

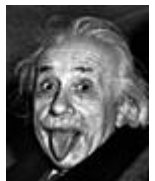


TESI DOCTORAL

Títol	Brassinoesteroides: síntesi d'anàlegs androstatsics encaminats en aprofundir en la interacció brassinoesteroide-receptor.
Realitzada per	Sra. Meritxell Molist Fusté
en el Centre	Escola Tècnica Superior IQS
i en el Departament	Química Orgànica i Bioquímica
Dirigida per	Dra. Carme Brosa Ballesteros

***SI BUSQUES RESULTATS DIFERENTS,
NO FACIS SEMPRE EL MATEIX.***

Albert Einstein (1879-1955)



M'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que han contribuït, tant o més que jo, a la realització d'aquesta tesi. El seu suport, la seva ajuda i amistat han estat indispensables per poder finalitzar-la.

A la meva directora de tesis, **Dra. Carme Brosa** per la seva confiança i els seus suggeriments.

Thanks **Dr. Kohout** to allow me to work in your research group in Prague, where I spent a very wonderful period of my thesis.

Al ja **Dr. Marc Amorós** per animar-me i oferir-me el seu inestimable suport en els primers anys del doctorat, així com també, als futurs **Drs. Enric Capdevila i Marc Vilaplana** per haver compartit i ajudat a superar les dificultats en els últims anys.

Als companys de laboratori que han contribuït directa o indirectament a portar a terme aquest projecte. Gràcies **Pep Rayó, Lluís Quintana, Cristina Peinado, Miroslav Sisa, Anna Esteve, Jaume Bosch...** per haver cregut en els androstans.

Als meus amics, **Carol, Ferran i Jordi**, per haver estat incondicionalment al meu costat des de fa més de 15 anys. Merci **Sandra, Aran, Moni i Montse** per ser com sou i recolzar-me des dels inicis de la carrera. Espero poder continuar gaudint de la vostra amistat durant moltíssims anys més.
Gràcies, de veritat.

I molt especialment, a la meva família, a la **Núria** per intentar entendre'm i animar-me, al **Roger** per fer-me riure i alegrar-me tots els dies i a **ma mare** per estar sempre amb mi. Al fiti, als meus tiets i cosins i a la meva àvia. Sense la vostra ajuda i suport no hauria arribat, ni molt menys, fins aquí.

MOLTÍSSIMES GRÀCIES

AcOEt	acetat d'etil	Et ₃ N	trietilamina
BR	brassinoesteroide	Et ₂ O	èter etílic
^t BuOH	<i>tert</i> -butanol	EtOH	etanol
cc	cru complex	Exp	experiència
CCF	cromatografia de capa fina	imp	impuresa
Cy	ciclohexà	MCPBA	àcid <i>m</i> -cloroperbenzoic
DCC	diciclohexilcarbodiimida	MeCOMe	acetona
DCU	diciclohexilurea	MeOH	metanol
DHQD-PHN	9- <i>o</i> -(9'-fenantril)èter	NBS	N-bromosuccinimida
DHP	3,4-dihidro-2H-pirà	NMO	N-òxid de N-metilmorfolina
Diazald	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitroso- <i>p</i> -	PCC	Clorocromat de piridini
DIBAL-H	hidrur de diisobutilalumini	PTSA	àcid <i>p</i> -toluensulfònic
DMAP	4-(dimetilamino)piridina	PPTS	<i>p</i> -toluensulfonat de piridini
DMP	dimetoxipropà	Py	piridina
DMF	dimetilformamida	<i>RLIT</i>	test d'inclinació de la làmina
DMSO	dimetilsulfòxid	rdt	rendiment
EM-AR	Espectre de masses d'alta resolució	T	temperatura
EM-IE	Espectre de masses d'ionització electrònica	t.a.	temperatura ambient
EM-IQ	Espectre de masses d'ionització química	TBHP	hidroperòxid de <i>tert</i> -butil
		Tf-N ₃	trifluorometansulfonilazida
		THF	tetrahidrofuran
		TMA	trimetilalumini

SUMARI

En el camp dels brassinoesteroides, promotors del creixement vegetal, es pretén, d'una banda, d'aprofundir en el coneixement de la seva interacció amb el receptor (on la formació de ponts d'hidrogen dels diferents hidroxils sembla jugar un paper fonamental) i, de l'altra, obtenir anàlegs amb bona relació cost sintètic-activitat. En aquest sentit, es creu interessant abordar l'estudi dels brassinoesteroides androstànics.

S'han desenvolupat estratègies sintètiques per a l'obtenció, de forma sistemàtica i eficient, d'anàlegs androstànics amb diferents cadenes laterals. S'ha estudiat computacionalment la semblança tridimensional de tots els anàlegs proposats amb la de brassinoesteroides actius de referència, emprant alineaments flexibles amb el programa MOE.

Les estratègies desenvolupades per tal d'aconseguir diverses modificacions a l'anell A han permès observar com la introducció de les funcionalitats $2\alpha,3\alpha$ -diol és més senzilla i eficient que d'altres *a priori* interessants com $2\alpha,3\alpha$ -difluor o 2,3-dicetona.

S'han desenvolupat estratègies i aproximacions per a la síntesi de l'anàleg androstànic que millor simularia la cadena lateral de la brassinolida (brassinosteroide natural més actiu conegut fins el moment). De tota manera, degut a la dificultat sintètica de l'àcid carboxílic 3*S*,4-dimetil-2*R*-hidroxipentanoic (cadena lateral) no s'ha aconseguit la síntesi de l'anàleg d'interès.

S'han dissenyat, sintetitzat i avaluat una sèrie d'androstans per tal d'estudiar la influència de la part hidrofòbica terminal i de la posició de les funcionalitats polars de la cadena lateral, així com també el paper que juga el grup protector d'aquestes en l'activitat.

Amb la finalitat de validar la metodologia SHOP aplicada prèviament en l'equip, s'han sintetitzat i avaluat diversos brassinoesteroides androstànics amb cadenes d'àcids carboxílics comercials escollits emprant aquesta metodologia.

La síntesi i avaluació d'activitat d'anàlegs androstànics amb diferents funcionalitats en α de carbonil de la cadena lateral (fluor, carbonil, azida, amina...) així com també la dels anàlegs escollits de forma sistemàtica (metodologia SHOP) ha permès concloure que és necessària la presència d'una funcionalitat donadora de ponts d'hidrogen en aquesta regió per tal que un brassinoesteroide expressi activitat com a promotor del creixement vegetal.

ÍNDEX

ÍNDEX	- 11 -
A. INTRODUCCIÓ	- 21 -
1. ELS ESTEROIDES	- 23 -
2. LES FITOHORMONES	- 23 -
3. ELS BRASSINOESTEROIDES (BRS)	- 25 -
3.1. Distribució, efecte fisiològic i toxicitat	- 25 -
3.2. Evolució històrica i estructura	- 26 -
3.3. Aplicació a camp	- 27 -
3.4. Genètica molecular i mecanisme fisiològic	- 28 -
3.5. Antecedents en la Secció d'Esteroides	- 29 -
3.5.1. <i>Síntesi: la única via d'obtenció de BRs</i>	- 29 -
3.5.2. <i>Avaluació de l'activitat dels BRs: els bioassaigs</i>	- 30 -
3.5.3. <i>Relacions estructura-activitat</i>	- 31 -
3.5.3.1. <i>Relacions estructura-activitat (SAR)</i>	- 31 -
3.5.3.2. <i>Relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR)</i>	- 31 -
3.5.4. <i>Resultats obtinguts fins el moment</i>	- 32 -
3.6. Els anàlegs androstànics d'interès	- 33 -
3.6.1. <i>Avantatges i inconvenients dels androstans</i>	- 33 -
3.6.2. <i>Antecedents en la síntesi de BRs androstànics</i>	- 34 -
3.6.2.1. <i>Departament d'Esteroides de l'Acadèmia de Ciències de Praga</i>	- 34 -
3.6.2.2. <i>Col·laboració Acadèmia de Ciències de Praga i IQS</i>	- 35 -
3.6.2.3. <i>La Secció de Ciències Aplicades de l'Escola Superior d'Agricultura de Kyoto</i>	- 36 -
3.6.3. <i>Noves propostes sintètiques</i>	- 37 -
3.6.3.1. <i>La "brassinolida androstànica"</i>	- 37 -
3.6.3.2. <i>Modificacions a l'anell A</i>	- 38 -
3.6.3.3. <i>Anàlegs amb diferents funcionalitats en α de l'èster</i>	- 38 -
3.6.3.4. <i>Anàlegs escollits per mètodes computacionals</i>	- 39 -
B. OBJECTIUS	- 41 -
C. DISCUSSIÓ DE RESULTATS	- 45 -
1. ESTRATEGIA SINTÈTICA GENERAL	- 47 -
2. OBTENCIÓ DEL PRODUCTE DE PARTIDA 25	- 48 -
3. FUNCIONALITZACIÓ DE L'ESQUELET ANDROSTÀNIC	- 49 -
3.1. Introducció	- 49 -

3.2. Estudi computacional dels anàlegs amb modificacions a l'anell A	- 50 -
3.2.1. <i>La conformació activa</i>	- 50 -
3.2.2. <i>L'alineament flexible</i>	- 50 -
3.2.3. <i>Superposicions amb la castasterona (2)</i>	- 52 -
3.3. Síntesi d'esquelets amb funcionalitat dicetona a l'anell A	- 52 -
3.3.1. <i>A partir del Δ^2</i>	- 53 -
3.3.2. <i>A partir del diol</i>	- 55 -
3.3.2.1. <i>Síntesi del diol 52</i>	- 55 -
3.3.2.2. <i>Oxidació del diol 52 a la dicetona 53</i>	- 57 -
3.3.2.2.1. <i>Estudi del mecanisme</i>	- 58 -
3.3.2.2.2. <i>Emprant NBS</i>	- 60 -
3.3.2.2.3. <i>Emprant PCC</i>	- 61 -
3.4. Síntesi d'esquelets amb funcionalitat difluor a l'anell A	- 62 -
3.4.1. <i>Emprant difluorur de p-iodotoluè</i>	- 64 -
3.4.2. <i>Emprant difluorur de xenó</i>	- 65 -
3.5. Síntesi d'esquelets amb funcionalitat diol a l'anell A	- 69 -
3.5.1. <i>Dihidroxilació convencional</i>	- 69 -
3.5.2. <i>Dihidroxilació asimètrica de Sharpless</i>	- 70 -
3.5.3. <i>Separació i purificació de mescles de 2ξ,3ξ-diols 26, 94 i 95</i>	- 72 -
3.5.3.1. <i>Isomerització de 94 a 95</i>	- 73 -
3.5.3.2. <i>Separació per cromatografia flash i Lobar-Merk®</i>	- 73 -
3.5.3.3. <i>Recristal·lització en EtOH</i>	- 75 -
3.5.3.4. <i>Comparació tècniques de separació dels diols 26, 94 i 95</i>	- 75 -
3.6. Protecció dels diol de l'anell A: síntesi de 96	- 75 -
3.6.1. <i>Intent de síntesi de 96 via Acetona/H⁺</i>	- 76 -
3.6.2. <i>Síntesi de 96 via DMP</i>	- 76 -
4. APROXIMACIÓ A LA SÍNTESI DE LA “CASTASTERONA ANDROSTÀNICA”	- 77 -
4.1. Estratègies sintètiques per a la síntesi de l'àcid 98	- 77 -
4.2. Síntesi d'epòxids	- 79 -
4.2.1. <i>Reducció microbiològica</i>	- 79 -
4.2.2. <i>Reacció de Darzens</i>	- 80 -
4.2.3. <i>Epoxidació asimètrica de Sharpless</i>	- 80 -
4.2.3.1. <i>Síntesi de l'èster α,β-insaturat 114</i>	- 81 -
4.2.3.2. <i>Síntesi de l'alcohol al·lílic 113</i>	- 81 -
4.2.3.3. <i>Epoxidació asimètrica de Sharpless de l'alcohol al·lílic 113</i>	- 81 -
4.2.4. <i>Obtenció d'àcids o èsters α,β-insaturats</i>	- 82 -
4.2.5. <i>Síntesi d'α,β-epoxiàcids/èsters racèmics a partir de derivats α,β-insaturats</i>	- 83 -
4.2.6. <i>Síntesi de l'androstà 132</i>	- 84 -
4.3. Obertura d'epòxids	- 85 -
4.3.1. <i>Emprant TMA</i>	- 85 -
4.3.2. <i>Emprant ⁱPrMgBr</i>	- 86 -
4.3.3. <i>Emprant ⁱPr₂CuLi</i>	- 87 -
4.4. Propostes per a futures síntesis	- 87 -

5. SÍNTESI D'ANDROSTANS AMB DIVERSES FUNCIONALITATS EN α DE CARBONIL	- 88 -
5.1. Introducció i antecedents	- 88 -
5.2. Anàlegs androscànics proposats	- 90 -
5.2.1. Sense funcionalitat en α de carbonil	- 90 -
5.2.2. Funcionalitat cetona en α de carbonil	- 90 -
5.2.3. Funcionalitat azida en α de carbonil	- 91 -
5.2.4. Funcionalitat metoxicarbonilamina en α de carbonil	- 92 -
5.2.5. Funcionalitat hidroxil en α de carbonil	- 94 -
5.2.6. Funcionalitat fluor en α de carbonil	- 95 -
5.3. Síntesi d'àcids carboxílics (cadena lateral)	- 97 -
5.3.1. Àcids carboxílics comercials	- 97 -
5.3.2. Síntesi d' α -azidoàcids	- 97 -
5.3.3. Síntesi d' α -metoxicarbonilaminoàcids	- 99 -
5.3.4. Síntesi d' α -hidroxiàcids	- 99 -
5.3.4.1. Síntesi del 2S-hidroxiàcid 168	- 99 -
5.3.4.2. Protecció del 2S-hidroxiàcid 168	- 100 -
5.3.4.3. Protecció del 2R-hidroxiàcid 174	- 102 -
5.3.5. Síntesi de l' α -fluoràcid 176	- 102 -
5.4. L'etapa d'esterificació	- 104 -
5.4.1. Esterificació directa	- 104 -
5.4.2. Activació de l'alcohol	- 105 -
5.4.3. Activació del grup carboxilat	- 105 -
5.4.3.1. Activació amb BOP-Cl	- 105 -
5.4.3.2. Activació amb clorurs de cloroamidini	- 105 -
5.4.3.3. Via clorur d'àcid	- 105 -
5.4.3.4. Esterificació de Mitsunobu	- 105 -
5.4.3.5. Esterificació de Steglich	- 106 -
5.4.3.6. Esterificació de Yamaguchi	- 107 -
5.5. Síntesi de 143 (2'H)	- 109 -
5.5.1. Esterificació via DCC/DMAP	- 109 -
5.5.1.1. Hidròlisi emprant HCl	- 109 -
5.5.1.2. Hidròlisi emprant CF ₃ COOH	- 110 -
5.5.2. Esterificació de Yamaguchi	- 111 -
5.5.2.1. Hidròlisi emprant CF ₃ COOH	- 111 -
5.6. Síntesi de 144 (2'ceto)	- 111 -
5.7. Síntesi de 145 i 146 (2'N₃)	- 112 -
5.7.1. Intent d'esterificació amb DCC	- 112 -
5.7.2. Esterificació de Yamaguchi	- 113 -
5.7.3. Desprotecció dels acetònids 188 i 189	- 113 -
5.8. Síntesi de 151 i 152 (2'NHCOOMe)	- 113 -
5.9. Síntesi de 153 i 154 (2'OH)	- 114 -
5.9.1. Síntesi de 154 (2'S-OH)	- 114 -
5.9.2. Síntesi de 153 (2'R-OH)	- 116 -
5.10. Síntesi de 161 (2'R-F)	- 118 -

6. SÍNTESI D'ANÀLEGS ANDROSTÀNICS AMB CADENES D'ÀCIDS CARBOXÍLICS COMERCIALS ESCOLLIDES PER MÈTODES COMPUTACIONALS	- 119 -
6.1. Introducció.....	- 119 -
6.2. Síntesi dels anàlegs androscànics 211 i 212.....	- 124 -
6.3. Síntesi de l'anàleg androscànic 213.....	- 127 -
D. DISCUSSIÓ DE LES DADES D'ACTIVITAT	- 131 -
E. CONCLUSIONS	- 145 -
F. PART EXPERIMENTAL	- 149 -
O. OBSERVACIONS GENERALS.....	- 153 -
1. PREPARACIÓ DE L'ESQUELET ANDROSTÀNIC.....	- 156 -
1.1. Intent de síntesi d'anàlegs BRs androscànics amb funcionalitat 2,3-dicetona.....	- 156 -
1.1.1. Intent de síntesi d'anàlegs 2,3-diceto a partir de 17 β -hidroxi-5 α -androsc-2-en-6-ona (25).....	- 156 -
1.1.2. Intent de síntesi d'anàlegs 2,3-diceto a partir de 2 ξ ,3 ξ -androscans (52).....	- 156 -
1.1.2.1. Síntesi de 17 β -acetoxi-5 α -androsc-2-en-6-ona (51).....	- 156 -
1.1.2.2. Síntesi de 17 β -acetoxi-2 ξ ,3 ξ -dihidroxi-5 α -androscan-6-ona (52).....	- 157 -
1.1.2.3. Intent d'obtenció de la funcionalitat 2,3-dicetona (53) emprant NBS.....	- 157 -
1.1.2.4. Intent d'obtenció de la funcionalitat 2,3-dicetona (53) emprant polivinil-PCC.....	- 158 -
1.1.2.5. Intent d'obtenció de la funcionalitat 2,3-dicetona (53) emprant PCC.....	- 158 -
1.2. Síntesi d'anàlegs BRs androscànics amb funcionalitat 2,3-difluor (91 i 92).....	- 159 -
1.2.1. Intent de síntesi de 2 α ,3 α -difluoroandroscans emprant difluorur de p-iodotoluenè.....	- 159 -
1.2.2. Síntesi de 2 ξ ,3 ξ -difluoro-17 β -acetoxi-5 α -androscan-6-ona emprant difluorur de xenon.....	- 159 -
1.3. Síntesi d'anàlegs BRs androscànics amb funcionalitat 2α,3α-diol.....	- 160 -
1.3.1. Síntesi de 2 α ,3 α ,17 β -trihidroxi-5 α -androscan-6-ona (26).....	- 160 -
1.3.2. Dihidroxilació asimètrica de Sharpless.....	- 160 -
1.3.3. Purificació del cru de la reacció 1.3.1.....	- 161 -
1.3.3.1. Intent d'isomerització del trihidroxiandroscà 94 a 95.....	- 161 -
1.3.3.2. Mitjançant cromatografia flash i Lobar® (AcOEt/THF 4:1).....	- 161 -
1.3.3.3. Mitjançant cromatografia flash (AcOEt/THF 8:1).....	- 161 -
1.3.3.4. Mitjançant recristal·lització i cromatografia flash (AcOEt/THF 8:1).....	- 162 -
1.3.4. Intent de protecció del diol 26 emprant MeCOMe.....	- 162 -
1.3.5. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -hidroxi-5 α -androscan-6-ona (96) emprant DMP.....	- 162 -
2. INTENT DE SÍNTESI DE LA "CASTASTERONA ANDROSTÀNICA"	- 163 -
2.1. Síntesi d'epòxids racèmics	- 163 -
2.1.1. Obtenció de compostos insaturats.....	- 163 -
2.1.1.1. Síntesi del (E)-4-metil-2-pentenoat d'etil (114).....	- 163 -
2.1.1.2. Síntesi de l'àcid 4-metil-2-pentenoic (122).....	- 163 -
2.1.1.3. Síntesi de (E)-4-metil-2-pentenoat de metil (123).....	- 164 -
2.1.1.4. Síntesi del crotonat de 2'S-metilbutil (120).....	- 164 -
2.1.2. Epoxidacions de compostos insaturats.....	- 164 -

2.1.2.1. Síntesi de l'àcid 2,3-epoxibutanoic (124).....	- 164 -
2.1.2.2. Síntesi de l'àcid (E)-2,3-epoxi-4-metilpentanoic (129) via epoxidació de 122.....	- 165 -
2.1.2.4. Síntesi de 2,3-epoxibutanoat de benzil (127)	- 165 -
2.1.2.5. Síntesi del (E)-2,3-epoxi-4-metilpentanoat d'etil (131)	- 166 -
2.1.2.6. Síntesi del (E)-2,3-epoxi-4-metilpentanoat de metil (130)	- 166 -
2.1.3. Esterificació entre alcohols i α,β -epoxiàcids.....	- 167 -
2.1.3.1. Síntesi de 129 via saponificació de 131	- 167 -
2.1.3.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2',3'-epoxi-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (132)	- 167 -
2.2. Síntesi d'epòxids quiral via epoxidació asimètrica de Sharpless	- 168 -
2.2.1. Síntesi de l'alcohol al·lílic 113	- 168 -
2.2.2. Síntesi de (2S,3S)-2,3-epoxi-4-metil-1-pentanol (117)	- 168 -
2.2.3. Síntesi de l'epoxiàcid 118.....	- 168 -
2.3. Obertura d'epòxids	- 169 -
2.3.1. Emprant TMA	- 169 -
2.3.1.1. Intents d'obertura de 2,3-epoxibutanoat de metil (126)	- 169 -
2.3.1.2. Intents d'obertura del 2,3-epoxibutanoat de benzil (127)	- 169 -
2.3.1.3. Intents d'obertura del 2,3-epoxi-4-metilpentanoat de metil (130)	- 170 -
2.3.1.4. Intents d'obertura del 2,3-epoxi-4-metilpentanoat d'etil (131)	- 170 -
2.3.2. Intent d'obertura de l'àcid 2,3-epoxibutanoic (124).....	- 170 -
2.3.3. Intent d'obertura de 2,3-epoxibutanoat de metil (126)	- 171 -
3. SÍNTESI DE BRS ANDROSTÀNICS AMB DIFERENTS FUNCIONALITATS A C2'	- 171 -
3.1. Sense funcionalitat a C2'	- 171 -
3.1.1. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (143) via DCC/AcOEt.....	- 171 -
3.1.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (184) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	- 172 -
3.1.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (143)	- 172 -
3.1.3.1. Hidròlisi de l'acetònid emprant HCl	- 172 -
3.1.3.2. Hidròlisi de l'acetònid 184 emprant CF ₃ COOH	- 173 -
3.2. Funcionalitat cetona a C2'	- 173 -
3.2.1. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (187) via DCC/AcOEt.....	- 173 -
3.2.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (187) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	- 173 -
3.2.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (144)	- 174 -
3.3. Funcionalitat 2R-azida a C2'	- 175 -
3.3.1. Síntesi de l'àcid 2R-azido-4-metilpentanoic (164)	- 175 -
3.3.1.1. Preparació de Tf-N ₃ en CH ₂ Cl ₂	- 175 -
3.3.1.2. Azidació de la D-leucina (166)	- 175 -
3.3.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'R-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (189)	- 175 -
3.3.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'R-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (146)	- 176 -
3.4. Funcionalitat 2S- azida a C2'	- 177 -
3.4.1. Síntesi de l'àcid 2S-azido-4-metilpentanoic (165)	- 177 -
3.4.1.1. Preparació de Tf-N ₃ en CH ₂ Cl ₂	- 177 -
3.4.1.2. Azidació de la L-Leucina (167)	- 177 -

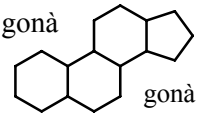
3.4.2. Intent de síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'S-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (188) via DCC	177 -
3.4.2.1. Intent de síntesi de 188 via DCC/Acetona	177 -
3.4.3. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'S-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (188) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	178 -
3.4.4. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'S-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (145)	178 -
3.5. Funcionalitat 2R-amina a C2'	179 -
3.5.1. Síntesi de l'àcid 2R-metoxicarbonilamino-4-metilpentanoic (170)	179 -
3.5.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metil-2'R-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (190)	179 -
3.5.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(4'-metil-2'R-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (151)	180 -
3.6. Funcionalitat 2S-amina a C2'	181 -
3.6.1. Síntesi de l'àcid 2S-metoxicarbonilaminoisopentanoic (171)	181 -
3.6.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metil-2'S-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (191) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	181 -
3.6.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(4'-metil-2'S-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (152)	182 -
3.7. Funcionalitat 2R-hidroxil a C2'	183 -
3.7.1. Síntesi de l'àcid 2R-acetoxi-4-metilpentanoic (175)	183 -
3.7.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'R-acetoxi-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (196) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	183 -
3.7.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'R-hidroxi-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (153)	183 -
3.8. Funcionalitat 2S-hidroxil a C2'	185 -
3.8.1. Síntesi de l'àcid 2S-hidroxi-4-metilpentanoic (168)	185 -
3.8.2. Intent de síntesi de l'àcid 2S-(ξ -tetrahidropiraniloxi)-4-metilpentanoic (172)	185 -
3.8.3. Síntesi de l'àcid 2S-(ξ -tetrahidropiraniloxi)-4-metilpentanoic (172)	186 -
3.8.3.1. Síntesi de PPTS	186 -
3.8.3.2. Síntesi de l'àcid 2S-(ξ -tetrahidropiraniloxi)-4-metilpentanoic (172)	186 -
3.8.4. Síntesi de l'àcid 2S-acetoxi-4-metilpentanoic (173)	186 -
3.8.5. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'S-hidroxi-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (154)	187 -
3.8.6. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'S-hidroxi-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (154)	187 -
3.9. Funcionalitat 2R- fluor a C2'	189 -
3.9.1. Síntesi de l'àcid 2R-fluoro-4-metilpentanoic (176)	189 -
3.9.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'R-fluoro-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (202) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	189 -
3.9.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'R-fluoro-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (161)	190 -
4. SÍNTESI DE BRS ANDROSTÀNICS AMB CADENES COMERCIALS ESCOLLIDES PER MÈTODES COMPUTACIONALS	191 -
4.1. Síntesi de 2α,3α-dihidroxi-17β-(2'R-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5α-androstan-6-ona (211).....	191 -
4.1.1. Síntesi de l'àcid 2R-(tetrahidropiranil-2' ξ -iloxi)-ciclohexanacètic (215)	191 -
4.1.2. Síntesi de l'àcid 2R-acetoxi-2-ciclohexil-acètic (218)	192 -
4.1.3. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'R-acetoxi-2'-ciclohexilacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (220) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	193 -

4.1.4. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi- 17β -(2'R-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)- 5α -androstan-6-ona (211) emprant CF_3COOH	193 -
4.1.5. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi- 17β -(2'R-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)- 5α -androstan-6-ona (211) emprant HCl.....	193 -
4.2. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$-dihidroxi-17β-(2'S-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5α-androstan-6-ona (212)-	195 -
4.2.1. Síntesi de l'àcid 2S-acetoxi-2-ciclohexilacètic (219)	195 -
4.2.2. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -isopropilidendioxi- 17β -(2'S-acetoxi-2'-ciclohexilacetoxi)- 5α -androstan-6-ona (221) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	195 -
4.2.3. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi- 17β -(2'S-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)- 5α -androstan-6-ona (212)-	196 -
4.3. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$-dihidroxi-17β-(3'-amino-3'-ciclohexilpropioniloxi)-5α-androstan-6-ona (213).-	197 -
4.3.1. Intent de síntesi de l'àcid 3-ciclohexil-3-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)propanoic (224) ..	197 -
4.3.2. Síntesi de l'àcid 3-ciclohexil-3-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)propanoic (224).....	197 -
4.3.3. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -isopropilidendioxi- 17β -(3'-ciclohexil-3'-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino) propioniloxi)- 5α -androstan-6-ona (225) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi	197 -
4.3.4. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi- 17β -(3'-ciclohexil-3'-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)- propioniloxi)- 5α -androstan-6-ona (226)	198 -
4.3.5. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi- 17β -(3'-amino-3'-ciclohexilpropioniloxi)- 5α -androstan-6-ona (213)....	199 -
G. BIBLIOGRAFIA	201 -

A. INTRODUCCIÓ

1. ELS ESTEROIDES

Els esteroides són molècules complexes que contenen el sistema cíclic del gonà (ciclopentaperhidrofenantrè) i comprenen gran varietat de productes naturals, essent en molts casos reguladors biològics importants.



Alguns esteroides de gran importància són el colesterol, la vitamina D, les hormones sexuals femenines i masculines, els àcids biliars, les cardenolides, els corticoesteroides... Actualment, es coneixen més de 20.000 esteroides, essent, sens dubte, els d'origen animal els més àmpliament estudiats.

El colesterol, l'esterol animal (zooesterol) més important, és un component estructural imprescindible de les parets cel·lulars. Tot i que es troba present en totes les parts de l'organisme, és majoritari en el teixit del cervell i en la medul·la espinal.

Mentre les hormones sexuals controlen el desenvolupament de les característiques secundàries masculines i femenines, els corticoesteroides intervenen en la regulació de nombroses activitats biològiques com el metabolisme de carbohidrats, proteïnes i lípids, el balanç d'aigua i electròlits i les reaccions a fenòmens al·lèrgics i inflamatoris.

Les plantes contenen gran quantitat d'alcohols esteroidals (fitoesterols) essencials en la formació i manteniment de les membranes cel·lulars. Alguns dels fitoesterols més representatius són l'estigmasterol, present, per exemple, en l'oli de soja i l'ergosterol, en el sègol, el llevat... La irradiació de derivats de l'ergosterol amb llum ultraviolada el transforma en nombrosos productes entre els quals es troba la vitamina D₂.

Degut a l'àmplia varietat i a la importància fisiològica dels esteroides, s'ha desenvolupat una extensa investigació científica, tant des del punt de vista del seu metabolisme com de la seva síntesi química.

S'han obtingut nombrosos derivats esteroidals no naturals amb accions fisiològiques específiques per a aplicacions mèdiques i moltes de les reaccions i generalitzacions de la química orgànica s'han desenvolupat inicialment sobre els esteroides.

2. LES FITOHORMONES

Les hormones són compostos naturals que, un cop segregades per certes cèl·lules especialitzades, són transportades fins a altres òrgans o teixits, essent necessàries tan sols baixes concentracions per a generar-hi una resposta.

El desenvolupament d'una planta depèn de la interacció entre factors externs (la llum, nutrients, aigua, temperatura...) i interns (codi genètic i hormones).

Les fitohormones, a diferència de les hormones animals, actuen en nombrosos processos fisiològics i la seva biosíntesi no es relaciona directament amb una glàndula, sinó que estan presents en gairebé totes les cèl·lules. Poden promoure o inhibir determinats processos. Així, per exemple, mentre les auxines, les giberel·lines, citoquinines i etilè regulen el creixement de les plantes, l'àcid absísic, els inhibidors, morfactines i retardants del creixement, l'inhibeixen.¹⁻⁴

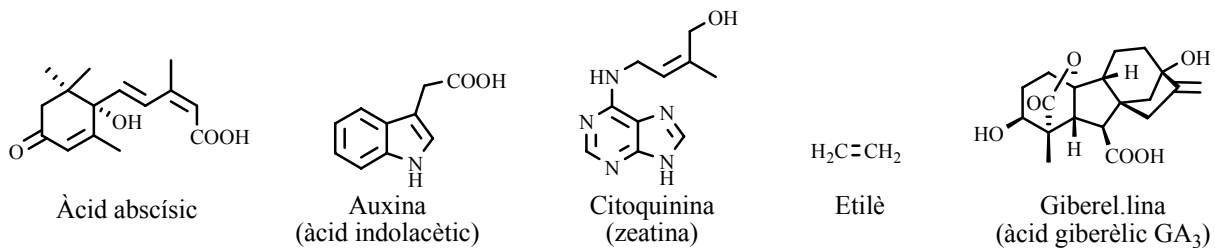


Figura 1

Clàssicament, les fitohormones es classificaren en els cinc grans grups anteriorment esmentats (Figura 1), tot i que altres i molt diversos compostos naturals també són considerats fitohormones. Aquests s'han agrupat com a inhibidors, retardants, poliamines...

Especial atenció mereix la darrera família de fitohormones descoberta, els brassinoesteroides (BRs), les característiques i propietats dels quals es descriuran més endavant.

En la següent taula es mostra l'any de descobriment de cada grup de fitohormones, així com alguns dels exemples més destacats de cada grup:

Fitohormona	Any	Exemples	Fitohormona	Any	Exemple
Auxines	1920	àcid indolbutíric, naftalenacètic	Inhibidors	1928	alguns flavonoides, cumarina, hidrazida maleica
Giberel·lines	1935	àcid giberèlic	Morfactines	1958	diversos fluorens substituïts
Citoquinines	1913	zeatina, cinetina, benciladenina	Retardants	1949	carbamat, derivats de l'àcid fosfònic (fosfonat de metil)
Etilè	1901	-	Àcid jasmònic	1990	jasmonat de metil
Àcid absísic	1963	-	Poliamines	1971	putrescina, cadaverina, espermidina
BRs	1979	brassinolida, castasterona			

Taula 1

Les fitohormones promouen la síntesi de proteïnes, faciliten el transport de productes fotosintètics, regulen el nivell d'aigua de la planta... A nivell macroscòpic, són capaces de promoure o incrementar la floració, milloren la qualitat i conservació de la fruita, en retarden o acceleren la seva maduració, incrementen el creixement de branques laterals, disminueixen la caiguda dels fruits⁵⁻⁷... Per totes aquestes propietats, són emprades com a reguladors del creixement en agricultura.

3. ELS BRASSINOESTEROIDES (BRs)

3.1. Distribució, efecte fisiològic i toxicitat

Els BRs són fitohormones d'estructura esteroidal essencials pel creixement, reproducció i desenvolupament normal dels vegetals.⁸⁻¹⁰

Es troben presents en tot tipus de plantes (gimnospermes, monocotiledònies i dicotiledònies), inclús en algues i cianobacteries i es troben en un ampli marge de concentracions (des de 10^{-1} fins a 10^{-7} nmol per gram), depenent no solament de l'espècie i del període de desenvolupament, sinó també de la part de la planta, aïllant-se les majors concentracions en les parts amb major activitat reproductora (pol·len, llavors, flors, petits brots...)⁹⁻¹³

Els BRs augmenten la mida i la divisió cel·lular, incrementen el contingut en clorofil·la i juguen un paper vital en els processos de fotorregulació¹⁴ i control hormonal en les plantes.¹⁵ Aquestes hormones també augmenten la inclinació de les fulles, la germinació de llavors, l'altura de la planta, el gruix de la tija...^{12,16-18}

Des dels seus inicis, els BRs van ser considerats bons candidats per a ser emprats en l'agricultura^{17,19} ja que petites quantitats d'ells (entre 5 i 50 mg de BR per hectàrea) provoquen una millora considerable en el creixement i el desenvolupament de les plantes.

En la Figura 2 es poden observar varies plantes de tabac que només difereixen en la quantitat de BRs presents en cada una d'elles. Baixos nivells de BRs condueixen a l'enanisme, mentre que, amb nivells normals d'aquestes hormones, s'obtenen plantes de tabac fins a 1.8 m més altes (Fotografia de Michael Neff i Joanne Chory)²⁰



Figura 2

Aplicats exògenament, incrementen el rendiment i la qualitat de diversos tipus de cultius, des dels més àmpliament estudiats com els d'arròs, blat, soja, blat de moro... com altres d'alt valor afegit com bolets o plantes ornamentals.²¹⁻²⁵

Els BRs prevenen de la caiguda prematura dels fruits i confereixen a la planta resistència a agents químics (pesticides, herbicides...)^{12,26} i a factors mediambientals adversos^{27,28} (salinitat,^{29,30} temperatures extremes,^{31,32} escassetat de nutrients, sequetat,^{33,34} ...) així com resistència a infeccions víriques o a fongs.¹⁷

Degut a les semblances estructurals dels BRs amb els ecdiesteroides, també s'ha descrit la possible activitat d'aquests com a reguladors de la muda dels insectes.^{35,36}

L'any 1998, Khripach *et al.*³⁷ empraren amb èxit els BRs per a reduir l'acumulació de metalls pesats i elements radioactius en les plantes que creixien en àrees contaminades degut a l'accident de la central nuclear de Xernòbil del 1986.

Es troba àmpliament descrit el sinergisme entre aquests reguladors i altres hormones vegetals, especialment les auxines (àcid indolacètic)³⁸⁻⁴⁰ i les giberel·lines,⁴¹ havent-se demostrat la influència dels BRs sobre l'equilibri hormonal i la concentració de les altres fitohormones.

Pel que fa referència a la hipotètica perillositat pel consum humà, tots els test de toxicitat emprats per avaluar alguns BRs han mostrat una baixa o nul·la toxicitat d'aquests compostos, així com un molt petit efecte acumulatiu i absència d'activitat mutagènica.^{17,42}

3.2. Evolució històrica i estructura

Les primeres referències bibliogràfiques de l'existència de BRs daten del 1941,⁴³ quan Mitchell i Whitehead observaren l'activitat com a promotors del creixement vegetal d'extractes de pol·len de blat de moro (*Zea mays*) en ser avaluats en el test d'elongació de l'internode de la mongeta.

Diversos estudis posteriors conduïren a aquests mateixos autors a proposar el 1970 l'existència d'un nou grup d'hormones vegetals capaces d'incrementar rendiment i qualitat en les collites,⁴⁴ a les que anomenaren *brassins*. Posteriorment, es publicaren diversos articles sobre l'aïllament d'aquestes noves hormones en 20 tipus de plantes diferents.⁴⁴⁻⁴⁶

Per tal d'aïllar-ne els compostos actius, 250 kg de pol·len de colza (*Brassica napus* L.)⁴⁷ van ser extrets amb CCl₄ i MeOH, en lots de 25 kg. Grove *et al.*⁴⁸ en cromatografiaren la fracció metanòlica i aconseguiren aïllar 10 mg d'una substància cristal·lina que anomenaren brassinolida (**1**), la qual caracteritzaren i identificaren mitjançant dades espectroscòpiques i raigs X.

Tres anys més tard, la castasterona (**2**), un precursor biosintètic de la brassinolida (**1**), va ser aïllat⁴⁹ del castanyer japonès (*Castanea crenata*) i, a partir d'aquí i fins el moment, més de 60 anàlegs esteroidals han estat identificats per extracció de fonts naturals.

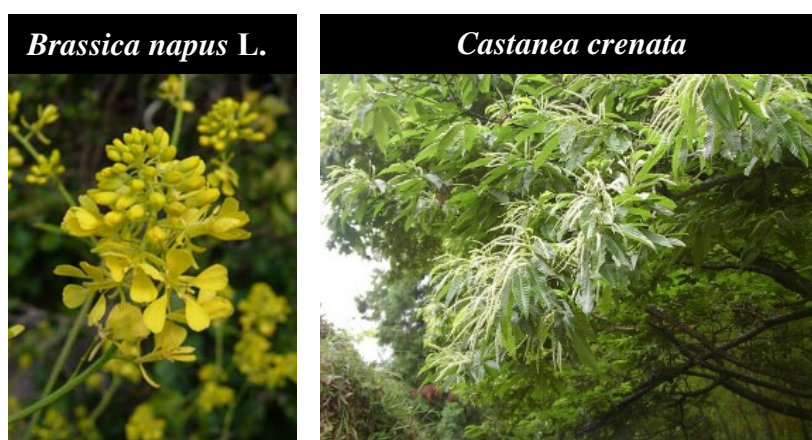
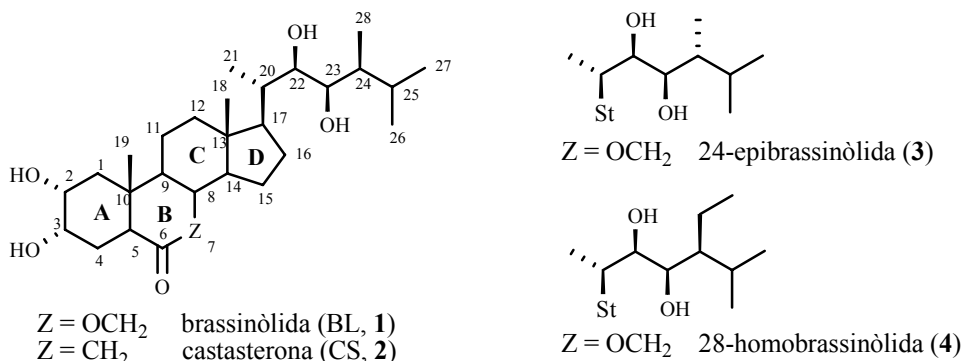


Figura 3

Els BRs naturals difereixen principalment en les funcionalitats polars a l'anell A, el grup a C6 de l'anell B i el substituent alifàtic a C24 de la cadena lateral. Tots ells presenten funcionalitats hidroxiliques a les posicions C22 i/o C23 sempre amb configuració *R*.



Esquema 1

El descobriment dels BRs, fa tan sols uns 25 anys, va accelerar els estudis sobre la biorregulació de la vida de les plantes. Fins aquell moment, només s'havia descrit l'existència d'hormones esteroidals en el món animal i en fongs. Tanmateix, el desenvolupament d'aquestes hormones vegetals ha estat molt ràpid, transcorrent escassament dues dècades des del seu descobriment fins a la seva aplicació en agricultura.

Fins a l'actualitat, autors del Japó (45%), dels EUA (15%), d'Alemanya (10-15%), de Xina (10-15%), de l'Antiga Unió Soviètica (10-15%) i d'arreu del món han publicat més de 1000 articles, uns 250 *reviews*^{11,50-61} i quatre llibres^{8-10,62} relacionats amb les diferents metodologies sintètiques, la seva activitat fitofisiològica, el seu metabolisme, el mode d'acció, biosíntesi, mètodes d'anàlisi i aïllament, aplicacions a l'agricultura, recerca de nous anàlegs...

3.3. Aplicació a camp

Els primers experiments per a la seva aplicació a camp començaren a mitjans dels anys 80, al Japó i l'antiga Unió Soviètica.⁶³ A partir d'aleshores, s'han publicat nombroses articles i molts dels seus usos han estat patentats.^{9,10} Així, per exemple, l'aplicació d'alguns BRs sobre cultius de mongetes provoca augments considerables en el pes de les llavors,⁶⁴ millors en la producció de mongetes, blat, soia,...⁶⁵ provoca increments en la producció de colza, tomàquets⁶⁶...

També s'ha descrit la disminució de la caiguda de fruits en els llimoners, tarongers, presseguers, pereres, pomers... gràcies a l'aplicació d'aquestes hormones.⁶⁷

De tota manera, l'aplicació a camp de BRs presenta alguns inconvenients importants:

- En primer lloc, la seva impossibilitat d'obtenció per extracció del medi natural, degut a les baixes concentracions en la que es troben.
- En segon lloc, l'elevat cost sintètic de la BL (**1**), BR natural més actiu conegut fins el moment, degut al fet que el producte de partida, el campesterol, és inassequible econòmicament (preu superior a 30 €/mg).

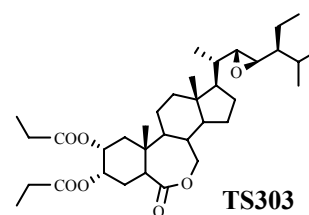
Per aquest motiu, els diversos experiments d'aplicació a camp d'aquestes hormones s'han dut a terme emprant altres BRs com ara la 24-epibrassinolida (**3**) i la homobrassinolida (**4**).

▪ Finalment però, és important destacar la rapidesa en que aquestes hormones anteriorment esmentades, es metabolitzen quan s'apliquen a les plantes.

Es poden trobar productes comercials que contenen aquestes hormones per a la millora de diferents tipus de cultius. Així, per exemple, la 24-epibrassinolida (**3**) és el principi actiu de l'*Epin*®, un promotor del creixement vegetal comercial emprat per a cultius de tomàquets,⁶⁸ patates,⁶⁹ cogombres, pebrots, cibada,⁷⁰ bolets,⁷¹ blat,^{72,73} maduixes,⁷⁴ plantes ornamentals...

Altres preparacions comercials, com ara *Tianfengsu*, riques en **3**, han estat emprades per finalitats semblants sobre cultius d'arròs, blat de moro, cotó, tabac, vegetals... De manera similar, s'ha patentat l'aplicació de **4** per millorar les collites de tabac, sucre, te, fruites^{17,75}...

Per tal d'augmentar l'estabilitat dels anàlegs esteroidals en les aplicacions a camp, s'ha desenvolupat el BR TS303, emprat comercialment com a TNZ303.^{10,76}



3.4. Genètica molecular i mecanisme fisiològic

La ravenissa taliana (*Arabidopsis thaliana*) és una herba petita i força prolífica, considerada organisme de referència i àmpliament emprada per a l'estudi de la biologia de les plantes ("el ratolí del regne vegetal"). El seu ràpid creixement (cicle de vida de 6 a 8 setmanes) i el seu genoma (el més senzill de les plantes que floreixen), completament seqüenciat a mitjans de l'any 2000,⁷⁷ la fan molt atractiva per a ser emprada per a estudis de genètica molecular. Probablement, els resultats obtinguts per l'*Arabidopsis* es podran transferir i adaptar a tot tipus d'altres vegetals: agroalimentaris, medicinals... Prèviament, però, serà necessari caracteritzar cada un dels 25000 gens de l'*Arabidopsis thaliana*, així com estudiar-ne la seva funció i la de les proteïnes que codifiquen.

Per tal d'elucidar el mecanisme biosintètic dels BRs, es van aplicar diversos esteroides marcats isotòpicament a les plantes i s'analitzaven els compostos als quals aquests evolucionaven.⁷⁸⁻⁸⁷ D'altra banda, també s'estan estudiant més de 20 mutants de diversos gens.^{16,88-94} Aquests provoquen interrupcions en la ruta sintètica dels BRs, conduint a alteracions dramàtiques del desenvolupament normal (esterilitat, caiguda de flors, enanisme...), podent-se aquest recuperar mitjançant l'aplicació externa de BRs.^{16,88,95-101}

De tota manera, molts interrogants resten oberts sobre el mecanisme fisiològic mitjançant el qual els BRs alteren el creixement i desenvolupament dels vegetals. Resoldre el com, on, i per què aquests compostos actuen podrà ser de gran interès per a la comunitat científica i també per a l'agricultura. La *National Science Foundation* (EUA) destinarà més de 25 milions de dòlars (sota el Projecte 2010) per finançar investigacions, especialment en el camp de la genètica molecular, que condueixen a determinar la funció de tots els gens, i les proteïnes, de la ravenissa taliana.

Un dels primers resultats obtinguts en el marc d'aquest projecte, ha estat la identificació del receptor dels BRs. Chory *et al.*¹⁰² descriueren l'any 2000, la unió dels BRs amb una proteïna de membrana (una quinasa) amb dominis rics en leucina (LRR), l'anomenaren BRI1 i actualment, està considerat com el receptor dels BRs.¹⁰³

Concretament els BRs s'uneixen a un domini extracel.lular de BRI1, una regió formada per 25 repeticions riques en leucina (LRR) i 70 aminoàcids localitzats entre la 21ena i la 22ena LRR, sent molt específic per a la unió amb els BRs.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Els estudis que s'estan realitzant actualment van encaminats a intentar obtenir l'estructura tridimensional del receptor, amb el BR ancorat a ell i sense ell.

En la fotografia es mostren dues plantes d'*Arabidopsis*; una d'elles sense cap tipus de modificació genètica i l'altra en que s'ha inhabilitat la resposta de la planta a les hormones de creixement vegetal mitjançant una mutació del gen BRI1. Sense aquesta capacitat de resposta als BRs, la planta no creix. (Fotografia de Daniel Kim)¹⁰⁶



Figura 4

Si bé és cert que en els darrers anys s'ha avançat molt en l'estudi del desenvolupament i creixement de les plantes, tant des d'un punt de vista genètic, com bioquímic, analític..., existeixen encara moltes incògnites en el mecanisme d'acció dels BRs. De tota manera, tots aquests estudis recents posen de manifest la importància dels BRs i el seu interès creixent en la comunitat científica.

Estudiar la interacció BR-receptor sembla ser imprescindible per aprofundir en el coneixement del mode d'actuar d'aquestes hormones. Així, per tal d'obtenir més informació sobre l'estructura tridimensional del receptor (desconeguda fins el moment) serà necessari extreure conclusions a partir de l'estructura dels propis anàlegs esteroidals, considerant que tots ells interaccionen amb el mateix receptor i pels mateixos punts d'unió. Per aquest motiu, es creu interessant abordar la síntesi i avaluació de l'activitat de diferents anàlegs BRs.

3.5. Antecedents en la Secció d'Esteroides

3.5.1. Síntesi: la única via d'obtenció de BRs.

La necessitat de disposar de BRs, bé sigui per a emprar-los per a estudis fisiològics o bé per a aplicar-los en agricultura, així com l'extremadament baixa concentració en la que es troben en el regne vegetal, condueixen al desenvolupament d'estratègies per a obtenir-los per síntesi química.

Els productes de partida per aquestes síntesis són esterols que es poden fàcilment obtenir a partir de recursos naturals i que contenen l'esquelet hidrocarbonat esteroïdal adequat.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, diversos anàlegs d'aquest tipus (22*S*,23*S*-, 22*R*,23*R*-epoxi, 2,3-diacetat...), especialment aquells més assequibles sintèticament i econòmicament que els BRs naturals, han estat sintetitzats i patentats com a nous promotors del creixement vegetal.^{9,10}

Des de l'any 1986, a l'equip s'està treballant en el desenvolupament d'estratègies sintètiques per tal, d'una banda, optimitzar la síntesi de diversos BRs naturals i, de l'altra, obtenir nous anàlegs que permetin aprofundir en el coneixement de la interacció BR-receptor.

Pel que fa referència a aquest segon objectiu i amb la finalitat d'extreure, de forma indirecta, la màxima informació possible del receptor, va ser necessari, d'una banda, desenvolupar un model computacional suficientment robust i convincent que permetés predir l'activitat dels nous anàlegs de forma eficient així com establir-ne relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR). De l'altra, també va caldre posar a punt un bioassaig d'avaluació de l'activitat per així poder obtenir dades de forma homogènia.

3.5.2. *Avaluació de l'activitat dels BRs: els bioassaigs*

Per tal d'avaluar l'activitat biològica dels BRs s'han adaptat i modificat diversos bioassaigs ja existents per a l'avaluació d'altres fitohormones. Inicialment, es va emprar el test del segon internode de la mongeta,¹⁰⁷ (test desenvolupat per a giberel·lines). S'observà com els BRs promouien l'elongació, la divisió cel·lular, el creixement i la curvatura de l'internode.

Posteriorment també s'utilitzaren el bioassaig del primer internode de la mongeta¹⁰⁸ i el test d'inclinació de la làmina d'arròs (*RLIT*),¹⁰⁹ ambdós desenvolupats per a mesurar el creixement induït per les auxines i modificats posteriorment per detectar l'activitat BR.

Altres bioassaigs com el test d'inhibició del pèsol,¹¹⁰ les llavors del rave,¹¹¹ l'hipocotil del tomàquet¹¹¹... han estat molt menys emprats degut als complicats protocols, la manca d'estàndards o la baixa sensibilitat.

