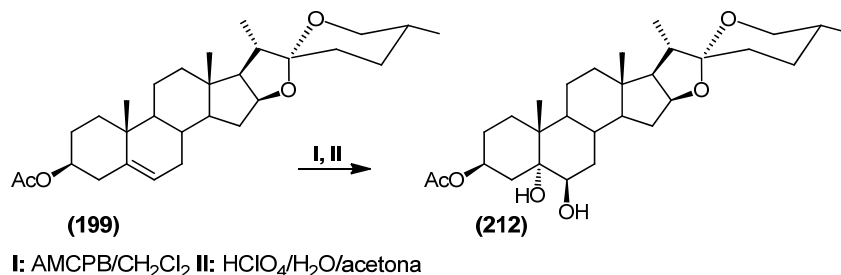
A una disolución de acetato de diosgenina **199** (9.12 g, 20.0 mmol) en ácido acético (100 mL) y diclorometano (49 mL) se le adiciona en pequeñas porciones cianoborohidruro de sodio (2.64 g) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h antes de verterla sobre H₂O (600 mL) y extraerla con acetato de etilo (3 x 100 mL). El extracto orgánico resultante se lava con agua (7 x 100 mL), con disolución saturada de Na₂CO₃ 5% (2 x 40 mL), con disolución saturada de NaCl (3 x 50 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora. El sólido obtenido se recristaliza en hexano (150 mL) para obtener 6.00 g (13.10 mmol, 66 %) del compuesto monoacetilado **210**. **P.F.** 106-108 °C (*de acetato de etilo/hexano*). Lit. 105-106 °C (*de acetato de etilo/hexano*)⁹⁸ **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.35 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-6), 4.57 (tdd, $J = 10.7, 6.5, 4.2$ Hz, 1H, H-3), 4.28 (td, $J = 7.7, 5.3$ Hz, 1H, H-16), 3.51–3.38 (m, 2H, H-26), 3.31 (td, $J = 8.1, 3.9$ Hz, 1H, H-22), 2.32 – 2.27 (m, 2H, H-4), 2.01 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.01 (s, 3H, CH₃-19), 0.98 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.79 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.0 C-4, 139.6 C-5, 122.3 C-6, 32.2 C-7, 31.5 C-8, 49.9 C-9, 36.6 C-10, 20.6 C-11, 39.3 C-12, 40.6 C-13, 56.8 C-14, 31.9 C-15, 83.1 C-16, 65.0 C-17, 16.4 C-18, 19.3 C-19, 37.9 C-20, 18.9 C-21, 90.3 C-22, 30.4 C-23, 30.1 C-24, 35.7 C-25, 67.9 C-26, 16.6 C-27, 170.5 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3.

5.2.11. Diacetato de (22*R*,25*R*)-furost-5-en-3 β ,26-diol (211).

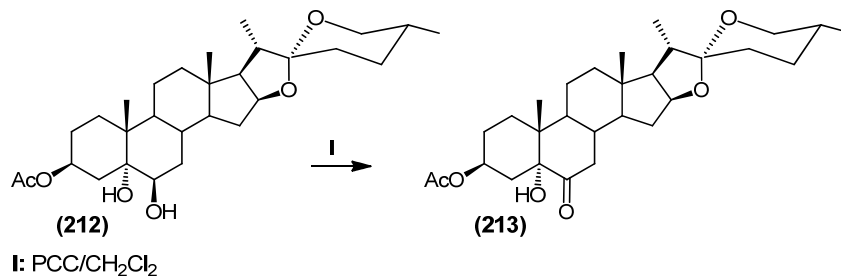
A una disolución del compuesto monoacetilado **210** (9.9 g, 21.6 mmol) en piridina (50 mL) se le adiciona anhídrido acético (20 mL) y unos cristales de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche antes de verterla sobre una solución en agitación de HCl 10%/hielo (600 mL). El sólido obtenido se filtra al vacío, se lava con abundante agua, se seca al vacío y se disuelve en CH₂Cl₂ (75 mL). El extracto orgánico resultante se lava con disolución de CuSO₄ 10% (2 x 30 mL), con H₂O (2 x 30 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 30 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora para obtener 10.15 g (20.3 mmol, 94 %) del furosteno diacetilado **211**. **P.F.** 116-117 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.58 (tdd, *J* = 10.7, 6.5, 4.2 Hz, 1H, H-3), 4.28 (td, *J* = 7.7, 5.2 Hz, 1H, H-16), 3.94 (dd, *J* = 10.2, 5.8 Hz, 1H, H-26), 3.84 (dd, *J* = 10.7, 6.9 Hz, 1H, sist ABX, H-26), 3.29 (td, *J* = 8.1, 4.2 Hz, 1H, H-22), 2.29 (dd, *J* = 7.3, 4.6 Hz, 2H, H-4), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-26), 2.01 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.02 (s, 3H, CH₃-19), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-21), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-27), 0.79 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 37.0 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.0 C-4, 139.6 C-5, 122.3 C-6, 32.2 C-7, 31.5 C-8, 50.0 C-9, 36.7 C-10, 20.6 C-11, 39.4 C-12, 40.6 C-13, 56.8 C-14, 31.9 C-15, 83.2 C-16, 65.1 C-17, 16.4 C-18, 19.3 C-19, 37.9 C-20, 18.9 C-21, 90.1 C-22, 30.4 C-23, 30.8 C-24, 32.7 C-25, 69.3 C-26, 16.7 C-27, 171.2 CH₃COO-3, 170.4 CH₃COO-26, 21.4 CH₃COO-3, 20.9 CH₃COO-26. **Análisis Elemental.** observado C 74.19 % H 9.05 % estimado para C₃₁H₄₈O₅ C, 74.36 % H 9.66 %.

5.3. Funcionalización de los anillos A y B.

5.3.1. (25R)-3β-Acetoxy-5α-espirostan-5,6β-diol (212) mediante un procedimiento de dos pasos: epoxidación y apertura del oxirano.

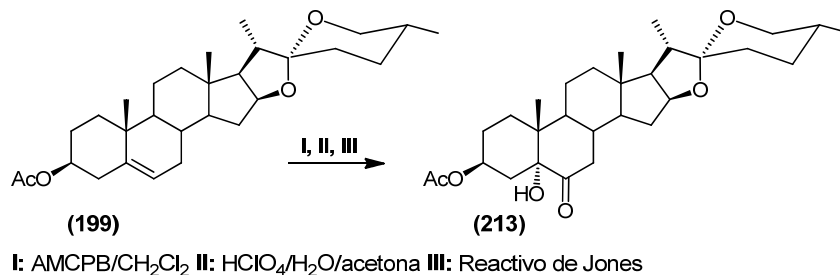


A una disolución de acetato de diosgenina **199** (4.56 g, 10.0 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) se le adiciona AMCPB (2.42 g) y la mezcla se agita hasta la desaparición de la materia prima (120 minutos). Posteriormente se adiciona disolución de sulfito de sodio (10 mL), acetona (50 mL) y una solución de ácido perclórico (15 mL HClO₄ en 15 mL H₂O) y la mezcla se agita durante 15 minutos. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (4 x 25 mL) y el extracto orgánico se lava con disolución saturada de NaCl (3 x 50 mL), con disolución de Na₂CO₃ al 10 % (3 x 20 mL), con disolución saturada de NaCl (2 x 50 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío. El sólido obtenido se disuelve en acetato de etilo (100 mL), se lava con disolución de Na₂CO₃ al 10 % (10 x 20 mL), con disolución saturada de NaCl (2 x 20 mL), con H₂O (2 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío. El producto obtenido se purifica por recristalización fraccionada utilizando como disolvente acetona para obtener 1.76 g (3.59 mmol, 36 %) del diol **212**. P.F. 269-270 °C (*de acetato de etilo, descomposición*). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.20-5.11 (m, 1H, H-3), 4.43-4.36 (m, 1H, H-16), 3.55-3.52 (q, *J*= 6 Hz, 1H, H-6), 3.48 (ddd, *J*= 10.7, 4.3, 1.8 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.36 (dd, *J*= 10.7, 10.7 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.18 (t, *J*= 12.2 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.20 (s, 3H, CH₃-19), 0.97 (d, *J*= 6.8 Hz, 3H, CH₃-21), 0.79 (d, *J*= 6.3 Hz, 3H, CH₃-27), 0.79 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (75.5 MHz) δ ppm 32.1 C-1, 26.7 C-2, 71.1 C-3, 37.0 C-4, 75.6 C-5, 76.1 C-6, 34.9 C-7, 29.9 C-8, 45.5 C-9, 38.4 C-10, 20.9 C-11, 39.9 C-12, 39.4 C-13, 55.7 C-14, 31.7 C-15, 80.8 C-16, 62.1 C-17, 16.7 C-18, 16.5 C-19, 41.6 C-20, 14.5 C-21, 109.3 C-22, 31.4 C-23, 28.8 C-24, 30.3 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27, 170.9 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3. EM FAB: 493 [M+3]⁺, 492 [M+2]⁺, 491 [M+1]⁺, 489, 473, 431, 413, 395, 358, 347, 311, 269, 251, 183, 159, 155, 154, 139, 107, 95, 81, 69, 55 (100%).

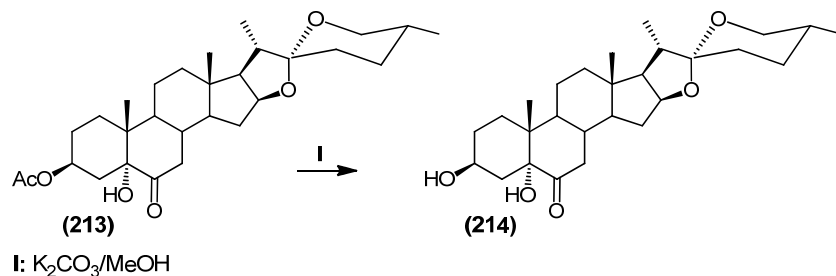
5.3.2. (25*R*)-3β-Acetoxy-5-hidroxi-5α-espirostan-6-ona (213).

Una disolución del diol **212** (490.7 mg, 1.0 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL) se adiciona a una suspensión en agitación de PCC (323.3 mg, 1.5 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL). La mezcla se agita durante 120 minutos, se adiciona PCC (161.7 mg, 0.75 mmol) y se continúa la agitación durante 60 minutos. Se adiciona éter etílico (25 mL), se agita y se filtra a través de una columna de gel de sílice lavando la columna con éter etílico (50 mL) y acetato de etilo (50 mL). Las fracciones colectadas se evaporan para obtener 480.9 mg (0.98 mmol, 98 %) del cetol **213**. P.F. 270 °C (*de acetato de etilo*). Lit. 268.6-269 °C⁹⁹ **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.07 – 4.97 (m, 1H, H-3), 4.40 (td, *J* = 7.5, 6.6 Hz, 1H, H-16), 3.46 (dd, *J* = 10.7, 2.9 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.35 (dd, *J* = 10.9, 10.9 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.77 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.12 (dd, *J* = 13.1, 4.0 Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.00 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-21), 0.82 (s, 3H, CH₃-19), 0.78 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃-27), 0.75 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.2 C-2, 70.5 C-3, 32.4 C-4, 80.2 C-5, 211.9 C-6, 41.8 C-7, 36.7 C-8, 44.3 C-9, 42.5 C-10, 21.2 C-11, 39.6 C-12, 41.1 C-13, 56.0 C-14, 31.5 C-15, 80.5 C-16, 62.0 C-17, 16.4 C-18, 14.0 C-19, 41.6 C-20, 14.4 C-21, 109.3 C-22, 31.3 C-23, 28.8 C-24, 30.3 C-25, 66.8 C-26, 17.1 C-27, 171.0 CH₃COO-3, 21.3 CH₃COO-3. **EM** (EI, 70 e⁻V): 488 M⁺, 429, 416, 389, 374, 359, 345, 341, 314, 296, 267, 239, 199, 181, 161, 147, 140, 139 (100 %), 121, 115, 109, 93, 69, 55.

5.3.3. (25R)-3β-Acetoxy-5-hidroxi-5α-espirostan-6-ona (213) mediante un procedimiento de tres pasos: epoxidación, apertura del oxirano y oxidación del alcohol.

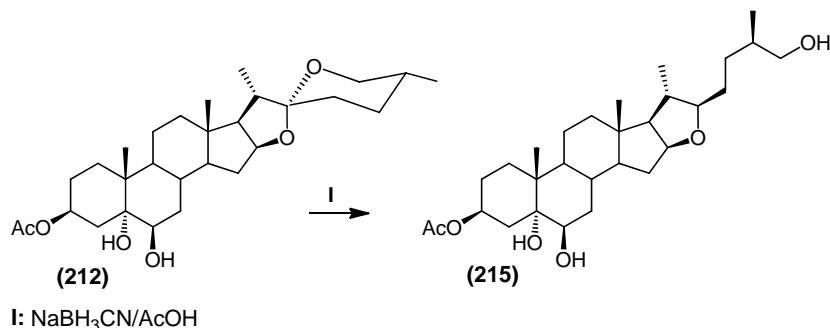


A una disolución de acetato de diosgenina **199** (4.56 g, 10.0 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) se le adiciona AMCPB (2.42 g, 14 mmol) y la mezcla se agita hasta desaparición de la materia prima (95 min). Posteriormente se adiciona disolución de sulfito de sodio (10 mL) y la mezcla se agita durante 15 min antes de adicionar acetona (50 mL) y disolución de ácido perclórico al 60 % (15 mL). Se mantiene la agitación durante 20 minutos, se enfría en baño de hielo manteniendo la agitación y se adiciona gota a gota reactivo de Jones (14 mL). La reacción se sigue por CCD utilizando como referencia producto de partida y sistema de disolvente hexano: acetato de etilo 3:2. Concluida la reacción se adiciona metanol (20 mL), disolución saturada de NaCl (150 mL) y la mezcla se extrae con acetato de etilo (40 mL, 30 mL y 30 mL). Los extractos combinados se lavan con disolución de carbonato de sodio al 5% (4 x 30 mL), con H₂O (1 x 20 mL) y con disolución saturada de NaCl (4 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora. El producto crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener 960.0 mg (1.97 mmol, 20 %) del cetol **213** idéntico al descrito anteriormente en el epígrafe 5.3.2.

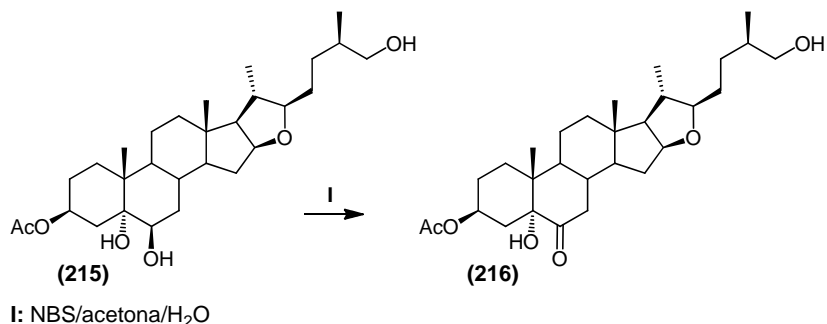
5.3.4. (25R)-3 β ,5-Dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (214).

Una mezcla del cetol **213** (200.0 mg, 0.41 mmol) en metanol (9.3 mL) saturado con K₂CO₃ se agita a temperatura ambiente durante 90 min. Se adiciona H₂O-hielo (20 mL), se enfría y se filtra al vacío para obtener 177.5 mg (0.40 mmol, 98 %) de la cetona dihidroxilada **214**. **P.F.** 260-262 °C (*de acetato de etilo*, descomposición). Lit. 268-270 °C (*de etanol*)⁸⁴ **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃ + MeOD) δ ppm 5.27 (s, 1H, OH-5), 4.36 (dd, $J = 14.7, 7.6$ Hz, 1H, H-16), 4.23 (s, 1H, OH-3), 3.88 (ddd, $J = 16.2, 11.0, 5.0$ Hz, 1H, H-3), 3.43 (ddd, $J = 10.9, 4.4, 1.5$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.31 (dd, $J = 10.9, 10.9$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.75 (t, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.05 (dd, $J = 12.9, 4.2$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 0.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.75 (s, 3H, CH₃-19), 0.74 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.71 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.8 C-1, 30.0 C-2, 66.8 C-3, 35.5 C-4, 79.9 C-5, 213.7 C-6, 41.8 C-7, 36.8 C-8, 44.3 C-9, 42.3 C-10, 21.2 C-11, 39.5 C-12, 41.0 C-13, 56.0 C-14, 31.4 C-15, 80.5 C-16, 61.9 C-17, 16.3 C-18, 13.9 C-19, 41.5 C-20, 14.3 C-21, 109.3 C-22, 31.2 C-23, 28.6 C-24, 30.1 C-25, 66.8 C-26, 17.0 C-27. **EM** (EI, 70 e⁻V): 446 M⁺, 426, 413, 388, 387, 374, 367, 359, 357, 354, 341, 332, 317, 314, 303, 296, 283, 281, 267, 257, 253, 332, 230, 229, 203, 187, 175, 161, 140, 139 (100%), 133, 115, 109, 93, 69, 55.

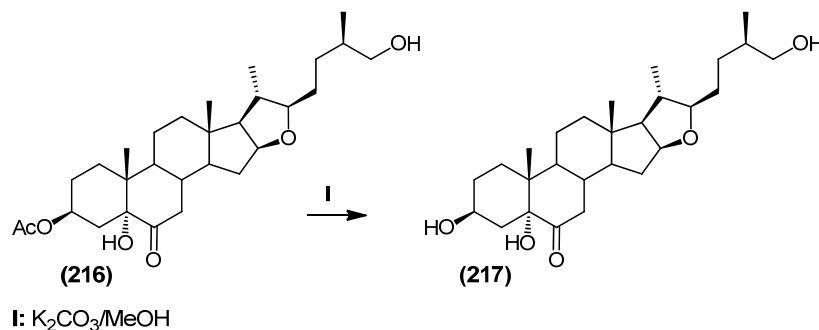
5.3.5. 3-Monoacetato de (22*R*,25*R*)-5 α -furostan-3 β ,5,6 β ,26-tetraol (215).



A una disolución del diol **212** (490.0 mg, 1.0 mmol) en AcOH (10 mL), se le adiciona poco a poco NaCNBH₃ (189.0 mg, 3.0 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente hasta desaparición de la materia prima (120 min). La mezcla se vierte sobre disolución saturada de NaCl/hielo (125 mL). El precipitado formado se filtra al vacío y se disuelve en acetato de etilo (100 mL). El extracto orgánico se lava con H₂O (3 x 20 mL), con disolución saturada de NaCl (3 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora. El producto crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 2:3 para obtener 482.8 mg (0.98 mmol, 98 %) del triol **215**. *Aceite*. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ ppm 5.10 (a, 1H, H-3), 4.28 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-16), 3.51-3.45 (da, 3H, H-26 y H-6), 3.32 (q, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-22), 2.01 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.17 (s, 3H, CH₃-19), 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃-21) 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.79 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (75.5 MHz) δ ppm 30.2 C-1, 26.6 C-2, 71.4 C-3, 36.9 C-4, 75.5 C-5, 75.9 C-6, 34.8 C-7, 29.9 C-8, 45.3 C-9, 38.4 C-10, 20.7 C-11, 39.5 C-12, 41.1 C-13, 56.1 C-14, 32.1 C-15, 83.2 C-16, 65.1 C-17, 16.7 C-18, 16.6 C-19, 37.8 C-20, 18.9 C-21, 90.3 C-22, 29.7 C-23, 30.0 C-24, 35.5 C-25, 67.8 C-26, 16.6 C-27, 171.2 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3. **EM** (EI, 70 e⁻V): 475, 473, 431, 405, 403, 375, 349, 348, 347 (100%), 345, 329, 311, 298, 283, 269, 251, 241, 229, 211, 185, 175, 161, 145, 144, 139, 109, 107, 95, 81, 67, 55.

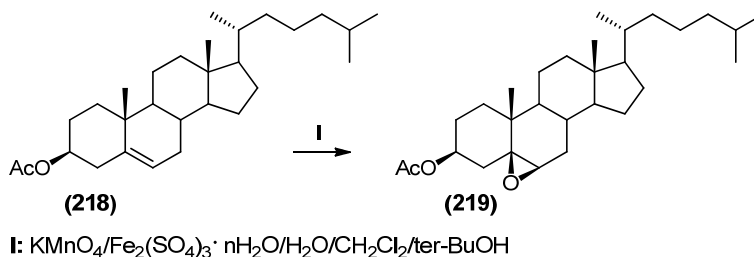
5.3.6. (22*R*,25*R*)-3β-Acetoxi-5,26-dihidroxi-5α-furostan-6-ona (216).

Una mezcla del triol **215** (216.8 mg, 0.44 mmol) y N-bromosuccinimida (100.0 mg, 0.65 mmol) se disuelve en acetona (10 mL) y se adiciona agua (1 mL) tornándose amarilla pálida la disolución en 1 ó 2 minutos. Este color desaparece a los 60 minutos mientras la agitación se mantiene durante 24 horas. Se adiciona agua (20 mL) lentamente, se trasvasa a un embudo de separación y se extrae con acetato de etilo (2 x 25 mL). La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl (3 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío. El producto crudo se purifica en columna cromatográfica de gel de sílice utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 1:1 para obtener 121.7 mg (0.25 mmol, 57 %) del cetol **216**. **P.F.** 154-155 °C (*de metanol*). **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.01-4.98 (m, 1H, H-3), 4.28 (td, *J* = 7.5, 5.4 Hz, 1H, H-16), 3.50-3.38 (m, 2H, H-26), 3.30 (td, *J* = 7.8, 4.1 Hz, 1H, H-22), 2.75 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-7_{ax}), 1.99 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.98 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.89 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-19), 0.76 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (75.5 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 26.2 C-2, 70.8 C-3, 32.2 C-4, 80.0 C-5, 212.0 C-6, 41.7 C-7, 36.8 C-8, 44.2 C-9, 42.4 C-10, 21.0 C-11, 39.2 C-12, 41.5 C-13, 56.5 C-14, 31.9 C-15, 82.9 C-16, 65.0 C-17, 16.5 C-18, 13.9 C-19, 37.9 C-20, 18.8 C-21, 90.3 C-22, 29.5 C-23, 30.1 C-24, 35.7 C-25, 68.0 C-26, 16.5 C-27, 171.2 CH₃COO-3, 21.3 CH₃COO-3. **EM** (EI, 70 eV): 490 M⁺, 473, 443, 429, 403, 361, 348, 347, 346, 345 (100 %), 327, 299, 296, 281, 267, 253, 239, 223, 185, 173, 161, 147, 144, 126, 121, 93, 81, 79, 55.

5.3.7. (22*R*,25*R*)-3β,5,26-Trihidroxi-5α-furostan-6-ona (217).

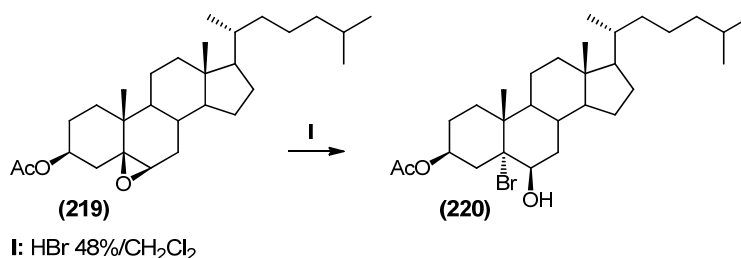
Una mezcla del cetol **216** (120.8 mg, 0.25 mmol) en metanol (5.6 mL) saturado con K₂CO₃ se agita a temperatura ambiente durante 90 min. Se adiciona H₂O-hielo (12 mL), se enfría y se filtra al vacío para obtener 96.6 mg (0.22 mmol, 86 %) de la cetona trihidroxilada **217**. **P.F.** 192-194 °C (*de acetona/agua*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃+MeOD) δ ppm 4.72 (s, 1H, OH-5), 4.21 (td, *J* = 7.6, 5.3 Hz, 1H, H-16), 3.80 (ddd, *J* = 15.8, 10.7, 4.8 Hz, 1H, H-3), 3.41 – 3.20 (m, 3H, H-22, H-26), 2.69 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-21), 0.79 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-27), 0.69 (s, 3H, CH₃-19), 0.67 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 29.7 C-2, 66.5 C-3, 35.2 C-4, 79.7 C-5, 213.9 C-6, 41.5 C-7, 36.9 C-8, 44.1 C-9, 42.2 C-10, 20.9 C-11, 39.0 C-12, 41.3 C-13, 56.3 C-14, 31.6 C-15, 82.8 C-16, 64.7 C-17, 16.2 C-18, 13.7 C-19, 37.6 C-20, 18.5 C-21, 90.2 C-22, 29.7 C-23, 30.1 C-24, 35.4 C-25, 67.2 C-26, 16.1 C-27. **EM** (EI, 70 eV): 448 M⁺, 430, 388, 387, 361, 341, 305, 304, 303 (100%), 286, 285, 283, 267, 257, 239, 227, 199, 189, 175, 161, 145, 144, 133, 121, 107, 99, 93, 81, 79, 67, 55. **EM-AR** (EI, 70 eV): observado 448.3168 calculado para C₂₇H₄₄O₅ 448.3183

5.3.8. Acetato de 5 β ,6 β -epoxicolestan-3 β -ol (**219**).



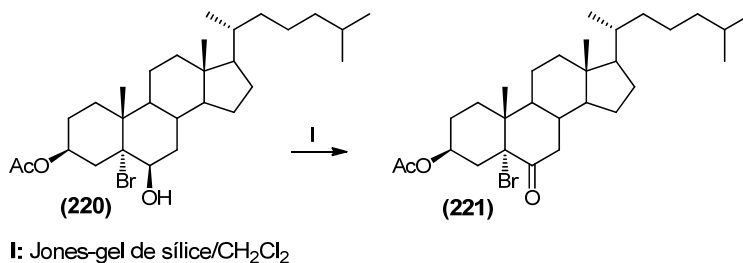
En un mortero se pulveriza finamente KMnO_4 (12.0 g) y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (6.0 g), se adiciona H_2O (1.2 mL) y la mezcla se coloca en un balón que contiene CH_2Cl_2 (90 mL). Posteriormente se adiciona disolución de acetato de colesterol **218** (2.57 g, 6.0 mmol) en CH_2Cl_2 (90 mL) y alcohol-terbutílico (3 mL). Después de 20 minutos de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se filtra a través de una columna de celita/ gel de sílice y se eluye con acetato de etilo (200 mL). El filtrado crudo se evapora al vacío para obtener 2.63 g (5.92 mmol, 99 %) del epóxido **219**, idéntico al reportado previamente.¹⁰⁰

5.3.9. 3 β -Acetoxi-5-bromo-5 α -colestan-3 β ,6 β -diol (**220**).



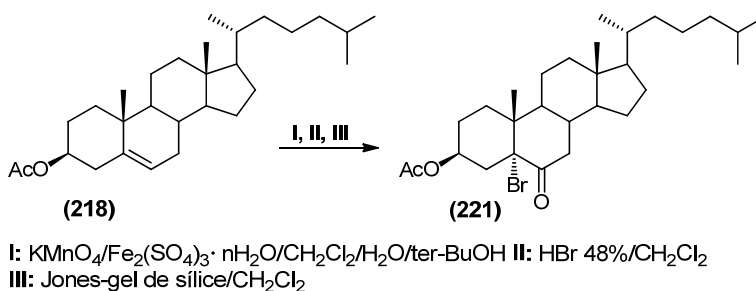
Una disolución del epóxido **219** (2.33 g, 5.9 mmol) en CH_2Cl_2 (89 mL) se agita vigorosamente por 5 minutos con $\text{HBr } 48\%$ (30 mL). La fase orgánica se lava con H_2O (5 x 89 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora al vacío para obtener 2.36 g (4.48 mmol, 76 %) de la bromohidrina **220**, idéntica a la reportada previamente.¹⁰⁰

5.3.10. 3β-Acetoxy-5-bromo-5α-colestano-6-ona (221).



Una disolución de la bromohidrina **220** (2.36 g, 4.5 mmol) en CH₂Cl₂ (67 mL) se adiciona sobre una suspensión en agitación de reactivo de Jones soportado en gel de sílice (preparado a partir de 11 mL de reactivo de Jones y 22 g de gel sílice) en CH₂Cl₂ (45 mL). La mezcla de reacción se agita durante 20 minutos, se diluye con acetato de etilo (50 mL) y se filtra a través de una columna de gel de sílice. El eluyente se evapora para obtener 1.69 g (3.23 mmol, 72 %) de la bromocetona **221**, idéntica a la reportada previamente.¹⁰⁰

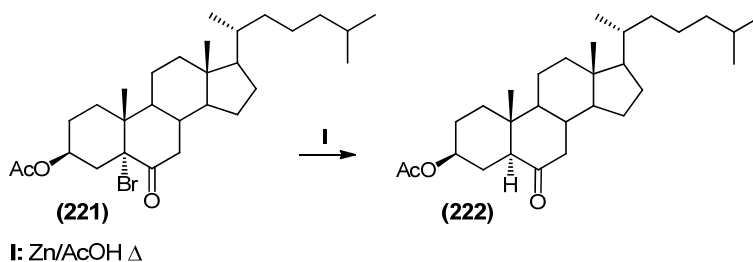
5.3.11. 3β-Acetoxy-5-bromo-5α-colestano-6-ona (221) mediante un procedimiento de tres pasos: β-epoxidación, apertura del oxirano y oxidación del alcohol.



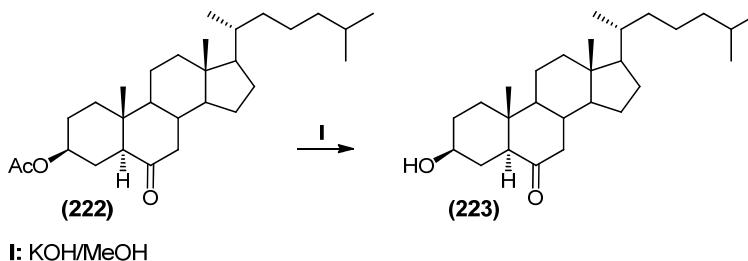
En un mortero se pulveriza finamente KMnO₄ (6.00 g) y Fe₂(SO₄)₃·nH₂O (3.00 g), se adiciona H₂O (0.6 mL) y la mezcla se coloca en un balón que contiene CH₂Cl₂ (45 mL). Se adiciona disolución de acetato de colesterol **218** (1.28 g, 3.0 mmol) en CH₂Cl₂ (45 mL) y alcohol-terbutílico (1.5 mL). Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, se adiciona CH₂Cl₂ (30 mL) y la mezcla se filtra a través de una columna de celita/ gel de sílice y se eluye con CH₂Cl₂ (30 mL). El filtrado se lava con H₂O (3 x 25 mL) y la fase orgánica se agita con HBr 48% (15 mL) durante 5 minutos. Se lava con H₂O (2 x 20 mL) y se adiciona sobre una mezcla en agitación de reactivo de Jones soportado en gel de sílice (preparado a partir de 2.5 mL de

reactivo de Jones y 5 g de gel de sílice) y CH_2Cl_2 (30 mL). La mezcla se agita durante 20 minutos, se filtra a través de una columna de gel de sílice y el eluyente se evapora para obtener 1.08 g (2.07 mmol, 69 %) de la bromocetona **221**, idéntica a la reportada previamente.¹⁰⁰

5.3.12. 3 β -Acetoxi-5 α -colestano-6-ona (**222**).

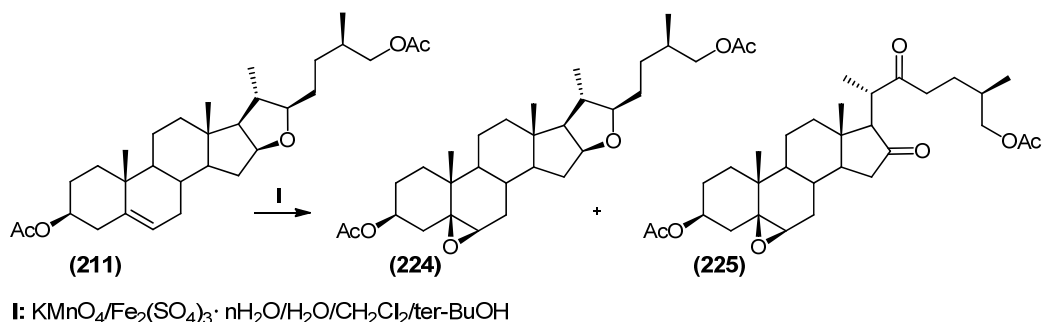


Una mezcla de la bromocetona **221** (2.57 g, 4.9 mmol), zinc en polvo (1.57 g) y ácido acético (60 mL) se agita bajo reflujo durante 2 h. Se adiciona acetato de etilo (300 mL) y la mezcla se lava con disolución saturada de NaCl (3 x 90 mL), con agua (3 x 90 mL), con disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 120 mL), con agua (2 x 90 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora al vacío. El producto crudo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 6:1 para obtener 1.53 g (3.44 mmol, 70 %) de la cetona acetilada **222**. **P.F.** 127-128 °C (*de acetato de etilo*). **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.65 (m, 1H, H-3), 2.30 (dd, $J = 4.5, 8.7$ Hz, 1H, H-4_{ec}), 2.25 (d, $J = 12.3, 2.7$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-3}$), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-21}$), 0.86 y 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H cada uno, $\text{CH}_3\text{-26}$ y $\text{CH}_3\text{-27}$), 0.75 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-19}$), 0.65 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-18}$). **RMN ^{13}C** (75.5 MHz) δ ppm 36.4 C-1, 26.8 C-2, 72.8 C-3, 26.1 C-4, 56.1 C-5, 210.3 C-6, 46.6 C-7, 37.9 C-8, 53.8 C-9, 40.9 C-10, 21.3 C-11, 39.4 C-12, 43.0 C-13, 56.7 C-14, 23.9 C-15, 28.0 C-16, 56.4 C-17, 13.0 C-18, 13.0 C-19, 35.7 C-20, 18.6 C-21, 36.1 C-22, 23.8 C-23, 39.4 C-24, 28.0 C-25, 22.5 C-26, 22.8 C-27, 21.4 $\text{CH}_3\text{COO-3}$, 170.5 $\text{CH}_3\text{COO-3}$. **EM** (EI, 70 eV): 445 M^+ , 444, 429, 401, 386, 385, 384 (100 %), 369, 366, 355, 331, 291, 289, 271, 247, 244, 229, 211, 187, 185, 175, 161, 149, 136, 121, 107, 95, 93, 81, 69, 55.

5.3.13. 3 β -Hidroxi-5 α -colestan-6-ona (**223**).

Una disolución de la cetona acetilada **222** (1.53 g, 3.4 mmol) en MeOH (30 mL) se agita en baño María con KOH (0.50 g) hasta disolución total. Después de 20 minutos de la disolución total se adiciona H₂O, se continúa el calentamiento y se filtra al vacío para obtener 1.27 g (3.15 mmol, 93 %) de la cetona hidroxilada **223**. P.F. 140-141 °C (*de acetato de etilo*). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.56 (m, 1H, H-3), 2.30 (dd, $J = 4.2, 8.7$ Hz, 1H, H-4_{ec}), 2.19 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-4_{ax}), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.85 (2d, $J = 6.6$ Hz, 3H cada uno, CH₃-26 y CH₃-27), 0.74 (s, 3H, CH₃-19), 0.65 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (75.5 MHz) δ ppm 36.7 C-1, 30.6 C-2, 70.6 C-3, 30.0 C-4, 56.7 C-5, 211.0 C-6, 46.7 C-7, 37.9 C-8, 53.9 C-9, 40.9 C-10, 21.5 C-11, 39.4 C-12, 43.0 C-13, 56.8 C-14, 24.0 C-15, 28.0 C-16, 56.1 C-17, 12.0 C-18, 13.1 C-19, 35.7 C-20, 18.6 C-21, 36.1 C-22, 23.8 C-23, 39.5 C-24, 28.0 C-25, 22.5 C-26, 22.8 C-27. EM (EI, 70 e⁻ V): 404 [M+2]⁺, 403 [M+1]⁺, 402 M⁺ (100 %), 387, 384, 369, 331, 327, 301, 290, 289, 287, 271, 262, 248, 247, 245, 229, 215, 211, 201, 185, 175, 161, 149, 139, 135, 109, 107, 95, 93, 81, 79, 67, 55.

5.3.14. Diacetato de (25R)-5 β ,6 β -epoxifurostan-3 β ,26-diol (224) y (25R)-3 β ,26-diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestan-16,22-diona (225).



En un mortero se pulveriza finamente KMnO_4 (4.00 g) y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (2.00 g), se adiciona H_2O (0.4 mL) y la mezcla se coloca en un balón que contiene CH_2Cl_2 (10 mL). Se adiciona una disolución del furosteno diacetilado **211** (1.00 g, 2 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) y alcohol-terbutílico (1 mL). Después de 20 minutos de agitación a temperatura ambiente, se adiciona éter etílico (25 mL) y la mezcla se filtra a través de una columna de celita y gel de sílice. Se eluye con acetato de etilo (2 x 30 mL) y el filtrado se lava con agua (5 x 30 mL), con disolución saturada de NaCl (5 x 30 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora al vacío para obtener la mezcla del furostano epoxidado **224** y la dicetona colestánica epoxidada **225**, los cuales se separan en una columna cromatográfica utilizando el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 4:1.

5.3.14.1 Diacetato de (25R)-5 β ,6 β -epoxifurostan-3 β ,26-diol (224).

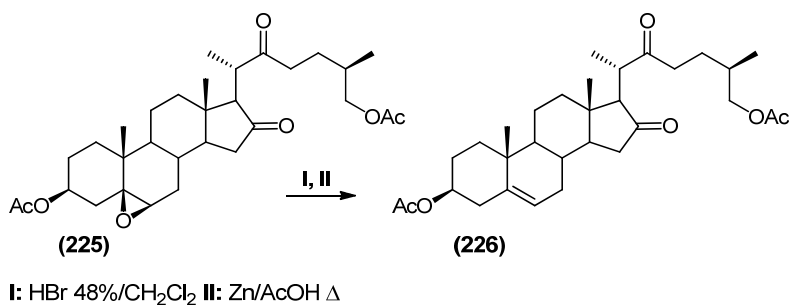
Rend. 171.9 mg, (0.33 mmol, 17 %). **P.F.** 117-118 °C (de acetato de etilo). **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.82-4.67 (m, 1H, H-3), 4.26 (td, $J = 8.0, 5.2$ Hz, 1H, H-16), 3.96 (dd, $J = 10.8, 5.6$ Hz, 1H, H-26), 3.85 (dd, $J = 10.8, 6.8$ Hz, 1H sist AB(X), H-26), 3.29 (td, $J = 8.4, 4.0$ Hz, 1H, H-22), 3.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 2.05 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-26}$), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-3}$), 1.02 (s, 3H, CH_3-19), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3-21), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3-27), 0.76 (s, 3H, CH_3-18). **RMN** ^{13}C (75.5 MHz) δ ppm 32.5 C-1, 27.1 C-2, 71.2 C-3, 37.9 C-4, 62.4 C-5, 63.3 C-6, 36.6 C-7, 29.4 C-8, 51.0 C-9, 35.1 C-10, 21.5 C-11, 39.4 C-12, 40.6 C-13, 56.3 C-14, 32.1 C-15, 83.0 C-16, 65.1 C-17, 16.3 C-18, 17.0 C-19, 37.9 C-20, 18.8 C-21, 90.1 C-22, 30.4 C-23, 30.7 C-24, 32.7 C-25, 69.3 C-26, 16.7 C-27, 171.2 $\text{CH}_3\text{COO-26}$, 170.5 $\text{CH}_3\text{COO-3}$, 21.3

$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-3}$, 20.9 $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-26}$. **EM (FAB):** 516 M^+ , 515 $[\text{M-1}]^+$, 455, 437, 411, 211, 154, 109, 95, 83, 81, 71, 69, 57, 55. **EM-AR (FAB):** observado 515.3364 calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_6$ 515.3367 $[\text{M-1}]^+$

5.3.14.2 (25R)-3 β ,26-Diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestan-16,22-diona (225).

Rend. 522.9 mg, (0.99 mmol, 49 %). Aceite. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.77 (tdd, $J=6.0, 4.8, 2.3$ Hz, 1H, H-3), 4.00-3.87 (m, 2H, H-26), 3.12 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, H-6), 2.83-2.75 (m, 1H, H-20), 2.59 (m, 2H, H-4), 2.06 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-26}$), 2.04 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-3}$), 1.04 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3-19$), 1.03 (d, $J=7.6$ Hz, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3-21$), 0.96 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3-27$), 0.77 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3-18$). **RMN ^{13}C** (75.5 MHz) δ ppm 32.4 C-1, 27.0 C-2, 71.1 C-3, 37.8 C-4, 62.5 C-5, 63.0 C-6, 36.4 C-7, 28.9 C-8, 50.6 C-9, 35.1 C-10, 21.3 C-11, 39.6 C-12, 41.5 C-13, 50.5 C-14, 38.6 C-15, 213.2 C-16, 66.1 C-17, 15.3 C-18, 17.0 C-19, 43.2 C-20, 12.8 C-21, 217.4 C-22, 37.1 C-23, 26.6 C-24, 32.0 C-25, 69.0 C-26, 16.7 C-27, 171.2 $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-26}$, 170.4 $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-3}$, 21.2 $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-3}$, 20.9 $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-26}$. **EM (FAB):** 531 $[\text{M+1}]^+$, 515, 513, 472, 471, 411, 295, 229, 223, 211, 115, 107, 97, 95, 91, 81, 69, 67, 55. **EM-AR (FAB):** observado 531.3272 calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_7$ 531.3316 $[\text{M+1}]^+$

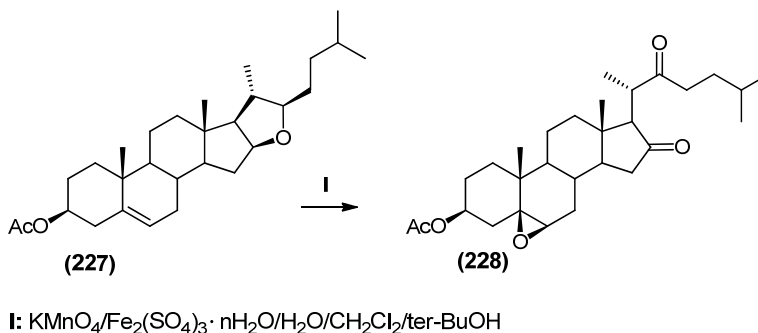
5.3.15. (25R)-3 β ,26-Diacetoxi-colest-5-en-16,22-diona, (acetato de criptogenina) (226).



Una disolución de la dicetona colestánica epoxidada **225** (400.0 mg, 0.75 mmol) en CH_2Cl_2 (25 mL) se agita en un embudo de separación con HBr al 48% (10 mL) durante 55 minutos. La fase orgánica se lava con agua (5 x 10 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora al vacío. Al residuo se le adiciona ácido acético (15 mL) y Zn en polvo (950.0 mg). La suspensión se calienta a reflujo durante 30 minutos, se filtra por gravedad a través de un algodón y al filtrado se le adiciona acetato de etilo (50 mL), agua (20 mL) y se deja en reposo a temperatura ambiente. La

fase orgánica se lava con disolución de NaCl 10% (5 x 10 mL), con agua (3 x 10 mL), con disolución de Na₂CO₃ 5% (2 x 10 mL) y con agua (2 x 10 mL). La fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavan con agua (4 x 15 mL), se secan con Na₂SO₄ anhidro y se evaporan al vacío. El producto crudo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener 224.4 mg (0.44 mmol, 58 %) de acetato de criptogenina **226**. *Aceite*. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.38 (da, *J*= 6.4 Hz, 1H, H-6), 4.67-4.56 (m, 1H, H-3), 4.00-3.87 (dd, *J*= 6, 1.8 Hz, 2H, H-26), 2.85-2.74 (m, 1H, H-20), 2.65-2.53 (m, 3H, H-4, H-25), 2.06 (s, 3H, CH₃COO-26), 2.04 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.06 (s, 3H, CH₃-19), 1.05 (d, *J*=6.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.97 (d, *J*= 6.6 Hz, 3H, CH₃-27), 0.81 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 31.7 C-1, 27.6 C-2, 73.6 C-3, 38.0 C-4, 139.8 C-5, 121.7 C-6, 36.6 C-7, 30.9 C-8, 51.1 C-9, 36.6 C-10, 20.4 C-11, 39.6 C-12, 41.6 C-13, 49.5 C-14, 38.5 C-15, 213.2 C-16, 66.1 C-17, 15.3 C-18, 19.3 C-19, 43.3 C-20, 12.9 C-21, 217.9 C-22, 37.1 C-23, 26.7 C-24, 32.0 C-25, 69.0 C-26, 16.8 C-27, 171.2 CH₃COO-26, 170.4 CH₃COO-3, 21.3 CH₃COO-3, 20.9 CH₃COO-26.

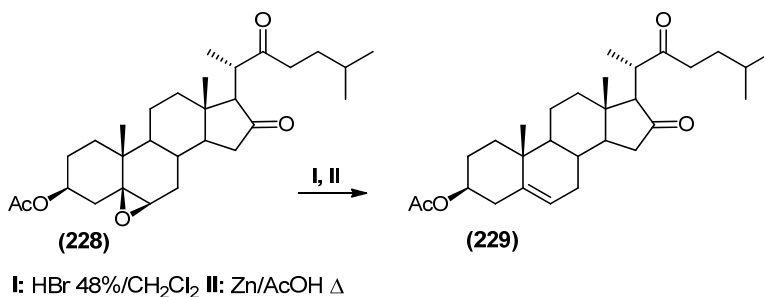
5.3.16. 3β-Acetoxy-5β,6β-epoxicolestan-16,22-diona (**228**).



En un mortero se pulveriza finamente KMnO₄ (2.50 g) y Fe₂(SO₄)₃·nH₂O (1.25 g), se adiciona H₂O (0.25 mL) y la mezcla se coloca en un balón que contiene CH₂Cl₂ (5 mL). Se adiciona una disolución del furostenol monoacetilado **227** (442.7 mg, 1.0 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) y alcohol-terbutílico (0.5 mL). Después de 150 minutos de agitación a temperatura ambiente, se adiciona éter etílico (12.5 mL) y celita (1.00 g). Se agita durante 15 minutos y la mezcla se filtra a través de una columna de gel de sílice. Se eluye con éter etílico (12.5 mL) y acetato de etilo (4 x 15

mL) y los eluatos se evaporan al vacío. El producto crudo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener 283.7 mg (0.60 mmol, 60 %) de la dicetona epoxidada **228**. **P.F.** 134-135 °C (*de metanol*). **RMN ¹H** (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm 4.74 (m, 1H, H-3), 3.12 (a, 1H, H-6), 2.60 (d, *J*=5.4 Hz, 1H, H-17), 2.03 (d, *J*=6.3 Hz, 3H, CH₃-21), 2.02 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.99 (s, 3H, CH₃-19), 0.85 y 0.85 (d, *J* =6.6 Hz, 3H cada uno, CH₃-26 y CH₃-27), 0.74 (s, 3H, CH₃-18). **RMN ¹³C** (75.5 MHz) δ ppm 32.4 C-1, 27.0 C-2, 71.1 C-3, 37.8 C-4, 62.5 C-5, 63.0 C-6, 36.4 C-7, 28.9 C-8, 50.6 C-9, 35.1 C-10, 21.3 C-11, 40.4 C-12, 41.5 C-13, 50.5 C-14, 38.6 C-15, 213.9 C-16, 66.0 C-17, 15.3 C-18, 17.0 C-19, 43.2 C-20, 12.8 C-21, 217.4 C-22, 37.1 C-23, 32.1 C-24, 27.6 C-25, 22.4 C-26, 22.4 C-27, 21.2 CH₃COO-3, 170.4 CH₃COO-3. **EM (FAB):** 473 [M+1]⁺, 413, 395, 327, 267, 207, 154, 147, 109, 97, 83, 81, 69, 57, 55 (100 %). **EM-AR (FAB):** observado 473.3303 calculado para C₂₉H₄₅O₅ 473.3262 [M+1]⁺

5.3.17. 3β-Acetoxi-colest-5-en-16,22-diona (**229**).

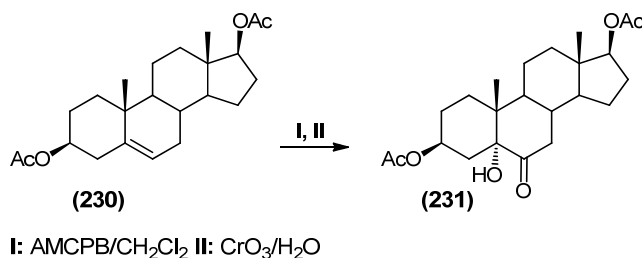


Una disolución de la dicetona colestánica epoxidada **228** (215.9 mg, 0.46 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL) se agita en un embudo de separación con HBr 48 % (6 mL) durante 20 minutos. La fase orgánica se lava con agua (5x 10 mL), se seca con Na₂SO₄ y se evapora al vacío. Al residuo obtenido se le adiciona AcOH (9 mL), Zn en polvo (575.0 mg) y se calienta a reflujo durante 20 minutos. Se filtra por gravedad y se diluye con acetato de etilo (30 mL). El extracto orgánico se lava con disolución de NaCl al 10 % (5 x 10 mL), con agua (3 x 10 mL), con disolución de Na₂CO₃ al 5% (porciones de 10 mL hasta que cesó la evolución de CO₂), se lava con disolución saturada de NaCl (2 x 10 mL), con H₂O (2 x 10 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío. El producto crudo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener 117.0 mg (0.26

mmol, 57 %) de la dicetona colestánica **229**. P.F. 152-154 °C (*de metanol*). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.36 (d, *J*= 4.8 Hz, 1H, H-6), 4.65-4.54 (m, 1H, H-3), 2.61 (d, *J*= 3.6 Hz, 1H, H-17), 2.03 (d, *J*=6.3 Hz, 3H, CH₃-21), 2.02 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.03 (s, 3H, CH₃-19), 0.89 y 0.89 (d, *J*= 6.6 Hz, 3H cada uno, CH₃-26 y CH₃-27), 0.79 (s, 3H, CH₃-18) RMN ¹³C (75.5 MHz) δ ppm 31.7 C-1, 27.6 C-2, 73.7 C-3, 38.0 C-4, 139.8 C-5, 121.8 C-6, 36.6 C-7, 30.9 C-8, 51.1 C-9, 36.6 C-10, 20.5 C-11, 38.5 C-12, 41.6 C-13, 49.5 C-14, 40.4 C-15, 217.9 C-16, 66.0 C-17, 12.9 C-18, 19.3 C-19, 43.3 C-20, 15.4 C-21, 213.9 C-22, 37.2 C-23, 32.2 C-24, 27.6 C-25, 21.4 C-26, 22.4 C-27, 22.4 CH₃COO-3, 170.42 CH₃COO-3. EM (FAB): 457 [M+1]⁺, 397, 327, 281, 267, 207, 165, 147, 97, 95, 83, 81, 73, 69, 57, 55 (100%).

5.4. Síntesis de cetoles.

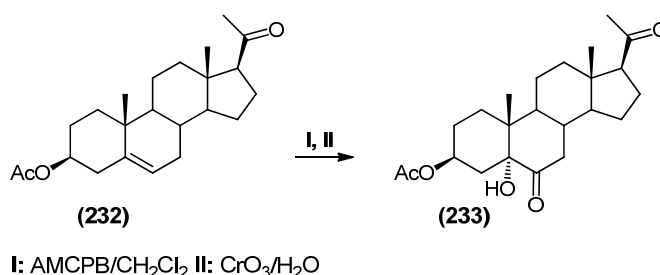
5.4.1. 3,17-Diacetato de 3β,5,17β-trihidroxi-5α-androstan-6-ona (**231**).



A una disolución del esteroide **230** (1.50 g, 4 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL), se le adiciona AMCPB (968 mg, 5.61 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente hasta desaparición de la materia prima (80 min). Se adiciona acetona (50 mL) y la mezcla de reacción se enfría a 0 °C en un baño de hielo antes de adicionar gota a gota disolución de CrO₃ (1.4286 g, 14.29 mmol) en agua (4.3 mL). Se retira el baño de hielo y se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla se vuelve a enfriar a 0 °C y se adiciona gota a gota disolución de CrO₃ (714.3 mg, 7.14 mmol) en agua (2.15 mL). Se retira el baño de hielo y se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 50 min, se adiciona agua (50 mL) y se extrae con acetato de etilo (2 x 50 mL). La fase orgánica se lava con agua (9 x 50 mL), con disolución de NaHCO₃ al 10% (5 x 50 mL), con H₂O (2 x 50 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 50 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío para obtener 1.48 g (3.64 mmol, 91 %) del cetol **231**. P.F. 236-238 °C (*de acetato de etilo*). Lit. 236-237.5 °C (*de metanol*)¹⁰¹ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.08 – 4.97 (m, 1H, H-3), 4.62 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-17), 2.76 (t, *J* =

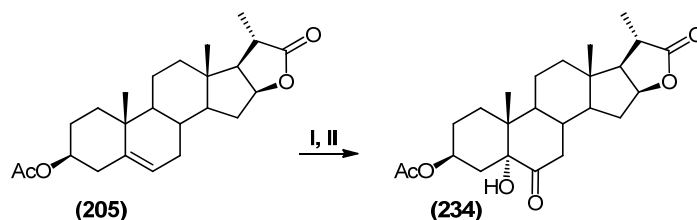
12.6 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.23 – 2.14 (m, 1H, H-16), 2.10 (dd, $J = 13.0, 4.6$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-17), 2.00 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.82 (s, 3H, CH₃-19), 0.77 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.2 C-2, 70.4 C-3, 32.5 C-4, 80.3 C-5, 211.6 C-6, 41.2 C-7, 37.0 C-8, 44.3 C-9, 42.5 C-10, 20.9 C-11, 36.5 C-12, 43.2 C-13, 50.7 C-14, 23.3 C-15, 27.4 C-16, 82.4 C-17, 12.1 C-18, 13.9 C-19, 171.1 CH₃COO-3, 170.9 CH₃COO-17, 21.3 CH₃COO-3, 21.1 CH₃COO-17. **EM** (EI, 70 e⁻V): 406 M⁺, 347, 346 (100%), 330, 315, 303, 286, 264, 249, 175, 147, 133, 121, 109, 105, 91, 81, 69, 67, 55.

5.4.2. 3-Monoacetato de 3 β ,5-dihidroxi-5 α -pregnan-6,20-diona (233).



El tratamiento del esteroide **232** (1.43 g, 4 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 1.40 g (3.5 mmol, 90 %) del cetol **233**. **P.F.** 220-222 °C (*de éter etílico*). Lit. 223-224.5 °C (*de metanol/cloroformo/hexano*)¹⁰² **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm δ 5.08 – 4.99 (m, 1H, H-3), 2.92 (s, 1H, OH-5), 2.78 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.55 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-17), 2.11 (s, 3H, CH₃-21), 2.00 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.81 (s, 3H, CH₃-19), 0.59 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.2 C-2, 70.6 C-3, 32.3 C-4, 80.1 C-5, 211.9 C-6, 41.5 C-7, 37.1 C-8, 44.1 C-9, 42.4 C-10, 21.3 C-11, 38.6 C-12, 44.5 C-13, 56.3 C-14, 24.1 C-15, 22.7 C-16, 63.4 C-17, 13.3 C-18, 13.9 C-19, 209.2 C-20, 31.4 C-21, 21.3 CH₃COO-3, 171.1 CH₃COO-3. **EM** (EI, 70 e⁻V): 391 [M+1]⁺, 390 M⁺, 374, 356, 332, 331, 330 (100%), 315, 314, 312, 297, 287, 285, 269, 248, 233, 227, 215, 201, 187, 177, 159, 135, 133, 121, 109, 95, 93, 81, 79, 71, 67, 55.

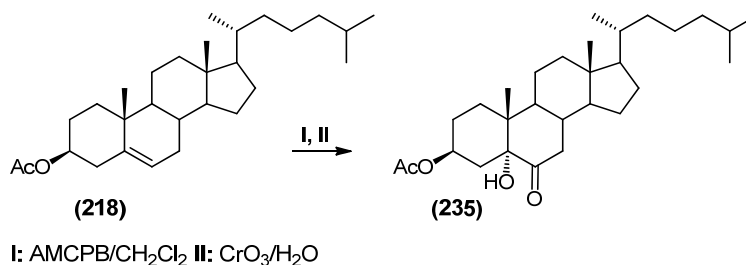
5.4.3. Lactona 22→16 del ácido 3β-acetoxi-5,16β-dihidroxi-6-oxo-5α-bisnorcolánico (234).



I: AMCPB/CH₂Cl₂ II: CrO₃/H₂O

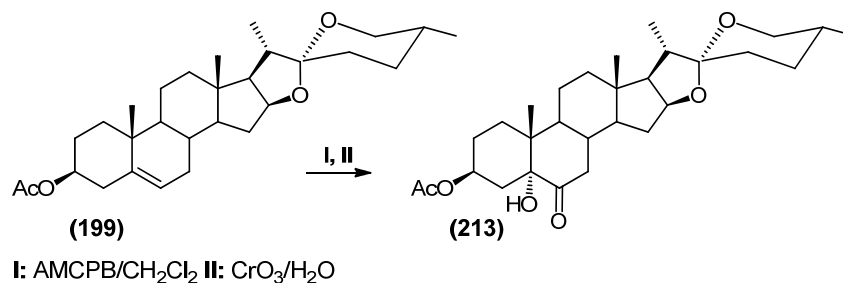
El tratamiento del acetato de vespertilina **205** (605.2 mg, 1.57 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 554.3 mg (1.33 mmol, 85 %) del cetol **234**. P.F. 280.6-282.2 °C (*de acetona*). Lit. 280.6-282.2 °C (*de acetona*)⁷⁹ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.06 – 4.97 (m, 1H, H-3), 4.93 (td, *J* = 7.7, 4.5 Hz, 1H, H-16), 3.41 (s, 1H, OH-5), 2.78 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.60 – 2.53 (m, 1H, H-20), 2.25 – 2.18 (m, 1H, H-15), 2.09 (dd, *J* = 12.9, 4.7 Hz, 1H, H-7_{ec}), 1.98 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃-21), 0.80 (s, 3H, CH₃-19), 0.71 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.2 C-2, 70.6 C-3, 32.2 C-4, 80.0 C-5, 211.5 C-6, 41.5 C-7, 36.4 C-8, 44.2 C-9, 42.4 C-10, 20.6 C-11, 37.9 C-12, 42.2 C-13, 54.3 C-14, 32.7 C-15, 82.3 C-16, 58.8 C-17, 13.7 C-18, 13.9 C-19, 36.0 C-20, 17.9 C-21, 181.0 C-22, 171.1 CH₃C=O-3, 21.3 CH₃COO-3.

5.4.4. 3-Monoacetato de 3 β ,5-dihidroxi-5 α -colestan-6-ona (235).

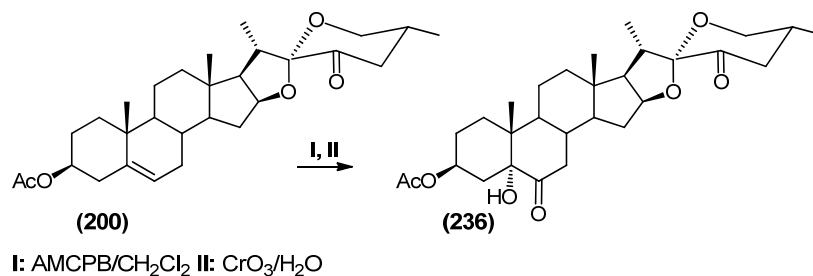


El tratamiento del esteroide **218** (1.71 g, 4.0 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 1.76 g (3.82 mmol, 96 %) del cetol acetilado **235**. P.F. 230-232 °C (*de acetato de etilo*). Lit. 232-233 °C (*de metanol*)⁹³ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.08 – 4.98 (m, 1H, H-3), 2.98 (s, 1H, OH-5), 2.75 (t, J = 12.6 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.09 (dd, J = 13.0, 4.6 Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.00 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.90 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃-21), 0.86 y 0.85 (d, J = 6.5 Hz, 3H cada uno, CH₃-26 y CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-19), 0.64 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.3 C-2, 70.7 C-3, 32.4 C-4, 80.3 C-5, 212.4 C-6, 41.7 C-7, 37.3 C-8, 44.3 C-9, 42.5 C-10, 21.4 C-11, 39.6 C-12, 43.1 C-13, 56.3 C-14, 23.9 C-15, 28.1 C-16, 56.2 C-17, 12.0 C-18, 13.9 C-19, 35.7 C-20, 18.6 C-21, 36.1 C-22, 23.9 C-23, 39.5 C-24, 28.0 C-25, 22.5 C-26, 22.8 C-27, 171.0 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3. EM (EI, 70 e-V): 460 M⁺, 418, 402, 401, 400 (100 %), 382, 367, 357, 331, 318, 303, 287, 269, 247, 227, 199, 175, 163, 137, 135, 121, 109, 95, 93, 79, 55.

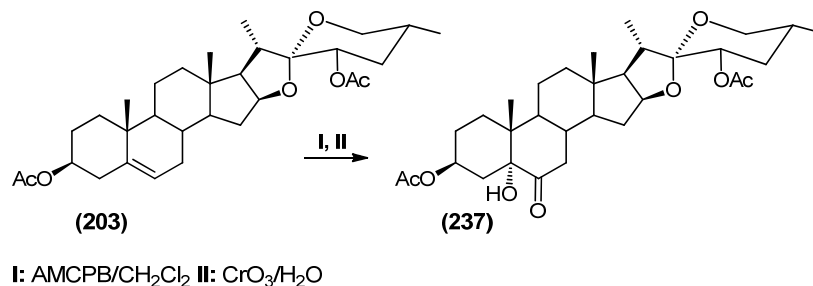
5.4.5. 3-Monoacetato de (25R)-3 β ,5-dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (213).



El tratamiento del esteroide **199** (1.83 g, 4.0 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 1.70 g (3.48 mmol, 87 %) del cetol acetilado **213** idéntico al descrito en el epígrafe 5.3.2.

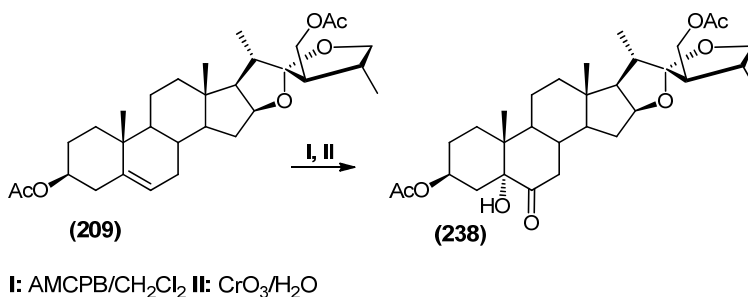
5.4.6. 3-Monoacetato de (25*R*)-3β,5-dihidroxi-5α-espirostan-6,23-diona (236).

El tratamiento del acetato de 23-oxo diosgenina **200** (798.4 mg, 1.70 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 787.6 mg (1.57 mmol, 92 %) del cetol acetilado **236**. P.F. 272-274 °C (*de acetato de etilo/hexano*). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.05 – 4.95 (m, 1H, H-3), 4.61 (td, *J* = 7.7, 6.0 Hz, 1H, H-16), 3.76 (dd, *J* = 11.3, 11.3 Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.58 (ddd, *J* = 11.2, 4.1, 1.2 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.01 (s, 1H, OH-5), 2.91 – 2.83 (m, 1H, H-20), 2.76 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.45 – 2.41 (m, 2H, H-24), 2.33 – 2.23 (m, 1H, H-25), 2.10 (dd, *J* = 13.0, 4.0 Hz, 1H, H-7_{ec}), 1.99 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃-21), 0.93 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃-27), 0.81 (s, 3H, CH₃-19), 0.75 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.2 C-2, 70.5 C-3, 32.4 C-4, 80.2 C-5, 211.8 C-6, 41.7 C-7, 36.7 C-8, 44.3 C-9, 42.4 C-10, 21.1 C-11, 39.3 C-12, 41.6 C-13, 56.1 C-14, 31.5 C-15, 83.0 C-16, 61.7 C-17, 16.1 C-18, 14.0 C-19, 34.7 C-20, 14.3 C-21, 109.8 C-22, 201.7 C-23, 45.2 C-24, 35.8 C-25, 65.7 C-26, 17.1 C-27, 171.0 CH₃COO-3, 21.3 CH₃COO-3. EM (IE, 70 eV): 502 M⁺, 475, 474, 430, 421, 420, 419, 360, 359, 358, 345, 341, 327, 313, 296, 285, 267(100 %), 249, 239, 209, 185, 175, 173, 149, 147, 133, 121, 105, 93, 91, 79, 56. EM-AR (IE) observado 502.2897, estimado para C₂₉H₄₂O₇ 502.2925

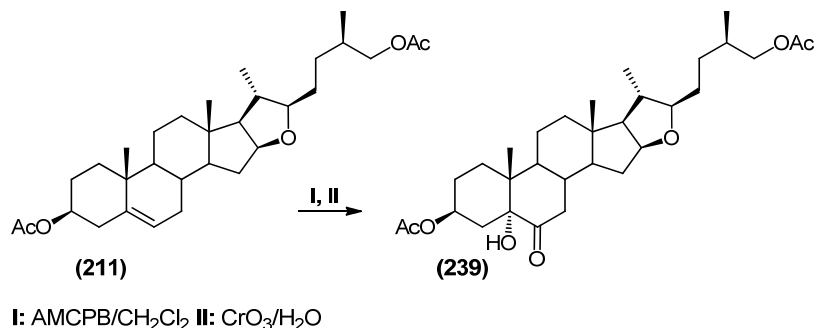
5.4.7. 3,23-Diacetato de (23*S*,25*R*)-3 β ,5,23-trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (237).

El tratamiento del esteroide **203** (778.1 mg, 1.51 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 716.1 mg (1.31 mmol, 87 %) del cetol **237**. **P.F.** 258-260°C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.05 – 4.95 (m, 1H, H-3), 4.80 (dd, $J = 11.8, 4.7$ Hz, 1H, H-23), 4.45 (dt, $J = 7.1, 5.9$ Hz, 1H, H-16), 3.53 (s, 1H, OH-5), 3.41 (ddd, $J = 10.7, 4.5, 1.1$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.32 (dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.77 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.13 – 2.05 (m, 2H, H-7_{ec}, H-20), 2.01 (s, 3H, CH₃COO-23), 1.98 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.93 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.81 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-19), 0.77 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.4 C-1, 26.2 C-2, 70.7 C-3, 32.2 C-4, 80.0 C-5, 212.1 C-6, 41.7 C-7, 36.7 C-8, 44.2 C-9, 42.4 C-10, 21.0 C-11, 39.4 C-12, 41.5 C-13, 56.0 C-14, 31.4 C-15, 80.9 C-16, 61.4 C-17, 16.0 C-18, 13.9 C-19, 35.9 C-20, 14.0 C-21, 108.5 C-22, 68.6 C-23, 33.9 C-24, 30.6 C-25, 65.7 C-26, 16.4 C-27, 171.1 CH₃COO-3, 170.6 CH₃COO-23, 21.3 CH₃COO-3, 21.1 CH₃COO-23. **EM** (IE, 70 eV): 547 [M+1]⁺, 546 M⁺, 486, 461, 432, 420, 419 (100%), 401, 360, 359, 341, 327, 296, 285, 267, 249, 239, 197, 173, 147, 121, 105, 93, 85, 81. **EM-AR** (IE): observado 546.3162 calculado para C₃₁H₄₆O₈ 546.3187.

5.4.8. 3,23'-Diacetato de (22S,23R)-16 β ,22:22,25-diepoxi-23'-hidroximetil-3 β ,5 α -dihidroxi-24-metil-26,27-dinorcolestan-6-ona (238).



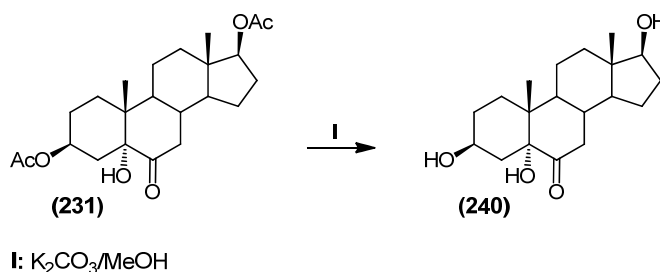
El tratamiento del esteroide **209** (149.2 mg, 0.29 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 125.5 mg (0.23 mmol, 79 %) del cetol acetilado **238**. P.F. 254-256 °C (*de acetato de etilo/hexano*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.06 – 4.96 (m, 1H, H-3), 4.42 (dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, 1H, H-16), 4.17 – 4.06 (m, 2H, H-23' a y H-23' b), 3.92 (dd, $J = 7.7, 7.7$ Hz, 1H, H-25 *pro-S*), 3.39 (dd, $J = 9.8, 8.5$ Hz, 1H, H-25 *pro-R*), 3.27 (s, 1H, OH-5), 2.76 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.32 – 2.23 (m, 1H, H-20), 2.20 – 2.12 (m, 1H, H-23), 2.09 (dd, $J = 13.0, 3.5$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.04 (s, 3H, CH₃COO-23'), 1.98 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.05 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃-24'), 0.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.81 (s, 3H, CH₃-19), 0.77 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.2 C-2, 70.6 C-3, 32.3 C-4, 80.1 C-5, 212.0 C-6, 41.7 C-7, 36.8 C-8, 44.2 C-9, 42.4 C-10, 21.1 C-11, 39.4 C-12, 41.6 C-13, 55.9 C-14, 31.5 C-15, 80.6 C-16, 62.7 C-17, 16.3 C-18, 13.9 C-19, 35.8 C-20, 16.0 C-21, 119.7 C-22, 52.6 C-23, 63.6 C-23', 37.4 C-24, 15.6 C-24', 71.8 C-25, 171.0 CH₃COO-3, 170.9 CH₃COO-23', 21.3 CH₃COO-3, 20.9 CH₃COO-23'. **Análisis Elemental.** observado C 67.11 % H 8.40 % estimado para C₃₁H₄₆O₈ C 68.11 % H 8.48 %.

5.4.9. (22*R*,25*R*)-3β,5α,26-Trihidroxi-5α-furostan-6-ona (239).

El tratamiento del furosteno diacetilado **211** (500.7 mg, 1.00 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 493.0 mg (0.93 mmol, 93 %) del cetol **239**. **P.F.** 156-158 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.06 – 4.94 (m, 1H, H-3), 4.27 (td, *J* = 7.7, 5.1 Hz, 1H, H-16), 3.94 (dd, *J* = 10.7, 5.8 Hz, 1H, H-26), 3.83 (dd, *J* = 10.7, 6.8 Hz, 1H, sist ABX, H-26), 3.34 (s, 1H, OH-5), 3.28 (td, *J* = 8.0, 4.2 Hz, 1H, H-22), 2.74 (t, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.08 (dd, *J* = 13.0, 4.2 Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-26), 1.98 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-21), 0.91 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-19), 0.75 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.5 C-1, 26.2 C-2, 70.7 C-3, 32.3 C-4, 80.1 C-5, 212.0 C-6, 41.7 C-7, 36.9 C-8, 44.2 C-9, 42.4 C-10, 20.9 C-11, 39.2 C-12, 41.4 C-13, 56.5 C-14, 31.9 C-15, 82.9 C-16, 65.0 C-17, 16.5 C-18, 13.9 C-19, 37.9 C-20, 18.8 C-21, 90.1 C-22, 30.7 C-23, 30.4 C-24, 32.7 C-25, 69.3 C-26, 16.7 C-27, 171.1 CH₃COO-3, 171.3 CH₃COO-26, 21.3 CH₃COO-3, 20.9 CH₃COO-26. **EM** (EI, 70 e⁻V): 532M⁺, 517, 473, 472, 443, 429, 403, 347, 345 (100%), 327, 296, 281, 267, 253, 239, 186, 161, 147, 126, 121, 93, 81, 67, 55. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 532.3408 calculado para C₃₁H₄₈O₇ 532.3395.

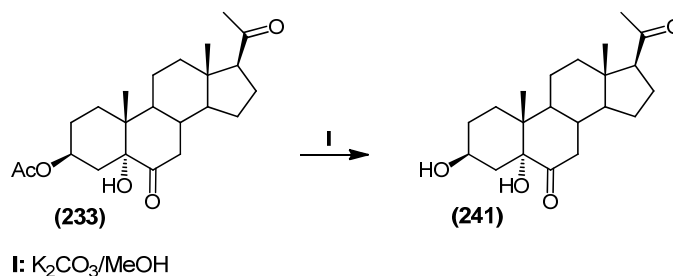
5.5. Hidrólisis de cetoles acetilados.

5.5.1. 3 β ,5,17 β -Trihidroxi-5 α -androstan-6-ona (240).



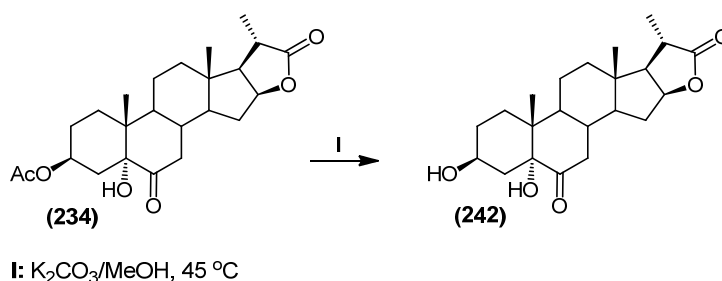
Una mezcla del cetol diacetilado **231** (827.6 mg, 2.04 mmol) en metanol (46 mL) saturado con K₂CO₃ se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. La mitad del disolvente se evapora al vacío antes de verterlo sobre H₂O con hielo. El sólido obtenido se filtra al vacío, se lava con abundante agua y se seca a temperatura ambiente para obtener 644.9 mg (2.0 mmol, 98 %) del cetol dihidroxilado **240**. P.F. 254-256 °C (*de metanol*). Lit 222-225 °C (*descomposición*)¹⁰³ **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.28 (s, 1H, OH-5), 4.45 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, OH-17), 4.34 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, OH-3), 3.69 (qd, *J* = 10.8, 5.0 Hz, 1H, H-3), 3.46 (td, *J* = 8.5, 4.9 Hz, 1H, H-17), 2.65 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.66 (s, 3H, CH₃-19), 0.60 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 29.7 C-2, 65.2 C-3, 35.8 C-4, 79.1 C-5, 212.3 C-6, 41.0 C-7, 37.0 C-8, 44.1 C-9, 42.0 C-10, 20.7 C-11, 36.4 C-12, 43.1 C-13, 50.7 C-14, 22.8 C-15, 30.5 C-16, 79.8 C-17, 11.2 C-18, 13.6 C-19. **EM** (EI, 70 eV): 324 [M+2]⁺, 323 [M+1]⁺, 322 M⁺, 305, 304, 290, 289, 271, 261, 251, 235, 223, 222 (100%), 221, 217, 207, 199, 175, 161, 151, 149, 147, 145, 133, 121, 110, 107, 97, 93, 83, 81, 79, 77, 67, 65, 57, 55. **EM-AR** (EI, 70 eV): observado 322.2147 calculado para C₁₉H₃₀O₄ 322.2139

5.5.2. 3 β ,5-Dihidroxi-5 α -pregnan-6,20-diona (241).



El tratamiento del cetol acetilado **233** (581.9 mg, 1.49 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 377.7 mg (1.08 mmol, 72 %) de la dicetona dihidroxilada **241**. P.F. 196-198 °C (*de metanol*). Lit. 192-195 °C (*de metanol*)¹⁰⁴ RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.33 (s, 1H, OH-5), 4.36 (d, J = 5.6 Hz, 1H, OH-3), 3.76 – 3.64 (m, 1H, H-3), 2.71 (t, J = 12.5 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.61 (t, J = 8.9 Hz, 1H, H-17), 2.06 (s, 3H, CH₃-21), 0.66 (s, 3H, CH₃-19), 0.49 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 30.4 C-2, 65.2 C-3, 35.7 C-4, 79.1 C-5, 212.1 C-6, 41.3 C-7, 36.7 C-8, 43.8 C-9, 41.9 C-10, 21.0 C-11, 38.0 C-12, 43.9 C-13, 55.9 C-14, 23.6 C-15, 22.2 C-16, 62.4 C-17, 13.1 C-18, 13.6 C-19, 208.5 C-20, 31.2 C-21. EM (EI, 70 eV): 350 [M+2]⁺, 349 [M+1]⁺, 348 M⁺, 330, 315, 297, 287, 249, 248 (100%), 233, 227, 187, 161, 159, 133, 105, 95, 93, 91, 55.

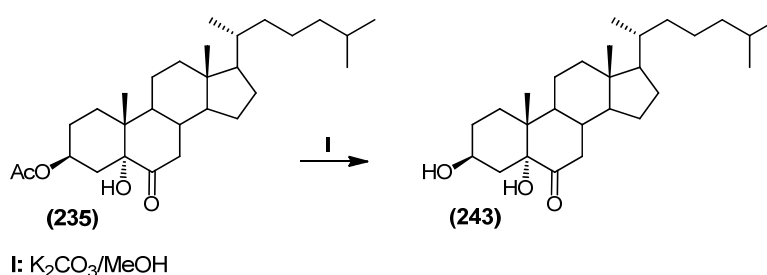
5.5.3. Lactona 22 \rightarrow 16 del ácido 3 β ,5,16 β -trihidroxi-6-oxo-5 α -bisorcolánico (242).



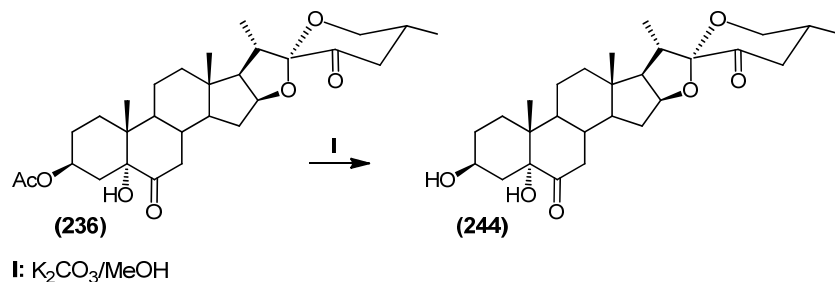
Una mezcla del cetol acetilado **234** (532.4 mg, 1.27 mmol) en metanol (95 mL) saturado con K₂CO₃ se agita a 45 °C durante 40 min. Se vierte sobre agua (100 mL) y se le adiciona gota a gota HCl 6N hasta ajustar el pH=1. La disolución resultante se mantiene en reposo durante 20 min, se enfría y el sólido formado se filtra al vacío, se disuelve en una mezcla acetato de etilo-éter etílico, se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora para obtener 407.4 mg (1.08 mmol, 85 %)

de la cetona dihidroxilada **242**. P.F. 300-302 °C (*de acetona*). Lit. 300 °C (*de acetona*)⁷⁹ RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.34 (s, 1H, OH-5), 4.96 (td, *J* = 7.5, 3.5 Hz, 1H, H-16), 4.36 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, OH-3), 3.69 (ddt, *J* = 16.0, 10.7, 5.1 Hz, 1H, H-3), 2.70 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.58 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-20), 2.19 – 2.12 (m, 1H, H-15), 1.20 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃-21), 0.67 (s, 3H, CH₃-19), 0.62 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 30.5 C-2, 65.2 C-3, 35.7 C-4, 79.0 C-5, 211.9 C-6, 41.3 C-7, 36.0 C-8, 43.9 C-9, 42.0 C-10, 20.4 C-11, 37.2 C-12, 41.8 C-13, 53.7 C-14, 32.2 C-15, 82.0 C-16, 57.7 C-17, 13.3 C-18, 13.6 C-19, 35.3 C-20, 17.5 C-21, 180.6 C-22.

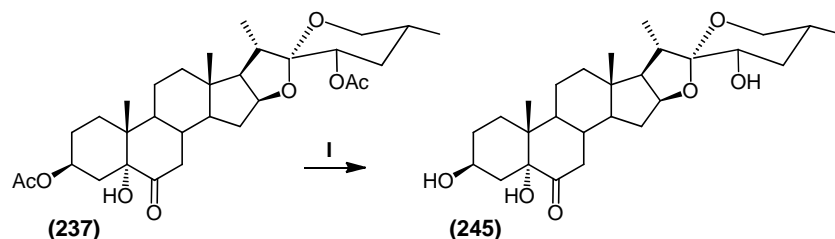
5.5.4. 3β,5-Dihidroxi-5α-colestan-6-ona (**243**).



El tratamiento del cetol acetilado **235** (2.00 g, 4.34 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 1.34 g (3.20 mmol, 74 %) de la cetona dihidroxilada **243**. P.F. 230-232 °C (*de metanol*). Lit. 231-232 °C (*de cloroformo*)⁹³ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.94 (ddd, *J* = 16.0, 10.8, 4.8 Hz, 1H, H-3), 3.49 (s, 1H, OH-5), 2.73 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.06 (dd, *J* = 13.0, 4.5 Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.00 (dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz, 1H, H-12), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-21), 0.85 y 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H cada uno, CH₃-26 y CH₃-27), 0.77 (s, 3H, CH₃-19), 0.62 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.8 C-1, 30.1 C-2, 67.1 C-3, 35.8 C-4, 80.3 C-5, 213.8 C-6, 41.8 C-7, 37.4 C-8, 44.3 C-9, 42.4 C-10, 21.4 C-11, 39.6 C-12, 43.1 C-13, 56.3 C-14, 23.8 C-15, 28.0 C-16, 56.1 C-17, 12.0 C-18, 13.9 C-19, 35.7 C-20, 18.6 C-21, 36.1 C-22, 23.9 C-23, 39.4 C-24, 28.0 C-25, 22.5 C-26, 22.8 C-27. EM (EI, 70 eV): 420 [M+2]⁺, 419 [M+1]⁺, 418 M⁺, 402, 401, 400, 385, 370, 367, 343, 331, 319, 318 (100 %), 303, 285, 248, 247, 245, 243, 217, 189, 175, 161, 149, 137, 121, 107, 95, 93, 81, 79, 55.

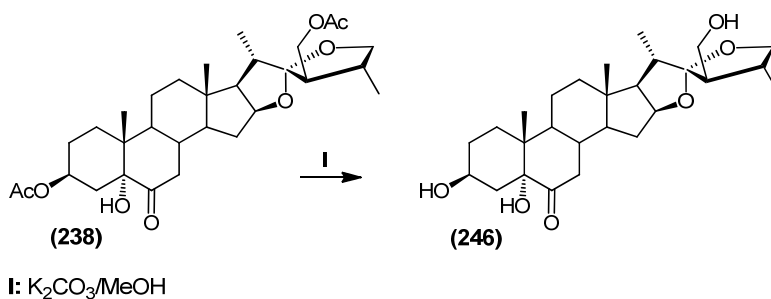
5.5.5. (25*R*)-3β,5-Dihidroxi-5α-espirostan-6,23-diona (244).

El tratamiento de la dicetona acetilada **236** (699.6 mg, 1.39 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 568.5 mg (1.23 mmol, 89 %) de la dicetona dihidroxilada **244**. **P.F.** 296-298 °C (*de acetato de etilo/hexano*). **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4.60 (dt, $J = 7.5, 6.1$ Hz, 1H, H-16), 3.96 (a, 1H, H-3), 3.77 (dd, $J = 11.3, 11.3$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.58 (dd, $J = 11.1, 4.0$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 2.95 (a, 1H, OH-5), 2.92 – 2.83 (m, 1H, H-20), 2.75 (t, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.51 – 2.41 (m, 2H, H-24), 2.33 – 2.22 (m, 1H, H-25), 2.09 (dd, $J = 13.1, 2.5$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 0.93 y 0.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H cada uno, CH_3 -21 y CH_3 -27), 0.79 (s, 3H, CH_3 -19), 0.75 (s, 3H, CH_3 -18). **RMN ^{13}C** (100 MHz) δ ppm 29.8 C-1, 30.3 C-2, 67.2 C-3, 36.1 C-4, 80.4 C-5, 212.7 C-6, 41.8 C-7, 36.7 C-8, 44.4 C-9, 42.4 C-10, 21.2 C-11, 39.3 C-12, 41.6 C-13, 56.2 C-14, 31.5 C-15, 83.0 C-16, 61.6 C-17, 16.1 C-18, 14.1 C-19, 34.7 C-20, 14.3 C-21, 109.8 C-22, 201.7 C-23, 45.2 C-24, 35.8 C-25, 65.7 C-26, 17.1 C-27. **EM** (IE, 70 eV): 460 M^+ , 433, 432, 414, 379, 378, 377, 359, 341, 323, 313, 303, 285, 267 (100%), 249, 239, 225, 199, 185, 175, 173, 165, 147, 121, 107, 93, 91, 81, 67, 56. **EM-AR** (IE): observado 460.2828, estimado para $C_{27}H_{40}O_6$ 460.2819.

5.5.6. (23*S*,25*R*)-3 β ,5,23-Trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (245).I: K₂CO₃/MeOH

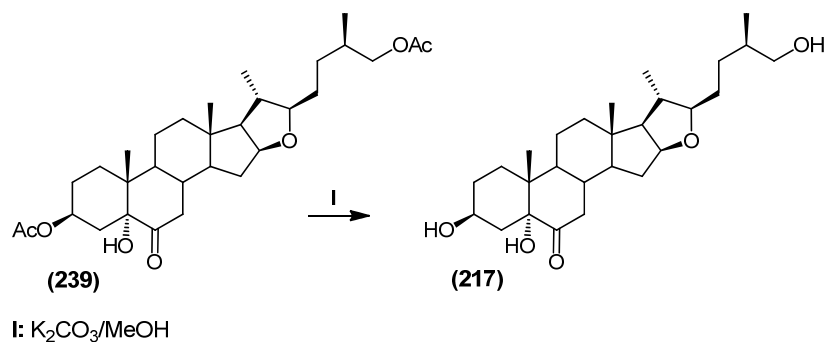
El tratamiento del cetol diacetilado **237** (973.3 mg, 1.78 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 693.8 mg (1.50 mmol, 84 %) del triol **245**. **P.F.** 242-244 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.34 (s, 1H, H-OH-5), 4.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, OH-23), 4.37 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, OH-3), 4.31 (dd, *J* = 15.2, 7.2 Hz, 1H, H-16), 3.69 (td, *J* = 10.6, 5.4 Hz, 1H, H-3), 3.35 – 3.25 (m, 2H, H-23, H-26_{ec}), 3.09 (dd, *J* = 11.0, 11.0 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.68 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.52 – 2.45 (m, 1H, H-20), 0.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃-21), 0.74 (s, 3H, CH₃-18), 0.74 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H, CH₃-27), 0.67 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 30.5 C-2, 65.3 C-3, 35.8 C-4, 79.1 C-5, 212.3 C-6, 41.6 C-7, 36.3 C-8, 43.9 C-9, 42.0 C-10, 20.9 C-11, 39.6 C-12, 41.1 C-13, 55.6 C-14, 31.1 C-15, 80.3 C-16, 61.2 C-17, 16.3 C-18, 13.7 C-19, 34.6 C-20, 14.3 C-21, 110.5 C-22, 65.8 C-23, 37.6 C-24, 30.7 C-25, 64.9 C-26, 16.7 C-27. **EM** (EI, 70 e⁻V): 463 [M+1]⁺, 462 M⁺, 444, 429, 379, 378, 377 (100%), 359, 341, 323, 313, 303, 285, 267, 249, 239, 225, 203, 191, 173, 165, 147, 121, 119, 93, 91, 81. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 462.2969 calculado para C₂₇H₄₂O₆ 462.2976.

5.5.7. (2*S*,23*R*,24*R*)-16 β ,22:22,25-Diepoxi-23-hidroxi-23-hidroxi-3 β ,5 α -dihidroxi-24-metil-26,27-dinorcolestan-6-ona (246).



El tratamiento del cetol diacetilado **238** (50.2 mg, 0.092 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 41.3 mg (0.089 mmol, 97 %) del triol **246**. **P.F.** 260-262 °C (*de metanol*). **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.29 (s, 1H, OH-5), 4.56 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, OH-23'), 4.32 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, OH-3), 4.27 (td, *J* = 7.6, 6.2 Hz, 1H, H-16), 3.83 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 1H, H-25 *pro-S*), 3.69 (qd, *J* = 10.6, 5.0 Hz, 1H, H-3), 3.57 – 3.50 (m, 1H, H-23' a), 3.41 – 3.34 (m, 1H, H-23' b), 3.19 (dd, *J* = 9.1, 8.0 Hz, 1H, H-25 *pro-R*), 2.68 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.42 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-20), 0.99 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃-24'), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃-21), 0.73 (s, 3H, CH₃-18), 0.67 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 30.4 C-2, 65.1 C-3, 35.7 C-4, 79.0 C-5, 212.0 C-6, 41.4 C-7, 36.4 C-8, 43.8 C-9, 41.9 C-10, 20.8 C-11, 39.2 C-12, 41.2 C-13, 55.5 C-14, 31.2 C-15, 79.7 C-16, 62.6 C-17, 16.0 C-18, 13.6 C-19, 35.0 C-20, 16.4 C-21, 119.5 C-22, 55.4 C-23, 60.7 C-23', 36.4 C-24, 16.6 C-24', 71.2 C-25. **Análisis Elemental.** observado C, 69.75 % H 9.10 %, estimado para C₂₇H₄₂O₆ C 70.10 % H 9.15 %.

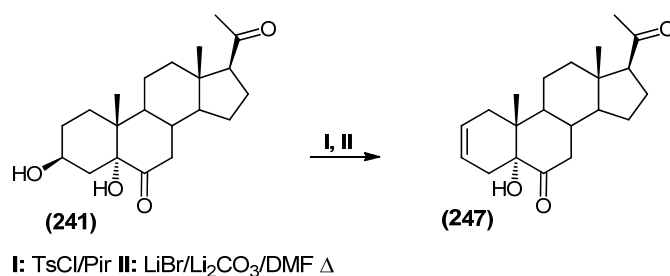
5.5.8. (22*R*,25*R*)-3β,5,26-Trihidroxi-5α-furostan-6-ona (217).



El tratamiento del cetol **239** (532.7 mg, 1.00 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 433.4 mg (0.97 mmol, 97 %) de la cetona trihidroxilada **217** idéntica a la descrita en el epígrafe 5.3.7.

5.6. Síntesis de cetoles insaturados.

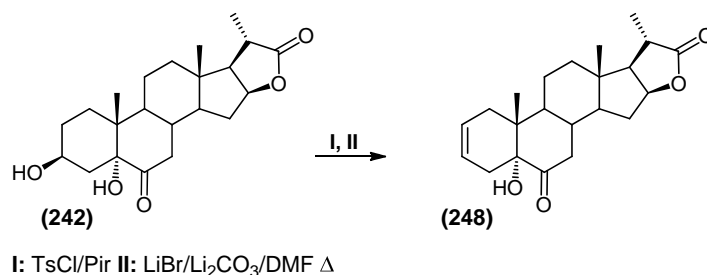
5.6.1. 5-Hidroxi-5α-pregn-2-en-6,20-diona (247).



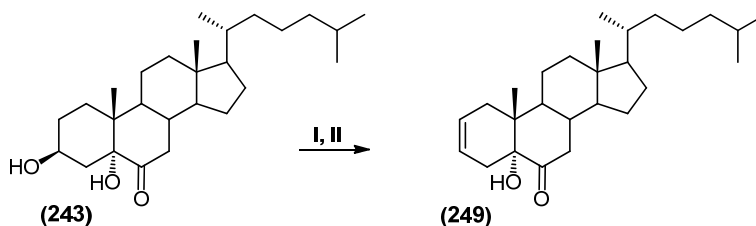
A una disolución de la dicetona dihidroxilada **241** (946.0 mg, 2.71 mmol) en piridina (14 mL) se le adiciona TsCl (1.31 g, 6.78 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Se vierte sobre una disolución de HCl al 3%/hielo, el sólido formado se filtra al vacío, se lava con abundante agua, se disuelve en acetato de etilo (60 mL), se lava con agua (2 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío. El residuo se disuelve en DMF seca (22 mL), se agrega LiBr (1.39 g), Li₂CO₃ (1.15 g) y se calienta a reflujo durante 180 min. La mezcla se enfría a temperatura ambiente, se le adiciona acetato de etilo (70 mL), se filtra al vacío y las sales se lavan con acetato de etilo (4 x 5 mL). El extracto orgánico resultante se lava con H₂O (6 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío para obtener 747.7 mg del producto crudo el cual se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente el sistema de

disolvente hexano/acetato de etilo 8:1 para obtener 401.4 mg (1.21 mmol, 45 %) del cetol insaturado **247**. **P.F.** 154-156 °C (*de acetato de etilo/hexano*). Lit. 154-157 °C (*de acetona*)¹⁰⁴ **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.62 – 5.53 (m, 2H, H-2, H-3), 2.70 (t, *J* = 12.7 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.56 (td, *J* = 4.1, 2.0 Hz, 1H, H-1), 2.54 – 2.48 (m, 1H, H-17), 2.12 (dd, *J* = 12.7, 4.2 Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.07 (s, 3H, CH₃-21), 0.64 (s, 3H, CH₃-19), 0.55 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 125.0 C-2, 122.3 C-3, 34.3 C-4, 77.5 C-5, 212.1 C-6, 42.2 C-7, 37.1 C-8, 44.7 C-9, 41.9 C-10, 20.8 C-11, 38.4 C-12, 44.3 C-13, 56.3 C-14, 23.9 C-15, 22.6 C-16, 63.3 C-17, 13.1 C-18, 14.3 C-19, 209.9 C-20, 31.3 C-21. **EM** (EI, 70 e⁻V): 331 [M+1]⁺, 330 M⁺, 298, 297 (100%), 285, 269, 233, 227, 177, 159, 135, 105, 93, 91, 79, 77, 67. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 330.2174 calculado para C₂₁H₃₀O₃ 330.2189

5.6.2. Lactona **22**→**16** del ácido 5,16β-dihidroxi-6-oxo-5α-bisnorcol-2-énico (**248**).

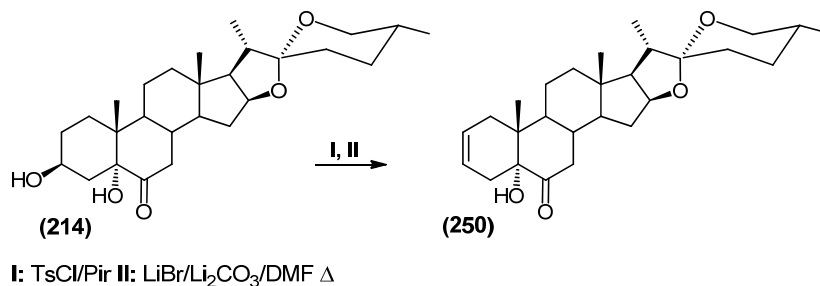


El tratamiento de la cetona dihidroxilada **242** (356.5 mg, 0.95 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **247** produjo 264.7 mg (0.74 mmol, 78 %) del cetol insaturado **248**. **P.F.** 242-244 °C (*de acetato de etilo/hexano*). **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃ + MeOD) δ ppm 5.66 – 5.53 (m, 2H, H-2, H-3), 4.93 (td, *J* = 7.7, 4.5 Hz, 1H, H-16), 2.72 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.63 – 2.58 (m, 1H, H-1), 2.58 – 2.51 (m, 1H, H-20), 1.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃-21), 0.70 (s, 3H, CH₃-18), 0.67 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (75 MHz) δ ppm 29.7 C-1, 125.1 C-2, 122.3 C-3, 34.3 C-4, 82.4 C-5, 211.0 C-6, 42.3 C-7, 36.4 C-8, 45.0 C-9, 42.0 C-10, 20.2 C-11, 37.8 C-12, 41.9 C-13, 54.3 C-14, 32.6 C-15, 82.4 C-16, 58.7 C-17, 13.6 C-18, 14.4 C-19, 36.0 C-20, 17.8 C-21, 181.3 C-22. **EM** (EI, 70 e⁻V): 359 [M+1]⁺, 358 M⁺, 326, 325, 313, 297, 261, 223, 205, 165, 147, 133, 105, 93 (100%), 91, 79, 55. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 358.2125 calculado para C₂₂H₃₀O₄ 358.2139.

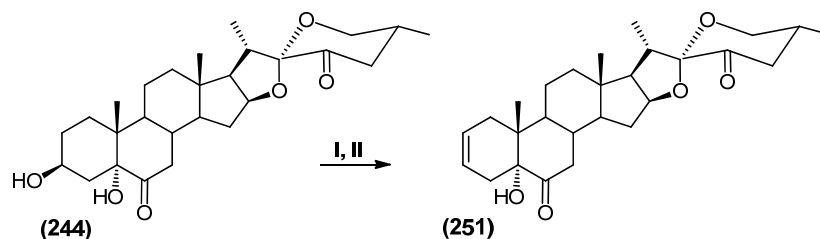
5.6.3. 5-Hidroxi-5 α -colest-2-en-6-ona (**249**).

I: TsCl/Pir II: LiBr/Li₂CO₃/DMF Δ

El tratamiento de la cetona dihidroxilada **243** (1.00 g, 2.39 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **247** produjo 731.5 mg (1.83 mmol, 77 %) del cetol insaturado **249**. P.F. 134-136 °C (*de acetato de etilo*). Lit. 140-141.5 °C (*de etanol*).¹⁰⁵ **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ ppm 5.70 – 5.58 (m, 2H, H-2, H-3), 2.68 (t, $J = 12.6$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.68 – 2.61 (m, 1H, H-1), 2.19 (dd, $J = 12.7, 4.1$ Hz, 1H, H-7_{ec}). 0.91 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.86 y 0.86 (d, $J = 6.6$, 3H cada uno, CH₃-26, CH₃-27), 0.70 (s, 3H, CH₃-19), 0.65 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.1 C-1, 125.5 C-2, 122.4 C-3, 34.5 C-4, 78.0 C-5, 211.3 C-6, 42.7 C-7, 37.5 C-8, 45.2 C-9, 42.3 C-10, 21.0 C-11, 39.5 C-12, 42.9 C-13, 56.4 C-14, 23.8 C-15, 28.0 C-16, 56.1 C-17, 11.9 C-18, 14.5 C-19, 35.7 C-20, 18.6 C-21, 36.1 C-22, 23.9 C-23, 39.5 C-24, 28.0 C-25, 22.5 C-26, 22.8 C-27. **EM** (EI, 70 eV): 402 [M+2]⁺, 401 [M+1]⁺, 400 M⁺, 385, 368, 367 (100%), 355, 339, 303, 287, 227, 211, 185, 161, 157, 135, 109, 95, 93, 81, 71, 57.

5.6.4. (25R)-5-Hidroxi-5 α -espirost-2-en-6-ona (250).

El tratamiento de la cetona dihidroxilada **214** (2.01 g, 4.51 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **247** produjo 1.49 g (3.49 mmol, 77 %) del cetol insaturado **250**. **P.F.** 198-200 °C (*de hexano/acetato de etilo*). Lit. 197-198 °C (*de acetona*)⁸⁴ **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.70 – 5.57 (m, 2H, H-2, H-3), 4.40 (td, $J = 7.6, 6.4$ Hz, 1H, H-16), 3.46 (ddd, $J = 10.8, 4.4, 1.7$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.35 (dd, $J = 10.9, 10.9$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.70 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.62 (dd, $J = 4.1, 2.0$ Hz, 1H, H-1), 2.21 (dd, $J = 12.7, 3.7$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.16 – 2.08 (m, 1H, H-4), 0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.78 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.75 (s, 3H, CH₃-18), 0.71 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.1 C-1, 125.4 C-2, 122.3 C-3, 34.5 C-4, 77.9 C-5, 210.9 C-6, 42.7 C-7, 36.8 C-8, 45.2 C-9, 42.3 C-10, 20.8 C-11, 39.5 C-12, 40.8 C-13, 56.2 C-14, 31.5 C-15, 80.4 C-16, 62.0 C-17, 16.3 C-18, 14.6 C-19, 41.6 C-20, 14.4 C-21, 109.3 C-22, 31.3 C-23, 28.7 C-24, 30.3 C-25, 66.9 C-26, 17.1 C-27. **EM** (EI, 70 e⁻V): 428 M⁺, 410, 395, 369, 356, 323, 297, 285, 281, 251, 237, 211, 191, 161, 157, 139, 121, 119, 109, 105, 93, 91, 79, 69 (100%), 67, 55. **EM-AR** (FAB): observado 429.3024 calculado para C₂₇H₄₁O₄ 429.2999 [M+1]⁺

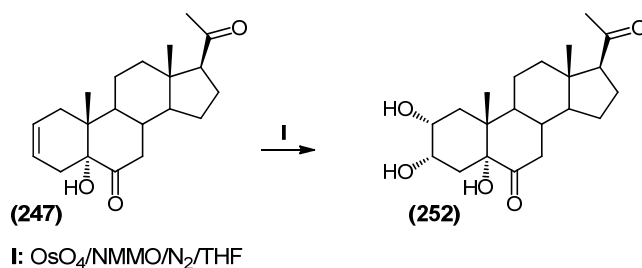
5.6.5. (25R)-5-Hidroxi-5 α -espirost-2-en-6,23-diona (251).

I: TsCl/Pir II: LiBr/Li₂CO₃/DMF Δ

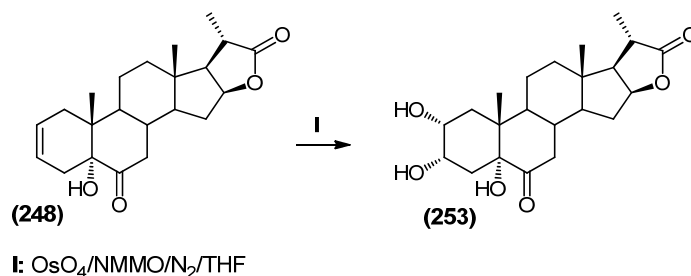
El tratamiento de la dicetona dihidroxilada **244** (638.3 mg, 1.39 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **247** produjo 383.6 mg (0.87 mmol, 63 %) de la dicetona insaturada **251**. P.F. 258-260 °C (*de hexano/acetato de etilo*). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.69 – 5.57 (m, 2H, H-2 y H-3), 4.65 – 4.57 (m, 1H, H-16), 3.77 (dd, $J = 11.3$, 11.3 Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.57 (ddd, $J = 11.1$, 4.4, 1.1 Hz, 1H, H-26_{ec}), 2.88 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-20), 2.69 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.61 (dd, $J = 4.2$, 2.1 Hz, 1H, H-1), 2.46 – 2.41 (m, 1H, H-24), 2.34 – 2.21 (m, 1H, H-25), 2.19 (dd, $J = 12.7$, 3.6 Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.12 (dd, $J = 15.9$, 2.1 Hz, 1H, H-4), 0.93 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.75 (s, 3H, CH₃-18), 0.71 (s, 3H, CH₃-19). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.1 C-1, 125.4 C-2, 122.3 C-3, 34.5 C-4, 77.9 C-5, 210.7 C-6, 42.6 C-7, 36.8 C-8, 45.1 C-9, 42.2 C-10, 20.7 C-11, 39.3 C-12, 41.3 C-13, 56.2 C-14, 31.4 C-15, 82.9 C-16, 61.6 C-17, 16.0 C-18, 14.6 C-19, 34.7 C-20, 14.3 C-21, 109.8 C-22, 201.7 C-23, 45.2 C-24, 35.8 C-25, 65.7 C-26, 17.0 C-27. EM (FAB): 443 [M+1]⁺, 359, 341, 285, 259, 207, 159, 149, 133, 105, 91, 83, 57. EM-AR (FAB): observado 443.2811, estimado para C₂₇H₃₉O₅ 443.2792 [M+1]⁺.

5.7. Dihidroxilación de cetoles insaturados.

5.7.1. 2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -pregnan-6,20-diona (252).

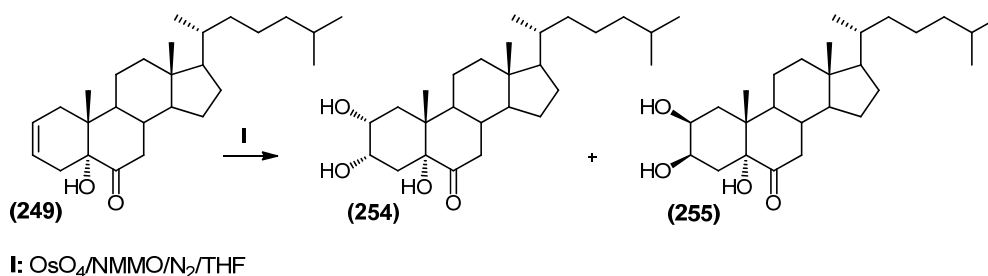


A una disolución del cetol insaturado **247** (335.8 mg, 0.86 mmol) en THF (9.1 mL) se le adiciona óxido de N-metilmorfolina (688.0 mg) y una disolución de OsO₄ en ter-butanol (4.13 mL) previamente preparada. La mezcla se agita bajo atmósfera de nitrógeno durante toda la noche, se añade disolución de Na₂SO₃ (310.9 mg) en agua (0.71 mL), se agita durante 90 min y se adiciona acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl (5 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío para obtener 333.4 mg del producto crudo, el cual se purifica por columna cromatográfica utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 1:1 para obtener 147.5 mg (0.41 mmol, 48 %) del triol **252**. **P.F.** 204-206 °C (*de metanol*). Lit. 205-206 °C (*de heptano/acetona*)¹⁰⁴ **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.66 (s, 1H, OH-5), 5.51 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, OH-3), 4.60 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, OH-2), 3.95 – 3.91 (m, 1H, H-3), 3.62 (dtd, $J = 8.4, 5.1, 3.5$ Hz, 1H, H-2), 2.62 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-17), 2.59 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.06 (s, 3H, CH₃-21), 0.67 (s, 3H, CH₃-19), 0.49 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.6 C-1, 66.5 C-2, 69.3 C-3, 34.5 C-4, 79.2 C-5, 210.3 C-6, 40.9 C-7, 36.3 C-8, 44.2 C-9, 44.7 C-10, 20.7 C-11, 37.9 C-12, 44.0 C-13, 55.8 C-14, 23.6 C-15, 22.1 C-16, 62.4 C-17, 13.2 C-18, 14.4 C-19, 208.5 C-20, 31.2 C-21. **EM** (EI, 70 e⁻V): 366 [M+2]⁺, 365 [M+1]⁺, 364 M⁺, 347, 346, 331, 328, 320, 313, 303, 286, 285, 270, 261, 247, 243, 233, 215, 189, 177, 175, 159, 155, 137, 133, 109, 107, 95, 93, 91 (100%), 79, 71, 67, 55. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 364.2229 calculado para C₂₁H₃₂O₅ 364.2244

5.7.2. Lactona 22→16 del ácido 2 α ,3 α ,5,16 β -tetrahidroxi-6-oxo-5 α -bisorcolánico (253).

El tratamiento del cetol insaturado **248** (211.8 mg, 0.59 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **252** produjo 130.6 mg del producto crudo, el cual se purifica por columna cromatográfica utilizando como eluyente el sistema de disolvente diclorometano/metanol 95:5 para obtener 131.4 mg (0.34 mmol, 58 %) del triol **253**. **P.F.** 304-306 °C (*de acetato de etilo/hexano*). **RMN ¹H** (400 MHz, *DMSO-d₆*) δ ppm 5.66 (s, 1H, OH-5), 5.47 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, OH-3), 5.00 – 4.93 (m, 1H, H-16), 4.55 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, OH-2), 3.95 – 3.90 (m, 1H, H-3), 3.62 (tdd, $J = 8.8, 5.8, 3.3$ Hz, 1H, H-2), 2.63 – 2.55 (m, 2H, H-7_{ax}, H-20), 1.20 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.69 (s, 3H, CH₃-19), 0.63 (s, 3H, CH₃-18). **RMN ¹³C** (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 66.4 C-2, 69.2 C-3, 34.5 C-4, 79.1 C-5, 210.0 C-6, 40.9 C-7, 35.6 C-8, 44.3 C-9, 44.7 C-10, 20.0 C-11, 37.1 C-12, 41.7 C-13, 53.6 C-14, 32.2 C-15, 81.9 C-16, 57.7 C-17, 13.2 C-18, 14.4 C-19, 35.3 C-20, 17.5 C-21, 180.6 C-22. **EM** (EI, 70 e⁻V): 394 [M+2]⁺, 393 [M+1]⁺, 392 M⁺, 374, 348, 331, 313, 289, 276, 275, 261, 247, 221, 205, 175, 173, 159, 174, 133, 119, 107, 93, 91, 79, 69, 67, 55(100%). **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 392.2175 calculado para C₂₂H₃₂O₆ 392.2193.

5.7.3. 2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -coleston-6-ona (254) y 2 β ,3 β ,5-trihidroxi-5 α -coleston-6-ona (255).



El tratamiento del cetol insaturado **249** (200.0 mg, 0.5 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **252** produjo 236.5 mg de la mezcla de los trioles **254** y **255** los cuales se separan en una columna cromatográfica utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 1:1.

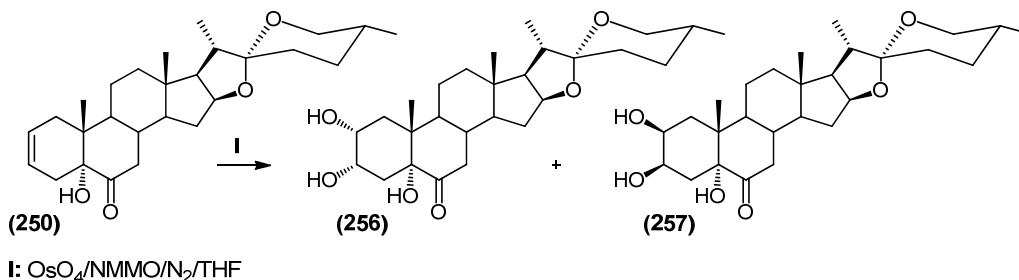
5.7.3.1 2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -coleston-6-ona (254).

Rend. 134.4 mg (0.31 mmol, 62 %). **P.F.** 190-192 °C (*de acetato de etilo*). **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.61 (s, 1H, OH-5), 5.43 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, OH-3), 4.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, OH-2), 3.94 – 3.90 (m, 1H, H-3), 3.61 (ddd, *J* = 11.2, 8.4, 5.2 Hz, 1H, H-2), 2.56 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH₃-21), 0.84 y 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H cada uno, CH₃-26 y CH₃-27), 0.67 (s, 3H, CH₃-19), 0.61 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.6 C-1, 66.5 C-2, 69.3 C-3, 34.4 C-4, 79.2 C-5, 210.4 C-6, 41.0 C-7, 36.5 C-8, 44.2 C-9, 44.7 C-10, 20.7 C-11, 39.3 C-12, 42.7 C-13, 55.9 C-14, 23.3 C-15, 27.7 C-16, 55.5 C-17, 11.8 C-18, 14.4 C-19, 35.2 C-20, 18.5 C-21, 35.6 C-22, 23.5 C-23, 38.9 C-24, 27.4 C-25, 22.4 C-26, 22.7 C-27. **EM** (EI, 70 e⁻V): 436 [M+2]⁺, 435 [M+1]⁺, 434 M⁺, 416, 398, 383, 367, 355, 331, 318, 317, 285, 247, 243, 231, 211, 189, 175, 161, 149, 137, 135, 109, 95, 81, 69 (100%), 55. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V) observado 434.3385 calculado para C₂₇H₄₆O₄ 434.3396.

5.7.3.2 2β,3β,5-Trihidroxi-5α-colestan-6-ona (255).

Rend. 62.3 mg (0.14 mmol, 28 %). **P.F.** 162-164 °C (*de éter etílico*). **RMN ¹H** (400 MHz, *DMSO-d₆*) δ ppm 5.31 (s, 1H, OH-5), 4.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, OH-3), 4.06 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, OH-2), 3.80 – 3.71 (m, 2H, H-2, H-3), 2.66 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-21), 0.86 (s, 3H, CH₃-19), 0.84 y 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H cada uno, CH₃-26 y CH₃-27), 0.60 (s, 3H, CH₃-18). **RMN ¹³C** (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 68.3 C-2, 67.1 C-3, 36.6 C-4, 79.4 C-5, 212.3 C-6, 41.2 C-7, 36.0 C-8, 44.1 C-9, 41.5 C-10, 21.0 C-11, 39.4 C-12, 42.7 C-13, 55.9 C-14, 23.3 C-15, 27.7 C-16, 55.6 C-17, 11.9 C-18, 15.7 C-19, 35.2 C-20, 18.5 C-21, 35.7 C-22, 23.5 C-23, 39.0 C-24, 27.4 C-25, 22.4 C-26, 22.7 C-27. **EM** (EI, 70 eV): 436 [M+2]⁺, 435 [M+1]⁺, 434 M⁺, 416, 390, 373, 355, 331, 318, 316, 303, 255, 247, 221, 175, 161, 147, 121, 137, 107, 95, 81, 69, 57 (100%). **EM-AR** (EI, 70 eV): observado 434.3368 calculado para C₂₇H₄₆O₄ 434.3391.

5.7.4. (25R)-2α,3α,5-Trihidroxi-5α-espirostan-6-ona (256) y (25R)-2β,3β,5-trihidroxi-5α-espirostan-6-ona (257).



El tratamiento del cetol insaturado **250** (428.6 mg, 1 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **252** produjo 460.7 mg de la mezcla de los trioles **256** y **257**, los cuales se separan en una columna cromatográfica utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 1:1.

5.7.4.1 (25R)-2α,3α,5-Trihidroxi-5α-espirostan-6-ona (256).

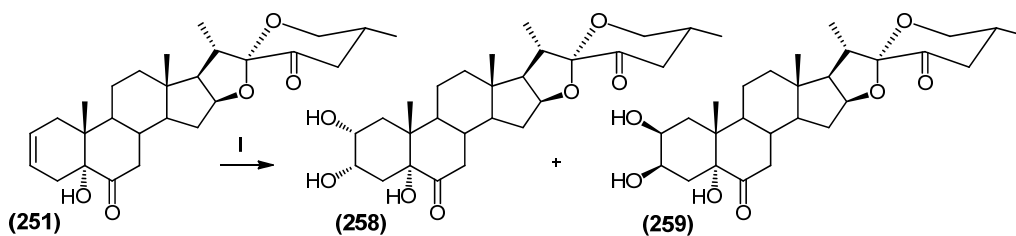
Rend. 289.5 mg (0.63 mmol, 63 %). **P.F.** 276-278 °C (*de acetona*). Lit.278.7-279.1 °C (*de heptano/acetato de etilo*)¹⁰⁶ **RMN ¹H** (400 MHz, *DMSO-d₆*) δ ppm 5.65 (s, 1H, OH-5), 5.47 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, OH-3), 4.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, OH-2), 4.28 (dt, *J* = 7.5, 6.6 Hz, 1H, H-16), 3.94 – 3.89 (m, 1H, H-3), 3.61 (ddd, *J* = 11.2, 8.3, 5.1 Hz, 1H, H-2), 3.41 (ddd, *J* = 10.7, 4.2, 1.6 Hz, 1H, H-26_{cc}), 3.20 (dd, *J* = 11.0, 11.0 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.56 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.91 (d, *J*

= 6.9 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.73 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -27), 0.70 (s, 3H, CH_3 -18), 0.69 (s, 3H, CH_3 -19). **RMN ^{13}C** (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 66.4 C-2, 69.3 C-3, 34.4 C-4, 79.1 C-5, 210.3 C-6, 41.1 C-7, 35.9 C-8, 44.3 C-9, 44.7 C-10, 20.5 C-11, 39.1 C-12, 40.6 C-13, 55.5 C-14, 31.1 C-15, 80.0 C-16, 61.6 C-17, 16.1 C-18, 14.5 C-19, 41.1 C-20, 14.6 C-21, 108.4 C-22, 30.9 C-23, 28.5 C-24, 29.8 C-25, 65.9 C-26, 17.1 C-27. **EM (IE, 70 e $^-$ V):** 462 M^+ , 444, 403, 390, 348, 333, 330, 319, 283, 255, 231, 227, 181, 161, 147, 140, 139 (100%), 121, 115, 109, 93, 69, 55. **EM-AR (IE):** observado 462.2977 calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6$ 462.2976.