Degut al fet que cada un d'aquests bioassaig mesura un macroscòpic diferent (augment en pes de les llavors, en llargària dels internodes, inclinació de la làmina d'arròs...), s'ha observat una gran dependència entre el bioassaig emprat i el valor d'activitat mesurat. Així, compostos actius en un tipus de bioassaig han mostrat activitat marginal en ésser aplicats en altres bioassaigs.^{112,113}

D'entre tots els bioassaigs desenvolupats, el test d'inclinació de la làmina d'arròs (*RLIT*) és el més àmpliament emprat i considerat força específic per a BRs.^{112,113} Mentre el límit de detecció és de 50 ppb per a l'àcid indolacètic, és possible detectar BL (1) en concentracions de l'ordre de 0.5 ppb.

En la bibliografia, es troben descrites dues metodologies per a la realització del *RLIT*. Una d'elles consisteix en treballar amb segments de planta¹¹⁴ i l'altra, amb plantes senceres d'arròs.¹¹⁵

A l'equip,^{61,116} s'ha desenvolupat i adaptat el bioassaig de la làmina d'arròs amb planta sencera emprant la varietat Bahía, originària del Delta de l'Ebre. S'ha emprat amb èxit per avaluar l'activitat de més de 200 anàlegs BRs i ha resultat ser molt eficient en quant a sensibilitat, reproductibilitat i repetibilitat.^{61,116-124}

3.5.3. Relacions estructura-activitat

3.5.3.1. Relacions estructura-activitat (SAR)

Mitjançant la comparació de les dades d'activitat de diversos anàlegs BRs sintetitzats es proposà en un principi certes relacions qualitatives estructura-activitat (SAR).^{27,60,125} D'entre les més acceptades en la comunitat científica, es va suggerir que els requeriments estructurals mínims per a què un BR presentés activitat eren a) el 2 α ,3 α -diol *cis* veïnal de l'anell A, b) la unió A/B *trans* entre els anells A i B, c) la funcionalitat oxigenada a C6, bé sigui lactona o cetona i d) el 22R,23R-diol de la cadena lateral.

De tota manera, a l'equip d'Esteroides de l'Institut Químic de Sarrià es va pensar que cada un d'aquests requeriments no podia ser considerat independentment de la resta de la molècula. Es proposà que el que realment importava era la disposició tridimensional de la molècula, no podent-se valorar cada un dels grups funcionals per separat.

Per tal de validar aquesta hipòtesi es decidí sintetitzar **5**, anàleg que no compleix els requeriments estructurals previstos (funcionalitats 2 β ,3 β -diol i unió A/B *cis*) però que si disposa d'una bona disposició tridimensional. En la Figura 5 es pot observar una bona superposició entre **5** i la homobrassinolida (**4**), especialment pel que fa referència a les regions polars:

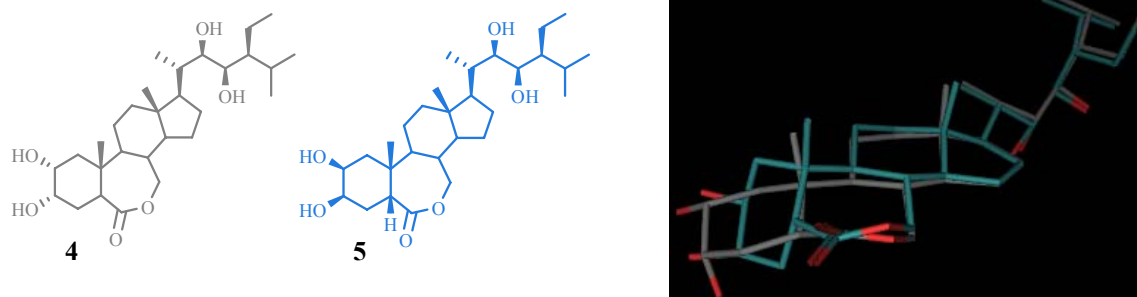


Figura 5

L'elevada activitat mostrada per **5** en el *RLIT*^{126,127} demostrà la importància de la disposició tridimensional dels anàlegs BRs, fent necessari el desenvolupament d'un model QSAR per tal d'intentar establir correlacions entre l'estructura d'una molècula i la seva activitat com a promotor del creixement vegetal.

3.5.3.2. Relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR)

Tot i que l'anàlisi de les relacions estructura-activitat (SAR) s'inicià probablement fa més de 100 anys, el concepte de correlacionar quantitativament activitats i estructures (QSAR) s'atribueix a Hansch i col.laboradors i data de finals dels 60.¹²⁸⁻¹³⁰

En els darrers anys, s'han desenvolupat multitud d'estudis QSAR, especialment en el camp del disseny de fàrmacs, per tal d'aprofundir en el coneixement de la interacció entre una molècula biològicament activa i el seu receptor i així, poder predir i escollir noves molècules actives.¹³¹⁻¹³⁵

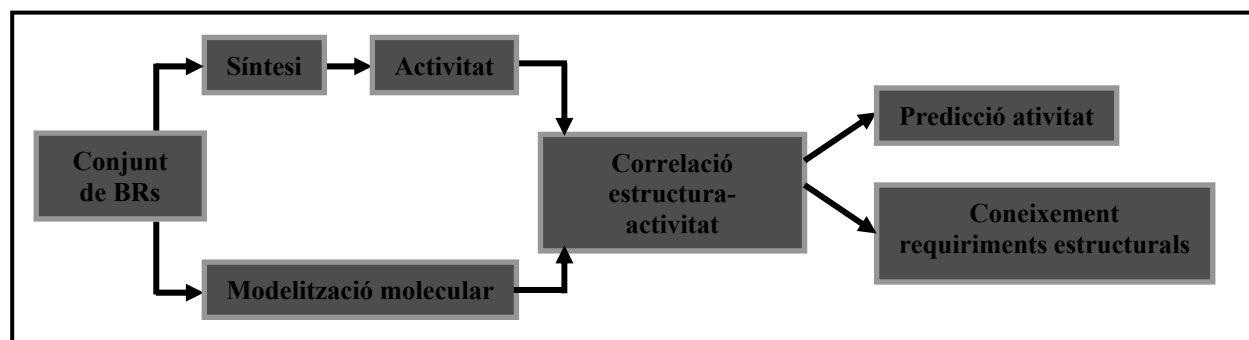
A l'equip, partint de les dades d'activitat (avaluades totes elles en el *RLIT*) d'uns 20 anàlegs BRs, s'ha desenvolupat un model QSAR amb descriptors GRID,¹³⁶ suficientment robust com per predir l'activitat dels diversos anàlegs, obtenir més informació sobre l'esmentada interacció BR-receptor i dissenyar nous compostos interessants,^{61,137} aconseguint-se d'aquesta manera, reduir significativament l'esforç sintètic.

Així, mitjançant tècniques de modelització molecular, es va poder establir una bona correlació entre l'activitat d'un compost i les càrregues electrostàtiques d'aquest.¹²⁶ Emprant la metodologia GRID es va trobar que la formació de ponts d'hidrogen juga un paper important en la interacció entre el BR i la proteïna receptora.^{61,137,138}

Aquesta tècnica consisteix en situar la molècula d'estudi, optimitzada prèviament per modelització, en l'interior d'una malla tridimensional i calcular l'energia d'interacció entre la sonda i el BRs per cada un dels punts de la malla, recorrent així l'espai tridimensional. Els mapes obtinguts indiquen les regions de l'espai que presenten una alta probabilitat d'interacció. En l'equip, els mapes de GRID que més s'han estudiat i que millors resultats han proporcionat han estat aquells obtinguts quan s'ha emprat com a sonda la molècula d'H₂O, que és tant donadora com acceptora de pont d'hidrogen. Donada la bona correlació observada entre la facilitat de formar ponts d'hidrogen i l'activitat dels BRs, es suggerí que aquest tipus d'interacció era una de les possibles entre BR i receptor.

3.5.4. Resultats obtinguts fins el moment

Considerant que, tal i com s'ha comentat anteriorment, no es coneix l'estructura tridimensional del receptor, ha estat i és necessari obtenir informació sobre aquest a partir de la comparació de l'estructura i les dades d'activitat dels diferents anàlegs avaluats:



Esquema 2

Un estudi comparatiu entre la BL (1), uns 20 anàlegs i l'antagonista KM-01⁶¹ va permetre l'any 1998 suggerir que les zones d'interacció essencials per tal que un BR expressi activitat són: la zona corresponent als hidroxils en C₃ i C₂₃ i la part alta del carbonil lactònic de l'anell B (àrees senyalades en vermell). D'altra banda, les zones corresponents als hidroxils en C₂ i C₂₂ i la part baixa del carbonil (àrees senyalades en blau) semblen no ser tan importants per desencadenar activitat.

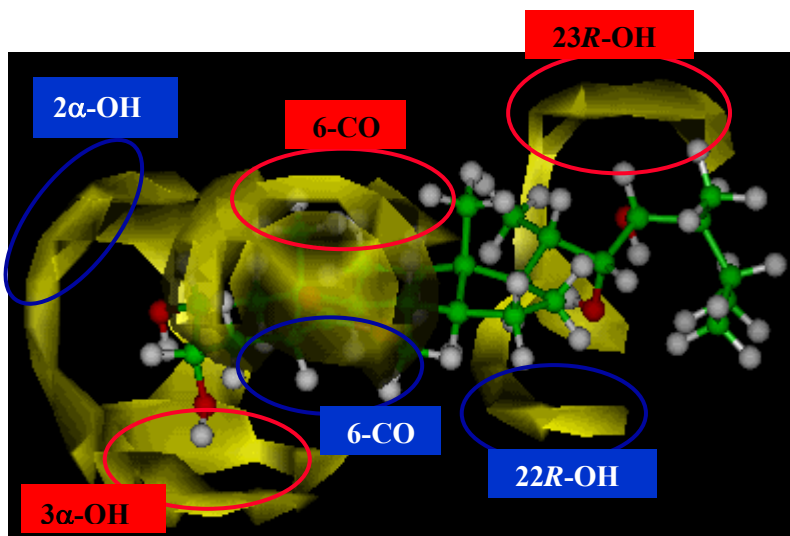


Figura 6

A l'equip, s'han sintetitzat anàlegs BRs amb modificacions en els 4 hidroxils de la BL, tant eliminant-los selectivament, com canviant la seva configuració o substituint-los per altres funcionalitats. També s'han realitzat modificacions en la lactona de l'anell B, substituint-la per un grup cetònic, un hemiacetal, un grup α o β -hidroxil i un èter cíclic. S'ha modificat la fusió dels anells A i B de *trans* a *cis* i s'ha substituït el *S*-metil en C₂₄ de la BL, per un *R*-metil (cadena d'ergostà), un *S*-etil (cadena d'estigmastà) i per un hidrogen (cadena de colestà).^{116,137-146}

Recentment, s'ha canviat cada una de les funcionalitats hidroxíliques de la 28-homobrassinòlida (**4**) per grups acceptors (cetona, azida, fluor...) o donador de pont d'hidrogen (amina). A través de l'avaluació de les dades d'activitat d'aquests anàlegs, s'evidencia com els hidroxils de l'anell A ($2\alpha,3\alpha$ -diol) actuen com acceptors de pont d'hidrogen, mentre que es suggereix com els de la cadena lateral ($22R,23R$ -diol), ho farien com a donador en la interacció BR-receptor.^{117,147}

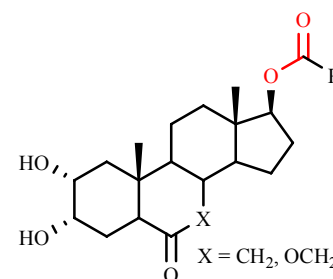
De tota manera, la dificultat que suposa la construcció de la cadena lateral, amb 2 centres quirals consecutius (obtinguts mitjançant glicolització quiral), encareix enormement la síntesi d'aquests anàlegs.

En la recerca de nous anàlegs BRs actius amb millor relació cost sintètic/activitat, s'han desenvolupat els anàlegs BRs androstànics.

3.6. Els anàlegs androstànics d'interès

3.6.1. Avantatges i inconvenients dels androstants

Els anàlegs androstànics es caracteritzen per tenir una funcionalitat èster a la cadena lateral, que es pot fàcilment obtenir a través d'una esterificació entre l'esquelet esteroidal, degudament funcionalitzat, i un àcid carboxílic (cadena lateral).



Esquelet androstànic

Aquesta modificació comporta a) la desaparició de la regió hidrofòbica en el carboni 21, b) la substitució de C20 per un oxigen, c) el canvi en la geometria de C22, de tetraèdrica (sp^3) a planar (sp^2) i d) la substitució d'un grup hidroxílic (22-OH) per un cetònic.

Tanmateix, la síntesi d'androstans presenta avantatges respecte a la d'altres anàlegs BRs:

- Aquests anàlegs permetran aprofundir en l'estudi de la importància de la part hidrofòbica de la cadena lateral, així com també de la forma d'actuar del 22*R*,23*R*-diol. Sembla relativament senzill introduir canvis en aquesta regió, regió difícilment modificable en els altres tipus d'anàlegs BRs.
- La cadena lateral dels anàlegs androstànics té, com a molt, 2 centres quirals. D'aquesta manera es redueix a la meitat el nombre de centres quirals presents a la cadena, amb la qual cosa, el cost de síntesi disminueix considerablement.
- La ruta sintètica dels anàlegs androstànics és convergent, amb les avantatges que això comporta des del punt de vista de rendiment global i cost sintètic.
- En la síntesi de derivats androstànics, s'evita la glicolització quiral de la cadena lateral. Aquest fet contribueix enormement en la disminució del cost sintètic ja que s'evita l'ús de lligant quiral (necessari per a obtenir una bona estereoselectivitat), reactiu limitant en quant a cost econòmic.

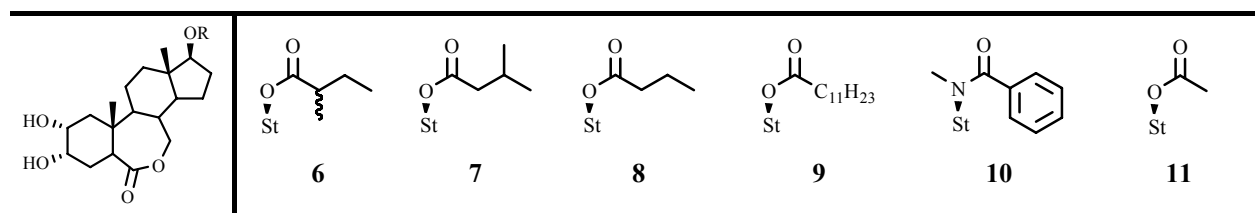
3.6.2. Antecedents en la síntesi de BRs androstànics

Fins el moment, només tres grups científics han estudiat i aprofundit en la síntesi i avaluació de l'activitat de BRs androstànics: el Departament d'Esteroides de l'Acadèmia de Ciències de Praga, la Secció d'Esteroides de l'Institut Químic de Sarrià i, molt més recentment, la Secció de Ciències Aplicades de l'Escola Superior d'Agricultura de la Universitat de Kyoto.

3.6.2.1. Departament d'Esteroides de l'Acadèmia de Ciències de Praga.

El grup d'Esteroides de l'Acadèmia de Ciències de Praga, dirigit per L. Kohout, va ser el pioner en la síntesi d'androstans amb activitat BR, datant-se els primers estudis de finals dels anys 80.¹⁴⁸

En general, totes les investigacions anaren encaminades a la síntesi d'androstans amb cadenes d'àcids alifàtics comercials (per exemple, **6-10**):¹⁴⁹⁻¹⁵³



Taula 2

Si bé, tots aquests anàlegs van mostrar activitat marginal en ser avaluats en el *RLIT*, s'observà certa activitat d'alguns d'ells en ésser aplicats en el bioassaig del segon internode de la mongeta. Aquest és un exemple clar de la dependència del valor d'activitat del bioassaig emprat.

Amb la finalitat d'obtenir anàlegs androscànics actius, es va establir una estreta col·laboració entre aquest departament de l'Acadèmia de Ciències de Praga i la Secció d'Esteroides de l'IQS, col·laboració que es manté fins a l'actualitat i que ha aportat i està aportant excel·lents resultats.

3.6.2.2. Col·laboració Acadèmia de Ciències de Praga i IQS

Una de les primeres idees que es va suggerir en el transcurs de l'esmentada col·laboració consistia en atribuir la manca d'activitat dels anàlegs **6-11** a la absència de funcionalitat en α de carbonil de la cadena lateral (la que correspondria a l'hidroxil en C₂₃ de la BL), una de les que es creu indispensable per expressar activitat.

Aquesta idea es va veure recolzada per la superposició entre les zones de major probabilitat de formació de pont d'hidrogen de la BL (en vermell) i les de l'anàleg **7** (en groc). Es podia observar clarament la falta d'una regió polar en α de carbonil de **7**.

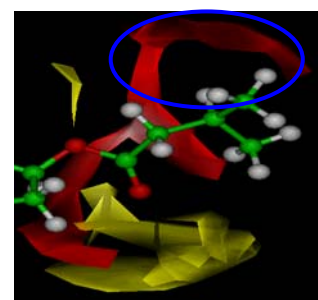


Figura 7

Es proposà introduir una funcionalitat polar en α de carbonil, bé sigui un grup amina (com per exemple l'anàleg **12**) o un grup hidroxil (anàleg **13**). En els dos mapes de GRID següents es pot observar com la superposició amb la BL millorava considerablement.

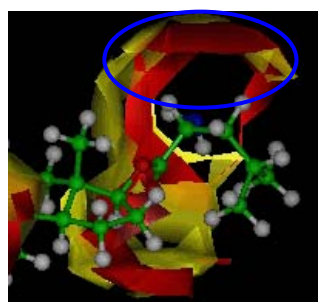
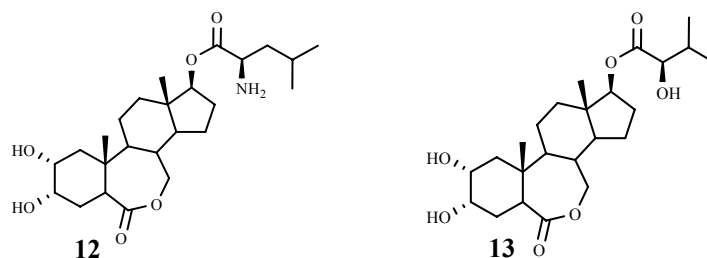


Figura 8

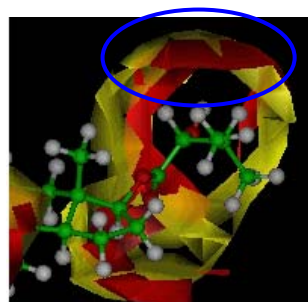
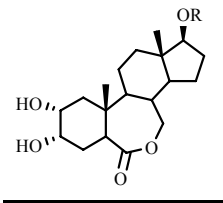
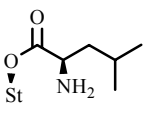
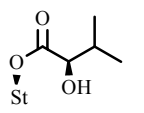
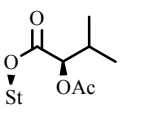
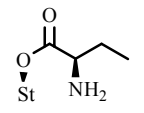
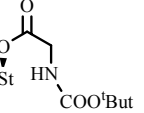
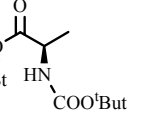
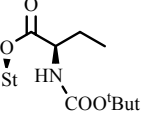
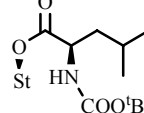


Figura 9

Es considerarà interessant, per tant, obtenir anàlegs androscànics amb diferents cadenes alifàtiques laterals però que continguessin una funcionalitat amina o hidroxil en α de carbonil.

Fins a l'actualitat, s'han obtingut i avaluat en el *RLIT* els següents amino i hidroxiderivats androscànics, l'activitat dels quals, expressada com a $-\log[\text{dosi}_{45^\circ}(\mu\text{g})]$, es mostra entre parèntesi:^{118-121,154}

	 12 (-)	 13 (0.14)	 14 (0.16)		
	 15 (-)	 16 (-)	 17 (-)	 18 (0.81)	 19 (1.03)

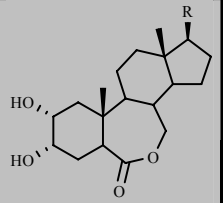
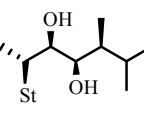
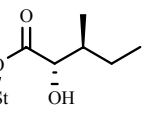
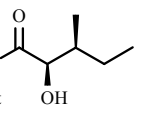
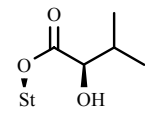
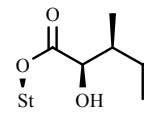
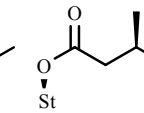
Taula 3

En la sèrie corresponent als derivats cetònics (segona fila) es pot observar com, a mesura que augmenta la llargària de la part hidrofòbica de la cadena lateral, l'activitat dels anàlegs obtinguts també és major (compostos **15-20**).

De tota manera, s'observa també com l'activitat decreix considerablement quan es continua incrementant la regió apolar en la part terminal de la cadena lateral (anell aromàtic en el cas de l'anàleg **20**). Aquest descens en l'activitat sembla ser degut a que **20** supera el volum d'exclusió molecular, indicant, doncs, que els anàlegs androstànics mostraran major activitat quan més semblants siguin les seves cadenes laterals a la de la BL.

3.6.2.3. La Secció de Ciències Aplicades de l'Escola Superior d'Agricultura de Kyoto

L'any 2004 Uesusuki *et al.*¹⁵⁵ sintetitzaren anàlegs androstànics amb diferents cadenes laterals. A continuació es mostren alguns dels compostos obtinguts per aquest grup, així com la activitat que obtingueren, juntament amb la de la BL (**1**):

	 1	 21	 22	 13	 23	 24
	-log[dosi_{50%}](µg)]	7.92	3.64	4.84	3.96	4.43
-log[dosi_{50%}](µg)] (normalitzat)	1.00	0.46	0.61	0.50	0.56	residual

Taula 4

El grup de Uesusuki *et al.*¹⁵⁵ ha expressat les activitats com a $-\log[\text{dosi}_{50\%}(\mu\text{g})]$, que correspon al valor d'activitat igual al 50% del màxim d'activitat del BR. A l'equip, en canvi, l'activitat s'expressa com a $-\log[\text{dosi}_{45\%}(\mu\text{g})]$, però es va observar que els dos valors d'activitat són molt semblants ja que el màxim d'activitat per molts BRs correspon a una inclinació d'aproximadament 90° en el *RLIT*.^{61,116}

A la taula anterior, també s'inclouen valors d'activitat normalitzats prenent la BL (**1**) com a referència. Cal considerar que en els bioassaigs duts a terme pel grup de Uesusuki *et al.*¹⁵⁵, a diferència dels bioassaigs fets a l'equip, els anàlegs es coapliquen amb l'auxina àcid indol-3-acètic (IAA), mostrant un efecte sinèrgic que s'observa en el *RLIT*. Aquest fet incrementa notablement les dades d'activitat i impossibilita comparar directament aquestes amb les dades d'activitat de la Secció d'Esteroides de l'IQS.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'anàleg androscànic **13** també va ser sintetitzat i avaluat en l'equip.¹¹⁸ Si bé és cert que la puresa amb la que es va obtenir era del 90%, el seu valor d'activitat expressat com a $-\log[\text{dosi}_{45\%}(\mu\text{g})]$ i normalitzat respecte de la BL només va ser de 0.04.

A partir dels resultats obtinguts per aquest grup, se'n pot desprendre que:

- Alguns androscànics també tenen una elevada activitat brassinoesteroïdal, de l'ordre de molts BRs naturals,¹⁰ com és el cas de la 24-epibrassinòlida ($-\log[\text{dosi}_{50\%}(\mu\text{g})]^* = 0.47$)^{61,156} i la 28-homocastasterona ($-\log[(\text{dosi}_{50\%}(\mu\text{g}))^*] = 0.52$).^{61,156}
- El carbonil de l'èster i l'hidroxil de α de la cadena en els anàlegs androscànics mimetitzen bé els hidroxil de C₂₂ i C₂₃ de la brassinòlida.
- Comparant les activitats de **21** i **22**, s'observa que els anàlegs androscànics que tenen configuració *S* a la cadena lateral són més de 10 vegades menys actius que els isòmers *R*.
- Comparant les activitats de **22** i **24**, es confirma que l'hidroxil de C₂₃ és molt important de cara a desencadenar activitat BR.

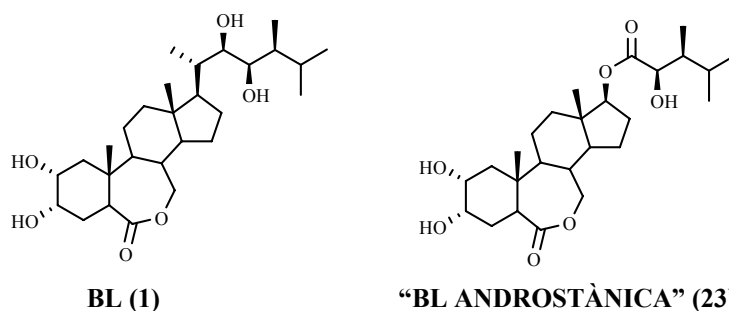
L'elevada activitat d'alguns anàlegs androscànics confirma que les hipòtesis realitzades sobre la similitud dels brassinoesteroïdes i els anàlegs androscànics és vàlida. D'aquesta manera, s'obre la porta a tota una nova família d'anàlegs BRs actius i més econòmics que els BRs. A més, la versatilitat d'obtenció d'anàlegs amb diferents cadenes laterals permetrà estudiar la influència en l'activitat de modificacions en aquesta regió de l'esquelet esteroïdal.

3.6.3. Noves propostes sintètiques

Tenint en compte tots els resultats sobre anàlegs androscànics obtinguts fins el moment, es va creure interessant aprofundir en la síntesi i avaluació d'activitat d'altres anàlegs d'aquest tipus, amb la finalitat d'obtenir BRs amb més bona relació cost sintètic-activitat i disposar de més dades per ampliar la informació de que es disposa sobre la interacció BR-receptor.

3.6.3.1. La "brassinòlida androscànica"

Amb la idea d'establir inequívocament el potencial dels androscànics com a promotors del creixement vegetal, es proposa abordar la síntesi de **23**, l'anàleg androscànic que millor mimetitzaria la BL (**1**), el BR natural més actiu conegut fins el moment.



Esquema 3

Si bé es preveu que la síntesi de la cadena lateral de **23** serà complicada, degut principalment als dos centres quirals consecutius (2'*R*-hidroxil i 3'*S*-metil), es creu que l'esforç sintètic compensaria el fet d'obtenir un anàleg androscànic força actiu. En cas de disposar de **23**, es podria avaluar en el *RLIT* i valorar la participació en l'activitat de la funcionalitat èster a C17, per comparació amb **1**.

3.6.3.2. Modificacions a l'anell A

Tot i que fins el moment, la majoria d'anàlegs androscànics obtinguts contenen funcionalitats hidroxiliques a C2 i/o C3, es creu interessant estudiar la influència en l'activitat d'altres grups funcionals com azides, carbonils, fluors... Aquestes modificacions podrien, d'una banda, afavorir la formació de ponts d'hidrogen amb el receptor i, de l'altra, retardar els processos de degradació que pateixen els anàlegs naturals. Ambdós casos es traduirien en un augment en l'activitat dels anàlegs obtinguts.¹¹⁷

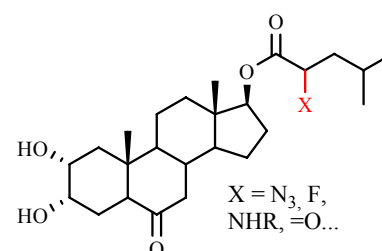
A més, la introducció del 2 α ,3 α -diol ha estat, des de sempre, una de les etapes claus i més problemàtiques en la síntesi dels diferents BRs androscànics. El reactiu més eficient i més emprat per a dur a terme aquesta glicolització és el OsO₄. De tota manera, l'elevat cost econòmic i toxicitat, així com les tedioses separacions del seu corresponent diastereòmer 2 β ,3 β -diol, que es forma en aquest tipus de compostos en una proporció considerable, suggereixen la necessitat d'estudiar la introducció d'altres funcionalitats a l'anell A.

Així doncs, aprofitant els resultats recentment obtinguts en l'equip,¹¹⁷ en els quals s'evidenciava el fet que els hidroxils en C2 i C3 actuen com a acceptors de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor, es pretén estudiar la síntesi de compostos androscànics 2,3-dicetònics o 2 α ,3 α -difluorats.

3.6.3.3. Anàlegs amb diferents funcionalitats en α de l'èster

Tal i com s'ha comentat anteriorment, una de les principals avantatges dels androscans és la versatilitat i facilitat de síntesi d'anàlegs amb modificacions a la cadena lateral, fet que els fa adients per estudiar la forma d'interaccionar de l'hidroxil en C23 de la BL (el que correspondria a la posició en α de l'èster androscànic) amb el receptor.

En treballs anteriors duts a terme a l'equip,¹¹⁷ es va suggerir que tant l'hidroxil en C₂₂ com el de C₂₃ de la BL actuaven com a donadors de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor. De tota manera, el fet que aquesta hipòtesi estigui basada en l'avaluació de l'activitat d'un reduït nombre d'anàlegs estigmastànics, fa necessària l'obtenció d'altres derivats BRs que permetin corroborar l'esmentada hipòtesi.



Per tan, caldrà obtenir, mesurar i comparar l'activitat de diversos derivats amb diferents funcionalitats en α de carbonil, funcionalitats que només puguin actuar com acceptores de pont d'hidrogen (cetona, fluor, azida) i d'altres que també en puguin ser donadores (amines substituïdes)

També es pretén comparar l'activitat d'anàlegs 2'R i 2'S substituïts per tal de confirmar que en els androstans, de la mateixa manera que per la resta de BRs, la configuració *R* en les funcionalitats polars de la cadena lateral és millor que la *S*.

Tenint en compte que, a l'equip, **19** és l'androstà que major activitat ha mostrat fins el moment, s'emprarà la cadena de leucina per obtenir els àcids α -funcionalitzats que s'anclaran posteriorment a l'esquelet esteroidal.

3.6.3.4. Anàlegs escollits per mètodes computacionals

De tota manera, la utilitat més interessant dels androstans és, sens dubte, el fet de poder obtenir anàlegs amb millors relacions cost sintètic-activitat.

Per tal d'intentar optimitzar aquesta relació, es proposà ancorar a l'esquelet esteroidal cadenes d'àcids carboxílics comercials. Així, a l'equip es realitzà un estudi computacional, mitjançant tècniques de modelització molecular,^{157,158} amb la finalitat de seleccionar, entre gairebé 7500 àcids comercials, les cadenes idònies per a ésser ancorades.

A partir dels resultats obtinguts en aquest estudi, es pretenen sintetitzar anàlegs androstànics amb les cadenes d'àcids carboxílics comercials que millors resultats varen donar en l'esmentat estudi computacional.

B. OBJECTIUS

Mitjançant la **síntesi de nous BRs androstànics** es pretén:

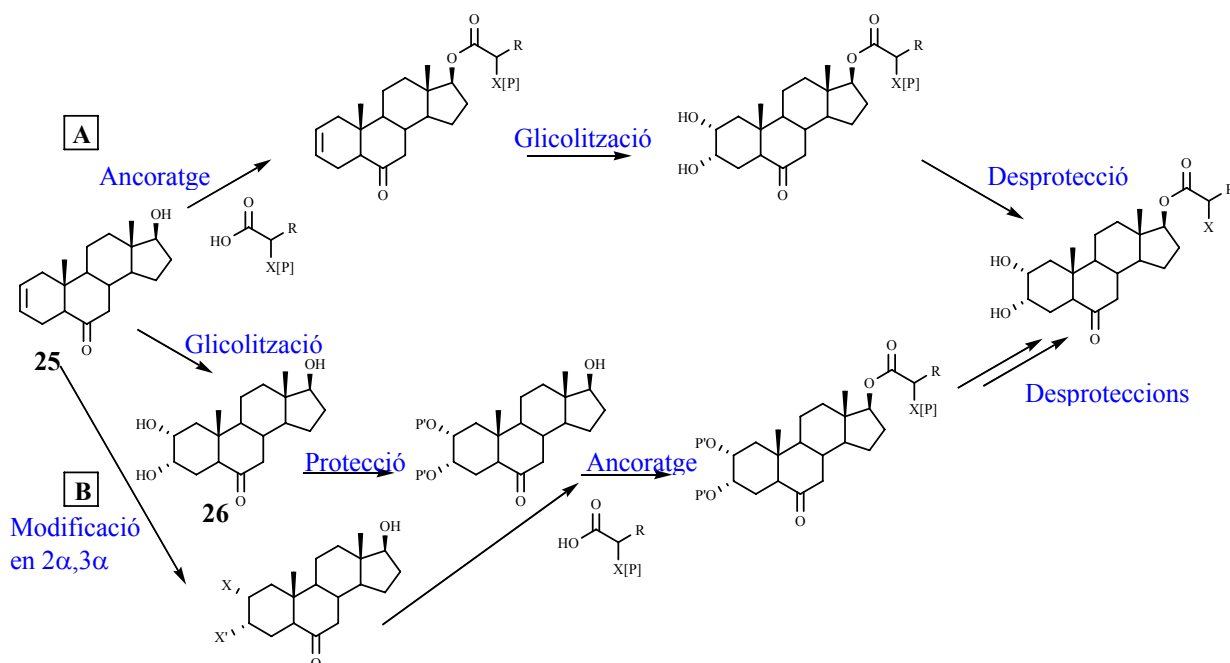
- ▶ Constatar l'ús potencial dels androstans com a promotors del creixement vegetal.
- ▶ Aprofundir en el coneixement del receptor dels BRs, concretament en la forma d'interaccionar dels diferents hidroxils dels BRs, en la importància de la part apolar terminal de la cadena lateral i en la influència de la posició de la funcionalitat polar en aquesta regió en la interacció BR-receptor.
- ▶ Obtenir anàlegs amb bona relació cost sintètic-activitat, bé sigui estudiant la introducció de diferents difuncionalitats a l'anell A, sintetitzant anàlegs amb cadena hidrocarbonada derivada de l'àcid 4'-metipentanoic 2'funcionalitzat com també emprant cadenes laterals d'àcids carboxílics comercials.
- ▶ Validar la metodologia computacional emprada per al disseny de nous anàlegs androstànics actius.

C. DISCUSSIÓ DE RESULTATS

1. ESTRATEGIA SINTÈTICA GENERAL

Tal i com s'ha comentat prèviament, l'objectiu general consisteix en sintetitzar derivats BRs androscànics. Amb aquesta finalitat es poden plantejar dues estratègies sintètiques partint de l'hidroxienona **25**.

La primera estratègia consisteix en esterificar la cadena lateral en primer lloc per funcionalitzar l'anell A posteriorment (*via A*). La segona es basaria en deixar com a últim pas sintètic l'ancoratge de la cadena lateral d'interès amb l'esquelet **26**, prèviament funcionalitzat (*via B*):



Esquema 4

L'estratègia **A** permet l'obtenció de diversos anàlegs amb una mateixa cadena lateral i modificacions a l'esquelet esteroidal (diversitat a l'anell A i B). Un cop acoblada la cadena, es poden introduir diferents funcionalitats tant en l'anell A (Δ^2 , 2 α ,3 α - o 2 β ,3 β -diol) com a l'anell B (cetona, lactona). A més, s'eviten els dos passos sintètics corresponents a la protecció i desprotecció del diol de l'anell A. És per això que, fins ara, a l'equip s'ha emprat aquesta estratègia per a la síntesi de tots els anàlegs androscànics obtinguts fins el moment.

De tota manera, la síntesi d'aquests compostos va generar molts problemes en la separació dels diferents isòmers formats en la glicolització de l'anell A, no podent-se obtenir, en alguns casos, pureses superiors al 90%.¹¹⁸⁻¹²⁰ A raó d'aquesta dificultat en la separació dels productes finals, s'ha optat per canviar l'estratègia sintètica, proposant-se l'ús de la via **B** per a assolir els objectius plantejats en aquesta tesi.

L'estratègia **B** permet obtenir anàlegs androscànics amb diferents cadenes laterals però tots ells amb la mateixa funcionalitat 2 α ,3 α -diol a l'anell A (diversitat a la cadena lateral). Aquesta segona estratègia presenta com a principal avantatge que només cal posar a punt una vegada la metodologia de separació d'isòmers del diol de l'anell A.

Un cop fixades les condicions òptimes per a l'obtenció de **26** amb una elevada puresa, es podrà realitzar el procediment de manera sistemàtica i no caldrà modificar-lo en funció de la cadena lateral que hi hagi acoblada. Restarà només treballar en la funcionalització de les cadenes laterals i en les reaccions d'esterificació de les cadenes laterals per obtenir nous anàlegs BRs androscànics.

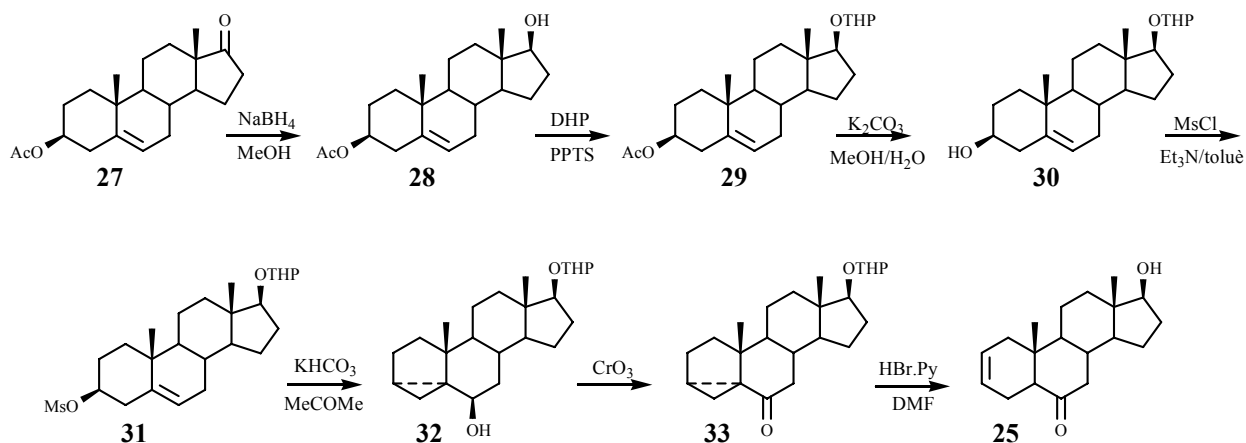
Aquesta estratègia és també extensible al compostos que s'obtinguin amb modificacions a C2 i C3, un dels altres objectius d'aquesta tesi.

Cal destacar que s'iniciarà l'estudi amb la síntesi d'anàlegs amb funcionalitat cetònica a l'anell B. Un cop avaluats en el *RLIT*, s'abordarà la lactonització de l'anell B d'aquells BR androscànics que mostrin una activitat interessant en l'esmentat bioassaig.

2. OBTENCIÓ DEL PRODUCTE DE PARTIDA 25

25 es va obtenir a l'equip després de 7 etapes sintètiques, partint del compost comercial **27** i amb un rendiment global del 54%.^{119,120}

La síntesi s'inicia amb la reducció de la funcionalitat 17-cetona a 17 β -hidroxil (**28**), seguit de la seva corresponent protecció en forma de tetrahidropiranilèter (**29**). A continuació, es saponifica el 3 β -acetat i l'hidroxil lliure **30** s'activa en forma de messilat (**31**), el qual per solvolisi en acetona aquosa i KHCO_3 rendeix el ciclopropilalcohol **32**. Posteriorment, l'oxidació de Jones condueix a la formació de la ciclopropilcetona **33** la qual, per tractament amb HBr/Py , rendeix el producte d'interès **25**:



Esquema 5

Tanmateix, en els últims anys, la síntesi del producte de partida **25** s'està realitzant en col·laboració amb l'Acadèmia de les Ciències de Praga, motiu pel qual no s'inclou en aquesta tesi. Aquest grup aconseguí adaptar la síntesi per a la producció de **25** a escala de kg. En essència, l'estratègia sintètica és pràcticament la mateixa, només modificant alguns grups protectors: $-\text{OBz}$ enlloc de $-\text{OTHP}$ a C17 (ja que els reactius emprats són més econòmics) i TsO- enlloc de MsO- a C3 (ja que els tosilderivats solen ser més estables que els corresponents mesilderivats). També modificaren algunes condicions de reacció (HCl enlloc de K_2CO_3 per a desprotegir el 3 β -acetat i LiI o LiCO_3 enlloc de HBr/Py en la última etapa de l'estratègia).

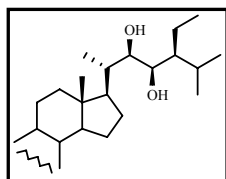
3. FUNCIONALITZACIÓ DE L'ESQUELET ANDROSTÀNIC

3.1. Introducció

Considerant els valors d'activitat de diversos anàlegs estigmastànics, colestànics, androstànics... obtinguts fins el moment,^{61,116,117,137,147} es pot observar com la funcionalitat 2 α ,3 α -diol és la més freqüent entre els anàlegs actius. A més, aquest diol es troba present en la majoria de BRs naturals.

De tota manera, es creu interessant la introducció d'altres funcionalitats diferents al diol a l'anell A per tal d'aprofundir en el coneixement de la interacció BR-receptor. A més, la síntesi de la funcionalitat 2 α ,3 α -diol presenta dos inconvenients: d'una banda, l'ús de tetròxid d'òsmi, d'elevat cost econòmic i alta toxicitat i, de l'altra, la ja esmentada dificultat de separació dels corresponents diastereòmers 2 β ,3 β -diols.

En treballs anteriors duts a terme a l'equip,¹¹⁷ s'observà una elevada activitat dels derivats amb substituents fluor (**34**, **35** i **36**), cetona (**37** i **38**), azida (**39** i **40**) a C₂ i C₃, en contrast amb les activitat marginals mostrades pels corresponents aminoanàlegs **41-43**. Aquests resultats van permetre concloure que els hidroxils presents en l'anell A actuaven com a acceptors de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor. En la següent taula es mostren les activitats dels anàlegs anteriorment esmentats, així com també, a títol comparatiu, la dels anàlegs referibles amb un sol hidroxil (**44** i **45**) o dos hidroxils (**4** i **46**) a l'anell A.



44 (1.91)	45 (1.47)	34 (2.23)	35 (3.22)	37 (>2)	39 (0.65)	40 (1.76)
46 (2.80)	4 (3.32)	41 (-)	42 (-)	36 (1.47)	38 (1.53)	43 (-)

Taula 5

Els més que satisfactoris valors d'activitat obtinguts en derivats amb una sola funcionalitat a l'anell A, on un dels dos 2 α ,3 α -hidroxils era substituït per funcionalitats fluor o cetona, van fer pensar que la síntesi de 2 α ,3 α -difluor i 2,3-dicetona podria ser una bona alternativa als 2 α ,3 α -diol anàlegs.

3.2. Estudi computacional dels anàlegs amb modificacions a l'anell A

Abans de procedir a la síntesi dels esmentats anàlegs es decideix estudiar com aquestes modificacions afecten l'estructura tridimensional de la molècula, fet que podria dificultar la interacció amb el receptor i decidir, per tant, si la seva síntesi es creu convenient o no. Es proposa valorar la similitud (mitjançant alineaments flexibles) entre cada un dels nous anàlegs i la conformació activa d'un BR de referència d'elevada activitat.

3.2.1. La conformació activa

Tots els models QSAR estan basats en la hipòtesi que molècules similars mostren propietats semblants. Per tant, serà interessant escollir un *lead* (cap de sèrie), BR de referència d'elevada activitat, i comparar l'estructura dels futurs nous anàlegs amb la d'aquest, per així intentar predir qualitativament futurs valors d'activitat.

Si bé és cert que tots els compostos tenen un cert grau de flexibilitat, només una de les conformacions (la conformació activa) o grup restringit de conformacions serà capaç d'unir-se amb el receptor i desencadenar activitat.

Per tal de determinar aquesta conformació activa, Marshall *et al.*¹⁵⁹ proposaren comparar les diferents conformacions de les molècules bioactives i, a partir de les característiques comuns en totes elles, identificar-ne l'activa per a cada una d'elles. Segons les propietats fisico-químiques emprades en la comparació (distància entre grups funcionals, superposició de volums...) i depenent de la manera com es generen els conformers, es poden obtenir conformacions actives considerablement diferents.^{61,126,157,160}

A l'equip s'ha escollit la conformació de **2** (Figura 10) que millor superposició ha mostrat amb la BL (**1**).¹⁶⁰ És aquesta conformació la que es prendrà com a referència per a comparar-hi tots els diferents anàlegs d'interès.

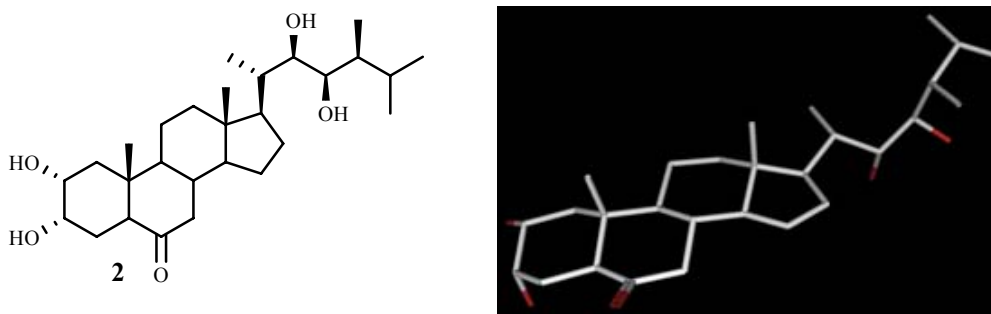


Figura 10

3.2.2. L'alineament flexible

Una de les maneres d'esbrinar els requeriments estructurals per desencadenar activitat és realitzar l'alineament de la molècula (model) que se sap que té activitat amb la molècula d'estudi.¹⁶¹⁻¹⁶³ Les metodologies basades en l'alineament tridimensional per trobar els lligands biològicament actius parteixen de la condició que, quan dos lligands tenen semblant activitat i s'uneixen al receptor de manera similar, s'ha de produir un bon alineament i, per tant, es pot obtenir informació sobre l'estructura del centre actiu del receptor.

Per tal de quantificar la semblança entre la conformació activa de **2** (Figura 10) i les diverses conformacions dels futurs nous anàlegs, es realitzaran alineaments flexibles emprant el programa MOE¹⁶⁴ amb el *Force Field* MMFF94.¹⁶⁵

Una de les maneres de realitzar l'alineament flexible és fixant el model (**2**) i permetre flexibilitat a l'anàleg, d'aquesta manera s'aconsegueix obtenir un conòrmer que presenti *a priori* propietats similars al model emprat. La metodologia utilitzada consisteix en generar conformacions del nou anàleg (mitjançant la rotació a l'atzar dels diferents enllaços) i mesurar la similitud de cada una d'elles amb la conformació activa de **2**, prèviament fixada.

En general, s'obtindrà millor alineament quan a) menor sigui l'energia mitjana de la tensió de les molècules, b) més semblants siguin el seu volum i la distribució espacial i c) major solapament s'obtingui en els grups aromàtics (en cas que hi siguin presents) i en les funcionalitats donadores i acceptores de pont d'hidrogen d'ambdues molècules.

Un cop el càlcul ha finalitzat, el programa MOE genera una base de dades on es mostra:

- mol: les distribucions espacials dels millors alineaments.
- U: l'energia mitjana de la tensió de les molècules en kcal/mol. Es calcula realitzant la suma de l'energia potencial individual dividit pel nombre de molècules.
- S: el resultat de la distribució espacial de l'alineament que té en compte U i els paràmetres de tensió, volum, distribució, presència de grups aromàtics i funcionalitats donadores o acceptores de pont d'hidrogen. Valors baixos indiquen millor solapament.

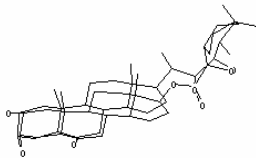
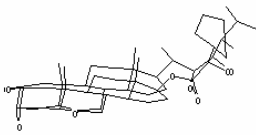
	mol	U	S
1		15.8091	209.8248
2		15.9008	210.2340

Figura 11

3.2.3. Superposicions amb la castasterona (2)

En la Figura 12 i Figura 13 es poden observar, respectivament, les superposicions entre la castasterona (2, en blanc) i els corresponents anàlegs colestànics que només difereixen d'ella per tenir funcionalitats dicetona (47) o 2 α ,3 α -difluor (48) a l'anell A enlloc del 2 α ,3 α -diol (en marró). Es pot veure com aquestes modificacions només introdueixen lleugers canvis conformacionals, restant força inalterada la resta de la molècula. Es considera interessant, per tant, obtenir anàlegs androstànics amb funcionalitats 2,3-dicetona i 2 α ,3 α -difluor.

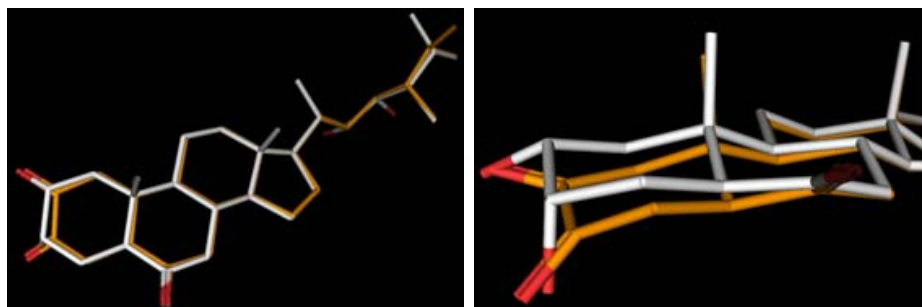
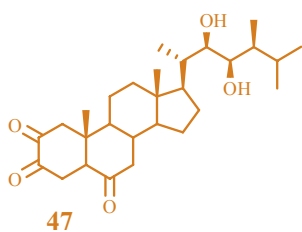


Figura 12

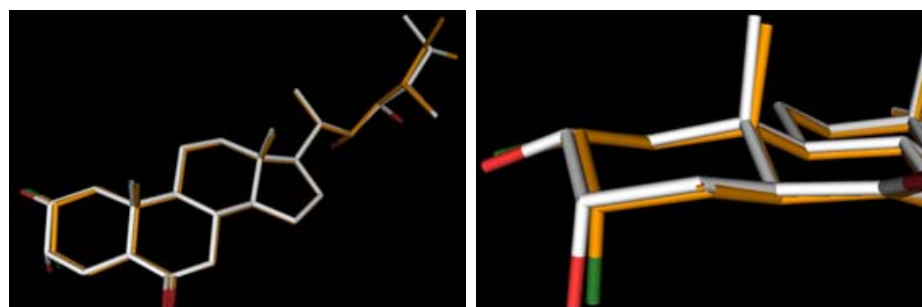
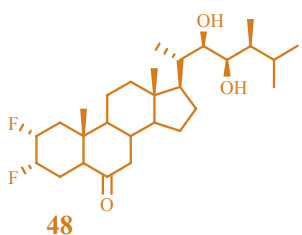
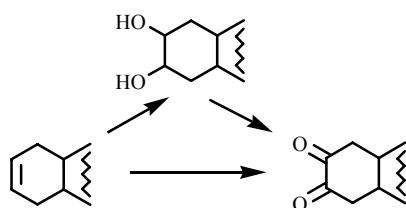


Figura 13

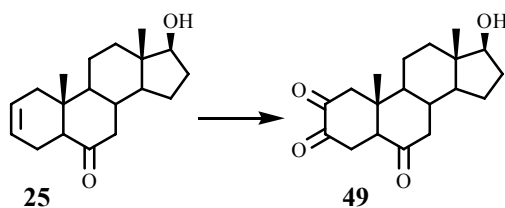
3.3. Síntesi d'esquelets amb funcionalitat dicetona a l'anell A.