5.7.4.2 (25R)-2 β ,3 β ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (257).

Rend. 54.3 mg (0.12 mmol, 12 %). **P.F.** 302-304 $^\circ\text{C}$ (de acetona). Lit. 251-253 $^\circ\text{C}$ (de heptano/acetona).⁸⁴ **RMN ^1H** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 5.36 (s, 1H, OH-5), 4.31 – 4.25 (m, 2H, H-16 y OH-3), 4.08 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, OH-2), 3.79 – 3.71 (m, 2H, H-2 y H-3), 3.41 (dd, $J = 10.9, 2.7$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.20 (dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.67 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.90 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.88 (s, 3H, CH_3 -19), 0.73 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -27), 0.69 (s, 3H, CH_3 -18). **RMN ^{13}C** (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 68.2 C-2, 67.0 C-3, 36.6 C-4, 79.3 C-5, 212.1 C-6, 41.3 C-7, 35.5 C-8, 44.2 C-9, 41.5 C-10, 20.8 C-11, 39.2 C-12, 40.6 C-13, 55.5 C-14, 31.1 C-15, 80.0 C-16, 61.7 C-17, 16.1 C-18, 15.8 C-19, 41.0 C-20, 14.6 C-21, 108.4 C-22, 30.9 C-23, 28.5 C-24, 29.8 C-25, 65.9 C-26, 17.1 C-27. **EM (IE, 70 e $^-$ V):** 462 M^+ , 444, 404, 403, 390, 357, 348, 233, 319, 312, 301, 283, 269, 255, 229, 189, 173, 161, 147, 140, 139 (100%), 121, 115, 109, 93, 69, 55. **EM-AR (IE):** observado 462.3004, calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6$ 462.2976.

5.7.5. (25R)-2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (258) y (25R)-2 β ,3 β ,5-trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (259).



I: OsO₄/NMMO/N₂/THF

El tratamiento de la dicetona insaturada **251** (301.0 mg, 0.68 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **252** produjo 278.0 mg de la mezcla de los trioles **258** y **259**, los cuales se separan en una columna cromatográfica utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 1:1.

5.7.5.1 (25R)-2 α ,3 α ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (258).

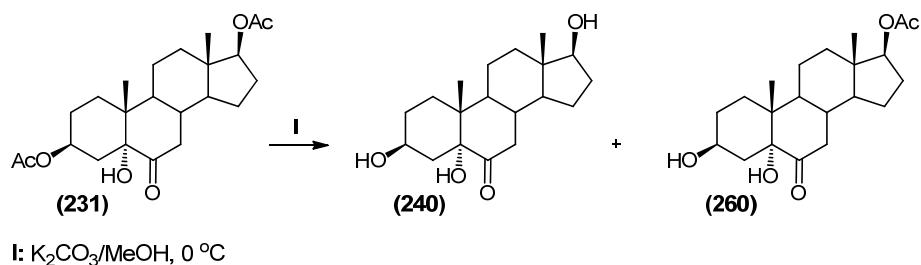
Rend. 132.7 mg (0.28 mmol, 41 %). **P.F.** 286-288 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.65 (s, 1H, OH-5), 5.48 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, OH-3), 4.55 (dd, *J* = 14.5, 6.6 Hz, 2H, H-16, OH-2), 3.92 (a, 1H, H-3), 3.64 (m, 3H, H-2, H-26_{ax,ec}), 2.56 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.87 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃-27), 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃-21), 0.68 (s, 3H, CH₃-19), 0.68 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 66.5 C-2, 69.3 C-3, 34.5 C-4, 79.1 C-5, 210.2 C-6, 41.0 C-7, 35.9 C-8, 44.2 C-9, 44.7 C-10, 20.5 C-11, 38.9 C-12, 41.0 C-13, 55.5 C-14, 31.0 C-15, 82.6 C-16, 60.8 C-17, 15.9 C-18, 14.5 C-19, 34.3 C-20, 14.4 C-21, 109.1 C-22, 201.4 C-23, 44.7 C-24, 35.3 C-25, 64.9 C-26, 16.7 C-27. **EM (FAB):** 477 [M+1]⁺, 459, 385, 341, 327, 281, 267, 221, 207, 165, 147, 136, 97, 91, 73, 69, 57 (100%). **EM-AR (FAB):** observado 477.2872, calculado para C₂₇H₄₁O₇ 477.2847 [M+1]⁺.

5.7.5.2 (25R)-2 β ,3 β ,5-Trihidroxi-5 α -espirostan-6,23-diona (259).

Rend. 64.5 mg (0.14 mmol, 21 %). **P.F.** 288-290 °C (*de acetona/agua*). **RMN ¹H** (400 MHz, *DMSO-d₆*) δ ppm 5.38 (s, 1H, OH-5), 4.55 (dt, $J = 7.6, 6.4$ Hz, 1H, 1H, H-16), 4.29 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, OH-3), 4.09 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, OH-2), 3.79 – 3.71 (m, 2H, H-2 y H-3), 3.65 (dd, $J = 11.1, 11.1$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.59 (ddd, $J = 11.1, 5.0, 1.2$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 2.75 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-20), 2.67 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.43 – 2.30 (m, 2H, H-24), 2.18 (qd, $J = 11.6, 5.4$ Hz, 1H, H-8), 0.88 (s, 3H, CH₃-19), 0.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.86 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.67 (s, 3H, CH₃-18). **RMN ¹³C** (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 68.3 C-2, 67.1 C-3, 36.6 C-4, 79.3 C-5, 212.1 C-6, 41.2 C-7, 35.3 C-8, 44.1 C-9, 41.5 C-10, 20.8 C-11, 39.0 C-12, 41.1 C-13, 55.5 C-14, 31.1 C-15, 82.6 C-16, 60.9 C-17, 16.0 C-18, 15.8 C-19, 34.2 C-20, 14.4 C-21, 109.1 C-22, 201.4 C-23, 44.7 C-24, 35.4 C-25, 64.9 C-26, 16.7 C-27. **Análisis Elemental:** observado C 68.34 % H 8.54 %, estimado para C₂₇H₄₀O₇ C 68.04 % H 8.46 %

5.8. Obtención de análogos de brasinoesteroides de tipo androstano.

5.8.1. 3 β ,5,17 β -Trihidroxi-5 α -androstan-6-ona (240) y 17-monoacetato de 3 β ,5,17 β -trihidroxi-5 α -androstan-6-ona (260).



A una disolución del cetol **231** (1.38 g, 3.4 mmol) en MeOH (80 mL), se le adiciona a 5°C y en agitación una suspensión de K₂CO₃ (471.2 mg) en MeOH (22 mL). La agitación se mantiene a 0°C durante 23 h, se adiciona gota a gota HCl 5% hasta pH = 2 y se mantiene la agitación a 0°C durante 5 min adicionales. Se evapora al vacío más de la mitad del disolvente y se diluye con acetato de etilo (200 mL). El extracto orgánico se lava con H₂O (6 x 50 mL) y con disolución saturada de NaCl (1 x 50 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío para obtener 1.21 g de la mezcla de los alcoholes **240** y **260** los cuales se separan en una columna

cromatográfica utilizando como eluyente un gradiente del sistema diclorometano/metanol de 99:1 a 95:5.

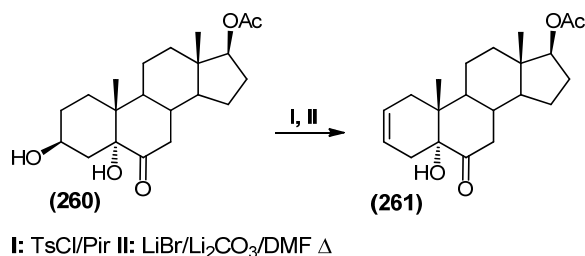
5.8.1.1 3 β ,5,17 β -Trihidroxi-5 α -androstan-6-ona (**240**).

Rend. 186.3 mg (0.58 mmol, 17 %) idéntico al descrito en el epígrafe 5.5.1.

5.8.1.2 17-Monoacetato de 3 β ,5,17 β -trihidroxi-5 α -androstan-6-ona (**260**).

Rend. 676.2 mg (1.86 mmol, 55 %). **P.F.** 254 °C (*de metanol*). **RMN ¹H** (400 MHz, *CDCl*₃ + *MeOD*) δ ppm 4.55 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-17), 3.86 (ddd, *J* = 16.2, 10.9, 4.9 Hz, 1H, H-3), 2.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, OH-3 y OH-5), 2.73 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.17 – 2.07 (m, 1H, H-16), 2.02 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-7_{ec}), 1.98 (s, 3H, CH₃COO-17), 0.73 (s, 3H, CH₃-19), 0.72 (s, 3H, CH₃-18). **RMN ¹³C** (100 MHz) δ ppm 29.8 C-1, 29.9 C-2, 66.7 C-3, 35.4 C-4, 79.9 C-5, 213.7 C-6, 41.1 C-7, 37.0 C-8, 44.2 C-9, 42.3 C-10, 20.8 C-11, 36.5 C-12, 43.1 C-13, 50.6 C-14, 23.1 C-15, 27.3 C-16, 82.5 C-17, 11.9 C-18, 13.8 C-19, 171.4 CH₃COO-17, 21.0 CH₃COO-17. **EM** (EI, 70 e⁻V): 366 [M+2]⁺, 365 [M+1]⁺, 364 M⁺, 346, 332, 331, 313, 303, 293, 286, 265, 264 (100%), 263, 249, 243, 217, 199, 185, 175, 161, 159, 147, 133, 119, 107, 105, 95, 93, 91, 79, 77, 67, 57, 55. **EM-AR** (EI, 70 e⁻V): observado 364.2234 calculado para C₂₁H₃₂O₅ 364.2244.

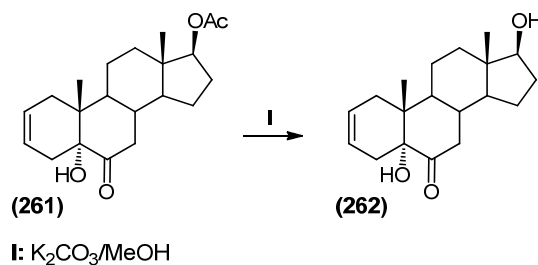
5.8.2. 5,17 β -Dihidroxi-5 α -androst-2-en-6-ona (**261**).



El tratamiento del cetol **260** (662.0 mg, 1.82 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **247** produjo 593.4 mg del producto crudo, el cual se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente el sistema hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener 522.4 mg, (1.51 mmol, 83 %) del cetol insaturado **261**. **P.F.** 172-174 °C (*de diclorometano*). **RMN ¹H** (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm 5.69 – 5.54 (m, 2H, H-2, H-3), 4.61 (dd, *J* = 9.1, 7.9 Hz, 1H, H-17), 2.70 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.66 – 2.59 (m, 1H, H-1), 2.21 – 2.14 (m, 2H, H-16, H-7_{ec}), 2.11

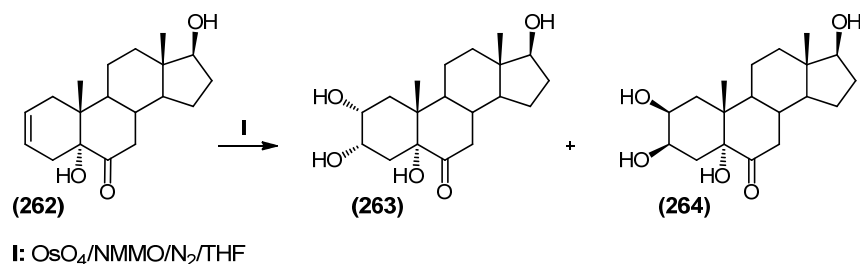
(m, 1H, H-4), 2.02 (d, $J = 2.8$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-17}$), 0.76 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-18}$), 0.69 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-19}$). **RMN** ^{13}C (100 MHz) δ ppm 30.0 C-1, 125.4 C-2, 122.3 C-3, 34.5 C-4, 77.9 C-5, 210.9 C-6, 42.0 C-7, 37.1 C-8, 45.1 C-9, 42.2 C-10, 20.5 C-11, 36.5 C-12, 42.9 C-13, 50.8 C-14, 23.2 C-15, 27.3 C-16, 82.3 C-17, 11.9 C-18, 14.5 C-19, 171.1 $\text{CH}_3\text{-COO-17}$, 21.1 $\text{CH}_3\text{-COO-17}$. **EM** (EI, 70 e $^-$ V): 347 $[\text{M}+1]^+$, 346 M^+ , 330, 328, 314, 313, 301, 300, 286, 285, 271, 264, 250, 249, 235, 225, 224, 209, 193, 175, 157, 149, 147, 134, 133, 109, 107, 105, 95, 93, 91, 83, 81, 79, 77, 69, 67, 57, 55 (100%). **EM-AR** (EI, 70 e $^-$ V): observado 346.2129 calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 346.2139

5.8.3. 5,17 β -Dihidroxi-5 α -androst-2-en-6-ona (262).



El tratamiento del cetol insaturado **261** (421.6 mg, 1.22 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 366.9 mg (1.21 mmol, 99 %) de la cetona dihidroxilada **262**. **P.F.** 194-196 $^\circ\text{C}$ (*de metanol*). **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.70 – 5.56 (m, 2H, H-2, H-3), 3.66 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-17), 2.67 (t, $J = 12.6$ Hz, 1H, H-7 $_{\text{ax}}$), 2.62 (m, 1H, H-1), 2.18 (dd, $J = 12.7, 3.9$ Hz, 1H, H-7 $_{\text{ec}}$), 0.72 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-18}$), 0.71 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-19}$). **RMN** ^{13}C (100 MHz) δ ppm 30.1 C-1, 125.4 C-2, 122.3 C-3, 34.52 C-4, 78.0 C-5, 211.1 C-6, 42.1 C-7, 37.4 C-8, 45.3 C-9, 42.3 C-10, 20.6 C-11, 36.3 C-12, 43.3 C-13, 51.1 C-14, 23.1 C-15, 30.3 C-16, 81.5 C-17, 11.0 C-18, 14.5 C-19. **EM** (EI, 70 e $^-$ V): 305 $[\text{M}+1]^+$, 304 M^+ , 290, 287, 286, 272, 271 (100%), 260, 259, 245, 242, 225, 221, 209, 207, 199, 185, 165, 161, 151, 147, 135, 134, 133, 123, 110, 109, 105, 97, 95, 93, 91, 83, 81, 79, 69, 67, 65, 57, 55. **EM-AR** (EI, 70 e $^-$ V): observado 304.2023 calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 304.2033.

5.8.4. 2 α ,3 α ,5,17 β -Tetrahidroxi-5 α -androstan-6-ona (263) y 2 β ,3 β ,5,17 β -tetrahidroxi-5 α -androstan-6-ona (264).



El tratamiento de la cetona dihidroxilada **262** (304.2 mg, 1.0 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **252** produjo 280.3 mg de la mezcla de los tetraoles **263** y **264**, los cuales se separan en una columna cromatográfica utilizando como eluyente un gradiente del sistema diclorometano/metanol de 98:2 a 95:5.

5.8.4.1 2 α ,3 α ,5,17 β -Tetrahidroxi-5 α -androstan-6-ona (263).

Rend. 158.7 mg (0.47 mmol, 47 %). **P.F.** 238-240 °C (*de metanol*). **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.62 (s, 1H, OH-5), 5.46 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, OH-3), 4.55 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, OH-2), 4.46 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, OH-17), 3.96 – 3.91 (m, 1H, H-3), 3.66 – 3.57 (m, 1H, H-2), 3.47 (td, $J = 8.4, 4.9$ Hz, 1H, H-17), 2.54 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.68 (s, 3H, CH₃-19), 0.61 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.6 C-1, 66.4 C-2, 69.3 C-3, 34.5 C-4, 79.2 C-5, 210.4 C-6, 40.7 C-7, 36.6 C-8, 44.5 C-9, 44.7 C-10, 20.4 C-11, 36.3 C-12, 43.1 C-13, 50.7 C-14, 22.7 C-15, 29.7 C-16, 79.7 C-17, 11.2 C-18, 14.4 C-19. **EM** (EI, 70 eV): 340 [M+2]⁺, 339 [M+1]⁺, 338 M⁺ (100%), 322, 321, 320, 305, 302, 294, 292, 287, 277, 269, 259, 250, 248, 243, 222, 221, 215, 203, 189, 177, 175, 161, 151, 137, 133, 121, 109, 107, 97, 95, 93, 91, 83, 81, 79, 77, 69, 67, 57, 55. **EM-AR** (EI, 70 eV): observado 338.2098 calculado para C₁₉H₃₀O₅ 338.2088.

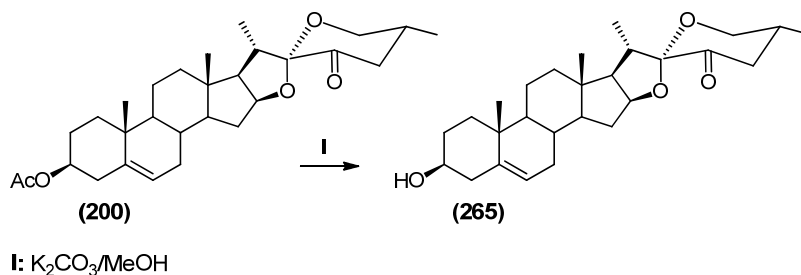
5.8.4.2 2 β ,3 β ,5,17 β -Tetrahidroxi-5 α -androstan-6-ona (264).

Rend. 57.5 mg (0.17 mmol, 17 %). **P.F.** 272-274 °C (*de metanol*). **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.33 (s, 1H, OH-5), 4.46 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, OH-17), 4.30 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, OH-3), 4.09 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, OH-2), 3.79 – 3.72 (m, 2H, H-2, H-3), 3.46 (td, $J = 8.5, 4.9$ Hz, 1H, H-17), 2.64 (t, $J = 12.5$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 0.87 (s, 3H, CH₃-19), 0.59 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100

MHz) δ ppm 30.5 C-1, 68.3 C-2, 67.1 C-3, 36.5 C-4, 79.5 C-5, 212.3 C-6, 40.9 C-7, 36.2 C-8, 44.4 C-9, 41.6 C-10, 20.7 C-11, 36.7 C-12, 43.2 C-13, 50.7 C-14, 22.8 C-15, 29.8 C-16, 79.8 C-17, 11.3 C-18, 15.8 C-19. **EM** (EI, 70 eV): 341 [M+3]⁺, 340 [M+2]⁺, 339 [M+1]⁺, 338 M⁺ (100%), 336, 321, 320, 306, 305, 295, 294, 287, 277, 260, 259, 250, 248, 235, 223, 222, 219, 207, 201, 193, 190, 175, 159, 149, 145, 135, 123, 109, 108, 97, 95, 93, 83, 81, 79, 71, 69, 67. **EM-AR** (EI, 70 eV): observado 338.2092 calculado para C₁₉H₃₀O₅ 338.2088.

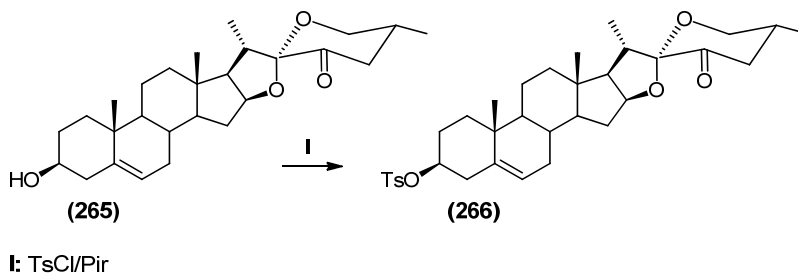
5.9. Obtención de ABRs con cadena lateral de tipo 23-hidroxi-espirostando.

5.9.1. (25R)-3 β -Hidroxi-espirost-5-en-23-ona (265).

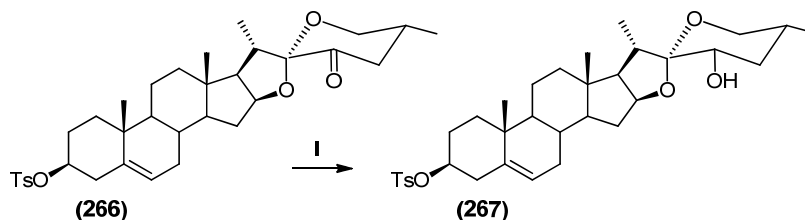


El tratamiento del acetato de 23-oxo diosgenina **200** (1.57 g, 3.3 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **240** produjo 1.30 g (3.0 mmol, 91 %) de la cetona hidroxilada **265**. **P.F.** 236-238 °C (*de metanol*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.33 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H-6), 4.60 (ddd, *J* = 14.1, 7.6, 6.3 Hz, 1H, H-16), 3.77 (dd, *J* = 11.2, 11.2 Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.57 (ddd, *J* = 11.2, 4.6, 1.4 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.50 (ddd, *J* = 15.4, 10.9, 4.4 Hz, 1H, H-3), 2.87 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.49 – 2.38 (m, 2H, H-24), 1.01 (s, 3H, CH₃-19), 0.93 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃-21), 0.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-27), 0.78 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 37.2 C-1, 31.6 C-2, 71.7 C-3, 42.2 C-4, 140.9 C-5, 121.2 C-6, 32.0 C-7, 31.4 C-8, 50.0 C-9, 36.6 C-10, 20.8 C-11, 39.6 C-12, 40.7 C-13, 56.6 C-14, 31.8 C-15, 83.3 C-16, 61.6 C-17, 16.0 C-18, 19.4 C-19, 34.8 C-20, 14.4 C-21, 109.8 C-22, 201.8 C-23, 45.3 C-24, 35.8 C-25, 65.6 C-26, 17.1 C-27. **EM** (FAB): 429 [M+1]⁺, 411, 400, 385, 346, 345, 327, 325, 283, 272, 271, 269, 253, 251, 221, 207, 171, 165, 159, 147, 133, 119, 107, 105, 95, 91, 81, 79, 69, 67, 57, 55 (100%). **EM-AR** (FAB) observado 429.2968, estimado para C₂₇H₄₁O₄ 429.2999 [M+H]⁺.

5.9.2. Tosilato de (25R)-3β-hidroxi-espirost-5-en-23-ona (266).

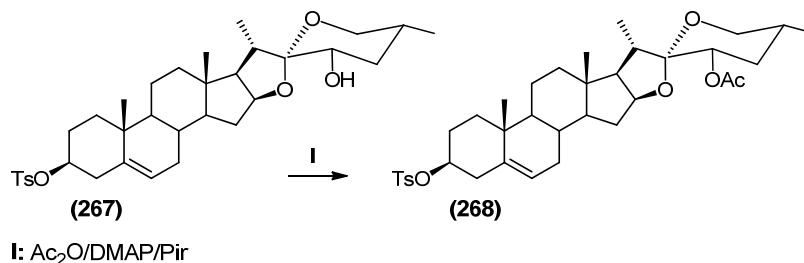


A una disolución de la cetona hidroxilada **265** (1.30 g, 3.02 mmol) en piridina (13 mL) se le adiciona TsCl (1.50 g, 7.07 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Se vierte sobre una disolución de HCl al 3%/hielo, el sólido formado se filtra al vacío, se lava con abundante agua, se disuelve en acetato de etilo (200 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora para obtener 1.72 g (2.95 mmol, 98 %) de la cetona tosilada **266** (. P.F. 160-162 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-*orto*), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-*meta*), 5.33 – 5.27 (m, 1H, H-6), 4.60 (dd, *J* = 14.7, 7.6 Hz, 1H, H-16), 4.38 – 4.27 (m, 1H, H-3), 3.77 (dd, *J* = 11.2, 11.2 Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.57 (dd, *J* = 11.1, 4.0 Hz, 1H, H-26_{ec}), 2.92 – 2.83 (m, 1H, H-20), 2.43 (d, *J* = 7.7 Hz, 6H, H-24_{ax,ec}, H-4_{ax}, CH₃-Ts), 2.33 – 2.22 (m, 2H, H-4_{ec}, H-25), 0.97 (s, 3H, CH₃-19), 0.93 y 0.93 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H cada uno, CH₃-27 y CH₃-21), 0.77 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 36.8 C-1, 28.6 C-2, 82.2 C-3, 38.9 C-4, 144.4 C-5, 123.0 C-6, 31.9 C-7, 31.3 C-8, 49.8 C-9, 36.5 C-10, 20.7 C-11, 39.4 C-12, 40.7 C-13, 56.5 C-14, 31.7 C-15, 83.2 C-16, 61.6 C-17, 16.0 C-18, 19.2 C-19, 34.7 C-20, 14.4 C-21, 109.8 C-22, 201.8 C-23, 45.3 C-24, 35.8 C-25, 65.6 C-26, 17.1 C-27, 139.0 C-*ipso*, 127.6 C-*orto*, 129.7 C-*meta*, 134.7 C-*para*, 21.6 CH₃-Ts. **EM** (FAB): 585 [M+3H]⁺, 584 [M+2H]⁺, 583 [M+H]⁺, 502, 501, 500, 472, 426, 425, 411, 393, 254, 253, 251, 221, 173, 161, 159, 145, 107, 105, 91, 69, 55 (100%). **EM-AR** (FAB): observado 583.3067, estimado para C₃₄H₄₇O₆ ³²S₁ 583.3088 [M+H]⁺.

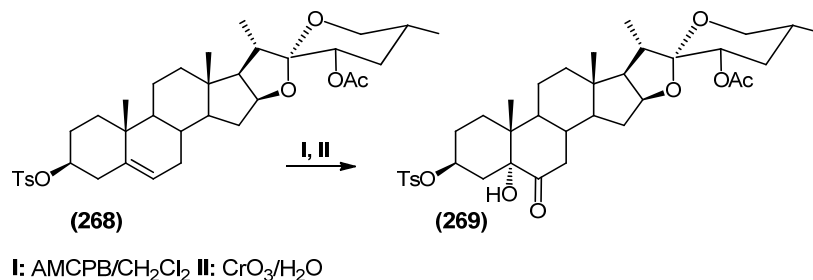
5.9.3. 3-Tosilato de (23S,25R)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (267).

I: NaBH₄/MeOH/dioxano, 0 °C

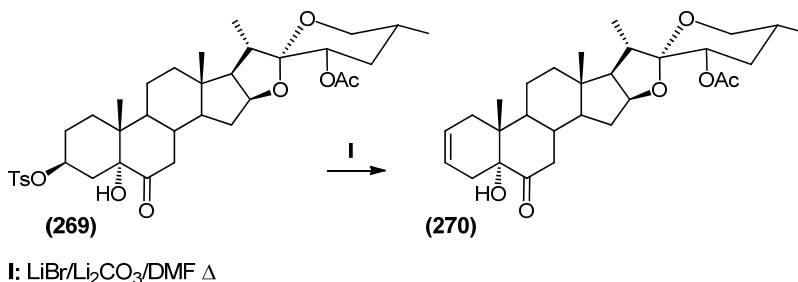
A una disolución fría (0 °C) de la cetona tosilada **266** (150.0 mg, 0.26 mmol) en MeOH (7 mL) y dioxano (1.3 mL), se le adiciona en pequeñas porciones NaBH₄ (53.8 mg). La mezcla de reacción se agita durante 3h, se adiciona agua (1 mL) y se mantiene la agitación durante 10 min más. Se adiciona acetato de etilo (45 mL) y la disolución se lava con H₂O (5 x 10 mL), con disolución saturada de NaCl (2 x 10 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener 120.3 mg (0.21 mmol, 81 %) del alcohol **267**. P.F. 118-120 °C (*de acetona/agua*). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-orto), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-meta), 5.32 – 5.27 (m, 1H, H-6), 4.45 (dt, *J* = 8.9, 7.2 Hz, 1H, H-16), 4.32 (ddd, *J* = 16.2, 11.2, 4.6 Hz, 1H, H-3), 3.46 (dd, *J* = 11.5, 5.0 Hz, 1H, H-23), 3.40 (ddd, *J* = 10.8, 4.6, 1.9 Hz, 1H, H-26_{cc}), 3.24 (dd, *J* = 11.1, 11.1 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.57 – 2.49 (m, 1H, H-20), 2.44 (s, 3H, CH₃-Ts), 0.98 (s, 3H, CH₃-19), 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.81 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm 36.8 C-1, 28.6 C-2, 82.2 C-3, 38.8 C-4, 144.4 C-5, 123.1 C-6, 32.0 C-7, 31.1 C-8, 49.8 C-9, 36.5 C-10, 20.7 C-11, 39.7 C-12, 40.7 C-13, 56.3 C-14, 31.7 C-15, 81.4 C-16, 61.5 C-17, 16.3 C-18, 19.1 C-19, 35.5 C-20, 14.1 C-21, 110.6 C-22, 67.0 C-23, 38.5 C-24, 30.8 C-25, 65.9 C-26, 16.6 C-27, 139.0 C-*ipso*, 127.6 C-*orto*, 129.7 C-*meta*, 134.7 C-*para*, 21.6 CH₃-Ts. EM (IE, 70 eV): 586 [M+2H]⁺, 584 M⁺, 574, 569, 568, 567, 566, 565, 551, 548, 536, 533, 524, 518, 512, 507, 502, 501, 500, 499, 480, 438, 412, 395, 394, 376, 329, 328, 327, 326, 311, 282, 255, 254, 253, 239, 213, 173, 172, 157, 145, 109, 107, 91(100%), 79, 77. EM-AR (IE): observado 584.3189, estimado para C₃₄H₄₈O₆ ³²S₁ 584.3166.

5.9.4. 23-Acetato-3 β -tosilato de (23*S*,25*R*)-espirost-5-en-3 β ,23-diol (268).

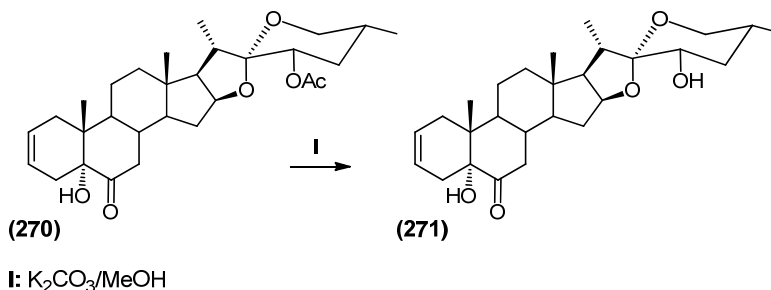
A una disolución del alcohol **267** (1.59 g, 2.71 mmol) en piridina (20 mL) y anhídrido acético (3.91 mL), se le adicionan unos cristales de N,N-dimetil-amino piridina. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 275 min y se vierte sobre H₂O/hielo. El sólido formado se filtra al vacío, se lava con abundante agua (500 mL) y se disuelve en acetato de etilo (150 mL). El extracto orgánico se lava con disolución de CuSO₄ 10% (5 x 50 mL), con H₂O (6 x 50 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 50 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 9:1 para obtener 1.02 g (1.62 mmol, 60 %) del compuesto acetilado **268**. **P.F.** 170-172 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-*orto*), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-*meta*), 5.32 – 5.28 (m, 1H, H-6), 4.82 (dd, *J* = 11.8, 4.7 Hz, 1H, H-23), 4.45 (dd, *J* = 14.7, 7.7 Hz, 1H, H-16), 4.32 (tt, *J* = 11.3, 4.7 Hz, 1H, H-3), 3.42 (ddd, *J* = 10.8, 4.5, 1.8 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.34 (dd, *J* = 11.0, 11.0 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.44 (s, 3H, CH₃-Ts), 2.32 – 2.26 (m, 1H, H-4_{ec}), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-23), 0.98 (s, 3H, CH₃-19), 0.94 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃-21), 0.82 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 36.8 C-1, 28.6 C-2, 82.2 C-3, 38.9 C-4, 144.4 C-5, 123.2 C-6, 32.0 C-7, 31.3 C-8, 49.8 C-9, 36.5 C-10, 20.7 C-11, 39.5 C-12, 40.7 C-13, 56.4 C-14, 31.7 C-15, 81.2 C-16, 61.5 C-17, 15.9 C-18, 19.1 C-19, 30.7 C-20, 14.1 C-21, 108.6 C-22, 68.6 C-23, 34.0 C-24, 35.9 C-25, 65.7 C-26, 16.4 C-27, 170.6 CH₃COO-23, 21.2 CH₃COO-23, 138.9 C-*ipso*, 127.6 C-*orto*, 129.7 C-*meta*, 134.7 C-*para*, 21.6 CH₃-Ts. **EM-FAB:** 628 [M+2]⁺, 627 [M+1]⁺, 625, 619, 607, 579, 568, 567, 565, 499, 456, 455, 396, 395, 393, 328, 327, 282, 281, 253, 221, 167, 173, 157, 154, 147, 136, 107, 95, 91, 85, 73, 57, 55 (100%). **EM-AR** (FAB): observado 627.3305, estimado para C₃₆H₅₁O₇ ³²S₁ 627.3350 [M+1]⁺.

5.9.5. 23-Acetato-3 β -tosilato de (23S,25R)-5,23-dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (269).

El tratamiento del compuesto acetilado **268** (1.69 g, 2.70 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **231** produjo 1.61 g (2.45 mmol, 91 %) del cetol **269**. **P.F.** 178-180 °C (*de acetona/hexano*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-*orto*), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-*meta*), 4.80 (dt, $J = 11.1, 5.4$ Hz, 2H, H-23 y H-16), 4.49 – 4.42 (m, 1H, H-3), 3.42 (dd, $J = 10.6, 4.5$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.33 (dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.71 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.43 (s, 3H, CH₃-Ts), 2.02 (s, 3H, CH₃COO-23), 0.93 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.82 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.77 (s, 3H, CH₃-19), 0.77 (s, 3H, CH₃-18). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 27.3 C-2, 79.2 C-3, 33.8 C-4, 80.5 C-5, 210.9 C-6, 41.7 C-7, 36.7 C-8, 44.2 C-9, 42.2 C-10, 21.1 C-11, 39.4 C-12, 41.5 C-13, 56.0 C-14, 31.4 C-15, 80.9 C-16, 61.4 C-17, 16.0 C-18, 13.9 C-19, 35.9 C-20, 14.0 C-21, 108.6 C-22, 68.6 C-23, 34.0 C-24, 30.7 C-25, 65.7 C-26, 16.4 C-27, 170.6 CH₃COO-23, 21.1 CH₃COO-23, 144.6 C-*ipso*, 127.6 C-*orto*, 129.8 C-*meta*, 134.3 C-*para*, 21.6 CH₃-Ts. **Análisis Elemental.** observado C 64.47 % H 7.48 % S 4.53 %, estimado para C 65.63 % H 7.65 % S 4.87 %.

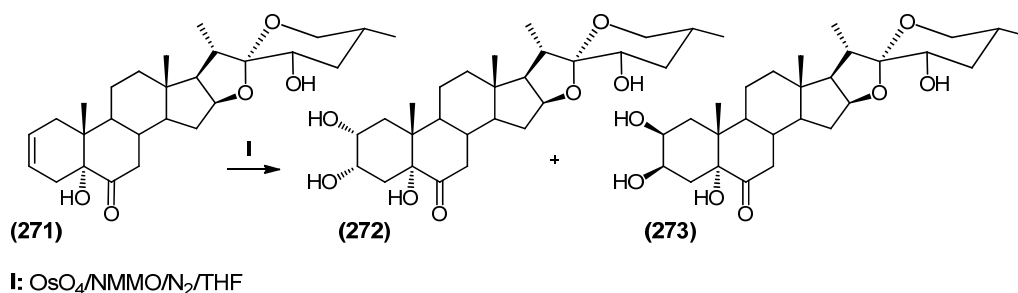
5.9.6. 23-Monoacetato de (23S,25R)-5,23-dihidroxi-5 α -espirost-2-en-6-ona (270).

Una disolución del cetol **269** (445.6 mg, 0.68 mmol) en DMF seca (6.3 mL) se calienta a reflujo durante 165 min con LiBr (395.3 mg) y Li₂CO₃ (327.3 mg). La mezcla se enfría a temperatura ambiente, se le adiciona acetato de etilo (21 mL), se filtra al vacío y las sales se lavan con acetato de etilo (4 x 5 mL). El extracto orgánico resultante se lava con H₂O (7 x 15 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 15 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío para obtener 337.5 mg del producto crudo el cual se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente el sistema de disolvente hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener 267.5 mg (0.55 mmol, 81 %) del cetol insaturado **270**. P.F. 212-214 °C (*de acetona*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.71 – 5.58 (m, 2H, H-2 y H-3), 4.82 (dd, $J = 11.8, 4.8$ Hz, 1H, H-23), 4.46 (td, $J = 8.4, 5.8$ Hz, 1H, H-16), 3.43 (ddd, $J = 10.9, 4.7, 1.9$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.34 (dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.71 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.67 – 2.62 (m, 1H, H-1), 2.22 (dd, $J = 12.7, 3.6$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 2.03 (s, 3H, CH₃COO-23), 0.95 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.83 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-18), 0.72 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.1 C-1, 125.4 C-2, 122.3 C-3, 34.5 C-4, 77.9 C-5, 210.7 C-6, 42.7 C-7, 36.8 C-8, 45.1 C-9, 42.2 C-10, 20.7 C-11, 39.4 C-12, 41.3 C-13, 56.2 C-14, 31.5 C-15, 80.9 C-16, 61.4 C-17, 15.9 C-18, 14.6 C-19, 36.0 C-20, 14.1 C-21, 108.6 C-22, 68.6 C-23, 34.0 C-24, 30.7 C-25, 65.7 C-26, 16.4 C-27, 170.6 CH₃COO-3, 21.1 CH₃COO-3. **EM** (IE, 70 eV): 487 [M+1]⁺, 486 M⁺, 453, 426, 401, 373, 372, 360, 359 (100%), 341, 325, 313, 296, 285, 267, 249, 239, 213, 197, 155, 147, 105, 93, 85, 81, 55. **EM-AR**: observado 486.2962, calculado para C₂₉H₄₂O₆ 486.2976.

5.9.7. (23*S*,25*R*)-5,23-Dihidroxi-5 α -espirost-2-en-6-ona (271).

Una mezcla del cetol insaturado **270** (267.5 mg, 0.55 mmol) en metanol (13 mL) saturado con K₂CO₃ se agita a temperatura ambiente durante 150 min. La mitad del disolvente se evapora al vacío y se vierte sobre H₂O con hielo. Se extrae con acetato de etilo (2 x 50 mL) y el extracto orgánico se lava con H₂O (5 x 15 mL), con disolución saturada de NaCl (1 x 15 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío para obtener 240.5 mg (0.54 mmol, 98 %) del diol insaturado **271**. **P.F.** 236-238 °C (*de acetona/agua*). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.70 – 5.57 (m, 2H, H-2 y H-3), 4.47 (dt, $J = 8.1, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.47 (dd, $J = 11.5, 5.1$ Hz, 1H, H-23),), 3.41 (ddd, $J = 6.1, 5.5, 3.1$ Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.24 (dd, $J = 11.1, 11.1$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.71 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.62 (a, 1H, H-1), 2.54 (p, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-20), 2.21 (dd, $J = 12.6, 3.2$ Hz, 1H, H-7_{ec}), 0.95 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃-21), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-27), 0.80 (s, 3H, CH₃-18), 0.72 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.1 C-1, 125.4 C-2, 122.3 C-3, 34.5 C-4, 77.9 C-5, 210.8 C-6, 42.7 C-7, 36.7 C-8, 45.2 C-9, 42.3 C-10, 20.8 C-11, 39.6 C-12, 41.3 C-13, 56.1 C-14, 31.5 C-15, 81.1 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 14.6 C-19, 35.5 C-20, 14.0 C-21, 110.6 C-22, 67.0 C-23, 38.5 C-24, 30.8 C-25, 65.9 C-26, 16.6 C-27. **EM** (IE, 70 eV): 444 M⁺, 426, 408, 392, 361, 360, 359, 342, 341(100%), 325, 313, 295, 286, 285, 267, 249, 239, 213, 183, 175, 157, 147, 141, 133, 121, 119, 105, 91, 79, 77, 55. **EM-AR**: observado 444.2862, estimado para C₂₇H₄₀O₅ 444.2870.

5.9.8. (23*S*,25*R*)-2 α ,3 α ,5,23-Tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (272) y (23*S*,25*R*)-2 β ,3 β ,5,23-tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (273).



El tratamiento del diol insaturado **271** (206.5 mg, 0.46 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **252** produjo 207 mg de la mezcla de los tetraoles **272** y **273**, los cuales se separan en una columna cromatográfica utilizando como eluyente el sistema de disolvente diclorometano/metanol 97:3.

5.9.8.1 (23*S*,25*R*)-2 α ,3 α ,5,23-Tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (272).

Rend. 104.9 mg (0.22 mmol, 48 %). **P.F.** 270-272 °C (*de acetona/agua*). **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.65 (s, 1H, OH-5), 5.47 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, OH-3), 4.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, OH-2), 4.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, OH-23), 4.31 (dt, *J* = 8.4, 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.93 – 3.89 (m, 1H, H-3), 3.61 (ddd, *J* = 11.0, 8.4, 5.3 Hz, 1H, H-2), 3.32 – 3.28 (m, 2H, H-23, H-26_{ec}), 3.09 (dd, *J* = 11.1, 11.1 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.57 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.47 (m, 1H, H-20), 0.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.75 (s, 3H, CH₃-18), 0.74 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃-27), 0.69 (s, 3H, CH₃-19). **RMN** ¹³C (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 66.4 C-2, 69.2 C-3, 34.5 C-4, 79.1 C-5, 210.3 C-6, 41.1 C-7, 35.9 C-8, 44.3 C-9, 44.7 C-10, 20.5 C-11, 39.4 C-12, 41.1 C-13, 55.5 C-14, 31.0 C-15, 80.2 C-16, 61.1 C-17, 16.2 C-18, 14.5 C-19, 34.4 C-20, 14.2 C-21, 110.4 C-22, 65.8 C-23, 37.5 C-24, 30.7 C-25, 64.9 C-26, 16.6 C-27. **EM-IE:** 478 M⁺, 460, 406, 395, 394, 393, 375, 357, 319, 302, 301, 283(100%), 265, 255, 241, 225, 201, 189, 173, 155, 147, 109, 107, 93, 85, 81. **EM-AR:** observado 478.2922, calculado para C₂₇H₄₂O₇ 478.2925.

5.9.8.2 (23S,25R)-2 β ,3 β ,5,23-Tetrahidroxi-5 α -espirostan-6-ona (273).

Rend. 99.8 mg (0.21 mmol, 46 %). **P.F.** 266-268 °C (*de acetona/agua*). **RMN ^1H** (400 MHz, *DMSO- d_6*) δ ppm 5.36 (s, 1H, OH-5), 4.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, OH-23), 4.31 (dd, $J = 16.2, 6.7$ Hz, 2H, H-16, OH-3), 4.09 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, OH-2), 3.75 (m, 2H, H-2, H-3), 3.32 (m, 2H, H-23, H-26_{ec}), 3.09 (dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.67 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.52 – 2.47 (m, 1H, H-20), 0.88 (s, 3H, CH_3 -19), 0.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.74 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, CH_3 -27), 0.74 (s, 3H, CH_3 -18). **RMN ^{13}C** (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 68.2 C-2, 67.1 C-3, 36.6 C-4, 79.3 C-5, 212.2 C-6, 41.5 C-7, 35.5 C-8, 44.2 C-9, 41.3 C-10, 20.8 C-11, 39.7 C-12, 41.1 C-13, 55.5 C-14, 31.1 C-15, 80.3 C-16, 61.2 C-17, 16.2 C-18, 15.8 C-19, 34.5 C-20, 14.2 C-21, 110.4 C-22, 65.8 C-23, 37.5 C-24, 30.7 C-25, 64.9 C-26, 16.7 C-27. **EM-IE:** 478 M^+ , 460, 406, 395, 394, 393, 375, 357, 339, 319, 301, 283(100%), 265, 255, 241, 189, 181, 147, 121, 107, 93, 85, 55. **EM-AR:** observado 478.2924, calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_7$ 478.2925.

6. CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron 23 análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales de tipo androstano, pregnano, dinorcolano, colestano, espirostano, 23-oxo espirostano, 23-hidroxi espirostano 16 β ,22:22,25-diepoxi dinorcolestano y furostano.
2. Los derivados del pregnano **241** y **252**, así como la pregnenolona (**274**) fueron sometidos al ensayo biológico de la SIF. En el intervalo de dosis probado, el compuesto **241** fue efectivo a dos de las concentraciones probadas, lo cual sugiere que la presencia de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo es capaz de inducir la estimulación del crecimiento vegetal.
3. La actividad mostrada en el bioensayo de la SIF por los derivados de la lactona dinorcolánica **242** y **253**, así como la mostrada por la vespertilina (**206**) la cual carece de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo, sugiere que la agrupación lactona en la cadena lateral puede ser capaz de producir el crecimiento vegetal, lo cual abre un interesante tema que debe investigarse más a fondo.
4. Los derivados del colesterol **243**, **254** y **255** fueron sometidos al ensayo biológico de la SIF. En el intervalo de dosis probado, los compuestos **243** y **254** fueron tan efectivos como la fitohormona natural **30**. Estos resultados sugieren que la presencia de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo, es capaz de inducir la estimulación del crecimiento vegetal, incluso en ausencia de funciones oxigenadas en la cadena lateral.
5. La caracterización de los compuestos obtenidos mediante las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear evidenció las diferentes transformaciones realizadas tanto en la cadena lateral como en los anillos A/B.

7. REFERENCIAS

- (a) Cutler, H. G.; Yokota, T.; Adam, G. *Brassinosteroids. Chemistry, bioactivity, and applications*. A. C. S Symp. 474. American Chemical Society: Washington, DC, **1991**;

(b) Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; de Groot, A. E. *Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormone* San Diego: Academic Press, **1999**;

(c) Sakurai, A.; Yokota, T.; Clouse, S. D. *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*. Springer: **1999**;

(d) Hayat, S.; Ahmad, A. *Brassinosteroids: Bioactivity and Crop Productivity*. Springer: **2003**;

(e) Clouse, S. D.; Sasse, J. M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 427-451;

(f) Bajguz, A.; Tretyn, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*. **2003**, *62* (7), 1027-1046;

(g) Iglesias, A. M. A.; Pérez, G. R.; Coll, M. F. Natural brassinosteroids and their synthetic analogs. *Rev C.N.I.C, Cienc. Quím.* **1996**, *27*, 3-12;

(h) Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen, J. D.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Cook, J. C. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*. **1979**, *281* (5728), 216-217.
- Malíková, J.; Swaczynová, J.; Kolář, Z.; Strnad, M. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*. **2008**, *69* (2), 418-426.
- (a) Iglesias-Arteaga, M. A.; Gil, R. P.; Lara, V. L.; Martinez, C. S. P.; Manchado, F. C. Synthesis and biological activity of (22*R*,25*R*)-5 α -furostan-2 α ,3 α ,26-triol. *J. Chem. Res.* **1996**, (11), 504-505;

(b) Iglesias-Arteaga, M. A.; Gil, R. P.; Martinez, C. S. P.; Manchado, F. C. Spirostanic analogues of teasterone. Synthesis, characterisation and biological activity of laxogenin, (23*S*)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **2001**, (3), 261-266;

(c) Iglesias-Arteaga, M. A.; Martinez, C. P.; Manchado, F. C. Spirostanic analogues of castasterone. *Steroids*. **2002**, *67* (3-4), 159-163.

4. (a) Brosa, C.; Soca, L.; Terricabras, E.; Ferrer, J. C.; Alsina, A. New synthetic brassinosteroids: a 5 α -hydroxy-6-ketone analog with strong plant growth promoting activity. *Tetrahedron*. **1998**, *54* (40), 12337-12348; (b) Romero-Avila, M.; de Dios-Bravo, G.; Mendez-Stivalet, J. M.; Rodriguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. Synthesis and biological activity of furostanic analogues of brassinosteroids bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety. *Steroids*. **2007**, *72* (14), 955-959.
5. Mitchell, J. W.; Whitehead, M. R. Responses of Vegetative Parts of Plants Following Application of Extract of Pollen from *Zea mays*. *Bot. Gaz.* **1941**, *102* (4), 770-791.
6. Mitchell, J. W.; Skaggs, D. P.; Anderson, W. P. Plant Growth-stimulating Hormones in Immature Bean Seeds. *Science*. **1951**, *114* (2954), 159-161.
7. Mitchell, J. W.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Plimmer, J. R.; Smith, M. V. Brassins: a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature*. **1970**, *225* (5237), 1065-1066.
8. Mandava, N. B., Sidwell, B A., Mitchell, J W., Worley JF, Production of brassins from rape pollen : a convenient preparative method. *Ind. Eng. Chem. Prod. Dev.* **1973**, *12*, 138-139.
9. a) Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Pfeffer, P. E.; Mandava, N.; Warthen Jr, J. D.; Worley, J. F. 6-D-Glucopyranosyl fatty acid esters from *Brassica napus* pollen. *Phytochemistry*. **1978**, *17* (7), 1187-1189. b) Gregory, L. E. Acceleration of Plant Growth Through Seed Treatment with Brassins. *Am. J. Bot.* **1981**, *68* (4), 586-588.
10. a) Mandava, N. B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **1988**, *39* (1), 23-52. b) Steffens, G. L. U.S. Department of Agriculture Brassins Project: 1970-1980. In *Brassinosteroids*, American Chemical Society: **1991**.

11. Marumo, S.; Hattori, H.; Abe, H.; Nonoyama, Y.; Munakata, K., The Presence of Novel Plant Growth Regulators in Leaves of *Distylium racemosum* Sied et Zucc. *Agric. Biol.Chem* **1968**, 32 (4), 528-529.
12. Ikekawa, N.; Takatsuto, S.; Kitsuwa, T.; Saito, H.; Morishita, T.; Abe, H. Analysis of natural brassinosteroids by gas chromatography and gas chromatography—mass spectrometry. *J. Chromat. A*. **1984**, 290 (0), 289-302.
13. Yokota, T.; Arima, M.; Takahashi, N. Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23 (12), 1275-1278.
14. a) Sasse, J. M. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plant.* **1997**, 100 (3), 696-701. b) Miransari, M. Role of phytohormone signaling during stress. In *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, Springer New York: **2012**, 381-393.
15. Yokota, T.; Morita, M.; Takahashi, N. 6-Deoxocastasterone and 6-deoxodolichosterone - putative precursors for brassinolide-related steroids from *Phaseolus-vulgaris*. *Agric. Biol.Chem.* **1983**, 47 (9), 2149-2151.
16. (a) Kim, S.-K. Natural Occurrences of Brassinosteroids. In *Brassinosteroids*, American Chemical Society: **1991**; (b) Park, S. C.; Kim, T. W.; Kim, S. K. Identification of brassinosteroids with 24*R*-methyl in immature seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, 21 (12), 1274-1276.
17. Yokota, T.; Matsuoka, T.; Koarai, T.; Nakayama, M. 2-Deoxybrassinolide, a brassinosteroid from *Pisum sativum* seed. *Phytochemistry.* **1996**, 42 (2), 509-511.

18. Motegi, C.; Takatsuto, S.; Gamoh, K. Identification of brassinolide and castasterone in the pollen of orange (*Citrus sinensis* Osbeck) by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromat. A.* **1994**, *658* (1), 27-30.
19. Takatsuto, S.; Yokota, T. Biochemical analysis of natural brassinosteroids. *Brassinosteroids.* **1999**, 47-68.
20. Piotrowska, A.; Bajguz, A. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry.* **2011**, *72* (17), 2097-2112.
21. Bajguz, A. *Brassinosteroids - Occurrence and Chemical Structures in Plants.* **2011**.
22. Yokota, T.; Baba, J.; Takahashi, N. A new steroidal lactone with plant-growth regulatory activity from *Dolichos lablab* seed. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23* (47), 4965-4966.
23. Yokota, T.; Higuchi, K.; Takahashi, N.; Kamuro, Y.; Watanabe, T.; Takatsuto, S. Identification of brassinosteroids with epimerized substituents and/or the 23-Oxo group in pollen and anthers of Japanese cedar. *Biosci. Biotechnol. Bioch.* **1998**, *62* (3), 526-531.
24. Kim, S. K.; Yokota, T.; Takahashi, N. 25-Methyldolichosterone, a new brassinosteroid with a tertiary butyl group from immature seed of *Phaseolus vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51* (8), 2303-2305.
25. Abe, H.; Morishita, T.; Uchiyama, M.; Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; Ikeda, M.; Sassa, T.; Kitsuwa, T.; Marumo, S. Occurrence of three new brassinosteroids: brassinone, (24S)-24-ethylbrassinone and 28-norbrassinolide, in higher plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **1983**, *39* (4), 351-353.
26. Kim, S. K. Natural Occurrences of Brassinosteroids. *Acs Symposium Series* **1991**, *474*, 26-35.

27. Baba, J.; Yokota, T.; Takahashi, N. Brassinolide-related new bioactive steroids from dolichos-lablab seed. *Agric. Biol.Chem.* **1983**, *47* (3), 659-661.
28. Taylor, P. E.; Spuck, K.; Smith, P. M.; Sasse, J. M.; Yokota, T.; Griffiths, P. G.; Cameron, D. W. Detection of brassinosteroids in pollen of lolium-perenne 1 by immunocytochemistry. *Planta.* **1993**, *189* (1), 91-100.
29. Yokota, T.; Koba, S.; Kim, S. K.; Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; Sakakibara, M.; Okada, K.; Mori, K.; Takahashi, N. Diverse structural variations of the brassinosteroids in Phaseolus vulgaris seed. *Agric. Biol.Chem.* **1987**, *51* (6), 1625-1631.
30. Spengler, B.; Schmidt, J.; Voigt, B.; Adam, G. 6-Deoxo-28-norcastasterone and 6-deoxo-24-epicastasterone - 2 new brassinosteroids from ornithopus-sativus. *Phytochemistry.* **1995**, *40* (3), 907-910.
31. Bishop, G. J.; Nomura, T.; Yokota, T.; Harrison, K.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Jones, J. D. G.; Kamiya, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *PNAS.* **1999**, *96* (4), 1761-1766.
32. Schmidt, J.; Spengler, B.; Voigt, B.; Adam, G. Brassinosteroids - Structures, analysis and synthesis. *Evol. Metab. Path.* **2000**, *34*, 385-407.
33. Ismaili, J.; Boisvert, M.; Longpre, F.; Carange, J.; Le Gall, C.; Martinoli, M.-G.; Daoust, B. Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: Synthesis and structure-activity relationships. *Steroids.* **2012**, *77* (1-2), 91-99.
34. McMorris, T. C.; Patil, P. A. Improved synthesis of 24-epibrassinolide from ergosterol. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (8), 2338-2339.

35. Zhou, W. S.; Tian, W. S. Study on the synthesis of brassinolide and related-compounds .3. Stereoselective synthesis of typhasterol from hyodeoxycholic acid. *Tetrahedron*. **1987**, 43 (16), 3705-3712.
36. Wu, S. Z.; Zhou, W. S. Study on the syntheses of brassinolide and related-compounds .14. highly stereoselective construction of the side-chain of brassinosteroids utilizing the beta-alkylative 1,3-carbonyl transposition of the steroidal 22-en-24-one. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*. **1990**, (6), 1765-1767.
37. Khripach, V. A. Synthesis of brassinosteroids. *Pure Appl. Chem.* **1990**, 62 (7), 1319-1324.
38. Centurion, O. M. T.; Galagovsky, L. R. Alternative synthesis of (24S)-homoethylcastasterone from stigmasterol. *Anal. Asoc. Quim. Argentina*. **1998**, 86 (3-6), 104-109.
39. Takatsuto, S.; Ikekawa, N. Synthesis of (22R,23R)-28-homobrassinolide. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, 30 (11), 4181-4185.
40. Ikekawa, N.; Zhao, Y. J. Application of 24-epibrassinolide in agriculture. *ACS Symposium Series*. **1991**, 474, 280-291.
41. Voigt, B.; Schmidt, J.; Adam, G. Synthesis of 24-epiteasterone, 24-epityphasterol and their B-homo-6 α -oxalactones from ergosterol. *Tetrahedron*. **1996**, 52 (6), 1997-2004.
42. Sakakibara, M.; Mori, K. Brassinolide and its analogs. 2. Facile synthesis of (22R,23R)-homobrassinolide. *Agric. Biol.Chem.* **1982**, 46 (11), 2769-2779.
43. Takatsuto, S. Synthesis of dolicholide from (22E, 24R)-3 α ,5-cyclo-5 α -ergost-22-en-6-one. *Agric. Biol.Chem.* **1988**, 52 (9), 2361-2363.