Tot i que l'obtenció de dicetones veïnals es preveu complicada (veure apartats 3.3.1. i 3.3.2.), el fet que anàlegs amb una sola funcionalitat cetònica a l'anell A (37 i 38), hagin mostrat elevada activitat en el RLIT, fa interessant intentar sintetitzar anàlegs androstànics 2 α ,3 α -dicetònics.

En general, la introducció de dues funcionalitats cetona veïnals es troba descrita a la bibliografia o bé a través d'una oxidació directa del doble enllaç o bé a través d'una glicolització i posterior oxidació del diol format. Tanmateix, però, la majoria de referències bibliogràfiques descriuen aquest tipus d'oxidacions sobre cetones aromàtiques.



Esquema 6

3.3.1. A partir del Δ^2


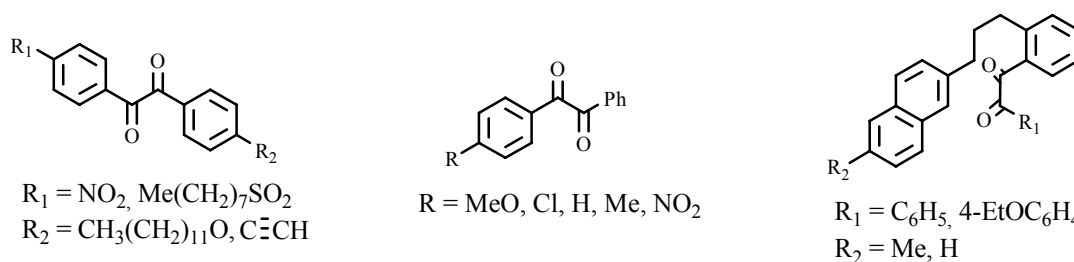
Esquema 7

Diverses publicacions descriuen l'obtenció de 1,2-dicetones de diferents substrats a partir de dobles enllaços. En general, els mètodes emprats com agents oxidants són: permanganat potàssic en anhídrid acètic,¹⁶⁶ altres anhídrids com el benzenoselènic,¹⁶⁷ derivats de crom,^{168,169} altres agents reactius com HBr, I₂, PdCl₂... en presència de DMSO.¹⁷⁰⁻¹⁷⁶ De tota manera, però, només s'han trobat referències bibliogràfiques sobre substrats aromàtics.

L'ús de permanganat potàssic en anhídrid acètic, descrit l'any 1971 per Sharpless *et al.*¹⁶⁶ va ser un dels primers mètodes emprats per a dur a terme aquesta reacció. Tot i que posteriorment aquest reactiu s'ha emprat per a la síntesi de 2,3-dicetoèsters provinents d'àcids grassos insaturats¹⁷⁷ i per a la obtenció de dicetones aromàtiques,¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ se'n descarta el seu ús sobre **25** degut a les condicions dràstiques en les que s'ha de dur a terme la reacció (possiblement incompatibles amb l'esquelet esteroidal), al fet de ser necessària una protecció prèvia de l'hidroxil a C17 i, finalment, per la possible formació de subproductes en grans proporcions com α -cetoacetats¹⁷⁸ o inclús sobreoxidacions en els anells de l'esquelet.

Altres agents oxidants desenvolupats per aquest tipus de reaccions han estat l'anhídrid benzenoselènic ((PhSeO)₂O)¹⁶⁷ o bé derivats de crom (VI),^{168,169} però l'escassa bibliografia i la toxicitat i/o inaccessibilitat dels reactius emprats semblen desaconsellar-ne el seu ús.

En els darrers anys, però, la metodologia més àmpliament descrita en la bibliografia per a l'oxidació de dobles enllaços a dicetones veïnals és, sens dubte, la que emprava alguns agents oxidants com HBr, I₂, PdCl₂... en presència de DMSO i a temperatures no inferiors als 100 °C.¹⁷⁰⁻¹⁷⁶ Els millors resultats (amb rendiments generalment superiors al 80%) s'obtenen en emprar HBr/DMSO. Seguint aquesta metodologia s'han obtingut dicetones a partir de diversos compostos insaturats com són:¹⁷⁰⁻¹⁷⁶

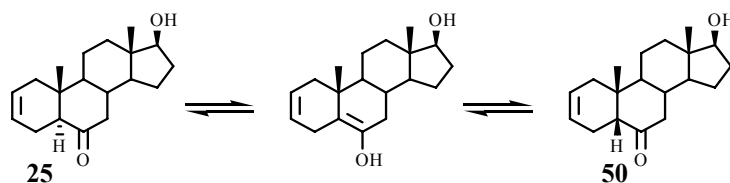


Esquema 8

Així, doncs, es decideix tractar **25** amb diferents dissolucions d'HBr (45%) en DMSO i estudiar-ne l'efecte de la temperatura i el temps de reacció, així com l'estabilitat del 17 β -OH en aquestes condicions, ja que no es disposa de cap referència bibliogràfica de l'ús d'aquest reactiu sobre substrats amb funcionalitat hidroxil.

Es va observar com temperatures al voltant dels 100 °C rendien crús molt complexos atribuïbles probablement a sobreoxidacions de l'esquelet esteroidal.

En canvi, en disminuir la temperatura i realitzar la reacció a temperatura ambient (t.a.), curiosament s'observà la presència de **25** i **50**. Aquest fet es podria explicar mitjançant l'existència d'un equilibri entre la configuració dels anells A/B *trans* i A/B *cis*, a través de la seva forma enòlica:



Esquema 9

S'obtenia **50** en major o menor proporció depenent del temps de reacció, sense veure's alterada la funcionalitat 17β-hidroxílica ni detectar-se en cap cas la dicetona d'interès **49**:

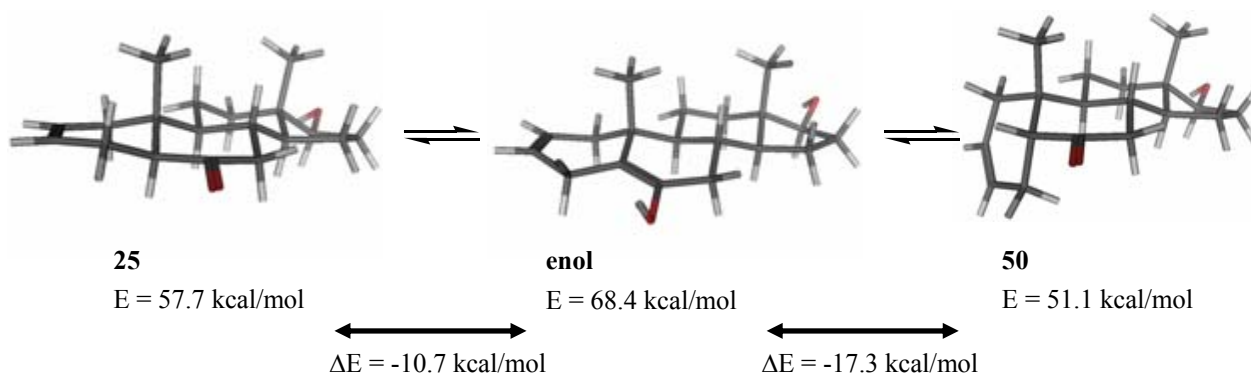
T (°C)	t (h)	50 / 25
100	16 – 20 h	cc
t.a.	5 h	2 : 3
t.a.	20 h	1 : 0

Taula 6

L'isomerització de **25** a **50** va ser un resultat molt sorprenent a l'equip, ja que, en compostos estigmastànics o ergostànics, sempre s'havia observat la major estabilitat de la configuració A/B *trans* front l'A/B *cis* (en absència de 2β-substituents en l'anell A).¹¹⁷

Amb la finalitat d'intentar explicar aquests resultats, s'estudià l'estabilitat de tots tres compostos a nivell teòric i preliminar, mitjançant càlculs de la seva energia amb mètodes de mecànica molecular.

La minimització de l'energia de cada un d'ells es realitza emprant el programa MOE.¹⁶⁴ Posteriorment, es calcula l'energia de **25**, **50** i de l'intermedi enòlic utilitzant cada un dels 5 *forcefields* disponibles en aquest programa (AMBER'89, AMBER'94, MMFF94, Engh-Huber, PEF95SAC, Rule). S'escull el PEF95SAC per ser l'únic d'ells en que l'energia de l'intermedi enòlic és superior a la de **25** i **50**.



Esquema 10

Els resultats d'energia calculats mostren com el compost **50** és 6.6 kcal/mol més estable que **25**, fet que podria explicar la proporció obtinguda entre els dos compostos.

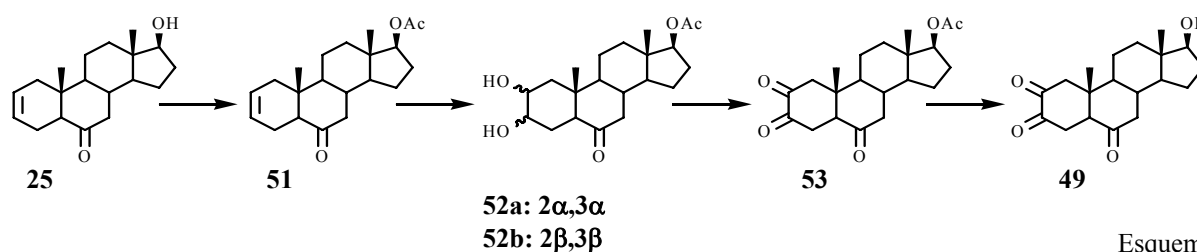
A més, sembla ser que, sempre que s'aconseguís arribar a l'intermedi enòlic, el substrat evolucionaria cap a la formació de l'isòmer amb la configuració dels anells A/B *cis*.

Per tal de contrastar la validesa d'aquesta suposició, es realitza el mateix càlcul sobre substrats amb funcionalitats 2 α ,3 α -diol. En aquests casos, els isòmers A/B *trans* són sempre més estables (de l'ordre de 8 kcal/mol) que els corresponents A/B *cis*, resultats coherents amb dades experimentals obtingudes en l'equip.¹¹⁷

3.3.2. A partir del diol

Degut a no detectar-se la presència de la dicetona d'interès **49** en cap de les experiències realitzades partint directament de **25**, s'intentarà obtenir-la a partir de l'oxidació del diol de l'anell A.

Caldrà, però, la prèvia protecció de l'hidroxil a C17:



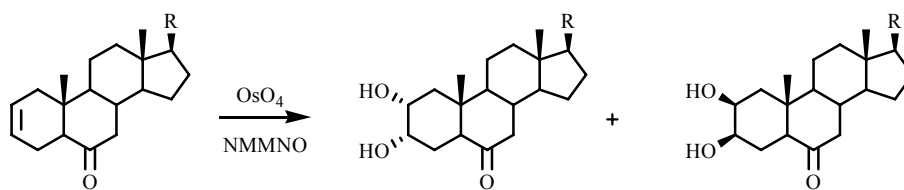
3.3.2.1. Síntesi del diol **52**

El tractament de **25** amb anhídrid acètic i Py, seguint una metòdica àmpliament descrita,¹⁸¹ rendeix **51** amb un rendiment del 96%.

La glicolització sobre el doble enllaç de l'anell A es realitza emprant com agent oxidant OsO₄, un dels reactius més emprats per a l'obtenció de diol *cis* a partir d'alquens, i N-òxid de N-metilmorfolina (NMO) com a cooxidant.

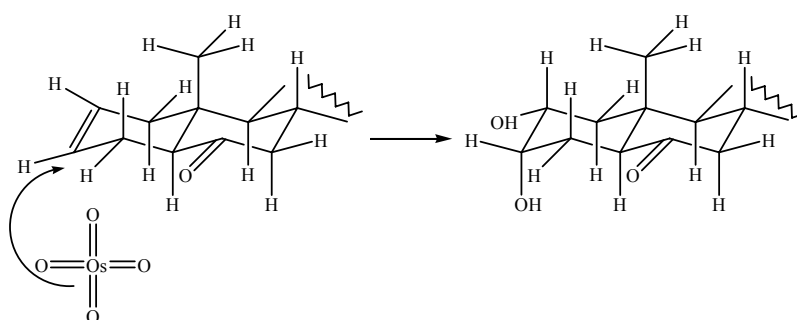
El principal inconvenient d'aquesta reacció és l'ús de OsO₄, pel seu elevat preu però, sobretot, per la seva alta toxicitat. És per aquest motiu que s'empra en quantitats catalítiques i conjuntament amb un oxidant secundari, l'N-òxid de N-metilmorfolina (NMO),^{182,183} que permet retornar l'osmi reduït a la seva forma oxidada, de manera que, amb aquesta regeneració, el procés es converteix en catalític.

El OsO₄ es dissol en un dissolvent orgànic, alcohol ^tbutílic, per a reduir la seva perillositat de manipulació.



Esquema 12

El OsO_4 genera una addició *sin* dels dos hidroxils sobre el doble enllaç, formant-se únicament dos diastereòmers: els diols $2\alpha,3\alpha$ i $2\beta,3\beta$. No obstant, l'impediment estèric entre la cara β de l'esteroides (essencialment degut a la presència del metil a C19) i el gran tamany efectiu del OsO_4 , afavoreixen la formació del diol $2\alpha,3\alpha$, tal i com s'indica en el següent esquema:



Esquema 13

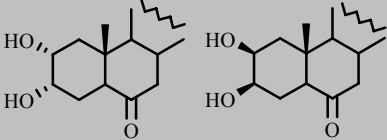
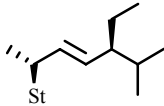
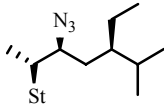
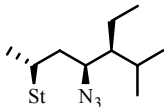
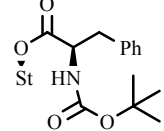
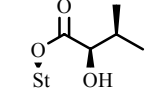
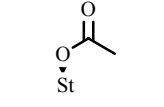
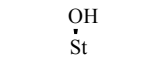
Aquesta reacció de glicolització sobre Δ^2 s'ha aplicat en l'equip en la síntesi de diferents esquelets esteroidals que difereixen només en la cadena lateral. S'obtenen barreges dels dos diols (amb diferents proporcions depenent del substrat) i rendiments globals del 80-90%.

Degut a l'elevada polaritat que solen tenir aquests compostos, en molts dels esquelets androstànics fins ara estudiats no ha estat possible arribar a separar completament els dos diastereòmers entre si.

La dihidroxilació del doble enllaç de l'anell A de **51** es realitza per tractament amb NMO i OsO_4 (relació molar esteroides/NMO/ OsO_4 1:30:0.1) en una barreja de t-BuOH/THF/ H_2O (9:3:1),¹¹⁹ a t.a. i sota atmosfera inerta. S'obté una barreja de diols **52**, amb un rendiment de glicolització del 97% i una relació **52a/52b** de 75:25. S'emprarà aquest cru de reacció directament per a la posterior oxidació del 2,3-diol de l'anell A a 2,3-dicetona.

La relació entre els diols $2\alpha,3\alpha$ i el $2\beta,3\beta$, determinada mitjançant l'espectre de ^1H -RMN, varia molt segons quina sigui la cadena lateral, degut a un efecte a llarga distància induït per aquesta. A la taula següent es mostren les proporcions obtingudes fins el moment a l'equip, per a cada un dels diols en funció de la cadena lateral.

En general, es pot observar com la proporció de $2\beta,3\beta$ -diol anàlegs, front als seus corresponents $2\alpha,3\alpha$ -diol isòmers, és major quan més curta és la cadena lateral, reforçant així la influència d'aquesta per un efecte a llarga distància.

Cadena lateral		Ref.
	92 : 8	137
	82 : 18	117
	82 : 18	117
	80 : 20	118
	75 : 25	119
	75 : 25	Veure apartat 3.3.2.
	70 : 30	Veure apartat 3.5.

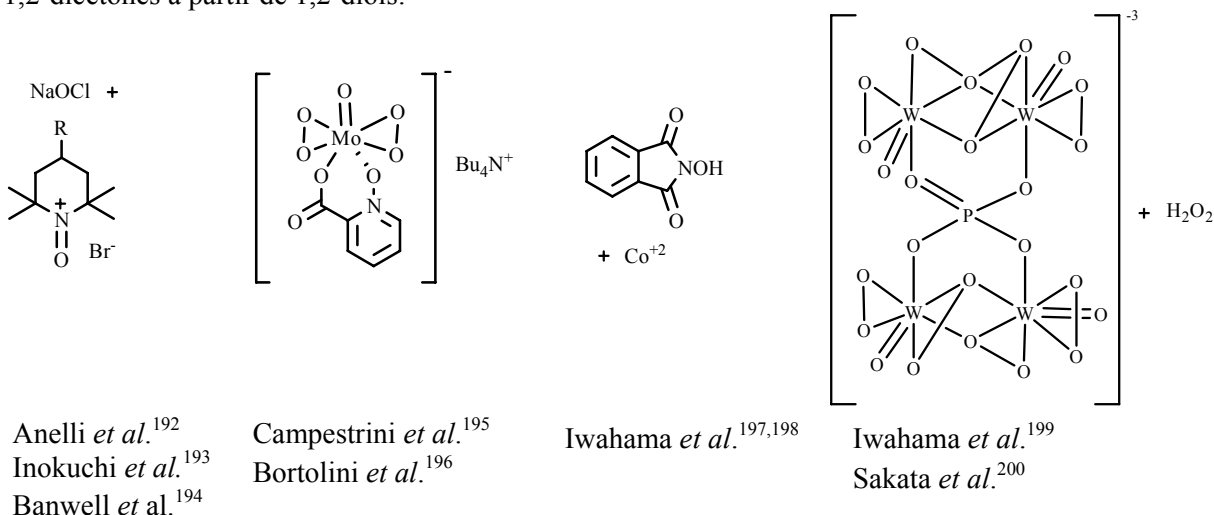
Taula 7

3.3.2.2. Oxidació del diol **52** a la dicetona **53**

Si bé es troben descrites multitud de metodologies per oxidar un grup hidroxílic a cetona, les referències bibliogràfiques per a l'obtenció de dicetones i, més concretament, cetones veïnals, són més escasses.

Reactius com AgCO_3 ¹⁸⁴ i KMnO_4 ¹⁸⁵ van ser els primers agents oxidants emprats per aquestes síntesis, però, degut a les condicions dràstiques utilitzades i als subproductes obtinguts (aldehids, àcids carboxílics...), aviat van ser substituïts per altres com l'àcid *o*-iodoxibenzoic (IBX),¹⁸⁶ $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}/\text{DMSO}$ ¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ o 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ)¹⁹¹ però tots ells amb unes aplicacions molt concretes.

A continuació es mostren alguns dels agents oxidants desenvolupats posteriorment per a la síntesi de 1,2-dicetones a partir de 1,2-diols:

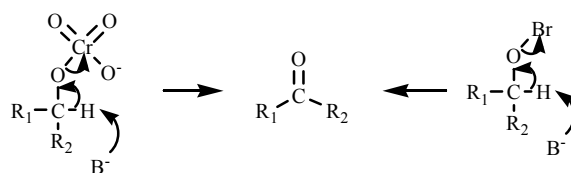


Diversos motius fan que aquests reactius no semblin idonis per a la síntesi de **53** a partir de **52**. D'una banda, cal considerar la seva manca d'accessibilitat comercial i l'elevat cost econòmic (requerint algun d'ells inclús de diverses etapes sintètiques). De l'altra, els baixos rendiments d'oxidació que se solen obtenir (detectant-se sovint abundants subproductes com hidroxicetones, productes de deshidratació...¹⁹⁴). Finalment, també és important destacar que tots ells s'assagen sobre substrats poc funcionalitzats, molt diferents de l'esquelet esteroidal d'interès.

En canvi, tant l'ús de NBS^{201,202} com de derivats de crom^{203,204} semblen ser reactius més interessants per a intentar oxidar el diol **52** a la dicetona **53**.

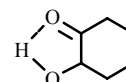
3.3.2.2.1. Estudi del mecanisme

Tant emprant derivats de Cr (VI)^{203,204} com amb NBS,^{201,202} la formació de la cetona es dona per evolució d'un complex intermedi, essent necessari el protó en *ipso* de l'hidroxil:

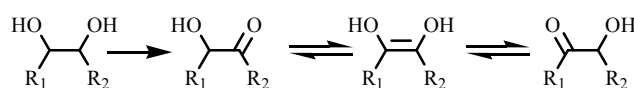


Esquema 14

Cal tenir en compte que, després de tenir lloc l'oxidació d'un dels dos hidroxils del diol, es podria donar la formació d'un pont d'hidrogen intramolecular, que estabilitzaria l' α -hidroxicetona intermèdia i en dificultarien la seva posterior oxidació.²⁰⁵

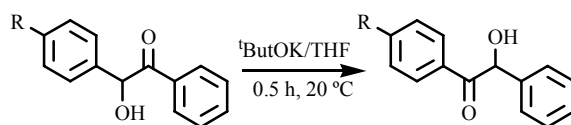


A més, aquesta α -hidroxicetona podria evolucionar mitjançant una tautomeria a través de la formació de l'enol:



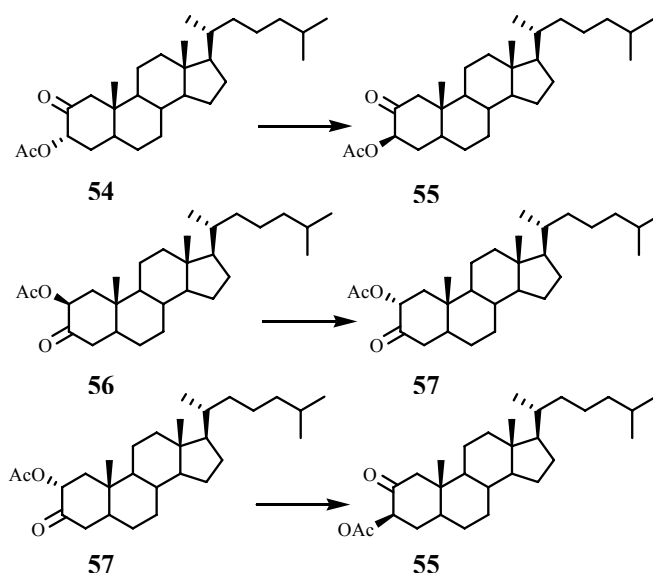
Esquema 15

L'intercanvi entre les dues α -hidroxicetones es troba àmpliament descrit en la bibliografia sobre alguns substrats on l'enol es troba estabilitzat degut a l'aromaticitat de les molècules.²⁰⁶⁻²⁰⁹



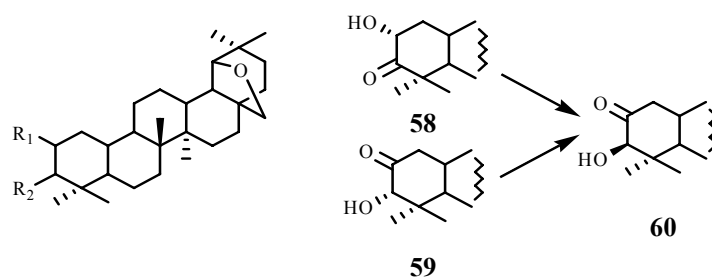
Esquema 16

També es troben referències d'isomeritzacions semblants sobre substrats esteroidals, com són, per exemple, les descrites per Williamson *et al.*²¹⁰ i Henbest *et al.*²¹¹ l'any 1961:



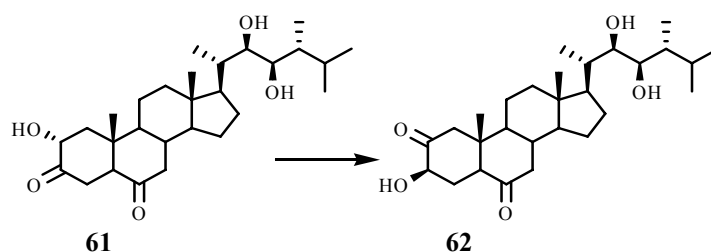
Esquema 17

De la mateixa manera, Klinot *et al.*²¹² observen, per tractament amb catàlisi àcida, les següents isomeries entre anàlegs oleànics.



Esquema 18

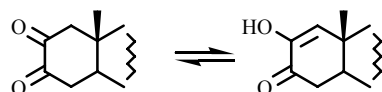
Més recentment i dins el camp de la síntesi d'anàlegs BRs (concretament derivats de la epicastasterona), Voigt *et al.*²¹³ publiquen l'espontània isomerització de **61** a **62**:



Esquema 19

D'altra banda, en la bibliografia, es poden trobar algunes referències bibliogràfiques en les quals l'oxidació d'un diol, i més concretament d'un ciclohexadiol, no aconsegueix generar la dicetona sinó que s'obtenen α -hidroxicetones amb elevats rendiments, tot i emprar grans excessos d'agents oxidants.^{205,214-217}

A més, és important destacar que la dicetona **53** es podria trobar en la seva forma enòlica (cetona α,β -insaturada força estable), inconvenient important a l'hora d'extreure conclusions dels valors d'activitat dels compostos 2,3-dicetònics, obtinguts en el *RLIT*.



Esquema 20

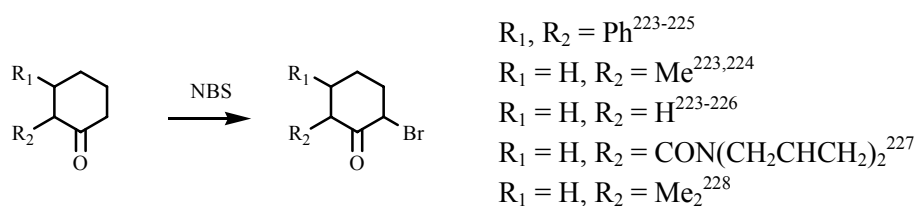
De tota manera, tot i les possibles dificultats que poden sorgir en l'oxidació del diol **52** a la dicetona **53**, atribuïbles possiblement a la formació d'un pont d'hidrogen intramolecular, o a tautomeris o isomeris com les anteriorment descrites, es creu interessant assajar l'ús de NBS i de derivats de crom.

3.3.2.2.2. Emprant NBS

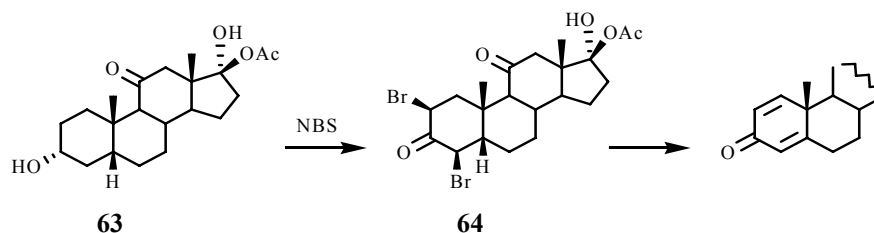
L'ús de NBS, per a dur a terme l'oxidació de funcionalitats hidroxíliques als corresponents grups cetònics, presenta com a principals avantatges l'accessibilitat del reactiu (NBS) i les condicions gairebé neutres, compatibles amb la funcionalitat èster (acetat) a C17.

L'any 2003, Khurana *et al.*²¹⁸ descriuen l'obtenció de dicetones a partir de diols veïnals força funcionalitzats amb rendiments elevats. Si bé era la primera vegada que es descrivia l'ús de NBS per a l'oxidació de 1,2-diols, anteriorment, aquest reactiu ja havia estat àmpliament emprat per a l'oxidació de compostos amb un sol grup hidroxílic,²¹⁹⁻²²² inclús sobre substrats esteroidals.²²⁰

És important destacar, però, que es troba també descrita la bromació en α de carbonil emprant NBS (a t.a., temps curts de reacció i amb rendiments molt elevats) sobre diferents substrats, com són:

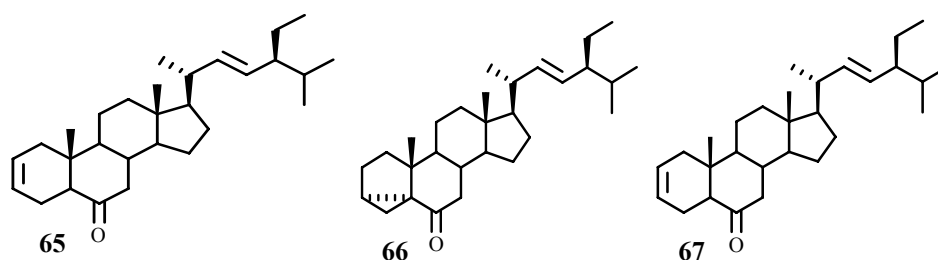


Aquesta etapa sintètica ha resultat un procediment habitual per a la síntesi de corticoesteroides i hormones sexuals amb dienona creuada a l'anell A. Així, el tractament de **63** amb NBS a 60 °C provoca la bromació en α de carbonil, generat per prèvia oxidació de l'hidroxil amb aquest mateix reactiu, amb un rendiment del 58%.²²⁹



Esquema 21

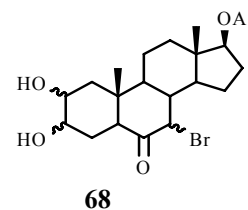
De tota manera, a l'equip,¹¹⁷ recentment es va emprar aquest reactiu per a obtenir bromohidrines a partir de dobles enllaços en diversos substrats estigmastànics:



Tot i que es formaven α -bromocetones com a producte de sobreoxidacions de les bromohidrines, el fet que en cap cas es detectés la bromació en α de carbonil de l'anell B va fer pensar que la NBS podria ser un bon reactiu per a dur a terme l'oxidació del diol **52** a la dicetona **53**.

Així doncs, considerant aquests resultats, es duen a terme diverses experiències tractant **52** amb NBS en CCl_4 i Py, a diferents concentracions, temperatures i temps de reacció. En cap de les proves realitzades, es detecta, per CCF comparativa amb mostra de referència (veure apartat 3.3.2.2.3.), la formació de la dicetona d'interès **53**.

Tanmateix, el seguiment de la reacció per CCF permetia observar com, a temps de reacció curts, es formava un producte de polaritat semblant a **53**, però que evolucionava posteriorment cap a altres compostos menys polars. Després de purificar un dels cruds de reacció mitjançant cromatografia flash (SiO_2 , Cy/AcOEt 1:1) seguit de cromatografia preparativa (SiO_2 , Cy/AcOEt 1:6), s'identifica aquest compost com a **68** producte de la bromació en α de carbonil produïda per la NBS.



Comparant els resultats obtinguts anteriorment en l'equip amb els d'ara, s'observa una major reactivitat de la NBS sobre el doble enllaç que no pas per a l'oxidació del diol (en ambdós casos es treballava amb una relació en equivalents d'aproximadament 1:1). Mentre que pels anàlegs estigmastànics **65**, **66** i **17** s'aconseguia la formació de bromohidrines a t.a., es recupera **52** inalterat al tractar-lo amb NBS a aquesta temperatura. És necessari dur a terme la reacció a 70 °C per a observar la desaparició de **52** en el cru de reacció.

Tot i que no es varen identificar més compostos, l'aïllament de **68** sembla indicar que primer es dona la bromació en α de carbonil i posteriorment tindrien lloc les possibles oxidacions dels hidroxils.

Si bé és cert que possiblement temps de reacció més llargs conduirien a l'oxidació del diol a la 2,3-dicetona, el fet que primer es doni la bromació en α de carbonil, descarta la possibilitat d'emprar NBS per obtenir **53**.

3.3.2.2.3. Emprant PCC

Per tal d'intentar obtenir la dicetona **53**, es decideix provar l'oxidació del diol emprant PCC,²⁰³ un agent oxidant general àmpliament estudiat i anteriorment emprat en l'equip.¹⁵⁷

Les resines polimèriques de PCC^{230,231} permeten no solament evitar la formació de sals de crom, difícilment separables del compost d'interès, sinó també poder ser regenerades, característica interessant si es té en compte l'elevada toxicitat dels derivats cromats.

Tanmateix, el tractament de **52** amb clorocromat de polivinilpiridina no condueix a l'oxidació del diol, recuperant-se producte de partida inclús després de 3 dies a 80 °C.

En canvi, l'ús de PCC sobre **52** (en relació molar PCC/**52** 4:1 a t.a. durant 6 h) rendeix un cru, a partir del qual, després de purificació mitjançant cromatografia flash (SiO₂, Cy/AcOEt, 3:2), s'aconsegueix aïllar una fracció enriquida en la cetona d'interès **53**. Tanmateix, però, aquesta es troba impurificada amb compostos α -hidroxicetònics a l'anell A (multiplet a 4.15 ppm degut a CH-OH, augment dels senyals entre 2.5 i 3.0 ppm corresponents a protons en α de carbonil i singlet a 0.76 ppm de 19-CH₃), amb factors de retenció molt similars a **53**. Temps de reacció superiors (fins a 4 dies) no aconseguen augmentar la conversió d'aquesta dioxidació.

La formació de compostos α -hidroxicetònics podria ser deguda a l'existència d'isomerismes com les anteriorment descrites. Sembla evident, doncs, la formació d'un enol intermedi que dificultaria l'oxidació del segon hidroxil per absència del protó en *ipso*, fet que podria explicar la dificultat per obtenir dicetones no aromàtiques.

Si bé és cert que l'oxidació del diol **52** a la dicetona **53** s'ha aconseguit emprant PCC, el fet que el rendiment obtingut sigui inferior al 4% descarta aquesta metodologia sintètica per a la funcionalització de l'anell A de l'esquelet androestànic.

Per tant, considerant tots els inconvenients en l'obtenció de dicetones veïnals, no es creu adient prosseguir amb la síntesi de **53**, ja que, l'esforç sintètic no compensaria els resultats que d'ella se'n puguin extreure.

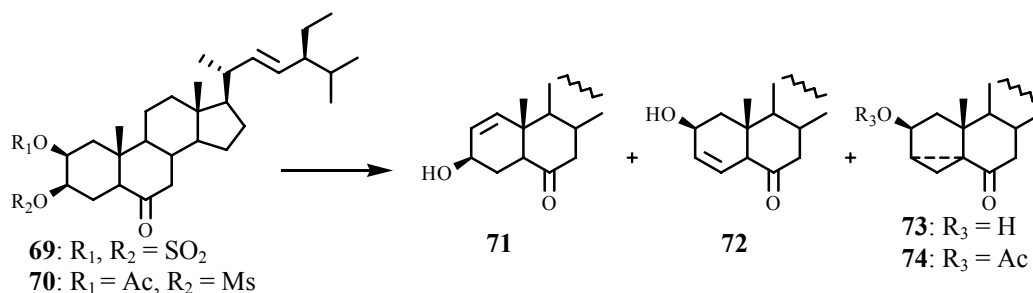
3.4. Síntesi d'esquelets amb funcionalitat difluor a l'anell A

Una de les maneres més comuns en síntesi orgànica per introduir la funcionalitat fluor consisteix en la substitució nucleòfila d'un hidroxil.

S'han desenvolupat multitud d'agents fluorants per aquests tipus de reaccions, com són el SF₄,^{232,233} PhPF₄,²³⁴ fluoroalquilamines (FAR),²³⁵ fluorurs metàl·lics i de tetraalquilamoni, entre d'altres.²³⁶⁻²⁴⁰

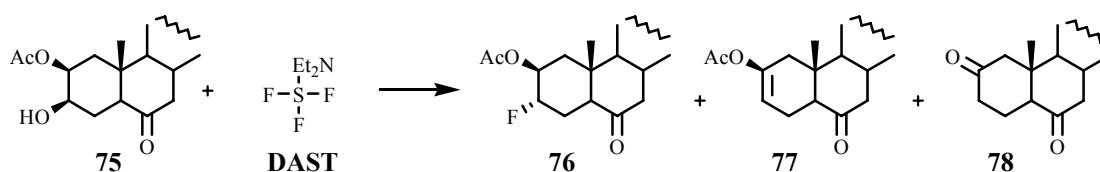
Amb la finalitat d'obtenir anàlegs estigmastànics amb aquesta funcionalitat a l'anell A, a l'equip, es van tractar 3 β -hidroxils, activats en forma de messilat o sulfat cíclic, amb diferents agents fluorants nucleòfils,¹³⁷ com són ara els fluorurs de tetrametilamoni (TMAF), tetraetilamoni (TEAF), tetrabutylamoni (TBAF) i una barreja CaF₂/KF en presència de catalitzadors de transferència de fase.

En cap de les diferents experiències realitzades es detecta la presència de fluoroderivat d'interès, aconseguint-se només aïllar productes d'eliminació.



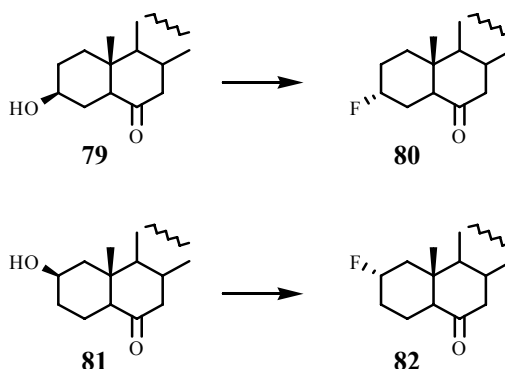
Esquema 22

En canvi, l'ús de l'agent fluorant trifluorur de dietilaminosulfur (DAST),²⁴¹ àmpliament emprat per a tot tipus de compostos orgànics,²⁴²⁻²⁴⁶ permetia l'obtenció de 3 α -fluoroderivats, sense ser necessària la prèvia activació de l'hidroxil. Tanmateix, però, només s'aconseguien rendiments del 16% per a **76**.¹²¹



Esquema 23

Aquest mateix reactiu, es va emprar per a la síntesi de fluoroderivats estigmastànics amb una sola funcionalitat a l'anell A.¹¹⁷



Esquema 24

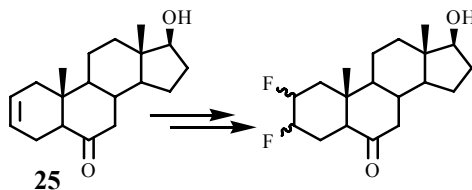
Si bé **80** s'obtenia amb un rendiment força acceptable (del 51%), l'impediment 1,3-diaxial causat pel metil 19-CH₃ dificultava la formació del complex intermedi amb el DAST, obtenint-se **82** amb rendiments inferiors al 10%. S'aïllaven majoritàriament productes d'eliminació i no s'aconseguien millors resultats ni disminuint la temperatura de la reacció, ni emprant deoxofluor® enlloc de DAST, ni utilitzant una base en el medi...

L'any 1995, Shellhamer *et al.*²⁴⁷ van concloure, després d'estudiar la reacció de diferents diols amb DAST, que la formació de compostos difluorats depenia del nombre de carbonis que separava els dos grups hidroxílics. Així, si es tractaven 1,2-diols amb aquest agent fluorant, s'obtenien sulfits com a productes majoritaris i només traces del difluor veïnal d'interès.



Esquema 25

Aquests baixos rendiments van fer pensar que la doble substitució del 2 β ,3 β -diol per 2 α ,3 α -difluor emprant DAST no era una bona estratègia sintètica. Es va creure convenient, per tant, intentar funcionalitzar directament el doble enllaç de l'anell A de **25**.

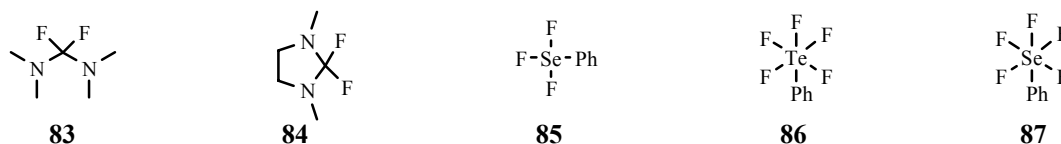


Esquema 26

L'esmentada funcionalitat difluor veïnal es pot introduir per tractament del compost insaturat amb F₂ gas (al 5% en N₂). Així, des del 1966,²⁴⁸ s'ha aplicat aquesta metodologia sobre una àmplia gamma de compostos orgànics, obtenint-se amb èxit el compost difluorat d'interès sense veure's afectades altres funcionalitats com la cetona, l'hidroxil, l'amina, l'ester, l'anell aromàtic...²⁴⁸⁻²⁵²

Tanmateix, la dificultat que comporta el fet de treballar amb F₂ gas (oxidant fort, irritant, corrosiu i molt reactiu, produint freqüentment incendis i explosions violentes) ha provocat el desenvolupament d'altres agents fluorants més fàcilment manejables.

D'entre ells, cal destacar el fluoroxisulfat de cesi (la sal de cesi de l'àcid hipofluoròs juntament amb àcid sulfúric),²⁵³ les fluoroamines tipus **83** i **84**,^{254,255} derivats de seleni o teluri (**85**, **86** i **87**)²⁵⁶⁻²⁵⁸ o bé reaccions electroquímiques emprant HF/Et₃N.²⁵⁹ Tanmateix, la dificultat de síntesi d'alguns d'aquests agents fluorants, així com les escasses aplicacions que se'n troben descrites, fan pensar en estudiar alternatives sintètiques més viables.



Esquema 27

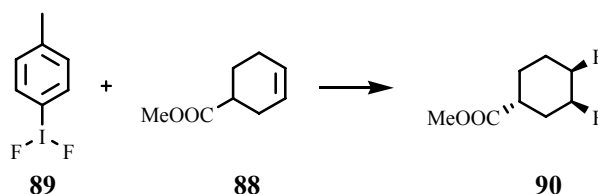
A més, alguns d'aquests reactius, com els selenoderivats són tèrmicament inestables, reaccionant violentament a -20 °C i descomposant a 20 °C. Tanmateix però, el principal inconvenient és la falta d'estereoselectivitat, generant normalment proporcions més o menys iguals dels quatre isòmers possibles.

Sembla interessant, per tant, elegir un agent fluorant capaç d'introduir certa estereoselectivitat en la reacció de difluoració. Les escasses referències bibliogràfiques sobre aquests tipus de reactius es redueixen pràcticament a l'ús del difluorur de *p*-iodotoluenè²⁶⁰ i al de difluorur de xenó.²⁶¹ Es decideix, per tant, assajar ambdós agents fluorants per a la funcionalització de l'anell A androestànic.

3.4.1. Emprant difluorur de *p*-iodotoluenè

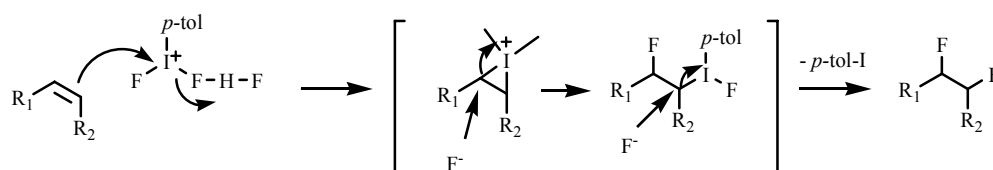
L'any 1998, Hara *et al.*²⁶⁰ tractaren diferents compostos insaturats (com **88**), amb difluorur de *p*-iodotoluenè (**89**) en presència de Et₃N·5HF. Si bé, aquest reactiu ja s'havia emprat anteriorment per difluorar olefines,²⁶² no va ser fins aleshores quan es considerà l'estereoselectivitat de la reacció.

Aquests autors obtingueren un dels diastereòmers selectivament, i, a més, restaven inalterades altres funcionalitats com grups ester, cloro, hidroxil...



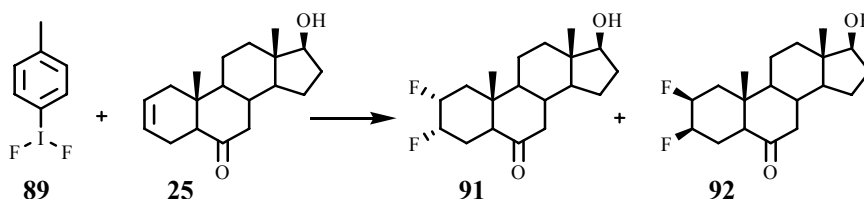
Esquema 28

La síntesi dels difluoroderivats es donaria a través d'un intermedi catiònic iodoni format per l'atac del doble enllaç sobre **89** (activat per l'HF). Posteriorment, es donaria l'addició dels dos ions fluorurs, presents en el medi de reacció, i l'eliminació de *p*-iodotoluè.



Esquema 29

Degut a l'impediment estèric de la cara β de l'esteroides, es creu que es veurà afavorida la síntesi del producte no desitjat 2β,3β-difluor **92** front a 2α,3α-difluoroderivat **91**.



Esquema 30

De tota manera, es decideix tractar **25** amb **89** i Et₃N·3HF. Es realitzen varies experiències modificant la temperatura de reacció (a 0 i t.a. °C), el temps de reacció (2 i 48 h) i la relació molar **25/89** (1:1.3 i 1:2.5). En tots els casos, es recupera producte de partida, no detectant-se, ni per CCF ni per espectres de ¹H-RMN, la formació de la més mínima quantitat de compostos difluorats.

3.4.2. Emprant difluorur de xenó

Degut a la baixa capacitat de fluoració de **89**, s'abondarà la síntesi dels difluoroderivats emprant un altre agent fluorant.

El difluorur de xenó (XeF₂) és i ha estat el reactiu més emprat per introduir aquestes funcionalitats directament sobre el doble enllaç. Tanmateix però, el principal inconvenient que presenta es troba en el fet que, fins a l'actualitat, s'han proposat diversos mecanismes de reacció (tal i com s'abondarà més endavant) no assegurant-se en tots ells la introducció d'estereoselectivitat.

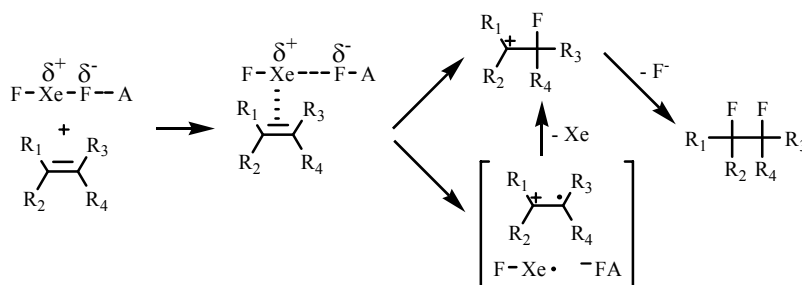
Es tracta d'una versió modificada del fluor gas, presentant com a gran avantatge el fet de ser un sòlid comercial, termodinàmicament estable a temperatura ambient (punt de fusió de 129 °C) i fàcilment manejable, sense perdre, però, l'elevada reactivitat.

Les primeres difluoracions d'aquest tipus daten de principis dels anys 60, quan Shieh *et al.*²⁶¹ aconseguiren introduir dos àtoms de fluor a diverses olefines emprant XeF₆, XeF₄ i XeF₂ a través de reaccions en fase gas. Posteriorment, i fins a l'actualitat, s'han desenvolupat metodologies en fase líquida, amb solvents apolars, i multitud d'articles avalen el XeF₂ com a bon agent fluorant.²⁶¹⁻²⁷⁶

Es troba descrita, però, la reacció de XeF₂ amb alcohols (ROH),^{267,268} donant lloc a espècies electrofíliques ROXeF, que alhora podrien reaccionar amb el doble enllaç. Serà necessària, per tant, la protecció de l'hidroxil a C17 de l'esteroides.

Cal considerar també, el caràcter catalític de la reacció, essent necessari l'ús de catalitzadors com són el trifluorur de bor eterat,^{262,267,268,270-272,275,277} l'HF,^{267,268,272,273} el SiF₄,^{264,265} o bé el I₂.²⁶³

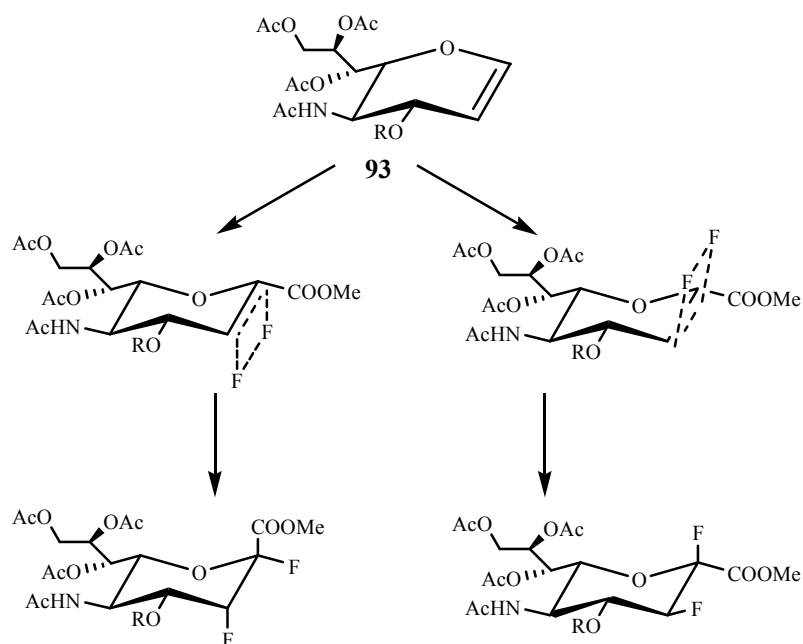
Essencialment, s'han proposat dos mecanismes diferents per a la difluoració d'una olefina amb XeF₂. Un d'ells s'iniciaria amb la formació d'un complex π intermedi, afavorit per la catàlisi àcida (A). Aquest evolucionaria cap a un β-fluorocarbocatió mitjançant la directa migració del fluor o bé a través d'una transferència electrònica cap a un catió radical seguit de la migració del fluor. Finalment, l'atac del fluorur al β-fluorocarbocatió conduiria a la formació del difluor veïnal. Segons aquest mecanisme, es podrien formar, per tant, els 4 diastereòmers possibles, donant-se poca o nul·la diastereoselectivitat.



Esquema 31

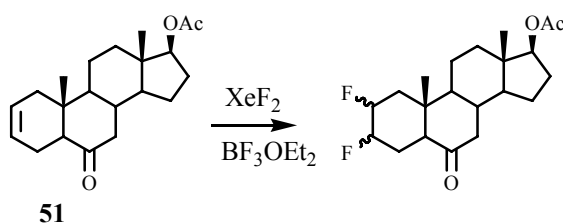
D'altra banda, però, Ikeda *et al.*²⁷⁵ l'any 2004, proposaren un altre mecanisme per aquest tipus de difluoracions. Tant emprant XeF₂ com amb F₂, la reacció progressaria a través d'una addició *sin* al doble enllaç que comportaria la formació d'un anell de quatre membres (estat de transició), el qual seria posteriorment atacat pel F₂.

En la síntesi de difluoroderivats de l'àcid siàlic (**93**), aquests autors no solament només obtingueren dos dels quatre diastereòmers possibles sinó que també aconseguiren afavorir la formació d'un respecte l'altre degut a impediments estèrics:



Esquema 32

Així, doncs, seguint la metodologia desenvolupada per Ikeda *et al.*²⁷⁵ es tracta **51** amb XeF₂ emprant trifluorur de bor eterat com a catalitzador.

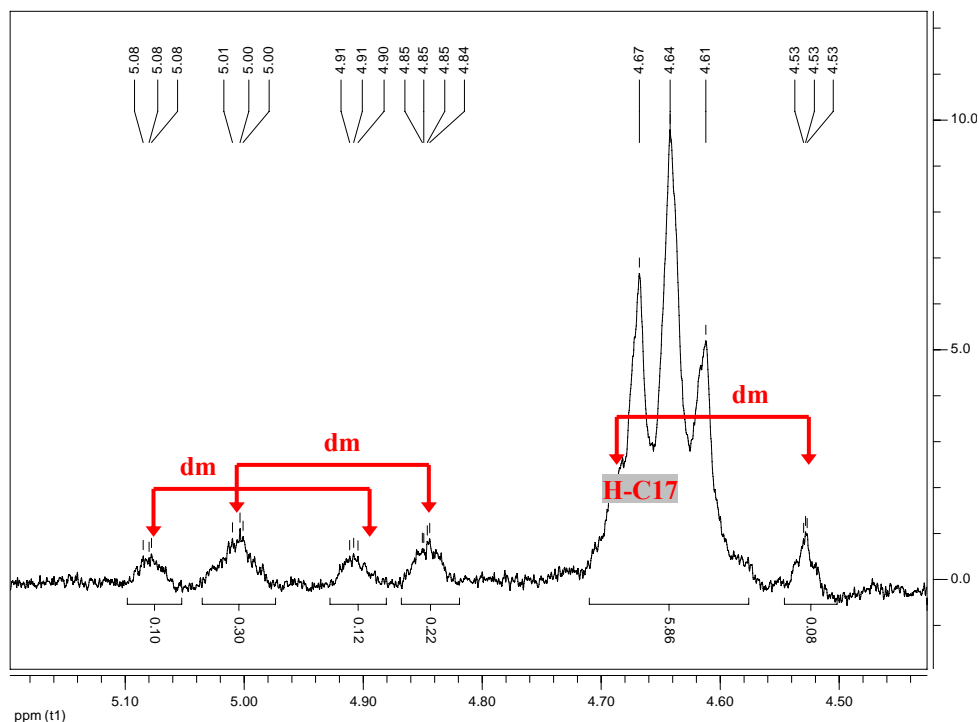


Esquema 33

Després de realitzar dues cromatografies flash (Cy/AcOEt 4:1 i 8:1) i diverses recristal·litzacions amb diferents mescles de dissolvents, es recupera un 8% de producte de partida **51** sense reaccionar i diverses fraccions barreja de compostos difluorats.

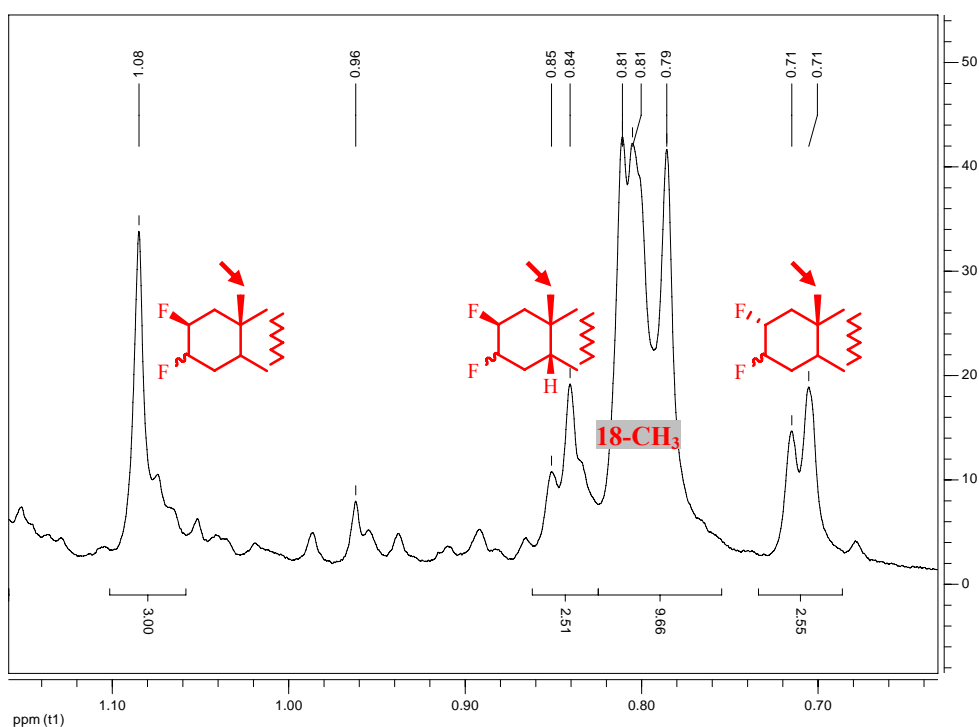
Aquestes fraccions contenen barreges dels 8 isòmers possibles de 2ξ,3ξ-difluoro-17β-acetoxi-5ξ-androst-6-ona, els quals no ha estat possible diferenciar i separar per CCF.

La presència de la doble funcionalitat 2ξ,3ξ-difluor es veu corroborada per l'existència de tres senyals a 5.00, 4.92 i 4.62 ppm (doblets de multiplets) amb uns acoblaments J_{F-H} = 51, 45 i 45 Hz respectivament, característics de l'existència de fluor.



Espectre 1

D'altra banda, mitjançant els diversos senyals dels 19-CH₃, es detecten diversos compostos difluorats. El senyal a 1.08 ppm correspondrien a androstats amb configuració 2 β i els anells A/B *trans*, els senyals a 0.85 i 0.84 ppm s'assignarien a compostos 2 β substituïts però amb els anells A/B *cis* (formats per l'impediment 1,3-diaxial de la funcionalitat 2 β amb el 19-CH₃) i, finalment, els senyals a 0.71 i 0.72 ppm correspondrien 2 α ,3-difluors, essent el 2 α ,3 α -difluor el compost d'interès.



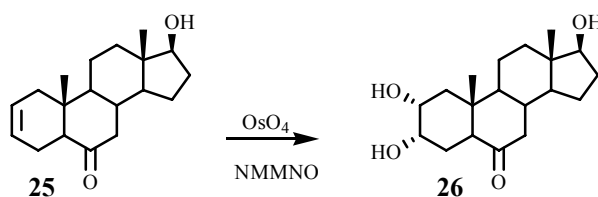
Espectre 2

Les integrals relatives entre tots els compostos són aproximadament les mateixes, fet que sembla corroborar el mecanisme radicalari de la reacció.

Considerant, d'una part, que no ha estat possible separar els 6 diastereòmers que es formen i, de l'altra, que el compost d'interès $2\alpha,3\alpha$ -difluor s'obté en una proporció inferior al 20% (determinada mitjançant espectres de $^1\text{H-RMN}$), no es creu convenient ni eficient la síntesi de difluoroderivats i s'aprofundirà més en l'obtenció de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxianàlegs.

3.5. Síntesi d'esquelets amb funcionalitat diol a l'anell A

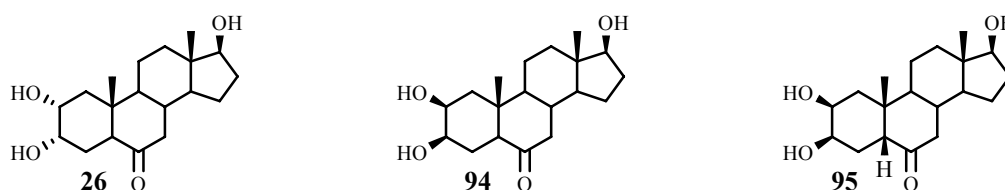
3.5.1. Dihidroxilació convencional



Esquema 34

Les primeres referències bibliogràfiques de la triolona **26** daten de finals dels anys 80.¹⁴⁸ A partir d'aleshores, el grup de L.Kohout ha descrit diverses metodologies sintètiques i aplicacions d'aquest compost.²⁷⁸⁻²⁸⁰

Tal i com s'ha dut a terme pel compost **51**, la glicolització del doble enllaç de l'anell A de **25** es realitza per tractament d'aquest amb NMO i OsO_4 (relació molar esteroide/NMO/ OsO_4 1:30:0.1) en una barreja de $t\text{-BuOH/THF/H}_2\text{O}$ (9:3:1)¹¹⁹ i sota atmosfera inerta. S'ha observat, durant les diferents experiències realitzades, que una relació molar NMO/esteroide 30:1 és suficient perquè la reacció tingui lloc, sense veure's alterats ni el rendiment ni l'excés diastereomèric, que són pràcticament iguals que amb una relació molar 60:1.¹¹⁹



Esquema 35

Després de 14 h de reacció, s'obté una barreja de diols amb un rendiment del 83% i una proporció **26/94/95** de 70:30:<1, el que representa un excés diastereomèric del 40% de **26** (valorat per $^1\text{H-RMN}$).

Es pot observar, una vegada més, la influència de la cadena lateral en la proporció entre el diols $2\alpha,3\alpha$ i el $2\beta,3\beta$ (veure apartat 3.3.2.1.). L'absència d'aquesta condueix a una barreja amb la proporció més baixa de $2\alpha,3\alpha$ -diol.

3.5.2. Dihidroxicació asimètrica de Sharpless

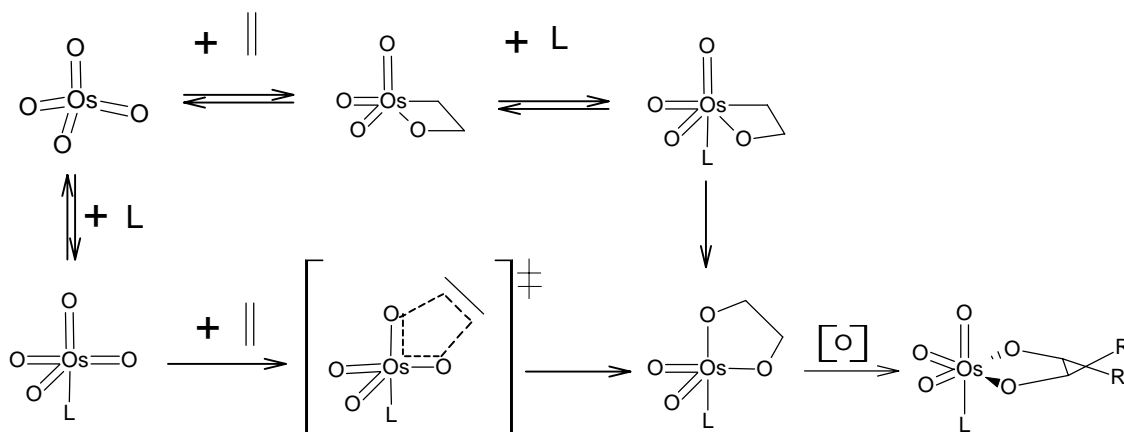
Per tal d'intentar augmentar la proporció de diol $2\alpha,3\alpha$ (**26**) front el $2\beta,3\beta$ (**94**) es va provar la introducció de la funcionalitat diol mitjançant la dihidroxilació asimètrica de Sharpless.

Fins el moment, s'han publicat diversos mètodes de glicolització quiral catalítica d'olefines^{140,281-283} emprant diferents lligands quirals per tal d'afavorir la formació d'un dels diastereòmers generats en la glicolització *sin* d'una olefina.

En aquest treball s'utilitzarà dihidroquinidin 9-O-(9'-fenantril) èter (DHQD-PHN) com a lligant quiral.^{140,282}

L'estereoselectivitat d'aquesta dihidroxilació es basa en la capacitat del complex catalitzador $\text{OsO}_4\text{-L}^*$ d'afavorir la glicolització per una cara de l'olefina essent L^* una amina terciària quiral.

El complex catalític forma un osmaoxetà amb l'olefina per un mecanisme que encara no és clar. S'han proposat dos mecanismes; un concertat $[3+2]$ i un mecanisme per etapes $[2+2]$.²⁸⁴



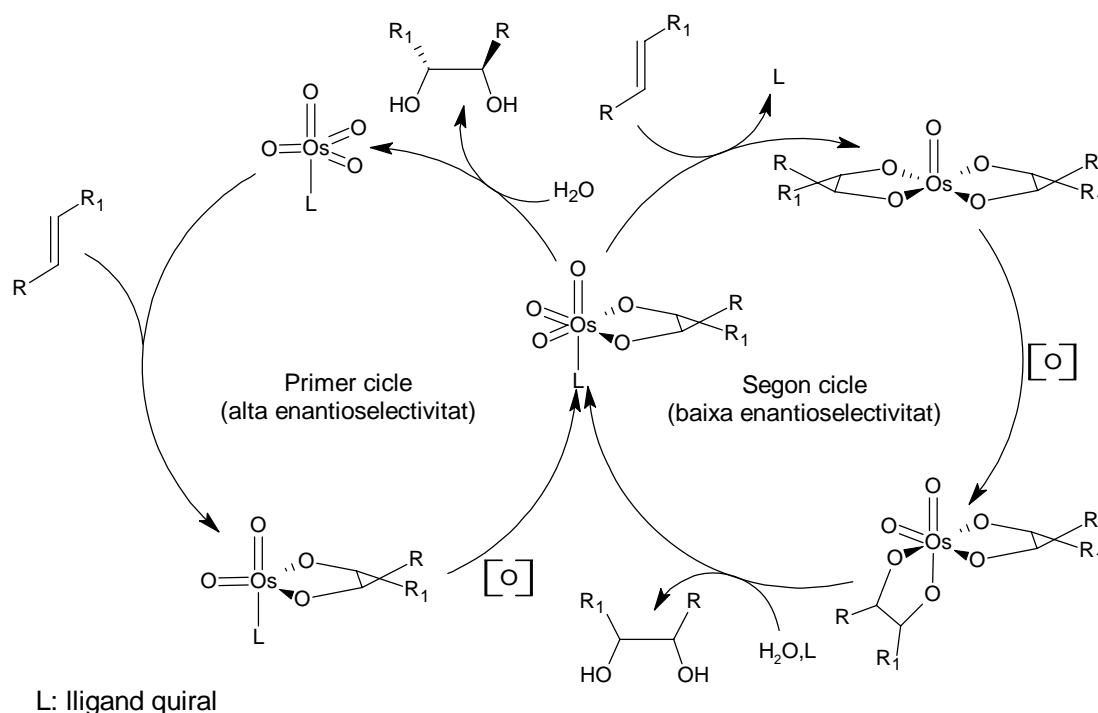
Esquema 36

Un cop format l'osmaoxetà, existeixen dos cicles catalítics que rendeixen el producte dihidroxilat (Esquema 37). El segon cicle té menor diastereoselectivitat que el primer.²⁸⁵

L'addició lenta d'olefina i l'addició de sals d'amoni són dos dels factors que minimitzen el segon cicle.

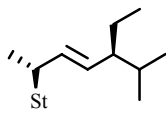
L'addició de sals d'amoni quaternàries abans de l'addició lenta d'olefina faciliten la hidròlisi dels èsters d'osmi en el primer cicle de la glicolització.^{285,286}

També s'ha trobat que les baixes temperatures augmenten l'excés diastereomèric.²⁸⁵



Esquema 37

A l'equip es va estudiar la relació entre els dos diastereòmers en funció del lligand utilitzat:¹³⁷

Cadena lateral	Lligand quiral	
	Sense lligand	92 : 8
	DHQD-PHN	98 : 2
	(DHQ) ₂ -PHAL	35 : 65

Taula 8

Degut a l'impediment estèric del 19-CH₃, la proporció de diol 2 α ,3 α obtinguda sense lligand quiral en esquelets estigmastànics sol ser suficientment bona com per no fer necessària la glicolització asimètrica, que empra lligands quirals d'un cost econòmic força elevat. Malgrat això i degut al fet que sobre esquelets androstànics s'obtingui major proporció de diol 2 β ,3 β (de l'ordre de 20-30%), es decideix provar aquesta glicolització sobre **25**, per intentar disminuir l'esmentada proporció.

Les millors condicions de reacció trobades en l'equip,¹⁴⁰ per afavorir l'excés diastereomèric són: 0,2 equivalents de OsO₄ i 2 equivalents de lligand quiral, per cada equivalent de substrat. De tota manera, degut a l'elevat cost econòmic del lligand DHQD-PHN, en treballs efectuats en l'equip,^{116,147} una relació OsO₄/DHQD-PHN 0.033:0.33 es considerarà suficientment bona.

Així doncs, es porta a terme la glicolització de **25** dissolent el substrat en ^tBuOH/THF/H₂O (15:3:5) i afegint-hi OsO₄ (0.033 equivalents), DHQD-PHN (0.33 equivalents), NMO (10 equivalents) i Et₄N⁺AcO⁻·4H₂O (0.7 equivalents). Sota atmosfera d'argó i absència de llum, es deixar agitar la mescla durant 17 h, obtenint-se un cru que conté **26/94/95** (Esquema 35) en una proporció 79:21:<1 (determinada per ¹H-RMN).

S'obté **26** amb un rendiment global del 58% a partir de **25**, després de purificació per cromatografia flash, i amb un excés diastereomèric del 58%, el que representa un augment d'un 18% respecte la glicolització convencional amb OsO₄. Tenint en compte l'elevat preu del lligant quirals, de moment, es considera insuficient l'augment de la diastereoselectivitat de la reacció per justificar l'ús de la glicolització de Sharpless en aquest treball.

3.5.3. Separació i purificació de mescles de 2ξ,3ξ-diols **26**, **94** i **95**

A l'equip, s'han intentat purificar 2ξ,3ξ-diols d'esquelets androscànics però sempre amb una cadena lateral ancorada sobre l'hidroxil 17β de l'androstà (Esquema 4, Via A). Aquest fet requeria posar a punt una metodologia de separació per a cada un dels anàlegs que divergien en la cadena lateral.

Després d'emprar tècniques de cromatografia flash i cromatografia Lobar-Merk® sobre barreges de diols sintetitzats fins el moment a l'equip, només s'aconseguí obtenir el diastereòmer 2α,3α amb una puresa del 90%, sent el diol 2β,3β la principal impuresa.¹¹⁸⁻¹²⁰

Per tal de millorar tant la puresa com el rendiment en l'aïllament dels diols, es decideix canviar la ruta sintètica (Esquema 4, Via B) i abordar la separació d'aquests en la primera etapa, estudiant i aprofundint en els diferents possibles mètodes de purificació.

En primer lloc, cal destacar les característiques del cru de reacció a separar, que correspon a qualsevol cru de glicolitzacions convencionals o asimètriques. En aquesta mescla, gairebé el 30% de la barreja són els productes no desitjats **94** i **95**. L'alta proporció de productes no desitjats i la seva semblança estructural amb **26** (només difereixen entre si en la configuració de les posicions 2, 3 i 5 de l'esquelet) dificulten la seva separació del cru de reacció.

Per altra banda, els trihidroxiandrostans **26**, **94** i **95** tenen una polaritat molt elevada, fins al punt que només són solubles en dissolvents molt polars com el metanol, i són parcialment solubles en dissolvents com èter etílic o THF. Aquesta elevada polaritat els hi atorga un factor de retenció molt baix.

El fet de no disposar d'una metodologia per purificar **26**, fa necessari haver de posar a punt el mètode de separació. Aquest serà molt útil a l'hora de sintetitzar anàlegs BRs androscànics, ja que **26** és un compost intermedi clau en l'estratègia de síntesi.

Per a separar els isòmers que genera la glicolització de **25** es plantegen tres possibilitats:

- Isomerització de **94** a **95**.
- Separació per cromatografia flash i Lobar-Merk®.
- Recristal·lització en EtOH

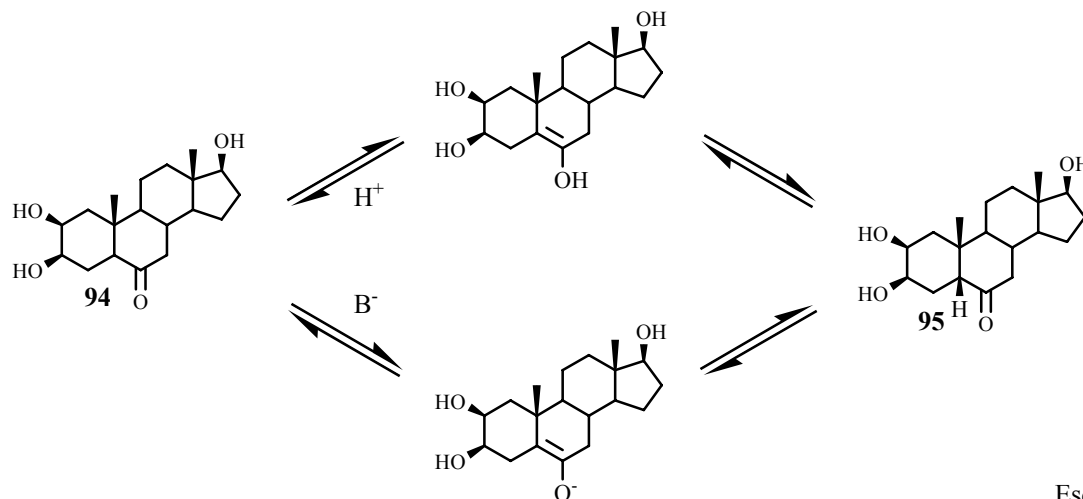
3.5.3.1. Isomerització de **94** a **95**.

Per CCF i degut a la seva major diferència estructural, s'observa com el diastereòmer **95** se separa millor de **26** que **94**, fet que va fer pensar que isomeritzant **94** a **95** (ambdós diastereòmers no desitjats en aquest treball) es podria millorar el procés de purificació de **26**.

Amb aquesta idea, es decideix provar aquesta isomerització directament sobre el cru de glicolització de **25** ja que es creu que el producte d'interès **26** no es veurà afectat.

La isomerització de **94** a **95** suposa canviar la unió dels anells AB, de *trans* a *cis*. Tot i que la configuració *trans* generalment és més estable que la *cis*, aquest canvi estructural és possible que tingui lloc, en aquest cas, a causa de la interacció 1,3-diaxial que s'estableix entre el 2 β -OH i el 19-CH₃.^{144,287}

La isomerització es pot dur a terme en medi àcid (HCl), via l'intermedi enòlic, o en medi bàsic (K₂CO₃, KOH, NaOH), via l'intermedi enolat (Esquema 38).



Esquema 38

A l'equip,¹¹⁷ s'han dut a terme, amb èxit, isomeritzacions semblants sobre substrats estigmastànics en medi bàsic. Així doncs, seguint metodologies ja emprades, es tracta el cru de glicolització de **25** amb una dissolució 2 M de NaOH en THF/MeOH/H₂O. Transcorreguts 2 dies, no s'observa desplaçament de l'equilibri cap a la formació de **94**, rendint un cru en que la proporció **94/95** és pràcticament igual a la inicial.

3.5.3.2. Separació per cromatografia flash i Lobar-Merk®.

Mètode 1

En primer lloc es prova la mescla AcOEt/CHCl₃/MeOH (5:5:1) com a eluent i la relació sílice/producte utilitzada és l'estàndard (50:1). El seguiment de la columna es realitza per cromatografia de capa fina (CCF), utilitzant el mateix eluent. Es detecten dos dels tres compostos formats, ja que **95** es troba en una proporció inferior al 1%. La separació cromatogràfica rendeix una fracció enriquida de **26** que té un 13% de **94**, però no s'aconsegueix la purificació total de **26**.

Mètode 2

Es prova una nova mescla d'eluent, AcOEt/THF (4:1), i s'augmenta la relació sílice/producte, de l'estàndard en cromatografia flash a una relació 350:1. El seguiment de columna es fa per CCF utilitzant la mescla AcOEt/THF (4:1), en la qual **26** i **94** tenen uns factors de retenció de 0.17 i 0.22, respectivament. La fracció mescla de **26** i **94** que s'obté es torna a purificar mitjançant cromatografia Lobar®, utilitzant la mateixa mescla elutòrica AcOEt/THF 4:1.

Combinant la cromatografia flash i Lobar®, s'aconsegueix aïllar un 88% del total de **26** present al cru de glicolització, el que suposa un aïllament de **26** molt elevat.

Quan es prova d'escalar aquesta purificació amb quantitats més elevades de cru de glicolització, apareixen dos problemes que impedeixen aïllar **26**:

- La baixa solubilitat dels triols en l'eluent es manifestà de manera més evident en augmentar la quantitat de cru a separar. A conseqüència de la insolubilitat dels triols en l'eluent, la utilització d'una columna Lobar® no fou possible. Es va provar de carregar 793 mg d'un cru de glicolització amb una mescla d'eluent més polar, però no s'aconseguí aïllar cap producte. La insolubilitat dels triols va obligar, també, a modificar la forma de carregar el producte a la columna flash de separació, canviant de càrrega en dissolució a càrrega seca.
- Tot i perdent-se capacitat de separació del mètode, s'ha de disminuir la proporció sílice/producte (de 350:1 a 150:1), ja que grans quantitats de sílice permeten resolucions elevades en la separació però també provoquen augments considerables en els volums d'elució.

Davant de tots aquests inconvenients es decidí reajustar la metodologia de separació prescindint de l'ús de cromatografia Lobar-Merk® i modificant de nou la mescla elutòria.

Mètode 3

Com s'ha indicat, es decideix utilitzar únicament cromatografia flash amb càrrega seca del cru de glicolització. La relació sílice/producte es redueix respecte al mètode 2 i s'usa una proporció 150:1. La mescla elutòria utilitzada és AcOEt/THF però es disminueix la proporció de THF de 4:1 a 8:1. Disminuint la polaritat de l'eluent, es "compensa" l'amplada que té el front d'elució provinent de la càrrega seca i la menor relació cru/sílice, permetent així la separació dels triols. El seguiment de columna es fa per CCF emprant AcOEt/THF 4:1 com a eluent.

Després de realitzar la reacció de glicolització de **25**, seguida d'una purificació per cromatografia flash en les condicions descrites anteriorment, s'obté un rendiment del 59% de producte aïllat **26**, un 26% d'una fracció barrejada que conté **94** i **26** en una proporció 74:26 i un 4% de **94** pur.

L'ús d'aquest mètode evita els problemes de solubilitat citats en el mètode 2, ja que el cru es carrega a la columna en sec. La càrrega seca permet separar una major quantitat de cru, fet indispensable tenint en compte que **26** és un intermedi de reacció clau en la ruta sintètica dels anàlegs BRs androstànics i es requerirà poder-ne obtenir grans quantitats i d'elevada puresa.

3.5.3.3. Recristal·lització en EtOH

Es decideix provar la purificació mitjançant recristal·litzacions, ja que la separació cromatogràfica emprada és tediosa i comporta molt de temps. L. Kohout *et al.*²⁸⁸ realitzen la purificació i aïllament de 2 α ,3 α -dihidroxí-17 β -hidroxí-5 α -androstan-6-ona (**26**) mitjançant recristal·litzacions consecutives.

El cru obtingut en la reacció de glicolització es recristal·litza amb EtOH i, després d'una sola recristal·lització, s'obté **26** amb un rendiment del 25% i una puresa del 96%.

Posteriorment es realitzà una columna Flash de les aigües mares de la recristal·lització (emprant AcOEt/THF 8:1 com eluent) amb la finalitat d'augmentar el rendiment. S'obté un 41% de producte aïllat **26**, un 11% d'una fracció barrejada que conté **94** i **26** en una proporció 25:75 i un 1% de **94**.

D'aquesta manera s'aconsegueix una rendiment total del compost **26** del 66%.

3.5.3.4. Comparació tècniques de separació dels diols **26**, **94** i **95**

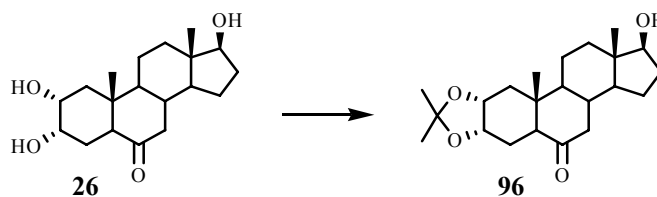
S'observa com, mitjançant la purificació per recristal·lització i la posterior cromatografia flash s'obté un 66% de **26**, superior a l'obtingut per cromatografia flash sola (59%). S'obtenen compostos d'elevada puresa en ambdós casos.

Per tant, es proposa en l'etapa de purificació del glicol **26** primer, dur a terme una recristal·lització amb EtOH per obtenir el producte d'interès amb una elevada puresa i de manera ràpida i, posteriorment, amb les aigües mares de les recristal·litzacions es pot dur a terme una columna flash per tal d'augmentar el rendiment en producte d'interès. Es fixa, doncs, aquest mètode de separació com a estàndard a emprar en la separació de **26**, **94** i **95**.

3.6. Protecció dels diol de l'anell A: síntesi de **96**.

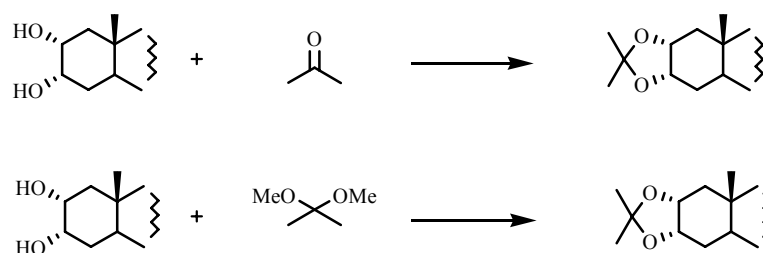
Per poder esterificar una cadena lateral sobre l'hidroxil de C₁₇, cal protegir els diols de l'anell A de l'esquelet. Una de les maneres més comuns de protegir diols veïnals és per formació d'acetals^{153,154,289,290} i ha estat emprada anteriorment en l'equip.¹⁴⁴ Els acetals tenen rendiments elevats, tant en les seves reaccions de formació com trencament, cosa que disminueix al mínim la pèrdua de rendiment en la síntesi.

La desprotecció dels acetals es duu a terme en condicions d'acidesa molt suaus, en què l'èster, que es formarà sobre l'hidroxil de C₁₇, no es veurà afectat. Per tot això, es considera adequada la protecció via acetal de C₂ i C₃. S'escull el grup isopropilidendioxi com a acetal per a protegir C₂ i C₃ (Esquema 39).



Esquema 39

Per obtenir el dioxolà desitjat, cal fer reaccionar el glicol amb acetona,²⁹⁰ o bé amb una forma activada de l'acetona, com el dimetoxipropà (DMP),^{144,289,291} emprant PTSA com a catalitzador.^{292,293}



Esquema 40

Per acabar, cal esmentar que aquest grup protector, pel fet de ser sensible a condicions d'acidesa suaus, no pot ser purificat per cap tècnica cromatogràfica que utilitzi sílice. Per aquesta raó, el cru de **96** s'utilitzarà directament per fer l'esterificació de la cadena lateral.

3.6.1. Intent de síntesi de **96** via Acetona/ H^+

En dissoldre el diol **26** amb acetona seca i quantitats catalítiques d'àcid p-toluensulfònic (PTSA), després de 72 h de reacció a temperatura ambient, no s'aprecia cap avanç significatiu en la reacció per CCF. És probable que la presència d'humitat en l'acetona, altament higroscòpica, expliqui el fet que no es formés el dioxolà **96**.

3.6.2. Síntesi de **96** via DMP

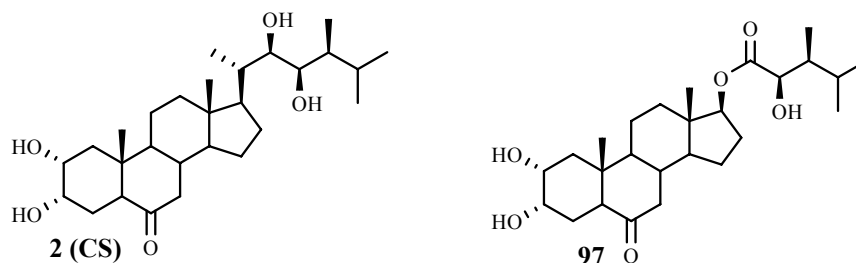
En dissoldre **26** en DMP i quantitats catalítiques de PTSA, després de 28 h de reacció a temperatura ambient i sota atmosfera inerta, s'observa, per CCF, com encara resta diol **26** per reaccionar. De tota manera, aquest no es detecta per CCF, on l'obtenció de **96** és exclusiva.

La presència de **26** en la CCF es dona a causa de la descomposició de **96** en el seu pas a través de la sílice, cosa que confirma la baixa estabilitat del dioxolà **96**. Així, doncs, s'obté **26** amb una conversió total, rendiment quantitatiu i amb una elevada puresa.

El cru d'aquesta reacció s'utilitza directament com a substrat de les reaccions d'ancoratge de cadenes laterals, que s'expliquen més endavant.

4. APROXIMACIÓ A LA SÍNTESI DE LA “CASTASTERONA ANDROSTÀNICA”

Tal i com ja s’ha comentat anteriorment, a partir de la síntesi i avaluació de l’activitat de **97**, es pretén veure l’efecte de la funcionalitat èster a C17 en l’activitat:



Esquema 41

La superposició entre **2** i **97**, realitzada amb el programa MOE, permet assolir un molt bon alineament entre ambdós compostos, tant en les regions polars com en les zones hidrofòbiques:

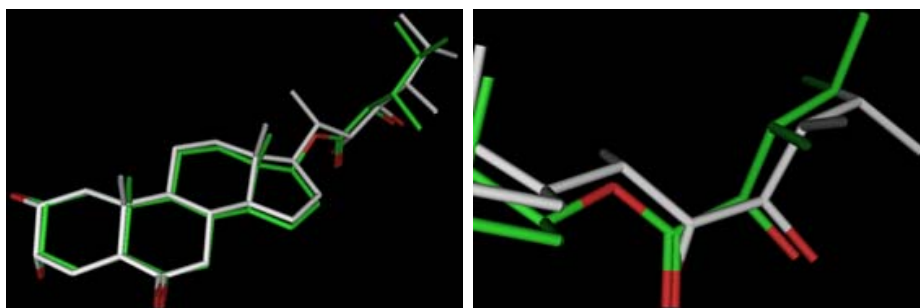
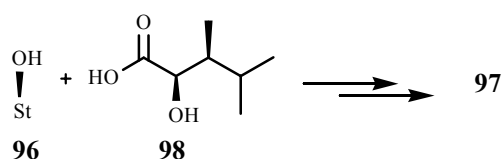


Figura 14

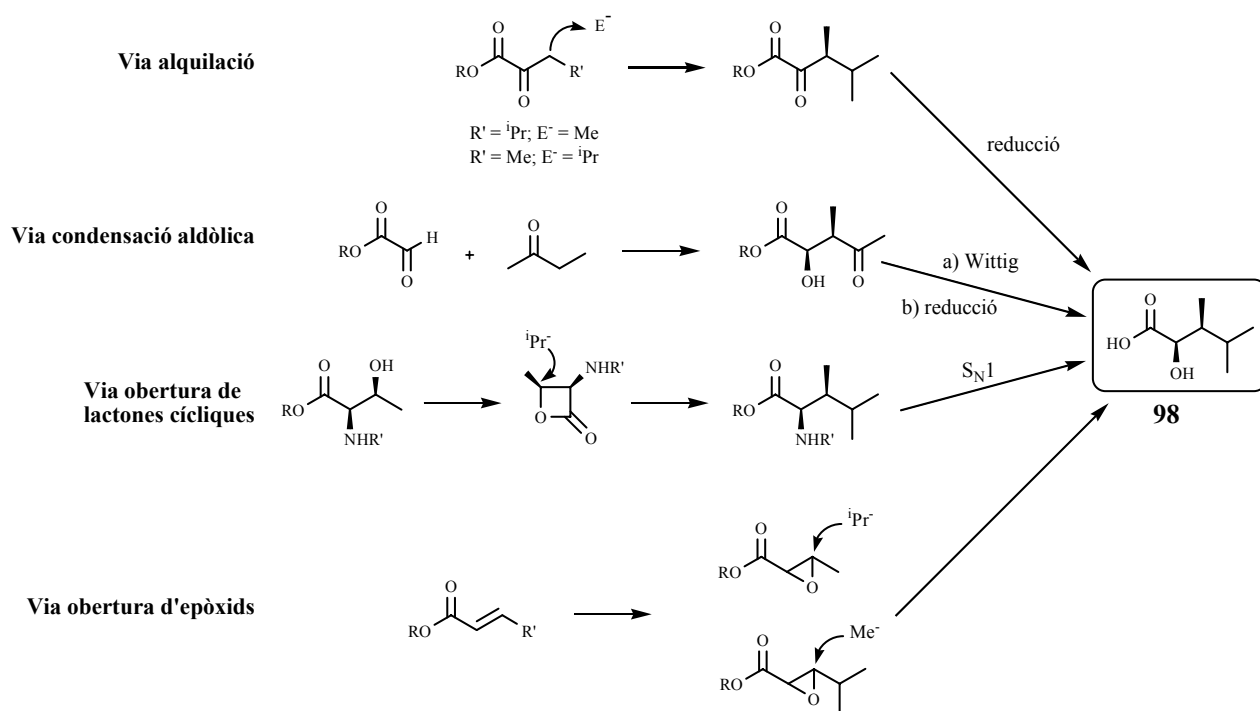
En general, l’estratègia sintètica que es proposa consisteix en l’obtenció de la cadena lateral degudament funcionalitzada, seguit de la corresponent esterificació d’aquesta amb l’esquelet androstenic.



Esquema 42

4.1. Estratègies sintètiques per a la síntesi de l’àcid **98**

La dificultat sintètica de la cadena lateral (l’àcid (3*S*,4)-dimetil-2*S*-hidroxi-pentanoic (**98**)) es deu principalment a la presència de dos centres quirals consecutius. A l’esquema següent, es mostren les millors metodologies trobades per a obtenir l’àcid quiral **98**, seleccionades després d’una extensa recerca bibliogràfica.



Esquema 43

Alquilació en α de carbonil

L'àcid d'interès **98** es podria obtenir a través de l'alquilació quiral en α de carbonil del 2-oxoèster corresponent.²⁹⁴ Si bé, els ee són força elevats (de l'ordre del 93%), es descarta l'ús d'aquesta reacció degut principalment a dos motius.

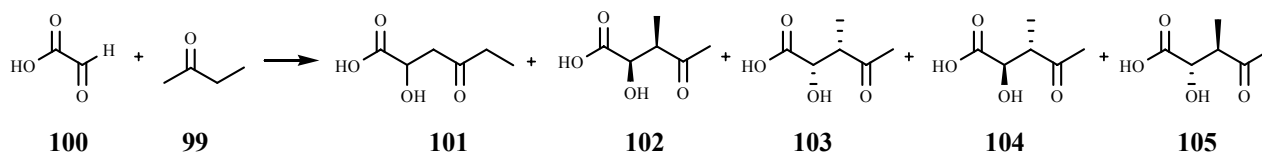
D'una banda, al fet que serien necessàries estrictes condicions de reacció (-100 °C per tal d'obtenir una bona diastereoselectivitat) i, de l'altra, a que encara restaria per realitzar la reducció de l' α -carbonil. Aquesta, hauria de ser diastereoselectiva per tal d'evitar la formació dels dos α -hidroxièsters diastèriomèrics presumiblement difícils de separar.

Condensació aldòlica

La formació de l' α,β -enllaç C-C de **98** es podria aconseguir a través de la condensació aldòlica entre un compost cetònic (**99**) i un α -cetoàcid (**100**).

L'ús de catalitzadors com ara $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$,²⁹⁵ BCl_3 ,²⁹⁶ $TiCl_4$,^{297,298} $InCl_3 \dots$,²⁹⁹ permet minimitzar la formació de productes d'eliminació, evitar l'ús de medis fortament àcids o bàsics, reaccions secundàries...

Concretament, en aquest cas, la presència de dos metilens actius provoca la formació de dos tipus de productes de condensació. A més, aquests poden ser *sin* o *anti*, depenent de les configuracions en α i β .



Esquema 44

Si bé es pot afavorir la formació dels diastereòmers *sin* (**102** i **103**) front els *anti* (**104** i **105**), la regioselectivitat obtinguda en la condensació entre **100** i **99** és molt baixa (56:44).

Considerant la dificultat de separació d'aquests 5 compostos, així com el fet de ser necessària una posterior reacció de Wittig (per convertir la γ -cetona en CH_3), seguida de reducció del doble enllaç generat, es descarta aquesta estratègia sintètica per obtenir **98**.

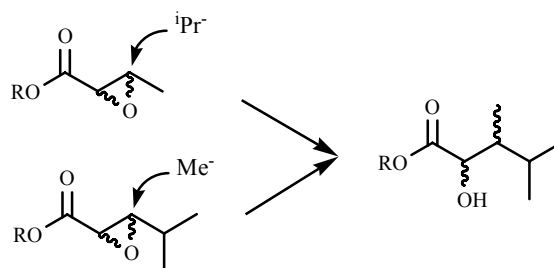
Obertura de cicles de lactones cícliques

Una altra estratègia per a la síntesi de **98** consistiria en la obertura de lactones cícliques mitjançant l'atac nucleòfil d'un magnesià (introducció del resta alquílic).³⁰⁰

Els baixos rendiments descrits per aquesta reacció, així com també, la possible racemització del centre quiral en α de carbonil durant la necessària substitució nucleòfila ($\text{S}_{\text{N}}1$) posterior del grup amínic per hidroxil, semblen desaconsellar aquesta metodologia per a la síntesi de **98**.

Obertura d'epòxids

L'estratègia sintètica que es considera més apropiada consisteix en la síntesi de **98** a partir de l'obertura d'un epòxid. S'estudiarà tant l'obertura d'epoxibutanoats (introducció del grup isopropil) com la de 4-metilpentanoats (introducció de metil).



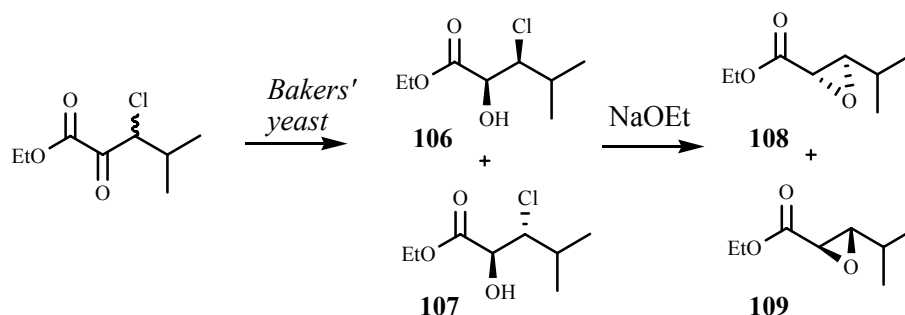
Esquema 45

Amb la finalitat de reduir al màxim el nombre de diastereòmers que es formarien en les obertures dels epòxids (dificultarien les etapes de purificació posteriors), s'intentarà obtenir aquests amb una elevada puresa enantiomèrica.

4.2. Síntesi d'epòxids

4.2.1. Reducció microbiològica

L'obtenció dels α,β -epoxièsters quirals **108** i **109** es pot dur a terme mitjançant la reducció enzimàtica (emprant *Baker's yeast: Saccharomyces cerevisiae*) d'èsters 3-cloro-2-oxoalcanoics quirals (**106** i **107**), els quals rendeixen els epòxids d'interès per tractament amb NaOEt .^{301,302}

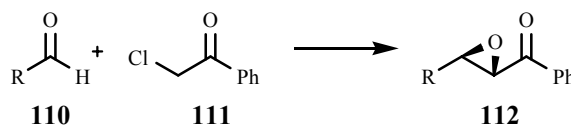


Esquema 46

La dificultat per obtenir el producte de partida quiral d'interès (l'èster 3*R*-cloro-4-metil-2-oxopentanoat d'etil) va fer pensar en obtenir l'epòxid d'interès a través d'altres metodiques.

4.2.2. Reacció de Darzens

La reacció de Darzens consisteix en la condensació d'aldehids (**110**) amb α -halocetones (**111**) en presència de bases (LiOH, ^tButOK, NEt₃) per donar les α,β -epoxicetones (**112**).³⁰³ L'ús de catalitzadors de transferència de fase permet la síntesi enantioselectiva d'aquestes.³⁰⁴



Esquema 47

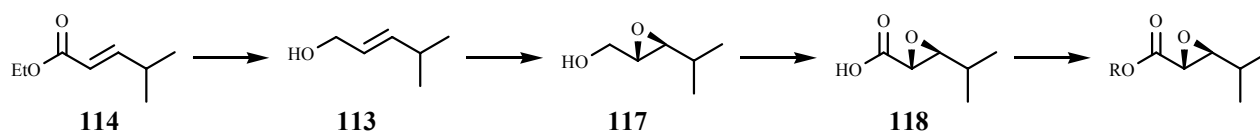
La formació de **112** es dona amb rendiments i excessos enantiomèrics baixos, de l'ordre de 40-80% i 40-70%, respectivament, depenent del substituent alifàtic R.

A més, per a la síntesi de **98**, caldria partir de l' α -cloroèster corresponent, enlloc de la cetona **111**. Considerant, la possible hidròlisi de l'esmentada funcionalitat èster d'interès en medi bàsic, es descarta la reacció de Darzens per obtenir els α,β -epoxièsters d'interès.

4.2.3. Epoxidació asimètrica de Sharpless

Es proposa emprar l'epoxidació asimètrica de Sharpless d'alcohols al·lílics, una de les reaccions asimètriques més extensament usades, per a l'obtenció d'epòxids quirals d'interès.

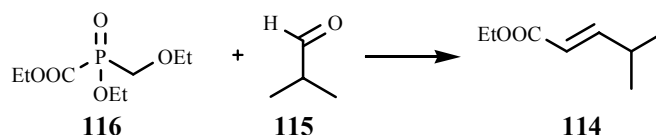
L'estratègia sintètica es basa en l'epoxidació de l'alcohol al·lílic **113**, obtingut per reducció de **114**, el qual s'haurà sintetitzat per reacció de Wittig entre l'isobutiraldehid (**115**) i el fosfonoacetat de trietil (**116**). L'oxidació de **117** a àcid carboxílic i posterior esterificació rendiran els α,β -epoxièsters substrats d'interès.



Esquema 48

4.2.3.1. Síntesi de l'èster α,β -insaturat **114**

La síntesi de l'èster α,β -conjugat **114** per condensació de Wittig entre l'isobutiraldehid (**115**) i el fosfonoacetat de trietil (**116**) es du a terme, en la majoria de les reaccions descrites en la bibliografia, en presència de NaH. **114** s'obté amb rendiments que oscil·len entre el 58 i el 97%.³⁰⁵⁻³¹⁰



Esquema 49

Així doncs, seguint la metòdica descrita per Caldwell *et al.*³⁰⁵ i Baker *et al.*,³⁰⁶ el tractament de **115** amb una dissolució a 0 °C de **116** en NaH (relació molar **115/116** 1:1), rendeix, després de purificació per destil·lació, **114** com a un oli incolor d'elevada puresa (rendiment del 83%).

4.2.3.2. Síntesi de l'alcohol al·lílic **113**

L'alcohol al·lílic **113** es va obtenir mitjançant la reducció de **114** per tractament amb hidrur de diisobutilalumini (DIBAL-H), seguint metòdiques descrites a principis dels 90.^{305,306} Un cop purificat el cru de reacció mitjançant cromatografia flash, s'obté **113** d'elevada puresa i amb un rendiment del 71%

4.2.3.3. Epoxidació asimètrica de Sharpless de l'alcohol al·lílic **113**

L'epoxidació enantioselectiva d'alcohols al·lílics (epoxidació de Sharpless) s'aconsegueix mitjançant la inducció asimètrica de derivats de tartrat enantiomèricament purs.

La formació d'epoxialcohols d'elevada puresa enantiomèrica a partir de l'oxidació d'alcohols al·lílics mitjançant hidroperòxid de ^tbutil (TBHP), en presència d'isopropòxid de titani (Ti(OⁱPr)₄) i tartrat de dietil (DET) es troba descrita des de principis dels anys 80.³¹¹

Des d'aleshores, s'ha modificat el procediment original per tal de millorar rendiments, excessos enantiomèrics, reduir la porció de catalitzador necessària...³¹²⁻³¹⁴

Multitud d'autors han emprat i estan emprant aquesta reacció per a obtenir epoxialcohols quirals sobre substrats molt diversos. En alguns casos, però, es troba descrita la dificultat en l'aïllament de compostos degut al seu baix pes molecular i elevada volatilitat, essent necessari modificar els procediments d'extracció (addició d'àcid cítric per eliminar els derivats de titani), emprar la destil·lació com a tècnica de purificació (possible epoxipolimerització), obtenir derivats de major pes molecular...^{312,315,316} Concretament, l'ús de *p*-nitrobenzoats derivats dels epoxialcohols simplifica i millora l'aïllament i purificació per recristal·lització.

L'epoxidació asimètrica de **113** es troba descrita en la literatura emprant tartrats de dietil [(+)-DET³⁰⁵ i (-)-DET³⁰⁶] com a auxiliars quirals, rendint respectivament els 2*S*,3*S* i 2*R*,3*R* epoxialcohols. Així, per a la síntesi del compost d'interès **117**, Caldwell *et al.*³⁰⁵ obtingueren un rendiment del 82% i un excés enantiomèric del 95%.

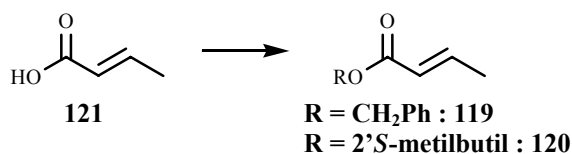
Així, doncs, es tractà **113** amb una dissolució de (+)DET, $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ i TBHP durant 3 dies a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ i es purificà el cru obtingut per cromatografia flash (SiO_2 , Cy/AcOEt 7:2).

Malauradament, però, s'obtingué una barreja dels dos enantiòmers amb un rendiment del 44% i on **117** es trobava en un excés enantiomèric no superior al 2%. Tot i haver dut a terme diversos intents de la mateixa reacció, controlant estrictament totes les condicions, no s'aconseguí en cap cas reproduir els resultats descrits en la bibliografia, assolint-se ee molt menors.

Es creu interessant, per a futurs treballs, aprofundir en el coneixement d'aquesta epoxidació, intentant canviar i optimitzar les condicions de reacció per tal d'assolir la puresa òptica descrita en la bibliografia.³⁰⁶ De tota manera, amb la finalitat d'estudiar l'etapa sintètica de l'obertura d'epòxids, es decideix treballar a partir d'aquest moment, amb epòxids racèmics, obtinguts a partir d'àcids o èsters α,β -insaturats.