44. Sakakibara, M.; Okada, K.; Ichikawa, Y.; Mori, K. Synthesis of brassinolide, a plant-growth promoting steroidal lactone. *Heterocycles*. **1982**, *17*, 301-304.
45. Zhou, W. S.; Jiang, B.; Pan, X. F. Stereoselective synthesis of the brassinolide side-chain - novel syntheses of brassinolide and related-compounds. *Tetrahedron*. **1990**, *46* (9), 3173-3188.
46. Kametani, T.; Katoh, T.; Fujio, J.; Nogiwa, I.; Tsubuki, M.; Honda, T. An improved synthesis of plant-growth regulating steroid brassinolide and its congeners. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (9), 1982-1991.
47. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; de Groot, A. E. *Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormone* San Diego: Academic Press, **1999**.
48. Back, T. G.; Baron, D. L.; Luo, W. D.; Nakajima, S. K. Concise, improved procedure for the synthesis of brassinolide and some novel side-chain analogues. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (4), 1179-1182.
49. Hazra, B. G.; Joshi, P. L.; Bahule, B. B.; Argade, N. P.; Pore, V. S.; Chordia, M. D. Stereoselective synthesis of (22*R*,23*R*,24*S*)-3 β -hydroxy-5-ene-22,23-dihydroxy-24-methyl-cholestane - a brassinolide intermediate from 16-dehydropregnenolone acetate. *Tetrahedron*. **1994**, *50* (8), 2523-2532.
50. Brosa, C.; Capdevila, J. M.; Zamora, I. Brassinosteroids: A new way to define the structural requirements. *Tetrahedron*. **1996**, *52* (7), 2435-2448.
51. Ramírez, J. A.; Brosa, C.; Galagovsky, L. R. Synthesis and bioactivity of C-29 brassinosteroid analogues with different functional groups at C-6. *Phytochemistry*. **2005**, *66* (5), 581-587.

52. Kishi, T.; Wada, K.; Marumo, S.; Mori, K. Brassinolide and its analogs .7. Synthesis of brassinolide analogs with a modified ring-B and their plant growth-promoting activity. *Agric. Biol.Chem.* **1986**, *50* (7), 1821-1830.
53. Brosa, C. Structure-activity relationship. *Brassinosteroids*. **1999**, 191-222.
54. Back, T. G.; Janzen, L.; Pharis, R. P.; Yan, Z. H. Synthesis and bioactivity of C-2 and C-3 methyl ether derivatives of brassinolide. *Phytochemistry*. **2002**, *59* (6), 627-634.
55. Galagovsky, L. R.; Gros, E. G.; Ramirez, J. A. Synthesis and bioactivity of natural and C-3 fluorinated biosynthetic precursors of 28-homobrassinolide. *Phytochemistry*. **2001**, *58* (6), 973-980.
56. Acebedo, S. L.; Ramirez, J. A.; Galagovsky, L. R. Synthesis and biological activity of brassinosteroids fluorinated at C-2. *Steroids*. **2009**, *74* (4-5), 435-440.
57. Ramirez, J. A.; Gros, E. G.; Galagovsky, L. R. Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom substituents on synthetic 28-homobrassinosteroid analogs. *Tetrahedron*. **2000**, *56* (34), 6171-6180.
58. Ramirez, J. A.; Brosa, C.; Galagovsky, L. R. Synthesis and bioactivity of C-29 brassinosteroid analogues with different functional groups at C-6. *Phytochemistry*. **2005**, *66* (5), 581-587.
59. Acebedo, S. L.; Alonso, F.; Galagovsky, L. R.; Ramirez, J. A. Synthesis and biological activity of ring-A difluorinated brassinosteroids. *Steroids*. **2011**, *76* (10-11), 1016-1020.
60. Ramirez, J. A.; Centurion, O. M. T.; Gros, E. G.; Galagovsky, L. R. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. *Steroids*. **2000**, *65* (6), 329-337.

61. Brosa, C.; Amoros, M.; Molist, M.; Hernandez, X. New brassinosteroid analogs having nitrogenated functionalities at C-3 to provide more information about the brassinosteroid-receptor interaction. *Tetrahedron*. **2004**, *60* (38), 8529-8534.
62. Okada, K.; Mori, K. Brassinolide and its analogs .3. Synthesis of brassinolide analogs and their plant growth-promoting activity. *Agric. Biol.Chem* **1983**, *47* (1), 89-95.
63. Mori, K.; Takeuchi, T. Brassinolide and its analogs .8. Synthesis of 25-methyldolichosterone, 25-methyl-2,3-diepidolichosterone, 25-methylcastasterone and 25-methylbrassinolide. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, (8), 815-818.
64. Kondo, M.; Mori, K. Brassinolide and its analogs .4. Synthesis of brassinolide analogs with or without the steroid side-chain. *Agric. Biol.Chem.* **1983**, *47* (1), 97-102.
65. Kohout, L.; Velgova, H.; Strnad, M.; Kaminek, M. Steroids .328. Brassino steroids with androstane and pregnane skeleton. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1987**, *52* (2), 476-486.
66. Kohout, L.; Slavikova, B.; Strnad, M. 17 α -oxa-17 α -homobrassinosteroid analogues. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1998**, *63* (5), 646-654.
67. Strnad, M.; Kohout, L. A simple brassinolide analogue 2 α ,3 α -dihydroxy-17 β -(3-methylbutyryloxy)7-oxa-B-homo-5 α -androstan-6-one which induces bean second internode splitting. *Plant Growth Regul.* **2003**, *40* (1), 39-47.
68. Kohout, L. Synthesis of brassino steroids with a 5 carbon-atom ester functionality in position 17. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, *54* (12), 3348-3359.

69. Sisa, M.; Hnilickova, J.; Swaczynova, J.; Kohout, L. Syntheses of new androstane brassinosteroids with 17 β -ester group - butyrates, heptafluorobutyrate, and laurates. *Steroids*. **2005**, 70 (11), 755-762.
70. Hnilickova, J.; Kohout, L.; Capdevila, E.; Esteve, A.; Vilaplana, M.; Molist, M.; Brosa, C.; Swaczynova-Oklestkova, J.; Slavikova, B. The synthesis of androstane brassinosteroid analogues with alpha-azido acid ester groups in position 17 β . *Steroids*. **2010**, 75 (12), 1005-1010.
71. Cerny, V.; Zajicek, J.; Strnad, M. On steroids .327. 2 α ,3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-B-homo-5 α -pregnan-21-oic acid and its derivatives as brassinolide analogs. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1987**, 52 (1), 215-222.
72. Kohout, L.; Kasal, A.; Strnad, M. Pregnane-type brassinosteroids with a four-carbon ester functionality in position 20. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, 61 (6), 930-940.
73. Rivera, D. G.; Coll, F. Synthesis and preliminary bioactivity evaluation of new pregnane brassinosteroid-like compounds. *Can. J. Chem. Rev. Canadienne De Chimie*. **2005**, 83 (8), 1084-1092.
74. Kohout, L.; Strnad, M. On steroids .321. Brassinosteroids with a cholestane side-chain. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1986**, 51 (2), 447-458.
75. Sisa, M.; Vilaplana-Polo, M.; Ballesteros, C. B.; Kohout, L. Brassinolide activities of 2 α ,3 α -diols versus 3 α ,4 α -diols in the bean second internode bioassay: Explanation by molecular modeling methods. *Steroids*. **2007**, 72 (11-12), 740-750.
76. Cerny, V.; Strnad, M.; Kaminek, M. On steroids .322. Preparation of 2 α ,3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23,24-dinor-B-homo-5 α -cholanic acid, its esters and amides as brassinolide analogs. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1986**, 51 (3), 687-697.

77. Adam, G.; Marquardt, V.; Vorbrodt, H. M.; Horhold, C.; Andreas, W.; Gartz, J. Aspects of synthesis and bioactivity of brassinosteroids. *ACS Symposium Series*. **1991**, 474, 74-85.
78. Rodriguez, C. R.; Villalobos, Y. I.; Becerra, E. A.; Manchado, F. C.; Herrera, D. C.; Zullo, M. A. T. Synthesis and biological activity of three new 5 α -hydroxy spirostane brassinosteroid analogues. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14 (3), 466-469.
79. Garate, J. L. M.; Garcia, L. S.; Martinez, C. S. P.; Iglesias-Arteaga, M. A.; Herrera, D. C.; Manchado, F. C. Synthesis of a new bisnorcholanolic lactone. *Synth. Commun.* **2003**, 33 (7), 1203-1209.
80. Iglesias-Arteaga, M. A.; Gil, R. P.; Martínez, C. S. P.; Manchado, F. C. Synthetic steroidal sapogenins. Part III - 23-ketohecogenin and 23-ketoisochiapagenin. *Synth. Commun.* **2000**, 30 (1), 163-170.
81. Iglesias-Arteaga, M. A. Síntesis de análogos espiroestánicos y furoestánicos de brasinoesteroides. *Tesis de Doctorado* **1995**.
82. Iglesias-Arteaga, M. A.; Gil, R. P.; Lara, V. L.; Martinez, C. S. P.; Manchado, F. C.; Perez, A. R.; Rios, L. P. Synthesis of (22R,25R)-3 β ,26-dihydroxy-5 α -furostan-6-one. *Synth. Commun.* **1998**, 28 (8), 1381-1386.
83. Iglesias-Arteaga, M. A.; Gil, R. P.; Lara, V. L.; Martinez, C. S. P.; Manchado, F. C. Synthesis and biological activity of (22R,25R)-5 α -furostan-2 α ,3 α ,26-triol. *J. Chem. Res.* **1996**, (S), 504-505.
84. Rivera, D. G.; Leon, F.; Coll, F.; Davison, G. P. Novel 5 β -hydroxyspirostan-6-ones ecdysteroid antagonists: Synthesis and biological testing. *Steroids*. **2006**, 71 (1), 1-11.

-
85. Bratoeff, E.; Cabeza, M.; Pérez-Ornelas, V.; Recillas, S.; Heuze, I. In vivo and in vitro effect of novel 4,16-pregnadiene-6,20-dione derivatives, as 5α -reductase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *111* (3–5), 275-281.
86. Pérez-Ornelas, V.; Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Heuze, I.; Sánchez, M.; Ramírez, E.; Naranjo-Rodríguez, E. New 5α -reductase inhibitors: In vitro and in vivo effects. *Steroids*. **2005**, *70* (3), 217-224.
87. Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Ramirez, E.; Heuze, I.; Recillas, S.; Berrios, H.; Cruz, A.; Cabrera, O.; Perez, V. Biological activity of novel progesterone derivatives having a bulky ester side chains at C-3. *Steroids*. **2008**, *73* (8), 838-843.
88. Barton, D. H. R.; Kulkarni, Y. D.; Sammes, P. G. Transformation of the steroidal sapogenin side chain. Part II. A new method for the preparation of 16-alkylated-pregn-16-en-20-ones. *J. Chem. Soc C: Org.* **1971**, 1149-1156.
89. Piccialli, V.; Smaldone, D. M. A.; Sica, D. Synthesis of polyoxygenated steroids .2. Studies towards the synthesis of polyoxygenated steroids - reaction of some tri-substituted and tetra-substituted monoene steroids with RuO_4 . *Tetrahedron*. **1993**, *49* (20), 4211-4228.
90. Musumeci, D.; Roviello, G. N.; Sica, D. The oxidation of Δ^2 , $\Delta^{2,4}$ and $\Delta^{4,6}$ steroids with RuO_4 . *Steroids*. **2004**, *69* (3), 173-179.
91. Murahashi, S. I.; Saito, T.; Hanaoka, H.; Murakami, Y.; Naota, T.; Kumobayashi, H.; Akutagawa, S. Ruthenium-catalyzed oxidative transformation of alkenes to α -ketols with peracetic-acid - simple synthesis of cortisone-acetate. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (11), 2929-2930.

92. Miescher, K. Uber steroide .99. Ein einfacher weg zur bereitung von corticosteroiden mit dioxyaceton-seitenkette, ausgehend von 17-ketonen - neue teilsynthese von Reichsteins substanz-s. *Helv. Chim. Acta.* **1950**, *33* (6), 1840-1847.
93. Fieser, L. F.; Rajagopalan, S. Selective Oxidation with N-Bromosuccinimide. II. Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (12), 3938-3941.
94. Salvador, J. A. R.; Moreira, V. M.; Hanson, J. R.; Carvalho, R. A. One-pot, high yield synthesis of α -ketols from $\Delta^{(5)}$ -steroids. *Steroids.* **2006**, *71* (3), 266-272.
95. Iglesias-Arteaga, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Mata-Esma, M. Y.; Viñas-Bravo, O.; Bernès, S. Abnormal Beckmann rearrangement in 23-hydroxyiminodiosgenin acetate. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (25), 4921-4926.
96. Sato, Y.; Ikekawa, N. The Chemistry of the spiroaminoketal side chain of Solasodine and Tomatidine. II.1 Chemistry of 3 β ,16 β -Diacetoxy-20-(2'- $\Delta^{2'}$ -N-acetyl-5'-methyltetrahydropyridyl)-5-pregnene. *J. Org. Chem.* **1960**, *25* (5), 786-789.
97. Garate, J. L. M.; de Magalhaes, G. C.; Romeiro, L. A. S., Synthesis of a brassinosteroid analogue from vespertiline. *Quimica Nova* **1998**, *21* (6), 726-730.
98. Chaosuancharoen, N.; Kongkathip, N.; Kongkathip, B. A novel synthetic approach from diosgenin to a 17 α -hydroxy orthoester via a regio- and stereo-specific rearrangement of an epoxy ester. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 961-983.
99. Wei-Shan, C.; Ta-Chung, H.; Huang-Minlon. *Huaxue Xuebao*, **1962**, *28*, 394-397.
100. Iglesias-Arteaga, M. A.; Simuta-Lopez, E. M.; Xochihua-Moreno, S.; Vinas-Bravo, O.; Smith, S. M.; Reyes, S. M.; Sandoval-Ramirez, J. S. A convenient procedure for the

- synthesis of 3 β -hydroxy-6-oxo-5 α -steroids. Application to the synthesis of laxogenin. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16* (3A), 381-385.
101. Knof, L. Derivate von 5.6-Seco-sterinen und -steroiden. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *647* (1), 53-61.
102. Rubin, M. B.; Brown, A. P. Steroids of unnatural configuration. Synthesis and properties of ring B modified 17 α ,-20 ketopregnanes. *J. Org. Chem.* **1968**, *33* (7), 2794-2801.
103. Njar, V. C. O.; Hartmann, R. W.; Robinson, C. H. Synthesis of 6 α ,7 α - and 6 β ,7 β -aziridinoandrost-4-ene-3,17-diones and related compounds: potential aromatase inhibitors. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1995**, (8), 985-991.
104. Rivera, D. G.; Coll, F., Synthesis and preliminary bioactivity evaluation of new pregnane brassinosteroid-like compounds. *Can. J. Chem.* **2005**, *83* (8), 1084-1092.
105. Reich, H.; Walker, F. E.; Collins, R. W. Δ^4 -Cholestene-6-one and Related Compounds. *J. Org. Chem.* **1951**, *16* (11), 1753-1760.
106. Rivera, D. G.; Pando, O.; Leliebre-Lara, V.; Coll, D.; León, F.; Coll, F. Synthesis of spirostanic analogues of brassinosteroids via homogeneous permanganate dihydroxylation. *J. Chem. Res.* **2004**, *2004* (1), 53-54.
107. Lopez, Y.; Ruiz-Perez, K. M.; Yopez, R.; Santillan, R.; Flores-Alamo, M.; Iglesias-Arteaga, M. A. Mechanistic insights and new products of the reaction of steroid sapogenins with NaNO₂ and BF₃·Et₂O in acetic acid. *Steroids.* **2008**, *73* (6), 657-668.
108. Fried, J.; Edwards, J. A. *Organic reactions in steroid chemistry*. Van Nostrand Reinhold Co.: New York, **1972**.

109. Iglesias-Arteaga, M. A.; Alvarado-Nuño, A. A. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -induced Beckmann rearrangement of 23-hydroxyiminosapogenins. A shortcut to bisnorcholanolic lactones. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (30), 5351-5353.
110. Sato, Y.; Ikekawa, N. Chemistry of the Spiroaminoketal Side Chain of Solasodine and Tomatidine. VI.1 The Beckmann Rearrangement of the Oximino Derivatives. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (12), 5058-5061.
111. Iglesias-Arteaga, M. A.; Velázquez-Huerta, G. A. Favorskii rearrangement of 23-oxo-3-epi-smilagenin acetate induced by iodosobenzene. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (40), 6897-6899.
112. Iglesias-Arteaga, M. A.; Mendez-Stivalet, J. M.; Perez, N. Synthesis of polyhydroxylated $\Delta^{(13)}$ -17,17-dialkyl-18-norsteroids by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{Ac}_2\text{O}$ -promoted Wagner-Meerwein rearrangement of furostanols. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2* (1), 47-50.
113. Fieser, L. F.; Fieser, M. *Steroids*. Reinhold Publishing Corporation: **1959**.
114. (a) Syamala, M. S.; Das, J.; Baskaran, S.; Chandrasekaran, S. A novel and highly β -selective epoxidation of Δ^5 -unsaturated steroids with permanganate ion. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (6), 1928-1930; (b) Parish, E. J.; Li, S. A One-Step Synthesis of 6 β -Hydroxy- Δ^4 -3-ketones. Novel Oxidation of Homoallylic Sterols with Permanganate Ion. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (16), 5665-5666.
115. Xu, Q.-H.; Peng, X.-W.; Tian, W.-S. A new strategy for synthesizing the steroids with side chains from steroidal sapogenins: synthesis of the aglycone of OSW-1 by using the intact skeleton of diosgenin. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (52), 9375-9377.

116. Rosado-Abón, A.; Romero-Avila, M.; Iglesias-Arteaga, M. A. A rapid and simple one-pot procedure for the synthesis of 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids. *Arkivoc.* **2010**, 110-115.
117. (a) Agrawal, P. K.; Jain, D. C.; Gupta, R. K.; Thakur, R. S. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry* **1985**, *24* (11), 2479-2496; (b) A. Iglesias Arteaga, M.; S. Perez Martinez, C.; Perez Gil, R.; Coll Manchado, F. 13C and 1H NMR Spectra of Synthetic (25R)-5 α -Spirostanes. *J. Chem. Res., Synop.* **1999**, (1), 48-49; (c) Iglesias-Arteaga, M. A.; Velazquez-Huerta, G. A.; Mendez-Stivalet, J. M.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. The Baeyer-Villiger reaction of 23-oxosapogenins. *Arkivoc.* **2005**, 109-126.

8. ANEXOS

Tabla 20. Datos del cristal y de la estructura refinada de 201.

Código de identificación	23-ohax	
Fórmula empírica	C ₂₉ H ₄₄ O ₅	
Peso Molecular	472.64	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclinico	
Grupo espacial	P 21	
Dimensiones de celda unitaria	a = 14.4364(3) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 6.12020(10) Å	$\beta = 99.521(2)^\circ$.
	c = 14.6243(3) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	1274.31(4) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1.232 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.082 mm ⁻¹	
F(000)	516	
Tamaño del Cristal	0.43 x 0.36 x 0.16 mm ³	
Rango de Theta para la colección de datos	3.39 a 26.11°.	
Rango de índice	-17<=h<=17, -7<=k<=7, -17<=l<=18	
Reflecciones colectada	19161	
Reflecciones independientes	2776 [R(int) = 0.0220]	
Integridad para theta = 26.11°	99.4 %	
Transmisión max. y min.	0.9870 y 0.9655	
Método de refinación	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²	
Datos / restricciones / parámetros	2776 / 2 / 315	
Bondad del ajuste en F²	1.034	
Índices R final [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0329, wR2 = 0.0884	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0340, wR2 = 0.0892	
Parámetro de estructura absoluta	0.1(11)	
Mayor diferencia entre max y min	0.471 y -0.247 e.Å ⁻³	

Tabla 21. Ángulos [°] y longitudes de enlace [Å] de 201.

C(1)-C(2)	1.545(2)	C(3)-C(4)	1.513(3)	C(6)-H(6)	0.9500
C(1)-C(10)	1.551(2)	C(3)-H(3)	1.0000	C(7)-C(8)	1.526(3)
C(1)-H(1A)	0.9900	C(4)-C(5)	1.519(2)	C(7)-H(7A)	0.9900
C(1)-H(1B)	0.9900	C(4)-H(4A)	0.9900	C(7)-H(7B)	0.9900
C(2)-C(3)	1.509(3)	C(4)-H(4B)	0.9900	C(8)-C(14)	1.523(2)
C(2)-H(2A)	0.9900	C(5)-C(6)	1.322(3)	C(8)-C(9)	1.545(2)
C(2)-H(2B)	0.9900	C(5)-C(10)	1.526(2)	C(8)-H(8)	1.0000
C(3)-O(1)	1.458(2)	C(6)-C(7)	1.501(2)	C(9)-C(11)	1.542(2)
C(9)-C(10)	1.562(2)	C(24)-C(25)	1.530(3)	C(5)-C(4)-H(4A)	109.7000
C(9)-H(9)	1.0000	C(24)-H(24A)	0.9900	C(3)-C(4)-H(4B)	109.7000
C(10)-C(19)	1.544(3)	C(24)-H(24B)	0.9900	C(5)-C(4)-H(4B)	109.7000
C(11)-C(12)	1.546(2)	C(25)-C(26)	1.519(3)	H(4A)-C(4)-H(4B)	108.2000
C(11)-H(11A)	0.9900	C(25)-C(27)	1.522(3)	C(6)-C(5)-C(4)	120.03(17)
C(11)-H(11B)	0.9900	C(25)-H(25)	1.0000	C(6)-C(5)-C(10)	123.76(16)
C(12)-C(13)	1.529(2)	C(26)-O(4)	1.444(2)	C(4)-C(5)-C(10)	116.20(16)
C(12)-H(12A)	0.9900	C(26)-H(26A)	0.9900	C(5)-C(6)-C(7)	124.90(17)
C(12)-H(12B)	0.9900	C(26)-H(26B)	0.9900	C(5)-C(6)-H(6)	117.6000
C(13)-C(14)	1.540(2)	C(27)-H(27A)	0.9800	C(7)-C(6)-H(6)	117.6000
C(13)-C(18)	1.544(3)	C(27)-H(27B)	0.9800	C(6)-C(7)-C(8)	111.75(15)
C(13)-C(17)	1.558(2)	C(27)-H(27C)	0.9800	C(6)-C(7)-H(7A)	109.3000
C(14)-C(15)	1.534(2)	C(28)-O(2)	1.195(3)	C(8)-C(7)-H(7A)	109.3000
C(14)-H(14)	1.0000	C(28)-O(1)	1.329(3)	C(6)-C(7)-H(7B)	109.3000
C(15)-C(16)	1.538(2)	C(28)-C(29)	1.504(2)	C(8)-C(7)-H(7B)	109.3000
C(15)-H(15A)	0.9900	C(29)-H(29A)	0.9800	H(7A)-C(7)-H(7B)	107.9000
C(15)-H(15B)	0.9900	C(29)-H(29B)	0.9800	C(14)-C(8)-C(7)	110.31(15)
C(16)-O(3)	1.439(2)	C(29)-H(29C)	0.9800	C(14)-C(8)-C(9)	109.76(13)
C(16)-C(17)	1.551(2)	O(5)-H(5O)	0.843(19)	C(7)-C(8)-C(9)	109.93(15)
C(16)-H(16)	1.0000			C(14)-C(8)-H(8)	108.9000
C(17)-C(20)	1.545(3)	C(2)-C(1)-C(10)	114.30(15)	C(7)-C(8)-H(8)	108.9000
C(17)-H(17)	1.0000	C(2)-C(1)-H(1A)	108.7000	C(9)-C(8)-H(8)	108.9000
C(18)-H(18A)	0.9800	C(10)-C(1)-H(1A)	108.7000	C(11)-C(9)-C(8)	112.19(14)
C(18)-H(18B)	0.9800	C(2)-C(1)-H(1B)	108.7000	C(11)-C(9)-C(10)	112.87(14)
C(18)-H(18C)	0.9800	C(10)-C(1)-H(1B)	108.7000	C(8)-C(9)-C(10)	111.52(13)
C(19)-H(19A)	0.9800	H(1A)-C(1)-H(1B)	107.6000	C(11)-C(9)-H(9)	106.6000
C(19)-H(19B)	0.9800	C(3)-C(2)-C(1)	108.60(15)	C(8)-C(9)-H(9)	106.6000
C(19)-H(19C)	0.9800	C(3)-C(2)-H(2A)	110.0000	C(10)-C(9)-H(9)	106.6000
C(20)-C(21)	1.525(3)	C(1)-C(2)-H(2A)	110.0000	C(5)-C(10)-C(19)	108.70(16)
C(20)-C(22)	1.548(3)	C(3)-C(2)-H(2B)	110.0000	C(5)-C(10)-C(1)	108.23(15)
C(20)-H(20)	1.0000	C(1)-C(2)-H(2B)	110.0000	C(19)-C(10)-C(1)	109.50(15)
C(21)-H(21A)	0.9800	H(2A)-C(2)-H(2B)	108.4000	C(5)-C(10)-C(9)	109.98(14)
C(21)-H(21B)	0.9800	O(1)-C(3)-C(2)	110.45(16)	C(19)-C(10)-C(9)	111.87(15)
C(21)-H(21C)	0.9800	O(1)-C(3)-C(4)	107.76(16)	C(1)-C(10)-C(9)	108.50(14)
C(22)-O(3)	1.418(2)	C(2)-C(3)-C(4)	110.15(17)	C(9)-C(11)-C(12)	113.60(14)
C(22)-O(4)	1.429(2)	O(1)-C(3)-H(3)	109.5000	C(9)-C(11)-H(11A)	108.8000
C(22)-C(23)	1.529(3)	C(2)-C(3)-H(3)	109.5000	C(12)-C(11)-H(11A)	108.8000
C(23)-O(5)	1.417(3)	C(4)-C(3)-H(3)	109.5000	C(9)-C(11)-H(11B)	108.8000
C(23)-C(24)	1.524(3)	C(3)-C(4)-C(5)	109.76(16)	C(12)-C(11)-H(11B)	108.8000
C(23)-H(23)	1.0000	C(3)-C(4)-H(4A)	109.7000	H(11A)-C(11)-H(11B)	107.7000

Continuación de la tabla 21....

C(13)-C(12)-C(11)	110.84(14)	C(13)-C(18)-H(18B)	109.5000	C(25)-C(24)-H(24A)	109.6000
C(13)-C(12)-H(12A)	109.5000	H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5000	C(23)-C(24)-H(24B)	109.6000
C(11)-C(12)-H(12A)	109.5000	C(13)-C(18)-H(18C)	109.5000	C(25)-C(24)-H(24B)	109.6000
C(13)-C(12)-H(12B)	109.5000	H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5000	H(24A)-C(24)-H(24B)	108.1000
C(11)-C(12)-H(12B)	109.5000	H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5000	C(26)-C(25)-C(27)	110.67(17)
H(12A)-C(12)-H(12B)	108.1000	C(10)-C(19)-H(19A)	109.5000	C(26)-C(25)-C(24)	108.92(15)
C(12)-C(13)-C(14)	107.31(14)	C(10)-C(19)-H(19B)	109.5000	C(27)-C(25)-C(24)	111.07(19)
C(12)-C(13)-C(18)	110.23(16)	H(19A)-C(19)-H(19B)	109.5000	C(26)-C(25)-H(25)	108.7000
C(14)-C(13)-C(18)	112.07(15)	C(10)-C(19)-H(19C)	109.5000	C(27)-C(25)-H(25)	108.7000
C(12)-C(13)-C(17)	115.48(14)	H(19A)-C(19)-H(19C)	109.5000	C(24)-C(25)-H(25)	108.7000
C(14)-C(13)-C(17)	99.67(14)	H(19B)-C(19)-H(19C)	109.5000	O(4)-C(26)-C(25)	112.42(16)
C(18)-C(13)-C(17)	111.61(15)	C(21)-C(20)-C(17)	113.56(17)	O(4)-C(26)-H(26A)	109.1000
C(8)-C(14)-C(15)	118.68(14)	C(21)-C(20)-C(22)	115.27(15)	C(25)-C(26)-H(26A)	109.1000
C(8)-C(14)-C(13)	115.09(14)	C(17)-C(20)-C(22)	103.80(14)	O(4)-C(26)-H(26B)	109.1000
C(15)-C(14)-C(13)	104.25(14)	C(21)-C(20)-H(20)	108.0000	C(25)-C(26)-H(26B)	109.1000
C(8)-C(14)-H(14)	105.9000	C(17)-C(20)-H(20)	108.0000	H(26A)-C(26)-H(26B)	107.9000
C(15)-C(14)-H(14)	105.9000	C(22)-C(20)-H(20)	108.0000	C(25)-C(27)-H(27A)	109.5000
C(13)-C(14)-H(14)	105.9000	C(20)-C(21)-H(21A)	109.5000	C(25)-C(27)-H(27B)	109.5000
C(14)-C(15)-C(16)	102.37(13)	C(20)-C(21)-H(21B)	109.5000	H(27A)-C(27)-H(27B)	109.5000
C(14)-C(15)-H(15A)	111.3000	H(21A)-C(21)-H(21B)	109.5000	C(25)-C(27)-H(27C)	109.5000
C(16)-C(15)-H(15A)	111.3000	C(20)-C(21)-H(21C)	109.5000	H(27A)-C(27)-H(27C)	109.5000
C(14)-C(15)-H(15B)	111.3000	H(21A)-C(21)-H(21C)	109.5000	H(27B)-C(27)-H(27C)	109.5000
C(16)-C(15)-H(15B)	111.3000	H(21B)-C(21)-H(21C)	109.5000	O(2)-C(28)-O(1)	123.79(17)
H(15A)-C(15)-H(15B)	109.2000	O(3)-C(22)-O(4)	110.18(15)	O(2)-C(28)-C(29)	124.7(2)
O(3)-C(16)-C(15)	111.46(15)	O(3)-C(22)-C(23)	104.51(17)	O(1)-C(28)-C(29)	111.49(19)
O(3)-C(16)-C(17)	104.43(15)	O(4)-C(22)-C(23)	111.96(15)	C(28)-C(29)-H(29A)	109.5000
C(15)-C(16)-C(17)	107.90(14)	O(3)-C(22)-C(20)	105.72(14)	C(28)-C(29)-H(29B)	109.5000
O(3)-C(16)-H(16)	110.9000	O(4)-C(22)-C(20)	108.75(15)	H(29A)-C(29)-H(29B)	109.5000
C(15)-C(16)-H(16)	110.9000	C(23)-C(22)-C(20)	115.40(17)	C(28)-C(29)-H(29C)	109.5000
C(17)-C(16)-H(16)	110.9000	O(5)-C(23)-C(24)	111.21(19)	H(29A)-C(29)-H(29C)	109.5000
C(20)-C(17)-C(16)	104.22(14)	O(5)-C(23)-C(22)	108.4(2)	H(29B)-C(29)-H(29C)	109.5000
C(20)-C(17)-C(13)	120.00(16)	C(24)-C(23)-C(22)	110.85(19)	C(28)-O(1)-C(3)	117.62(16)
C(16)-C(17)-C(13)	103.68(13)	O(5)-C(23)-H(23)	108.8000	C(22)-O(3)-C(16)	106.89(13)
C(20)-C(17)-H(17)	109.4000	C(24)-C(23)-H(23)	108.8000	C(22)-O(4)-C(26)	112.45(14)
C(16)-C(17)-H(17)	109.4000	C(22)-C(23)-H(23)	108.8000	C(23)-O(5)-H(50)	122(3)
C(13)-C(17)-H(17)	109.4000	C(23)-C(24)-C(25)	110.3(2)		
C(13)-C(18)-H(18A)	109.5000	C(23)-C(24)-H(24A)	109.6000		

Tabla 22. Datos del cristal y de la estructura refinada de 202.

Código de identificación	23ohe	
Fórmula empírica	C ₂₉ H ₄₄ O ₅	
Peso Molecular	472.64	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Ortorómbico	
Grupo espacial	P 21 21 21	
Dimensiones de celda unitaria	a = 8.39140(10) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 9.32080(10) Å	$\beta = 90^\circ$.
	c = 32.9697(4) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	2578.71(5) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.217 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.081 mm ⁻¹	
F(000)	1032	
Tamaño del Cristal	0.54 x 0.53 x 0.36 mm ³	
Rango de Theta para la colección de datos	3.46 a 26.15°.	
Rango de índice	-10<=h<=10, -11<=k<=11, -40<=l<=40	
Reflecciones colectada	72348	
Reflecciones independientes	2946 [R(int) = 0.0352]	
Integridad para theta = 26.15°	99.2 %	
Transmisión max. y min.	0.9714 y 0.9575	
Método de refinación	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²	
Datos / restricciones / parámetros	2946 / 0 / 310	
Bondad del ajuste en F²	1.093	
Índices R final [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0364, wR2 = 0.0939	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0366, wR2 = 0.0941	
Parámetro de estructura absoluta	10(10)	
Mayor diferencia entre max y min	0.303 y -0.307 e.Å ⁻³	

Tabla 23. Ángulos [°] y longitudes de enlace [Å] de 202.

C(1)-C(2)	1.529(3)	C(15)-H(15A)	0.9900	C(28)-C(29)	1.506(3)
C(1)-C(10)	1.551(3)	C(15)-H(15B)	0.9900	C(29)-H(29A)	0.9800
C(1)-H(1A)	0.9900	C(16)-O(3)	1.440(2)	C(29)-H(29B)	0.9800
C(1)-H(1B)	0.9900	C(16)-C(17)	1.558(3)	C(29)-H(29C)	0.9800
C(2)-C(3)	1.520(3)	C(16)-H(16)	1.0000	O(5)-H(5O)	0.83(3)
C(2)-H(2A)	0.9900	C(17)-C(20)	1.543(3)		
C(2)-H(2B)	0.9900	C(17)-H(17)	1.0000	C(2)-C(1)-C(10)	114.63(16)
C(3)-O(1)	1.466(2)	C(18)-H(18A)	0.9800	C(2)-C(1)-H(1A)	108.6000
C(3)-C(4)	1.523(3)	C(18)-H(18B)	0.9800	C(10)-C(1)-H(1A)	108.6000
C(3)-H(3)	1.0000	C(18)-H(18C)	0.9800	C(2)-C(1)-H(1B)	108.6000
C(4)-C(5)	1.521(3)	C(19)-H(19A)	0.9800	C(10)-C(1)-H(1B)	108.6000
C(4)-H(4A)	0.9900	C(19)-H(19B)	0.9800	H(1A)-C(1)-H(1B)	107.6000
C(4)-H(4B)	0.9900	C(19)-H(19C)	0.9800	C(3)-C(2)-C(1)	108.78(16)
C(5)-C(6)	1.330(3)	C(20)-C(21)	1.525(3)	C(3)-C(2)-H(2A)	109.9000
C(5)-C(10)	1.532(3)	C(20)-C(22)	1.534(3)	C(1)-C(2)-H(2A)	109.9000
C(6)-C(7)	1.495(3)	C(20)-H(20)	1.0000	C(3)-C(2)-H(2B)	109.9000
C(6)-H(6)	0.9500	C(21)-H(21A)	0.9800	C(1)-C(2)-H(2B)	109.9000
C(7)-C(8)	1.528(3)	C(21)-H(21B)	0.9800	H(2A)-C(2)-H(2B)	108.3000
C(7)-H(7A)	0.9900	C(21)-H(21C)	0.9800	O(1)-C(3)-C(2)	110.57(15)
C(7)-H(7B)	0.9900	C(22)-O(3)	1.418(2)	O(1)-C(3)-C(4)	107.21(15)
C(8)-C(14)	1.525(3)	C(22)-O(4)	1.429(2)	C(2)-C(3)-C(4)	110.54(16)
C(8)-C(9)	1.550(3)	C(22)-C(23)	1.524(3)	O(1)-C(3)-H(3)	109.5000
C(8)-H(8)	1.0000	C(23)-O(5)	1.424(2)	C(2)-C(3)-H(3)	109.5000
C(9)-C(11)	1.543(3)	C(23)-C(24)	1.522(3)	C(4)-C(3)-H(3)	109.5000
C(9)-C(10)	1.557(3)	C(23)-H(23)	1.0000	C(5)-C(4)-C(3)	109.15(15)
C(9)-H(9)	1.0000	C(24)-C(25)	1.533(3)	C(5)-C(4)-H(4A)	109.8000
C(10)-C(19)	1.542(3)	C(24)-H(24A)	0.9900	C(3)-C(4)-H(4A)	109.8000
C(11)-C(12)	1.542(3)	C(24)-H(24B)	0.9900	C(5)-C(4)-H(4B)	109.8000
C(11)-H(11A)	0.9900	C(25)-C(26)	1.518(3)	C(3)-C(4)-H(4B)	109.8000
C(11)-H(11B)	0.9900	C(25)-C(27)	1.528(3)	H(4A)-C(4)-H(4B)	108.3000
C(12)-C(13)	1.536(3)	C(25)-H(25)	1.0000	C(6)-C(5)-C(4)	119.91(18)
C(12)-H(12A)	0.9900	C(26)-O(4)	1.434(2)	C(6)-C(5)-C(10)	123.81(18)
C(12)-H(12B)	0.9900	C(26)-H(26A)	0.9900	C(4)-C(5)-C(10)	116.27(16)
C(13)-C(18)	1.533(3)	C(26)-H(26B)	0.9900	C(5)-C(6)-C(7)	124.66(19)
C(13)-C(14)	1.545(3)	C(27)-H(27A)	0.9800	C(5)-C(6)-H(6)	117.7000

Continuación de la tabla 23....

C(13)-C(17)	1.559(3)	C(27)-H(27B)	0.9800	C(7)-C(6)-H(6)	117.7000
C(14)-C(15)	1.537(3)	C(27)-H(27C)	0.9800	C(6)-C(7)-C(8)	113.27(17)
C(14)-H(14)	1.0000	C(28)-O(2)	1.202(2)	C(6)-C(7)-H(7A)	108.9000
C(15)-C(16)	1.526(3)	C(28)-O(1)	1.344(2)	C(8)-C(7)-H(7A)	108.9000
C(6)-C(7)-H(7B)	108.9000	C(8)-C(14)-C(13)	115.04(15)	C(17)-C(20)-H(20)	108.0000
C(8)-C(7)-H(7B)	108.9000	C(15)-C(14)-C(13)	104.04(16)	C(20)-C(21)-H(21A)	109.5000
H(7A)-C(7)-H(7B)	107.7000	C(8)-C(14)-H(14)	105.3000	C(20)-C(21)-H(21B)	109.5000
C(14)-C(8)-C(7)	110.60(16)	C(15)-C(14)-H(14)	105.3000	H(21A)-C(21)-H(21B)	109.5000
C(14)-C(8)-C(9)	107.45(16)	C(13)-C(14)-H(14)	105.3000	C(20)-C(21)-H(21C)	109.5000
C(7)-C(8)-C(9)	110.43(17)	C(16)-C(15)-C(14)	99.77(15)	H(21A)-C(21)-H(21C)	109.5000
C(14)-C(8)-H(8)	109.4000	C(16)-C(15)-H(15A)	111.8000	H(21B)-C(21)-H(21C)	109.5000
C(7)-C(8)-H(8)	109.4000	C(14)-C(15)-H(15A)	111.8000	O(3)-C(22)-O(4)	110.89(16)
C(9)-C(8)-H(8)	109.4000	C(16)-C(15)-H(15B)	111.8000	O(3)-C(22)-C(23)	107.21(15)
C(11)-C(9)-C(8)	111.62(16)	C(14)-C(15)-H(15B)	111.8000	O(4)-C(22)-C(23)	109.86(15)
C(11)-C(9)-C(10)	112.73(15)	H(15A)-C(15)-H(15B)	109.5000	O(3)-C(22)-C(20)	104.57(15)
C(8)-C(9)-C(10)	113.56(16)	O(3)-C(16)-C(15)	112.96(16)	O(4)-C(22)-C(20)	107.54(15)
C(11)-C(9)-H(9)	106.1000	O(3)-C(16)-C(17)	106.63(15)	C(23)-C(22)-C(20)	116.65(17)
C(8)-C(9)-H(9)	106.1000	C(15)-C(16)-C(17)	107.74(15)	O(5)-C(23)-C(24)	111.88(17)
C(10)-C(9)-H(9)	106.1000	O(3)-C(16)-H(16)	109.8000	O(5)-C(23)-C(22)	111.57(16)
C(5)-C(10)-C(19)	108.10(15)	C(15)-C(16)-H(16)	109.8000	C(24)-C(23)-C(22)	110.29(17)
C(5)-C(10)-C(1)	108.88(16)	C(17)-C(16)-H(16)	109.8000	O(5)-C(23)-H(23)	107.6000
C(19)-C(10)-C(1)	109.81(16)	C(20)-C(17)-C(16)	103.56(15)	C(24)-C(23)-H(23)	107.6000
C(5)-C(10)-C(9)	110.40(15)	C(20)-C(17)-C(13)	120.59(16)	C(22)-C(23)-H(23)	107.6000
C(19)-C(10)-C(9)	111.63(16)	C(16)-C(17)-C(13)	105.07(15)	C(23)-C(24)-C(25)	110.75(17)
C(1)-C(10)-C(9)	107.97(15)	C(20)-C(17)-H(17)	109.0000	C(23)-C(24)-H(24A)	109.5000
C(12)-C(11)-C(9)	113.68(16)	C(16)-C(17)-H(17)	109.0000	C(25)-C(24)-H(24A)	109.5000
C(12)-C(11)-H(11A)	108.8000	C(13)-C(17)-H(17)	109.0000	C(23)-C(24)-H(24B)	109.5000
C(9)-C(11)-H(11A)	108.8000	C(13)-C(18)-H(18A)	109.5000	C(25)-C(24)-H(24B)	109.5000
C(12)-C(11)-H(11B)	108.8000	C(13)-C(18)-H(18B)	109.5000	H(24A)-C(24)-H(24B)	108.1000
C(9)-C(11)-H(11B)	108.8000	H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5000	C(26)-C(25)-C(27)	110.23(18)
H(11A)-C(11)-H(11B)	107.7000	C(13)-C(18)-H(18C)	109.5000	C(26)-C(25)-C(24)	108.66(16)
C(13)-C(12)-C(11)	111.46(16)	H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5000	C(27)-C(25)-C(24)	112.65(18)
C(13)-C(12)-H(12A)	109.3000	H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5000	C(26)-C(25)-H(25)	108.4000
C(11)-C(12)-H(12A)	109.3000	C(10)-C(19)-H(19A)	109.5000	C(27)-C(25)-H(25)	108.4000
C(13)-C(12)-H(12B)	109.3000	C(10)-C(19)-H(19B)	109.5000	C(24)-C(25)-H(25)	108.4000
C(11)-C(12)-H(12B)	109.3000	H(19A)-C(19)-H(19B)	109.5000	O(4)-C(26)-C(25)	112.05(17)
H(12A)-C(12)-H(12B)	108.0000	C(10)-C(19)-H(19C)	109.5000	O(4)-C(26)-H(26A)	109.2000
C(18)-C(13)-C(12)	109.70(16)	H(19A)-C(19)-H(19C)	109.5000	C(25)-C(26)-H(26A)	109.2000

Continuación de la tabla 23....

C(18)-C(13)-C(14)	112.23(15)	H(19B)-C(19)-H(19C)	109.5000	O(4)-C(26)-H(26B)	109.2000
C(12)-C(13)-C(14)	107.29(16)	C(21)-C(20)-C(22)	114.95(17)	C(25)-C(26)-H(26B)	109.2000
C(18)-C(13)-C(17)	112.02(16)	C(21)-C(20)-C(17)	115.34(17)	H(26A)-C(26)-H(26B)	107.9000
C(12)-C(13)-C(17)	114.74(16)	C(22)-C(20)-C(17)	102.24(15)	C(25)-C(27)-H(27A)	109.5000
C(14)-C(13)-C(17)	100.50(15)	C(21)-C(20)-H(20)	108.0000	C(25)-C(27)-H(27B)	109.5000
C(8)-C(14)-C(15)	120.44(16)	C(22)-C(20)-H(20)	108.0000	H(27A)-C(27)-H(27B)	109.5000
C(25)-C(27)-H(27C)	109.5000	C(28)-C(29)-H(29A)	109.5000	C(28)-O(1)-C(3)	115.72(15)
H(27A)-C(27)-H(27C)	109.5000	C(28)-C(29)-H(29B)	109.5000	C(22)-O(3)-C(16)	106.64(14)
H(27B)-C(27)-H(27C)	109.5000	H(29A)-C(29)-H(29B)	109.5000	C(22)-O(4)-C(26)	112.59(15)
O(2)-C(28)-O(1)	124.51(19)	C(28)-C(29)-H(29C)	109.5000	C(23)-O(5)-H(5O)	106(2)
O(2)-C(28)-C(29)	123.71(19)	H(29A)-C(29)-H(29C)	109.5000		
O(1)-C(28)-C(29)	111.78(17)	H(29B)-C(29)-H(29C)	109.5000		

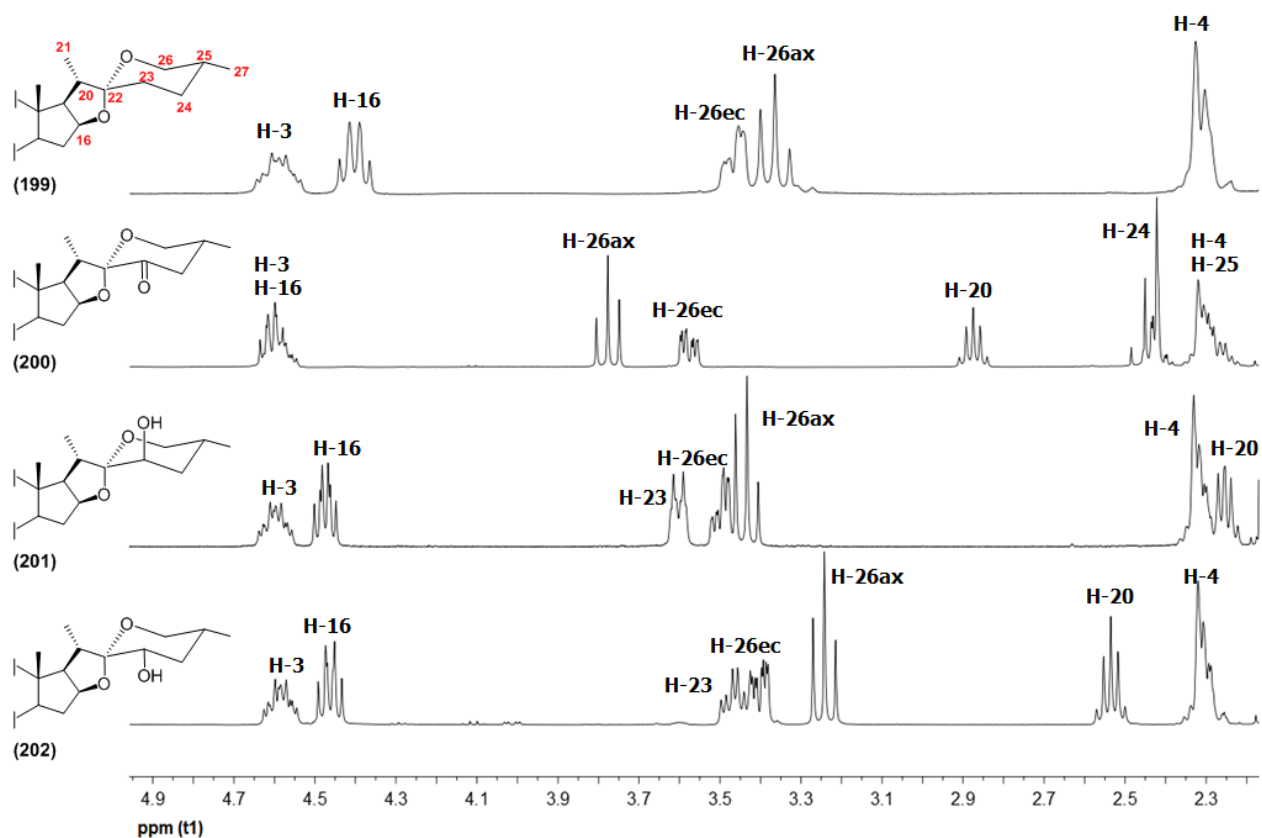


Figura 24. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 199, 200, 201, 202, que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados 23-oxo y 23-hidroxi espirostanos.

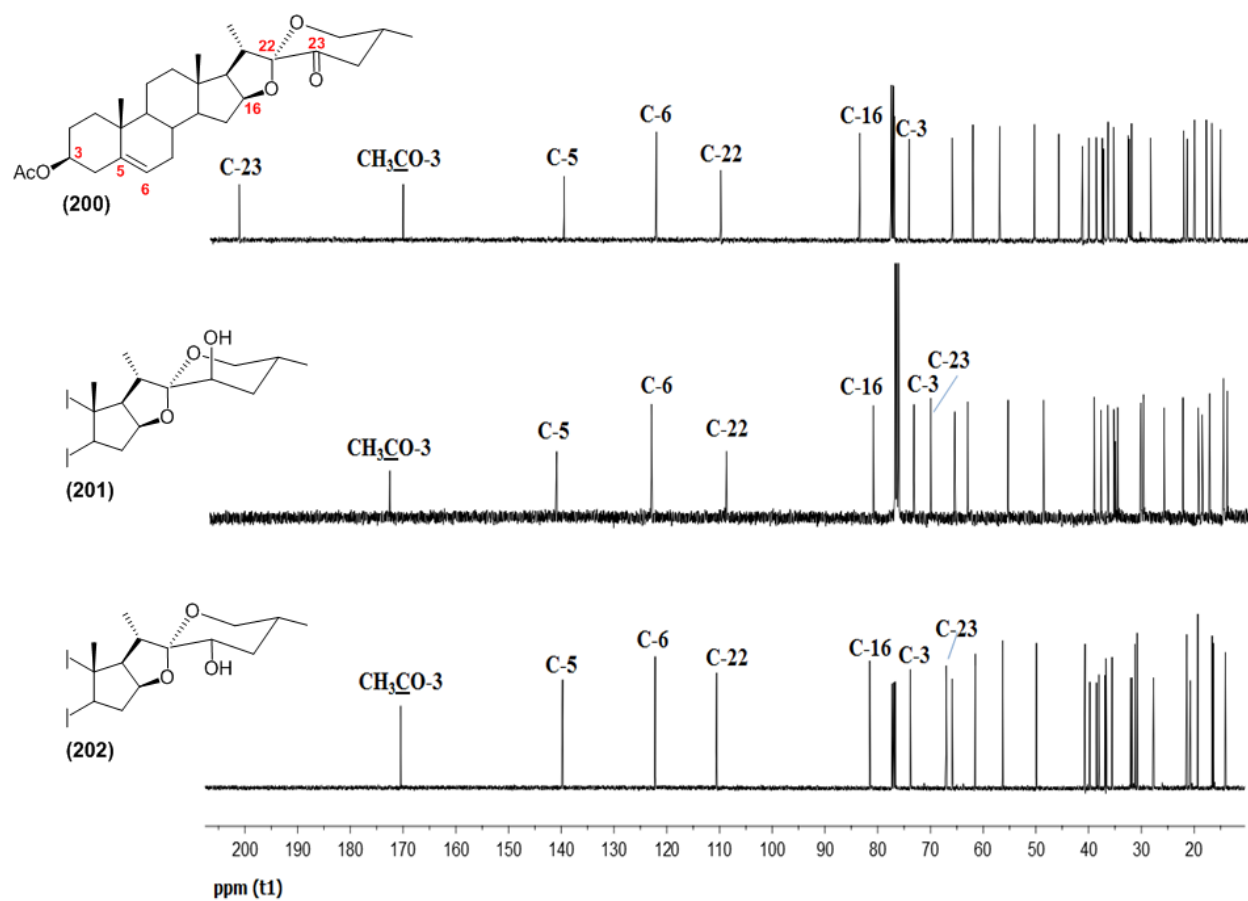


Figura 25. Espectros de ^{13}C de los compuestos 200, 201, 202.

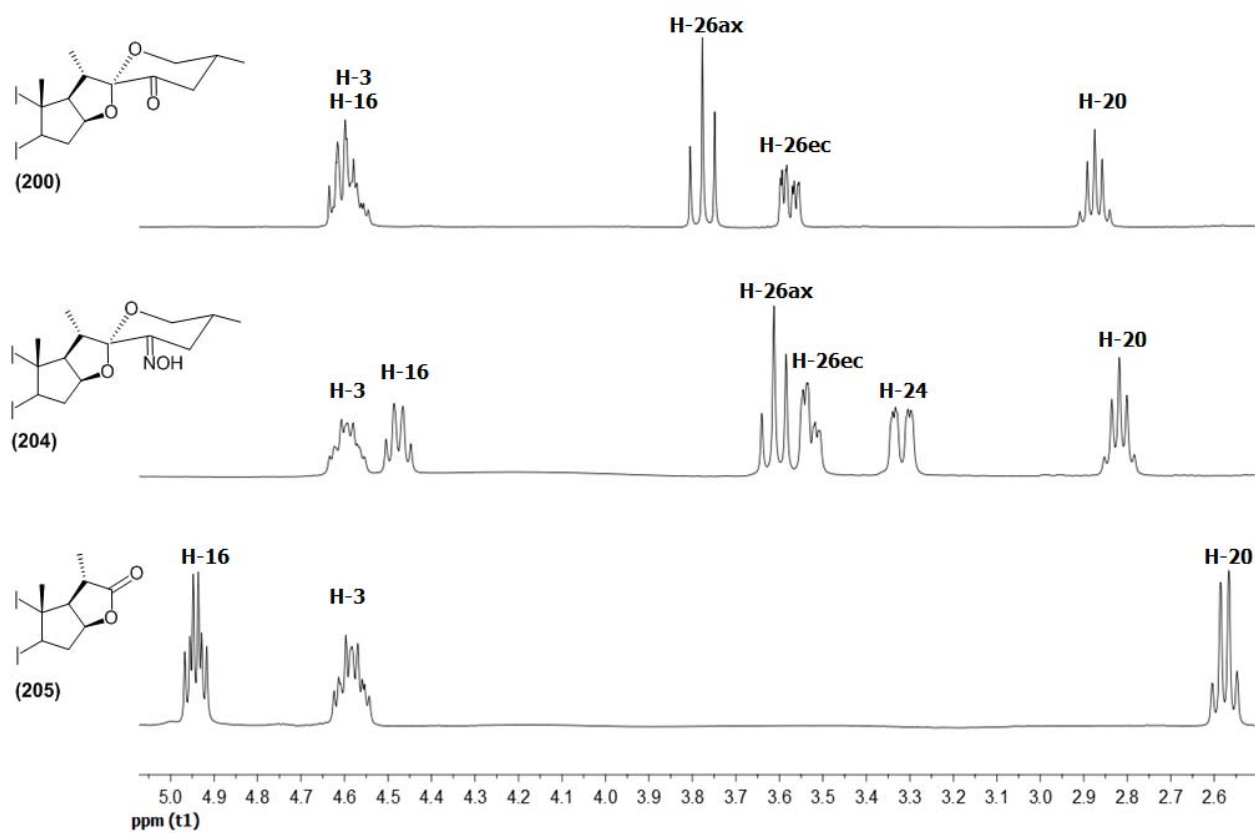


Figura 26. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 200, 204, 205, que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados de tipo dinorcolano.

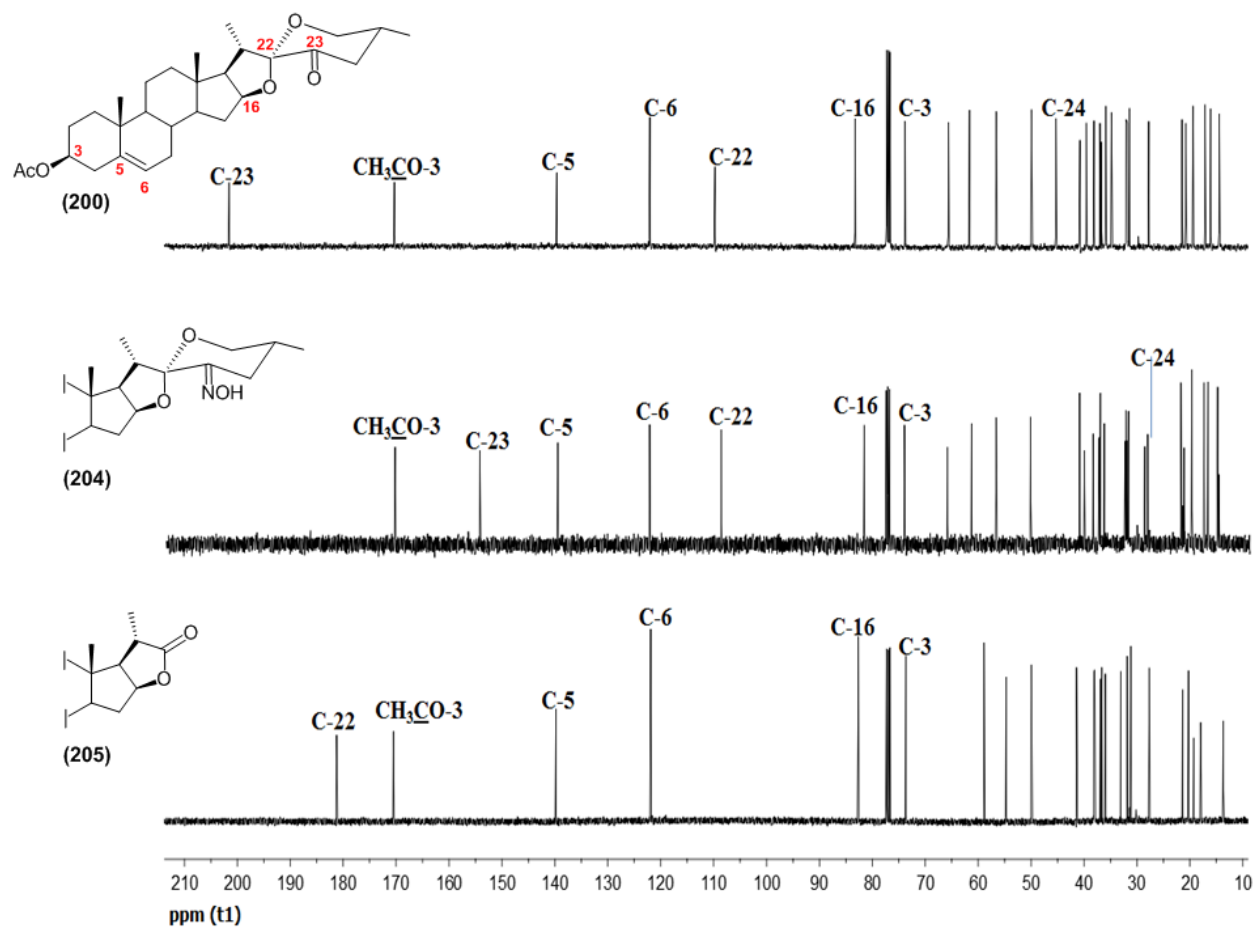


Figura 27. Espectros de ^{13}C de los compuestos 200, 204, 205.

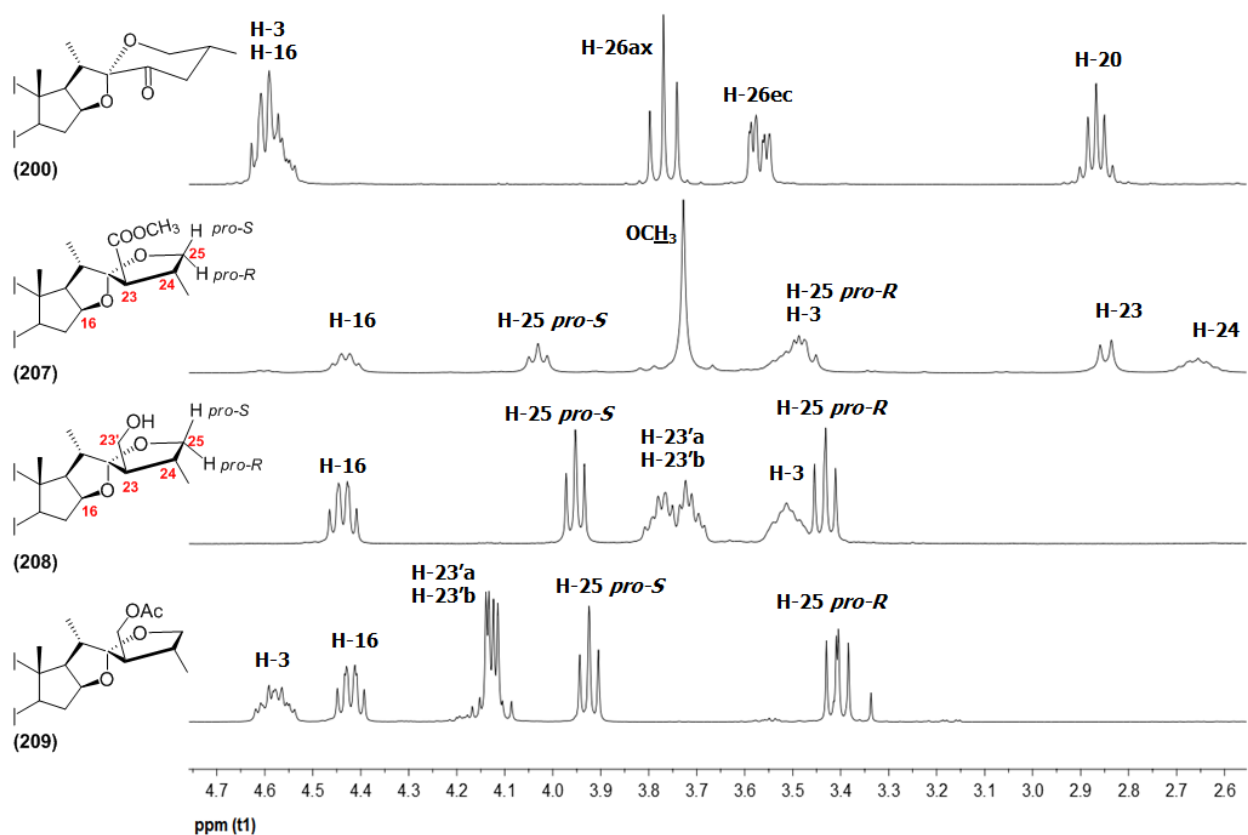


Figura 28. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 200, 207, 208 y 209 que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados de tipo $16\beta,22:22,25$ -diepoxi dinorcolestano.

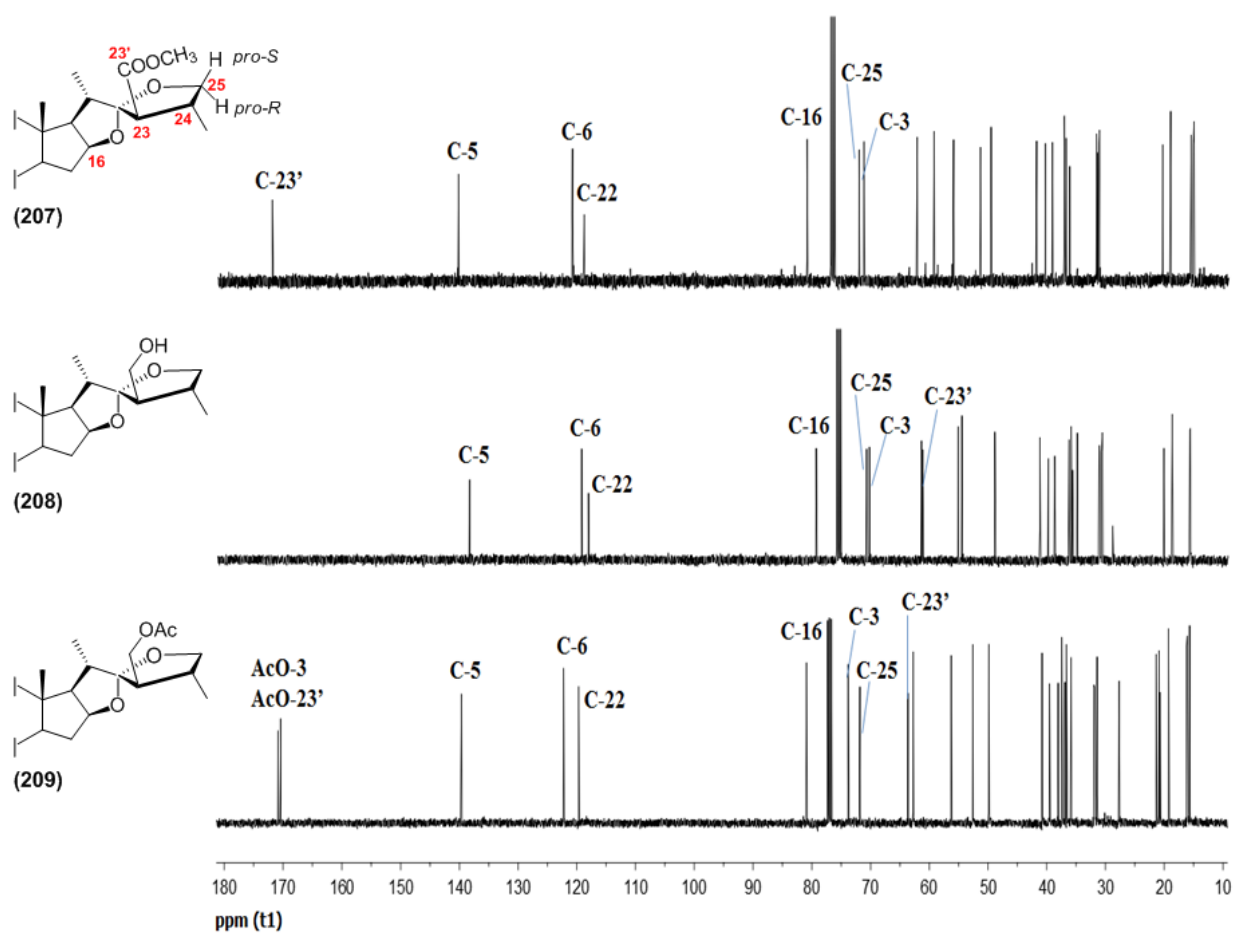


Figura 29. Espectros de ^{13}C de los compuestos 207, 208, 209.

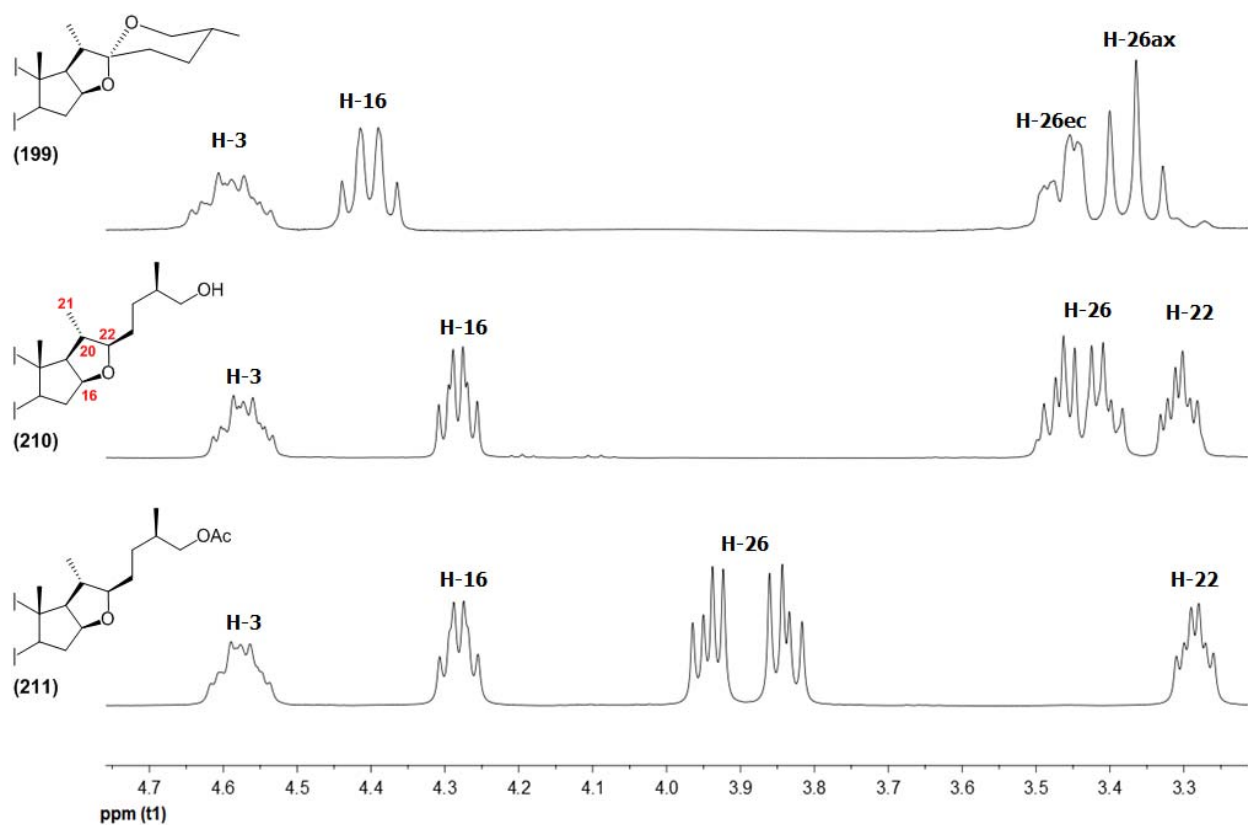


Figura 30. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 199, 210 y 211 que evidencian las transformaciones realizadas en la cadena lateral para obtener los derivados de tipo furostánicos.

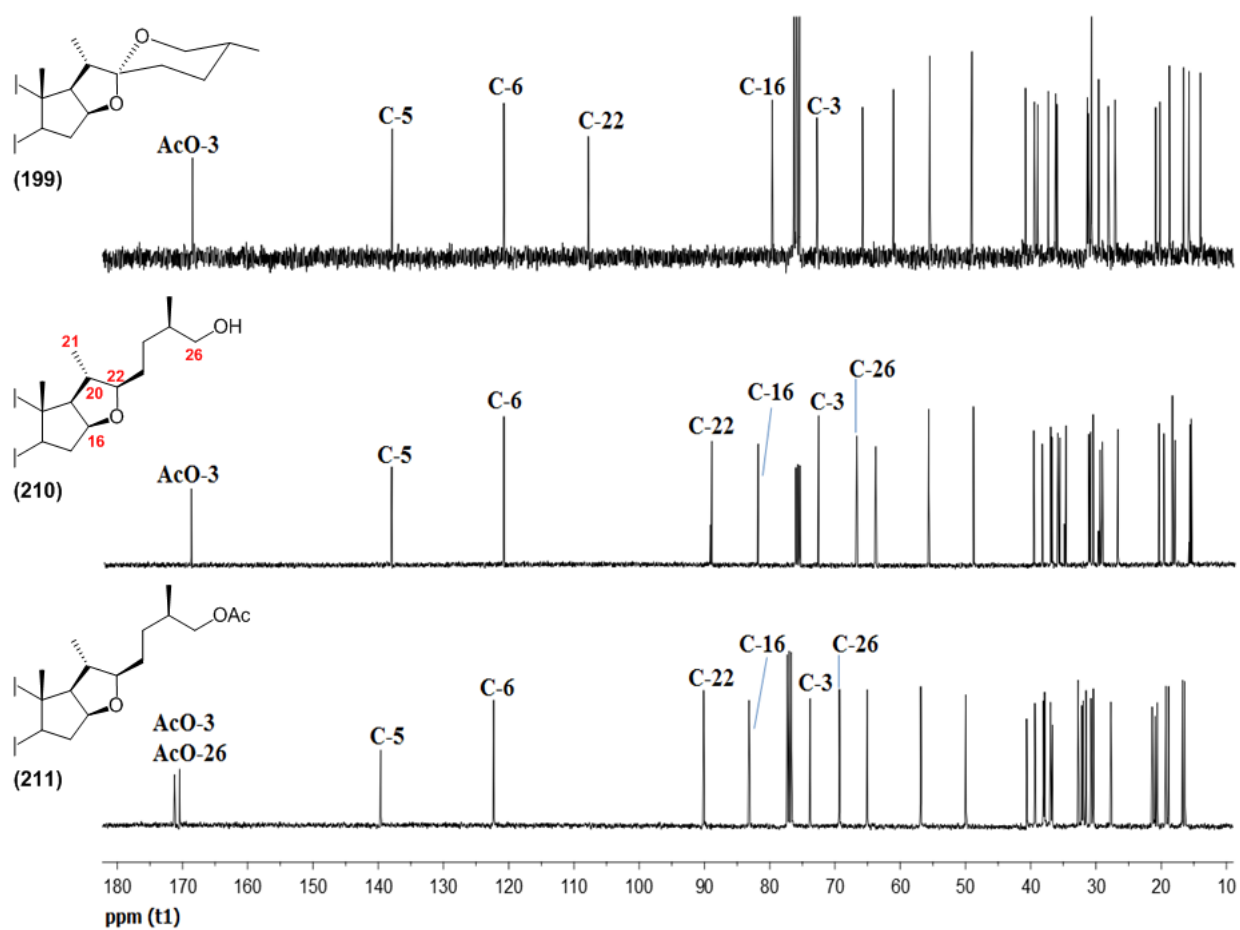


Figura 31. Espectros de ^{13}C de los compuestos 199, 210, 211.

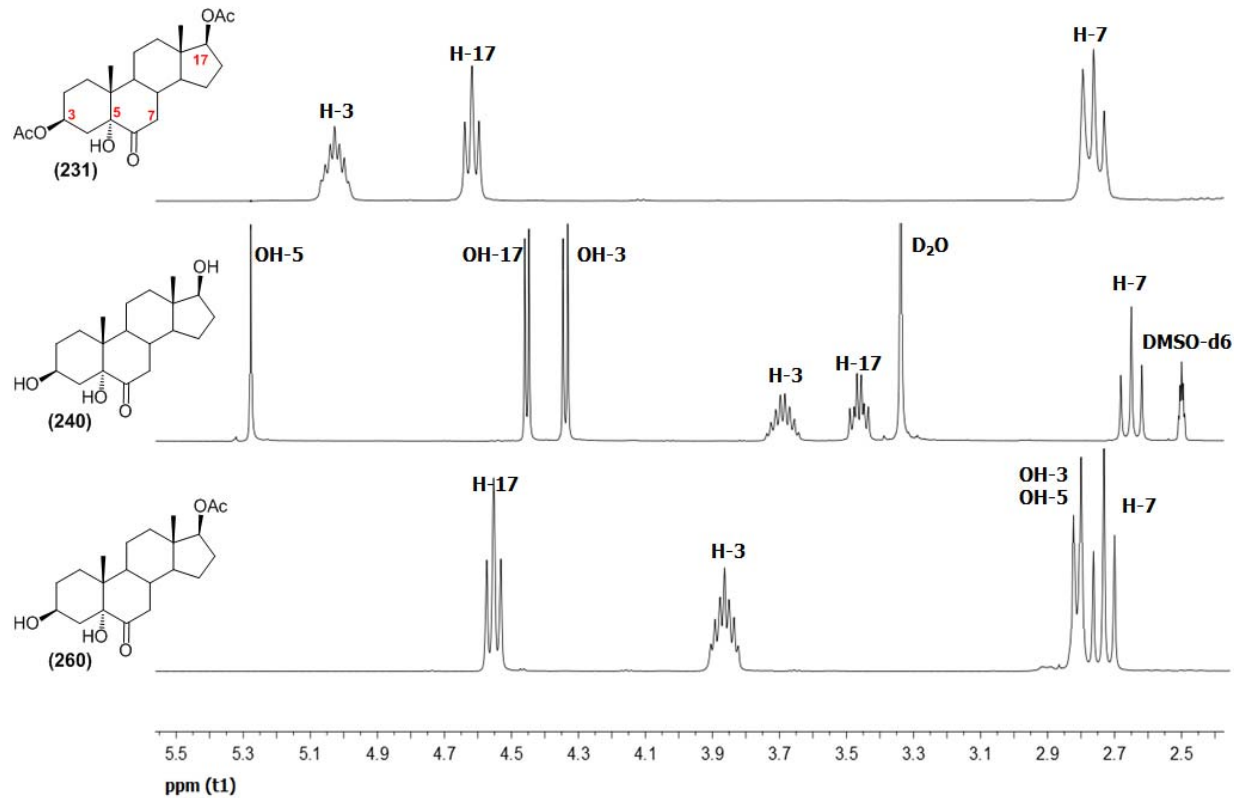


Figura 32. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 231, 240 y 260 que evidencian las transformaciones realizadas en los derivados de tipo androstano.

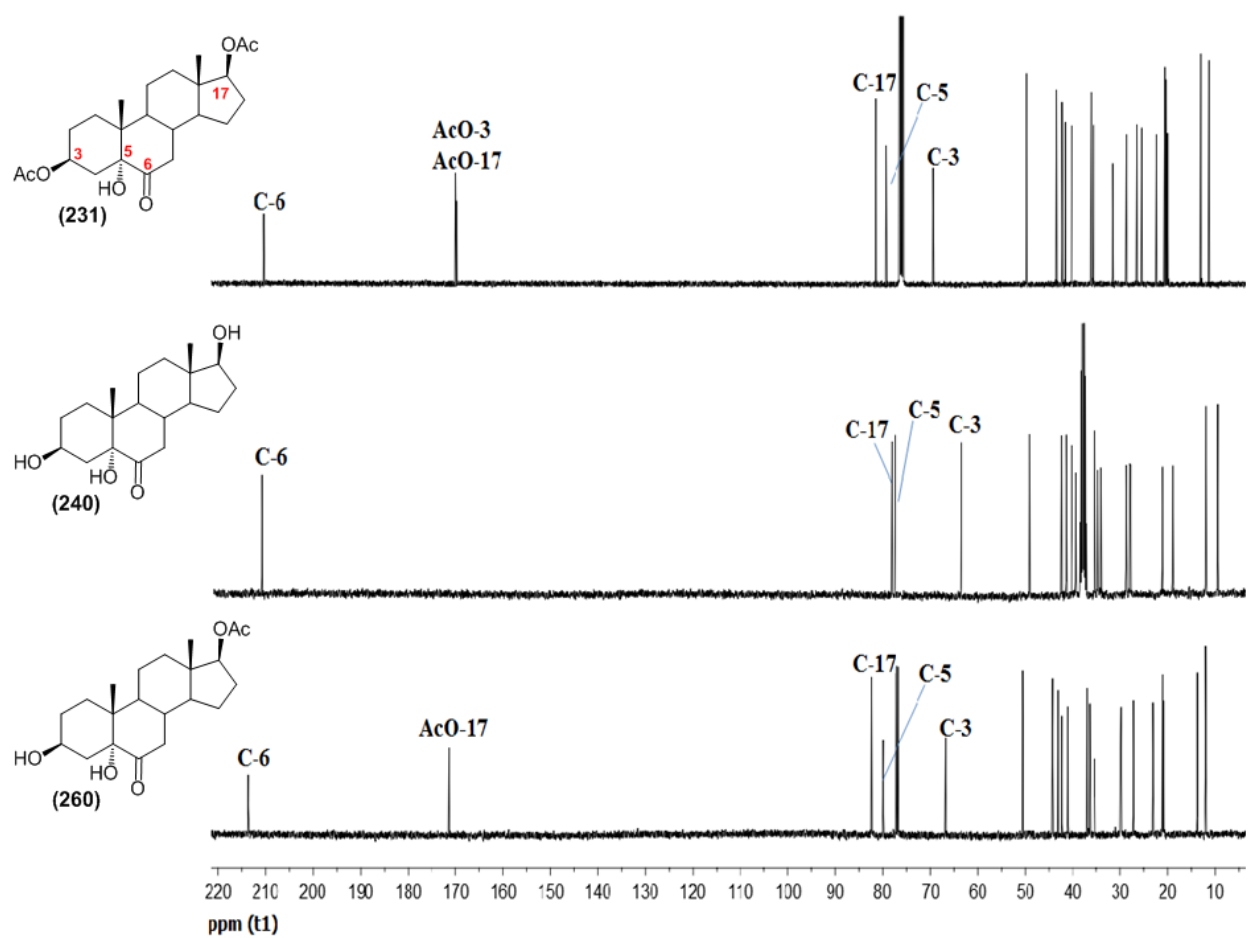


Figura 33. Espectros de ^{13}C de los compuestos 231, 240, 260.

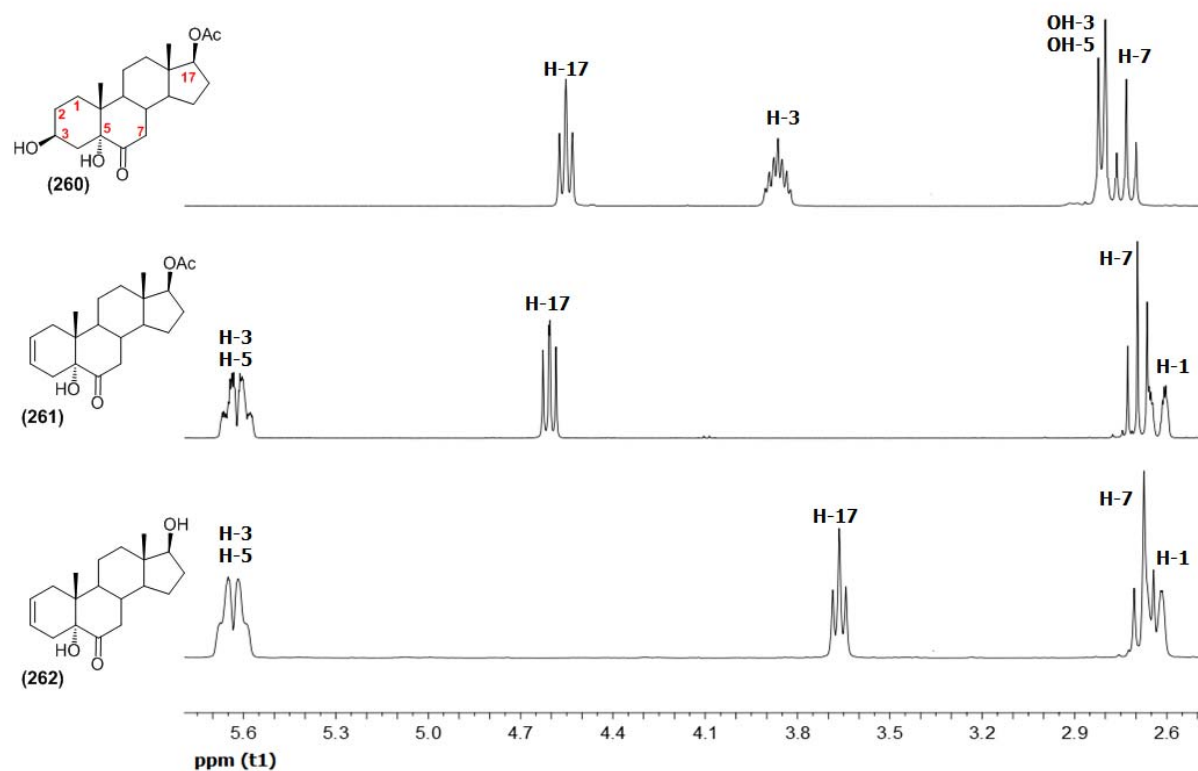


Figura 34. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 260, 261 y 262 que evidencian las transformaciones realizadas para obtener los derivados de tipo androstano.

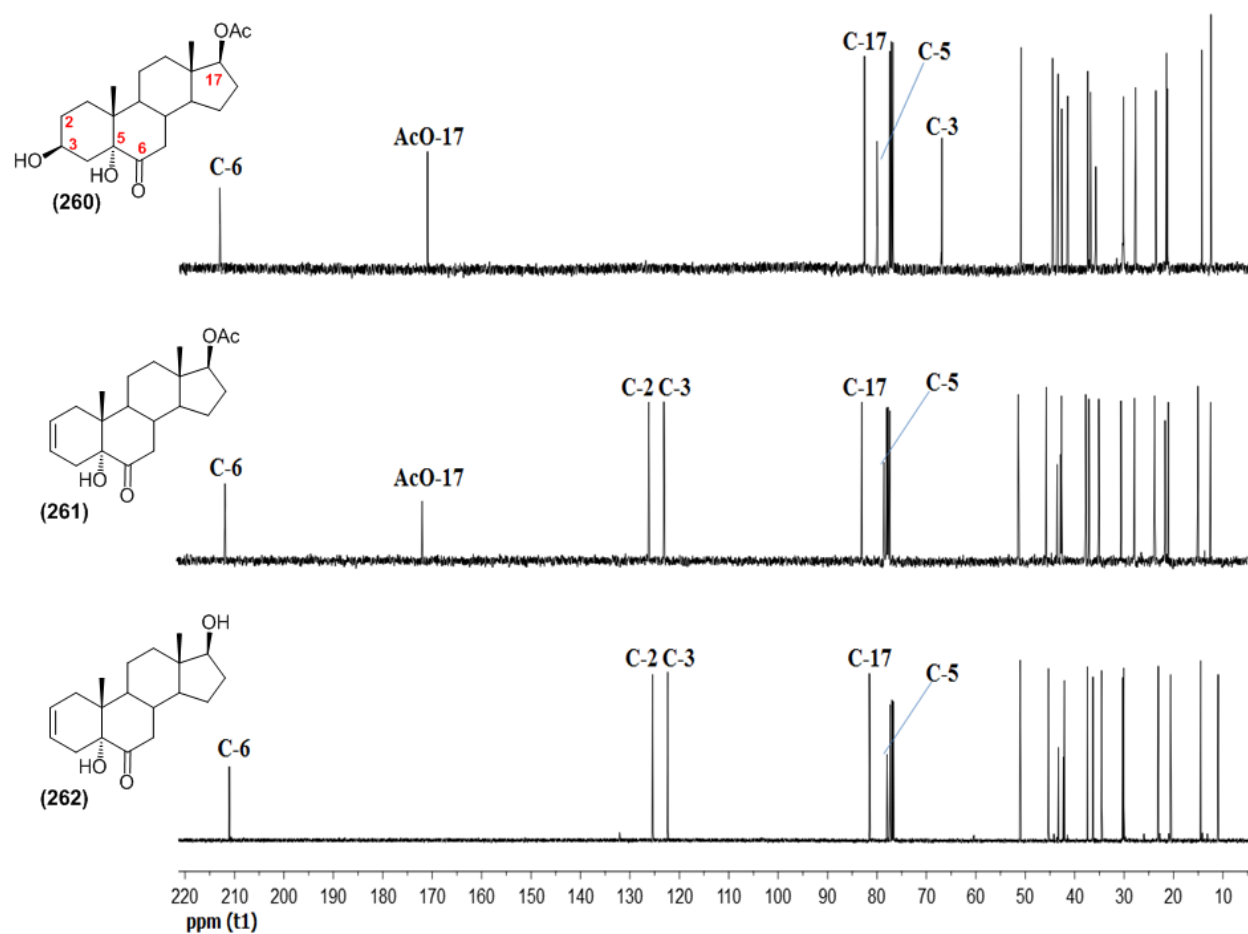


Figura 35. Espectros de ^{13}C de los compuestos 260, 261, 262.

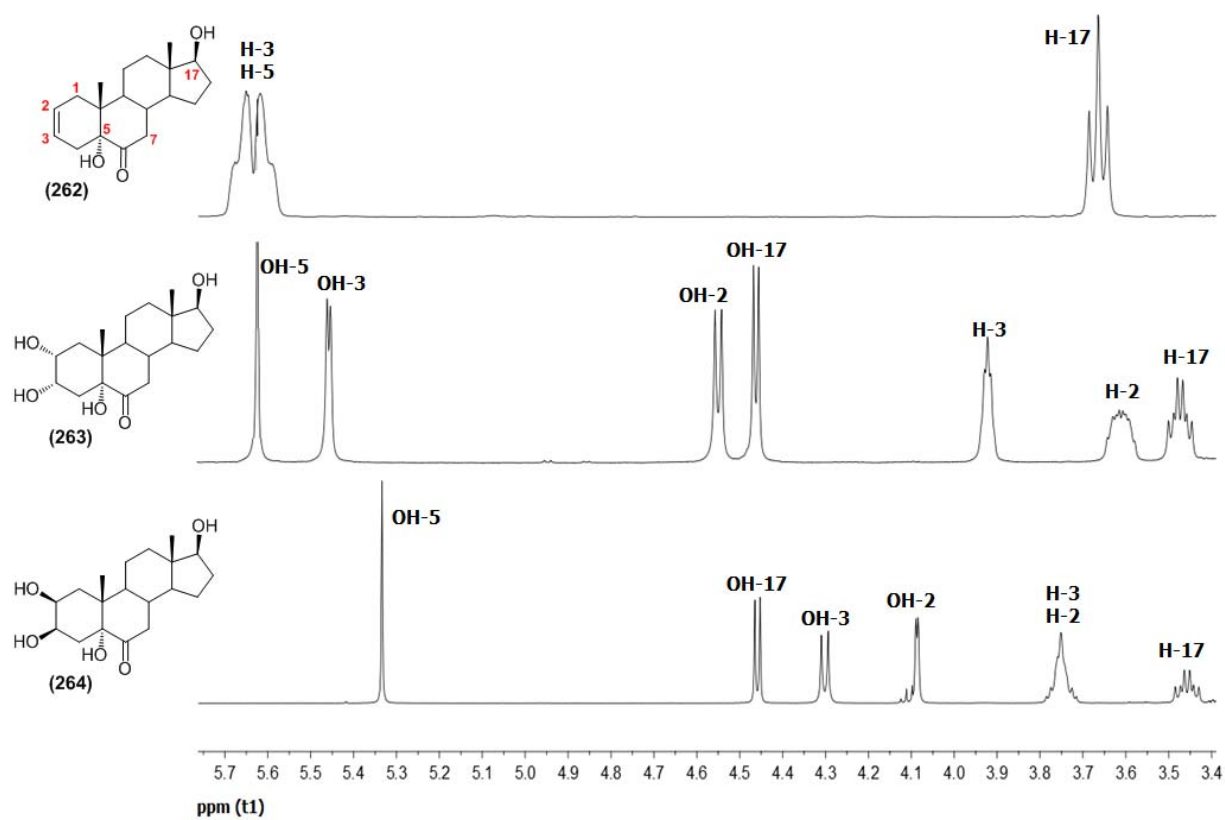


Figura 36. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 262, 263 y 264 que evidencian las transformaciones realizadas para obtener los ABRs de tipo androstano.

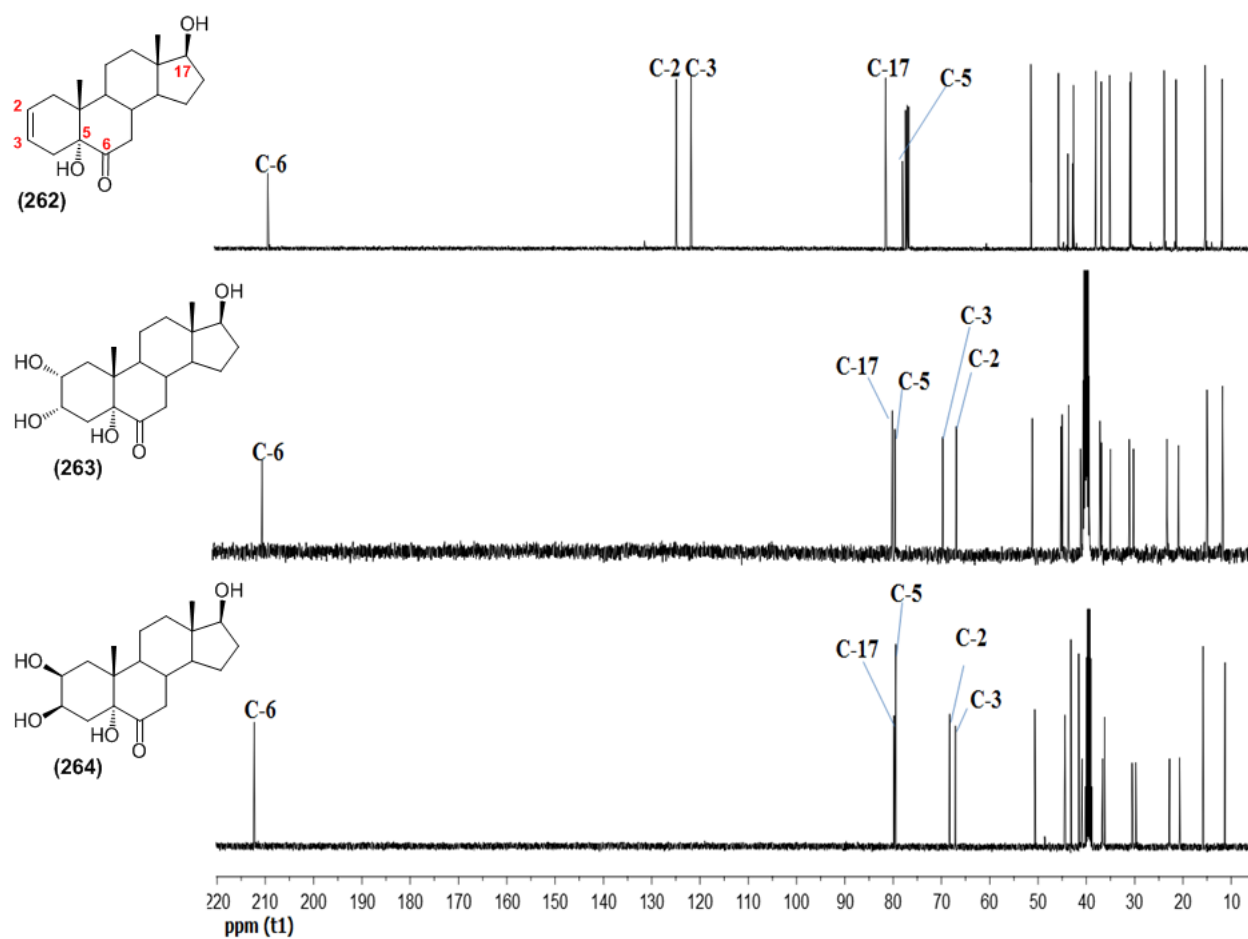


Figura 37. Espectros de ^{13}C de los compuestos 262, 263, 264.

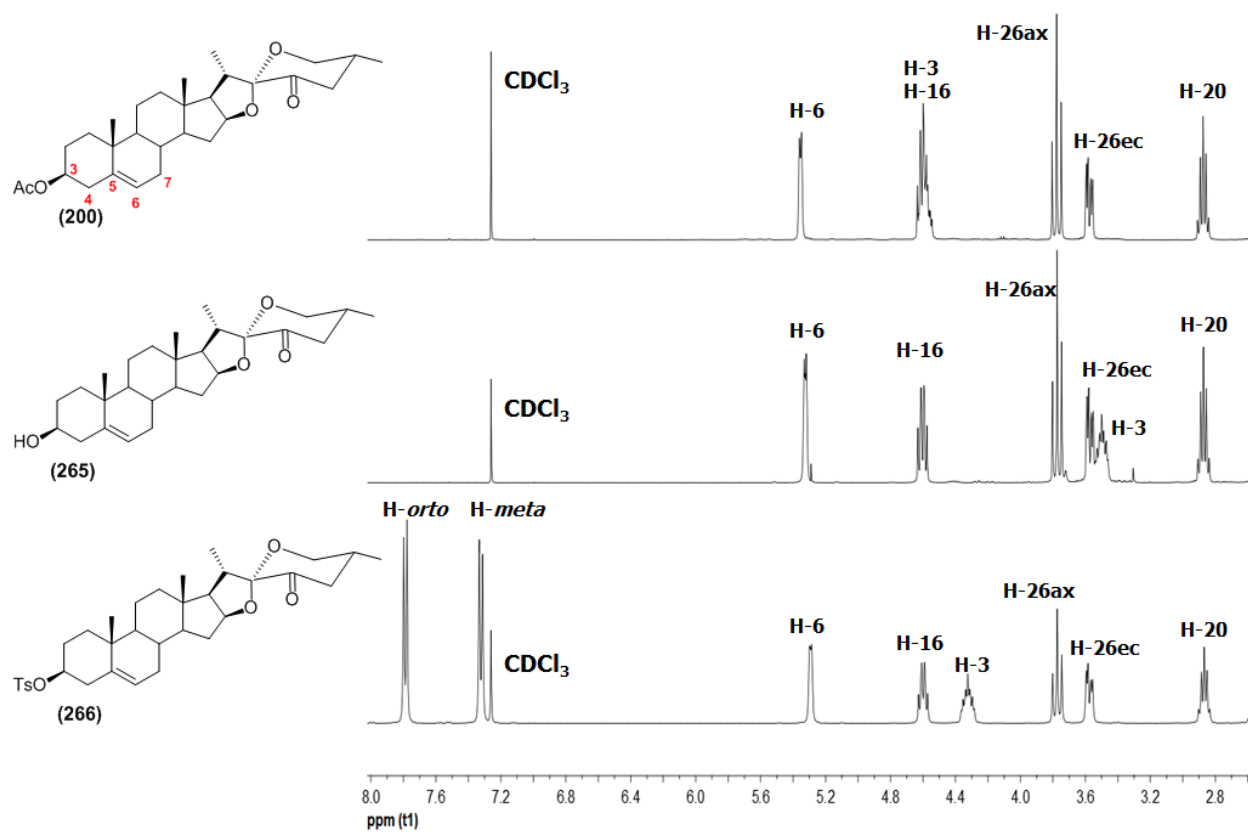


Figura 38. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 200, 265 y 266 que evidencian las diferentes sustituciones en el anillo A.

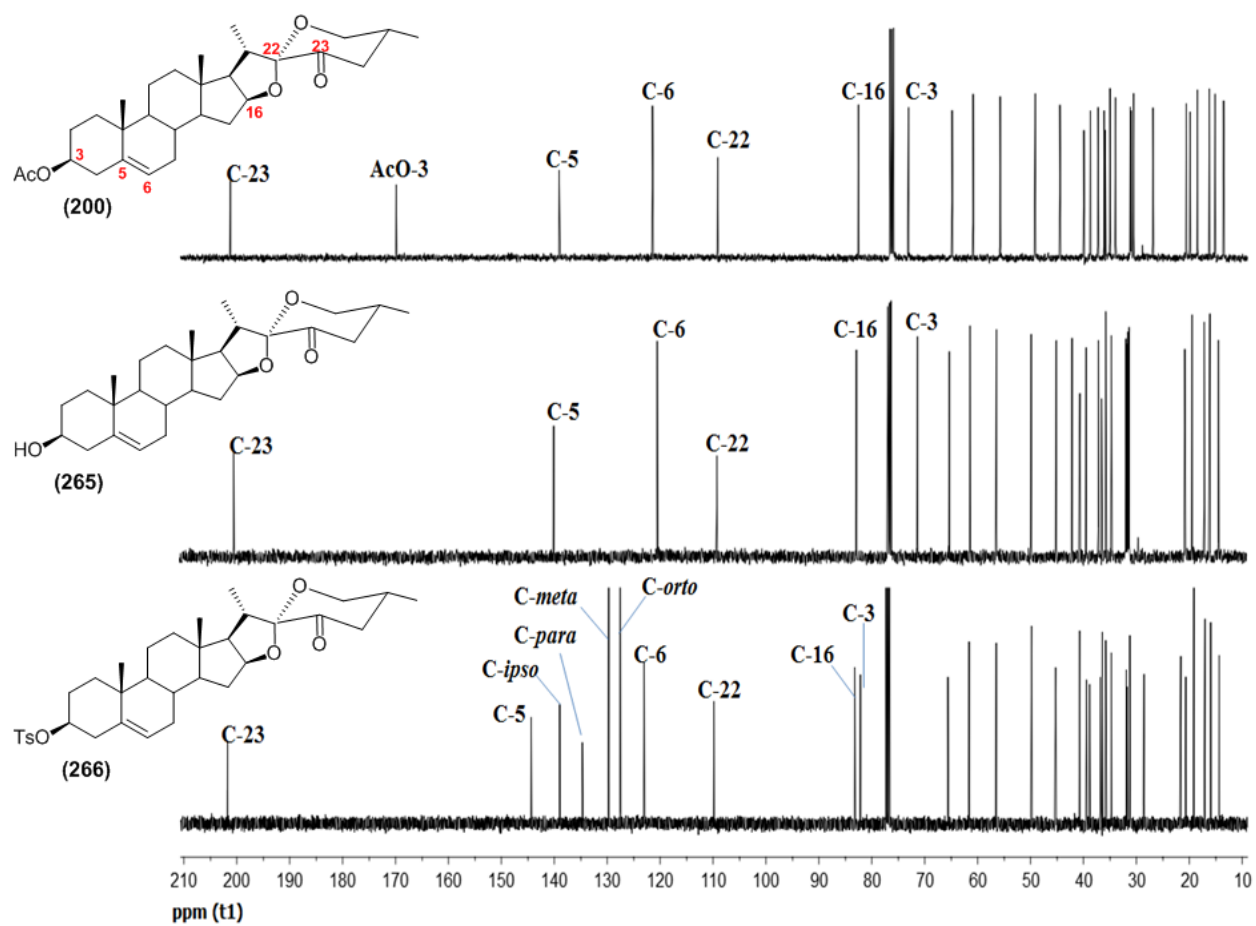


Figura 39. Espectros de ^{13}C de los compuestos 200, 265, 266.

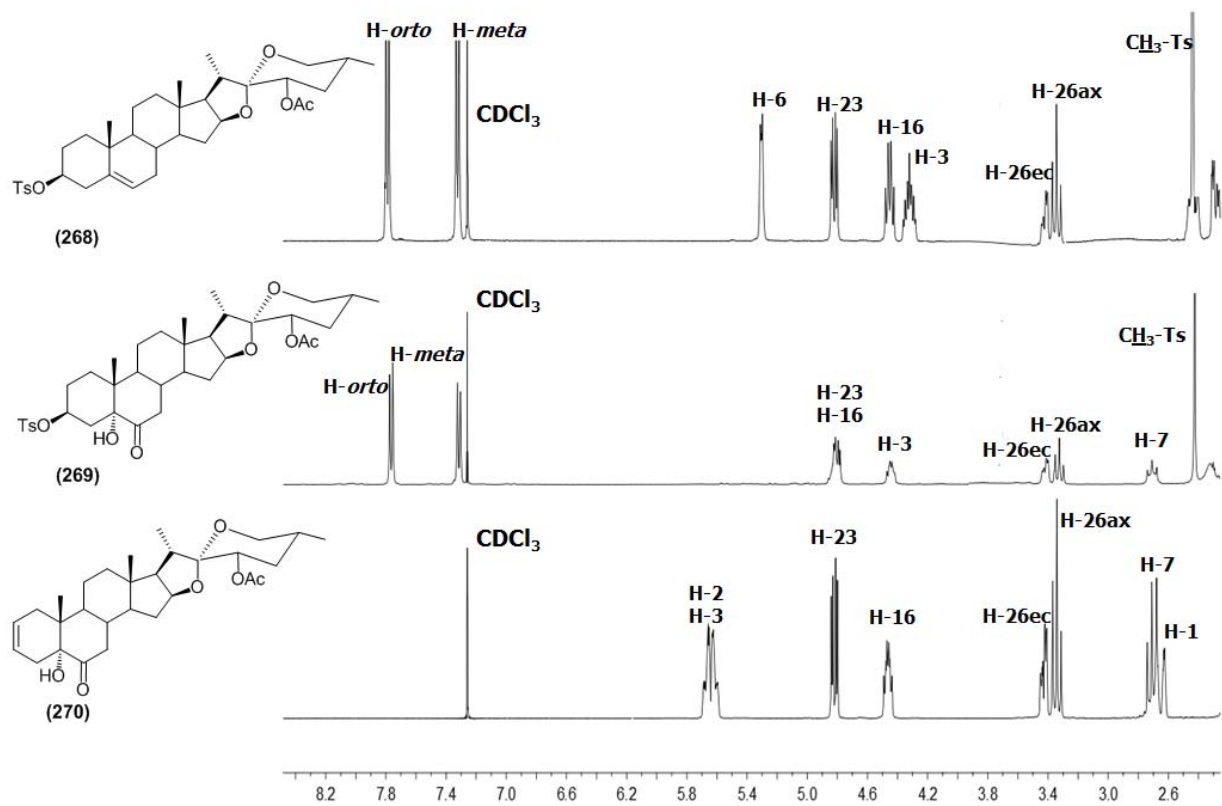


Figura 40. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 268, 269 y 270 que evidencian las diferentes sustituciones en los anillos A y B.

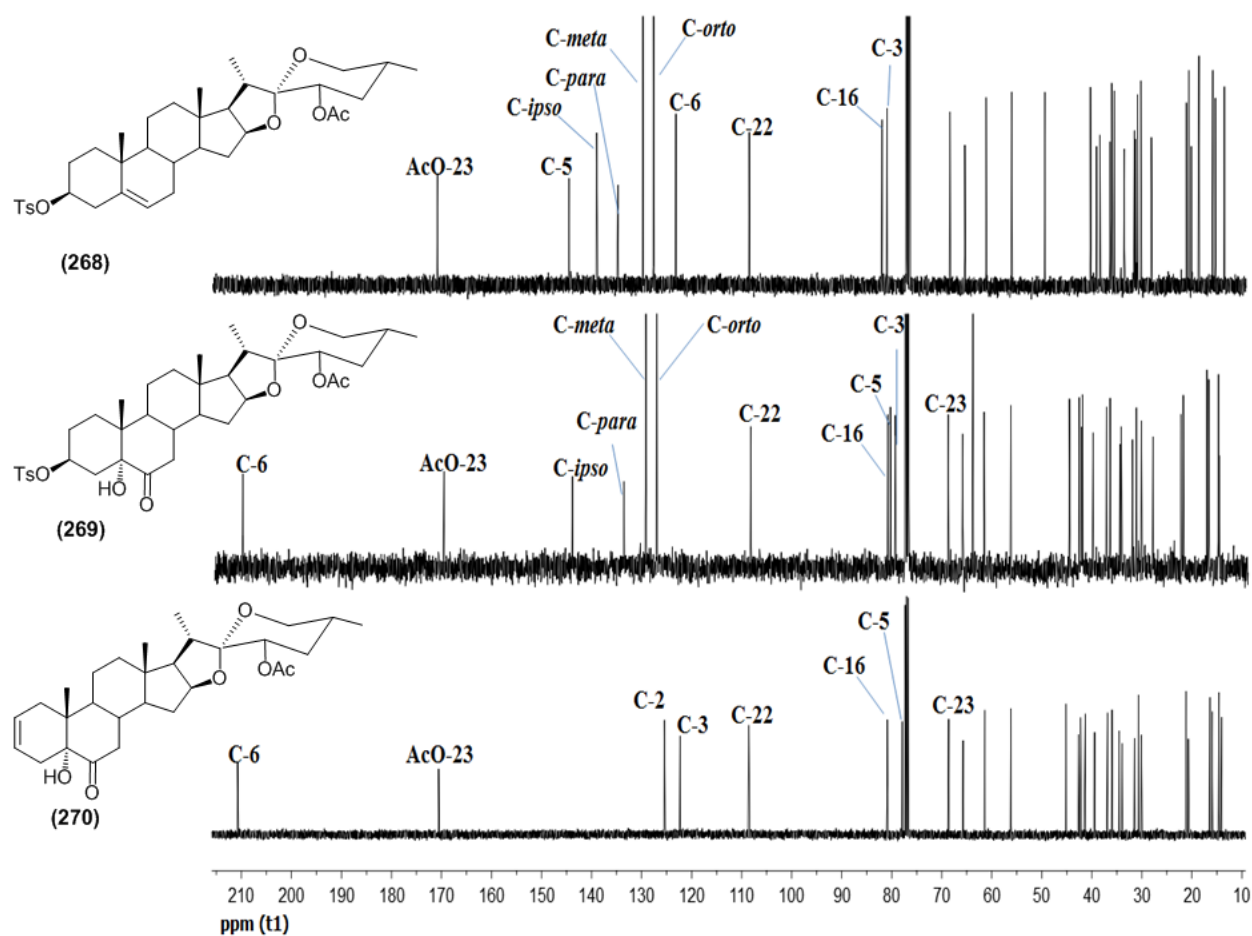


Figura 41. Espectros de ^{13}C de los compuestos 268, 269, 270.

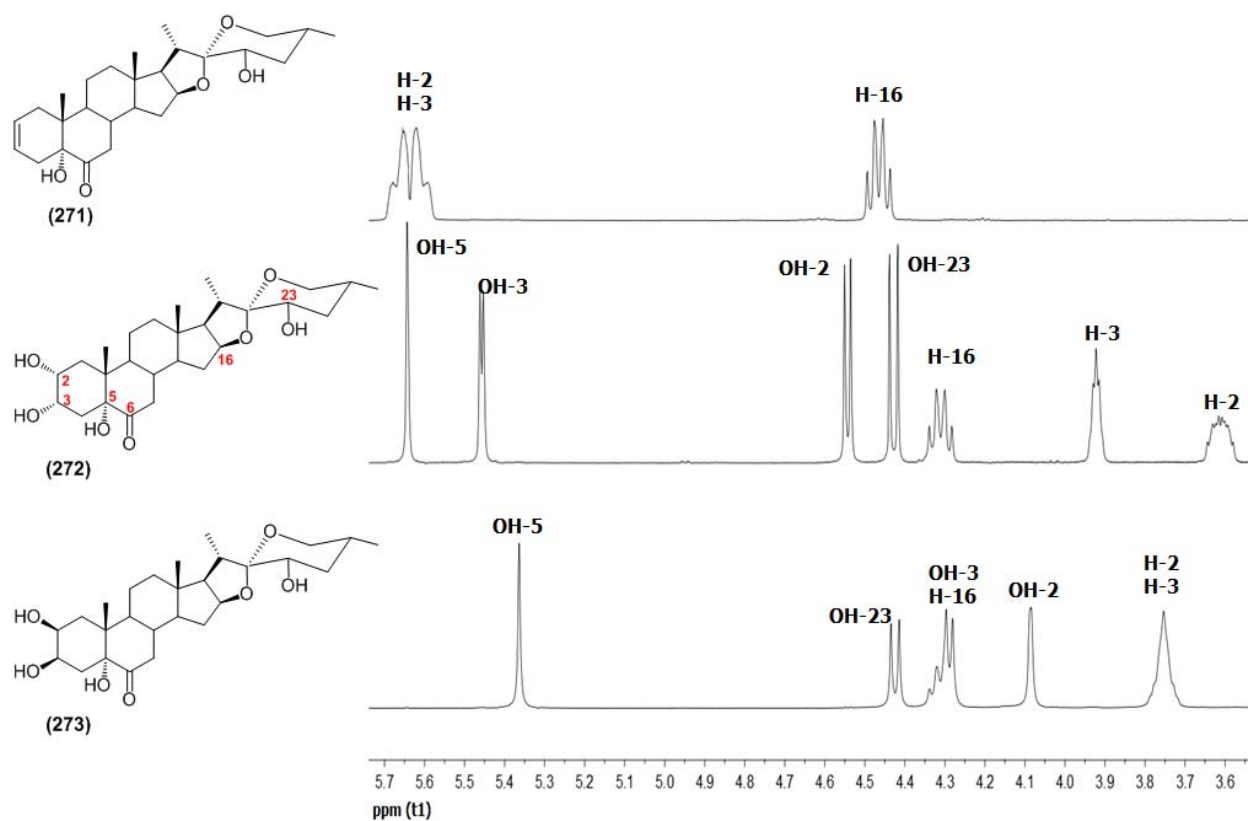


Figura 42. Fragmentos de los espectros de RMN ^1H de los compuestos 271, 272 y 273 que evidencian las diferentes sustituciones en los anillos A y B.

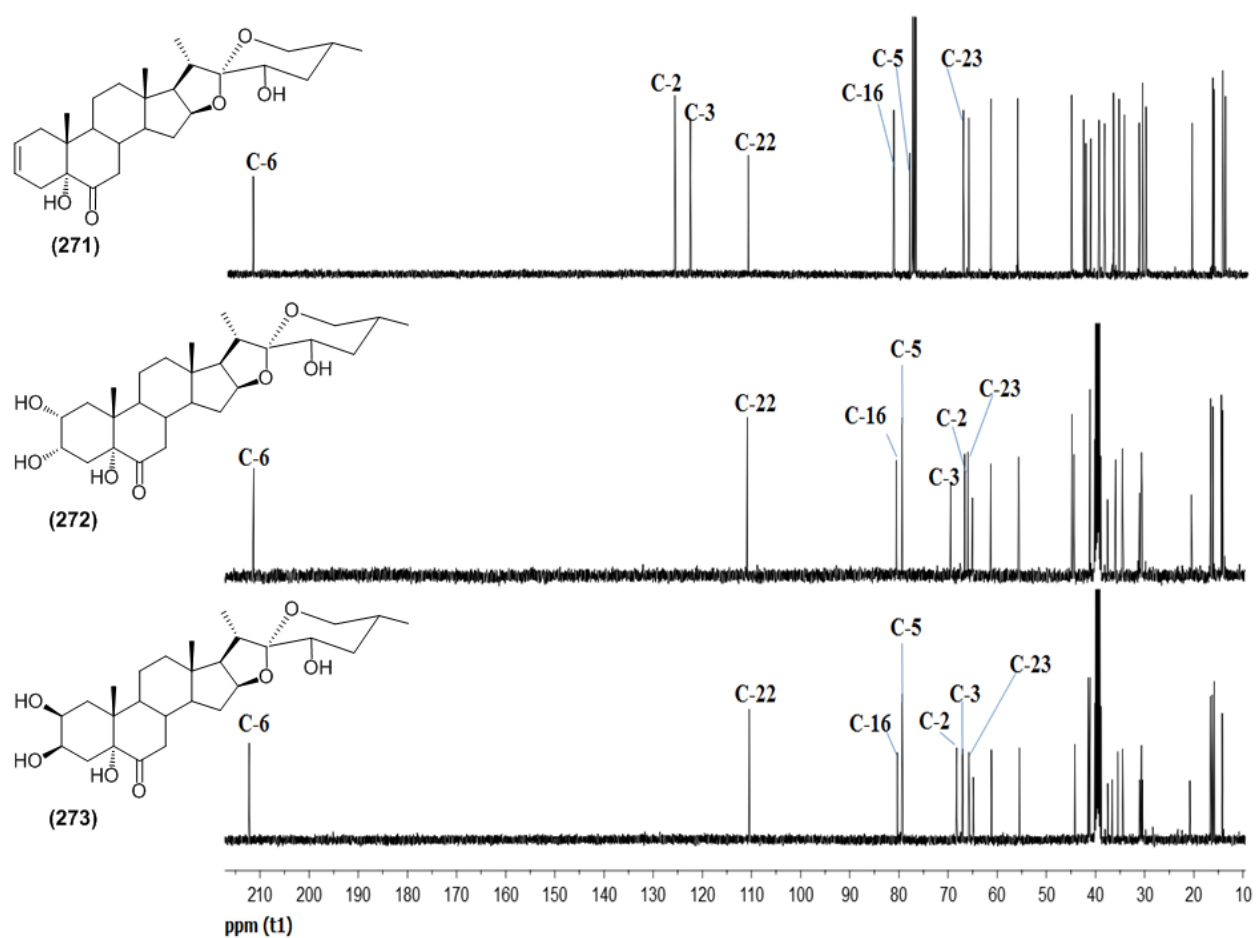


Figura 43. Espectros de ^{13}C de los compuestos 271, 272, 273.