4.2.4. Obtenció d'àcids o èsters α,β -insaturats

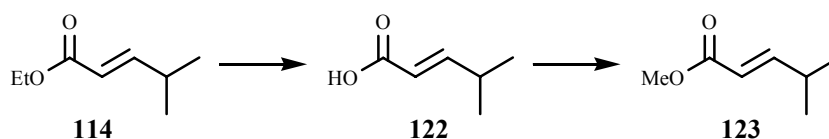
D'una banda, es proposa obtenir el crotonat de benzil (**119**), ja que la introducció d'una funcionalitat aromàtica permetrà la visualització dels diferents compostos formats en les CCF. També es creu interessant la síntesi del crotonat de 2'S-metilbutil (**120**) per tal de, aprofitant la quiralitat de l'èster, generar diastereòmers i simplificar així, la seva separació.



Esquema 50

L'esterificació entre l'àcid crotonic (**121**) i l'alcohol benzílic es va dur a terme en presència de DCC/DMAP, rendint **119** amb un rendiment del 65%. **120** s'obtingué per esterificació de Fisher entre **121** i el 2S'-metil-1-butanol amb un 64% de rendiment.

D'altra banda, partint de l'èster α,β -insaturat **114**, la síntesi del qual s'ha descrit en l'apartat 4.2.3.1., també es poden obtenir l'àcid carboxílic **122** (per saponificació) i l'èster metílic **123** (posterior esterificació de **122**):



Esquema 51

Es pretén emprar tant **122** com **123** per a dur a terme les posteriors epoxidacions i obertures d'epòxid. S'ha escollit l'èster metílic per ser el més àmpliament emprat en la literatura per aquest tipus de reaccions.

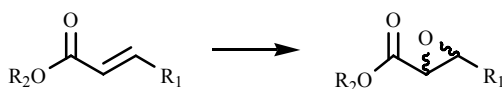
L'àcid **122** s'obtingué, amb un rendiment del 96%, per tractament de l'èster **114** amb $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ a reflux durant 5 h.

Una de les metodologies més emprades per obtenir èsters metílics a partir d'àcids carboxílics consisteix en tractar aquests amb diazometà (CH_2N_2). Concretament, l'any 1978, Razuš *et al.*³¹⁷ descriueren ja la síntesi de **123**.

Així, doncs, es bombolleja CH_2N_2 sobre una dissolució que conté **122** en CH_2Cl_2 a 0°C . Aquest gas es genera dissolent Diazald® (*N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida) en EtOH i addicionant NaOH (aq). S'obté **123** de forma quantitativa i d'elevada puresa.

4.2.5. Síntesi d' α,β -epoxiàcids/èsters racèmics a partir de derivats α,β -insaturats

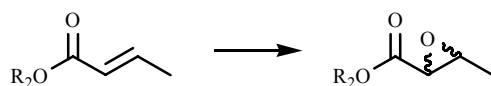
S'estudiarà l'epoxidació d'àcids i èsters α,β -insaturats, essent R_1 = metil o isopropil



Esquema 52

$\text{R}_1 \equiv$ metil

Per tal d'assajar l'obertura amb $^i\text{Pr}^-$, es proposa obtenir diversos α,β -epoxiderivats de l'àcid butanoic.



$\text{R}_2 = \text{H}$: **121**

$\text{R}_2 = \text{CH}_3$: **125**

$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$: **119**

$\text{R}_2 = 2'S$ -metilbutil : **120**

$\text{R}_2 = \text{H}$: **124**

$\text{R}_2 = \text{CH}_3$: **126**

$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$: **127**

$\text{R}_2 = 2'S$ -metilbutil : **128**

Esquema 53

La síntesi d' α,β -epoxièsters a partir d'èsters α,β -insaturats es troba àmpliament descrita a la bibliografia emprant MCPBA com a agent oxidant. Tant el temps de reacció (12 h, 2 dies, una setmana...) com la temperatura (de 0°C , t.a., reflux...) juguen un paper important per aconseguir la conversió total del producte de partida. Controlant aquestes condicions de reacció s'aconsegueixen obtenir rendiments superiors al 90%.³¹⁸⁻³²⁵

A continuació es mostren les condicions i els rendiments obtinguts per a la síntesi de **126**, **127** i **128** a partir de **125**, **119** i **120**, respectivament:

Epòxid	t (h)	T ($^\circ\text{C}$)	rdt (%)
126	24 h	reflux	85%
127	24 h	reflux	62%
128	18 h	t.a.	75%

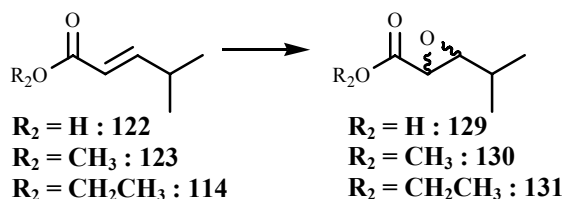
Taula 9

L'epoxidació de **125** per obtenir **126** es troba descrita en la bibliografia amb rendiments semblants als obtinguts (de l'ordre del 89%).³²³

Més difícil resulta ser l'epoxidació d' α,β -epoxiàcids emprant MCPBA. Es recupera, en molts dels casos descrits, els àcids α,β -insaturats (productes de partida) sense reaccionar. Per aquest motiu, Sharpless *et al.*³²⁶ proposaren el 1985 l'epoxidació d'àcids carboxílics emprant H_2O_2 com agent oxidant, en presència de Na_2WO_4 . Fins a l'actualitat, aquesta reacció ha estat àmpliament emprada, obtenint-se rendiments que oscil·len entre el 40 i el 90%.³²⁷⁻³³¹ De tota manera, el tractament de **121** amb H_2O_2 i Na_2WO_4 a 60°C durant 1 dia, rendeix un cru on la conversió no és superior al 40%.

$R_1 = \text{isopropil}$

Amb la finalitat d'assajar l'obertura amb Me^- , es proposa obtenir diversos α,β -epoxiderivats de l'àcid 4-metilpentanoic:



Esquema 54

Es decideix provar l'epoxidació dels èsters **122**, **123** i **114** emprant MCPBA i estudiar la importància del temps i la temperatura. A continuació es mostren els resultats obtinguts:

Epòxid	t (h)	T (°C)	rdt (%)
129	12 h	reflux	0%
130	12 h	reflux	49%
131	17 h	t.a.	0%
131	10 h	reflux	16%
131	22 h	reflux	35%
131	240 h	reflux	99%

Taula 10

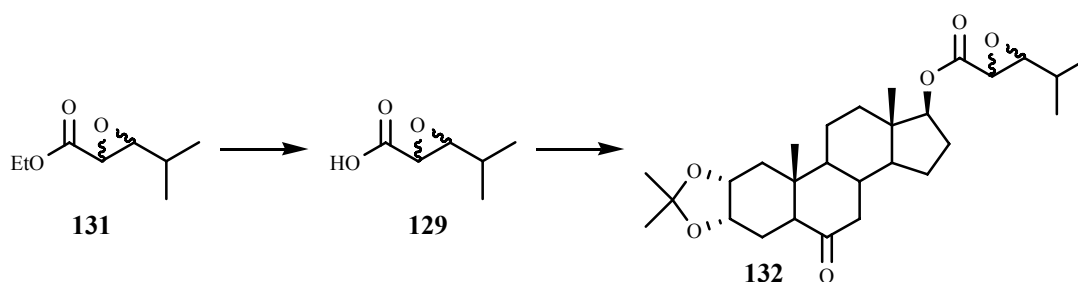
D'una banda, es corrobora la dificultat d'epoxidació dels àcids carboxílics α,β -insaturats amb MCPBA, no detectant-se la formació de **129** després de 12 h a reflux.

De l'altra, es pot observar la necessitat de treballar en condicions de reflux, ja que a t.a. no s'observa formació de l'epòxid **131**, ni tan sols transcorregudes 17 h de reacció.

Finalment, és important destacar els elevats temps de reacció (fins a 10 dies) necessaris per assolir una conversió total i formació gairebé quantitativa de l'epòxid **131**.

4.2.6. Síntesi de l'androsta **132**

L'àcid 2,3-epoxi-4-metilpentanoic (**129**) s'obtingué per saponificació en medi $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ de l'èster etílic corresponent **131**, amb un 90% de rendiment. **132** se sintetitzà per esterificació de Yamaguchi (formació de l'anhidrid mixt de **129** i el clorur de 2,4,6-triclorobenzoil i condensació amb **96**), obtenint-se un rendiment del 55%.

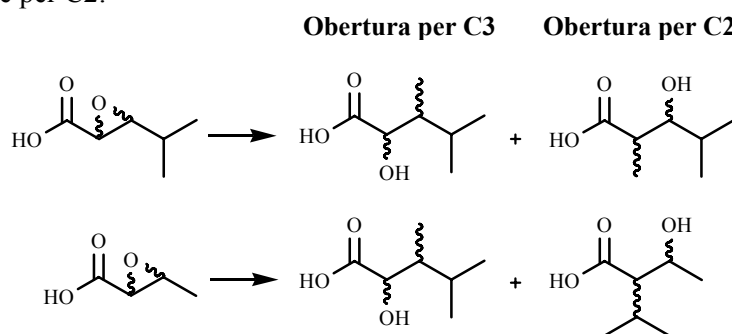


Esquema 55

4.3. Obertura d'epòxids

L'obertura dels α,β -epoxièsters és, sens dubte, l'etapa més crítica i complicada de tota estratègia sintètica. Per tal d'obtenir els èsters 2-hidroxi-3,4-dimetilpentanoats d'interès, es proposa provar la introducció del grup metílic sobre els diferents 2,3-epoxi-4-metilpentanoats i de l'isopropílic sobre els 2,3-epoxibutanoats. D'entre tots els agents nucleòfils per a dur a terme aquests tipus de reaccions es troben el trimetilalumini (TMA), el bromur d'isopropil magnesi ($^i\text{PrMgBr}$) i els isopropilcuprats de liti ($^i\text{Pr}_2\text{CuLi}$).

Cal esmentar que l'obertura dels epòxids es pot donar pel carboni en C3 (generant els compostos d'interès) però també per C2:



Esquema 56

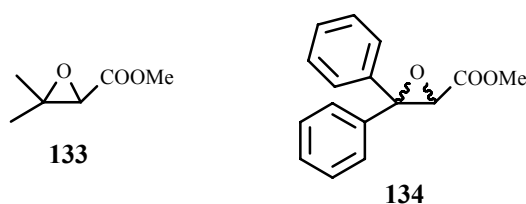
4.3.1. Emprant TMA

El TMA és l'agent nucleòfil més emprat per a la introducció de grups metílics a través de l'obertura d'epòxids.

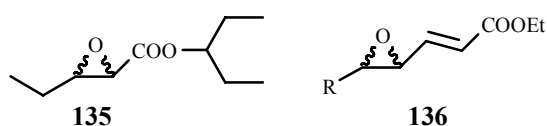
Tant el rendiment com la regioselectivitat de la reacció (obertura per C2 o C3) depenen enormement del substrat i de les condicions de reacció.

Es troben escasses referències on s'observi l'obertura majoritària d'interès (per C3), limitant-se aquestes a les investigacions realitzades pel grup de Jansen *et al.*^{332,333} sobre substrats com **133** o **134**.

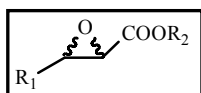
La formació preferent dels α -hidroxi front als β -hidroxièsters (97:3) s'atribueix a la major estabilització de l'intermedi carbocatiònic a C3 (terciari) que a C2 (secundari):



En altres casos, es dona preferentment l'obertura no desitjada per C2 (> 75%), com per **135**³³⁴ i **136**.^{335,336}



Tot i les escasses referències bibliogràfiques sobre l'ús de TMA per a l'obertura d' α,β -epoxièsters, es decideix provar la reactivitat d'aquest agent nucleòfil sobre els següents epòxids:



Epòxid	R ₁	R ₂
126	Me	Me
127	Me	CH ₂ Ph
130	ⁱ Pr	Me
131	ⁱ Pr	Et

Taula 11

A continuació es mostren les condicions de reacció emprades en les diferents proves, així com la composició del cru obtingut (valorat mitjançant espectres de ¹H-RMN):

Exp	Epòxid	Dissolvent	T (°C)	t (h)	Composició cru obtingut
1	126	heptà	De -10 °C a 45 °C	0.50 h	cc
2	126	CHCl ₃	De - 25 °C a t.a.	0.25 h	pp
3	126	CHCl ₃	De - 15 °C a t.a.	12 h	Possible presència de 2-OH Hidròlisi parcial de l'èster metílic
4	126	CHCl ₃	De - 35 °C a t.a.	20 h	Possible presència de 2-OH Hidròlisi parcial de l'èster metílic
5	127	Cy	20 °C	8 h	Formació de 2 i 3-OH Resta un 40% de pp
6	127	CH ₂ Cl ₂	- 20 °C	48 h	Hidròlisi de l'èster benzílic Presència de la funcionalitat epòxid
7	130	CHCl ₃	De - 35 °C a 0 °C	12 h	Hidròlisi parcial de l'èster
8	131	Cy	0 °C	24 h	pp
9	131	CHCl ₃	De - 35 °C a 0 °C	12 h	Possible presència de l' α -hidroxièster

Taula 12

Tots els intents de purificació i aïllament dels possibles α - o β -hidroxièsters formats van resultar sense èxit deguts principalment a la dificultat de detecció d'aquests compostos.

De tota manera, es pot observar, mitjançant integrals de ¹H-RMN, com, curiosament, en la majoria dels casos estudiats, la funcionalitat èster sembla ser més reactiva que l'epòxid, en condicions de TMA a baixes temperatures. Aquest fet va fer pensar en substituir el TMA per altres agents nucleòfils menys reactius com són els derivats magnesiens o els organocuprats.

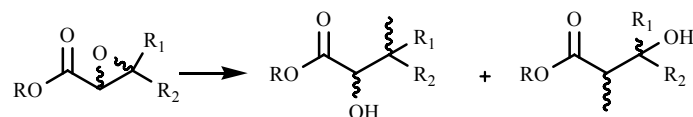
4.3.2. Emprant ⁱPrMgBr

Tot i que la bibliografia sobre l'ús de bromurs d'alquilmagnesi per a l'obertura d' α -epoxiàcids es limita pràcticament als estudis realitzats per El Kady *et al.*³³⁷ l'any 1979 (rendiments entre el 40 i el 70%), es decideix assajar aquest reactiu sobre l'epoxiàcid d'interès **124**.

De tota manera, el tractament de **124** amb $^i\text{PrMgBr}$ a t.a. durant 24 h rendeix un cru que s'identifica majoritàriament com a producte de partida sense reaccionar.

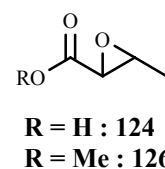
4.3.3. Emprant $^i\text{Pr}_2\text{CuLi}$

Chong *et al.*³³⁸ i Petit *et al.*³³⁹ descrigueren a finals dels anys 80 l'obertura d' α,β -epoxiàcids i α,β -epoxièsters, respectivament, emprant dimetilcuprats de liti. La regioselectivitat de la reacció depenia exclusivament del substrat, obtenint-se barreges 2-hidroxi/3-hidroxi entre 1:30 i 17:1:



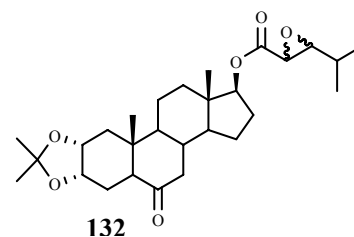
Esquema 57

Es decideix provar els organocuprats com agents nucleòfils per a l'obertura de l'epoxièster metílic **126** i també del seu àcid lliure corresponent **124**. Així, doncs, el tractament de **124** i **126** amb $^i\text{Pr}_2\text{CuLi}$ (generat *in situ* per tractament de CuI o CuCN amb $^i\text{PrLi}$ o $^i\text{PrMgCl}$) rendeix un cru on es detecten senyals assignables a l'obertura d'interès. De tota manera, tots els intents de purificació per cromatografia flash han estat fallits. Una de les causes podria ser el fet de treballar amb l'àcid carboxílic lliure.



4.4. Propostes per a futures síntesis

Tenint en compte els esperançadors resultats obtinguts en l'obertura d' α,β -epoxièsters emprant $^i\text{Pr}_2\text{CuLi}$, es proposa per a futurs treballs, aplicar aquesta metodologia directament sobre **132**. D'aquesta manera, no solament s'obtindria directament l'anàleg androscànic d'interès, sinó també es milloraria el procés de seguiment, detecció i aïllament dels productes formats (compostos esteroidals).

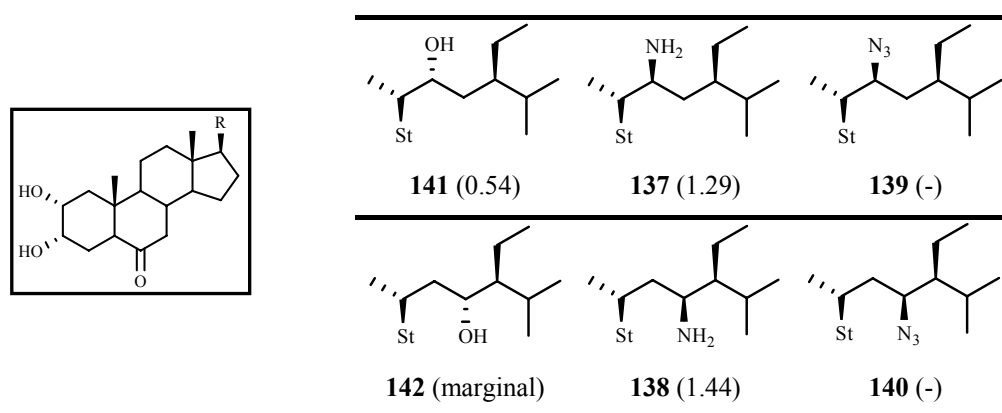


5. SÍNTESI D'ANDROSTANS AMB DIVERSES FUNCIONALITATS EN α DE CARBONIL

5.1. Introducció i antecedents

L'estudi de la forma d'interaccionar dels *R*-hidroxils a C22 i C23 amb el receptor s'ha iniciat recentment en l'equip, havent-se aconseguit obtenir alguns resultats preliminars interessants, tots ells emmarcats dins la tesi doctoral de M. Amorós.¹¹⁷

El fet que els aminoderivats **137** i **138** tinguessin una activitat superior als seus corresponents azidoderivats **139** i **140**, va permetre suggerir que els hidroxils presents en la cadena lateral dels BRs actuaven com a donadors de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor.



Taula 13

De tota manera, caldria obtenir altres anàlegs amb diferents funcionalitats a la cadena lateral per tal de corroborar aquesta hipòtesi.

Tal i com ja s'ha esmentat anteriorment, un dels objectius principals d'aquesta tesi consisteix en aprofundir en el coneixement de la forma d'interaccionar d'ambdós hidroxils, mitjançant la síntesi i avaluació de l'activitat de diversos anàlegs androstànics. Cal recordar que s'assumeix que el carbonil de l'èster androstànic mimetitza el 22*R*-OH i la funcionalitat en α d'aquest carbonil simula el 23*R*-OH.

Així doncs, es proposa obtenir una sèrie d'androstans amb el mateix esquelet i cadena lateral hidrocarbonada i que només difereixin en la funcionalitat en α de carbonil.

Tenint en compte que l'anàleg androstànic que major activitat ha mostrat fins el moment (**19** on X = NHBoc, activitat de 1.03) presenta cadena lateral derivada de l'àcid 4-metilpentanoic, es considera interessant l'obtenció d'androstans 17 β -(4'-metilpentanoil)-2'-substituïts (Figura 15). Aquest tipus de cadenes laterals difereixen de l'anàleg òptim ('la CS androstànica') només per l'absència del metil en la posició C24. A més, sintèticament aquest tipus de derivats presenten com a principal avantatge el fet que els productes de partida podrien ser la D i L-leucina, comercialment assequibles.

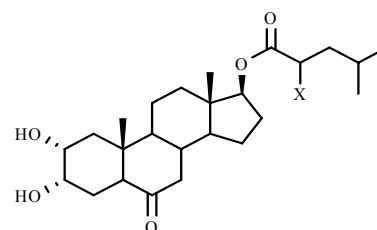


Figura 15

Pel que fa referència als grups funcionals a introduir en α de carbonil de la cadena lateral, es pensa en primer lloc en la funcionalitat hidroxílica com a donadora de pont d'hidrogen i les funcionalitats azida, fluor i cetona com a acceptores de pont d'hidrogen. A partir de l'avaluació de les dades d'activitat d'aquests anàlegs, es pretén establir si l'hidroxil en C₂₃ de la BL actua com acceptor o com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor.

Així mateix, l'obtenció i avaluació de l'activitat d'anàlegs amb funcionalitat hidroxil, amina o azida amb diferent configuració en α de carbonil permetrà estudiar la influència de les configuracions 2'R i 2'S en l'activitat dels anàlegs. Cal recordar que tots els BRs naturals presenten el diol de la cadena lateral en configuració 22R,23R, essent tots els anàlegs 22S,23S sintètics. A més, BRs amb 22R,23R-diol mostren sempre major activitat que els seus corresponents diastereòmers 22S,23S. Es pretén observar si se segueix la mateixa tendència pels anàlegs androstànics (si els 2'R derivats mostren major activitat que els 2'S).

També es pretén estudiar la importància i influència del grup BOC en l'activitat de l'androstà **19**, a partir de l'obtenció d'anàlegs on el grup ^tbutoxi es substitueixi per un metoxi.

Tanmateix i donat que aquesta no és la cadena òptima degut a la manca de metil en la posició C24, es creu també interessant obtenir un anàleg BR androstànic sense cap tipus de funcionalitat en la posició α de carbonil de la cadena lateral per tal de poder extreure conclusions més estrictes sobre la funcionalitat a introduir. Així mateix, es disposarà de més dades per demostrar i corroborar la influència de l'hidroxil en C₂₃ en la interacció BR-receptor i, conseqüentment, en l'activitat dels compostos.

A la taula següent, es mostra un resum de les funcionalitats interessants d'ésser introduïdes en α de carbonil, així com també la informació que es pretén obtenir de cada un dels anàlegs sintetitzats:

X	Objectiu
2'-H	D'una banda, es prendrà com a referència per als objectius posteriors i de l'altra, permetrà constatar que la funcionalitat en α de carbonil és imprescindible per a l'activitat dels anàlegs
2'R-N ₃	
2'R-F	Corroborar que el 23R-OH actua com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor.
2'R-OH	
2'ceto-	
2'R-NHCOOMe	Estudiar la importància del grup Boc de 19
2'S-N ₃	
2'S-F	Estudiar la influència de la configuració (2'R vs 2'S) en l'activitat
2'S-OH	
2'S-NHCOOMe	

Taula 14

A continuació es comentarà més detalladament cada un dels anàlegs que es pretenen obtenir. Es mostraran les característiques estructurals i les similituds de cada un d'ells amb la CS (**2**), mitjançant les respectives superposicions. De cara a obtenir anàlegs amb una elevada activitat serà necessari no solament

un elevat grau de solapament amb **2** sinó també que les funcionalitats polars de l'androstà siguin capaces de formar ponts d'hidrogen amb el receptor. Així, per a un mateix grau de solapament, segons sigui el caràcter del grup en α de carbonil (donador o acceptor de pont d'hidrogen) es poder obtenir anàlegs actius o amb activitat marginal en ésser avaluats en el *RLIT*.

Tenint en compte que, segons resultats obtinguts anteriorment en l'equip, sembla ser que aquesta funcionalitat actuaria com a donadora de pont d'hidrogen en la interacció amb el receptor,¹¹⁷ els 2'-azido, 2'-fluoro o 2'-cetoanàlegs (acceptors de pont d'hidrogen) no haurien de mostrar activitat com a promotors del creixement vegetal, mentre que s'hauria d'observar certa activitat pels 2'aminoderivats (donador de pont d'hidrogen).

És important destacar que es mostraran imatges de superposicions en 2D, fet que, en alguns casos pot fer difícil apreciar les semblances o similituds dels diferents androstants amb **2**.

5.2. Anàlegs androstànics proposats

5.2.1. Sense funcionalitat en α de carbonil

La Figura 16 mostra una superposició entre la CS (**2**, en blanc) i **143** (en verd). Es pot observar com **143** és incapaç de mimetitzar el 23R-OH de la BL degut a l'absència de funcionalitat polar en α de carbonil.



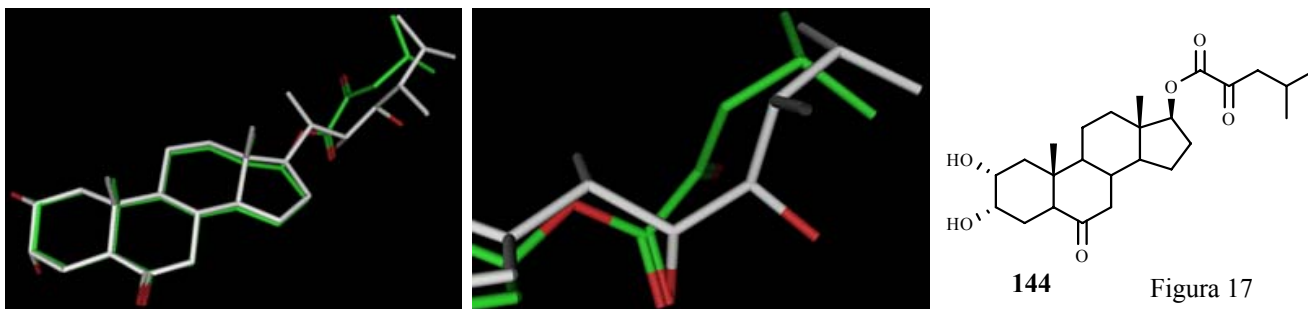
Figura 16

S'espera una activitat baixa o nul·la per aquest compost deguda a l'esmentada manca de funcionalitat en α de carbonil. Tanmateix, s'aborda la seva síntesi per tal de prendre'l com a referència i poder atribuir la possible activitat dels altres compostos a la funcionalitat en α de la cadena lateral (ja que serà la única que canviarà respecte **143**).

5.2.2. Funcionalitat cetona en α de carbonil

En la Figura 17 es pot observar la bona superposició que es dona entre la castasterona (**2**, en blanc) i l'anàleg α -ceto èster **144** (en verd).

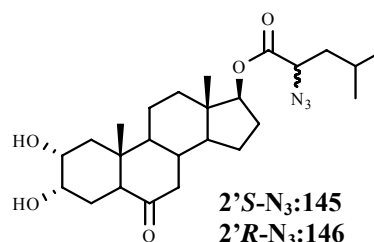
De tota manera, la hibridació sp^2 (cetona) en α de carbonil de **144** provoca una distribució espacial més rígida i plana per els carbonis en *ipso*, α i β de la cadena lateral. Aquest fet condueix a petites diferències en la superposició entre l'hidroxil en C₂₃ de **2** i el grup cetònic a C2' de **144**, així com també a lleugeres diferències en la part terminal hidrocarbonada de la cadena lateral d'ambdós compostos.



En el cas que el 23R-OH de la BL actués com a donador de pont d'hidrogen amb el receptor, tal i com suggereixen estudis previs de l'equip,¹¹⁷ **144** hauria de ser inactiu en ésser avaluat en el *RLIT*.

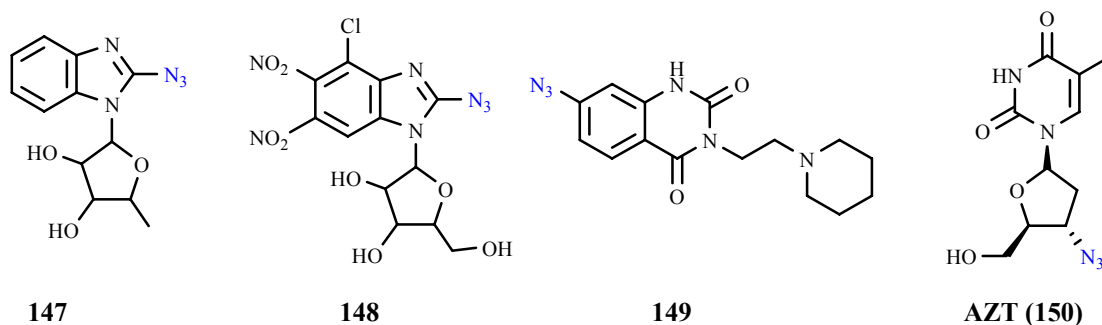
5.2.3. Funcionalitat azida en α de carbonil

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, es pretenen obtenir i avaluar l'activitat en el *RLIT* dels azidoanàlegs **145** i **146**.

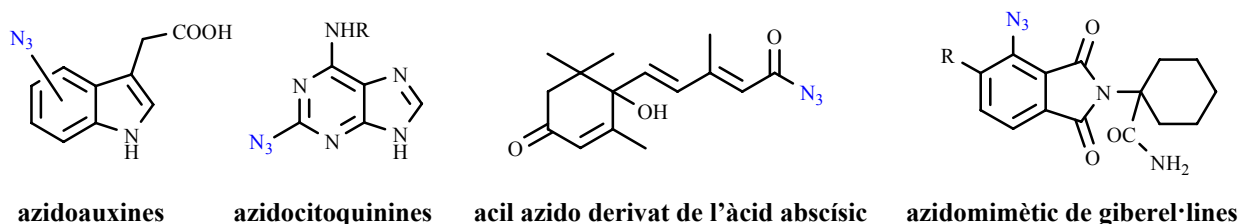


Tot i que la funcionalitat azida és força emprada i comú en síntesi orgànica, es troben escasses referències sobre el seu ús en compostos bioactius.

Alguns azidoderivats com **147** i **148**³⁴⁰ i **149**³⁴¹ s'estan avaluant per a ser emprats en el tractament d'algunes infeccions víriques o per accelerar la curació de ferides obertes, respectivament. Tanmateix, l'azidotimina **150** (AZT) és sens dubte l'exemple més destacat d'azidocompost amb aplicació farmacològica. Aquest es va desenvolupar com a agent anticancerígen el 1964, demostrant-se el 1985 que presentava activitat antirretroviral front al VIH.³⁴² Aprovat per la *Food and Drug Administration* dels EUA el 1987, s'empra actualment en el tractament del virus de la SIDA (Retrovir® o Combivir®)



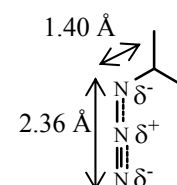
Pel que fa referència a l'obtenció d'azidocompostos com a hormones de creixement vegetal, es troben descrits alguns derivats d'auxines,^{343,344} de citoquinines,^{345,346} de l'àcid abscísic,³⁴⁷ mimètics de giberel·lines³⁴⁸...



La majoria d'aquests azidoderivats es van sintetitzar amb la finalitat d'identificar el receptor biològic mitjançant tècniques de marcatge per fotoafinitat: després de tenir lloc la unió entre el receptor i els azidoderivats, aquests s'activaven fotoquímicament, forçant la reacció amb les regions veïnals del lloc d'unió.

Quan aquests azidocompostos s'avaluaven en el bioassaig de la mongeta, del tabac, del pèsol, del gira-sol o del blat, mostraven activitats equivalents o superiors a la dels corresponents promotors del creixement naturals.

Els principals inconvenients d'introduir la funcionalitat azida en BRs androstànics es centren en la diferència de geometria (coplanar) i volum respecte l'hidroxil (Esquema 58), així com també en la dificultat de modelització molecular d'aquest grup.



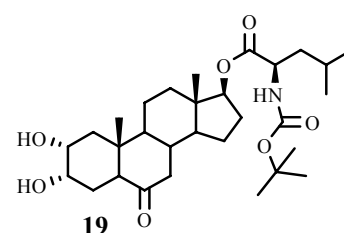
Esquema 58

No es pot oblidar que el volum del grup azida és molt superior al de l'hidroxil, fet que pot fer excedir el volum d'exclusió (obtingut en l'equip mitjançant la superposició de la geometria de les conformacions actives dels BRs avaluats que han resultat ser actius¹³⁷), provocant una davallada important en l'activitat si l'hidroxil substituït actua com a acceptor de pont d'hidrogen.

De tota manera, tenint en compte els referents bibliogràfics anteriorment esmentats i, sobretot, l'elevada activitat mostrada en el *RLIT* per alguns azidoanàlegs BRs obtinguts anteriorment en l'equip a C2 i C3,¹¹⁷ on els hidroxils actuen com a acceptors de pont d'hidrogen, suggereix una bona interacció amb el receptor. Es creu interessant la síntesi i avaluació de l'activitat de **145** i **146**, la qual és previsible que sigui nul·la si el 23*R*-OH actua com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor.

5.2.4. Funcionalitat metoxicarbonilamina en α de carbonil

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, fins a l'actualitat, **19** és l'anàleg BR androstànic que ha mostrat, a l'equip, una major activitat en el *RLIT*.¹¹⁸ L'activitat de **19** en el *RLIT*, de la mateixa manera que per la resta d'anàlegs, podria estar relacionada amb el fet que aquest anàleg androstànic sigui capaç de mimetitzar les diferents regions hidròfiles de **2**.



En realitzar un alineament flexible entre la castasterona (en blanc) i **19** (en verd), sorprenentment, es generen dos confòrmers prou estables energèticament (confòrmer *a* i confòrmer *b*) de **19**:

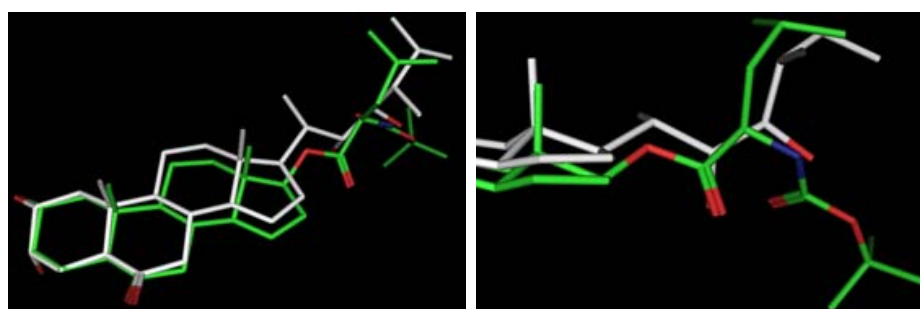
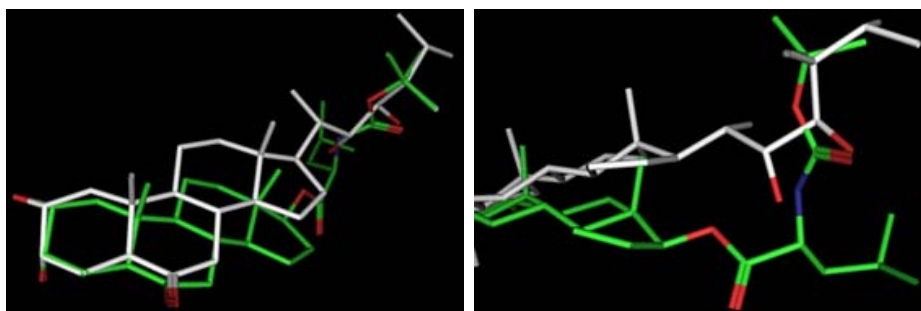


Figura 18: confòrmer *a*


 Figura 19: confòrmer *b*

Es pot observar com el diol $2\alpha,3\alpha$ de la CS (**2**) es superposa prou bé amb la funcionalitat $2\alpha,3\alpha$ -diol de **19**, per ambdós confòrmers. En canvi, el diol $22R,23R$ de la CS (**2**) es superposa de manera diferent per a cada un dels dos confòrmers.

En un d'ells (confòrmer *a*, Figura 18), el 22-OH de **2** és mimetitzat pel grup carbonílic de **19** i el 23-OH de **2**, pel grup amínic de **19**. Es pot observar com les cadenes laterals d'ambdós compostos es col·loquen de manera similar, amb un alt grau de superposició. En aquest confòrmer, però, el grup ^tbutoxicarbonílic se situa molt allunyat de la cadena lateral de **2**. Sembla que el gran volum i la disposició espacial d'aquest grup pugui estar dificultant la interacció de l'anàleg amb el receptor degut a possibles impediments estèrics.

En l'altre confòrmer (confòrmer *b*, Figura 19), els grups funcionals que se solapen amb el $22R,23R$ -diol de **2** canvien. Així, en aquest cas, és el 22-OH de **2** el que és mimetitzat pel grup amínic de **19** i el 23-OH de **2**, pel grup NHCO . S'observa també com la cadena lateral de **2** se superposa ara amb la funcionalitat ^tbutoxicarbonílica de **19**, quedant, en aquest cas, la cadena lateral de **19**, allunyada de **2**.

Per tal d'aprofundir en el coneixement de la influència del grup protector de l'amina, es decideix sintetitzar compostos que difereixin de **19** per tenir un grup metoxicarbonil enlloc del ^tbutoxicarbonílic i, a la vegada, amb diferent configuració del substituent (compostos **151** i **152**).

En realitzar les superposicions d'ambdós compostos amb la CS (**2**), sorprenentment, i a diferència que per a **19**, el confòrmer més estable per a cadascun d'ells correspon al tipus *a* de **19**, no detectant-se l'altre en els 30 primers confòrmers més estables. En la Figura 20 i Figura 21 es pot veure la superposició entre la CS (**2**, en blanc) i aquest confòrmer dels anàlegs **151** i **152** (en verd), respectivament:

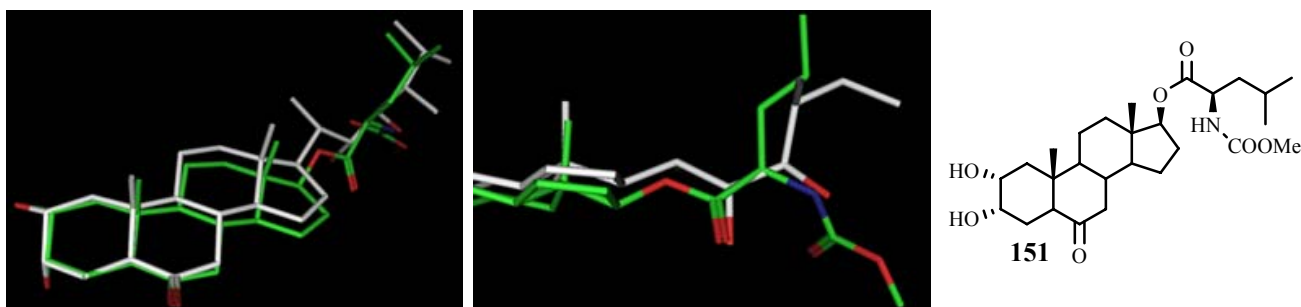


Figura 20

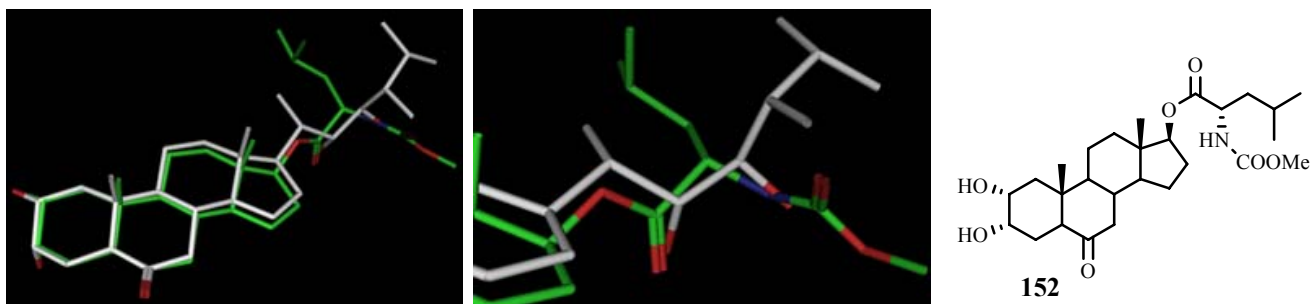


Figura 21

Es pot observar com, per a l'anàleg **151** (2'*R*-NH-COOMe), el 22-OH de **2** és mimetitzat pel grup carbonílic de **151** i el 23-OH de **2**, pel grup amínic de **151**. Les cadenes laterals d'ambdós compostos es col·loquen de manera similar i el grup metoxicarbonílic de **151**, allunyat de la cadena lateral de **2**

En el cas de l'anàleg **152** (2'*S*-NH-COOMe), les funcionalitats polars se superposen de manera similar que per a **151** (el 22-OH de **2** amb el carbonil de **152** i el 23-OH de **2** amb l'amina de **152**), però no s'observa solapament ni de la cadena lateral ni tampoc del grup metoxicarbonílic de **152**, una dada més a favor que el canvi configuracional del carboni en α del carbonil (anàleg **151** vs **152**) provoca una notable disminució en el grau de solapament.

Tot i esperar-se una baixa activitat per a **152**, es creu convenient sintetitzar tant **151** com **152**, per així corroborar la validesa del mètode computacional emprat en la superposició i seguir aprofundint en el coneixement del receptor.

5.2.5. Funcionalitat hidroxil en α de carbonil

Tal i com s'esperava, l'anàleg **153**, amb configuració 2'*R*-OH, pot adoptar una conformació semblant a la de la castasterona (**2**, en blanc), obtenint-se un bon solapament tant de les funcionalitats polars (22*R*-OH de **2** amb el carbonil de **153** i 23*R*-OH de **2** amb el 2'*R*-OH de **153**) com també, de les regions hidrofòbiques (cadenes laterals) d'ambdós compostos.

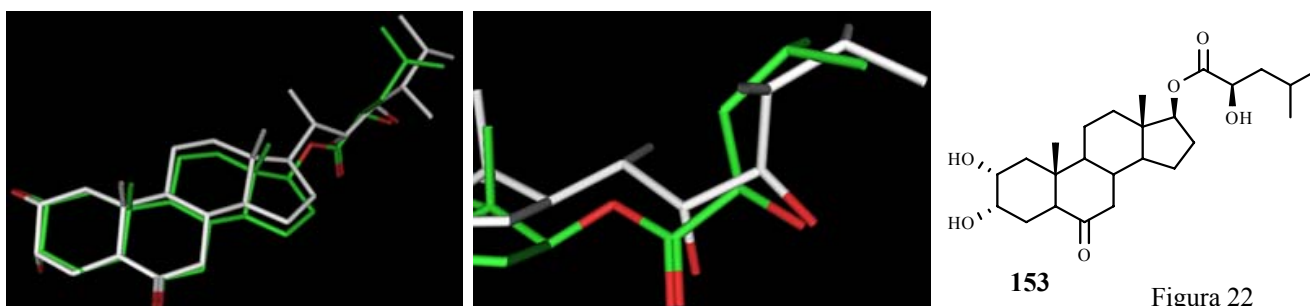
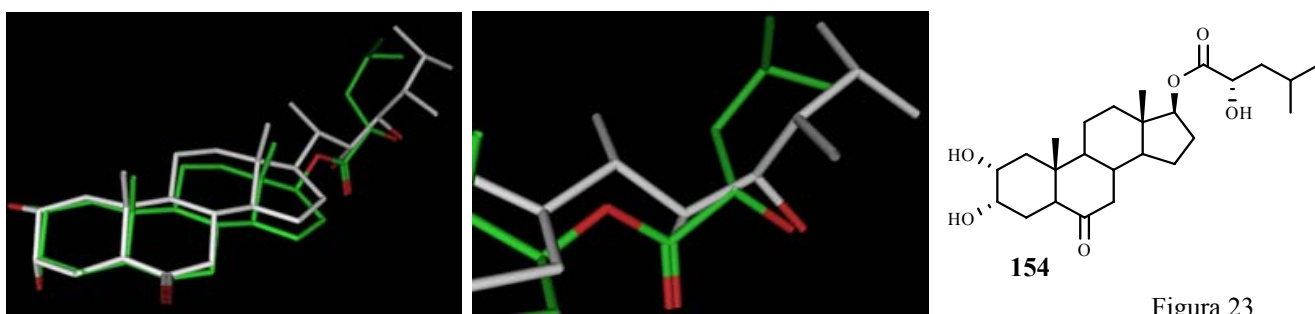


Figura 22

Quan la configuració en α de carbonil és *S* (**154**), les funcionalitats polars semblen superposar-se de la mateixa manera que per a **153**. En canvi, però, s'observa un descens en el grau de solapament de les parts terminals d'ambdues cadenes laterals degut a la configuració *S* en α de carbonil (aquestes diferències s'aprecien millor en observar el solapament en 3D)



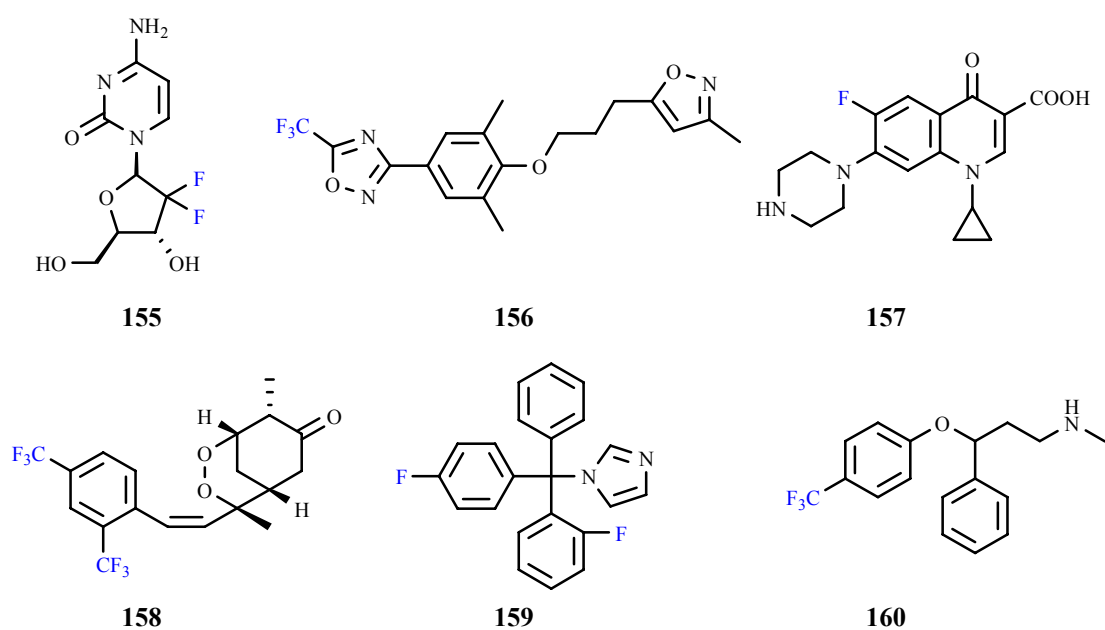
L'avaluació de l'activitat d'ambdós compostos (**153** i **154**) serà un altre exemple que ens permetrà obtenir informació sobre la influència de la configuració en α de carbonil en l'activitat.

5.2.6. Funcionalitat fluor en α de carbonil

La introducció del fluor orgànic pot modificar la resposta biològica, esdevenint una bona estratègia per el desenvolupament de nous i efectius agents biològica, farmacològica i medicinalment interessants.

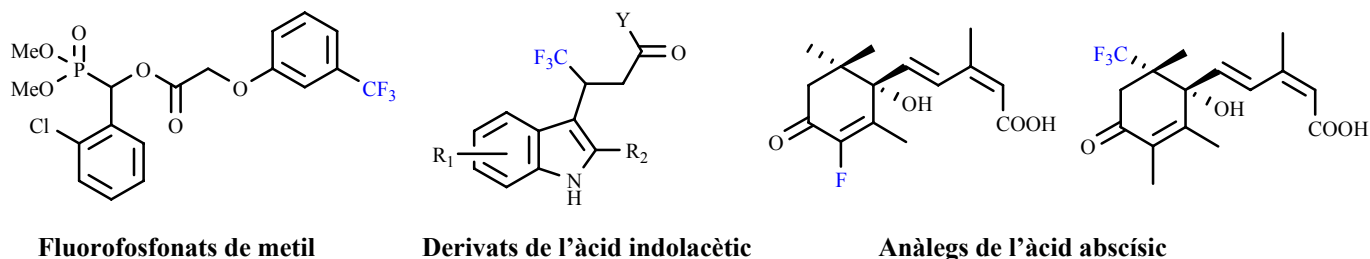
Nombrosos fluorocompostos han estat desenvolupats fins el moment. Molts d'ells són emprats actualment com a fàrmacs inhibidors d'enzims, antitrombòtics, agents anticancerigens (com **155**), antivírics (**156**), antibacterians (**157**), antimalària (**158**), agents antifúngics (**159**), antidiabètics, agents amb acció sobre el sistema nerviós central: antidepressius (fluoxetina, **160** Prozac, Lilly), pel tractament de l'Alzheimer, i també com a antiinflamatoris, anestèsics, pel tractament de la hipertensió, algunes úlceres, l'artritis reumatoide, la fibrosi quística, l'emfisema pulmonar, la SIDA³⁴⁹ ...

En alguns d'ells, el fluor s'ha introduït per substitució d'un H però en altres, per substitució d'un OH. S'ha comprovat, en molts casos, que la introducció de la funcionalitat fluor augmenta l'estabilitat dels compostos bioactius, allargant-ne la seva vida mitja.



Esquema 59

Igualment, es troben força referències sobre l'aplicació de fluorocompostos com a hormones del creixement vegetal. S'han descrit alguns fluorofosfonats de metil,³⁵⁰ auxines fluorades anàlogues de l'àcid indolacètic³⁵¹⁻³⁵⁴ o fluoroderivats de l'àcid abscísic...^{355,356}



Fluorofosfonats de metil

Derivats de l'àcid indolacètic

Anàlegs de l'àcid abscísic

Esquema 60

Aquests anàlegs han estat dissenyats per tal d'evitar oxidacions enzimàtiques, inactivacions metabòliques... que condueixen a la degradació dels compostos. La majoria d'ells han mostrat una elevada activitat com a promotors del creixement vegetal en diversos bioassaigs (el de l'arròs, de la col, de l'enciam...)

Així doncs, tal i com s'ha comentat anteriorment, s'abordarà la síntesi i avaluació de l'activitat d'anàlegs androstànics amb funcionalitat fluor en α de carbonil.

La substitució d'un hidroxil per fluor comporta escasses modificacions estèriques, fet que facilita la interacció entre la biomolècula fluorada i el receptor.

En principi, factors com els mecanismes de transport o el reconeixement enzimàtic no es veuran gaire afectats, mentre les propietats fisicoquímiques de la molècula es veuran alterades degut al canvi en l'electronegativitat i en la capacitat de formació de ponts d'hidrogen (el fluor només pot actuar com a acceptor) de la nova funcionalitat.