9. ARTÍCULOS PUBLICADOS

An unexpected and useful E-ring oxidative cleavage in furostanes

Anielka Rosado-Abon, Margarita Romero-Avila, and Martin A. Iglesias-Arteaga*

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México

E-mail: martin.iglesias@servidor.unam.mx

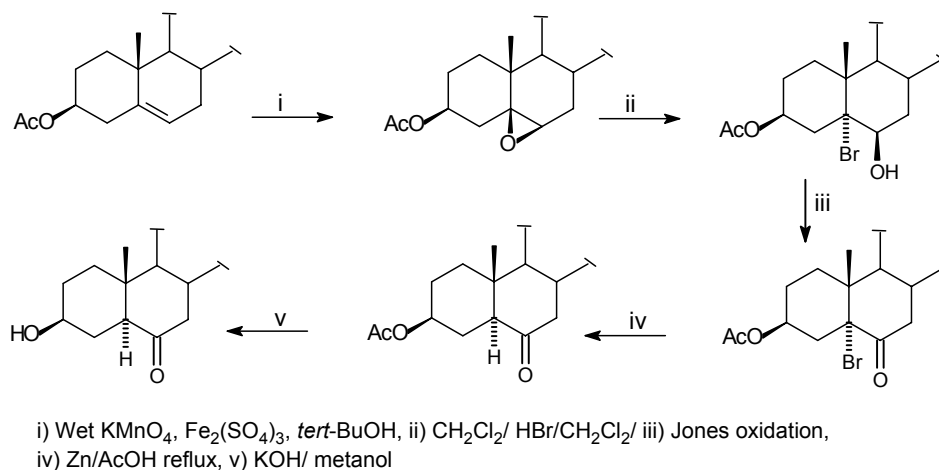
Abstract

Treatment of acetylated furostanols derived from steroid sapogenins with a wet mixture of KMnO_4 and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ in CH_2Cl_2 /*tert*-butyl alcohol produces the unexpected E-ring oxidative cleavage to afford the corresponding cholestan-22,16-diones. Based in this new reaction, facile syntheses of an OSW-1 precursor and kryptogenin acetate have been designed.

Keywords: Oxidative cleavage, furostanes, kryptogenin, OWS-1, 16,22-dioxosteroids

Introduction

The stereoselective β -epoxidation of Δ^5 -steroids using biphasic systems that involve potassium permanganate and metal salts has received considerable attention.¹ In particular, we have reported the transformation of 3β -hydroxy- Δ^5 -steroids into the corresponding 3β -hydroxy-6-oxosteroids [i.e cholesterol acetate into 3β -hydroxy-cholestan-6-one and diosgenin acetate into laxogenin], using a protocol that involves β -epoxidation, HBr induced oxirane ring opening, oxidation the resulting bromohydrin to a bromoketone and reduction to the parent ketone by treatment with Zn dust in refluxing acetic acid, (see Scheme 1).²

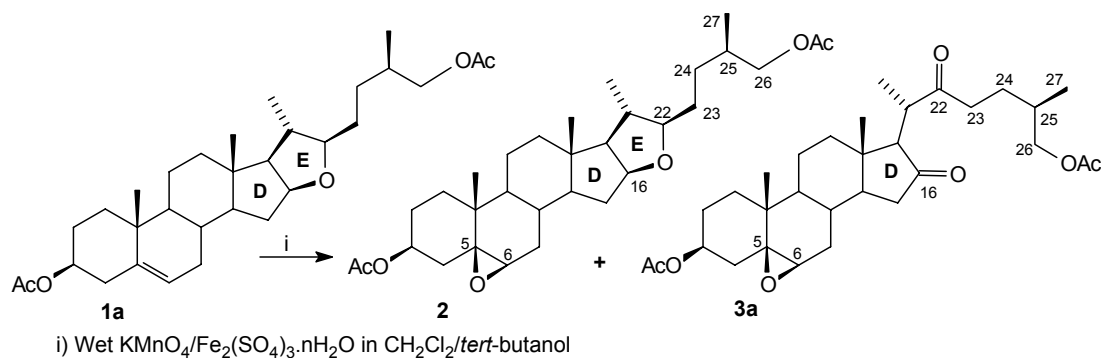


Scheme 1

Attempts to apply the above described procedure to furostanic compounds led to an unexpected oxidative cleavage reaction in which the furostanic compounds were converted into the corresponding cholestan-16,22-diones. Herein we report on the oxidative cleavage of the E-ring of furostanes and some of its synthetic applications.

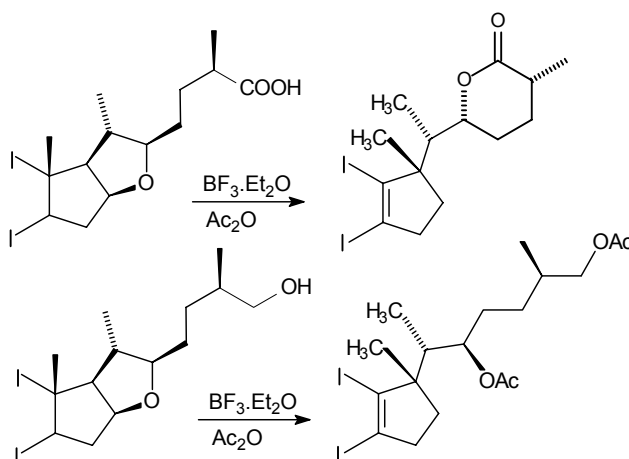
Results and Discussion

Attempt at β -epoxidation of the acetylated furostanol **1a** using wet $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ in CH_2Cl_2 /*tert*-butyl alcohol afforded the unchanged starting material and two compounds that after separation were characterized as the desired epoxidated furostanol **2a** (16.6%) and the unexpected epoxidated diketone **3a** (43.3%), (see Scheme 2 and Table 1, entry 1). In an experiment conducted without the ferric salt the unchanged starting material was recovered after 24 hours.



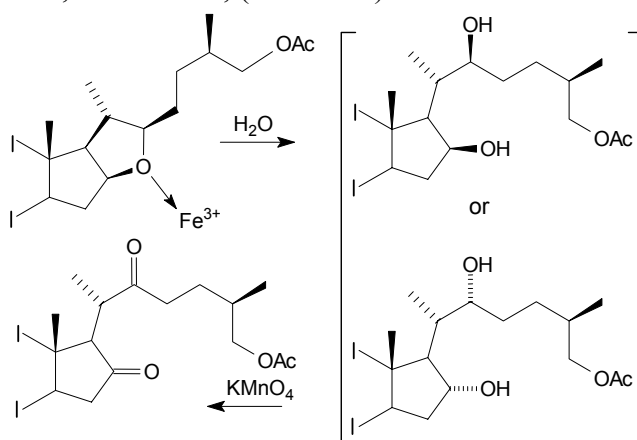
Scheme 2

Some reports have shown that the E-ring of furostanes undergoes cleavage in the presence of Lewis acids. For instance, $\text{Ac}_2\text{O}/\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ treatment of furostanes has been reported to produce E-ring cleavage followed by 17→16 hydride shift and Wagner-Meerwein rearrangement to afford Δ^{13} -17 β -methyl-18-norsteroids (Scheme 3).³ Activation of acetic anhydride by $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ resulted in acetylation of O-16 that triggers the observed rearrangement. The absence of a nucleophile capable to produce the nucleophilic displacement of the acetylated oxygen, justifies the observed course.



Scheme 3

In this new reaction of furostane compounds with wet $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, the fact that in absence of the ferric salt no reaction was observed suggests a mechanism in which, after coordination to the ferric cation, the tetrahydrofuranic oxygen attached to both C-16 and C-22 can be displaced by water present in the reaction media leading to a diol which is rapidly oxidized to the observed 16,22-diketone, (Scheme 4).



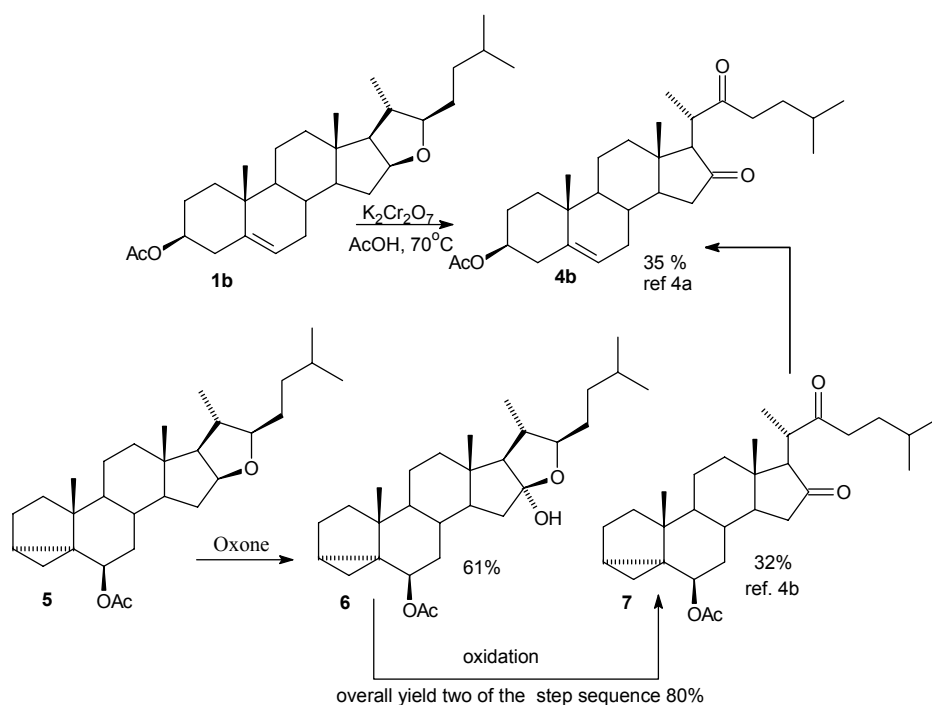
Scheme 4

The distribution of products indicates that the epoxidation of the double bond is faster than the E-ring cleavage and prompted us to study the reaction conditions for the total conversion of **1a** into **3a**. We were pleased to find that the simple increase on the amounts of the reagents and reaction time resulted in the conversion of the starting material **1a** into **3a**, (see Table 1, entry 2).

Table 1. Results of of epoxidation-oxidative E-ring opening of compound **1a**

	KMnO ₄ (g)	Fe ₂ (SO ₄) ₃ .nH ₂ O (g)	H ₂ O (ml)	Time (min.)	Yield %	
					2	3a
1	4	2	0.4	20	16.6	49.3
2	5	2.5	0.5	120	-	84.4

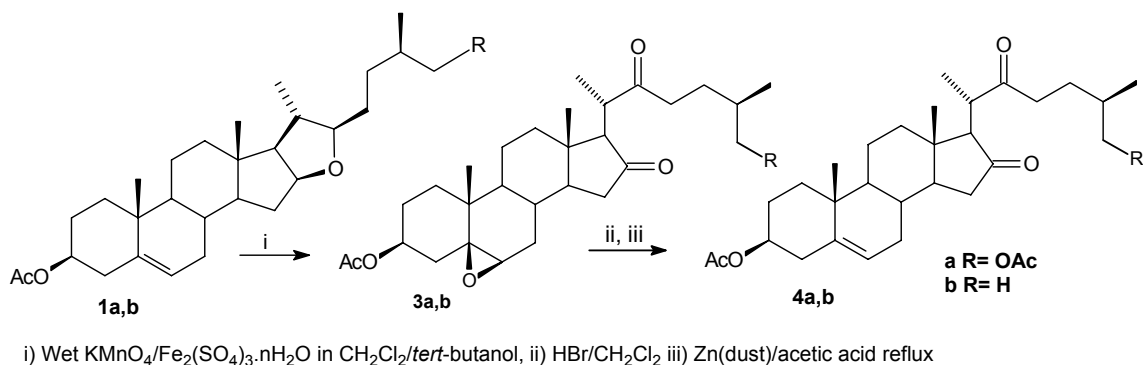
It has been reported that treatment of **1b** with K₂Cr₂O₇ in acetic acid led to the 16,22-diketone **4b** in poor yields.^{4a} In an alternative approach, oxidation with Oxone[®] of the acetylated *i*-steroid **5**, derived from diosgenin, produced the hemiketal **6** and the desired 16,22-diketone **7**. Four times recirculation of the mixture through the same oxidation procedure afforded **7** in 80% that was isomerised to **4b** in a long sequence to the synthesis of the potent antitumor agent OSW-1.^{4b}



Scheme 5

After those facts we decided to explore the application of this new reaction to the synthesis of kriptogenin acetate (**4a**),⁵ and **4b** that has been employed as synthetic precursor of OSW-1.^{4b} Application of the new reaction conditions to **1a** or to our previously reported **1b**^{6d} led to the

corresponding epoxidated diketones **3a** and **3b** which were converted into the desired 5,6 unsaturated derivatives **4a** (kryptogenin acetate) and **4b** by consecutive treatments with HBr in CH_2Cl_2 and Zn dust in refluxing acetic acid.



Scheme 6

Conclusions

We have found that $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ produces the oxidative cleavage of the E-ring of furostanes to afford a 16,22-diketone. This new reaction constitutes a convenient alternative for the preparation of 16,22-dioxo steroids that may find diverse and interesting synthetic applications. (i.e synthesis of OSW-1, kriptogenin derivatives or novel heterocyclic steroids). Additional experiments to extend this reaction to other steroidal and non-steroidal tetrahydrofuranic compounds are in development.

Experimental Section

General Procedures. Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ 5 cm x 2.5 cm plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vainillin in 50% HClO_4 and heated until colour developed. NMR spectra were recorded in on Varian Unity INOVA (300 or 400 MHz) spectrometers using TMS for ^1H or the solvent signal (CDCl_3) for ^{13}C as reference. Mass spectra were recorded on a Jeol SX-102-A spectrometer. Melting points were measured on Melt-Temp II equipment and are uncorrected.

Procedure for epoxidation-E-ring cleavage

KMnO_4 and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ were finely grounded in a mortar, H_2O was added and the mixture was placed in a round bottom flask containing CH_2Cl_2 (10 ml) (see Table 1 for amounts of KMnO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ and H_2O). A solution of the corresponding furostane compound **3a** or **3b** (2 mmol) in CH_2Cl_2 (5 ml) was added followed by addition of *tert*-butyl alcohol (1 ml) and

the mixture was stirred at room temperature for the indicated time. Ethyl ether (25 ml) and celite (2 g) were added and the mixture was stirred for 15 min before filtering through a small pad of silicagel and elution with ethyl ether (25 ml) and ethyl acetate (2 x 30 ml). The filtrate was washed with H₂O (5 x 30 ml), saturated aqueous NaCl solution (2 x 30 ml), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated to afford the desired compound.

(25R)-5 β ,6 β -Epoxyfurostan-3 β ,26-diol diacetate (2). M.p. 117-118 °C (from ethyl acetate). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.82-4.67 (m, 1H), 4.26 (dt, $J = 7.72, 7.72, 5.35$ Hz, 1H), 3.89 (ddd, $J = 17.59, 10.73, 6.35$ Hz, 1H), 3.27 (dt, $J = 8.20, 8.16, 4.05$ Hz, 1H), 3.06 (d, $J = 2.10$ Hz, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.96 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.73$ Hz, 3H), 0.74 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz) δ ppm 32.50 C-1, 27.14 C-2, 71.21 C-3, 37.92 C-4, 62.40 C-5, 63.34 C-6, 36.63 C-7, 29.37 C-8, 51.00 C-9, 35.12 C-10, 21.48 C-11, 39.42 C-12, 40.60 C-13, 56.30 C-14, 32.05 C-15, 83.00 C-16, 65.08 C-17, 16.26 C-18, 17.03 C-19, 37.87 C-20, 18.84 C-21, 90.12 C-22, 30.41 C-23, 30.74 C-24, 32.73 C-25, 69.33 C-26, 16.72 C-27, 21.26 and 20.93 $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}$, 171.23 and 170.48 CH_3COO . MS (FAB): 516 M⁺, 515 M⁺-1, 455, 437, 411, 211, 154, 109, 95, 83, 81, 71, 69, 57, 55. HRMS (FAB): estimated for C₃₁H₄₇O₆ (M⁺-H) 515.3367, found 515.3364.

(25R)-3 β ,26-Diacetoxy-5 β ,6 β -epoxycholestan-16,22-dione (3a). Syrup. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.74 (tdd, $J = 11.55, 9.87, 4.74, 4.74$ Hz, 1H), 4.00-3.81 (m, 2H), 3.09 (d, $J = 2.31$ Hz, 1H), 2.75 (ddd, $J = 17.83, 9.47, 5.59$ Hz, 1H), 2.56 (q, $J = 5.88, 5.86, 5.86$ Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.00 (d, $J = 7.55$ Hz, 6H), 0.93 (d, $J = 6.70$ Hz, 3H), 0.73 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz) δ ppm 32.39 C-1, 27.03 C-2, 71.05 C-3, 37.78 C-4, 62.45 C-5, 62.99 C-6, 36.41 C-7, 28.88 C-8, 50.61 C-9, 35.14 C-10, 21.26 C-11, 39.64 C-12, 41.53 C-13, 50.52 C-14, 38.55 C-15, 213.20 C-16, 66.11 C-17, 15.26 C-18, 16.95 C-19, 43.23 C-20, 12.81 C-21, 217.44 C-22, 37.05 C-23, 26.63 C-24, 32.00 C-25, 68.96 C-26, 16.72 C-27, 21.20 and 20.88 $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}$, 171.20 and 170.41 CH_3COO . MS (FAB): 531 MH⁺, 515, 513, 472, 471, 411, 295, 229, 223, 211, 115, 97, 107, 95, 91, 81, 69, 67, 55. HRMS (FAB) estimated for C₃₁H₄₇O₇ (MH⁺) 531.3316, found 515.3272

3 β -Acetoxy-5 β ,6 β -epoxycholestan-16,22-dione (3b). Obtained from 1 mmol (442 mg) of **1b** as described for **3a** (KMnO₄ 5g, Fe₂(SO₄)₃·nH₂O 2.5, H₂O 0.5 ml, reaction time 120 min) yield 283.7 mg (0.60 mmol, 60 %) M.p. 134-135 °C (from MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.74 (m, 1H, H-3), 3.12 (a, H-6), 2.60 (d, $J = \text{H-17}$), 2.03 (s, $\underline{\text{CH}_3}$ -21), 0.99 (s, $\underline{\text{CH}_3}$ -19), 0.85 (d, $\underline{\text{CH}_3}$ -26 y $\underline{\text{CH}_3}$ -27), 0.74 (s, $\underline{\text{CH}_3}$ -18). ¹³C-NMR (100 MHz): 32.39 C-1, 27.04 C-2, 71.07 C-3, 37.79 C-4, 62.48 C-5, 63.04 C-6, 36.42 C-7, 28.88 C-8, 50.59 C-9, 35.14 C-10, 21.27 C-11, 40.40 C-12, 41.54 C-13, 50.53 C-14, 38.55 C-15, 213.89 C-16, 66.03 C-17, 15.31 C-18, 16.97 C-19, 43.20 C-20, 12.82 C-21, 217.44 C-22, 37.09 C-23, 32.14 C-24, 27.57 C-25, 22.39 C-26, 22.39 C-27, 21.22 $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}$, 170.44 CH_3COO . MS (FAB): 473 MH⁺, 413, 395, 327, 267, 207, 147, 83, 81, 69. HRMS (FAB) estimated for C₂₉H₄₅O₅ (MH⁺) 473.3262, found 473.3303.

(25R)-3 β ,26-Diacetoxy-cholest-5-en-16,22-dione, krytogenin acetate (4b). A solution of **3a** (400 mg, 0.73 mmol) in CH₂Cl₂ (20 ml) was shaken for 20 min with 48% HBr (10 ml). The organic layer was washed with water (5x10 ml), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The

residue was refluxed for 30 min. with Zn dust (950 mg) in AcOH (15 ml). Ethyl acetate was added, the resulting mixture was filtered and washed with 10% aqueous NaCl (5 x10 ml), water (3x10 ml), 5% aqueous Na₂CO₃ (10 ml portions until evolution of CO₂ ceased), 10% aqueous NaCl (2x10 ml), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated to afford **5**, (224.4 mg, 57.8 %) after chromatographic purification in silica gel. M.p. 143-144 °C (from ethyl acetate); lit.⁷ 152-153 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ ppm 5.36 (d, *J* = 4.83 Hz, 1H, H-6), 4.67-4.52 (m, 1H, H-3), 3.93 (dd, *J* = 6.07, 3.08 Hz, 2H, H-26), 2.77 (m, 1H, H-20), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.02 (s, 3H, CH₃ acetyl), 1.04 (m, 6H, H-19 and H-21), 0.95 (d, *J* = 6.72 Hz, 3H, H-21), 0.79 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (100 MHz) δ ppm 36.61 C-1, 27.59 C-2, 73.64 C-3, 37.97 C-4, 139.83 C-5, 121.73 C-6, 31.66 C-7, 30.87 C-8, 49.53 C-9, 36.61 C-10, 20.44 C-11, 39.61 C-12, 41.61 C-13, 51.10 C-14, 38.51 C-15, 213.20 C-16, 66.09 C-17, 15.33 C-18, 19.25 C-19, 43.31 C-20, 12.92 C-21, 217.86 C-22, 37.13 C-23, 26.65 C-24, 32.02 C-25, 68.97 C-26, 16.76 C-27, 21.33 and 20.90 CH₃COO, 171.19 and 170.40 CH₃COO.

3β-Acetoxy-cholest-5-en-16,22-dione (4b). Obtained in 56.5 % (117 mg, 0.26 mmol) from **3b** (215.9 mg, 0.46 mmol) as described for kryptogenin acetate (**4a**). M.p. 152-154 °C (from MeOH) lit.^{4a} 151-152 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 5.36 (d, *J*= 4.8 Hz, H-6), 4.65-4.54 (m, H-3), 2.61 (d, *J*= 3.6 Hz, H-17), 2.02 (s, CH₃COO-3), 1.03 (s, CH₃-19), 0.89 (d, *J*= 6 Hz, CH₃-26 y CH₃-27), 0.79 (s, CH₃-18) ¹³C NMR (100 MHz): 31.67 C-1, 27.60 C-2, 73.66 C-3, 37.98 C-4, 139.81 C-5, 121.76 C-6, 36.62 C-7, 30.88 C-8, 51.09 C-9, 36.62 C-10, 20.45 C-11, 38.51 C-12, 41.62 C-13, 49.54 C-14, 40.38 C-15, 217.85 C-16, 66.01 C-17, 12.94 C-18, 19.26 C-19, 43.29 C-20, 15.37 C-21, 213.86 C-22, 37.16 C-23, 32.17 C-24, 27.60 C-25, 21.36 C-26, 22.41 C-27, 22.41 CH₃COO, 170.42 CH₃COO.

Acknowledgements

We thank *Dirección General de Asuntos del Personal Académico* (DGAPA-UNAM) for financial support via project IN-204008 and *Dirección General de Estudios de Postgrado* (DGEP-UNAM) for the scholarship granted to A.R-A. We are indebted to Rosa I. del Villar Morales and Margarita Guzmán Villanueva (USAI-UNAM) for registering NMR and Mass spectra.

References

- (a) Syamala, M. S.; Das, J.; Baskaran, S.; Chandrasekaran, S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1928-1930. (b) Parish, E. J.; Li, H.; Li, S. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 927. (c) Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Liman, M. D.; Nagaratnam, S.; Manickavasagar, R. *J. Chem. Res. (S)* **1995**, 220. (d) Parish, E. J.; Li, S. *J. Chem. Res. (S)* **1996**, 288. (e) Parish, E. J.; Li, S. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5665. (f) Salvador, J. A. R.; Sáe Melo, M. L.; Campos Neves, A. S.

- Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 687. (g) Salvador, J. A. R.; Hanson, J. R. *J. Chem. Res. (S)* **2002**, 576. (h) Silvestre, S. M.; Salvador, J. A. R.; Clark, J. H. *J. Mol. Catal. A: Chemical* **2004**, *219*, 143.
- Iglesias-Arteaga, M. A.; Símuta-Lopez, E. M.; Xochihua-Moreno, S.; Viñas-Bravo, O.; Montiel-Smith, S.; Meza Reyes, S.; Sandoval-Ramírez, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*(3A), 381.
 - (a) González, A. G.; Francisco, C. G.; Freire, R.; Hernández, R.; Salazar, J. A.; Suárez, E. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 4289. (b) Iglesias-Arteaga, M. A.; Mendez-Stivalet, J. M.; Pérez, N. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*(1), 47.
 - (a) Chausuancharoen, N.; Kongkathip, N.; Konkathip, B. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 961-983. (b) Xu, Q.; Peng, X-w.; Tian, W-s. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9375.
 - Kryptogenin and its derivatives have been employed as starting material for the synthesis of different bioactive steroid, see (a) Mui, M. M.; Kamat, S. Y.; Elliott, W. H. *Steroids*, **1974**, *24*, 239. (b) Cheng, M.S.; Wang, Q. L.; Tian, Q.; Song, H.Y.; Liu, Y.X.; Li, Q.; Xu, X.; Miao, H. D.; Yao, X. S.; Yang, Z. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3658. (c) Laura Alessandrini, L.; Ciuffreda, P.; Santaniello, E.; Terraneo, G. *Steroids*, **2004**, *69*, 789. (d) Liu, Y.; Zhao, D-M.; Lu, X-H.; Wang, H.; Chen, H.; Ke, Y.; Leng, L.; Cheng, M-S. *Bioorg. Med Chem. Lett* **2007**, *17*(11), 156.
 - Furostanoic compounds can be obtained from steroid sapogenins by different reductive treatments a) $\text{LiAlH}_4/\text{AlCl}_3$ in diethyl ether Iglesias-Arteaga, M. A.; Pérez-Gil, R.; Leliebre-Lara, V.; Pérez-Martínez, C. S.; Coll, F. *J. Chem. Res. (S)* **1996**, 504. (b) hydrogenation over PtO_2 in acidic media Iglesias-Arteaga, M. A.; Perez-Gil R.; Leliebre-Lara, V.; Perez-Martínez C. S.; Coll-Manchado, F. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 1779. (c) NaBH_3CN reduction in acetic acid Chausuancharoen N, Kongkathip N, Konkathip B. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 961. (d) Romero-Avila, M.; de Dios-Bravo, M. G.; Mendez-Stivalet, J. M.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. *Steroids* **2007**, *72*, 955.
 - Marker, R. E.; Wahner, R.B.; Ulshafer, P. R.; Wittbecker, E. L.; Goldsmith, D. P. J; Raouf, C. H. *J. Am. Chem Soc.* **1947**, *69*, 2167.

A rapid and simple one-pot procedure for the synthesis of 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids

Anielka Rosado-Abón, Margarita Romero-Ávila, Martín A. and Iglesias-Arteaga*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria

E-mail: martin.iglesias@servidor.unam.mx

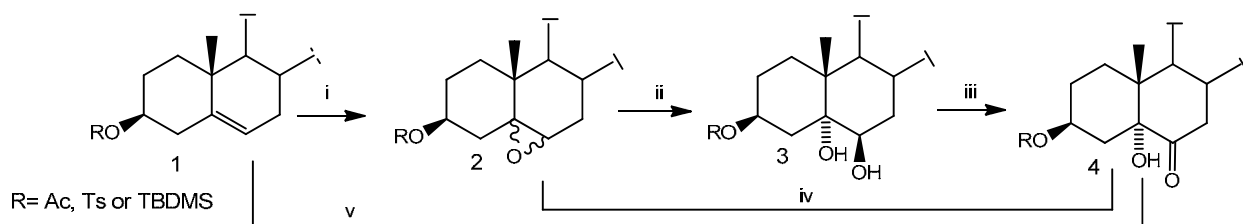
Abstract

A fast one-pot procedure for the synthesis of 5 α -hydroxy-6-oxo steroids is described. Epoxidation of 3 β -hydroxy- Δ^5 steroids followed by oxidative cleavage of the resulting epoxide with aqueous CrO₃ lead to the desired compounds without affection of labile side chains.

Keywords: Epoxides, oxidative cleavage, 5 α -hydroxy-6-oxo steroids, one-pot

Introduction

Steroids bearing a 3 β ,5 α -dihydroxy-6-oxo moiety have served as starting materials for the synthesis of different bioactive compounds including plant growth regulators,^{1,2} ecdysteroids antagonists,³ 5 α -reductase inhibitors^{4,5} or antagonists of the androgen receptor,⁶ among others. In general, the limited number of protocols for the preparation of such compounds start from derivatives of 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroids and involve the oxidation of 5,6-diols (iii),^{1,3} or the oxidative cleavage of 5 ξ ,6-epoxides by treatment with Jones reagent² or CrO₃ (iv)⁵ (Scheme 1).



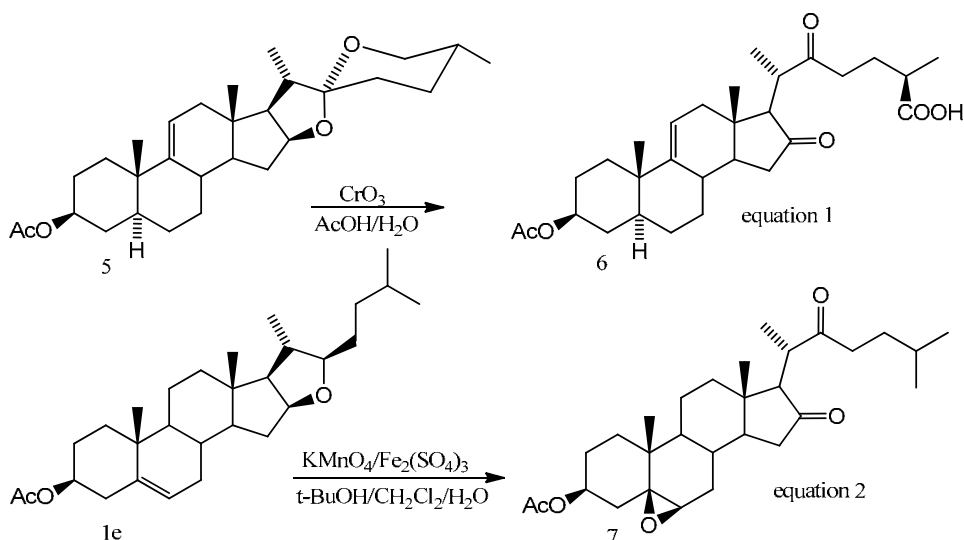
i) MCPBA/CH₂Cl₂ or KMnO₄/Fe₂(SO₄)₃, t-BuOH/CH₂Cl₂/H₂O; ii) H₂O/HClO₄/acetone; iii) Jones reagent or PCC; iv) Jones reagent or CrO₃; v) KMnO₄ / Fe(ClO₄)₃.nH₂O

Scheme 1

Recently, Salvador and coworkers reported that treatment of different 3 β -acetoxy- Δ^5 -steroids (androstane, pregnanes and cholestane series) with KMnO₄/Fe(ClO₄)₃ in heterogeneous media

for 8 to 24 hours (v), produced the corresponding 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids in 70 to 81% yields⁷ in an elegant approach in which the risks associated to the explosive nature of Fe(ClO₄)₃ may constitute a general limitation in the preparation of large amounts of the desired ketols (Scheme 1).

There are some reports that indicate that steroids bearing labile side chain may be affected by the acid conditions that predominate in the hydrolytic and oxidative cleavage of epoxides or in Jones oxidation of diols. Barton reported that treatment of steroid sapogenins with CrO₃ in acetic acid yielded the corresponding sapogenoic acid as a result of the oxidative opening of the spirostanoic side chain (equation 1).⁸ On the other hand, we described that treatment of furostanols with the KMnO₄/Fe₂(SO₄)₃ cleaved the E-ring to afford 16,22-diones, (equation 2).⁹

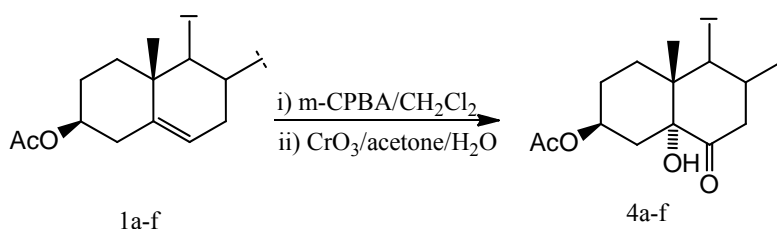


As a part of our project on the synthesis of bioactive compounds, we have directed our attention to a series of 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids bearing different oxygenated side chains as starting materials in the preparation of potentially bioactive compounds. Consequently, we decided to set up optimized experimental conditions that avoid the above-mentioned limitations that hinder the preparation of 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids bearing acid labile side chains. Herein we report on a simple one-pot procedure that allows the rapid preparation of such compounds in 1 to 10 mmol amounts without isolation of the intermediate epoxides **2** or diols **3**.¹⁰ In addition, a carefully assignment of NMR signals of the obtained compounds is provided.

Results and Discussion

As expected, treatment of the 3 β -acetoxy- Δ^5 -steroids **1a-f** with *m*-CPBA in CH₂Cl₂ produced mixtures of the corresponding 5 α - and 5 β -epoxides. While oxidative cleavage of the epoxides

derived from compounds **1a-d**, could be carried out by treatment with Jones reagent, similar treatment of those derived from **1e-f** produced mixtures of the desired ketol and variable amounts of products due to reaction of the side chain. The avoidance of strongly acidic conditions by substitution of Jones oxidant by a solution of CrO₃ in water prevents the reaction of the acid sensitive furostane E-ring and spirostane side chain, affording the desired ketols in high yield and purity. In those conditions, addition of acetone to the CH₂Cl₂ solution resulting from the epoxidation reaction, followed by cooling and treatment with CrO₃ produces the conversion of the epoxides into the corresponding ketol in 77-95 % yields, in a fast and convenient one-pot procedure that does not affect the studied labile side chains (see Scheme 2 and Table 1).



Scheme 2

Experimental Section

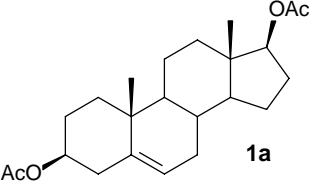
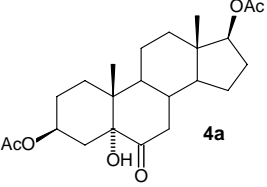
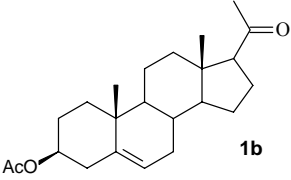
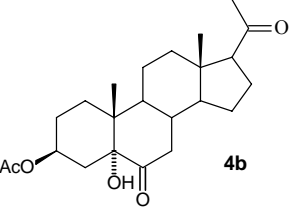
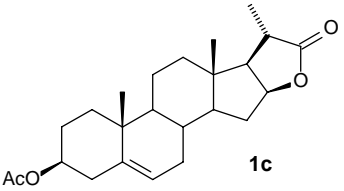
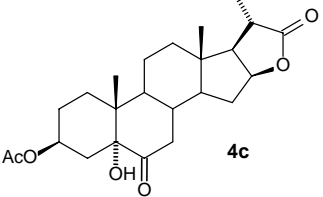
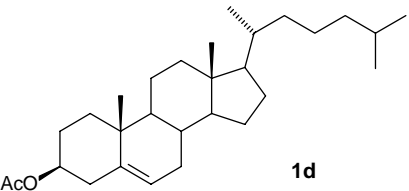
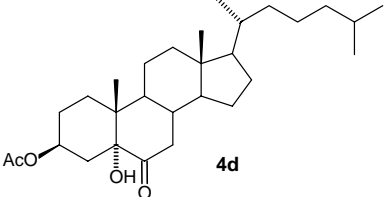
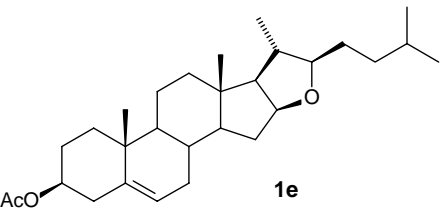
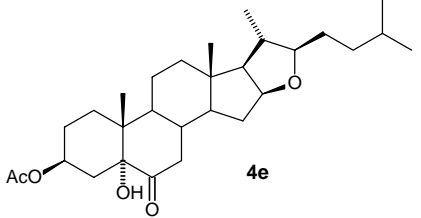
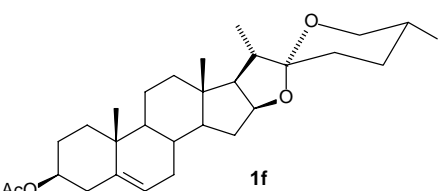
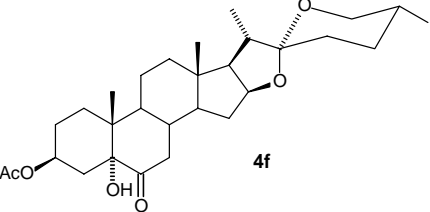
General. Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM® SIL G/UV254 plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vanillin in 50% HClO₄ and heated until color developed. NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions in Varian INOVA 400 and 300 MHz spectrometers using the solvent signal 7.26 ppm for ¹H and 77.00 ppm for ¹³C as reference. NMR signals were assigned with the aid of DEPT and combination of ¹H-¹H COSY and Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC). All 2D NMR spectra were recorded by using the standard pulse sequences and parameters recommended by the manufacturer. Melting points were measured on a Melt-Temp II apparatus and are uncorrected.

General procedure for ketol formation

m-CPBA (0.968 g, 5.61 mmol) was added to a solution of the 3β-acetoxy-Δ⁵-steroid (4 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) and the mixture was stirred until the starting material disappeared (1 to 1.5 h, TLC). Acetone (50 mL) was added and the mixture was cooled to 0°C in an ice bath before addition of a solution of CrO₃ (1.43 g, 14.3 mmol) in water (4.3 mL). The ice bath was removed, the mixture was stirred at room temperature for 20 min. and cooled to 0°C in the ice bath prior to dropwise addition of a solution of CrO₃ (0.71 g, 7.1 mmol) in water (2.2 mL). The ice bath was removed and the mixture stirred for 50 min, before addition of water (50 mL) and extraction with ethyl acetate (2x50 mL). The organic layer was washed with water (9x50 mL), 10% NaHCO₃

solution (5x50 mL), water (2x50 mL) and saturated NaCl solution (1x50 mL), dried and evaporated to afford the desired ketol (see Table 1 for yields).

Table 1. Formation of ketols

Starting material	Product	Yield
<p>1</p>  <p>1a</p>	 <p>4a</p>	91%
<p>2</p>  <p>1b</p>	 <p>4b</p>	90%
<p>3</p>  <p>1c</p>	 <p>4c</p>	77%
<p>4</p>  <p>1d</p>	 <p>4d</p>	96%
<p>5</p>  <p>1e</p>	 <p>4e</p>	92%
<p>6</p>  <p>1f</p>	 <p>4f</p>	87.2%

3 β ,17 β -Diacetoxy-5-hydroxy-5 α -androstan-6-one (4a). M.p. 236-238 °C (dec.), from ethyl acetate. Lit. 236-237.5 °C. 11 1 H NMR (δ ppm): 5.03 (m, 1H, H-3); 4.62 (dd, J = 9.1, 7.8 Hz, 1H, H-17); 2.76 (dd, J = 13.9, 11.4 Hz, 1H, H-7 ax.); 2.03 (s, 3H, CH₃COO-17); 2.00 (s, 3H,

CH₃COO-3); 0.82 (s, 3H, H-19); 0.77 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (δ ppm): 29.50 C-1; 26.20 C-2; 70.73 C-3; 32.21 C-4; 80.06 C-5; 212.16 C-6; 41.12 C-7; 37.02 C-8; 44.17 C-9; 42.47 C-10; 20.82 C-11; 36.50 C-12; 43.12 C-13; 50.64 C-14; 23.22 C-15; 27.37 C-16; 82.37 C-17; 12.01 C-18; 13.84 C-19; 21.09 and 21.32 CH₃COO-3 and CH₃COO-17; 171.12, 171.15 CH₃COO-3 and CH₃COO-17.

3β-Acetoxy-5-hydroxy-5α-pregnan-6,20-dione (4b). M.p. 220-222 °C (dec.), from diethyl ether, Lit. 223-224.5 °C.¹² ¹H NMR (δ ppm): 5.02 (m, 1H, H-3); 2.78 (dd, *J* = 12.6, 12.6 Hz, H-7 ax.); 2.54 (dd, *J* = 8.9, 8.9 Hz, H-17); 2.10 (s, 3H, CH₃COO-3); 0.58 (s, 3H, H-18); 0.79 (s, 3H, H-21); 1.99 (s, 3H, H-21). NMR ¹³C (δ ppm): 29.52 C-1; 26.21 C-2; 70.63 C-3; 32.27 C-4; 80.09 C-5; 211.94 C-6; 41.46 C-7; 37.09 C-8; 44.49 C-9; 42.39 C-10; 21.28 C-11; 38.57 C-12; 44.11 C-13; 56.34 C-14; 24.06 C-15; 22.72 C-16; 63.40 C-17; 13.34 C-18; 13.85 C-19; 209.22 C-20; 31.41 C-21; 21.33 CH₃COO-3; 171.06 CH₃COO-3.

3β-Acetoxy-5,16β-dihydroxy-6-oxo-5α-dinorcholanic acid 22→16 lactone (4c). Identical to our previous report.¹³ M.p. 282.2–280.6 °C from acetone. ¹H NMR (δ ppm): 0.71 (s, 3H, H-18); 0.80 (s, 3H, H-19); 1.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H, H-21); 1.98 (s, 3H, CH₃COO-3); 2.08 (dd, *J* = 4.5 Hz, 12.3 Hz, 1H, H-7 equatorial); 2.21 (m, 1H, H-15); 2.56 (m, 1H, H-20); 2.78 (dd, *J* = 12.3, 12.3 Hz, 1H, H-7 axial); 4.93 (m, 1H, H-16); 5.01 (m, H-3). ¹³C NMR (δ, ppm): 26.2 C-1; 29.5 C-2; 70.6 C-3; 32.2 C-4; 79.9 C-5; 211.4 C-6; 41.5 C-7; 36.4 C-8; 44.2 C-9; 42.4 C-10; 20.6 C-11; 37.9 C-12; 42.2 C-13; 54.3 C-14; 32.7 C-15; 82.3 C-16; 58.8 C-17; 13.7 C-18; 13.9 C-19; 36.0 C-20; 17.9 C-21; 181.0 C-22; 171.1 CH₃COO-3; 21.3 CH₃COO-3.

3β-Acetoxy-5-hydroxy-5α-cholestan-6-one (4d). Mp 230-231 °C, from ethyl acetate. Lit. 230-231 °C.¹⁴ ¹H NMR (δ ppm): 5.05-4.94 (m, 1H, H-3); 2.78 (dd, *J* = 12.6, 12.6 Hz, 1H, H-7 ax.); 2.01 (s, 3H, CH₃COO-3); 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H-21); 0.87 and 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H each, H-26 and H-27); 0.81 (s, 3H, H-19); 0.64 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (δ ppm): 32.03 C-1, 28.17 C-2, 71.52 C-3, 28.17 C-4, 79.82 C-5, 213.77 C-6, 41.80 C-7, 37.52 C-8, 44.25 C-9, 42.61 C-10, 21.46 C-11, 39.57 C-12, 43.22 C-13, 56.38 C-14, 26.41 C-15, 29.64 C-16, 56.24 C-17, 12.08 C-18, 13.91 C-19, 35.84 C-20, 18.70 C-21, 36.21 C-22, 24.03 C-23, 29.68 C-24, 28.09 C-25, 22.87 C-26, 23.96 C-27, 171.82 CH₃COO-3, 22.61 CH₃COO-3.

(22R)-3β-Acetoxy-5-hydroxy-5α-furostan-6-one (4e). Identical to our previous report.¹⁵ M.p. 184–186 °C, from ethyl acetate/hexane. ¹H NMR (δ ppm): 5.15–4.88 (m, 1H, H-3); 4.33–4.23 (m, 1H, H-16); 3.33–3.24 (m, 1H, H-22); 2.75 (dd, *J* = 11.6, 11.6 Hz, 1H, H-7ax.); 1.98 (s, 3H, CH₃COO-3); 0.98 (d, *J* = 6.41 Hz, 3H, H-21); 0.86 (d, *J* = 6.37 Hz, 6H, H-26 and H-27); 0.81 (s, 3H, H-18); 0.76 (s, 3H, H-19). ¹³C NMR (δ ppm): 29.48 C-1; 26.20 C-2; 70.63 C-3; 32.29 C-4; 80.10 C-5; 212.00 C-6; 41.69 C-7; 36.88 C-8; 44.26 C-9; 42.41 C-10; 20.96 C-11; 39.19 C-12; 41.44 C-13; 56.46 C-14; 31.90 C-15; 82.76 C-16; 65.12 C-17; 16.46 C-18; 13.92 C-19; 37.85 C-20; 18.97 C-21; 90.42 C-22; 28.20 C-23; 31.32 C-24; 35.77 C-25; 22.52 C-26; 22.45 C-27; 171.06; CH₃COO-3; 21.33 CH₃COO-3.

(25R)-3β-Acetoxy-5-hydroxy-5α-spirostan-6-one (4f). M.p. 270 °C, from ethyl acetate. Lit. 268-269 °C.¹⁶ ¹H NMR (δ ppm): 5.02 (m, 3H, H-3); 4.41 (m, 1H, H-16); 3.47 (ddd, *J* = 10.8, 4.5, 1.7 Hz, 1H, H-26 eq.); 3.36 (dd, *J* = 10.9, 10.9 Hz, H-26 ax.); 2.77 (dd, *J* = 12, 12.9 Hz, 1H, H-

7); 2.01 (s, 3H, CH₃COO-3); 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21); 0.83 (s, 3H, H-19); 0.79 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-27); 0.76 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (δ ppm): 29.48 C-1; 26.24 C-2; 70.71 C-3; 32.30 C-4; 80.10 C-5; 212.05 C-6; 41.77 C-7; 36.74 C-8; 44.28 C-9; 42.46 C-10; 21.17 C-11; 39.54 C-12; 41.05 C-13; 56.03 C-14; 31.51 C-15; 80.48 C-16; 62.02 C-17; 16.36 C-18; 13.93 C-19; 41.59 C-20; 14.40 C-21; 109.26 C-22; 31.32 C-23; 28.74 C-24; 30.23 C-25; 66.83 C-26; 17.07 C-27; 171.14 CH₃COO-3; 21.32 CH₃COO-3.

Acknowledgements

We thank *Dirección General de Asuntos del Personal Académico* (DGAPA-UNAM) for financial support via project IN-204008 and CONACyT (Mexico) for the scholarship granted to A.R-A. We are indebted to Nuria Esturau-Escofet for registering all NMR spectra.

References and Notes

1. Ramírez, J. A.; Teme-Centurión, O. M.; Gros, E. G.; Galagovsky, L. R. *Steroids* **2000**, *65*, 329.
2. Brosa, C.; Soca, L.; Terricabras E.; Ferrer, J. C.; Alsina, A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12337.
3. Rivera, D. G.; León F.; Coll, F.; Davison G. P. *Steroids* **2006**, *71*, 1.
4. Bratoeff, E.; Cabeza, M.; Pérez-Ornelas, V.; Recillas, S.; Heuze, I. *J. Steroid Biochem.* **2008**, *111*, 275.
5. Perez-Ornelas, V.; Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Heuze I.; Sánchez, M.; Ramírez, E.; Naranjo-Rodriguez, E. *Steroids* **2005**, *70*, 217.
6. Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Ramírez, E.; Heuze, I.; Recillas, S.; Berrios, H.; Cruz, A.; Cabrera, O.; Pérez, V. *Steroids* **2008**, *73*, 838.
7. Salvador, J. A. R.; Moreira, V. M.; Hanson, J. R. Carvalho, R. A. *Steroids* **2006**, *71*, 266.
8. Barton, D. H. R.; Kulkarni, Y. D.; Sammes, P.G.; *J. Chem. Soc. (C)* **1971**, 1149.
9. Rosado-Abon, A.; Romero-Avila, M.; Iglesias-Arteaga M. A. *Arkivoc* **2008**, (xiv), 274.
10. Copies of the ¹H and ¹³C NMR spectra can be found in the supplementary information file. All spectra were processed using MestReC or MestReNova (<http://mestrelab.com>).
11. Knof, L. *Ann Chem* **1961**, *Bd 647*, 53.
12. Rubin, M. B.; Brown, A. P. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2794.
13. Mola-Garate, J. L.; Suárez-García, L.; Pérez-Martinez, C. S.; Iglesias-Arteaga, M. A.; Coll-Herrera, D.; Coll-Manchado, F. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1203.
14. Fieser, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4386.
15. Romero-Avila, M.; de Dios-Bravo, G.; Mendez-Stivalet, J. M.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. *Steroids* **2007**, *72*, 955.
16. Wei-Shan, C.; Ta-Chung, H.; Huang-Minlon *Huaxue Xuebao* **1962**, *28*, 394.



Synthesis and plant growth promoting activity of polyhydroxylated ketones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and cholestane side chain

Anielka Rosado-Abón^a, Guadalupe de Dios-Bravo^b, Rogelio Rodríguez-Sotres^a,
Martín A. Iglesias-Arteaga^{a,*}

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF., Mexico

^bUniversidad Autónoma de la Ciudad de México Plantel San Lorenzo Tezonco Prol. Sn. Isidro 151 Col. Sn. Lorenzo Tezonco CP. 09790 México, DF., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2011

Received in revised form 3 January 2012

Accepted 5 January 2012

Available online 17 January 2012

Keywords:

Brassinosteroid analogs

Bean second internode bioassay

5 α -Hydroxy-6-oxo steroids

Plant growth promoting activity

Cholesterol

ABSTRACT

Three polyhydroxylated ketones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety were obtained from cholesterol. Two of them show plant growth promoting activity in the bean's second internode bioassay. The obtained results indicate that the presence of the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety may be capable to induce plant growth promotion even the absence oxygenated functions in the side chain.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Brassinolide (**1**) and other members of the family of brassinosteroids (Bs) (**2–6**) (Fig. 1) are considered as the sixth class of plant hormones [1–3]. In general, those compounds are characterized by the presence of oxygenated functions in the rings A and B as well as the side chain. The slight structural differences that may be found between the naturally occurring Bs are known to produce moderate to drastic variations in the plant growth stimulating activity. This has led to the establishment of generally accepted structural requirements for a good plant growth stimulating activity [1].

Nevertheless, the fact that a wide variety of synthetic compounds bearing minor, moderate or even drastic structural modifications have shown low to moderate, and in some cases, high plant growth stimulating activity [2–15] suggests that the requirements for a good biological activity are more flexible and variable than those initially established [1]. Several books and reviews have collected and analyzed the profuse available data and account for the former statement [2–5,8] (See for review, [5]).

In particular Brosa and coworkers as well as Galagowsky have described the synthesis of several brassinosteroids analogs (BA) (i.e. **7–9**, Fig. 2) bearing a 5 α -hydroxy-6-oxo moiety that have

shown low to moderate, or even high plant growth stimulating activity [14]. Interestingly our recently reported BA **10**, which bears the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and a furostane side chain also showed moderate biological activity [15] (Fig. 2).

After more than 30 years of brassinosteroids research, two main tasks have become evident:

- The synthesis of naturally occurring brassinosteroids and highly active analogs.* Since this activity is directed to studies on structure–activity, modes of action (interaction substrate–receptor, plant physiology, genetics, etc.) the compounds conceived for this task are expected to bear no – or only minor structural modifications on the known bioactive functions.
- The search for promising candidates for the massive application in agriculture.* In this context and considering that surprises occur, this activity needs a much more open search that should include simple (and even known) compounds with structural modifications that simplify the synthetic procedure and whose plant growth stimulating activity have been not studied. This does not mean a comeback to the trial and error system, but an open search that combines the cumulated experience and some audacity. In addition, the results would feedback task A that may try to explain why some given compounds with drastically modified structures display a significant plant growth stimulating activity.

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56223803.

E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).

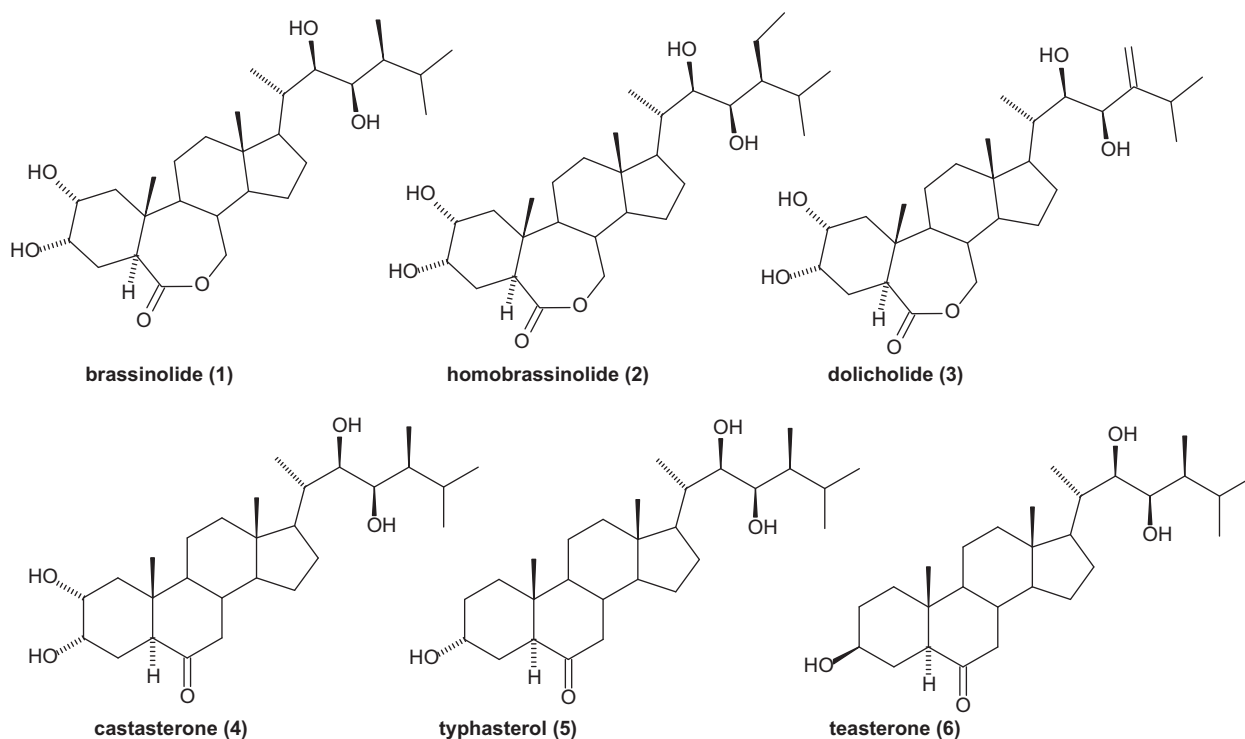


Fig. 1. Some naturally occurring brassinosteroids.

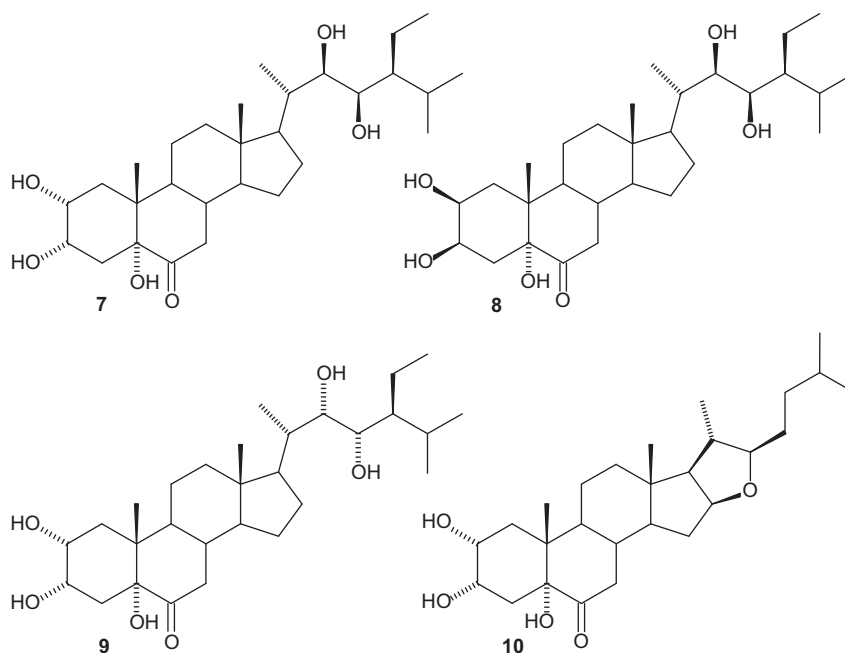


Fig. 2. Some BA bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety.

Since the introduction of the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety starting from 3 β -hydroxy- Δ^5 steroids is much easier than the preparation of the B-homo-7-oxa-6-oxo moiety that characterizes the more active compounds, BA bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety may be, in general, more suitable for large scale preparation. Hence, agricultural applications of moderately bioactive BA bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety may, at the end, prevail over that of the highly active commercially available B-homo-7-oxa-6-oxo analogs

whose prohibitive prices preclude the massive and generalized application of brassinosteroids to agriculture.

Those facts have prompted us to initiate a program for the preparation and evaluation of the plant growth promoting activity of a series of simple compounds with the easy to obtain 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and different side chains, using cheap and readily available steroids as starting materials. Herein we report on an optimized synthesis of three 5 α -hydroxy-6-oxo-steroids derived from

cholesterol and the study of their plant growth stimulating activity in the bean second internode bioassay.

2. Experimental

2.1. General conditions

Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM® SIL G/UV254 plates from MACHEREY–NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vanillin in 50% HClO₄ and heated until color developed. Melting points were measured on a Melt-Temp II equipment and are uncorrected. Mass spectra were registered in a Thermo-Electron spectrometer model DFS (Double Focus Sector). NMR spectra were recorded in CDCl₃ or DMSO-*d*₆ solution in Varian INOVA 400 or 300 MHz spectrometers using the solvent signals as references. NMR signals assignments were made with the aid of DEPT and a combination of 2D homonuclear (¹H–¹H) and heteronuclear (¹H–¹³C) correlation techniques, which included ¹H–¹H COSY, ¹H–¹H Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), and Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC). All 2D NMR spectra were recorded using the standard pulse sequences and parameters recommended by the manufacturer.

2.2. Synthetic procedures

2.2.1. 3β-Acetoxy-5-hydroxy-5α-cholestan-6-one (12)

m-CPBA (0.968 g, 5.61 mmol) was added to a solution of cholesteryl acetate (**11**) (1.7148 g, 4 mmol) in CH₂Cl₂ (20 ml) and the mixture was stirred until the starting material disappeared (1–1.5 h, TLC). Acetone (50 ml) was added and the mixture was cooled to 0 °C in an ice bath before addition of a solution of CrO₃ (1.4286 g, 14.29 mmol) in water (4.3 ml). The ice bath was removed, the mixture was stirred at room temperature for 20 min and cooled to 0 °C in the ice bath prior to drop wise addition of a solution of CrO₃ (0.7143 g, 7.14 mmol) in water (2.15 ml). The ice bath was removed and the mixture stirred for 50 min, before addition of water (50 ml) and extraction with ethyl acetate (2 × 50 ml). The organic layer was washed with water (9 × 50 ml), 10% NaHCO₃ solution (5 × 50 ml), water (2 × 50 ml) and saturated NaCl solution (1 × 50 ml), dried (Na₂SO₄) and evaporated to afford the desired ketol **12** (1.7597 g, 3.82 mmol, 96%). Mp 230–232 °C (from ethyl acetate); Lit. 232–233 °C [16]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ ppm: 5.05–4.94 (m, 1H, H-3), 2.78 (dd, *J* = 12.6, 12.6 Hz, 1H, H-7_{ax}), 2.01 (s, 3H, CH₃COO-3), 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H-21), 0.87 and 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H each, H-26 and H-27), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.64 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (75.5 MHz), δ ppm: 29.6 C-1, 26.4 C-2, 71.5 C-3, 32.0 C-4, 79.8 C-5, 213.8 C-6, 41.8 C-7, 37.5 C-8, 44.3 C-9, 42.6 C-10, 21.5 C-11, 39.7 C-12, 43.2 C-13, 56.4 C-14, 24.0 C-15, 28.2 C-16, 56.2 C-17, 12.1 C-18, 13.9 C-19, 35.8 C-20, 18.7 C-21, 36.2 C-22, 24.0 C-23, 39.6 C-24, 28.1 C-25, 22.6 C-26, 22.9 C-27, 171.8 CH₃COO-3, 21.5 CH₃COO-3. MS (EI, 70 eV): 460 M⁺, 418, 401, 400 (100%), 318.

2.2.2. 3β,5-Dihydroxy-5α-cholestan-6-one (13)

A saturated solution of K₂CO₃ in methanol (100 ml) was added to the solid ketol **12** (2 g, 4.34 mmol) and the mixture was stirred overnight at room temperature. Half the solvent was evaporated, the mixture was poured into ice-water, the produced solid was filtered off, washed with water and dried in the air to afford the dihydroxylated ketone **13** (1.3411 g, 3.21 mmol, 74%). Mp 230–232 °C (from methanol); Lit. 231–232 °C [16]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ ppm: 4.62 (broad, H-4), 3.94–3.90 (m, H-3), 3.12 (broad, H-7_{eq}), 2.78 (dd, *J* = 12.6 Hz, 12.6 Hz, H-7_{ax}), 0.91 (d, *J* = 6.4 Hz, CH₃-21), 0.86 (d, *J* = 6.4 Hz, CH₃-26 and CH₃-27), 0.77 (s, CH₃-19), 0.64 (s, CH₃-18). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ ppm: 29.9 C-1, 28.0 C-2,

66.8 C-3, 35.5 C-4, 80.0 C-5, 214.5 C-6, 41.7 C-7, 37.4 C-8, 44.2 C-9, 42.4 C-10, 21.3 C-11, 39.4 C-12, 43.0 C-13, 56.2 C-14, 23.8 C-15, 29.7 C-16, 56.0 C-17, 11.9 C-18, 13.8 C-19, 35.6 C-20, 18.5 C-21, 36.0 C-22, 23.7 C-23, 39.5 C-24, 27.9 C-25, 22.4 C-26, 22.7 C-27. MS (EI, 70 eV): 420 MH₂⁺, 419 MH⁺, 418 M⁺, 401, 400, 385, 367, 318 (100%), 303.

2.2.3. 5-Hydroxy-5α-cholest-2-en-6-one (14)

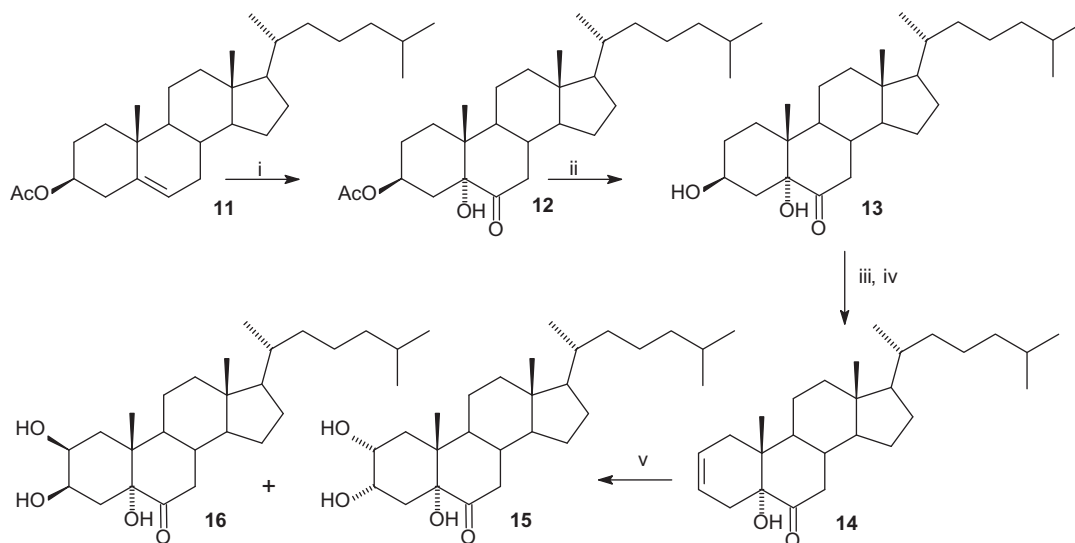
Tosyl chloride (953.2 mg, 5 mmol) was added to a solution of the dihydroxylated ketone **13** (1 g, 2.39 mmol) in dry pyridine (12 ml), the mixture was stirred overnight at room temperature and poured into 3% HCl/ice, the solid product was filtered off, washed with water, dissolved in ethyl acetate, dried (Na₂SO₄) and evaporated. The dried solid was refluxed for 30 min. in dry DMF (25 ml) with LiBr (1.3195 g) and Li₂CO₃ (1.0925 g) and the mixture was allowed to cold to room temperature. Ethyl acetate (70 ml) was added, the mixture was filtered, the solid residue was washed with ethyl acetate (4 × 5 ml) and the organic layer was washed with water (6 × 20 ml), dried (Na₂SO₄) and evaporated. The residue was purified in a chromatographic column (hexane/ethyl acetate 8/1) to afford the unsaturated 5α-hydroxyketone **14** (0.7315 g, 1.83 mmol, 77%). M.p 134–136 °C (from ethyl acetate); Lit. 140–141.5 °C [17]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ ppm: 5.69–5.57 (2H, m, H-2, H-3), 2.68 (1H, dd, *J* = 12.6 Hz, 12.6 Hz, H-7_{ax}), 2.18 (1H, dd, *J* = 4.1 Hz, 12.7 Hz, H-7_{eq}), 0.90 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, CH₃-21), 0.85 (6H, dd, *J* = 1.4 Hz, 6.6 Hz, CH₃-26 and CH₃-27), 0.69 (3H, s, CH₃-19), 0.64 (3H, s, CH₃-18). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ ppm: 28.0 C-1, 122.4 C-2, 125.5 C-3, 34.5 C-4, 78.0 C-5, 211.5 C-6, 42.6 C-7, 37.5 C-8, 45.2 C-9, 42.3 C-10, 21.0 C-11, 39.5 C-12, 42.9 C-13, 56.4 C-14, 23.8 C-15, 30.1 C-16, 56.1 C-17, 11.9 C-18, 14.5 C-19, 35.7 C-20, 18.6 C-21, 36.1 C-22, 23.9 C-23, 39.6 C-24, 28.0 C-25, 22.5 C-26, 22.8 C-27. MS (EI, 70 eV): 402 MH₂⁺, MH⁺, 400 M⁺, 385, 368, 367 (100%), 355.

2.2.4. 2α,3α,5-Trihydroxy-5α-cholestan-6-one (15) and 2β,3β,5-trihydroxy-5α-cholestan-6-one (16)

N-methylmorpholine N-oxide (0.243 g) and a 12.5 mg/ml solution of OsO₄ in *tert*-butyl alcohol (0.39 ml) were added to a solution of the unsaturated ketol **14** (200 mg, 0.5 mmol) in THF (5 ml) and the mixture was stirred overnight under N₂ atmosphere before addition of a solution of Na₂SO₃ (0.4 g) in water (3 ml). The mixture was extracted with ethyl acetate (2 × 50 ml) and the organic layer was washed with brine (5 × 20 ml), dried and evaporated to afford a mixture of the trihydroxylated compounds **15** and **16** that were separated in a chromatographic column using 1/1 of hexane/ethyl acetate as eluent.

2.2.4.1. 2α,3α,5-Trihydroxy-5α-cholestan-6-one (15). Yield (134.4 mg, 0.31 mmol, 62%). M.p 190–192 °C (from ethyl acetate) [18].

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 5.61 (1H, s, OH-5), 5.44 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, OH-3), 4.54 (1H, d, *J* = 5.8 Hz, OH-2), 3.92 (1H, m, H-3), 3.63–3.59 (1H, m, H-2), 2.56 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 12.4 Hz, H-7_{ax}), 1.84 (1H, dd, *J* = 4.1 Hz, 12.4 Hz, H-7_{eq}), 0.89 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, CH₃-21), 0.84 (6H, dd, *J* = 1.9 Hz, 6.6 Hz, CH₃-26 and CH₃-27), 0.67 (3H, s, CH₃-19), 0.61 (3H, s, CH₃-18). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 27.6 C-1, 66.4 C-2, 69.2 C-3, 34.3 C-4, 79.1 C-5, 210.4 C-6, 40.9 C-7, 36.4 C-8, 44.1 C-9, 42.6 C-10, 20.6 C-11, 39.2 C-12, 44.6 C-13, 55.8 C-14, 23.4 C-15, 30.5 C-16, 55.4 C-17, 11.7 C-18, 14.3 C-19, 35.1 C-20, 18.4 C-21, 35.5 C-22, 23.2 C-23, 38.8 C-24, 27.3 C-25, 22.3 C-26, 22.6 C-27. MS (IE, 70 eV): 436 MH₂⁺, 435 MH⁺, 434 M⁺, 416, 398, 383, 367, 355, 331, 318, 317, 285, 247, 243, 231, 211, 189, 175, 161, 149, 137, 135, 109, 95, 81, 69 (100%), 55. HRMS-EI: observed 434.3385; required for C₂₇H₄₆O₄ 434.3391.



i) a MCPBA/ CH_2Cl_2 , b $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}$; ii) $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; iii) TsCl/pyr ; iv) $\text{LiBr}/\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{DMF}$ reflux; v) $\text{OsO}_4/\text{NMMO}/\text{THF}$

Scheme 1. Synthetic procedure.

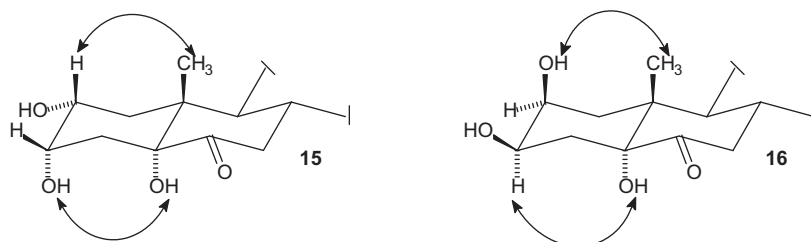


Fig. 3. Selected NOE correlations in triols **15** and **16**.

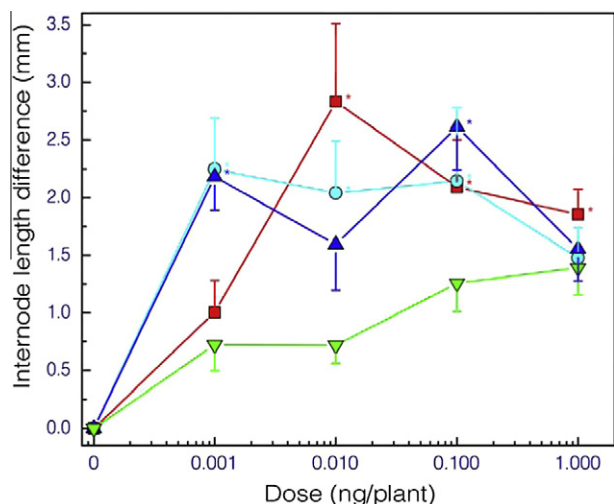


Fig. 4. Biological activity of the studied compounds. Homobrassinolide **2** (■), or compounds **13** (●), **15** (▲), or **16** (▼). The abscissa scale is logarithmic, but zero dosage was arbitrarily placed in the beginning of the graph. Length values are plotted as differences from control plants treated with vehicle (lanolin), therefore at zero dose, the length becomes zero.

2.2.4.2. *2 β ,3 β ,5-Trihydroxy-5 α -cholestan-6-one (16)*. Yield (62.3 mg, 0.14 mmol, 28%). M.p. 262–264 °C (from diethyl ether) [18]. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ ppm: 5.33 (1H, s, OH-5), 4.29 (1H,

d, $J = 6.2$ Hz, OH-3), 4.08 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, OH-2), 3.75 (2H, m, H-2 and H-3), 2.66 (1H, dd, $J = 12.5$ Hz, 12.5 Hz, H-7_{ax}), 1.82 (1H, dd, $J = 5.0$ Hz, 12.7 Hz, H-7_{eq}), 0.88 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -21), 0.87 (3H, s, CH_3 -19), 0.84 (6H, dd, $J = 2.0$ Hz, 6.6 Hz, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.60 (3H, s, CH_3 -18). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ ppm: 27.7 C-1, 68.3 C-2, 67.1 C-3, 36.6 C-4, 79.4 C-5, 212.3 C-6, 41.2 C-7, 36.0 C-8, 44.1 C-9, 42.7 C-10, 21.0 C-11, 39.4 C-12, 41.5 C-13, 55.9 C-14, 23.5 C-15, 30.5 C-16, 55.6 C-17, 11.8 C-18, 15.7 C-19, 35.2 C-20, 18.5 C-21, 35.6 C-22, 23.2 C-23, 38.9 C-24, 27.4 C-25, 22.4 C-26, 22.7 C-27. MS (EI, 70 eV): 436 MH^+ , 435 MH^+ , 434 M^+ , 416, 390, 373, 355, 331, 318, 316, 303, 255, 247, 221, 175, 161, 147, 121, 137, 107, 95, 81, 69, 57 (100%). HRMS (EI, 70 eV): observed 434.3368, required for $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_4$ 434.3391.

2.3. Biological assay

2.3.1. Bean's second internode elongation assay

The details of this test have been described elsewhere [15]. Briefly, bean seed were germinated in sterile wet paper towels. Bean seedling were planted in small pots with agrolite and watered with Hoghland solution for 2 weeks. Compounds were dissolved in a mixture of lanolin and ethanol, and 2 μl of the solution containing the dose indicated was applied to the base of the second internode. After 48 h, the length of the second internode was measured. Groups of 10–15 plants were used for each treatment. The data are from three independent experiments. Data is presented as length differences, i.e. the second internode length was recorded and the median value

of the internode length for control plants was subtracted to all data. For each compound tested, the overall statistical significance of the differences between the treatments (different dosages) was tested using the distribution-independent test of Kruskal–Wallis one way analysis of variance (ANOVA on ranks), individual differences against control were isolated with Dunn's method.

3. Results and discussion

3.1. Chemistry

Cholesteryl acetate (**11**) was converted into the acetylated ketol (**12**) following our recently published one-pot epoxidation-oxidative cleavage procedure [19]. Saponification of **12** afforded the dihydroxylated ketone **13** that on consecutive tosylation and elimination afforded the unsaturated ketol **14**. Dihydroxylation of **14** employing OsO₄ and NMMO as co-oxidant produced a mixture of the 2 α ,3 α and 2 α ,3 β diols **15** and **16** (Scheme 1).

Although an analogous preparation of compounds **15** and **16** has been previously reported by Rodriguez and coworkers in the synthesis of cytotoxic 6E-hydroximino-4-ene steroids [18], we decided to carry out a complete high field NMR characterization and provide unambiguous evidences on the orientation of the diol moiety introduced at positions C-2 and C-3, not provided in the above cited report. In particular, the orientation of the introduced cis-diol moiety can be easily established in NOESY experiments. While in the 2 α ,3 α ,5 α -triol **15** the observed H-2 β ↔H-19 and 3 α -OH↔5 α -OH NOE effects indicate the α -orientation of the 2,3-diol, the 2 β -oH ↔H-19 and H-3 α ↔5 α -oH NOE effects observed in the 2 β ,3 β ,5 α -triol **16** evidence the β -orientation of the diol moiety at positions C-2 and C-3 (Fig. 3).

3.2. Biological activity

A number of recent findings on the Bs signal transduction pathways [20] have paved the way for more direct molecular tests of the Bs effects. However, it has also been shown that these molecular responses are not always proportional to the applied dose [21]. Therefore, until a molecular test is properly validated, the classic physiological assays continue to be more reliable. Hence, the biological activities of compounds **13**, **15** and **16** were determined employing the bean's second internode elongation assay using homobrassinolide (**2**) as active control, and the vehicle (lanolin) as a control lacking activity.

The compounds were tested at concentrations from 1 pg to 1 ng per plant, using the bean second internode assay. From the non-parametric statistical test of the data, homobrassinolide (**2**) and compounds **13** and **15** were found to stimulate plant growth in the employed assay. Compound **16** appeared to give some effect, but the data lacked statistical significance, therefore, we consider this compound as inactive.

Table 1

Bean's second internode elongation differences (mm).

Dose (ng/plant)	2 homobrassinolide	13	15	16
0.001	1.01 ± 0.28	2.25 ± 0.44 (*)	2.18 ± 0.29 (*)	0.72 ± 0.22
0.010	2.83 ± 0.68 (*)	2.04 ± 0.45 (*)	1.60 ± 0.40	0.72 ± 0.15
0.100	2.09 ± 0.41 (*)	2.15 ± 0.64	2.61 ± 0.37 (*)	1.26 ± 0.25
1.000	1.86 ± 0.22 (*)	1.48 ± 0.26	1.56 ± 0.28	1.39 ± 0.24

(*) Statistically significant difference from control in a Kruskal–Wallis ANOVA, followed by the Dunn's test ($p < 0.05$). The length of the control plants internode was subtracted from that of the plants treated with the studied compounds.

Compounds **13** and **15** gave the maximal response (i.e. the highest internode length difference recorded for each compound) nearly as good as the natural phytohormone (**2**), and their effect at the lower dose tested (1 pg/plant) was at least as large as the effect observed with **2** (there was no statistically significant difference between the data for **2**, and the data for the compounds **13** and **15** at this dose). Therefore, we can safely conclude that **13** and **15** were as effective as the natural phytohormone (**2**) in the dosage range tested (Fig. 4 and Table 1).

4. Conclusions

Three brassinosteroid analogs bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and different hydroxylated A-rings were obtained from cholesterol. Compounds **13** and **15** showed interesting properties as plant growth stimulators in the bean's second internode elongation assay. The obtained results indicate that the presence of the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety, even in the absence of oxygenated functions in the side chain, is capable to induce plant growth stimulation. The active compounds **13** and **15** have the advantage that can be easily obtained from the inexpensive and ready available cholesterol acetate (**11**).

Acknowledgements

We thank Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) for financial support via project IN221911 and CONACyT (Mexico) for the scholarship granted to A.R-A. We are also grateful to Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT DF) for the financial support. We are indebted to Professor Vladimir Khripach of the Academy of Sciences of Byelorussia for the kind gift of homobrassinolide. Thanks are due to Nuria Esturau-Escofet for registering all NMR spectra and to Georgina Duarte Lisci and Margarita Guzmán Villanueva (USAI-UNAM) for registering Mass spectra.

References

- [1] Cluter HG, Yokota T, Adam G, editors. Brassinosteroids. Chemistry bioactivity and applications ACS Symp 474. Washington DC: American Chemical Society; 1991.
- [2] Khripach VA, Zhabinskii VN, de Groot AE. Brassinosteroids A New Class of Plant Hormones. Academic Press; 1999.
- [3] Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, editors. Brassinosteroids. Steroidal Plant Hormones. Tokyo: Springer; 1999.
- [4] Hayat S, editor. Brassinosteroids: bioactivity and crop productivity. Kluwer Academic Publishers; 2003.
- [5] Adam G, Marquardt V. Brassinosteroids. Phytochemistry 1986;25:1787–800.
- [6] Iglesias-Arteaga MA, Leliebre Lara V, Pérez-Martínez CS, Coll F. Synthesis of spirobrassinosteroids analogues of 6-desoxocastasterone. Quim Nova 1997;20:361–4.
- [7] Iglesias-Arteaga MA, Pérez Gil R, Leliebre Lara V, Pérez-Martínez CS, Coll F. Synthesis and biological activity of (22r,25r)-5 α -furostan-2 α ,3 α ,26-triol. J Chem Res S 1996;504–5.
- [8] Iglesias-Arteaga MA, Pérez R, Coll F. Natural brassinosteroids and synthetic analogues. Cienc Quím 1996;27:3–12 (Chem. Abstr. 1997, 127, 248270).
- [9] Iglesias-Arteaga MA, Pérez Gil R, Pérez-Martínez CS, Coll F. Spirosteroid analogues of teasterone. synthesis, characterization and biological activity of laxogenin (23s)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin). J Chem Soc Perkin Trans 1 2001;3:261–6.
- [10] Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Martínez CS, Coll F. Spirosteroid analogues of castasterone. Steroids 2002;67:159–63.
- [11] Pérez Gil R, Iglesias-Arteaga MA, Pérez Martínez CS, Coll García D, Coll F. Synthesis of analogues of brassinosteroids with 24-hydroxylated side chain. Eur J Org Chem 1998;11:2405–7.
- [12] Šiša M, Hnilíčková J, Swaczynová J, Kohout L. Syntheses of new androstane brassinosteroids with 17 β -ester group - butyrates, heptafluorobutyrate, and laurates. Steroids 2005;70:755–62.
- [13] Strnad M, Kohout L. A simple brassinolide analogue 2 α ,3 α -dihydroxy-17 β -(3-methyl-butryloxy)-7-oxa-B-homo-5 α -androstan-6-one which induces bean's second internode splitting. Plant Growth Regul 2003;40:39–47.
- [14] Brosa C, Soca L, Terricabras E, Ferrer JC, Alsina A. New synthetic brassinosteroids: a 5 α -hydroxy-6-ketone analog with strong plant growth promoting activity. Tetrahedron 1998;54:12337–48;

- Ramírez JA, Teme-Centurión OM, Gros EG, Galagovsky LR. Steroids 2000;65:329–37.
- [15] Romero-Avila M, de Dios-Bravo G, Mendez-Stivalet JM, Rodríguez-Sotres R, Iglesias-Arteaga MA. Synthesis and biological activity of furostane analogues of brassinosteroids bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety. Steroids 2007;72:955–9.
- [16] Fieser LF, Rajagopalan S. Selective oxidation with N-bromosuccinimide. Cholestane-3 α ,5 α ,6 β -triol. J Am Chem Soc 1949;71:3938–41.
- [17] Hans R, Walker FE, Collins RW. Δ^4 -cholestene-6-one and related compounds. J Org Chem 1951;16:1753–60.
- [18] Deive N, Rodríguez J, Jimenez C. Synthesis of cytotoxic 6E-hydroximino-4-ene steroids: structure/activity studies. J Med Chem 2001;44:2612–8.
- [19] Rosado-Abón A, Romero-Avila M, Iglesias-Arteaga MA. A rapid and simple one-pot procedure for the synthesis of 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids. Arkivoc 2010;X:110–5.
- [20] Kim TW, Wang ZY. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. Ann Rev Plant Biol 2010;61:681–704.
- [21] Symons GM, Reid JB. Brassinosteroids, de-etiolation and the re-emerging art of plant hormone quantification. Plant Signal Behav 2008;3:868–70.



Synthesis and plant growth promoting activity of dinorcholanic lactones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety

Anielka Rosado-Abón^a, Guadalupe de Dios-Bravo^b, Rogelio Rodríguez-Sotres^a, Martín A. Iglesias-Arteaga^{a,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., Mexico

^b Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Plantel San Lorenzo Texonco, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2012

Received in revised form 2 October 2012

Accepted 8 October 2012

Keywords:

Beckmann rearrangement

Dinorcholanic lactones

5 α -Hydroxy-6-oxo-steroids

Synthesis

Plant growth promoting activity

ABSTRACT

The naturally occurring dinorcholanic lactone vespertilin and two other non-natural derivatives bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety were synthesized starting from the readily available steroid sapogenin diosgenin. The obtained compounds showed plant growth promoting activity in the bean's second internode elongation assay.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Brassinosteroids are potent plant growth promoters. In addition to brassinolide (**1**), the most active member, this family of compounds is constituted by more than 70 naturally occurring compounds that are in general characterized by the presence of oxygenated functions in the rings A and B as well as in the side chain (see Fig. 1). The well-known fact that the structural modifications found in the naturally occurring compounds produce moderate to drastic differences in the plant growth stimulating activity, has led to the establishment of generally accepted structural requirements for a good plant growth stimulating activity [1–6].

Although the structural requirements for a good biological activity have been clearly established, a number of brassinosteroids analogues (BA) bearing slight to drastic structural modifications have shown low to moderate and even high plant growth promoting activity [2–18]. In particular, several BA bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety have shown high plant growth promoting activity [16,17]. As a part of our program on the synthesis of bioactive steroids we have reported the synthesis of some BA with furostane or cholestane side chains (i.e., **7** and **8**, Fig. 2) that have shown moderate plant growth promoting activity [18,19].

Our recent studies have shown that even BA bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and a cholestane side chain without oxygenated functions produce plant growth stimulation suggesting that the presence of the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety is capable to induce such effects [19]. This has prompted us to extend our studies to other 5 α -hydroxy-6-oxo-steroids with modified side chains. Herein we report on the synthesis of dinorcholanic lactones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and the evaluation of their plant growth promoting activity in the bean's second internode elongation assay.

2. Experimental

2.1. General conditions

Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM[®] SIL G/UV254 plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1% solution of vanillin in 50% HClO₄ and heated until color developed. Melting points were measured on a Melt-Temp II equipment. Mass spectra were registered in a Thermo-Electron spectrometer model DFS (Double Focus Sector). NMR spectra were recorded in CDCl₃ or DMSO-d₆ solution in a Varian INOVA 400 and 300 spectrometers using the solvent signal as reference. NMR signals assignments were made with the aid of a combination of 2D homonuclear (¹H–¹H) and heteronuclear (¹H–¹³C) correlation techniques, which included ¹H–¹H COSY, ¹H–¹H Nuclear Overhauser effect (NOESY), Heteronuclear Single Quantum Correlation

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223803; fax: +52 55 56223803.

E-mail address: martin.iglesias@unam.mx (M.A. Iglesias-Arteaga).

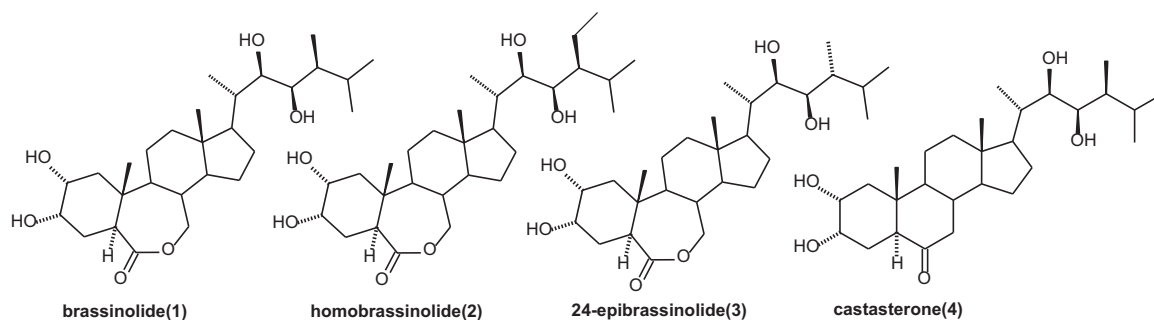


Fig. 1. Some naturally occurring brassinosteroids.

(HSQC). All 2D NMR spectra were recorded using the standard pulse sequences and parameters recommended by the manufacturer and processed employing the NMR processing program MestreNova.

2.1.1. (25R)-3 β -Acetoxy-spirost-5-en-23-one, namely 23-oxodiosgenin acetate (**10**)

NaNO₂ (0.5256 g) was slowly added (45 min) to a solution of diosgenin acetate (3 g, 6.57 mmol) and BF₃·Et₂O (2.69 mL) in acetic acid (75 mL). After conclusion of the addition, the addition of BF₃·Et₂O (2.69 mL) and NaNO₂ (0.5256 g in 45 min) were repeated and the resulting mixture was stirred for 1 h and poured into ice/water. The produced solid was filtered, washed with abundant water, dissolved in ethyl acetate (200 mL) and the organic solution was washed with 5% aqueous solution of Na₂CO₃ (2 × 50 mL), H₂O (1 × 50 mL) NaCl (1 × 50 mL), dried (anh. Na₂SO₄) and evaporated. The resulting syrup was dissolved in the smallest amount of 1/1 benzene/hexane solution left to stand overnight in a chromatographic column packed with Al₂O₃ (Brockman activity III). Elution with 10/1 hexane/ethyl acetate mixture afforded 1.093 (2.32 mmol, 35%) of 23-oxodiosgenin acetate. M.p. 190–192 °C (from ethyl acetate/hexane). Lit. 191–192 °C [20]. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.63–4.56 (m, 2H, H-3 and H-16), 3.77 (dd, *J* = 11.2 Hz, 11.2 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.57 (m, 1H, H-26 eq.), 2.87 (dq, *J* = 6.9, 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.43 (m, 2H, H-24), 2.31 (m, 2H, H-4), 2.27 (m, 1H, H-25), 2.01 (s, 3H, CH₃COO-3), 1.02 (s, 3H, CH₃-19), 0.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-21), 0.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-27), 0.78 (s, 3H, CH₃-18). ¹³C NMR (100 MHz) δ ppm 36.7 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.8 C-5, 122.1 C-6, 32.0 C-7, 31.3 C-8, 49.9 C-9, 36.9 C-10, 20.7 C-11, 39.5 C-12, 40.7 C-13, 56.5 C-14, 31.8 C-15, 83.3 C-16, 61.6 C-17, 16.0 C-18, 19.3 C-19, 34.7 C-20, 14.4 C-21, 109.8 C-22, 201.8 C-23, 45.2 C-24, 35.8 C-25, 65.6 C-26, 17.0 C-27, 170.5 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3.

2.1.2. (25R)-23-Hydroximino-spirost-5-en-3 β -ol acetate (**11**)

Sodium acetate (0.6 g in 5 mL H₂O) and NH₂OH·HCl (0.6 g, 8.63 mmol, in 3 mL H₂O) were added to a solution of the ketone **10** (1.58 g, 3.59 mmol) in ethanol (100 mL) and 1,4-dioxan (5 mL) and the mixture was stirred under reflux for 3 h. Half of the solvent was

evaporated, and the mixture was poured into H₂O/ice. The resulting solid was filtered off, washed with abundant water and dried in the air to afford the oxime **11** (1.586 g, 3.27 mmol, 91%). M.p. 208–210 °C. Lit. 208.5–211 °C [20]. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.38 (s, 1H, C=N–OH), 5.35 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-6), 4.60 (m, 1H, H-3), 4.46 (ddd, *J* = 15.2 Hz, 7.4 Hz, 1H, H-16), 3.60 (dd, *J* = 11.2 Hz, 11.2 Hz, 1H, H-26 ax.), 3.52 (dd, *J* = 11.2 Hz, 3.5 Hz, 1H, H-26 eq.), 3.31 (dd, *J* = 14.0 Hz, 2.5 Hz, 1H, H-24 eq.), 2.80 (dq, *J* = 6.7, 6.7 Hz, 1H, H-20), 2.31 (m, 2H, H-4), 2.02 (s, 3H, CH₃COO-3) 1.02 (s, 3H, CH₃-19), 0.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH₃-27), 0.79 (s, 3H, CH₃-18). ¹³C NMR (100 MHz) δ ppm 36.7 C-1, 28.2 C-2, 73.9 C-3, 38.0 C-4, 139.7 C-5, 122.2 C-6, 32.0 C-7, 31.8 C-8, 49.9 C-9, 36.9 C-10, 20.8 C-11, 39.7 C-12, 40.6 C-13, 56.4 C-14, 31.6 C-15, 81.5 C-16, 61.1 C-17, 16.2 C-18, 19.3 C-19, 35.9 C-20, 14.4 C-21, 108.6 C-22, 154.5 C-23, 27.7 C-24, 31.3 C-25, 65.7 C-26, 17.0 C-27, 170.5 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3.

2.1.3. 3 β -Acetoxy-16 β -hydroxy-dinorchol-5-enic acid 22 → 16 lactone, namely vespertilin acetate (**12**)

BF₃·Et₂O (1.46 mL) was added to a solution of the oxime **11** (1.362 g, 2.81 mmol) in acetic acid (28 mL) and the mixture was stirred at 60 °C for 2.5 h before pouring into water. The resulting solid was filtered off, washed with water and dissolved in ethyl acetate (100 mL) that was washed with H₂O (2 × 25 mL), 5% Na₂CO₃ solution (3 × 25 mL), H₂O (2 × 25 mL) and brine (1 × 25), dried and evaporated to afford the lactone **12** that was purified in a chromatographic column packed with silica gel (30 g) employing hexane/ethyl acetate 85/15 mixture as eluent to afford the pure vespertilin acetate **12** (1.0160 g, 2.6 mmol, 93%). M.p. 210–212 °C (from ethyl acetate/hexane) Lit. 213–214 °C [20]. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.36 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.94 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 4.7 Hz, 1H, H-16), 4.58 (tdd, *J* = 10.4 Hz, 6.3 Hz, 4.2 Hz, 1H, H-3), 2.58 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH₃COO-3) 1.31 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H, CH₃-21), 1.02 (s, 3H, CH₃-19), 0.76 (s, 3H, CH₃-18). ¹³C NMR (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.7 C-3, 38.0 C-4, 139.8 C-5, 121.9 C-6, 31.8 C-7, 31.2 C-8, 50.0 C-9, 36.6 C-10, 20.3 C-11, 38.1 C-12, 41.4 C-13, 54.7 C-14, 33.1 C-15, 82.7 C-16, 58.9 C-17, 13.7 C-18, 19.3 C-19, 36.0 C-20, 18.0 C-21, 181.3 C-22, 170.5 CH₃COO-3, 21.4 CH₃COO-3.

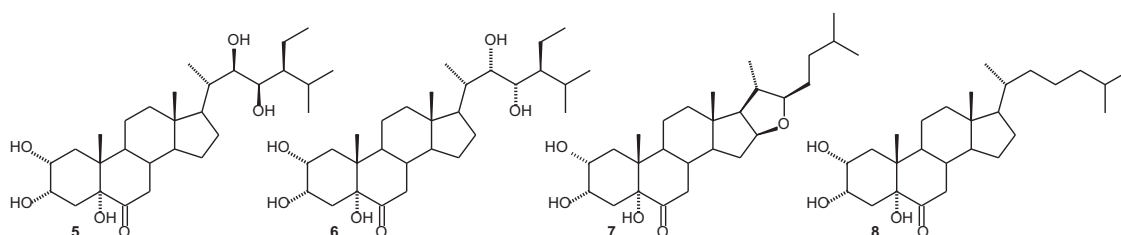


Fig. 2. Synthetic BA bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety.

2.1.4. $3\beta,16\beta$ -Dihydroxy-dinorchol-5-enic acid **22** \rightarrow 16 lactone, namely *vespertilin* (**13**)

A suspension of vespertilin acetate (**12**) (68 mg, 0.18 mmol) was stirred at 45 °C for 40 min in a saturated solution of K_2CO_3 in methanol (2 mL) and poured into water. After drop wise addition of HCl 6N to adjust to pH=1, the mixture was left to stand for 20 min and cooled. The produced solid was filtered off and dissolved in ethyl acetate diethyl ether mixture, dried (anh. Na_2SO_4) and evaporated to vespertilin (**13**) (60 mg, 0.17 mmol, 97%). M.p. 224–226 °C (from ethyl acetate hexane) Lit. 225–226 °C [21]. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 5.33 (m, 1H, H-6), 4.94 (ddd, $J=7.8$ Hz, 4.7 Hz, 1H, H-16), 3.50 (m, 1H, H-3), 2.58 (qd, $J=7.6$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H-20), 1.30 (d, $J=7.6$ Hz, 3H, CH_3 -21), 1.01 (s, 3H, CH_3 -19), 0.75 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (100 MHz) δ ppm 37.2 C-1, 31.5 C-2, 71.6 C-3, 42.1 C-4, 140.9 C-5, 120.9 C-6, 31.8 C-7, 31.2 C-8, 50.1 C-9, 36.5 C-10, 20.3 C-11, 38.2 C-12, 41.4 C-13, 54.8 C-14, 33.1 C-15, 82.7 C-16, 58.9 C-17, 13.7 C-18, 19.4 C-19, 36.0 C-20, 18.0 C-21, 181.4 C-22.

2.1.5. 3β -Acetoxy-5,16 β -dihydroxy-6-oxo-5 α -dinorcholanic acid **22** \rightarrow 16 lactone (**14**)

MCPBA (0.3799 g, 2.2 mmol) was added to a solution of vespertilin acetate (**12**) (0.6052 g, 1.57 mmol) in CH_2Cl_2 (8 mL) and the mixture was stirred until the starting material disappeared (1 h, TLC). Acetone (20 mL) was added and the mixture was cooled to 0 °C in an ice bath before drop wise addition of a solution of CrO_3 (0.2804 g, 2.8 mmol) in water (1 mL). The ice bath is removed, the mixture was stirred at room temperature for 20 min and cooled to 0 °C in the ice bath prior to drop wise addition of a solution of CrO_3 (0.7143 g, 7.14 mmol) in water (2.15 mL). The ice bath was removed and the mixture stirred for 2.5 h, before addition of water (20 mL) and extraction with ethyl acetate (2 \times 25 mL). The organic layer was washed with water (10 \times 20 mL), 10% $NaHCO_4$ solution (5 \times 20 mL), water (2 \times 20 mL) and brine (20 mL), dried (anh. Na_2SO_4) and evaporated to afford the desired ketol (**14**) (0.5543 g, 1.33 mmol, 85%). M.p. 280.6–282.2 °C (from acetone) Lit. 280.6–282.2 °C [22]. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 5.01 (m, 1H, H-3), 4.93 (ddd, $J=7.7$ Hz, 4.5 Hz, 1H, H-16), 2.78 (dd, $J=12.6$ Hz, 12.6 Hz, 1H, H-7 ax.), 2.56 (m, 1H, H-20), 2.21 (m, 1H, H-15), 2.09 (dd, $J=12.6$ Hz, 4.7 Hz, 1H, H-7 eq.), 1.98 (s, 3H, CH_3 COO-3), 1.30 (d, $J=7.6$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.80 (s, 3H, CH_3 -19), 0.71 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (100 MHz) δ ppm 26.2 C-1, 29.5 C-2, 70.6 C-3, 32.2 C-4, 80.0 C-5, 211.4 C-6, 41.5 C-7, 36.4 C-8, 44.2 C-9, 42.4 C-10, 20.6 C-11, 37.9 C-12, 42.2 C-13, 54.3 C-14, 32.7 C-15, 82.3 C-16, 58.8 C-17, 13.7 C-18, 13.9 C-19, 36.0 C-20, 17.9 C-21, 181.0 C-22, 171.1 CH_3 COO-3, 21.3 CH_3 COO-3.

2.1.6. $3\beta,5,16\beta$ -Trihydroxy-6-oxo-5 α -dinorcholanic acid **22** \rightarrow 16 lactone (**15**)

The ketol **14** (0.5324 g, 1.27 mmol) was stirred at 45 °C for 40 min in a saturated solution of K_2CO_3 in methanol (95 mL) and poured into water. After drop wise addition of HCl 6N to adjust to pH=1, the solution was left to stand for 20 min and cooled. The produced solid was filtered off and dissolved in ethyl acetate diethyl ether mixture, dried (anh. Na_2SO_4) and evaporated to afford the dihydroxylated ketone **15** (0.4074 g, 1.08 mmol, 85%). M.p. 300–302 °C from acetone, Lit. 300 °C [22]. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 5.34 (s, 1H, OH-5), 4.96 (m, 1H, H-16), 4.36 (d, $J=5.5$ Hz, 1H, OH-3), 3.69 (m, 1H, H-3), 2.70 (dd, $J=12.4$ Hz, 12.4 Hz, 1H, H-7 ax.), 2.58 (dq, $J=7.4$, 7.4 Hz, 1H, H-20), 1.20 (d, $J=7.5$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.67 (s, 3H, CH_3 -19), 0.62 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (100 MHz) δ ppm 29.6 C-1, 30.4 C-2, 65.2 C-3, 35.7 C-4, 79.0 C-5, 211.9 C-6, 41.3 C-7, 36.0 C-8, 43.9 C-9, 41.9 C-10, 20.3 C-11, 37.2 C-12, 41.7 C-13, 53.7 C-14, 32.2 C-15, 82.0 C-16, 57.7 C-17, 13.3 C-18, 13.6 C-19, 35.3 C-20, 17.5 C-21, 180.6 C-22.

2.1.7. $5,16\beta$ -Dihydroxy-6-oxo-5 α -dinorchol-2-enic acid **22** \rightarrow 16 lactone (**16**)

Tosyl chloride (0.3694 g, 1.91 mmol) was added to a solution of the dihydroxylated ketone **16** (0.3565 g, 0.95 mmol) in pyridine (4 mL), the mixture was stirred overnight, poured in 3% HCl/ice. The resulting solid was filtered off, washed with plenty of water, dissolved in ethyl acetate (35 mL) washed with H_2O (2 \times 20 mL), dried (anh. Na_2SO_4) and evaporated. The obtained solid was refluxed for 40 min in dry DMF (10 mL) with LiBr (0.6219 g) and Li_2CO_3 (0.5149 g) and the mixture was cooled to room temperature. Ethyl acetate (35 mL) was added, the mixture was filtered with suction and the organic layer was washed with H_2O (6 \times 12 mL), dried (Na_2SO_4) and evaporated. The produced solid was purified in a chromatographic column packed with silica gel (15 g) employing hexane/ethyl acetate 1/1 mixture as eluent to afford the unsaturated ketol **16** (0.2647 g, 0.74 mmol, 78%). M.p. 242–244 °C 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$) δ ppm 5.66–5.55 (m, 2H, H-2 and H-3), 4.93 (ddd, $J=7.7$ Hz, 4.5 Hz, 1H, H-16), 2.72 (dd, $J=12.5$ Hz, 12.5 Hz, 1H, H-7 ax.), 2.61 (m, 1H, H-1), 2.55 (dq, $J=7.8$ Hz, 3.8 Hz, 1H, H-20), 1.28 (d, $J=7.6$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.70 (s, 3H, CH_3 -19), 0.68 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (75 MHz) δ ppm 29.7 C-1, 122.3 C-2, 125.1 C-3, 34.3 C-4, 77.5 C-5, 211.0 C-6, 42.3 C-7, 36.4 C-8, 45.0 C-9, 42.0 C-10, 20.2 C-11, 37.8 C-12, 41.9 C-13, 54.3 C-14, 32.6 C-15, 82.4 C-16, 58.7 C-17, 13.6 C-18, 14.4 C-19, 36.0 C-20, 17.8 C-21, 181.3 C-22. MS (EI, 70 eV): 359 $[M+1]^+$, 358 M^+ , 326, 325, 313, 297, 261, 223, 205, 165, 147, 133, 105, 93 (100%), 91, 79, 55. HRMS (EI, 70 eV): observed 358.2125 calculated for $C_{22}H_{30}O_4$ 358.2139.

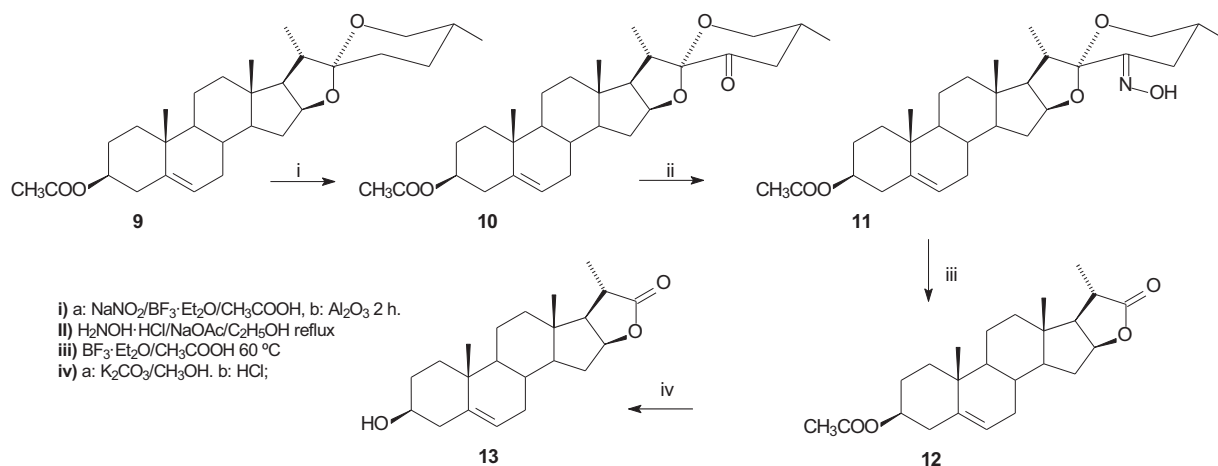
2.1.8. $2\alpha,3\alpha,5,16\beta$ -Tetrahydroxy-6-oxo-5 α -dinorcholanic acid **22** \rightarrow 16 lactone (**17**)

N-methylmorpholine N-oxide (0.4720 g) and 2.84 mL of a 12.5 mg/mL solution of OsO_4 in *tert*-butanol were added to a solution of the unsaturated ketol **16** (211.8 mg, 0.59 mmol) in THF (6.25 mL) and the mixture was stirred for 24 h. A solution of Na_2SO_3 (0.2134 g) in H_2O (0.5 mL) was added, the mixture was stirred overnight, ethyl acetate was added and the organic layer was washed with brine (5 \times 20 mL), dried (anh. Na_2SO_4) and evaporated. The produced solid was purified in a chromatographic column packed with silica gel (10 g) employing CH_2Cl_2 /methanol 95/5 mixture to afford the trihydroxylated ketone **17** (131.4 mg, 0.34 mmol, 58%). M.p. 304–306 °C (from ethyl acetate hexane). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 5.66 (s, 1H, OH-5), 5.47 (d, $J=3.3$, 1H, OH-3), 4.96 (m, 1H, H-16), 4.55 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, OH-2), 3.93 (m, 1H, H-3), 3.65–3.58 (m, 1H, H-2), 2.60 (m, 1H, H-20), 1.20 (d, $J=7.6$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.69 (s, 3H, CH_3 -19), 0.63 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (100 MHz) δ ppm 30.5 C-1, 66.4 C-2, 69.2 C-3, 34.4 C-4, 79.1 C-5, 210.0 C-6, 40.9 C-7, 35.3 C-8, 44.3 C-9, 41.7 C-10, 20.0 C-11, 37.1 C-12, 44.6 C-13, 53.6 C-14, 32.2 C-15, 81.9 C-16, 57.6 C-17, 13.2 C-18, 14.4 C-19, 35.6 C-20, 17.5 C-21, 180.6 C-22. MS (EI, 70 eV): 394 $[M+2]^+$, 393 $[M+1]^+$, 392 M^+ , 374, 348, 331, 313, 289, 276, 275, 261, 247, 221, 205, 175, 173, 159, 174, 133, 119, 107, 93, 91, 79, 69, 67, 55 (100%). HRMS (EI, 70 eV): observed 392.2175 calculated for $C_{22}H_{32}O_6$ 392.2193.

2.2. Biological test

2.2.1. Bean's second internode elongation assay

The details of this test have been described elsewhere [19]. Bean seeds were germinated in sterile wet paper towels, and seedlings were planted in small pots with agrolite. Plants were watered for two weeks with Hoghland solution. Compounds were dissolved in a mixture of lanolin and ethanol (1:1), and an aliquot of 2 μ L containing the indicated dose was applied to the base of the second internode. After 48 h, the length of the second internode (IL) was measured. Groups of 15 plants were used for each treatment, and three independent experiments were performed. The overall



Scheme 1. Synthesis of vestertilin (13).

statistical significance of the differences between the treatments (different dosages) was tested using the distribution-independent test of Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (ANOVA on ranks). When found, the significance of IL differences vs. the control was tested using the Dunn's method [23]. Histograms of the internode length data were found to fit to the skew-normal distribution and estimates of the IL mean and the standard error of the IL mean were obtained using the "SN" package [24] for the R software [25]. From these data, estimates were obtained for the maximal elongation response (IL_{\max}) of the second internode, produced by each compound, and the dose of compound producing 50% of IL_{\max} (SD_{50}). The estimates were obtained by fitting data to Eq. (1).

$$IL = \frac{(IL_{\max} - IL_0) [\text{Compound}]}{SD_{50} + [\text{Compound}]} + IL_0 \quad (1)$$

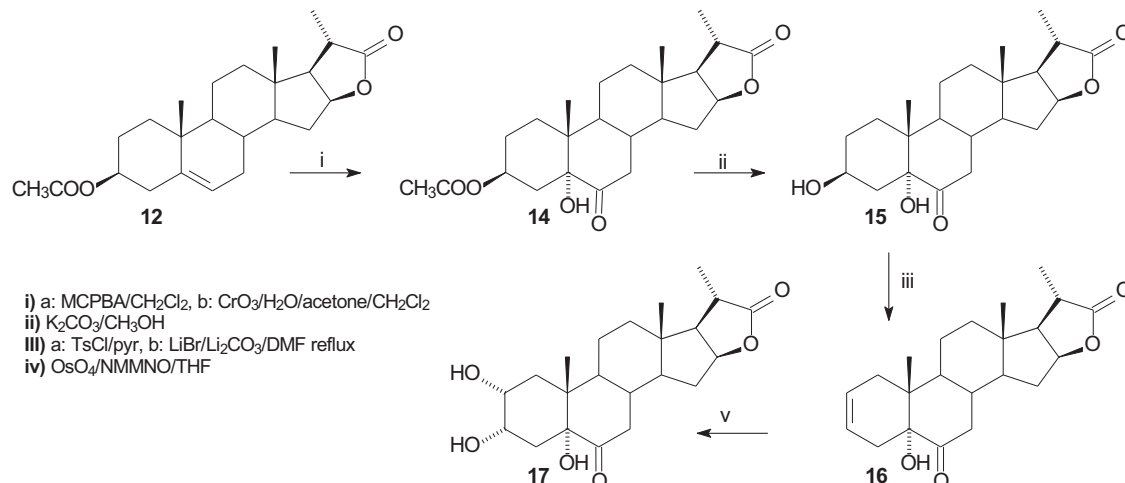
where IL is the observed internode length at each compound concentration, IL_0 is the internode length observed in the control treatment (vehicle only), and IL_{\max} and SD_{50} have the meaning defined above.

3. Results and discussion

Vespertilin (13), a naturally occurring dinorcholanolic lactone, was originally isolated by Suárez and coworkers [26] and later

prepared by Mola-Gárate and coworkers starting from solasodine [21] and following the lengthy protocol described by Sato in the early 1960s [27,28]. Our shorter synthetic protocol to vespertilin acetate (12) started with treatment of diosgenin acetate (9) with $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ and NaNO_2 in acetic acid followed by chromatography in neutral alumina (Brockmann activity III) to afford 23-oxodiosgenin acetate (10). Conversion of the ketone 10 into 23-hydroxiiminodiosgenin acetate (11) was achieved by refluxing with $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ and sodium acetate in ethanol–dioxane mixture. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -induced Beckmann rearrangement of the oxime 11 at 60 °C for 2.5 h afforded vespertilin acetate 12 in 93% yield. Finally saponification of 12 afforded vespertilin (13) (see Scheme 1).

Vespertilin acetate (12) was converted into the ketol 14 by consecutive one-pot treatment with MCPBA and CrO_3 . Saponification 14 employing K_2CO_3 in methanol afforded the dihydroxylated keto-lactone 15 that was treated with tosyl chloride and pyridine followed by reflux with $\text{LiBr}/\text{Li}_2\text{CO}_3$ in DMF to afford the unsaturated keto lactone 16. Treatment of 16 with OsO_4 and N -methylmorpholine N -oxide (NMMNO) in THF afforded the $2\alpha,3\alpha,5\alpha$ -trihydroxylated keto-lactone 17 (see Scheme 2). The α orientation of the 2,3-diol moiety in compound 17 can be easily confirmed by observation of the $\text{H-2} \leftrightarrow \text{H-19}$ and $\text{H-2} \leftrightarrow \text{H-3}$ NOE effects (see Fig. 3).



Scheme 2. Synthesis of vestertilin derivatives 15 and 17.

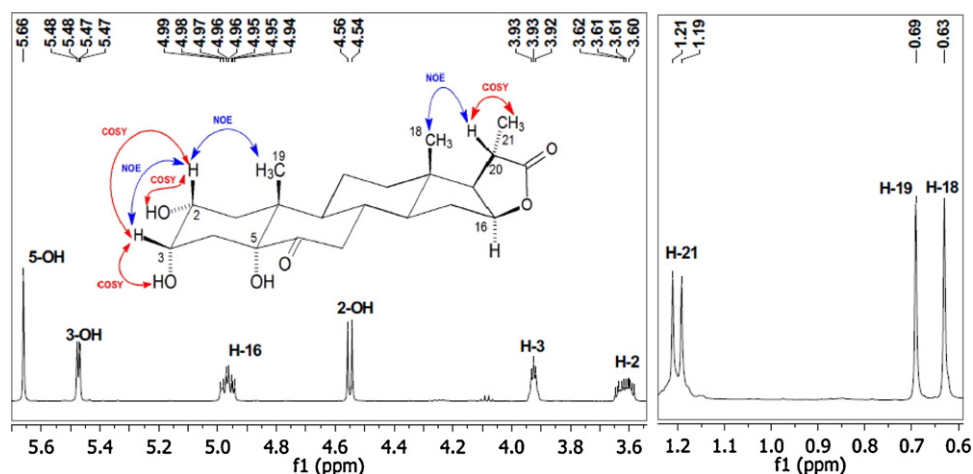


Fig. 3. Selected ^1H NMR signals and NOE correlations in compound **17**.

3.1. Biological activity

The biological activity of the compounds **13**, **15** and **17** was determined with the bean's second internode elongation assay (vide supra), employing homobrassinolide (**2**) as reference. Control plants were treated with vehicle only. The compounds were tested at concentrations from 1 pg to 1 ng per plant, using the bean second internode assay. The IL data did not conform to the normal distribution; therefore, the statistical significance of the differences was assessed using non-parametric statistics. From the statistical tests, homobrassinolide (**2**) and the studied dinorcholanic lactones exhibited growth promotion activity ($p < 0.05$). To compare the relative potency of the lactones with that from homobrassinolide (**2**), an estimation of mean and standard errors employing the skew-normal distribution was performed and the resulting values were plotted against the applied dose of compound (see Fig. 4). These data was then fitted to a classical saturation curve (Eq. (1), see experimental part) to provide a more quantitative description of the observed effects (see Table 1).

Given the complexity of the plant transduction pathways mediating plant responses to phytohormones [29], the estimated parameters are only useful for comparative purposes. From the data in Table 1 **15** and **2** exhibited similar activity, though the corresponding SD_{50} estimates are somehow uncertain because they were below the lowest dose tested. In addition, **13** and **17** were effective at doses one order of magnitude higher, at least, but they

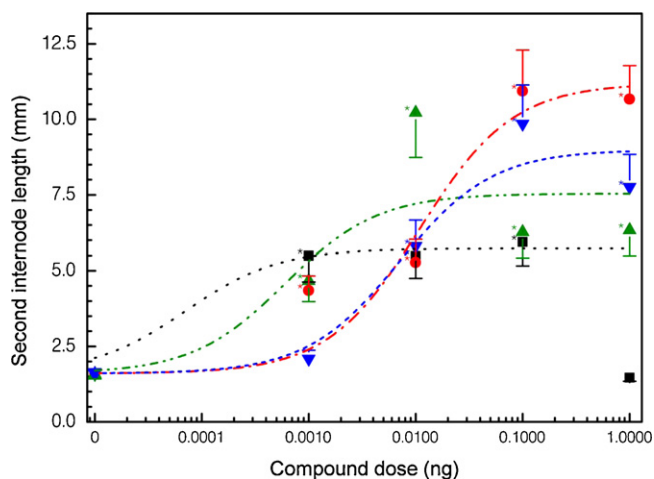


Fig. 4. Plant growth stimulating activity of studied compounds.