A continuació es mostra la superposició entre la CS (**2**, en blanc) i l'anàleg **161** (en verd). El baix grau de solapament entre ambdós compostos (tant de les funcionalitats polars com de la part hidrofòbica) és deu probablement a les característiques (acceptor-donador de pont d'hidrogen, càrrega...) que el propi programa MOE, amb el qual s'han realitzat les anàlisis conformationals, assigna a l'àtom de fluor.³⁵⁷

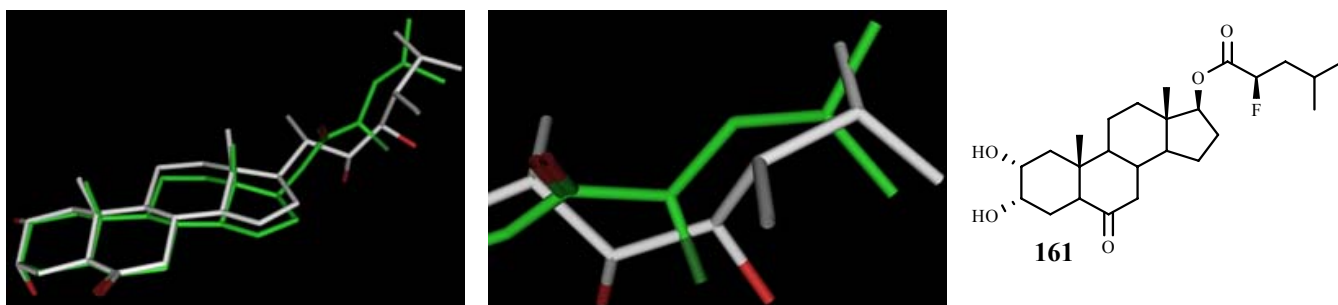
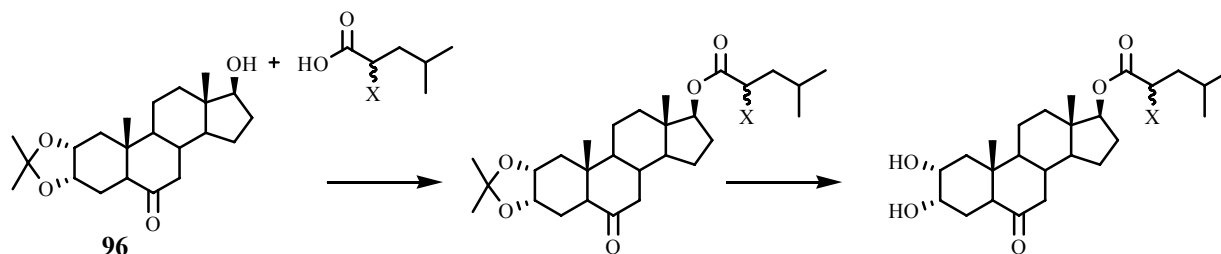


Figura 24

S'espera una baixa activitat per a **161** en cas que el 23R-OH actuï com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor.

5.3. Síntesi d'àcids carboxílics (cadenes laterals)

Per tal d'obtenir els anàlegs androstànics anteriorment esmentats, s'haurà d'esterificar l'esquelet androstànic **96** amb els diferents àcids carboxílics.

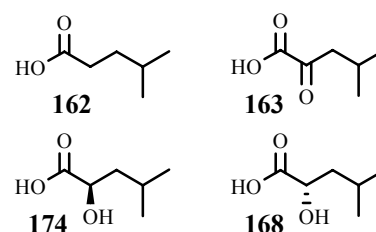


Esquema 61

Caldrà, per tant, una etapa prèvia de síntesi d'aquests àcids (cadenes laterals), així com també les proteccions dels grups funcionals d'aquests, en cas de ser necessàries.

5.3.1. Àcids carboxílics comercials

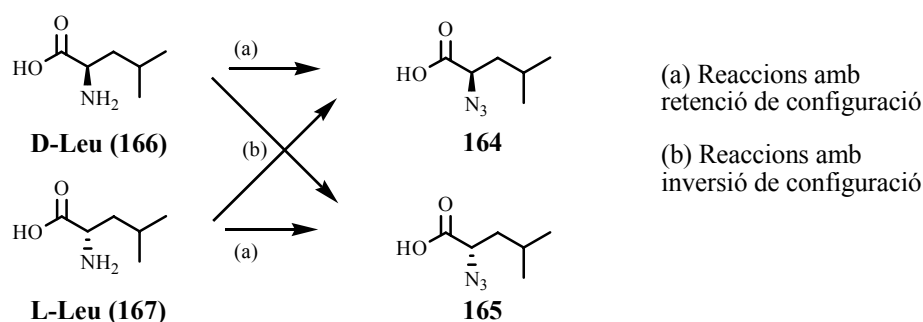
162, **163**, **168** i **174** són àcids carboxílics comercials que s'empraran per la posterior etapa d'esterificació directament.



5.3.2. Síntesi d' α -azidoàcids

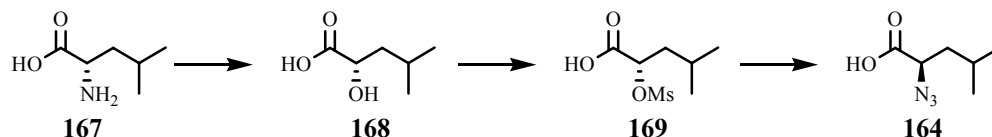
L'obtenció dels àcids 2*R*-azido-4-metilpentanoic (**164**) i 2*S*-azido-4-metilpentanoic (**165**) es pot dur a terme a partir dels dos enantiòmers de la Leucina.

Aquesta transformació es pot realitzar mitjançant una reacció amb retenció de configuració, o amb inversió de configuració, típicament per una reacció de substitució nucleòfila tipus S_N2 .^{358,359}



Esquema 62

En quant a les reaccions amb inversió de configuració, prenent com a exemple **164**, caldria per a obtenir-lo, transformar el grup amino de la Leucina en grup hidroxil, activar-lo via messilat i, finalment, dur a terme la substitució nucleòfila S_N2 (Esquema 63). L'obtenció de **165** s'aconseguiria d'una forma similar partint de **166**. Seguint aquesta metodologia, a l'equip, s'han sintetitzat amb èxit nombroses azides.^{117,147}

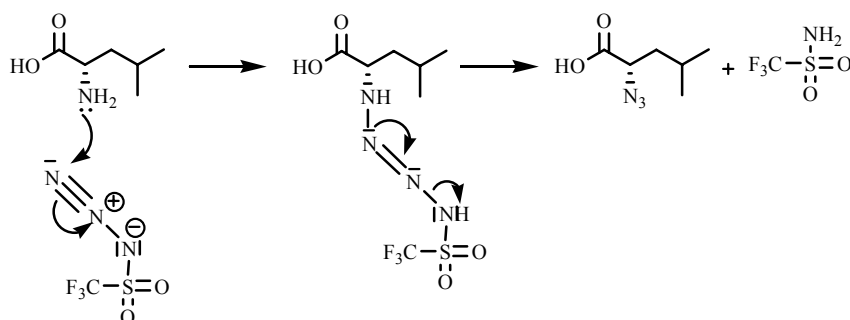


Esquema 63

Per altra banda, es pot abordar la síntesi dels azidoàcids **164** i **165** en un sol pas mitjançant reaccions amb retenció de configuració, directament a partir de l'α-aminoàcid corresponent **166** i **167**.³⁶⁰⁻³⁶⁵

Ruff *et al.*, el 1965,³⁶⁴ van ser els primers en descriure el pas d'amines primàries directament a azides per l'acció d'una solució de trifluorometansulfonilazida (Tf-N₃). Més endavant, Roberts *et al.*, el 1981,³⁶⁵ van aplicar aquest reactiu a la transformació del grup amino de diferents aminoàcids a azidoàcids. Es va observar que la transformació del grup amino a azida mantenia l'estereoquímica, amb pèrdues de puresa òptica no superiors al 5%.

Wong *et al.*, el 1996,³⁶⁰ van millorar els rendiments obtinguts per Roberts (entre el 40 i el 70%) introduint en el medi de reacció sals de cations metàl·lics (Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺). Aquests actuen com a àcids de Lewis activant la Tf-N₃ per a que tingui lloc una reacció de transferència d'un grup diazo, via atac nucleòfil del grup amino de l'aminoàcid, essent el Cu²⁺ el més eficient:



Esquema 64

Per a la síntesi de **164** i **165**, s'utilitza la metodologia proposada per Wong³⁶⁰ ja que permet estalviar dos passos sintètics, té un elevat rendiment i rendeix un producte d'elevada puresa òptica. A més, la seva síntesi està descrita amb èxit exactament sobre els mateixos substrats d'interès, les L i D Leucines.³⁶⁵

Aquesta metodologia consisteix en dues etapes. En la primera d'elles, es prepara la solució de Tf-N₃ en CH₂Cl₂, *in situ*, a partir de NaN₃ i anhídrid trifluorometansulfònic (Tf₂O) en relació 5:1 i s'agita la mescla a temperatura ambient durant 2 h. En la segona etapa, a 1 eq de la solució de Tf-N₃, recentment preparada, s'afegeix el substrat dissolt en H₂O (basificada amb Na₂CO₃) i quantitats catalítiques de CuSO₄. S'homogenitza la mescla amb MeOH i es deixa reaccionar durant 18 h a temperatura ambient.

Cal destacar que el reactiu Tf-N₃ és explosiu quan es porta a sequedat. Per aquesta raó, sempre s'aplica en una solució de CH₂Cl₂.

Així, seguint la metodologia proposada per Wong³⁶⁰ (però preparant la solució de Tf-N₃ a 0 °C per reduir els riscos de la reacció), **165** s'obté a partir de L-Leu (**167**) amb un rendiment del 61%, essent aquest lleugerament inferior al 67% descrit a la bibliografia.³⁶⁵ La rotació òptica de **165** és de $[\alpha]_D^{20} = -26.5^\circ$ a c 4 en MeOH.

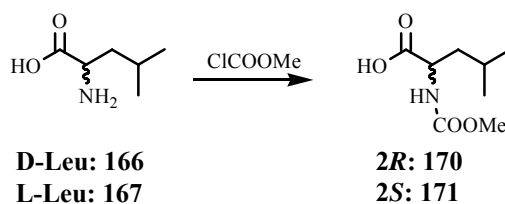
De la mateixa manera, l'azidoàcid **164** s'obté a partir de D-Leu (**166**) amb un rendiment del 59%, essent la seva rotació òptica $[\alpha]_D^{20} = +26.5^\circ$ a c 3.5 en MeOH.

La coincidència entre el valor absolut de $[\alpha]_D^{20}$ de **164** i **165** indica que tenen la mateixa puresa òptica.

Tot i que els valors de rotació òptica són inferiors als descrits ($[\alpha]_D^{20} = +36.2^\circ$ a c 1.13.³⁶⁶ per a **164**), el fet que ambdós isòmers presentin el mateix valor amb signe oposat i, considerant, a més, el mecanisme de la reacció, fa suposar que **164** i **165** s'han obtingut enantiomèricament purs. La confirmació d'aquest fet vindrà donada per l'ancoratge de les cadenes laterals sobre **96**, on, si les cadenes són enantiomèricament pures, rendiran un sol producte d'ancoratge cada una.

5.3.3. Síntesi d' α -metoxicarbonilaminoàcids

La síntesi dels carbamats del tipus **170** i **171** es pot dur a terme seguint el procediment de Schotten-Baumann,³⁶⁷ per tractament dels grups amínics amb cloroformat de metil. Aquestes reaccions són força exotèrmiques i solen tenir lloc en medi bàsic aquós (emprant NaOH o Na₂CO₃) per tal de retenir l'àcid clorhídric alliberat. S'obtenen amb èxit els corresponents *N*-metoxicarbonilaminoàcids amb rendiments d'entre el 76 i el 99% i amb excessos enantiomèrics superiors al 98%.³⁶⁸⁻³⁷³



Esquema 65

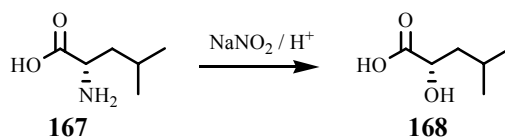
Així, doncs, dissolucions aquoses de **166** o **167** i NaOH es tracten amb cloroformat de metil a -3°C durant 15 h. Després d'acidificar la fase aquosa ($\text{pH} < 2$) i extreure amb AcOEt s'obtenen **170** i **171** purs i amb rendiments del 90 i 82%, respectivament.

5.3.4. Síntesi d' α -hidroxiàcids

5.3.4.1. Síntesi del 2*S*-hidroxiàcid **168**

Si bé, **168** és comercialment assequible, el seu cost econòmic és força superior a l'aminoàcid **167**, motiu pel qual es decideix assajar la seva síntesi abans d'adquirir-lo directament.

La conversió de grups amino a grups alcohol, és molt habitual en química orgànica i està àmpliament descrita a la bibliografia.³⁷⁴⁻³⁷⁷ La reacció es duu a terme en medi aquós, utilitzant NaNO₂ i amb catalisi àcida



Esquema 66

Donat que la hidroxilació té lloc mitjançant la formació de la sal de diazoni i posterior substitució d'aquesta per un hidroxil a través d'un mecanisme S_N1 , no es pot garantir *a priori* la puresa òptica del producte obtingut.

En efecte, el tractament de L-Leu (**167**) amb àcid sulfúric 4N i NaNO_2 en lleuger excés a 0°C rendeix un cru on **168** és el producte majoritari, valorat per $^1\text{H-RMN}$.

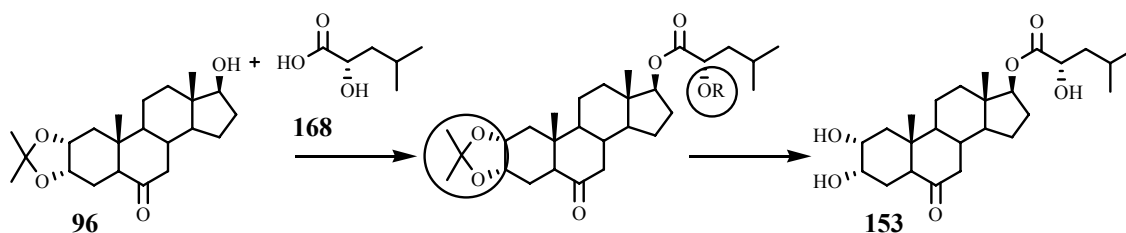
Degut a la dificultat de purificació d'aquest hidroxilàcid, així com també a la impossibilitat d'assegurar la seva puresa enantiomèrica, es decideix adquirir directament el producte comercial.

5.3.4.2. Protecció del 2S-hidroxilàcid **168**

En aquest cas, és necessària la protecció prèvia de l'hidroxil de **168** per tal de no competir amb l'OH a C17 de l'esquelet androstrànic **96** durant l'etapa d'esterificació.

La introducció d'un grup protector en la molècula implica dos etapes més de síntesi, protecció i desprotecció, que han de tenir la mínima incidència en el cost total de la síntesi. Tant en la introducció com en l'eliminació del grup protector, la reacció s'ha de donar en condicions suaus, rendiments elevats i selectivament.

Per tal d'escollir el grup protector idoni en aquesta síntesi, cal tenir en compte el medi en què es desenvoluparà la reacció d'esterificació i la desprotecció posterior.



Esquema 67

L'ancoratge de la cadena lateral es farà en medi neutre, per tant, aquest factor no serà important a l'hora de triar el grup protector. Pel que fa a la posterior desprotecció, cal tenir en compte que **96** té una funcionalitat acetal a l'anell A.

Per evitar un pas sintètic, es tria un grup protector que es desprotegeixi en les mateixes condicions que el grup isopropilidendiòxi i, al mateix temps, no afecti el grup èster format a l'etapa d'ancoratge.

En conclusió, donat que l'acetal es trenca en medi lleugerament àcid i que l'enllaç èster s'hidrolitza en un medi fortament àcid, es busca un grup protector per l'hidroxil que sigui desprotegit en un medi àcid suau.

A l'equip s'ha treballat molt amb el grup acetat per protegir hidroxils,¹¹⁸⁻¹²⁰ però les condicions de desprotecció àcides emprades (5% d'HCl en MeOH) provoquen també la hidròlisi del grup èster, cosa que disminueix molt el rendiment de la desprotecció.

Emprant DHP

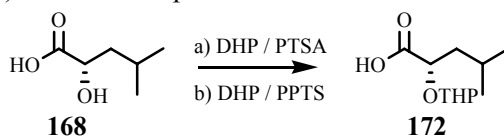
El grup tetrahidropirani (THP) és àmpliament emprat per a la protecció d'hidroxils formant el tetrahidropirani èter^{378,379} així com per protegir el mateix grup en α -hidroxiàcids.^{380,381} També a l'equip s'ha fet servir nombroses vegades.^{119,120}

L'acetal tetrahidropirani format és estable en presència de bases i agents oxidants, essent fàcilment desprotegit per tractament lleugerament àcid, en condicions més suaus que els grups ester. És d'esperar, per tant, que es redueixi la quantitat d'hidròlisi de l'enllaç èster esmentat. A més, en aquestes condicions, també es desprotegeix l'acetal de l'anell A de l'esteroides.

Resulta doncs, un grup protector adient per la posterior esterificació de Yamaguchi.³⁸² En aquesta, s'empren dues bases, la trietilamina i la dimetilaminopiridina, en quantitats catalítiques on les condicions de reacció són molt suaus.

Emprant aquest grup protector, s'esperen en principi bons rendiments en la desprotecció del grup hidroxil. Per altra banda, s'ha trobat a la bibliografia que la protecció d'hidroxiàcids equivalents a **168** sembla no donar subproductes, com podria ser l'èster tetrahidropiranílic corresponent.^{380,381}

Tenint en compte tot l'esmentat, s'escull el grup protector THP per a l'hidroxil en α del carbonil de **168**. Per a obtenir **172**, s'han trobat dues metodologies que utilitzen DHP però difereixen en el catalitzador emprat. Riguera *et al.*³⁸⁰ utilitzen PTSA com a catalitzador, mentre que Olsen *et al.*³⁸¹ utilitzen *p*-toluensulfonat de piridini (PPTS). Es decideix provar ambdós mètodes:



Esquema 68

El tractament de **168** amb DHP emprant com a catalitzadors PTSA o PPTS genera, en ambdós casos, un oli molt dens i de tonalitat fosca. Després de purificar per cromatografia flash el cru de reacció, s'observa, per ¹H-RMN, la formació d'èsterstetrahidropiranílics, així com també la polimerització del DHP generant dímers, trímers... que també es troben ancorats a l'àcid **168** un cop purificat.

Per tal d'evitar la formació d'aquests èsters tetrahidropiranílics, seria convenient la prèvia protecció de l'àcid. Aquest fet augmentaria en dos (protecció i desprotecció) els passos de l'estratègia sintètica, motiu pel qual es desaconsella l'ús d'aquest grup protector.

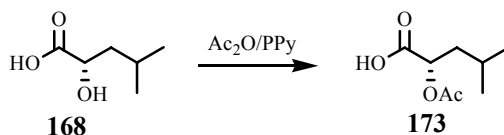
Emprant Ac₂O

Degut a la dificultat de protegir selectivament el grup hidroxílic front a l'àcid emprant DHP i, considerant que seria interessant aconseguir l'esmentada protecció de l'hidroxil sense prèvia protecció de l'àcid, es creu convenient assajar la protecció via acetat.

El principal inconvenient d'aquest grup protector resideix en el fet que les seves condicions de desprotecció són similars a les de la hidròlisi de l'èster androstànic (medi àcid). Per tant, caldrà controlar molt acuradament les condicions a fi d'optimitzar la formació del compost d'interès.

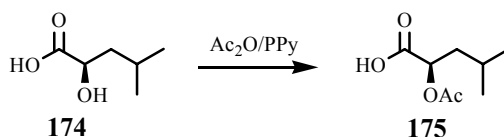
Seguint una de les metodiques més emprades per a la introducció del grup acetoxi,^{383,384} es tracta **168** amb anhídrid acètic en presència de piridina i emprant 4-pirrolidinpiridina com a catalitzador.

S'obté **173** amb rendiment quantitatiu i amb una puresa suficient com per a ser emprat en el proper pas sintètic.



Esquema 69

5.3.4.3. Protecció del 2R-hidroxiàcid **174**



Esquema 70

De la mateixa manera que per a la síntesi de **173**, **174** es tracta amb anhídrid acètic en presència de piridina i emprant 4-pirrolidinpiridina com a catalitzador, obtenint-se **175** d'elevada puresa i rendiment quantitatiu.

5.3.5. Síntesi de l' α -fluoràcid **176**

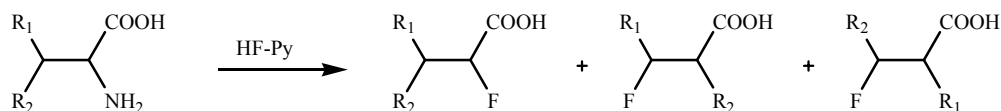
Una de les metodiques més emprades i descrites en la bibliografia per a l'obtenció d' α -fluoroàcids quirals parteixen del corresponent α -aminoàcid i, mitjançant reaccions de substitució amb retenció de configuració, s'obtenen amb èxit els α -fluoroàcids d'interès.

Fins a la dècada dels 60, un dels agents fluorants més comuns era l'HF anhidre però, degut a la seva perillositat i a la dificultat en la manipulació (punt d'ebullició de 19.6 °C), s'han anat desenvolupat solucions estables de HF en THF^{385,386} o bé en amines,^{387,388} amides,³⁸⁹⁻³⁹¹ esters,³⁹² fosfines,³⁹³ alcohols³⁹⁴ ... De tota manera, l'ús de polifluorur d'hidrogen en Py ha estat des de finals dels anys 70,³⁹⁵ l'agent més emprat per a realitzar aquest tipus de reaccions.

Al 1979, Olah *et al.*³⁹⁵ descriuen que les solucions estables que forma la Py amb HF anhidre contenen 9 equivalents de l'àcid per un equivalent de Py (70% HF v/v, 30% v/v Py) i són estables fins a 55 °C. A més, el polifluorur d'hidrogen es troba en equilibri amb petites quantitats d'HF lliure, podent ser emprat com a font d'àcid fluorhídric líquid. Així, aquests mateixos autors, empraren aquest agent per a introduir funcionalitats fluor a través de substitucions de grups hidroxil, addicions sobre alquens (hidro-, halo- i nitrofluoracions), i també, substitucions de grups amino per fluor.

Pel que fa referència a aquestes últimes, la síntesi de 2-fluoroàcids a partir dels corresponents α -aminoàcids va ser assajada amb èxit a través de la formació de la sal de diazoni amb nitrit sòdic a 0 °C i posterior substitució nucleòfila emprant HF-Py.³⁹⁵⁻³⁹⁹

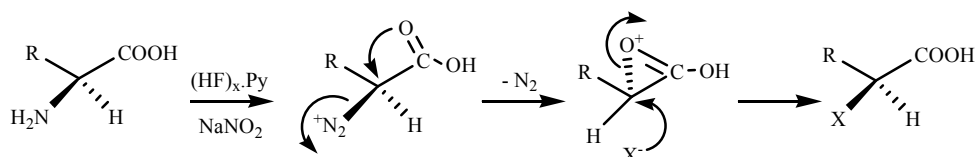
Posteriorment, Keck *et al.*^{400,401} i Olah *et al.*⁴⁰² obtingueren per aquesta mateixa reacció, la formació de β -fluoroàcids a part dels α -fluoroàcids esperats, atribuïda a reordenaments totals o parcials:



Esquema 71

Les proporcions entre els tres isòmers depenia no solament de l'aminoàcid sobre el que es realitzava la reacció (influència de la cadena hidrocarbonada en la reacció)^{400,403} sinó també de la relació HF-Py emprada, aconseguint-se evitar l'esmentat reordenament disminuint l'acidesa del medi (HF-Py 48-52%).⁴⁰² En canvi, ni el temps de reacció (1-24 h) ni la concentració d'aminoàcid (0.4-1.0 M) semblava influir en les proporcions dels compostos formats.⁴⁰¹

Tanmateix, no va ser fins l'any 1981 quan l'estereoselectivitat d'aquesta reacció va adquirir importància. Així, Fustini *et al.*⁴⁰⁴ establiren el seu mecanisme:



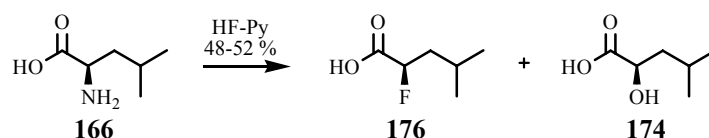
Esquema 72

Degut a la presència del grup carboxílic terminal, s'assegura la retenció de configuració de la reacció de substitució, no detectant-se racemització en l' α -fluoroàcid format. Cal esmentar que si la reacció s'aturava amb H₂O abans que finalitzés, s'aconseguia aïllar el corresponent 2-hidroxiàcid (X = OH), fet que corroborava el mecanisme proposat.

Aquesta síntesi d' α -fluoroàcids emprant HF-Py i mitjançant formació de la sal de diazoni amb NaNO₂ a 0 °C ja s'ha assajat amb èxit sobre diferents α -aminoàcids, com són l'àcid 2-aminobutanòic,^{395,403,405} la valina,^{395,406,407} la leucina,^{395,406,408} la fenilglicina,⁴⁰⁹ tirosina,³⁹⁵ treonina,³⁹⁵ àcid aspàrtic,^{395,410} àcid glutàmic,³⁹⁵ alanina,^{395,411,412} fenilalanina,^{395,401} 2-amino-3-ciclohexilpentanoic,⁴⁰⁴ isoleucina,^{406,407} àcid 2-aminopentanoic...⁴⁰⁶ amb rendiments que oscil·len entre el 14 i el 75%.

Així doncs, seguint la metodologia descrita per Percec *et al.*,⁴⁰⁸ es dissol la D-leucina (**166**) en Py i HF-Py comercial (70-30%) per tal d'aconseguir un medi HF-Py 48/52. A continuació s'addiciona lentament i a 0 °C el NaNO₂, per així formar la sal de diazoni, susceptible de patir substitució nucleòfila per l'anió fluorur. Després de 6 h de reacció a t.a., es dilueix amb H₂O i es realitzen extraccions amb èter i AcOEt.

S'obté un cru que conté una barreja del 2-fluorocompost d'interès **176** i l'àcid 2*R*-hidroxi-4-metilpentanoic (**174**), en una proporció 80:20, identificada mitjançant espectres de ¹H-RMN.



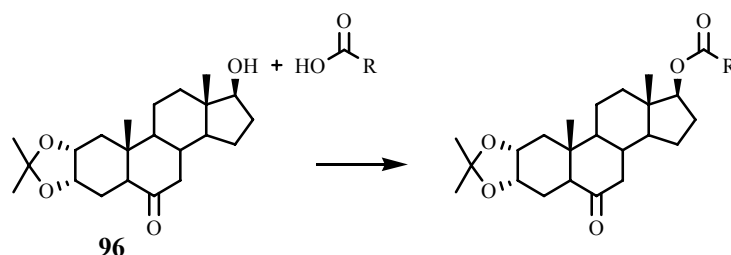
Esquema 73

Es calcula un rendiment per a **176** del 53% (superior al descrit⁴⁰⁸ del 24%), però el seu aïllament de **174** no ha estat possible ja que per CCF no és possible visualitzar cap dels dos compostos formats, ni a 254 nm, ni emprant H₂SO₄ com agent revelador, ni verd de bromocresol, ni tampoc emprant dissolució d'àcid

fosfomolibdic, fet que impossibilita la seva purificació cromatogràfica. Aquest fet dificulta molt el seguiment de la reacció i la possible separació cromatogràfica. A més, en cap de les referències bibliogràfiques consultades es troba descrita una metodologia per a separar ambdós compostos.^{395,406,408} És per això que es decideix emprar aquest cru en la següent reacció sense realitzar cap tipus de purificació.

5. 4. L'etapa d'esterificació

L'etapa d'esterificació entre l'esquelet androstànic **96**, i les diferents cadenes laterals (àcids carboxílics) serà una de les etapes claus en la síntesi d'anàlegs brassinoesteroidals. És per això que es decideix aprofundir en el seu estudi.



Esquema 74

En general, la síntesi d'èsters pot ser classificada en tres categories:

- Directa
- Via activació de l'alcohol
- Via activació de l'àcid carboxílic

5.4.1. Esterificació directa

Si bé, l'esterificació de Fischer era un dels mètodes més comuns, les dràstiques condicions de reacció (elevades temperatures en medi fortament àcid) la fan inviable per a la majoria de substrats, fet que va provocar el desenvolupament d'altres metodologies per a dur a terme esterificacions directes.

L'ús de sals de metalls com el Ti(IV),⁴¹³⁻⁴¹⁵ Sn(IV),⁴¹⁶⁻⁴¹⁸ Hf(IV),⁴¹⁹⁻⁴²² Zr(IV),⁴¹⁹ Al,⁴²³ B^{424,425} ... catalitzen la condensació directa i eficient entre un alcohol i un àcid carboxílic en quantitats equimolars i sense ser necessària una activació prèvia.

Així, per exemple, està descrit l'ús de TiCl₄ i TiCl(OTf)₃ com a catalitzadors de reaccions d'esterificació entre un alcohol i un àcid carboxílic en presència de TMSCl o tetràmers cíclics de dimetilsiloxà, respectivament. S'obtenen rendiments d'esterificació entre el 50 i el 99% però algunes d'elles es realitzen a temperatures superiors als 50 °C.

Recentment i després d'estudiar l'efecte catalític d'algunes sals de diversos metalls, Ishihara *et al.*⁴¹⁹ conclouen que els clorurs i alcòxids d'hafni (IV), més estables que les corresponents sals de Ti(IV), semblaven ser els més eficients per a catalitzar amb èxit reaccions d'esterificació.

De tota manera, els baixos rendiments obtinguts en la majoria dels casos estudiats, semblen desaconsellar-ne el seu ús per a la síntesi d'anàlegs androstànics.

5.4.2. Activació de l'alcohol

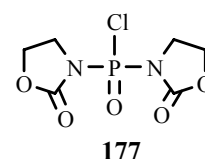
Consisteix en l'atac nucleòfil del grup carboxilat sobre halurs d'alquil o hidroxils activats en forma de bons grups sortint (com sulfonats).

El fet que l'esquelet androscànic sigui el reactiu limitant (cost més elevat) va fer descartar aquesta via d'esterificació, creient-se més interessant activar l'àcid carboxílic (cadena lateral) i reduint així, el nombre d'etapes sintètiques sobre l'esquelet.

5.4.3. Activació del grup carboxilat

5.4.3.1. Activació amb BOP-Cl

Un dels agents activants del grup àcid és el clorur de l'àcid bis[2-oxo-3-oxazolidinil]fosfínic (BOP-Cl, **177**), emprat per primer cop per Diago-Meseguer *et al.*^{426,426} l'any 1980. Obtenien l'èster etílic, amb rendiments del 97%.

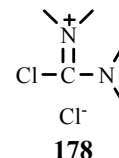


Posteriorment i fins a l'actualitat, aquesta reacció s'ha utilitzat per a la síntesi de tot tipus d'esters,⁴²⁷⁻⁴³² amb rendiments que solen oscil·lar entre el 40 i el 70%.

Algunes variants d'aquest mètode empenen derivats halogenats de **177**⁴³³ o bé substitueixen el clorur per hexafluorofosfats de derivats fosfònics de triazole.^{433,434}

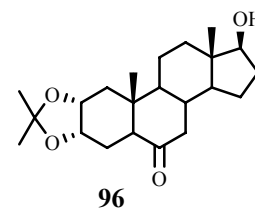
5.4.3.2. Activació amb clorurs de cloroamidini

Un altre agent activant del grup carboxílic per a realitzar la reacció d'esterificació és el clorur de *N,N,N',N'*-tetrametilcloroformamidini (**178**) o derivats d'aquest (com és el clorur de 2-cloro-1,3-dimetilimidazoli),⁴³⁵ emprats amb èxit per a la síntesi de lactones,⁴³⁶ però dels quals es disposa d'escassa bibliografia.



5.4.3.3. Via clorur d'àcid

Tot i que, a l'equip l'activació via clorur d'àcid es va emprar amb bons resultats sobre substrats esteroidals,^{119,120} l'alliberació de HCl en el medi de reacció, incompatible amb la presència del grup dioxolà de **96**, en descarta el seu ús com a mètode d'activació.

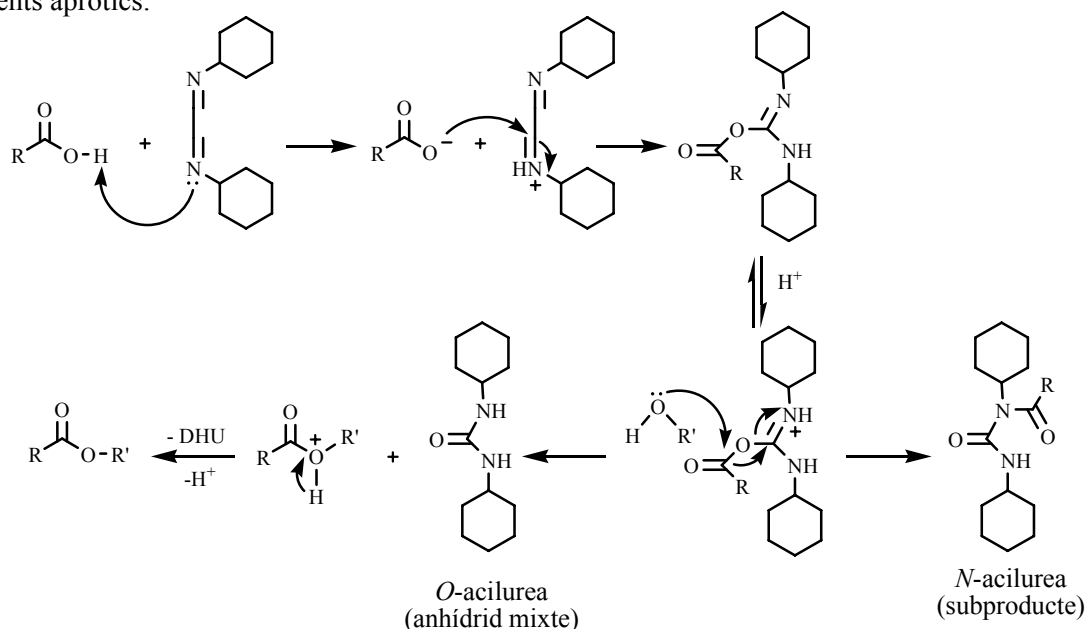


5.4.3.4. Esterificació de Mitsunobu

La reacció de Mitsunobu consisteix en la conversió dels grups hidroxílics en altres grups funcionals, com els esters, a través de l'ús de trifenílfosfina i azodicarboxilat de dietil (DEAD).⁴³⁷⁻⁴⁴⁰ Se'n descarta el seu ús pel fet de donar-se una inversió de configuració de l'alcohol i, també, per la dificultat d'eliminar els òxids de trifenílfosfina formats.

5.4.3.5. Esterificació de Steglich

Actualment, l'esterificació de Steglich^{441,442} és àmpliament emprada per a la síntesi d'èsters. Aquesta es realitza amb *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) i 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) com a catalitzador i presenta com a principal avantatge la possibilitat de treballar amb medis neutres i amb dissolvents apròtics.

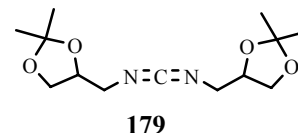


Esquema 75

L'intermedi *O*-acilurea, amb una reactivitat semblant al corresponent anhidrid de l'àcid, es forma per reacció entre la DCC i l'àcid carboxílic. L'alcohol ataca, posteriorment, l'àcid activat, obtenint-se la diciclohexilurea (DCU) estable i l'èster d'interès. És possible detectar, però, les *N*-acilurees, subproductes formats per la migració lenta del grup acil i molt difícilment eliminables.

A la pràctica, aquesta reacció condueix a la formació d'èsters sense cap tipus de problemes sempre i quan s'addicioni aproximadament un 5% de DMAP. Sembla ser que aquesta reacciona amb l'intermedi *O*-acilurea conduint a una amida reactiva que ràpidament reacciona amb l'alcohol. La DMAP, actua, per tant, com un agent de transferència de grups acil.⁴⁴³

Algunes variants d'aquesta reacció consisteixen en substituir la DCC per diisopropilcarbodiimida (DIC)⁴⁴⁴ o per la carbodiimida **179**.⁴⁴⁵ D'aquesta manera, les urees formades com a subproducte són més solubles en H₂O i així, més fàcilment eliminables.



Amb la finalitat de disminuir la formació de les *N*-acilurees, subproductes no desitjats en la reacció d'esterificació de Steglich, Boden et al.⁴⁴⁶ desenvoluparen una altra variant emprant DMAP·HCl (esterificació de Keck). L'addició d'aquest agent de transferència de protó no solament permetia treballar en menors concentracions d'àcid i d'alcohol, sinó també minimitzava la formació de les urees.

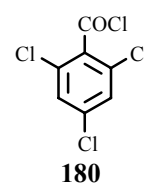
Degut a les extenses i variades referències bibliogràfiques de les que es disposa sobre l'aplicació de l'esterificació de Steglich per a tot tipus de substrats orgànics, es decideix provar aquesta reacció per a la síntesi d'anàlegs androestànics.

5.4.3.6. Esterificació de Yamaguchi

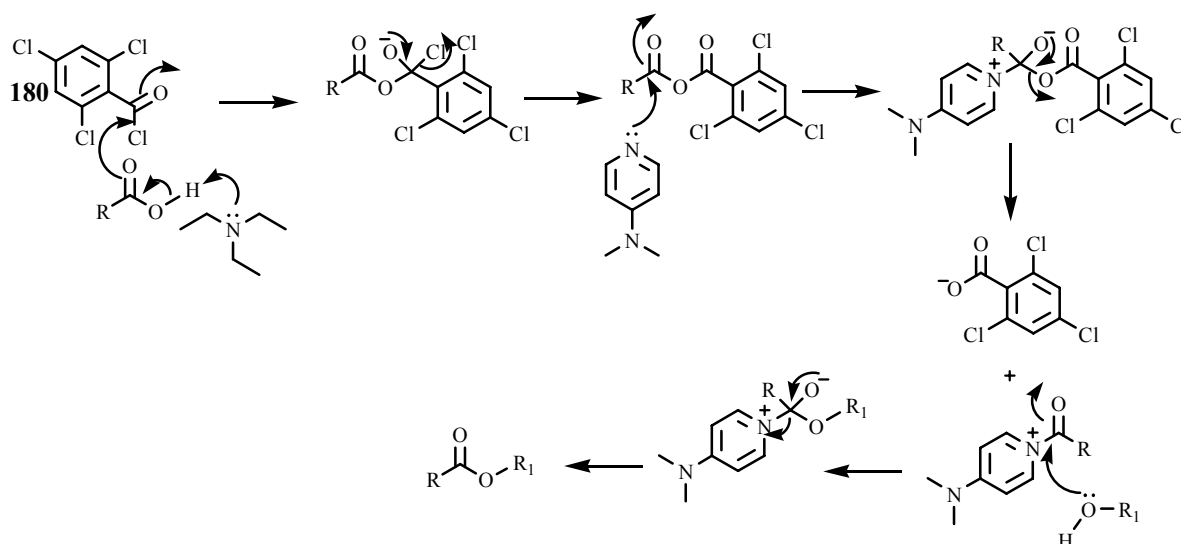
Des de la seva primera publicació, l'any 1979 (Inanaga *et al.*³⁸²) fins a l'actualitat, la reacció de Yamaguchi ha estat molt aplicada per a la síntesi d'èsters a partir d'àcids carboxílics i alcohols.

Consisteix en dues etapes consecutives: la formació de l'anhídrid mixt de l'àcid carboxílic i la posterior alcoholosi d'aquest.

La primera etapa consisteix en activar el grup àcid de la cadena lateral mitjançant la formació de l'anhídrid mixt entre un clorur d'àcid i la cadena lateral. Yamaguchi *et al.*,⁴⁴⁷ després d'estudiar diferents clorurs d'àcids, van determinar que el clorur d'àcid que donava millors rendiments de reacció era el clorur de 2,4,6-triclorobenzoïl (**180**). La reacció de formació de l'anhídrid mixt genera clorhidrat de trietilamina com a subproducte, que es separa de la solució d'anhídrid mixt per filtració.



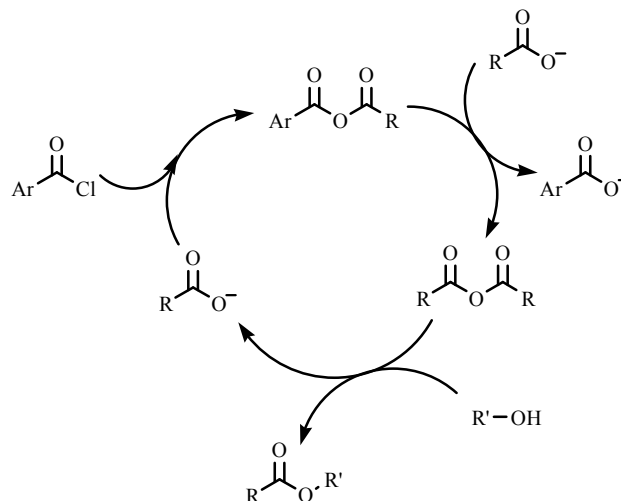
El grup 2,4,6-triclorobenzoïl és un bon grup sortint i això fa que el carbonil de la cadena sigui susceptible a atacs nucleòfils (2^a etapa de la reacció de Yamaguchi). A més, el carbonil del 2,4,6-triclorobenzoïl és molt poc reactiu a causa de l'impediment que genera la doble presència de clors en 2 i 6 de l'anell aromàtic. Aquestes dues propietats fan que aquest sigui un bon grup activador per a àcids carboxílics.



Esquema 76

Tant la proporció de DMAP com el dissolvent emprat tenen una influència notable en la reacció. Així, s'obtenen millors resultats utilitzant més d'un equivalent de catalitzador i dissolvents apolars (benzè, toluè, diclorometà...). De tota manera, petites quantitats d'àcid 2,4,6-triclorobenzoic es poden formar com a subproducte.

Recentment, a principis del 2006, Dhimitruka *et al.*⁴⁴⁸ realitzaren un estudi amb diferents anhídrids aromàtics i alifàtics i postularen un nou mecanisme per a la reacció de Yamaguchi: durant l'esterificació, es formaria un anhídrid alifàtic simètric *in situ*, que reaccionaria posteriorment amb l'alcohol per rendir l'èster d'interès. Aquest mecanisme explicaria la regioselectivitat observada en l'esterificació.

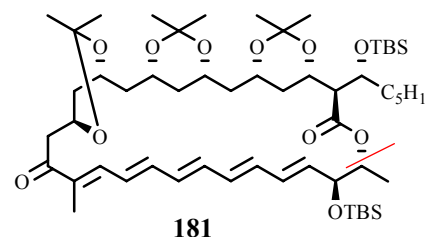


Esquema 77

D'acord amb el mecanisme proposat, aquests mateixos autors proposen l'ús de clorur de benzoil, econòmicament més assequible, enlloc del clorur de 2,4,6-triclorobenzoil i suggereixen, també, que no és necessari emprar excés de DMAP ni tampoc realitzar la reacció en dues etapes consecutives.

L'esterificació de Yamaguchi ha estat emprada per a la síntesi regioselectiva d'èsters molt funcionalitzats i impeditos estèricament^{449,450} i, sobretot per a síntesi de macròlides (lactonitzacions, macrociclacions) amb funció antibiòtica i fungicida,⁴⁵¹⁻⁴⁶¹ o anticancerígena,^{462,463,463}. També ha rendit bons resultats per a la síntesi de sapogenines⁴⁶⁴ o inclús per a la preparació de films per immobilitzar nanopartícules d'or,⁴⁶⁵ amb rendiments generalment superiors al 70%.

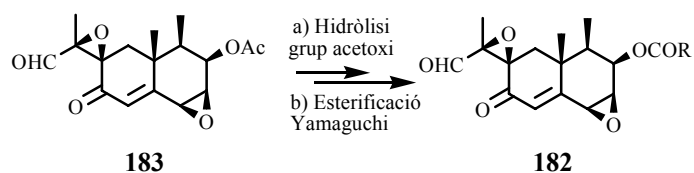
En alguns casos, com és el cas d'aquest macrocicle **181**, l'enllaç èster no es formava ni emprant DCC/DMAP ni tampoc amb l'agent activant BOP.⁴³⁴ S'obtenien rendiments del 30% quan s'empraven derivats halogenats del BOP (més reactius),⁴³³ però sens dubte, la reacció d'esterificació més eficient era la de Yamaguchi (amb un 70% de rendiment).



De la mateixa manera succeïa per a la síntesi d'altres compostos^{453,458,466} on els intents d'esterificació mitjançant el mètode de Steglich (o una variant emprant DIC-DMAP), el de Keck, emprant BOP o clorur de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolini com agents activants, no varen rendir els èsters d'interès. En canvi, s'aconseguia formar l'enllaç èster mitjançant la reacció de Yamaguchi.

Es troben descrits altres cassos,⁴⁵² on la reacció d'esterificació emprant DIC-DMAP permet la síntesi de l'enllaç èster, però la gran quantitat d'acilurees formades impedeixen l'aïllament de l'èster d'interès, fet que va requerir d'emprar la reacció de Yamaguchi.

A l'equip, es va emprar amb èxit l'esmentada reacció d'esterificació per a l'obtenció de **182** (derivats de PR toxina (**183**)). La presència de grups protectors sensibles a condicions dràstiques feia necessària les condicions neutres per a la reacció.

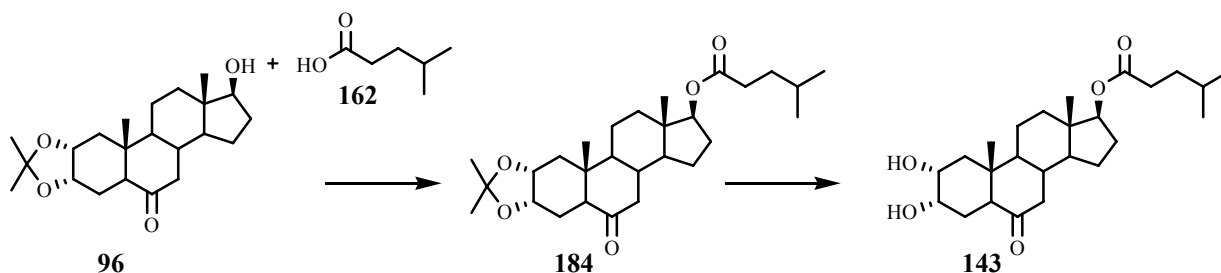


Esquema 78

Degut a aquests bons resultats obtinguts en l'equip, es decideix provar també aquesta metòdica d'esterificació per a la síntesi d'anàlegs androstats.

5.5. Síntesi de 143 (2'H)

L'estratègia sintètica que se seguirà es basa en l'esterificació entre l'esquelet esteroidal degudament funcionalitzat (amb el diol de l'anell A protegit en forma d'acetal: **96**) i l'àcid comercial 4-metilpentanoic (**162**), provant, tal i com s'ha dit anteriorment, l'esterificació via diciclohexilcarbodiimida (DCC) i l'esterificació de Yamaguchi, via anhidrid mixt.



Esquema 79

5.5.1. Esterificació via DCC/DMAP

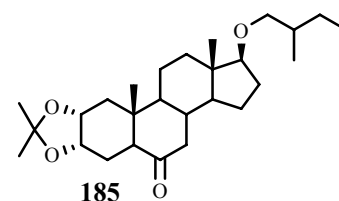
El tractament de **96** amb **162**, DCC i quantitats catalítiques de dimetilaminopiridina (DMAP) durant 4 dies a t.a., permet la formació de **184** sense detectar-se la presència de producte de partida per $^1\text{H-RMN}$. S'emprarà directament aquest cru per la següent etapa, la desprotecció dels hidroxils 2α i 3α , sense cap purificació cromatogràfica.

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, cal trobar selectivament unes condicions d'acidesa adequades per tal que es doni la desprotecció de l'acetònid selectivament front a la hidròlisi de l'enllaç èster a C17.

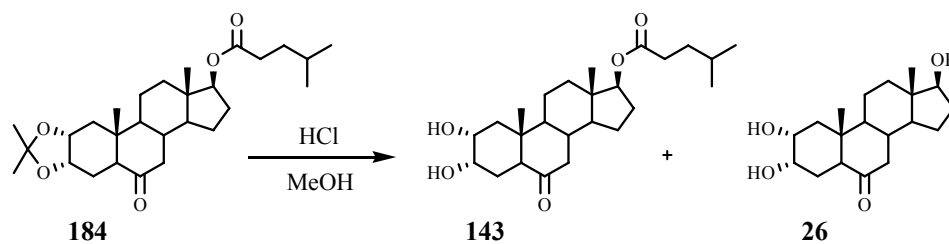
5.5.1.1. Hidròlisi emprant HCl

A l'equip, s'havia utilitzat HCl (5%) en MeOH, i AcOH (80%) a reflux com a metodologies per trencar acetònids.¹⁴⁴ No obstant, aquests acetònids no contenen cap altre grup sensible a hidròlisi. La presència de l'èster de cadena desaconsella utilitzar tant àcids minerals en concentracions elevades com àcids orgànics a altes temperatures.

Kohout *et al.*¹⁵² l'any 1989 publicaren la hidròlisi de l'acetònid de l'anell A de **185** emprant HCl (3%) en MeOH, obtenint-se el corresponent 2 α ,3 α -diol amb un rendiment superior al 80%.



Tot i tenir, en aquest cas, una funcionalitat èster enlloc d'èter en la cadena lateral, es decideix provar d'emprar aquesta mateixa metodologia per a la hidròlisi de **184**.



Esquema 80

Transcorregudes 3.5 h de reacció, seguides de purificació del cru mitjançant cromatografia flash, només s'aconsegueix aïllar un 4% de producte d'interès **143**, obtenint-se **26** com a compost majoritari (en un 92%), resultat de la hidròlisi de la funcionalitat èster de la cadena lateral. Es pot observar altra vegada la sensibilitat d'aquesta funcionalitat a condicions àcides.

Aquesta hidròlisi també es va observar en l'equip quan s'intentava desprotegir acetats d'anàlegs androstrànics emprant HCl (2%) en MeOH.^{119,120} Es descriuen rendiments d'hidròlisi de l'èster de 17 β , del 11% i superiors. En conseqüència, es decideix canviar les condicions d'hidròlisi de l'acetònid.