Table 1

Estimated maximal elongation response (IL_{\max}) and half-stimulatory dose (SD_{50}) of the observed second internode elongation in bean plants treated with the studied compounds.^a

Compound	IL_{\max} (mm)	SD_{50} (pg)
2	5.7 ± 0.2	$<1^b$
13	11.2 ± 1.1	11.3 ± 6.8
15	7.5 ± 1.3	$<1^b$
17	9.0 ± 0.9	7.0 ± 4.5

^a The estimates were obtained by fitting the data in Fig. 4 to Eq. (1). Values are given as mean \pm the standard error of the mean.

^b Since the estimate was below the smallest dose applied, the exact value is uncertain.

induced a stronger IL_{\max} . According to the second internode bioassay, **13**, **15** and **17** appear as good plant growth promoters and their effects on plants deserve further investigation.

4. Conclusion

The naturally occurring dinorcholanic lactone vespertilin (**13**) and two other non-natural partners (**15** and **17**) bearing the 5α -hydroxy-6-oxo moiety were prepared starting from diosgenin acetate (**9**). All the obtained dinorcholanic lactones produced plant growth promotion in the bean's second internode elongation assay. In particular **15** showed plant growth promoting activity comparable to that of homobrassinolide (**2**). The intriguing fact that vespertilin **13**, which lacks the 5α -hydroxy-6-oxo moiety, also produced plant growth promotion, suggests that the lactone moiety in side chain may be able to produce such effect and opens an interesting subject that should be further investigated.

Acknowledgements

The authors thank to Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) for financial support via project IN221911-3 and CONACyT (México) for the scholarship granted to A.R.-A. Additional financial support from Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT DF) is also acknowledged. We are indebted to Professor Vladimir Khripach of the Academy of Sciences of Byelorussia for the kind gift of homobrassinolide (**2**). Thanks are due to Nuria Esturau-Escofet (USAI-UNAM) for registering NMR spectra and to Georgina Duarte Lisci and Margarita Guzmán Villanueva (USAI-UNAM) for registering Mass spectra. We want to express our gratitude to Dr. Carlos Cobas from Mestrelab[®] for assistance with the MestreNova NMR processing program.

References

- [1] H.G. Cluter, T. Yokota, G. Adam (Eds.), *Brassinosteroids Chemistry, Bioactivity and Applications*. A.C.S. Symp., American Chemical Society, Washington, DC, 1991, p. 474.
- [2] V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, A.E. de Groot, *Brassinosteroids a New Class of Plant Hormones*, Academic Press, San Diego, 1999.
- [3] A. Sakurai, T. Yokota, S.D. Clouse (Eds.), *Brassinosteroids. Steroidal Plant Hormones*, Springer-Verlag, Tokyo, 1999.
- [4] S. Hayat (Ed.), *Brassinosteroids: Bioactivity and Crop Productivity*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2003.
- [5] For review see: G. Adam, V. Marquardt, *Brassinosteroids*, *Phytochemistry* 25 (1986) 1787–1800.
- [6] For review see: M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez, F. Coll, *Natural brassinosteroids and synthetic analogues*, *Revista CENIC. Ciencias Químicas* 27 (1996) 3–12, *Chem. Abstr.* 1997, 127, 248270.
- [7] M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez-Gil, V. Leliebre-Lara, C.S. Pérez-Martínez, F. Coll, *Synthesis and biological activity of (22R,25R)-5 α -furostan-2 α ,3 α ,26-triol*, *Journal of Chemical Research (S)* (1996) 504–505.
- [8] M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez-Gil, V. Leliebre-Lara, C.S. Pérez-Martínez, F. Coll, *Synthesis of (25R)-2 α ,3 α ,26-trihydroxy-5 α -furostan-6-one*, *Synthetic Communications* 28 (1998) 1779–1784.
- [9] M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez-Gil, V. Leliebre-Lara, C.S. Pérez-Martínez, A. Rosado, F. Coll, *Synthesis of (25R)-3 β ,26-dihydroxy-5 α -furostan-6-one*, *Synthetic Communications* 28 (1998) 1381–1386.
- [10] M.A. Iglesias-Arteaga, V. Leliebre-Lara, C.S. Pérez-Martínez, F. Coll, *Synthesis of spirobrassinosteroids analogues of 6-desoxocastasterone*, *Quimica Nova* 20 (1997) 361–364.
- [11] M.A. Iglesias-Arteaga, R. Pérez-Gil, C.S. Pérez-Martínez, F. Coll, *Spirosteranic analogues of teasterone. Synthesis, characterization and biological activity of laxogenin, (23S)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin)*, *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions I* (2001) 261–266.
- [12] M.A. Iglesias-Arteaga, C.S. Pérez-Martínez, F. Coll, *Spirosteranic analogues of castasterone*, *Steroids* 67 (2002) 159–163.
- [13] R. Pérez-Gil, M.A. Iglesias-Arteaga, Pérez-Martínez C.S. Coll-García, D.F. Coll, *Synthesis of analogues of brassinosteroids from chenodeoxycholic acid*, *European Journal of Organic Chemistry* 11 (1998) 2405–2407.
- [14] M. Šiša, J. Hnilčková, J. Swaczynová, L. Kohout, *Syntheses of new androstane brassinosteroids with 17 β -ester group – butyrates, heptafluorobutyrate, and laurates*, *Steroids* 70 (2005) 755–762.
- [15] M. Strnad, L. Kohout, *A simple brassinolide analogue. 2 α ,3 α -dihydroxy-17 β -(3-methyl-butyl-oxo)-7-oxa-B-homo-5 α -androstane-6-one which induces bean second internode splitting*, *Plant Growth Regulation* 40 (2003) 39–47.
- [16] C. Brosa, L. Soca, E. Terricabras, J.C. Ferrer, A. Alsina, *New synthetic brassinosteroids: a 5 α -hydroxy-6-ketone analogue with strong plant growth promoting activity*, *Tetrahedron* 54 (1998) 12337–12348.
- [17] J.A. Ramírez, O.M. Teme-Centurion, E.G. Gros, L.R. Galagovsky, *Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs*, *Steroids* 65 (2000) 329–337.
- [18] M. Romero-Ávila, G. de Dios-Bravo, J.M. Mendez-Stivalet, R. Rodríguez-Sotres, M.A. Iglesias-Arteaga, *Synthesis and biological activity of furosteranic analogues of brassinosteroids bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety*, *Steroids* 72 (2007) 955–959.
- [19] A. Rosado-Abón, G. de Dios-Bravo, R. Rodríguez-Sotres, M.A. Iglesias-Arteaga, *Synthesis and plant growth promoting activity of polyhydroxylated ketones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and cholestanic side chains*, *Steroids* 77 (2012) 461–466.
- [20] M.A. Iglesias-Arteaga, J. Sandoval-Ramirez, M.Y. Mata-Esma, O. Viñas-Bravo, S. Bernés, *Abnormal Beckmann rearrangement in 23-hydroxyiminodiosgenin acetate*, *Tetrahedron Letters* 45 (2004) 4921–4926.
- [21] J.L. Mola-Gárate, G.C. de Magalhães, *Síntese de análogo de brassinosteróide a partir de vespertinina*, *Quimica Nova* 21 (1998) 726–730.
- [22] J.L. Mola-Gárate, L. Suárez-García, C.S. Pérez-Martínez, M.A. Iglesias-Arteaga, D. Coll-Herrera, F. Coll-Manchado, *Synthesis of a new bisnorcholanic lactone*, *Synthetic Communications* 33 (2003) 1203–1209.
- [23] O.J. Dunn, *Multiple comparisons using rank sums*, *Technometrics* 6 (1964) 241–252.
- [24] A. Azzalini, A. Capitanio, *Statistical applications of the multivariate skew-normal distribution*, *Journal of Royal Statistical Society – Series B* 61 (1999) 579–602.
- [25] Development Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009.
- [26] A.G. González, C. García, R. Freire, E. Suárez, *Nuevas fuentes naturales de sapogeninas esteroidales IX. *Solanum vespertilio* Ait.*, *Anales de Quimica* 67 (1971) 433–439.
- [27] Y. Sato, H.G. Latham Jr., E. Mosettig, *Some reactions of solasodine*, *Journal of Organic Chemistry* 22 (1957) 1496–1500.
- [28] Y. Sato, N. Ikekawa, *Chemistry of the spiroaminoketal side chain of solasodine and tomatidine. VI. The Beckmann reaction of oximino derivatives*, *Journal of Organic Chemistry* 26 (1961) 5058–5061.
- [29] A.O. Shpakov, *Chemosignaling systems of plants*, *Tsitologiya* 51 (2009) 721–734.

The Crystal Structure of Diosgenin Acetate and Its 23-Oxygenated Derivatives

Anielka Rosado-Abon · Nuria Esturau-Escofet ·
Marcos Flores-Álamo · Rafael Moreno-Esparza ·
Martín A. Iglesias-Arteaga

Received: 23 August 2012 / Accepted: 25 February 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The crystal structures of diosgenin acetate (**1**), 23-ketodiosgenin acetate (**2**), (23*R*)-23-hydroxydiosgenin 3-monoacetate (**3**) and (23*S*)-23-hydroxydiosgenin 3-monoacetate (**4**) are described. Compounds **1**, **2** and **3** crystallized as a monoclinic system with a space group $P2_1$; while compound **4**, crystallized as orthorhombic systems with space group $P2_12_12_1$. The effects of the side chain modifications on the puckering parameters are presented and discussed.

Keywords Steroids · Spirostane · 23-Oxospirostane · 23-Hydroxyspirostanes X-ray structure · Puckering parameters · Ring conformation

Introduction

Steroid sapogenins are wide spread in the nature. Several members of this family of compounds have served as starting materials for the synthesis of a great variety of bioactive steroids that includes sexual and adrenocortical hormones [1], ecdysteroids [2], brasinosteroids analogues [3–5], and cytotoxic steroids [6–12] amongst many others.

In addition to their usefulness as starting materials, steroid sapogenins have been subject of intensive research due to the fact that several members of the family have showed biological activity [13–18].

As a part of our project in the synthesis of structurally modified steroid sapogenins we have become interested on the synthesis and detailed characterization of several members of this family of compounds bearing unnatural substitution patterns the steroid framework [19–21] or the side chain, [22, 23] that are serving as starting materials for the synthesis of potentially bioactive steroids. Herein we report on the crystal structure of diosgenin acetate, 23-oxodiosgenin acetate and both, the 23*S* and 23*R* epimers of 23-hydroxydiosgenin 3-monoacetate.

Experimental

Reactions were monitored by TLC on ALUGRAM[®] SIL G/UV254 plates from MACHEREY-NAGEL. Chromatographic plates were sprayed with a 1 % solution of vanillin in 50 % HClO_4 and heated until color developed. Melting points were measured on a Melt-Temp II equipment and are uncorrected. Mass spectra were registered in a Thermo-Electron spectrometer model DFS (Double Focus Sector). NMR spectra were recorded in CDCl_3 solution in a Varian INOVA 400 spectrometer using the solvent signal 7.26 ppm for ^1H and 77.00 ppm for ^{13}C as references.

(25*R*)-Spiros-5-en-3 β -ol Acetate Namely Diosgenin Acetate (**1b**)

Diosgenin (1a) (3 g, 7.24 mmol) was refluxed for 3 h in acetic anhydride (15 ml) and the mixture is allowed to reach room temperature before pouring into ice water (200 ml). The resulting mixture is stirred overnight, the produced solid was filtered off, washed with abundant water and dried in the air. Recrystallization from acetone/water afforded 2.5 g (5.48 mmol, 76 %) of diosgenin

A. Rosado-Abon · N. Esturau-Escofet · M. Flores-Álamo ·
R. Moreno-Esparza (✉) · M. A. Iglesias-Arteaga (✉)
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de
México, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico, DF, Mexico
e-mail: moresp@servidor.unam.mx

M. A. Iglesias-Arteaga
e-mail: martin.iglesias@unam.mx

acetate (**1b**). mp 195 °C (*from acetone/water*) Lit. [24] 195–196 °C. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.36 (d, J 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.58 (m, 1H, H-16, H-3), 4.40 (m, 1H, H-16, H-16), 3.46 (ddd J 10.9, 4.3, 1.3, H-26_{eq}), 3.36 (dd J 10.9, 10.9 H-26_{ax}), 2.01 (s, 3H, CH_3 -COO-3), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19), 0.96 (d, J 6.3, 3H, CH_3 -21), 0.78 (s, 3H, CH_3 -18), 0.78 (d J 6.1 CH_3 -27). **RMN** ^{13}C (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.6 C-5, 122.3 C-6, 32.0 C-7, 31.4 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.8 C-11, 39.5 C-12, 40.2 C-13, 56.4 C-14, 31.8 C-15, 80.8 C-16, 62.2 C-17, 16.3 C-18, 19.3 C-19, 41.6 C-20, 14.5 C-21, 109.2 C-22, 31.4 C-23, 28.8 C-24, 30.3 C-25, 66.8 C-26, 17.1 C-27, 170.4 CH_3 -COO-3, 21.4 CH_3 -COO-3.

(25R)-3 β -Acetoxyspiros-5-en-23-one (2)

NaNO_2 (0.5256 g) was slowly added (45 min) to a solution of diosgenin acetate (**1b**) (3 g, 6.57 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.69 ml) in acetic acid (75 ml). After conclusion of the addition, the addition of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.69 ml) and NaNO_2 (0.5256 g in 45 min.) were repeated and the resulting mixture was stirred for 1 h and poured into ice/water. The produces solid was filtered, washed with abundant water, dissolved in ethyl acetate (200 ml) and the organic solution washed with 5 % aqueous solution of Na_2CO_3 (2 \times 50 ml), H_2O (1 \times 50 ml), NaCl (1 \times 50 ml), dried (anh. Na_2SO_4) and evaporated. The resulting syrup was dissolved in the smallest amount of 1/1 benzene/hexane solution left to stand overnight in a chromatographic column packed with Al_2O_3 (Brockman activity III). Elution with 10/1 hexane/ethyl acetate mixture afforded 1.093 (2.32 mmol, 35 %) of 23-oxodiosgenin acetate (**2**). mp 190–192 °C (*from ethyl acetate/hexane*). Lit. [25] 191–192.5 °C **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.35 (d, J 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.64–4.54 (m, 2H, H-16, H-3), 3.78 (t, J 11.3 Hz, 1H, H-26_{ax}), 3.58 (ddd, J 11.2, 4.6, 1.4 Hz, 1H, H-26_{ec}), 2.87 (dd, J 13.7, 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.49–2.38 (m, 2H, H-24), 2.36–2.21 (m, 3H, H-4, H-25), 2.02 (s, 3H, CH_3 -COO-3), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19), 0.93 (d, J 7.1 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.93 (d, J 6.5 Hz, 3H, CH_3 -27), 0.78 (s, 3H, CH_3 -18). **RMN** ^{13}C (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.8 C-5, 122.2 C-6, 32.0 C-7, 31.4 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.5 C-12, 40.7 C-13, 56.5 C-14, 31.8 C-15, 83.3 C-16, 61.7 C-17, 16.0 C-18, 19.3 C-19, 34.8 C-20, 14.4 C-21, 109.8 C-22, 201.8 C-23, 45.3 C-24, 35.8 C-25, 65.6 C-26, 17.1 C-27, 170.5 CH_3 -COO-3, 21.4 CH_3 -COO-3. * interchangeable.

(23R,25R)-Spirost-5-en-3 β ,23-Diol 3-Monoacetate (3)
and (23S,25R)-Spirost-5-en-3 β ,23-Diol 3-Monoacetate (4)

NaBH_4 (180 mg) was slowly added to a cold (10 °C) solution of 23-oxodiosgenin acetate (561.7 mg, 1.2 mmol) in methanol (21 ml) and the mixture was stirred for 3 h. An

additional amount of NaBH_4 (18 mg) was added and the solution stirred for 1 additional hour before addition of acetone (2 ml). The solvents were evaporated and the solid residue was dissolved in ethyl acetate (50 ml) and washed with H_2O (4 \times 15 ml), saturated aqueous NaCl (3 \times 15 ml) solution, dried (anh. Na_2SO_4) and evaporated to afford the mixture of the epimeric 23R and 23S-hydroxy-diosgenin acetates that were separated in a chromatographic column employing 8:1 hexane/ethyl acetate mixture to afford the pure 23-hydroxyspirostanes.

(23R,25R)-Spirost-5-en-3 β ,23-Diol 3 Monoacetate (3)

Yield 27.2 mg (0.058 mmol, 5 %) of the 23R epimer (**3**) mp 240–242 °C (*from acetone/H₂O*) **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.37 (d, J 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.60 (tdd, J 10.3, 6.1, 4.2 Hz, 1H, H-3), 4.47 (td, J 7.8, 5.7 Hz, 1H, H-16), 3.60 (m, 1H, H-23), 3.50 (ddd, J 10.8, 5.1, 1.4 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.43 (dd, J 11.2 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.31 (dd, J 9.0, 3.7 Hz, 2H, H-4), 2.25 (td, J 12.7, 6.9 Hz, 1H, H-20), 2.03 (s, 3H, CH_3 -COO-3), 1.11 (d, J 7.0 Hz, 3H, CH_3 -21), 1.03 (s, 3H, CH_3 -19), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.80 (d, J 6.7 Hz, 3H, H-27). **^{13}C NMR** (100 MHz) δ ppm 37.0 C-1, 27.7 C-2, 73.9 C-3, 38.1 C-4, 139.7 C-5, 122.3 C-6, 32.1 C-7, 31.5 C-8, 50.0 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.4 C-12, 40.7 C-13, 56.5 C-14, 32.0 C-15, 81.3 C-16, 64.0 C-17, 16.8 C-18, 19.3 C-19, 40.6 C-20, 16.1 C-21, 108.4 C-22, 70.8 C-23, 36.3 C-24, 24.2 C-25, 66.3 C-26, 16.8 C-27, 170.5 CH_3 -COO-3, 21.4 CH_3 -COO-3. **HRMS (EI, 70 eV)**: observed 472.3183, required for $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_5$ 472.3183.

(23S,25R)-Spirost-5-en-3 β ,23-Diol 3 Monoacetate (4)

Yield 0.4517 g, (0.96 mmol, 80 %) mp 166–168 °C (*from methanol*) **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.36 (d, J 5.2 Hz, 1H, H-6), 4.59 (tdd, J 10.4, 6.2, 4.2 Hz, 1H, H-3), 4.46 (dt, J 8.9, 7.2 Hz, 1H, H-16), 3.50–3.42 (m, 1H, H-23), 3.40 (ddd, J 10.8, 4.7, 2.0 Hz, 1H, H-26_{ec}), 3.24 (dd, J 11.1, 11.1 Hz, 1H, H-26_{ax}), 2.58–2.49 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH_3 -COO-3), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19), 0.94 (d, J 7.0 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.82 (s, 1H, H-18), 0.81 (d, J 6.7 Hz, 3H, H-27). **^{13}C NMR** (100 MHz) δ ppm 36.9 C-1, 27.7 C-2, 73.8 C-3, 38.1 C-4, 139.7 C-5, 122.2 C-6, 32.0 C-7, 31.2 C-8, 49.9 C-9, 36.7 C-10, 20.7 C-11, 39.8 C-12, 40.7 C-13, 56.3 C-14, 31.8 C-15, 81.5 C-16, 61.5 C-17, 16.4 C-18, 19.3 C-19, 35.5 C-20, 14.1 C-21, 110.6 C-22, 67.0 C-23, 38.5 C-24, 30.8 C-25, 65.9 C-26, 16.6 C-27, 170.5 CH_3 -COO-3, 21.4 CH_3 -COO-3. **Elemental analysis**: observed C 73.54 % H 9.30 %, required for $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_5$ C 73.69 % H 9.38 %.

Crystallography

X-ray diffraction measurements were performed at 100 K on an Oxford Diffraction Atlas (Gemini) diffractometer

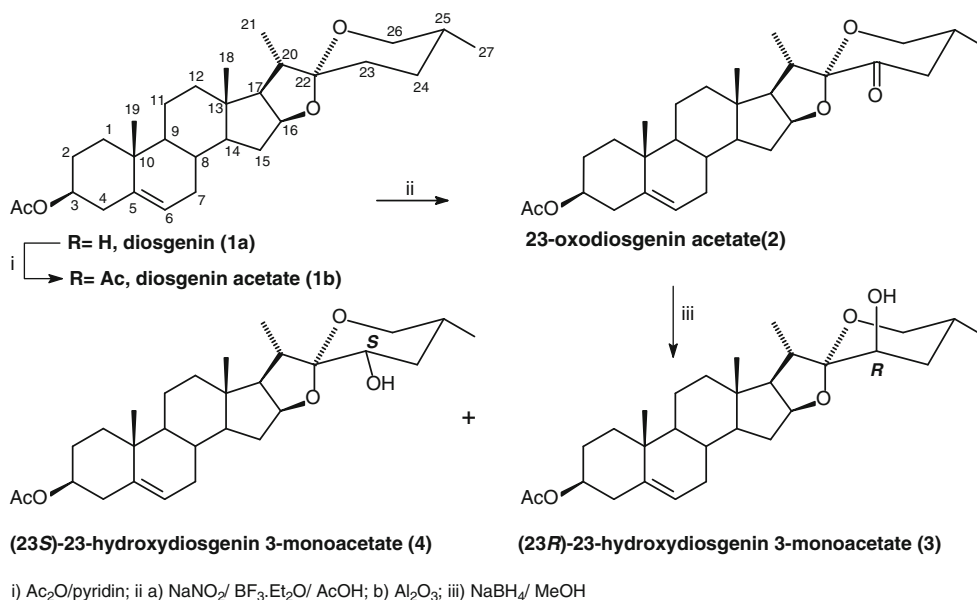
with Mo K α radiation $\lambda = 0.71073$ Å. Data collection routine and data reduction were carried out with the Cry-sAlisPro, Oxford Diffraction Ltd. Oxford Diffraction [26]. The structures of all molecules were solved using SIR2004 [27] and refined using SHELXL-97 [28]. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically and the hydrogen atoms were found in difference Fourier maps, placed at geometrically calculated positions and refined using the riding model. The obtained bond lengths and angles of each compound are normal and are available from the electronic supporting information (CIF file) for the structure. Crystallographic data have been deposited with the Cambridge

Crystallographic Data Center as supplementary material numbers CCDC 897411 (1), CCDC 897414 (2), CCDC 897413 (3) and CCDC 897412 (4). Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK. E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Suitable crystals for X-ray diffraction studies were obtained by slow evaporation at room temperature as follows: (25*R*)-spirost-5-en-3 β -ol acetate (1) from acetone; (25*R*)-3 β -acetoxyspirost-5-en-23-one (2) from 10:1 hexane/ethyl acetate mixture; (23*R*,25*R*)-spirost-5-en-3 β , 23-diol 3-monoacetate (3) and (23*R*,25*R*)-spirost-5-en-

Table 1 Crystal data and structure refinement for 1, 2, 3 and 4

	(1)	(2)	(3)	(4)
Formula	C ₂₉ H ₄₄ O ₄	C ₂₉ H ₄₂ O ₅	C ₂₉ H ₄₄ O ₅	C ₂₉ H ₄₄ O ₅
Fw	456.64	470.63	472.64	472.64
T (K)	100(2)	100(2)	100(2)	100(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Orthorhombic
Space group	P 21	P 21	P 21	P 21 21 21
a (Å)	14.4400(2)	14.3562(2)	a = 14.4364(3)	a = 8.3914(1)
b (Å)	6.1615(1)	6.2641(1)	b = 6.1202(1)	b = 9.3208(1)
c (Å)	14.6847(2)	14.5501(2)	c = 14.6243(3)	c = 32.9697(4)
β (°)	100.846(1)	99.677(2)	99.521(2)	
V (Å ³)	1,283.20(3)	1,289.85(3)	1,274.31(4)	2,578.71(5)
Z	2	2	2	4
ρ calcd (Mg/m ³)	1.182	1.212	1.232	1.217
μ (mm ⁻¹)	0.077	0.081	0.082	0.081
F(000)	500	512	516	1032
Crystal size (mm ³)	0.41 × 0.17 × 0.11	0.56 × 0.19 × 0.03	0.43 × 0.36 × 0.16	0.54 × 0.53 × 0.36
Theta range for data collection (°)	3.40 to 26.06	3.39 to 26.10	3.39 to 26.11	3.46 to 26.15
Index ranges	-17 ≤ h ≤ 17, -7 ≤ k ≤ 7, -18 ≤ l ≤ 18	-17 ≤ h ≤ 17, -7 ≤ k ≤ 7, -17 ≤ l ≤ 18	-17 ≤ h ≤ 17, -7 ≤ k ≤ 7, -17 ≤ l ≤ 18	-10 ≤ h ≤ 10, -11 ≤ k ≤ 11, -40 ≤ l ≤ 40
Reflections collected	37,549	38,588	19,161	72,348
Independent reflections	5,067 [R(int) = 0.0256]	2,805 [R(int) = 0.0414]	2,776 [R(int) = 0.0220]	2,946 [R(int) = 0.0352]
Completeness to theta = 26.06°	99.7 %	99.6 %	99.4 %	99.2 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	5,067/1/303	2,805/1/312	2,776/1/312	2,946/0/310
Goodness-of-fit on F ²	1.061	1.041	1.029	1.093
Final R indices [I > 2 σ (I)]	R1 = 0.0301, wR2 = 0.0806	R1 = 0.0323, wR2 = 0.0848	R1 = 0.0334, wR2 = 0.0901	R1 = 0.0364, wR2 = 0.0939
R indices (all data)	R1 = 0.0310, wR2 = 0.0810	R1 = 0.0336, wR2 = 0.0856	R1 = 0.0345, wR2 = 0.0909	R1 = 0.0366, wR2 = 0.0941
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.343 and -0.163	0.496 and -0.238	0.469 and -0.241	0.303 and -0.307



Scheme 1 Synthesis of 23-oxygenated derivatives of diosgenin acetate

3 β ,23-diol 3-monoacetate (4) from 8:1 hexane/ethyl acetate mixture. Compounds 1, 2 and 3 crystallized as a monoclinic system with a space group $\text{P}2_1$; while compound 4,

crystallized as orthorhombic systems with space group $\text{P}2_12_12_1$. Table 1 summarizes all the crystallographic data of the four structures.

Fig. 1 Crystal structure and unit cell of diosgenin acetate (1)

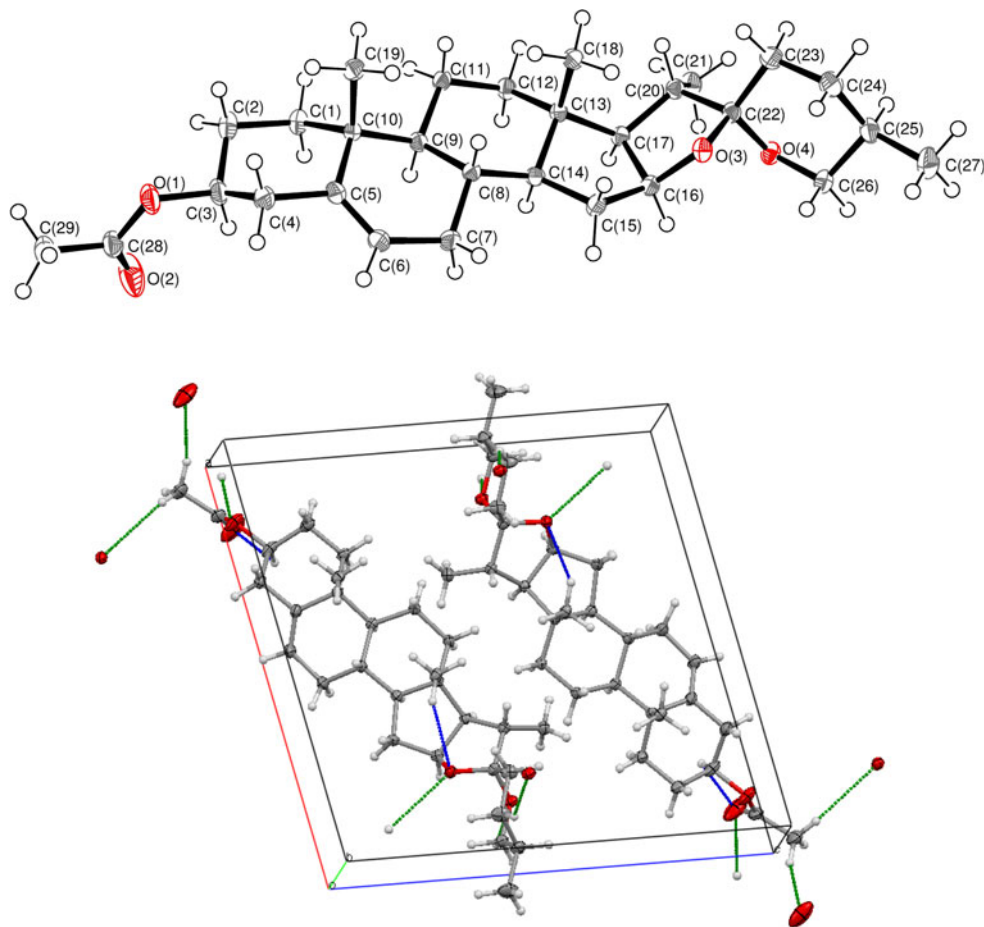
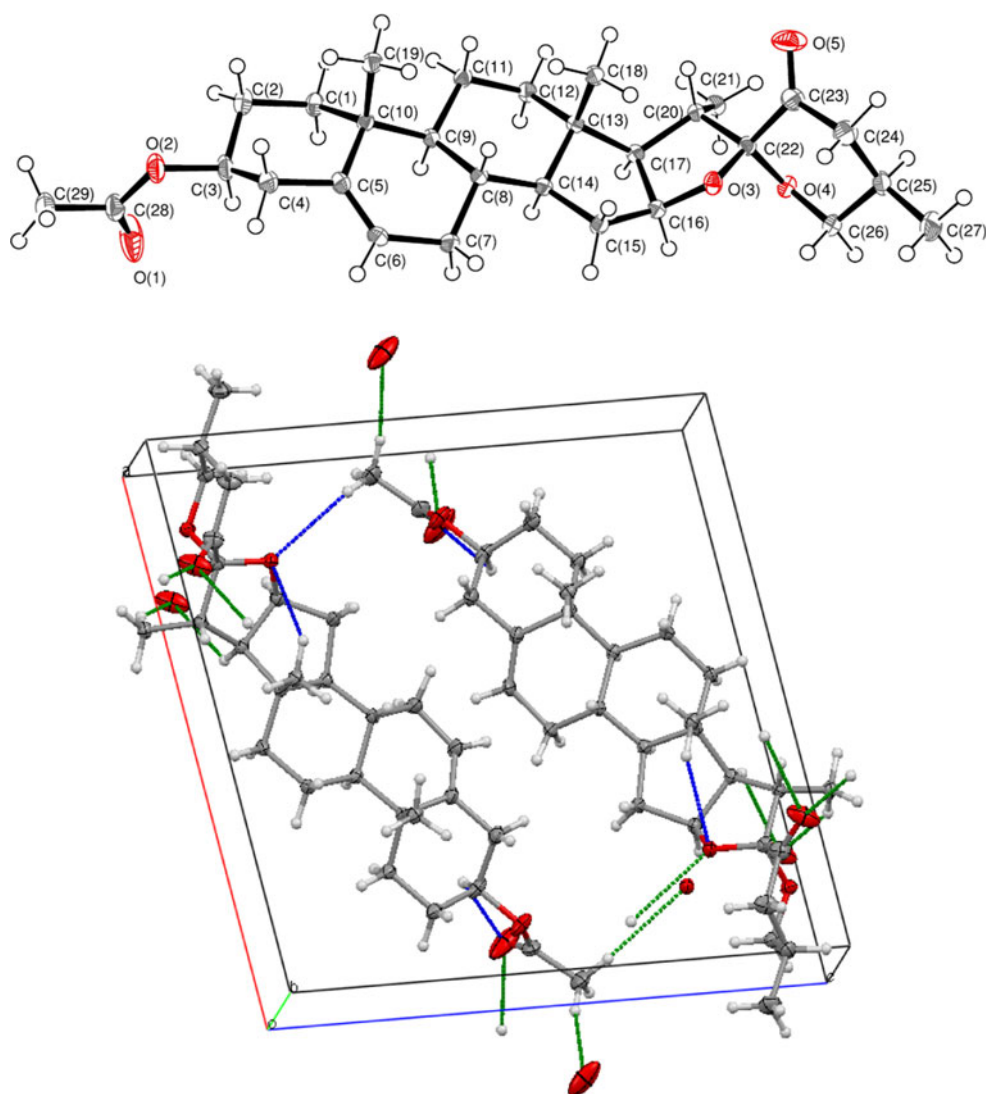


Fig. 2 Crystal structure and unit cell of 23-oxodiosgenin acetate (**2**)



Results and Discussion

Synthesis and NMR Characterization

Acetylation of diosgenin following the standard Ac_2O /pyridine procedure

Treatment of diosgenin acetate (**1b**) with $NaNO_2$ and $BF_3 \cdot Et_2O$ in acetic acid followed by hydrolysis in alumina afforded 23-oxodiosgenin acetate (**2**) which was reduced with $NaBH_4$ in methanol to afford a mixture of the 23*R*- and 23*S*-hydroxydiosgenin 3-monoacetates **3** and **4** (Scheme 1).

The observed 1H and ^{13}C NMR signals are in agreement with our previously described data from compounds with similar functionality in the F-ring [29]. In particular the presence of the carbonyl function at C-23 in compound **2** can be corroborated by the new functional signal at 201.8 ppm. The 23-hydroxyspirostanes **3** and **4** are characterized by the

signals of the carbynolic C-23 at 70.8 and 67.0 ppm respectively. Overlapping of the H-23 signals of the 23 hydroxy derivative hinder the determination of the configuration at C-23 by observation of the splitting pattern. Nevertheless observation of the shielding effect of the hydroxyl attached to C-23 allowed the determination of its axial or equatorial orientation and consequently the corresponding configuration at C-23. In the alcohol **3** the observed upfield shift of the signal of C-25 respect to that of diosgenin acetate (**1**) suggests a 1,3 diaxial interaction between the hydroxyl at C-23 and H-25, indicating the *R*-configuration at C-23. In the case of the alcohol **4** the upfield shift of the signal of C-20 respect to that of diosgenin acetate can be attributed to a δ -syn interaction between the hydroxyl group attached to C-23 and H-20, that indicates its equatorial orientation and consequently the *S* configuration at C-23. Crystallographic studies corroborated the assigned configuration for both alcohols **3** and **4**.

Crystallographic Studies

Each one of the studied compounds crystallizes as an isolated molecule, all studied compounds contain the steroid ABCD fused ring framework with axial methyl groups attached to C(10) and C(13). The A/B, B/C and C/D ring junctions are *trans*, whereas the cyclopentane ring D is *cis*-fused to the tetrahydrofuran ring E, which is in agreement with other steroids as indicated by the torsion angles shown in the CIF file. Then, these five fused rings A [C(1)–C(5)/C(10)], B[C(5)–C(10)], C[C(8)/C(9)/C(11)–C(14)], D, E [O(3)/C(16)/C(17)/C(20)/C(22)] are attached to F [O(4)/C(22)–C(26)] at C(22) which is shared by both rings D and E. The six-membered rings A, C and F present chair conformations, while B presents a half chair conformation due to the presence of the sp^2 bond C(5)–C(6) for all the studied compounds, however, in the case of the five-membered rings, ring D adopts a twisted on C(13)–C(14)

conformation in compounds **1**, **2** and **3**, while in compound **4** assumes an envelope on C(14) conformation. Finally in compounds **1**, **2** and **3**, the E ring adopts an envelope on O(3) *exo* conformation but in compound **4** changes to an envelope on C(22) *endo*.

In compounds **1**, **2** and **3**, the equatorial acetoxy group bonded to C(3) is arranged in such a way that the carbonyl O atom is close to eclipse the axial H atom attached to C(3) and does not disturb Ring A, this arrangement can be explained in terms of the intramolecular bond O(2)⋯H–C(3): 2.247(2) Å for **1**, 2.256(2) Å for **2** and 2.245(2) Å for **3**. In the case of **4**, the carbonyl O atom does not eclipse the axial H atom due to intermolecular interactions with other molecules.

In the absence of significant anomalous scattering effects, the absolute structure was assigned based on the crystal structure of the starting material (**1**), of which C(25) has a R-configuration with an equatorially group C(27). In

Fig. 3 Crystal structure and unit cell of (23*R*)-23-hydroxydiosgenin 3-monoacetate (**3**)

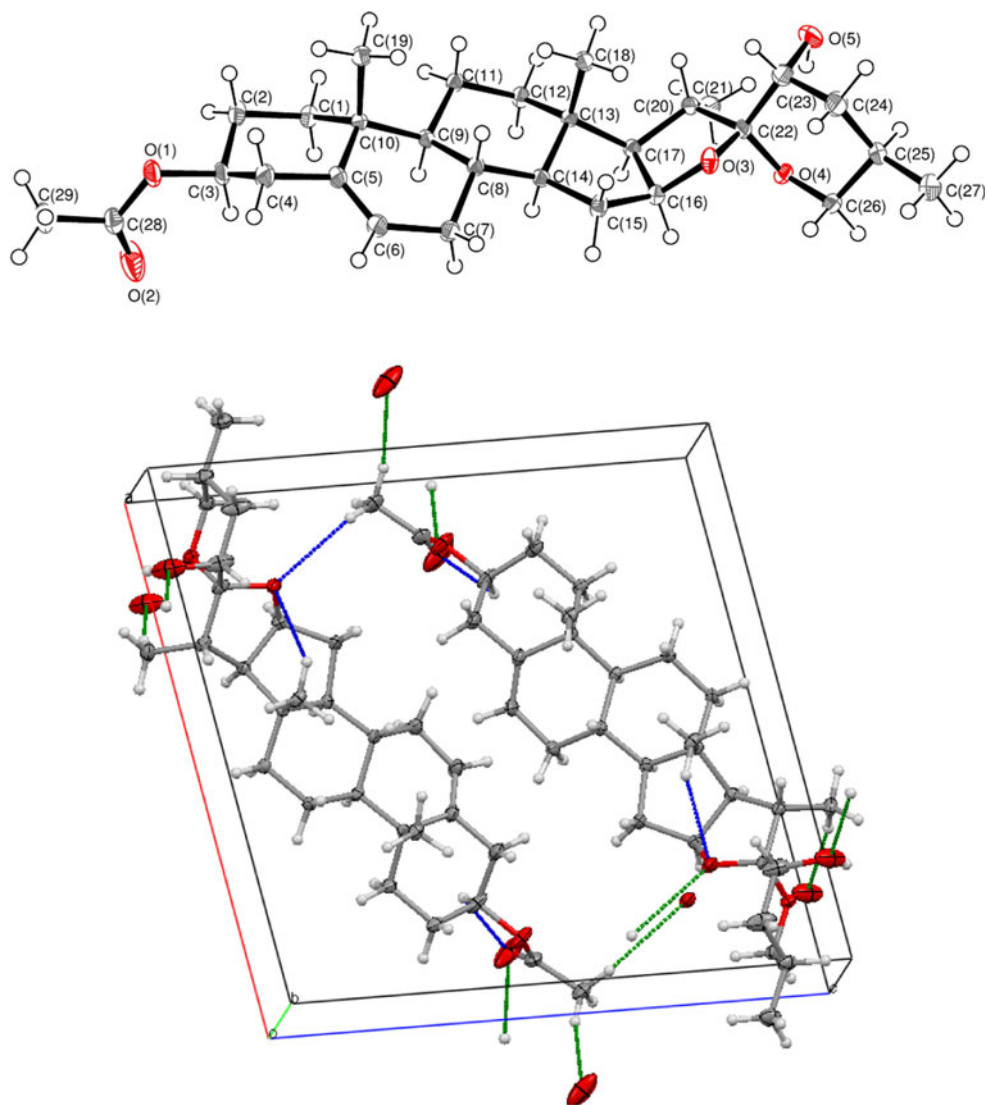


Fig. 4 Crystal structure and unit cell of (23*S*)-23-hydroxy diosgenin 3-monoacetate (**4**)

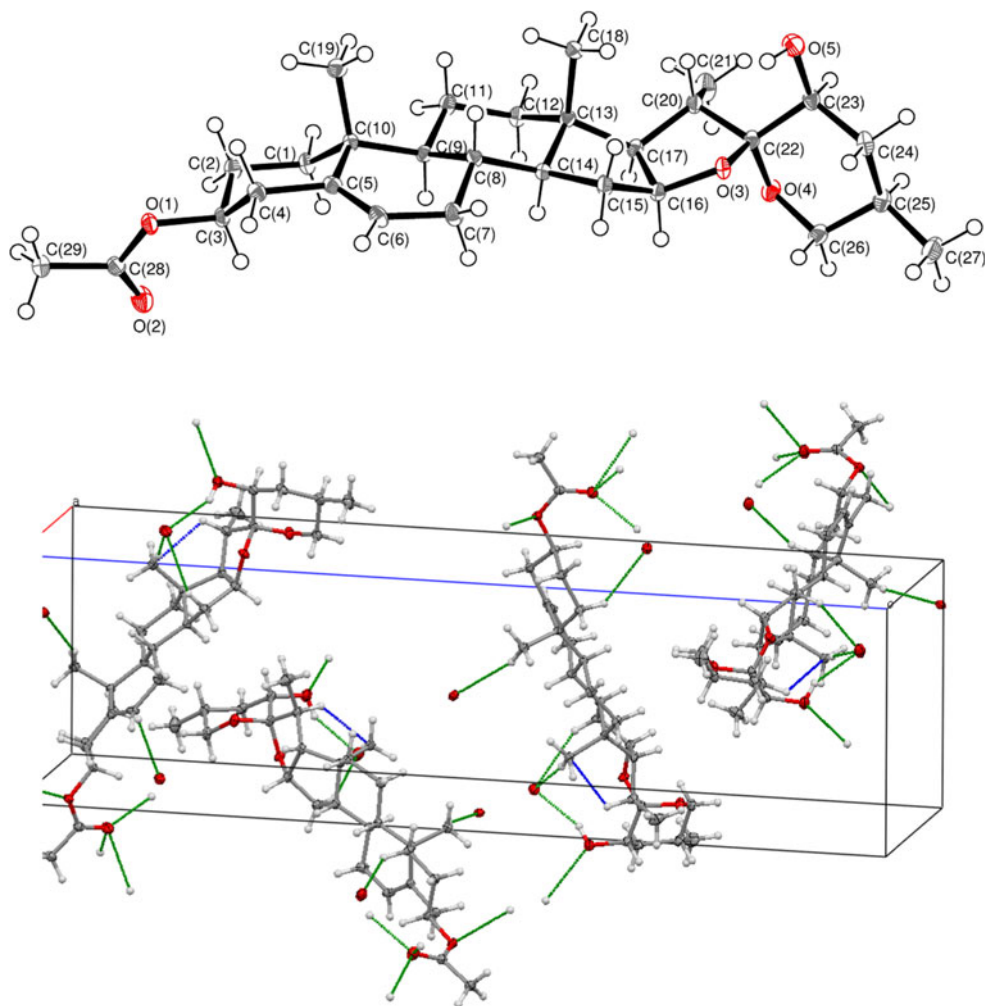


Table 2 Puckering descriptors obtained using the PLATON program

	1	2	3	4
Ring A	C-form	C-form	C-form	C-form
Ring B	H-form	H-form	H-form	H-form
Ring C	C-form	C-Form	C-form	C-form
Ring D	Twisted on	Twisted on	Twisted on	Envelope
	C(13)–C(14)	C(13)–C(14)	C(13)–C(14)	on C(14)
Ring E	Envelope	Envelope	Envelope	Envelope
	O(3)-exo	O(3)-exo	O(3)-exo	C(22) endo
Ring F	C-form	C-form	C-form	C-form

this way, the absolute structure of each compound is established with the help of PLATON [30] as: C(3): S, C(8): S, C(9): S, C(10): R, C(13): S, C(14): S, C(16): S, C(17): R, C(20): S, C(22): R and C(25): R; for (**1**), while for (**2**) every center have the same configuration but C(22): S, on the other hand, differences arise in lateral chain, due to the presence of the hydroxyl in C(23), R; for (**3**) and C(23): S, for (**4**).

Table 3 Least-squares overlay analysis of the rings, performed by each pair of structures

	(1–2)	(1–3)	(1–4)
Ring A	0.00431	0.00770	0.00764
Ring B	0.00334	0.00232	0.02260
Ring C	0.00356	0.00404	0.02590
Ring D	0.00449	0.00592	0.08910
Ring E	0.01010	0.00709	0.10600
Ring F	0.02840	0.01130	0.01620
All Rings	0.04480	0.05260	0.54000

The ORTEP plot of each crystal structure, were made with the ORTEP 3 for windows program [31] and are presented in Figs. 1, 2, 3 and 4, with the ellipsoid drawn at the 50 % of probability. The unit cells, were plotted using Mercury program [32]. The molecules in the unit cell of compounds **1** to **3** show no classic hydrogen bonds and they are linked via C–H...O hydrogen bonds, while the molecules of compound **4** presents one classic hydrogen bond, but is also linked through C–H...O bonds.

Table 4 Relevant torsion angles for rings E and F of compounds **1–4**

	1	2	3	4
C(16)–C(17)–C(20)–C(21)	123.22(11)	123.29(15)	124.37(16)	145.17(17)
C(16)–C(17)–C(20)–C(22)	–2.30(12)	–2.10(18)	–1.54(19)	19.70(18)
C(17)–C(20)–C(22)–O(4)	95.64(10)	99.29(16)	97.02(17)	80.61(18)
C(17)–C(20)–C(22)–C(23)	–140.55(10)	–139.63(15)	–136.24(18)	–155.52(16)
C(17)–C(16)–O(3)–C(22)	–40.09(11)	–38.33(16)	–38.64(17)	–27.76(18)
C(17)–C(20)–C(22)–O(3)	–21.41(12)	–21.10(18)	–21.31(19)	–37.32(18)
C(20)–C(22)–C(23)–C(24)	–175.98(11)	–179.24(16)	–179.04(18)	–179.50(16)
C(20)–C(22)–O(3)–C(16)	38.85(11)	37.66(17)	37.96(18)	41.15(18)
C(20)–C(22)–O(4)–C(26)	–176.62(10)	–173.78(15)	–174.90(15)	–171.78(16)
C(21)–C(20)–C(22)–O(3)	–146.33(10)	–146.01(16)	–146.14(17)	–163.05(17)
C(21)–C(20)–C(22)–O(4)	–29.28(14)	–25.6(2)	–27.8(2)	–45.1(2)
C(21)–C(20)–C(22)–C(23)	94.52(13)	95.5(2)	98.9(2)	78.8(2)
C(22)–C(23)–C(24)–C(25)	52.49(15)	52.2(2)	53.2(3)	54.4(2)
C(23)–C(24)–C(25)–C(26)	–52.85(15)	–49.7(2)	–54.2(2)	–52.9(2)
C(23)–C(24)–C(25)–C(27)	–175.82(12)	–172.82(18)	–176.33(19)	–175.30(18)
C(23)–C(22)–O(4)–C(26)	57.57(13)	60.55(18)	56.4(2)	60.3(2)
C(23)–C(22)–O(3)–C(16)	161.66(9)	161.23(14)	160.19(14)	165.59(14)
C(24)–C(25)–C(26)–O(4)	57.06(14)	55.88(19)	57.0(2)	55.6(2)
C(25)–C(26)–O(4)–C(22)	–60.48(13)	–63.71(18)	–58.86(19)	–61.0(2)
C(27)–C(25)–C(26)–O(4)	178.84(11)	179.69(16)	179.40(16)	179.47(17)
O(4)–C(22)–O(3)–C(16)	–77.07(11)	–82.55(16)	–79.40(17)	–74.48(18)
O(3)–C(16)–C(17)–C(20)	24.80(11)	23.76(15)	23.42(18)	3.44(17)
O(3)–C(22)–O(4)–C(26)	–62.32(12)	–55.65(19)	–59.4(2)	–58.0(2)
O(3)–C(22)–C(23)–C(24)	66.71(13)	62.3(2)	65.3(2)	63.75(19)
O(4)–C(22)–C(23)–C(24)	–53.76(14)	–56.3(2)	–53.9(3)	–56.8(2)
O(3)–C(22)–C(23)–O(5)		–121.6(2)	–172.46(16)	–61.2(2)
O(4)–C(22)–C(23)–O(5)		119.8(2)	68.3(2)	178.18(16)
C(20)–C(22)–C(23)–O(5)		–3.1(3)	–56.8(2)	55.5(2)
O(5)–C(23)–C(24)–C(25)		–123.8(2)	–67.4(3)	179.17(17)

The molecules in the unit cell of **1**, **2** and **3**, show no classic hydrogen bonds and all are linked via short contacts at C–H...O hydrogen bonds, in O(2)...H–C(29): 2.548(3) Å, O(3)...H–C(29): 2.775(4) Å and O(4)...H–C(24):2.775(4) Å for compound **1**. In O(2)...H–C(29): 2.545(2) Å, O(5)...H–C(17): 2.784(4) Å, O(5)...H–C(21):2.523 (4) Å and O(3)...H–C(29):2.725(4) Å for **2**. In O(2)...H–C(29): 2.553(3) Å, O(3)...H–C(29): 2.733(2) Å and O(5)...H–C(21):2.800 (4) Å for **3**. The packing of the crystals in these compounds is assumed to be dictated by van der Waals interactions and intermolecular C–H...O hydrogen bonds and differences between the packing diagrams are due to the way the molecules chain one to the other, inside the crystal. In the bottom of Figs. **1**, **2** and **3** the view of the cell packing of compounds **1**, **2** and **3** are shown, were less symmetrical arrangement than in **4** can be observed. To conclude, for **4** there are four molecules in the unit cell all linked by both classical and non-classical hydrogen bonds in In O(2)...H–O(5): 2.128(2) Å, O(2)...H–

C(18): 2.623(4) Å, O(2)...H–C(15):2.666(4) Å and O(1)...H–C(19):2.73(4) Å. A view of the cell packing of compound **4** is shown in the bottom of Fig. **4**.

Puckering parameters for compounds **1**, **2**, **3** and **4** were calculated as described by Cremer and Pople [33]. In all cases the calculation starts from C(1) to C(10) and proceeding in a counterclockwise direction for ring A, C(5) to C(10) and proceeds in a counterclockwise direction for ring B, from C(8) to C(14) and proceeds in a clockwise direction for ring C, for Ring D the calculation starts from C(13) to C(17) and proceeds in a clockwise direction, while Ring E the calculation follow this order; O(3), C(22), C(20), C(17), C(16). Finally in ring F starts from O(4) to C(26) and proceeds in a clockwise direction.

Table 2 shows the puckering descriptors as defined by Cremer and Pople [33] and calculated using the PLATON program [30]. The minor differences observed amongst rings A to C across all compounds may be attributed to the

different intermolecular interactions that are, of course, influenced by the changes introduced in the side chain.

On the other hand, when rings D and E are compared, it is clear, as expected, that the modifications introduced in the side chain produce some interesting conformational changes in the steroid framework. These changes considerably differentiate compounds **1**, **2** and **3** from **4**.

When ring D is compared, a change from the twisted on C(13)–C(14) conformation on **1**, **2** and **3** to envelope on C(14) on **4** is observed, something equivalent occurs when comparing ring E, where there are conformation changes from envelope O(3)-exo for **1**, **2** and **3** to envelope C(22) endo for **4**, making the overlay of ring F of compound between these rings very bad and also indicating important conformational changes associated to the conversion.

In order to assess quantitative differences among all the compounds, a least-squares overlay analysis is performed (**1** vs. **2**, **1** vs. **3** and **1** vs. **4**). Table 3 shows the results of least-squares overlay analysis obtained with Mercury program [32].

From the data of Table 2, is possible to realize that rings A, B and C are very similar in all compounds however rings D and E are similar in compounds **1**, **2** and **3** but very different on compound **4**. Finally, the introduction of an sp² atom in the F-ring results on a slight deviation from on its conformation, not enough to deviate it from the chair conformation. However if the five rings are compared all together, is very clear that compounds **1**, **2** and **3** are similar and differ from compound **4**. The relevant torsion angles of rings E and F are shown in Table 4.

Conclusions

The observed melting points of these compounds are: 197(1) °C for **1** with 3 short contact non-classical hydrogen bonds with an average distance of 2.699(1) Å; 190(1) °C for **2** with 4 short contact non-classical hydrogen bonds with an average distance of 2.644(1) Å; 167(1) °C for **3** with 3 short contact non-classical hydrogen bonds with an average distance of 2.695(1) Å and 241(1) °C for **4** with 4 short contact non-classical hydrogen bonds and one true hydrogen bond with an average distance of 2.559(1) Å. Then, the observed differences can be explained in terms of the position of the OH group which in the case of **4** allows to have a classical hydrogen bond that none of the other compounds can have. This can be used to design new compounds with some slightly different properties; such as the melting point and from this generate quasi-crystal behavior.

Acknowledgments The authors thank to Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) for financial

support via Project IN221911-3 and CONACyT for the scholarship Granted to A.R.-A. Thanks are due to Georgina Duarte Lisci and Margarita Guzmán Villanueva (USAI-UNAM) for registering Mass spectra. We want to express our gratitude to Dr. Carlos Cobas from Mestrelab[®] for assistance with the MestreNova NMR processing program.

References

- Fieser L, Feiser M (1959) Steroids. Reinhold, New York
- Lee E, Liu YT, Solomon PH, Nakanishi K (1976) J Am Chem Soc 98:1634–1635
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F (2001) J Chem Soc Perkin Trans 1:261–266
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F (2002) Steroids 67:159–163
- Romero-Ávila M, de Dios-Bravo G, Méndez-Stivalet JM, Rodríguez-Sotres R, Iglesias-Arteaga MA (2007) Steroids 72:955–959
- LaCour TG, Guo C, Bhandaru S, Boyd MR, Fuchs PL (1998) J Am Chem Soc 120:692–707
- Lee S, LaCour TG, Lantrip D, Fuchs PL (2002) Org Lett 4:313–316
- Jiang B, Shi H-P, Tian W-S, Zhou W-S (2008) Tetrahedron 64:469–476
- Xu Q-H, Peng X-W, Tian W-S (2003) Tetrahedron Lett 44:9375–9377
- Ravindar K, Reddy MS, Lindqvist L, Pelletier J, Deslongchamps P (2011) J Org Chem 76:1269–1284
- Shi Y, Jia L, Xiao Q, Lan Q, Tang X, Wang D, Li M, Ji Y, Zhou T, Tian W (2011) Chem Asian J 6:786–790
- Gryszkiewicz-Wojtkielewicz A, Jastrzębska I, Morzycki JW, Romanowska DB (2003) Curr Org Chem 7:1257–1277
- Corbiere C, Liagre B, Terro F, Beneytout JL (2004) Cell Res 14:188–196
- Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, Bordji K, Dauca M, Netter P, Beneytout JL (2003) Int J Oncol 22:899–905
- Raju J, Patlolla JMR, Swamy MV, Rao CV (2004) Cancer Epidemiol Biomark Prev 13:1392–1398
- Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, Tagliatalata-Scafati O (1998) J Agric Food Chem 46:4904–4908
- Carotenuto A, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, De Feo V, Carnuccio R, D'Acquisto F (1997) J Nat Prod 60:1003–1007
- Carotenuto A, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, Carnuccio R, D'Acquisto F (1997) Tetrahedron 53:3401–3406
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Leliebre-Lara V, Coll-Manchado F, Pérez-Martínez CS (1998) Synth Commun 28:4387–4392
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Leliebre-Lara V, Coll-Manchado F, Pérez-Martínez CS, Rosado A (1998) Synth Commun 28:75–81
- Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Gil R, Pérez-Martínez CS, Coll-Manchado F (2000) Synth Commun 30:163–170
- Ruiz-Pérez KM, Romero-Ávila M, Flores-Pérez B, Flores-Álamo M, Moreno-Esparza R, Iglesias-Arteaga MA (2009) Steroids 74:966–1002
- Ruiz-Pérez KM, Romero-Ávila M, Tinajero-Delgado V, Flores-Álamo M, Iglesias-Arteaga MA (2012) Steroids 77:819–828
- Steraloids cataloge. Web version <http://steraloids.com/>. Reference number S1601-000. Accessed 10 March 2013
- Iglesias-Arteaga MA, Sandoval-Ramírez J, Mata-Esma MY, Viñas-Bravo O, Bernés S (2004) Tetrahedron Lett 45:4921–4926
- CrysAlis CCD and CrysAlis R (2009) Oxford Diffraction, Abingdon

27. Burla MC, Caliandro R, Camalli M, Carrozzini B, Cascarano GL, De Caro L, Giacovazzo C, Polidori G, Spagna R (2005) *J Appl Crystallogr* 38:381–388
28. Sheldrick GM (2008) *Acta Cryst A* 64:112–122
29. Iglesias-Arteaga MA, Pérez-Martinez, CS, Pérez-Gil R, Coll-Manchado F (1999) *J Chem Res (S)*:48–49
30. Spek AL (1998) PLATON, a multipurpose crystallographic tool. Utrecht University, Utrecht
31. Farrugia LJ (1997) *J Appl Crystallogr* 30:565–571
32. Macrae CF, Bruno IJ, Chisholm JA, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Rodriguez-Monge L, Taylor R, Van de Streek J, Wood PA (2008) *J Appl Crystallogr* 41:466–470
33. Cremer D, Pople JA (1975) *J Am Chem Soc* 97:1354–1358