5.5.1.2. Hidròlisi emprant CF₃COOH

A la literatura, s'han trobat diverses metodologies d'hidròlisi d'acetals en presència d'enllaços ester.⁴⁶⁷⁻⁴⁷³ Algunes es duu a terme amb catàlisi d'àcid p-toluensulfònic,⁴⁶⁸ però la majoria es realitzen amb àcid trifluoroacètic a temperatura ambient^{467,469,470,472,473} i en concentracions del 50%,⁴⁷² 70%,⁴⁶⁷ 80%^{470,473} o al 90%.⁴⁶⁹

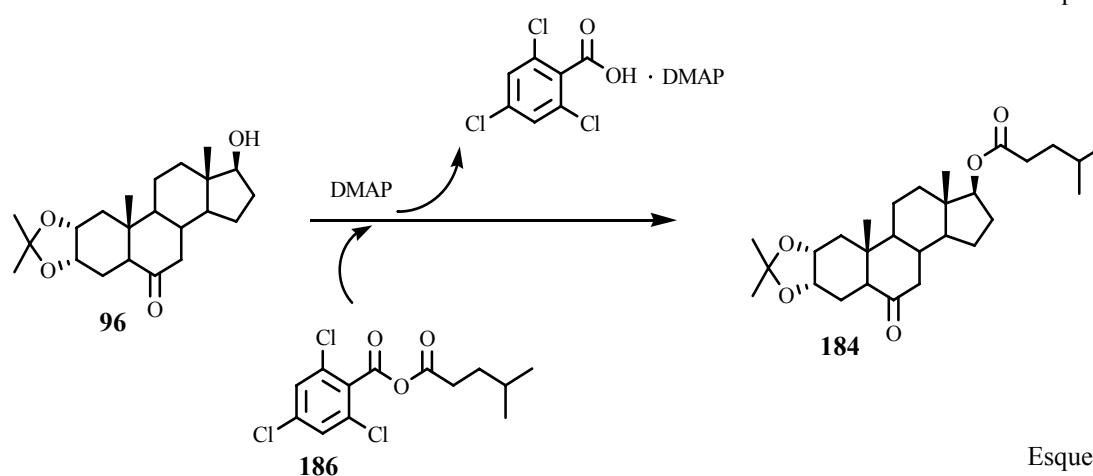
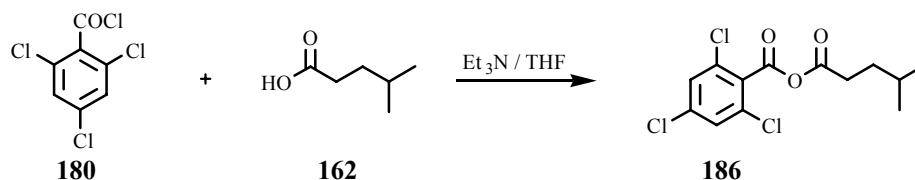
En un principi, s'escullen les condicions descrites més suaus per provar la hidròlisi de **184**: àcid trifluoroacètic al 50% i a 0 °C.

Després d'una hora de reacció seguida de purificació per cromatografia flash (Cy/AcOEt, 3:2), s'aconsegueixen aïllar fraccions que contenen el producte d'interès **143**. Totes elles, però, es troben impurificades amb acilurees, formades com a subproducte en la reacció d'esterificació anterior, en la qual el cru de reacció que contenia **184** no s'ha purificat. Després de realitzar dues columnes cromatogràfiques i dues recristal·litzacions amb EtOH/H₂O no s'aconsegueix aïllar **143** pur.

Així doncs, tot i que el tractament de **96** i **162** amb DCC i DMAP permet la formació de l'èster androstrànic, la presència d'acilurees en l'etapa de desprotecció, no permet dur a terme amb èxit la purificació del producte d'interès, motiu pel qual es decideix canviar la metodologia d'esterificació.

5.5.2. Esterificació de Yamaguchi

La dissolució de **162**, **180** i Et_3N i posterior evolució de la reacció a t.a. permet la formació *in situ* de l'anhidrid mixt **186** (Esquema 81). Aquest s'esterifica amb l'esquelet androstànic **96** en presència de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) i en atmosfera inerta (Esquema 82).



Aquesta reacció d'esterificació es porta a terme en excés d'anhidrid mixt **186** (generalment dos equivalents per equivalent de substrat),⁴⁷⁴ obtenint-se un cru que s'identifica, mitjançant $^1\text{H-RMN}$, com **184**, sense presència de **96**. S'emprarà en la següent etapa (desprotecció del diol de l'anell A) sense purificar-lo per cromatografia.

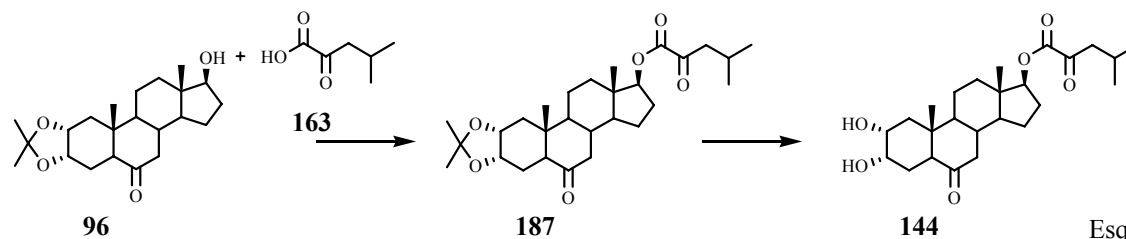
5.5.2.1. Hidròlisi emprant CF_3COOH

El tractament de **184** amb àcid trifluoroacètic al 50% i a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durant 10 h rendeix un cru del que, després de purificar-lo per cromatografia flash, permet aïllar el compost d'interès **143** amb un rendiment del 38% des de **26**, és a dir, després de 3 passos sintètics: formació de l'acetònid **96**, esterificació de Yamaguchi i trencament de l'acetònid per obtenir **143**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **143** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (*RLIT*), es recristal·litza en $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ en fred (rendiment de cristal·lització del 44%).

5.6. Síntesi de **144** (2'ceto)

Se segueix la mateixa metodologia sintètica que l'emprada per a la síntesi de **143**, basada en l'esterificació entre l'esquelet androstànic **96** i l' α -cetoàcid comercial **163**, seguit de la desprotecció de l'acetònid.



Esquema 83

Es decideix tornar a provar l'esterificació emprant DCC/DMAP ja que es pensa que la diferència de polaritat entre **143** i **144** serà suficient per aïllar **144** de les N-acilurees.

Tant per CCF com per $^1\text{H-RMN}$ es detecta la formació de **187** però, un cop hidrolitzat l'acetònid amb CF_3COOH (50%), no és possible aïllar i purificar **144** de N-acilurees formades, fet que va fer tornar a pensar en recórrer a l'esterificació de Yamaguchi.

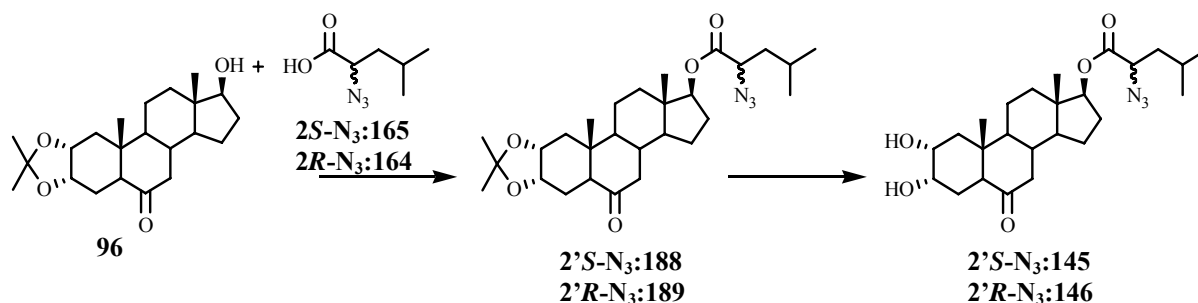
Així, doncs s'activa l'àcid **163** mitjançant la síntesi *in situ* de l'anhídrid mixt emprant clorur de 2,4,6-triclorobenzoil, que s'esterifica posteriorment amb **96**. Es desprotegeix el diol de l'anell A amb àcid trifluoroacètic i, una vegada purificat el cru de reacció, s'obté **144** amb un rendiment del 20% des de **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **144** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (*RLIT*), es recristal·litza **144** en EtOH/H₂O en fred (rendiment de cristal·lització del 61%).

5.7. Síntesi de **145** i **146** (2'N₃)

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'esterificació entre l'esquelet androscànic i la cadena lateral s'ha de dur a terme en condicions d'acidesa pràcticament neutres, no solament degut a la inestabilitat del grup protector acetal de l'anell A sinó també degut, en aquest cas, a la presència d'un centre quiral en α de carbonil de la cadena lateral, susceptible de patir certa racemització a pH bàsics.

L'esterificació mitjançant DCC i DMAP ja s'ha emprat amb bons resultats per a la síntesi de **184** i **187**, aconseguint-se la formació de la funcionalitat ester. Tanmateix, els problemes apareixien en la purificació dels anàlegs androscànics d'interès. Es decideix, però, provar altra vegada la síntesi dels azidoèsters emprant aquesta metodologia així com també, mitjançant l'esterificació de Yamaguchi.



Esquema 84

5.7.1. Intent d'esterificació amb DCC

La reacció d'esterificació amb DCC es prova en dos dissolvents diferents: CHCl_3 ¹⁵⁵ i acetona,¹¹⁸ ja que està descrit el seu ús en la bibliografia¹¹⁸ i ja varen ser emprats prèviament a l'equip.

Malauradament, però, el tractament de **96** amb **164** o **165** en presència de DCC i quantitats catalítiques de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), emprant CHCl_3 i acetona com a dissolvents, no permet la formació dels èsters d'interès en cap de les experiències realitzades. Després d'afegir-hi més quantitat de DCC i de 48 h de reacció en acetona i 147 h de reacció en CHCl_3 , per CCF no es detecta cap tipus d'evolució, confirmant-se per $^1\text{H-RMN}$ la sola presència dels productes de partida.

És possible que el grup azido en α de carbonil sigui capaç de desactivar el grup àcid per la formació d'anells intramoleculars, mitjançant ponts d'hidrogen o bé que l'esterificació no es doni degut a l'impediment estèric del grup azido en α de carbonil. Cap d'aquestes hipòtesis, no tenen cap suport experimental que les recolzi.

5.7.2. Esterificació de Yamaguchi

Davant els mals resultats obtinguts emprant la DCC, es decideix emprar altre cop l'esterificació de Yamaguchi, ja que la reacció es dona a través de la formació d'un activador d'àcid més fort, els anhídrids mixtes, els quals s'obtenen, a l'igual que **186**, tractant els azidoàcids corresponents amb **180** i Et_3N . Un cop filtrat el $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ format, eliminat el THF a pressió reduïda i redissolts els anhídrids mixtes en CH_2Cl_2 , es procedeix a esterificar-los amb **96**, en presència de DMAP com a catalitzador.

Si bé està descrit que s'utilitzin com a mínim 2 equivalents d'anhídrid mixt,⁴⁷⁵ a causa de la baixa estabilitat d'aquests i de la poca quantitat d'azidoàcids **164** i **165** de què es disposa, es decideix anar addicionant anhídrid mixt mentre, per CCF, es detecti **96** sense reaccionar.

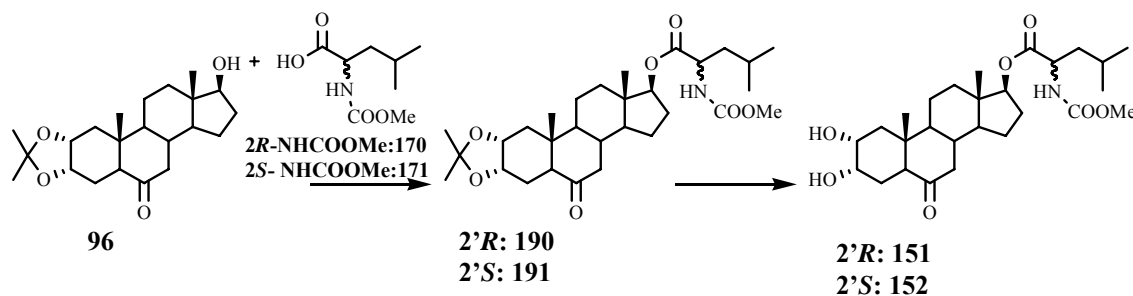
L'obtenció d'un sol producte d'ancoratge per cadascun dels dos compostos **188** i **189** seguint aquest procediment confirma la puresa òptica de les cadenes laterals **164** i **165**. S'empren els crús de reacció per a la següent etapa sense realitzar cap purificació cromatogràfica.

5.7.3. Desprotecció dels acetònids **188** i **189**

Tal i com es va dur a terme per a la hidròlisi dels acetals **184** i **187**, s'emprarà CF_3COOH al 50% i a una temperatura de $0\text{ }^\circ\text{C}$ per tal d'intentar minimitzar la hidròlisi de l'èster de 17β . S'obtenen **145** i **146** amb uns rendiments del 35% i el 62%, respectivament, des de **26**. Per tal d'avaluar la seva activitat en el *RLIT*, es recristal·litzen en $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ en fred, obtenint-se rendiments del 68 i 59%, respectivament.

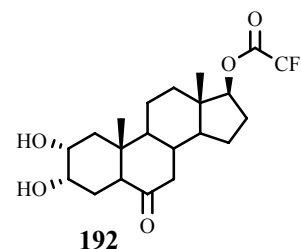
5.8. Síntesi de **151** i **152** ($2'\text{-NHCOOMe}$)

De la mateixa manera que pels anàlegs anteriorment esmentats, l'estratègia sintètica consisteix en les esterificacions de Yamaguchi entre l'esquelet **96** i els aminoàcids degudament protegits, seguida de la hidròlisi de l'acetal de l'anell A.



Esquema 85

Mentre l'esterificació va rendir **190** i **191** amb bons resultats, la hidròlisi dels acetals en medi CF_3COOH (50%) conduí a l'obtenció dels anàlegs d'interès **151** i **152** però també a la formació de **192** en una relació aproximada de 60:40 (**151** o **152/192**), determinada per $^1\text{H-RMN}$. **192** és el producte de la hidròlisi de la funcionalitat èster a C17, seguit d'esterificació de l'hidroxil lliure amb l'àcid trifluoroacètic present en el medi.



Aquest trifluoroacetat **192** no havia estat aïllat fins el moment en la síntesi de la resta d'anàlegs androscànics, fet que posa de manifest la influència de la cadena lateral en la diferent reactivitat d'aquests compostos.

Els anàlegs **151** i **152** s'obtenen després de tres etapes sintètiques amb un rendiment global del 35 i 23% des de **26**, respectivament.

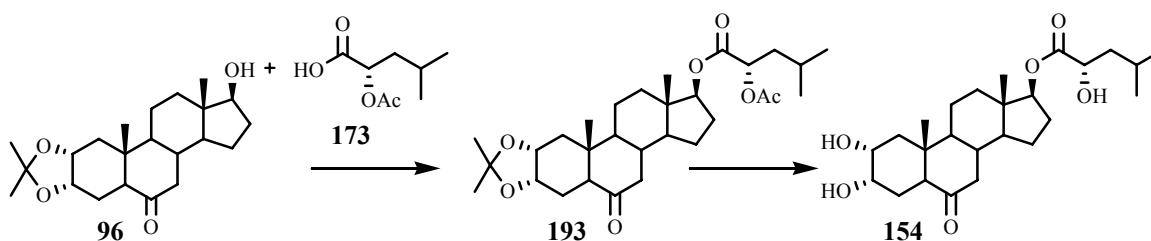
Per tal d'avaluar la seva activitat en el *RLIT*, **152** es recristal·litza en EtOH/H₂O en fred (62% de rendiment). Però, en intentar aplicar el mateix procediment de purificació mitjançant recristal·lització per **151**, es va observar com sorprenentment aquest compost no cristal·litzava en cap de les següents barreges de dissolvents: èter de petroli/CH₂Cl₂, èter diisopropílic/CH₂Cl₂, èter etílic/CH₂Cl₂, MeCOMe/H₂O i EtOH/H₂O en fred, fet que va fer necessària una segona purificació mitjançant cromatografia flash (rendiment del 73%). S'observa així, altra vegada, la influència de la cadena lateral en el comportament dels anàlegs.

5.9. Síntesi de **153** i **154** (2'-OH)

5.9.1. Síntesi de **154** (2'-S-OH)

Seguint la metodologia emprada fins el moment per a l'obtenció d'altres anàlegs androscànics, s'ancora la cadena **173** amb l'esquelet androscànic emprant l'esterificació de Yamaguchi: formació de l'anhídrid mixt amb clorur de 2,4,6-triclorobenzoil i posterior esterificació emprant DMAP com a catalitzador.

S'obté un cru de color taronja que correspon majoritàriament a **193**. Aquest s'emprarà sense realitzar cap tipus de purificació cromatogràfica posterior.



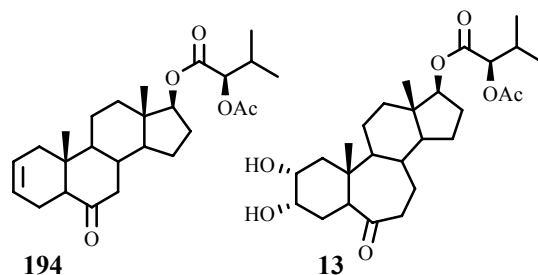
Esquema 86

La última etapa sintètica consisteix en la hidròlisi simultània de l'acetal de l'anell A i del grup acetoxi de **193** per tal d'obtenir l'anàleg d'interès **154**. En aquest cas, la dificultat d'aquesta etapa es fa més palesa per la similitud entre l'èster androscànic i l'acetat a C2'.

Típicament la hidròlisi del grup acetat es dona amb rendiments gairebé quantitius en condicions bàsiques ($K_2CO_3/MeOH$ ⁴⁷⁶ o NH_3 ⁴⁷⁷). Si bé és cert que medis lleugerament bàsics aconseguirien la hidròlisi del grup acetoxi, també trencarien l'enllaç èster de C17 obtenint-se el producte de hidròlisi total **26**. A més, seria necessària una etapa més per a la hidròlisi de l'acetal de l'anell A.

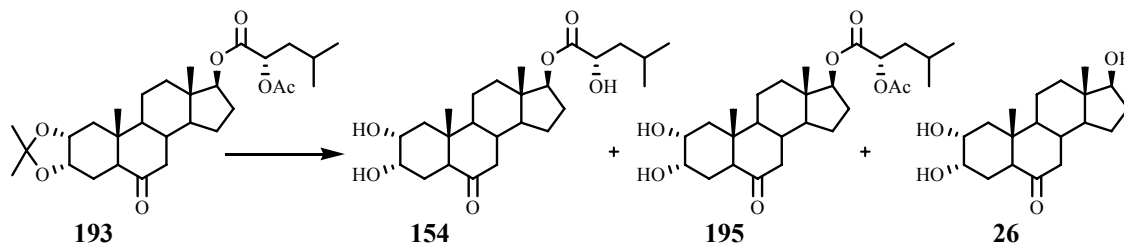
Sembla interessant, per tant, l'ús de condicions àcides suaus per dur a terme aquesta hidròlisi selectiva. L'any 1998, H. Chodounska i A. Kasal⁴⁷⁸ aconseguiren la desprotecció d'un grup acetat front a un benzoat emprant una barreja substrat/MeOH/ $CHCl_3/HCl$ 1 mmol : 8 ml : 1 ml : 0.6 ml.

Aplicant la mateixa metòdica, a l'equip, es va realitzar la hidròlisi dels grups acetoxi dels anàlegs androstànics **194** i **13**. Tot i formar-se majoritàriament els productes d'interès, s'observa el trencament de la cadena lateral, recuperant-se **26**, i l'existència de productes de partida, ambdós amb rendiments superiors al 10%.



Esquema 87

Tanmateix, quan es proven les mateixes condicions sobre **193** no s'aconsegueix la hidròlisi del grup acetat, posant de manifest una vegada més la influència de la cadena lateral en la diferent reactivitat dels anàlegs. Concentracions més elevades d' HCl condueixen a proporcions **154:195:26** de 2:0:98.



Esquema 88

Degut a la dificultat de dur a terme aquestes desproteccions emprant HCl , es decideix provar de substituir-lo per CF_3COOH .

Així doncs, es tracta **193** amb CF_3COOH 85% a t.a. Transcorreguts 4 dies de reacció, no es detecta presència de producte de partida per CCF, però a través dels espectres de 1H -RMN es pot observar la formació d'una gran proporció de trifluoroacetats en els hidroxils a C2, C3 i/o C2'. Aquests es poden observar per la desaparició dels senyals corresponents als hidroxils (sobre 3.5 ppm) i aparició de senyals èster (sobre 4.0 ppm). A més, el gran nombre de metils 18 i 19 (0.90, 0.87, 0.86, 0.85, 0.82, 0.80 i 0.79) també confirmen la formació de trifluoroacetats a C2, C3 i/o C2', així com també la formació de trifluoroacetats a C17 (4.83, t, J = 8.4 Hz). Serà necessària, per tant, la hidròlisi d'aquests trifluoroacetats per obtenir el producte d'interès.

Estan descrits rendiments gairebé quantitius per a la desprotecció de grups trifluoroacetoxi per a rendir hidroxils lliures, on s'empra, en la majoria dels casos, medis bàsics (K_2CO_3 ,^{479,480} $NaHCO_3$,⁴⁸¹ KOH ,^{482,483} NH_3 ⁴⁸⁴).

Tenint en compte l'existència de l'èster androstànic a C17, es decideix emprar condicions bàsiques suaus (NaHCO_3) i controlar acuradament la reacció per CCF.

Després de 30 min de reacció no es detecta producte de partida i, un cop purificat el cru mitjançant cromatografia flash (Cy/AcOEt, 1:3), s'aconsegueix aïllar **154** i **192** amb uns rendiments del 13% i 37% des de **26**.

Es creu que un augment en el temps de reacció i/o en la concentració de base haguera pogut millorar el rendiment de **154** però cal arribar a un compromís entre la hidròlisi dels trifluoroacetats i la possible hidròlisi de l'èster a C17.

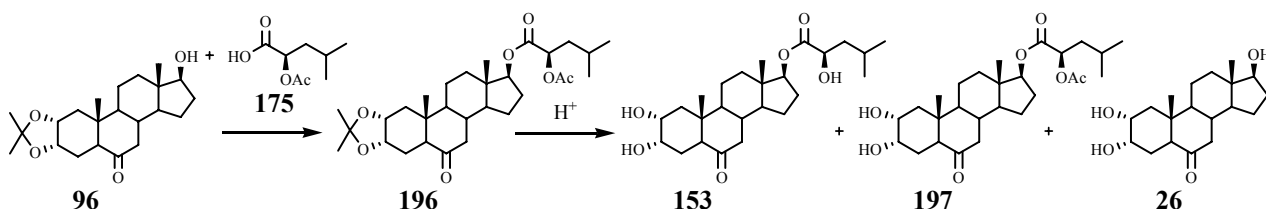
D'altra banda, es pot observar com els hidroxils de l'anell A són molt més reactius que no pas els de la cadena lateral.

Per tal d'avaluar l'activitat de **154** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (*RLIT*), es recristal·litza en EtOH/H₂O en fred (rendiment de cristal·lització del 65%).

5.9.2. Síntesi de **153** (2'R-OH)

S'ancora l'àcid carboxílic **175** amb l'esquelet androstànic **96**, mitjançant l'esterificació de Yamaguchi, obtenint-se **196** satisfactòriament. Aquest cru s'emprarà en la següent etapa d'hidròlisi de l'acetal de l'anell A, sense realitzar cap purificació cromatogràfica.

De la mateixa manera que succeïa per a **193**, la reacció d'hidròlisi dels grups protectors de **196**, genera **153** com a producte d'interès, i **197** i **26** com a subproductes:



Esquema 89

Es decideix aprofundir en les millors condicions d'hidròlisi per tal de minimitzar la formació de **197** i **26**. D'una banda, es descarta l'ús de CF_3COOH ja que condueix a la formació de trifluoroacetats que cal hidrolitzar posteriorment, disminuint considerablement el rendiment total. De l'altra i, tenint en compte l'esmentada importància de la cadena lateral en la reactivitat dels anàlegs, es creu necessari estudiar diferents condicions (concentració de dissolvents i d'HCl, temps...) en l'ús d'HCl com agent hidrolitzant.

A continuació es mostren les diferents experiències realitzades, a petita escala i a 0 °C, així com les porcions **153:197:26** obtingudes i identificades mitjançant espectres de ¹H-RMN:

Exp.	Concentració HCl (%)	Temps (h)	Relació 153:197:26
1	2.2	44	1:0:9
2	0.8	1.20	1:3.5:0.5
3	1.9	1.20	1:3:1
4	1.5	22	1:0.5:3.5
5	2.2	22	1:0:4
6	1.4	4	1:1.3:1
7	1.4	7	1:0.7:1.7
8	0.8	15	1:0.3:2

Taula 15

En primer lloc, es pot observar com l'acetal de l'anell A s'hidrolitza en condicions àcides molt suaus, ja que en cap cas es detecta la seva presència després del tractament àcid.

D'altra banda i contràriament al que s'esperava, els dos èsters (l'acetat de la cadena lateral i l'androstànic a C17) no són molt diferents de reactivitat entre si i cal arribar a un compromís per hidrolitzar el primer d'ells i minimitzar a l'hora la formació de **26**.

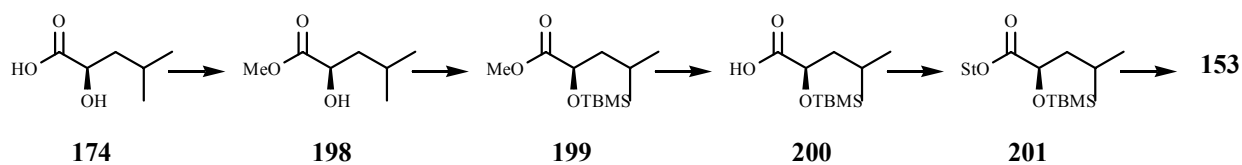
Tot i que tant el temps de reacció com la concentració d'àcid clorhídric en el medi influeixen en les proporcions **153:197:26** sembla ser que el temps hi juga un paper més important. Així, per una mateixa concentració d'àcid (exp. 1,5 i 2,8 i 6,7) majors temps de reacció condueixen a un augment considerable en la proporció de **26**. Mentre que, per un mateix temps de reacció (exp. 2,3 i 4,5), doblar la concentració d'àcid no modifica substancialment les proporcions **153:197:26**.

Per a dur a terme la reacció a més gran escala (de l'ordre d'1 g), s'empren les mateixes condicions que les de l'experiència **6**, ja que és on s'aconsegueix menor hidròlisi total (formació de **26**). S'obté una proporció **153:197:26** de 1:1.5:2, pitjor que l'anterior, evidenciant així la dificultat en el control de les condicions de reacció.

Desafortunadament, després d'intentar purificar el cru de reacció mitjançant cromatografia flash i a través de diverses recristal·litzacions, no s'aconsegueix separar **153** de **197**, aïllant-se només fraccions que contenen proporcions 1:1 dels esmentats anàlegs. Ambdós són compostos força polars, amb factors de retenció molt semblants que dificulten la seva separació.

Es proposa, per a futurs treballs, canviar l'estratègia sintètica modificant el grup protector de manera que no solament sigui més fàcil purificar l'anàleg d'interès sinó que la etapa de desprotecció d'aquest no provoqui tanta hidròlisi de l'èster a C17.

El grup TBMS podria ser emprat per a la protecció de l'hidroxil, essent necessàries la prèvia protecció de l'àcid carboxílic i posterior saponificació.



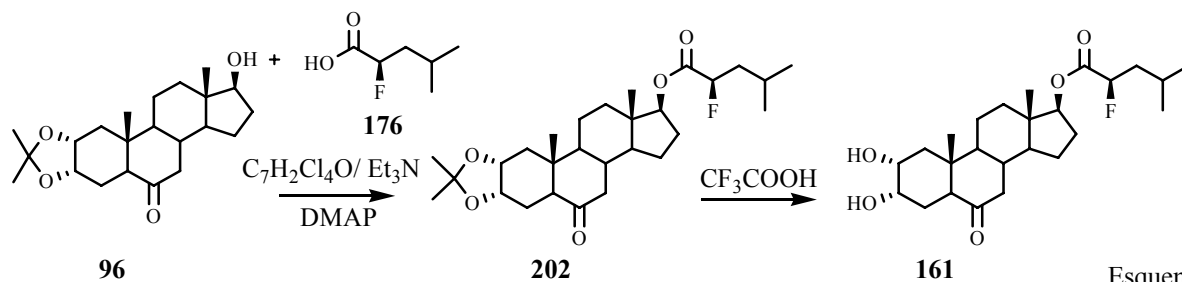
Esquema 90

El principal inconvenient consisteix en el fet de requerir-se dues etapes diferents i independents per a la desprotecció dels dos grups protectors (l'acetal de l'anell A i el de la cadena lateral). De tota manera, la possibilitat de desprotegir el grup TBMS selectivament front a la hidròlisi de l'èster androscànic (ja que es duria a terme en presència de fluorurs en medi neutre) sembla aconsellar aquesta estratègia sintètica.

5.10. Síntesi de 161 (2'R-F)

Es pretén obtenir l'anàleg **161** mitjançant l'esterificació de Yamaguchi entre **96** i **176**.

Se segueix el mateix procediment descrit per als altres anàlegs obtinguts fins el moment: esterificació de Yamaguchi entre **96** i **176** i posterior hidròlisi de l'acetal de l'anell A en medi CF_3COOH (50%) a 0°C , reacció aquesta última que té lloc en menys de 30 min.



Esquema 91

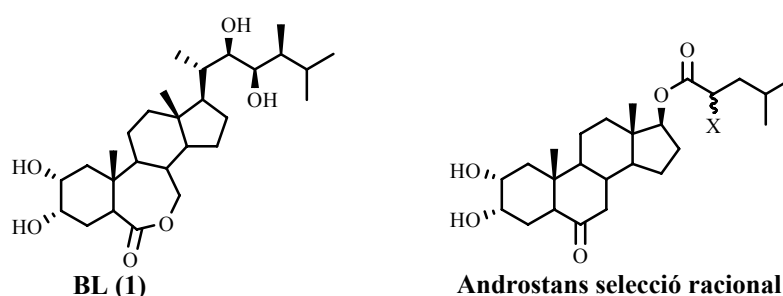
S'obté **161** amb un rendiment del 27% des de **26**. Posteriorment, es recristal·litza en $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ en fred per tal d'avaluar-ne la seva activitat en el test d'inclinació de la làmina d'arròs.

6. SÍNTESI D'ANÀLEGS ANDROSTÀNICS AMB CADENES D'ÀCIDS CARBOXÍLICS COMERCIALS ESCOLLIDES PER MÈTODES COMPUTACIONALS

6.1. Introducció

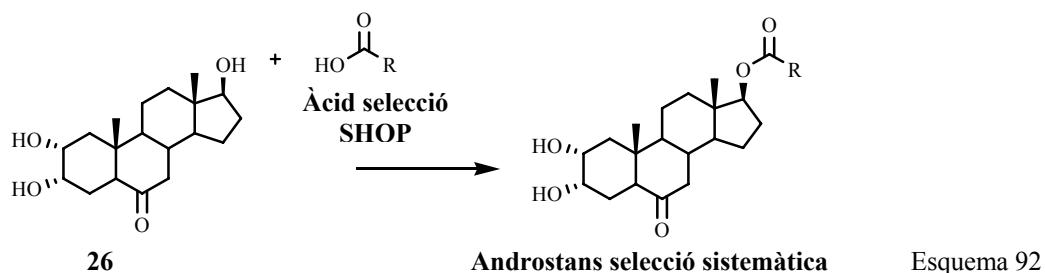
Cal recordar que un dels principals avantatges de l'ús de BRs androstrànics és la seva bona relació cost sintètic/activitat. La recerca de bones cadenes laterals es pot abordar des d'un punt de vista racional o bé des d'un altre més sistemàtic.

Tots els anàlegs obtinguts fins el moment en aquesta tesi es podrien englobar dins de la metodologia racional, ja que són androstrànics amb cadenes, *a priori*, estructuralment força similars a la de la BL (1): derivats α substituïts de l'àcid 4-metilpentanoic.



Una altra manera d'abordar la síntesi d'anàlegs androstrànics d'elevada activitat i baix cost sintètic consisteix en, de forma sistemàtica, ancorar a l'esquelet androstrànic cadenes laterals d'àcids carboxílics comercials. Aquestes haurien de mimetitzar la de la BL (1), sense partir d'una idea prefixada de la seva estructura. Es podrien obtenir, per tant, resultats interessants emprant àcids força allunyats estructuralment de la cadena de la BL (1).

En la tesi doctoral de I. Jové,¹⁵⁷ duta a terme en paral·lel i conjuntament amb aquesta, es va desenvolupar una nova metodologia computacional (SHOP (Scaffold HOPing))⁴⁸⁵ mitjançant la qual es varen seleccionar una sèrie d'àcids comercials, bons candidats per a ser ancorats a l'esmentat esquelet androstrànic **26**:

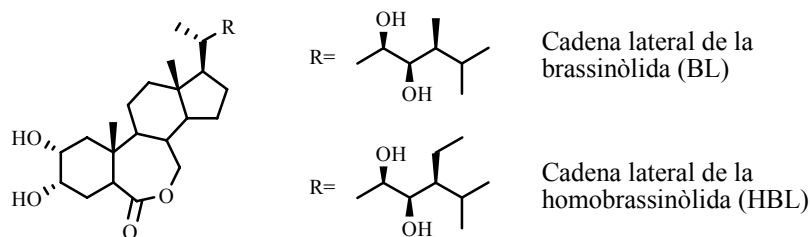


Per a dur a terme aquesta selecció, es van estudiar les propietats estructurals i químiques d'una base de dades de 7488 àcids carboxílics comercials, de sis proveïdors diferents:

Proveïdor	Aldrich	Asinex	IBS	Key Organics	Maybridge	Specs	TOTAL
Nº compostos	2988	1795	71	336	1807	491	7488

Taula 16

Després de realitzar una anàlisi conformacional i calcular-ne diversos descriptors, es comparà cada un d'ells amb les cadenes laterals dels BRs més actius coneguts fins el moment (brassinolida **(1)** i homobrassinolida **(4)**).

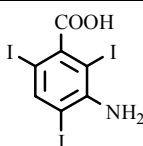
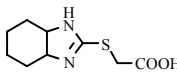
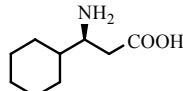
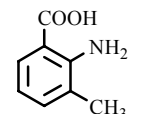
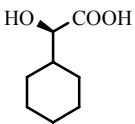
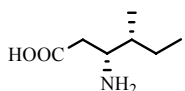
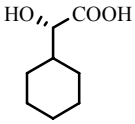
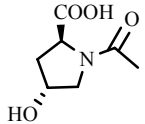


Esquema 93

Per tal de quantificar la semblança de cada àcid comercial amb la BL **(1)** o la HBL **(4)**, es calcularen diversos índex de similitud, entre els quals en destaca el de Carbó.⁴⁸⁶

L'índex de Carbó es basa en la comparació de les densitats electròniques de dues molècules superposades. Es troba comprès entre 0 i 1 i la màxima similitud entre molècules s'assoleix quan l'índex de Carbó és proper a 1.

A continuació es mostren les estructures dels àcids seleccionats amb major similitud (índex de Carbó)⁴⁸⁶ amb les cadenes laterals de la BL **(1)** i la HBL **(4)**. Es pot observar com les estructures són força allunyades a les racionals:

Àcid carboxílic	Índex amb BL	Índex amb HBL	Àcid carboxílic	Índex amb BL	Índex amb HBL
 203	0.985	0.983	 207	0.985	0.985
 204	0.986	0.985	 208	0.983	0.984
 205	0.985	0.981	 209	0.986	0.985
 206	0.985	0.981	 210	0.988	0.984

Taula 17

La metodologia computacional emprada permet reduir el nombre de compostos inicial (7488 àcids) a un centenar. D'entre aquests, els vuit àcids anteriors (**203-210**) són els que majors índex de similitud han mostrat. Degut a no ser possible seleccionar només un sol compost (índexs molt semblants), es decideix realitzar un alineament entre la BL (en verd) i els anàlegs androscànics amb cada una de les vuit cadenes laterals, amb la finalitat d'establir un ordre de prioritats per a ésser sintetitzats:

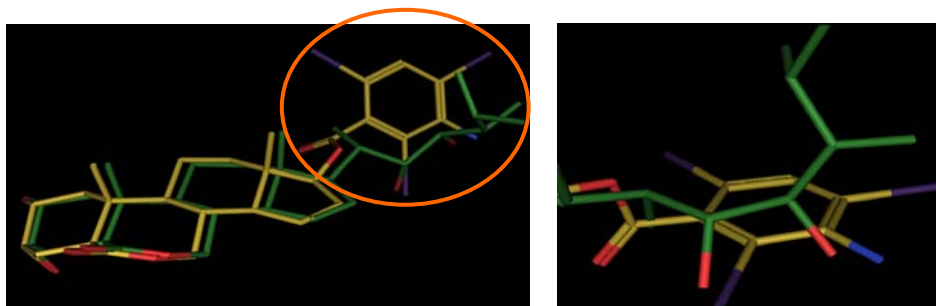


Figura 25: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androscà amb **203** com a cadena lateral (groc)

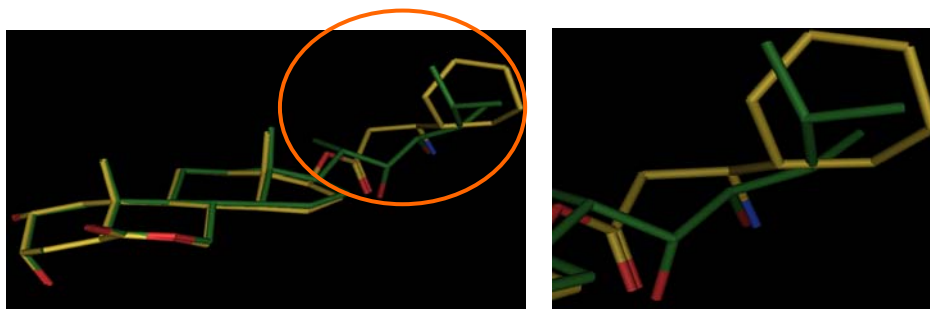


Figura 26: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androscà amb **204** com a cadena lateral (groc)

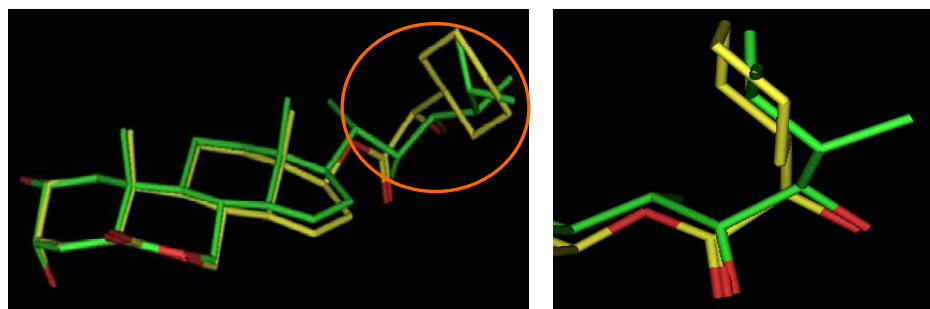


Figura 27: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androscà amb **205** com a cadena lateral (groc)

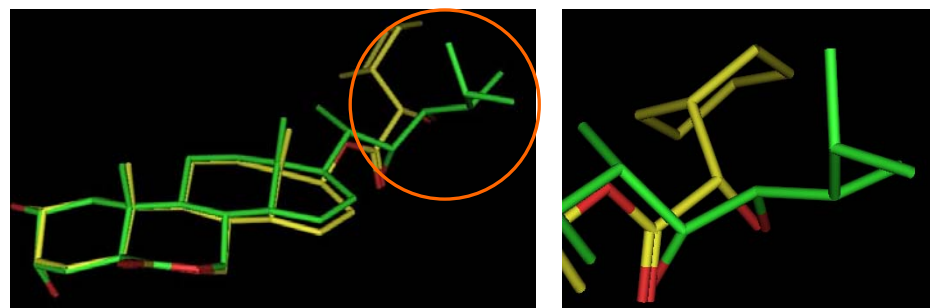


Figura 28: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androscà amb **206** com a cadena lateral (groc)

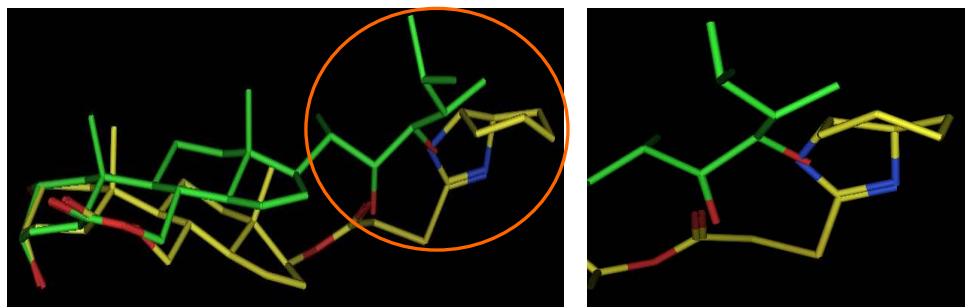


Figura 29: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androstà amb **207** com a cadena lateral (groc)

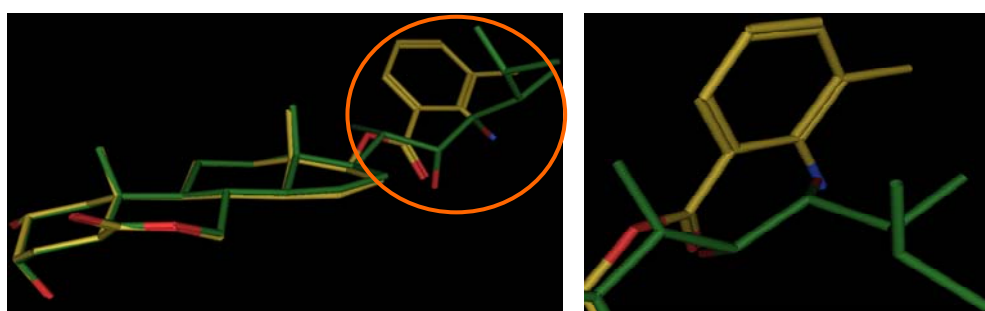


Figura 30: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androstà amb **208** com a cadena lateral (groc)

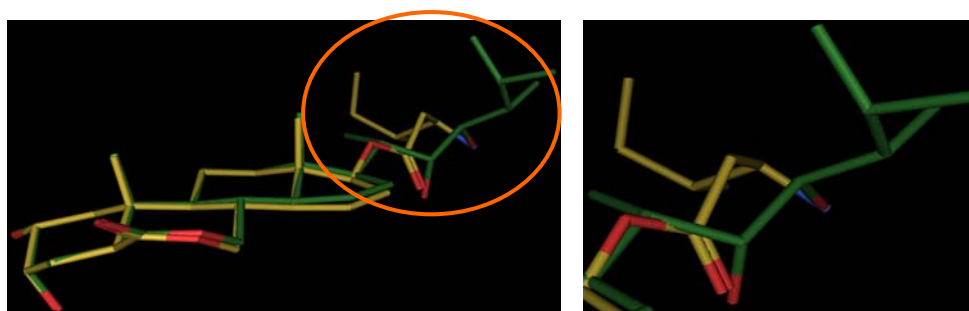


Figura 31: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androstà amb **209** com a cadena lateral (groc)

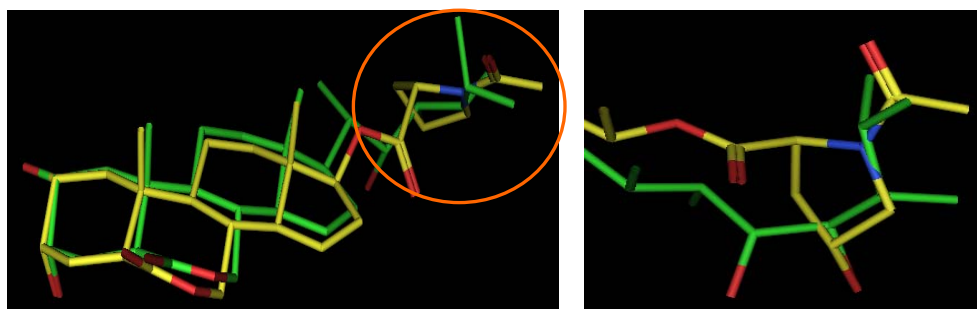
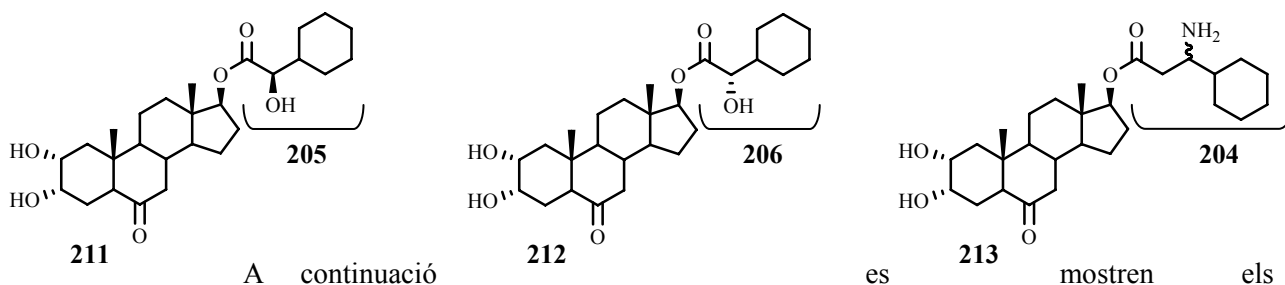


Figura 32: Alineament entre la BL (**1**, verd) i l'androstà amb **210** com a cadena lateral (groc)

En una primera selecció, es decidí abordar la síntesi i avaluació de l'activitat dels anàlegs amb cadenes laterals dels àcids **204**, **205** i **209**, per ésser aquests els que millors superposicions han mostrat amb la BL (**1**). Així mateix, tot i la diferència de solapament amb la BL, també es considerarà interessant ancorar l'àcid **206** per tal d'estudiar la importància de la configuració en α de carbonil (comparació amb **205**). Cal destacar que les Figures 25-32 no permeten visualitzar la distribució tridimensional de les superposicions.

Tot i que les bases de dades emprades per a la selecció d'àcids mostraven com tots ells eren comercialment assequibles, els aminoàcids **204** i **209** només es podien adquirir en forma racèmica. Per aquest motiu, es va desestimar la síntesi de l'androstà amb cadena de **209**, ja que la presència de dos centres quirals generaria una barreja de quatre diastereòmers, presumiblement difícils de separar i que conduirien a una disminució dràstica del rendiment global. En canvi, si que es va creure convenient ancorar **204**, degut a la formació de tan sols dos diastereòmers.

En una primera aproximació, es decidí abordar la síntesi i avaluació de l'activitat dels anàlegs **211**, **212** i **213**, tots ells amb funcionalitat cetona a l'anell B. En cas que algun d'ells mostrés activitat interessant en el *RLIT*, es procediria a la realització de la reacció de Baeyer-Villiger per tal d'obtenir les lactones corresponents:



alineaments entre el conòrmer actiu de la castasterona (**2**) i **211** i **212**:

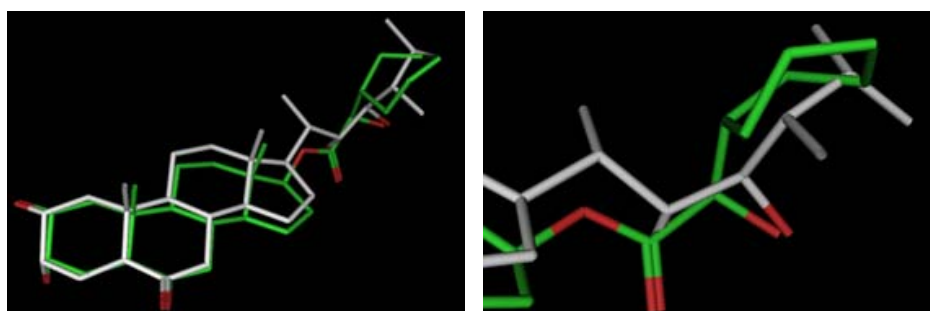


Figura 33: Alineament entre la CS (**2**, blanc) i **211** (verd)

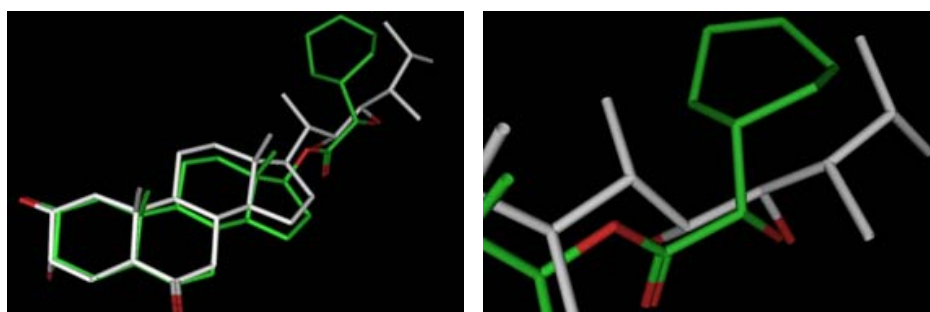


Figura 34: Alineament entre la CS (**2**, blanc) i **212** (verd)

Novament, si bé, **211** i **212** presenten un bon solapament tant en els esquelets com en la part hidrofílica de la cadena lateral (l'hidroxil i el carbonil simulen bé el 22*R*,23*R*-diol), la part hidrofòbica de **211** se superposa molt millor que la de **212**.

Pel que fa referència a l'àcid **204**, a continuació es mostren els dos alineaments flexibles entre la castasterona (**2**) i els anàlegs androstànics amb la cadena **204** (Figura 35) i també amb el seu enantiòmer **214** (Figura 36).

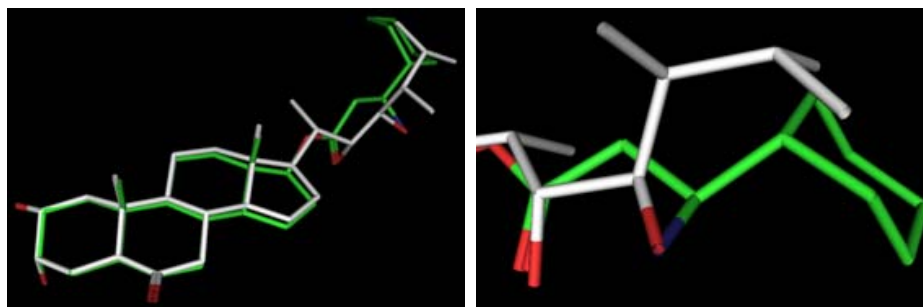
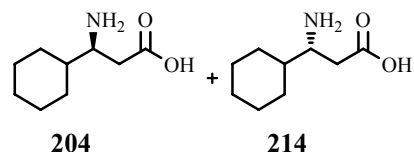


Figura 35: Alineament entre la CS (**2**, blanc) i androstà amb cadena **204** (verd)

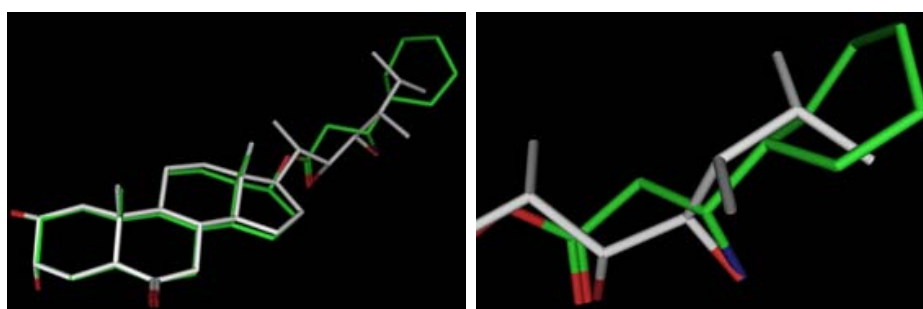
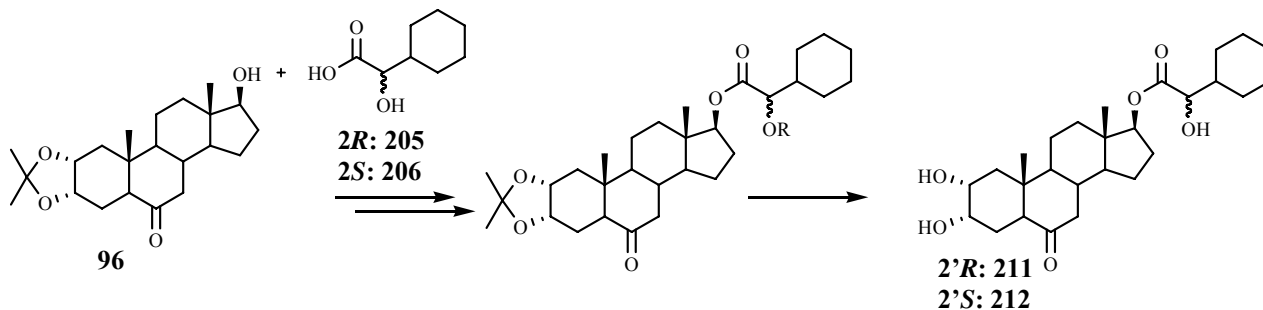


Figura 36: Alineament entre la CS (**2**, blanc) i androstà amb cadena **214** (verd)

Si bé l'esquelet i les funcionalitats polars (carbonil i amina) d'ambdós anàlegs se superposen molt bé amb les de **2**, les regions hidrofòbiques mostren notables diferències entre els diastereòmers.

6.2. Síntesi dels anàlegs androstànics **211** i **212**



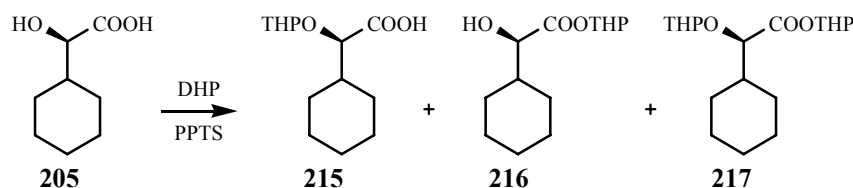
Esquema 94

De la mateixa manera com s'ha procedit anteriorment per a la síntesi de **153** i **154** (veure apartat 5.9), caldrà protegir no solament el diol de l'esquelet androstànic (en forma d'acetal) sinó també l'hidroxil dels àcids **205** i **206**. Novament, per evitar que aquests autocondensin en la reacció d'esterificació, s'ha

d'emprar un grup protector adient que permeti la posterior desprotecció selectiva de l'hidroxil front la funcionalitat èster formada.

Es decideix tornar a provar l'ús de l'ampliament emprat DHP com a grup protector ja que es disposa de referències bibliogràfiques on s'ha dut a terme amb èxit la protecció de **205** amb DHP.^{487,488} La reacció té lloc en presència de PPTS (en una relació molar **205**/DHP/PPTS de 1:3.6:0.1), durant 12 h a temperatura ambient i sota atmosfera inerta.

Seguint estrictament les condicions de reacció descrites, s'obté un cru, la purificació cromatogràfica del qual rendeix una mescla de diferents compostos (Esquema 95) amb un rendiment de 72% pel compost **217**,⁴⁸⁹ de 10% pel **216** i del 2% pel producte d'interès (**215**).



Esquema 95

Després de realitzar varies proves modificant algunes condicions de reacció, com són:

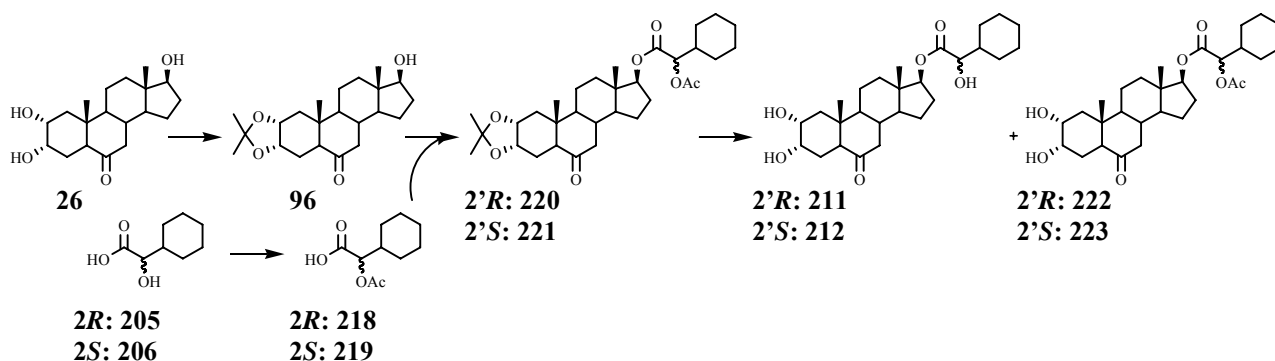
- disminuir la relació molar entre **205**/DHP a 1:1.
- disminuint la temperatura a 0 °C.
- reduint la proporció de catalitzador.
- afegint una gota de piridina per tal de controlar el pH del cru de reacció.

s'observa que la relació entre els èsters (**216** i/o **217**) i el producte d'interès **215** no és en cap cas inferior a 70:30, podent-se concloure que la protecció del grup hidroxil de l' α -hidroxiàcid **205** s'ha de realitzar amb un altre grup protector. S'escull, de la mateixa manera que pels α -hidroxiàcids anteriorment esmentats (veure apartat 5.9), el grup acetoxi.

El tractament de **205** i **206** amb anhídrid acètic i piridina en quantitat equivolumètrica i en presència de 4-(pirrolidin-1-il)piridina com a catalitzador permet obtenir **218** i **219**, amb uns rendiments del 83% i quantitatiu, respectivament.

218 i **219** es tracten separatament amb clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**) per tal de formar els anhídrids mixtes corresponents, els quals s'esterifiquen amb l'esquelet androstenic **96** en presència de DMAP (esterificació de Yamaguchi). Els èsters **220** i **221** formats s'empenen directament per a la següent reacció sense realitzar cap tipus de purificació cromatogràfica.

Finalment, resta per realitzar la hidròlisi en medi àcid dels dos grups protectors (l'acetònid de l'anell A i l'acetal de la cadena lateral). Cal recordar, que aquesta reacció pot generar com a subproductes **26** (trencament de la cadena lateral i eliminació de l'acetònid), si es porta a terme en un medi excessivament àcid, o bé, **222/223**, si l'acidesa del medi no és suficient. És necessari, per tant, arribar, a un compromís per optimitzar la formació de **211/212**.



Esquema 96

Per tal de trobar les condicions més adequades, s'efectuen algunes proves prèvies per a la hidròlisi de **220** emprant CF_3COOH a t.a:

CH_3COOH	t (h)	Relació 211:222:26
2 ml (50%)	48	1:1:0
8 ml (80%)	60	1:1:0
5 ml (100%)	20	cc

Taula 18

En primer lloc, es important destacar que el grup acetal de l'anell A s'hidrolitza en tots els casos, ja que només és necessari un medi lleugerament àcid per a que la reacció tingui lloc.

Es pot observar com ni el temps ni la concentració de CF_3COOH semblen influir molt en la reacció, no aconseguint-se hidrolitzar l'acetat de la cadena lateral en una proporció superior al 50%. Per intentar millorar aquests resultats, es va provar d'emprar medis lleugerament més àcids, com és el cas de l'àcid clorhídric, assajant-ne novament tant el dissolvent com el temps de reacció idonis:

Exp.	CHCl_3 (μL)	MeOH (μL)	$i\text{PrOH}$ (mL)	HCl 37% (μL)	t (h)	Relació 211/222/26
1	100	800	0	60	2	0:1:0
2	300	2400	0	60	2	0:1:0
3	100	800	0	60	48	4:1:0
4	0	0	1	80	2	0:1:0
5	100	800	0	150	20	7:1:3
6	0	0	1	250	20	2:2:1

Taula 19

A partir d'aquestes experiències, es pot observar com, d'una banda, la hidròlisi del grup acetat depèn del temps de reacció, no produint-se al cap de 2 h i aconseguint-se un 80% d'hidròlisi per a 48 h (experiències **1** i **3**). I de l'altra, en canvi, la hidròlisi de l'èster a C17 (formació de **26**) té lloc en concentracions elevades d' HCl (experiències **5** i **6**), sense tenir-hi molta influència el temps de reacció (experiències **3** i **4**).

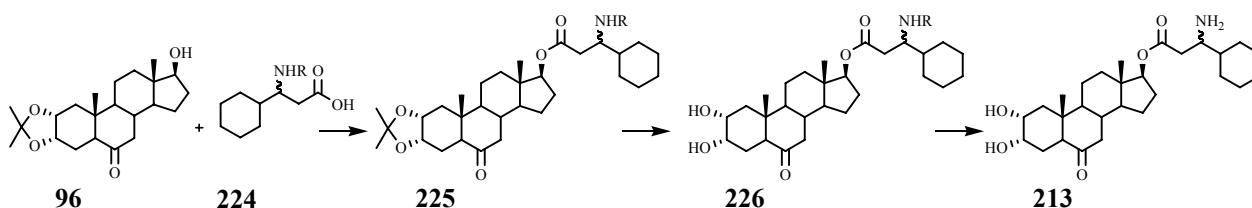
Considerant totes les proves realitzades, s'escala la reacció per a una quantitat més gran de **220**, emprant les condicions que major proporció de **211** han rendit (un 80% a l'experiència **3**). El fet de treballar amb quantitats majors de substrat va provocar que la relació **211/222/26** obtinguda en aquest cas fos quelcom més desafavorida per **211** (6.8:1:3.3, un 60% en producte d'interès), posant-se de manifest les estrictes condicions de reacció necessàries així com també la dificultat per controlar aquesta reacció.

La hidròlisi de **221** en les mateixes condicions que les anteriorment emprades per a **220**, rendeix una mescla **212/223/26** (13:1:6), on es detecta un 65% de **212**.

Una vegada purificats els crus de reacció mitjançant tècniques cromatogràfiques, els rendiments globals per a **211** i **212** han estat del 27% i del 34% respectivament, des de **26**. Aquests es recristal·litzen en EtOH/H₂O en fred per a ser avaluats en el test d'inclinació de la làmina d'arròs.

6.3. Síntesi de l'anàleg androscànic **213**

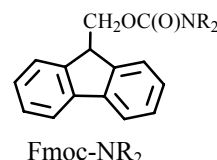
Per a la síntesi dels diastereòmers **213**, a partir de la barreja comercial d'aminoàcids degudament protegits (**224**), se seguirà la mateixa metodologia que per a la resta d'anàlegs obtinguts fins el moment, basada en l'esterificació de Yamaguchi entre l'esquelet androscànic **96** i l'aminoàcid protegit (cadena lateral). En aquest cas, i a diferència dels androscans anteriors, la hidròlisi dels dos grups protectors (el del diol de l'anell A i el del grup amínic de la cadena lateral) s'haurà de dur a terme en dues etapes successives i independents:



Esquema 97

S'han desenvolupat multitud de grups protectors de la funcionalitat amina, entre els quals en destaquen els carbamats (NCOOR), emprats per a la síntesi de pèptids i proteïnes,^{490,491} i les amides (NCOR), més usades en la síntesi d'alcaloides^{492,493} per a la protecció d'algunes bases nitrogenades. Mentre els carbamats es formen a partir de cloroformiats en condicions neutres, per a l'obtenció d'amides sol ser necessari treballar amb el clorur d'àcid, requerint-se condicions més dràstiques.

D'entre els carbamats més àmpliament estudiats, es troba, sens dubte, el 9-fluorenilmetilcarbamat (Fmoc), estable en condicions àcides i fàcilment hidrolitzable en presència d'amines (bases), rendint l'amina lliure i el dibenzofulvè.

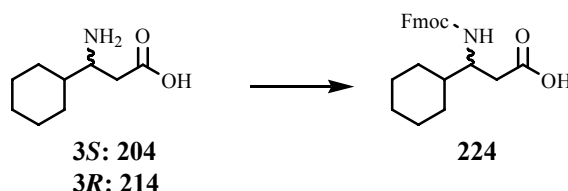


La síntesi de N-Fmoc-β-aminoàcids es troba àmpliament descrita a la literatura a partir del corresponent β-aminoàcid i clorur de Fmoc, en medi bicarbonat,⁴⁹⁴⁻⁴⁹⁹ carbonat⁵⁰⁰⁻⁵⁰⁴ o sosa.⁵⁰⁵

Es decideix iniciar les primeres proves emprant sosa aquosa ja que és en aquest medi on es troben descrites proteccions sobre substrats similars.

El tractament de la barreja dels aminoàcids comercials **204** i **214** amb clorur de Fmoc en dioxà i NaOH (1M) a 0 °C durant 4 h rendeix un cru complex on només és possible identificar, per ¹H-RMN, senyals corresponents al grup protector però no a l'amina d'interès protegida.

Quan la mateixa reacció s'efectua en medi carbonat, s'obté satisfactòriament **224** amb un rendiment del 96%.



Esquema 98

El cru de les cadenes laterals aminoprotegides **224** es tracta amb clorur de 2,4,6-triclorobenzoïl (**180**) per tal de formar els anhídrids mixtes corresponents, els quals s'esterifiquen amb l'esquelet androscànic **96**, en presència de DMAP com a catalitzador (reacció de Yamaguchi). L'acetònid **225** s'empra per a les següents reaccions sense prèvia purificació cromatogràfica. A continuació, cal en primer lloc, hidrolitzar l'acetal de l'anell A i, seguidament, desprotegir el grup amino de la cadena lateral.

La hidròlisi de l'acetònid té lloc en menys d'1 h en dissolució aquosa de CF₃COOH al 50%, obtenint-se **226** amb un rendiment del 40% després de tres etapes sintètiques des de **26**.

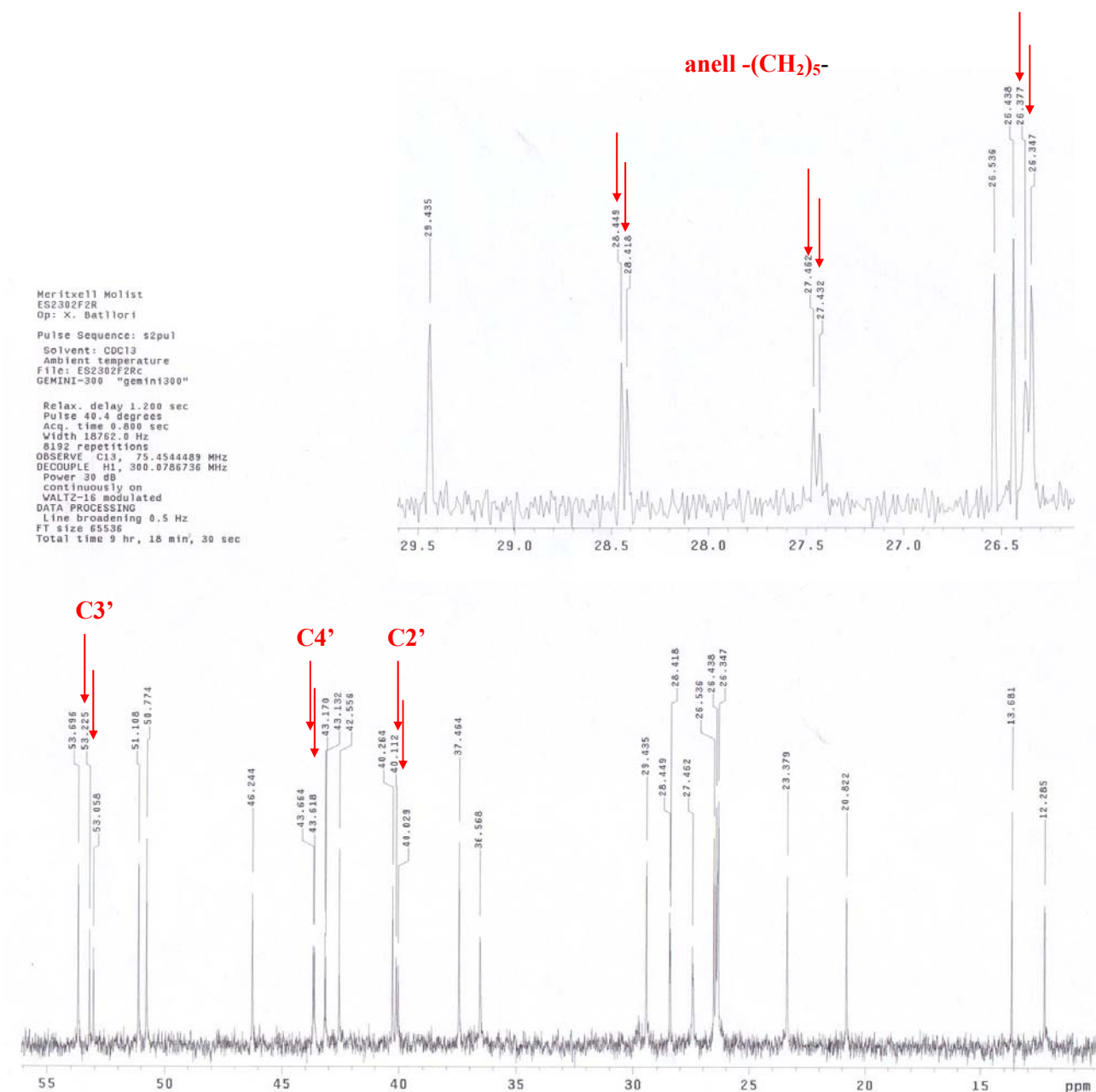
Pel que fa referència a la hidròlisi del grup Fmoc, a l'hora de triar la base més adient, s'ha tingut en compte la vida mitja d'aquest grup en Fmoc-ValOH emprant diferents bases en DMF:⁵⁰⁶

Base	t _{1/2}
20% piperidina	6 s
5% piperidina	20 s
50% morfolina	1 min
50% dicitclohexilamina	35 min
10% <i>p</i> -dimetilaminopiridina	85 min
50% diisopropiletilamina	10.1 h

Taula 20

Es decideix emprar com a base un 20% de piperidina, ja que, segons les referències bibliogràfiques trobades, aquesta amina permet l'obtenció de majors rendiments de desprotecció en temps de reacció inferiors. Així doncs, l'anàleg androscànic d'interès **213** s'obté per tractament de **226** amb DMF/piperidina (20%) a través d'una reacció molt neta, senzilla, ràpida i amb un rendiment del 93%.

Tot i que els desplaçaments químics dels senyals de ¹H-RMN per als dos diastereòmers de **213** són exactament els mateixos, no detectant-se cap tipus de desdoblament en cap d'elles, els espectres de ¹³C-RMN, mostrats a continuació, permeten diferenciar els senyals d'ambdós diastereòmers, essent aquestes suficientment diferents com per observar-se clarament la presència dels dos isòmers.



Espectre 3

Aquests dobles senyals no es van observar en cap dels anàlegs sintetitzats fins aleshores (ni en l' α -fluoroèster **161**, ni en els N-metoxycarbonilaminoderivats **151** i **152**...) fet que suggereix l'estereoespecificitat de les diferents reaccions emprades per a preparar les anteriors cadenes laterals.

D. DISCUSSIÓ DE LES DADES D'ACTIVITAT

En aquest capítol es presenten les dades d'activitat dels 11 compostos sintetitzats en aquesta tesi, 8 d'ells dissenyats de forma racional i 3, de manera sistemàtica, mitjançant la selecció d'àcids carboxílics emprant la metodologia SHOP. Es discuteixen, també, les conclusions que se'n poden extreure.

Activitat dels anàlegs sintetitzats

L'avaluació de l'activitat dels anàlegs sintetitzats s'ha dut a terme emprant el test d'inclinació de la làmina d'arròs (*RLIT*), basat en el desenvolupat per Takeno i Pharis.¹¹⁵ Les modificacions més importants que s'han realitzat en l'equip consisteixen en la seva adaptació a la varietat autòctona del Delta de l'Ebre Bahía, i a l'augment de la seva sensibilitat mitjançant la modificació del fotoperíode inicial (16 h de llum i 8 h de foscor) per 24 h de foscor, després del tractament amb el BR.^{10,116}

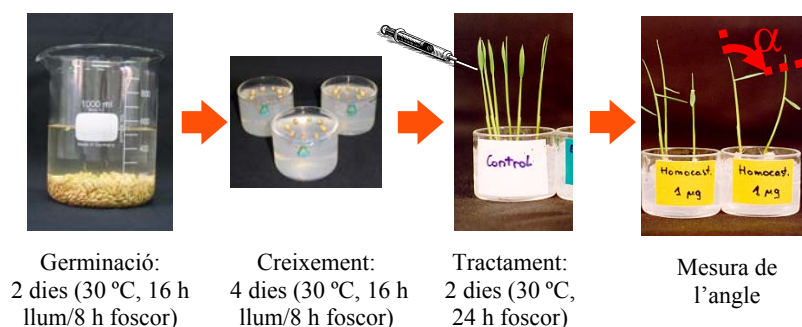
El protocol consta de quatre etapes:

1.- Germinació.- se submergeixen les llavors d'arròs (varietat Bahía) en aigua desionitzada i es deixen germinar durant 2 dies a 30 °C amb un fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor.

2.- Sembrada.- les llavors germinades es sembren en un gel d'agar-agar al 0.5% en aigua amb la radícula de germinació cap amunt però en contacte amb la superfície. Es deixa créixer l'arròs en les mateixes condicions que en l'etapa anterior durant 4 dies i mantenint una humitat relativa d'aproximadament un 90%.

3.- Injecció del BR.- se seleccionen les plantes on s'observi perfectament el nus on es desenvolupa la segona fulla, ja que és en aquesta part on s'injecta, amb una xeringa de cromatografia de gasos, el BR a una dosi que pot oscil·lar entre 10^{-7} i 2 µg/planta. Per tal que l'experiment sigui fiable, cada compost s'ha d'aplicar a un mínim de 10 o 12 plantes. En tots els casos, el producte a assajar s'ha dissolt en alcohol etílic del 95% en pes i, en cada bioassaig, es reserven plantes sense tractar com a control i d'altres en les que s'injecta 22R,23R-28-homocastasterona a 1 µg/planta, com a referència. Es col·loquen totes les plantes a la cambra de cultiu durant 2 dies a 30 °C i amb un fotoperíode de 24 h de foscor.

4.- Mesura de l'angle.- transcorreguts dos dies de l'aplicació del BR, es procedeix a la mesura de l'angle d'inclinació format entre la tija i l'anvers de la segona làmina, ara ja desenvolupada i separada de la tija. Es tallen les plantes per sota del nus i es dibuixa immediatament l'angle en un full de paper per a mesurar-lo posteriorment amb un transportador d'angles.

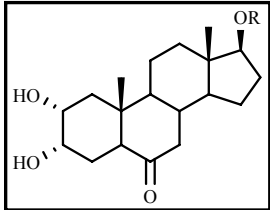
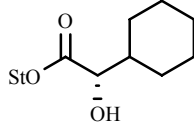
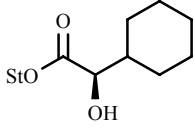
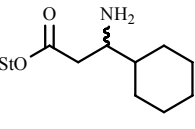
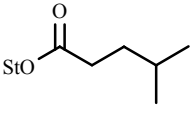
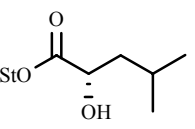
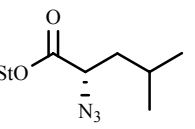
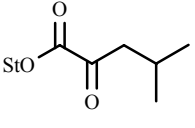
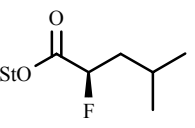
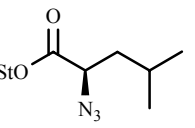
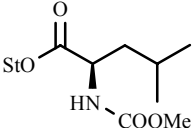


Esquema 99

El bioassaig s'inicia aplicant una dosi de 1 µg/planta ja que s'han observat problemes d'insolubilitat en aplicar concentracions superiors. Quan s'observa un angle d'inclinació de la fulla superior a 45 °, es procedeix a aplicar concentracions de BR inferiors per construir la corba dosi-resposta. Per a cada dosi, es realitzen, com a mínim, tres repeticions i els valors d'activitat per a cada compost s'expressen com el logaritme negatiu de la dosi a la qual la seva resposta és 45 ° (-log[dosi_{45°}(µg)]).

La correspondència entre l'angle d'inclinació de la làmina i l'activitat dels BRs s'atribueix a que els BRs actius promouen l'elongació i/o augment cel·lular en la zona d'aplicació, fet que provoca una inclinació de la fulla que es desenvolupa en aquest punt.

En la taula següent, es mostren les respostes de tots els compostos sintetitzats a 1 µg/planta, així com també, l'activitat, expressada com a (-log[dosi_{45°}(µg)]), d'aquells anàlegs dels quals ha estat possible realitzar la corba dosi-resposta. L'avaluació de les activitats ha estat duta a terme per diferents components de l'equip.^{122,124,507}

	<hr/>		
			
	212	211	213
Angle (°) a 1 µg/planta	44 °	84 °	66 °
Activitat (-log[dosi_{45°}(µg)])	0.29	1.69	1.02
<hr/>			
			
	143	154	145
Angle (°) a 1 µg/planta	7 °	2 °	4 °
Activitat (-log[dosi_{45°}])	-	-	-
<hr/>			
			
	144	161	146
Angle (°) a 1 µg/planta	20 °	20 °	4 °
Activitat (-log[dosi_{45°}])	-	-	-
			
			151
Angle (°) a 1 µg/planta			100 °
Activitat (-log[dosi_{45°}])			< 0.3

Taula 21

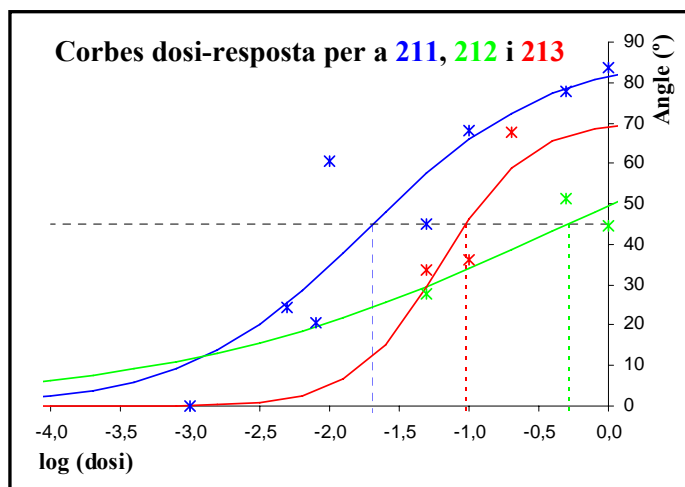
Cal remarcar que, en el cas de l'anàleg **151** (ha mostrat una resposta superior a 45 ° a 1 µg/planta), en disminuir la dosi per tal de realitzar la corba dosi/resposta fins a 0.5 µg/planta, els angles mesurats han estat pràcticament nul·ls, essent, per tant, l'activitat de **151** inferior a 0.3.

En la taula següent es detallen els angles mesurats en aplicar diferents dosis de cada un dels tres androstans **211**, **212** i **213**. És important destacar que aquests valors d'angle s'han obtingut després de realitzar la mitjana de com a mínim quatre bioassaigs, de 12 plantes cada un d'ells. El gràfic següent

mostra les seves corbes dosi-resposta, a partir de les quals s'han obtingut els valors d'activitat mitjançant la interpolació a 45 °:

Dosi	211 angle	212 angle	213 angle
1	84	44	66
0.5	78	51	-
0.2	-	-	68
0.1	68	-	36
0.05	45	28	34
0.01	61	-	-
0.005	25	-	-
0.008	20	-	-
0.001	0	-	-

Taula 22



En la gràfica, es pot observar com alguns dels punts de les corbes presenten una dispersió molt gran. Aquest fet és força freqüent quan s'avalua la resposta de les dosis que es troben prop del pendent de la corba.

El 23R-OH en la interacció BR-receptor

En aquest context, cal recordar la informació de la que es disposava abans d'iniciar aquesta tesi.

	141	137	139	19
Activitat (-log[dosi_{45°} (µg)])	0.54	1.29	-	1.03

Taula 23

L'activitat mostrada pels anàlegs **137** i **141** (amb funcionalitat donadora de pont d'hidrogen a C23) en contrast amb l'activitat marginal de **139** (grup acceptor de pont d'hidrogen a C23) suggeriria que l'hidroxil present en aquesta posició de la BL (**1**) actuava com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor. Cal remarcar que **141** presenta l'hidroxil en configuració oposada a la més adequada per expressar activitat.

Doncs bé, les activitats marginals de **143**, **144**, **146** i **161** (funcionalitat acceptora en α de carbonil) en contrast amb les activitats mostrades per **211**, **212**, **213** i **151** (donadors) corroboren les hipòtesis realitzades anteriorment en l'equip.¹¹⁷

Es creu doncs, que ara es disposa de prou anàlegs com per a poder concloure que el 23R-OH de la BL (**1**) actua com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor.

Dissortadament, en aquesta tesi no s'ha aconseguit obtenir **153** (isòmer configuracional de **154**), l'activitat del qual seria una dada més a considerar en el cas que resultés actiu. L'activitat marginal de **154** s'estudiarà en el següent apartat.

Comentari apart mereix **213**, doncs, tot i tractar-se d'una barreja de diastereòmers, la seva activitat és rellevant. Es creu que, quan es disposi de l'isòmer 3'R pur, l'activitat es veurà incrementada notablement, punt que també es comentarà en el següent apartat.

És important no oblidar que tots els anàlegs obtinguts en aquesta tesi presenten un grup cetònic a C6. Tal i com ja s'ha indicat en la introducció, és un fet prou generalitzable que tots els BR amb funcionalitat lactona a l'anell B, siguin naturals o sintètics, han resultat més actius que les seves corresponents cetones. En la taula següent, es mostren algunes parelles cetona/lactona a l'anell B, l'activitat de les quals s'expressa com a $-\log[\text{dosi}_{45^{\circ}}(\mu\text{g})]$:

Anell B	Lactona (X = OCO)	Cetona (X = CO)	Anell B	Lactona (X = OCO)	Cetona (X = CO)
	4.01	3.46		2.08	0.99
	3.32	2.80		1.76	0.65
	2.05	1.14		3.22	2.23
	2.57	2.29		0.41	-

Taula 24

És previsible, doncs, que l'activitat dels anàlegs que han resultat actius en aquesta tesi (**151**, **211**, **212** i **213**) es veurà incrementada quan se sintetitzin els corresponents anàlegs amb funcionalitat lactona a l'anell B, supòsit en el qual l'equip està treballant actualment.

Un altre punt a considerar consisteix en el fet que tots els anàlegs androstànics dissenyats racionalment i sintetitzats en aquesta tesi presenten l'esquelet carbonat de l'àcid 4-metilpentanoic, el qual va ésser escollit per haver permès, anteriorment en l'equip, l'obtenció d'androstans amb major activitat. A l'esmentada cadena hidrocarbonada lateral li manca, per tal d'obtenir anàlegs androstànics amb major similitud a la BL (**1**), un resta metílic que mimetitzi el 24S-metil d'aquesta. Per aquest motiu, s'ha intentat

synetitzar l'àcid (3*S*,4)-dimetil-2*S*-hidroxipentanoic (**98**) sense obtenir, malauradament, resultats satisfactoris tot i l'esforç realitzat.

Tal i com s'ha indicat, aquesta regió apolar sembla ser crítica per a l'activitat dels diferents BRs. Tan sols cal comparar les activitats dels anàlegs mostrats en la taula 24 per poder veure la influència dels tipus de restes alquíl·liques i la seva configuració en l'activitat de diversos BR.

S'espera en un futur disposar d'una estratègia sintètica adequada que permeti introduir el resta metílic en β del carbonil de la cadena lateral, per així sintetitzar androstans amb major activitat.

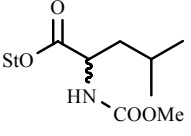
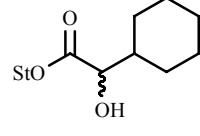
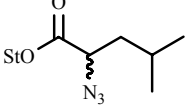
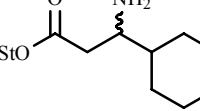
La configuració en α de carbonil

Cal recordar que anàlegs BRs amb configuració 22*R*,22*R*-diol són sempre més actius que els seus diastereòmers 22*S*,23*S*-diol. Si bé, tal i com es pot observar en els exemples de la taula següent, on l'activitat s'expressa com a $-\log[\text{dosi}_{45}(\mu\text{g})]$, això es compleix per a cadenes laterals estigmastàniques o ergostàniques, es desconeix la influència de la configuració en α de carbonil dels androstans.

Cadena lateral	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	22 <i>S</i> ,23 <i>S</i>	Cadena lateral	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	22 <i>S</i> ,23 <i>S</i>
	3.32	2.05		1.53	-
	2.57	2.08		2.36	1.17
	0.45	-		1.0	-
	2.80	1.14		3.22	< 1.0
	2.29	0.99		0.55	-

Taula 25

En aquesta tesi, s'han sintetitzat i avaluat tres parelles de compostos androstànics diastereòmers que només difereixen en la configuració en α de carbonil, així com també, un racèmic. L'activitat de tots ells, expressada com a $-\log[\text{dosi}_{45^\circ}(\mu\text{g})]$ es mostra en la taula següent:

Cadena lateral	2'R-anàleg	2'S-anàleg	Cadena lateral	2'R-anàleg	2'S-anàleg
	151 < 0.3	152 -		211 1.69	212 0.29
	146 -	145 -		racemat 213 1.02	

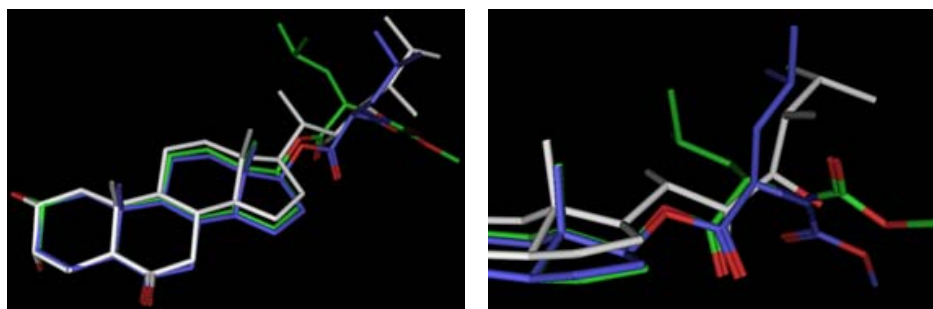
Taula 26

Es pot observar com anàlegs androstànics 2'R-funcionalitzats (**211** i **151**) mostren major activitat que els seus corresponents diastereòmers 2'S **212** i **152**, seguint així la mateixa tendència que es dona per altres tipus de BRs.

L'activitat marginal mostrada per **154** (grup donador de pont d'hidrogen en α de carbonil) es pot explicar per la seva configuració contrària a l'adequada per a una bona activitat. Malauradament, no s'han pogut comparar les dades d'activitat de la parella **153** i **154**, al no disposar-se, de moment, de **153**. De tota manera, es pretén, en un futur, sintetitzar i avaluar l'activitat d'aquest compost. S'espera que **153** mostrarà una activitat rellevant en el *RLIT*, de la mateixa manera que succeïa per alguns dels anàlegs mostrats en la taula 25, on la configuració 22*S*,23*S*-diol rendia compostos inactius mentre que els 22*R*,23*R*-diol anàlegs presentaven una activitat considerable.

Especial atenció mereix el compost racèmic **213**. El fet de ser una barreja dels dos diastereòmers (en proporció 1:1, aproximadament) provoca que l'activitat avaluada sigui força inferior a la que correspondria si es disposés del corresponent isòmer bioactiu pur. Es pretén, en futurs treballs, sintetitzar i avaluar l'activitat d'aquest, esperant-se un augment considerable en la seva activitat.

A continuació es mostren els alineaments de les parelles **151-152** i **211-212** amb la CS (**2**), observant-se millor solapament de les cadenes laterals pels anàlegs 2'R-derivats (en blau) que pels seus diastereòmers 2'S (en verd):


 Figura 37: Alineament entre la CS (**2**, blanc), **151** (blau) i **152** (verd)

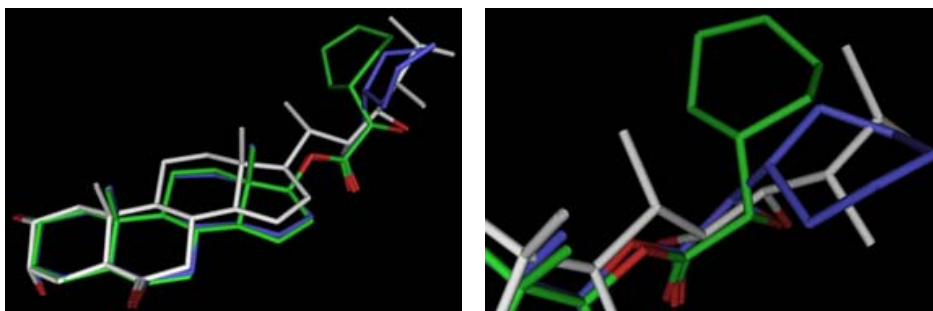


Figura 38: Alineament entre la CS (**2**, blanc), **211** (blau) i **212** (verd)

La part hidrofòbica de la cadena lateral

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, la part hidrofòbica de la cadena lateral juga un paper essencial per a l'obtenció d'anàlegs actius. Així, cal destacar la importància del tipus de substituent i la configuració del resta alquílic a C24 (taula 25).

Un altre exemple a considerar s'observa en els anàlegs androscànics amb cadenes α -aminosubstituïdes:

	<p>16 (-)</p>	<p>17 (-)</p>	<p>18 (0.81)</p>	<p>19 (1.03)</p>	<p>20 (0.28)</p>
--	----------------------	----------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

Taula 27

Es pot veure com a mesura que augmenta la llargària de la cadena lateral, s'obtenen anàlegs més actius (anàlegs **16** - **19**), sempre i quan no se superi el volum d'exclusió molecular de la part apolar terminal de la cadena lateral (anàleg **20**), fet que comporta un clar descens en l'activitat.

En aquest context, curiosament es pot observar com els anàlegs que contenen un ciclohexil en l'extrem terminal de la cadena lateral (obtinguts per síntesi sistemàtica) mostren major activitat en el *RLIT* que els que hi presenten un grup isopropílic (síntesi racional). Així, per exemple, **212** (en blau) ha resultat ser més actiu que **154** (en verd).

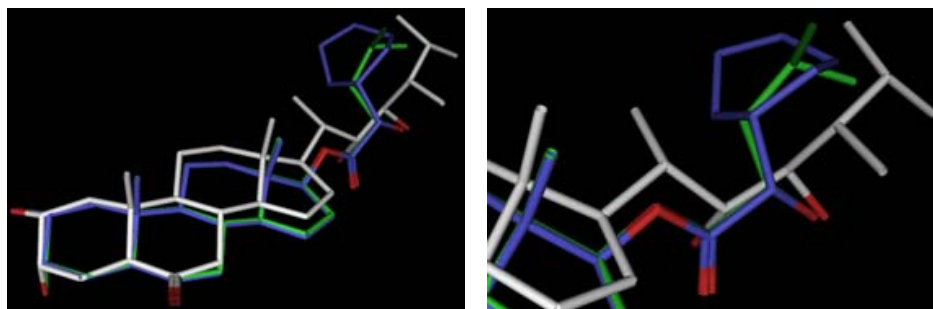


Figura 39: Alineament entre la CS (**2**, blanc), **212** (blau) i **154** (verd)

Sembla ser que el grup ciclohexil és capaç de mimetitzar millor la regió hidrofòbica de la part terminal de la cadena lateral de **2** (característica que es pot observar més clarament en la visió tridimensional del solapament). Es podria pensar que la causa de la menor activitat de **154** respecte **212** fos la manca de capacitat de l'isopropil per cobrir tot l'espai tridimensional de l'isobutil de **2**.

D'altra banda, la llibertat conformacional de l'isopropil de **154** és major que la del ciclohexil (més rígid), fet que pot dificultar la seva interacció amb el receptor degut a possibles termes entròpics.

S'observa aquí, altra vegada, la gran importància de la part hidrofòbica de la cadena lateral per a l'activitat dels BRs, obtenint-se androstans més actius amb el ciclohexil que amb l'isopropil, grup *a priori* racionalment més semblant a la CS (**2**).

Dissortadament, la no disponibilitat de **153** i, per tant, de la seva dada d'activitat, impossibilita extreure informació de la comparació **153** vs **211**, dues estructures comparables a **154** i **212**, però amb configuració 2'R-hidroxílica. Malgrat tot, en la superposició entre **153** (en verd), **211** (en blau) i la CS (**2**, en blanc) s'observa un millor alineament, fet que concorda amb la previsió que **153** hauria de mostrar una activitat rellevant en el *RLIT*:

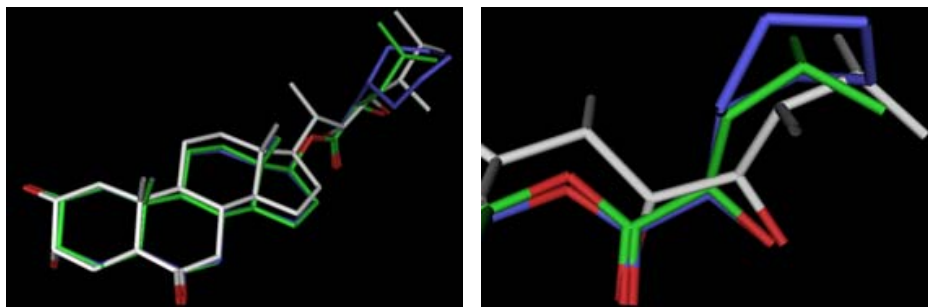


Figura 40: Alineament entre la CS (**2**, blanc), **211** (blau) i **153** (verd)

Posició de la funcionalitat polar en la cadena lateral

Per analogia amb molts dels BRs actius (estigmastànics, colestànics, ergostànics...) es va creure convenient, en iniciar aquesta tesi, la introducció d'una funcionalitat polar en α de carbonil de la cadena lateral dels anàlegs androstànics per tal de mimetitzar el diol veïnal 22*R*,23*R* de la BL(**1**).

Ara bé, **213**, on el grup aminic es troba en β de carbonil, ha mostrat una elevada activitat en el *RLIT*. Tal i com es pot observar en la figura següent, el 3'-aminosubstituent és capaç de mimetitzar el 23*R*-OH de la CS (**2**):

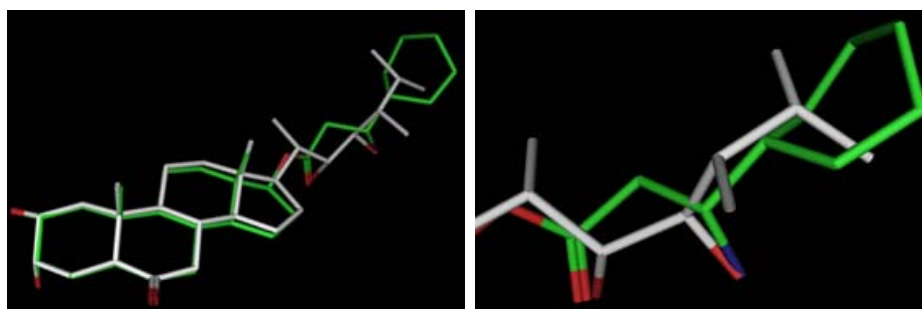


Figura 41: Alineament entre la CS (**2**, blanc) i **213** (verd)

Aquest resultat obre una porta cap a la síntesi de futurs anàlegs androstànics no solament α -substituïts sinó també on el grup polar es trobi en β del carbonil.

La influència del BOC en l'activitat BR

Cal recordar que, en realitzar un alineament flexible entre la castasterona (**2**, en blanc) i **19** (en verd), es generaven dos confòrmers prou estables energèticament. Tal i com ja s'ha comentat, la cadena lateral de **2** és mimetitzada de forma diferent per cada un dels dos confòrmers. Mentre que, en el cas del confòrmer *a*, la cadena lateral de l'androstà se superposa amb la cadena lateral de **2**, aquesta és mimetitzada per la funcionalitat ^tbutoxicarbonílica de **19** en el confòrmer *b*, fent això que l'esquelet quedi molt distorsionat.

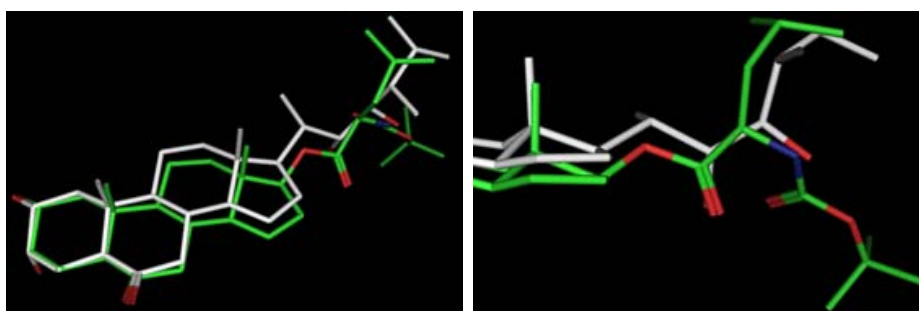


Figura 42: confòrmer *a*

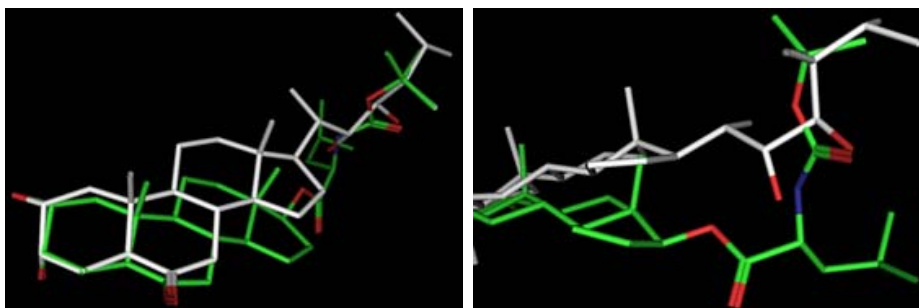


Figura 43: confòrmer *b*

Per altra banda i el que sembla més important és que, en el confòrmer *a*, el grup amino de **19** s'apropa a l'hidroxil en C23, mentre que en el confòrmer *b*, és el carbonil del ^tbutoxi de **19** el que mimetitzaria el 23R-OH. Sembla ser que la conformació que millor explicaria que aquest hidroxil actués com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor és el confòrmer *a*. Aquesta hipòtesi encaixa amb el fet que per a **151**, aquest confòrmer sigui molt més estable que no pas el *b* (apartat 5.2.4).

S'observa com el grup BOC té gran importància i influència sobre l'activitat dels compostos, però no es troba explicació a la disminució d'activitat entre **19** i **151**. Es suggereix, que aquest grup BOC podria afavorir certs aspectes de solubilitat i transport dels anàlegs a l'interior de la planta, disminuint-ne considerablement la seva polaritat. Aquesta hipòtesi podria explicar la menor activitat de **151** i la nul·la activitat de l'aminoderivat **12**. Tanmateix, no s'ha trobat cap evidència experimental d'aquesta hipòtesi.

La metodologia SHOP

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, la metodologia SHOP va permetre fer una selecció prèvia de vuit àcids carboxílics (cadena lateral) d'entre una base de dades de gairebé 7500 àcids comercials.

Amb la finalitat d'establir un ordre de prioritats per a ésser sintetitzats, es realitzaren alineaments entre la CS (**2**) i els diferents androstants amb les cadenes laterals d'àcids prèviament seleccionats. A partir dels resultats en les superposicions, s'escollí com a ordre de prioritats abordar la síntesi de **211** i **213**, així com també **212** per tal d'estudiar la influència de la configuració en α de carbonil en l'activitat BR.

Cal destacar que, si bé la metodologia SHOP emprada no permet diferenciar entre **211** i **212**, el solapament ja mostrava millor alineament per a **211** que no pas per a **212**:

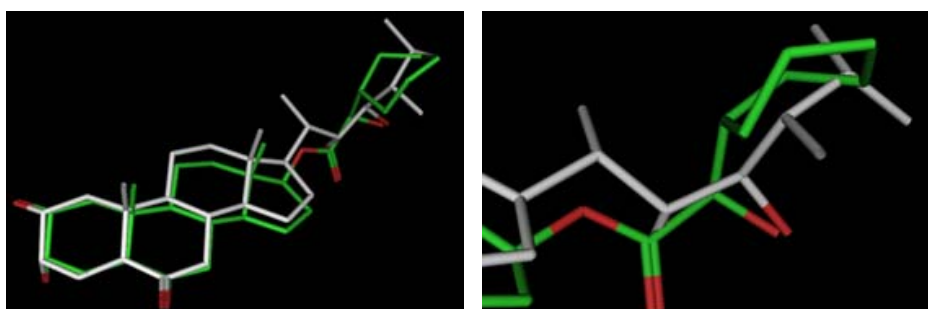


Figura 44: Alineament entre la CS (**2**, blanc) i **211** (verd)

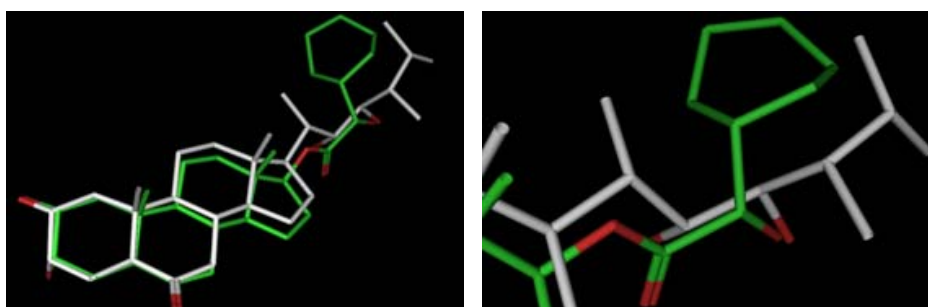


Figura 45: Alineament entre la CS (**2**, blanc) i **212** (verd)

La notable activitat mostrada pels tres anàlegs androstànics **211**, **212** i **213** validen la metodologia computacional SHOP emprada per a l'elecció dels àcids carboxílics (cadena lateral). De la mateixa manera, la menor activitat de **212** (amb menor grau de solapament amb **2**) suggereix que l'alineament dels compostos amb la CS emprant el programa MOE ha resultat ser una tècnica útil i eficient per a establir un ordre de prioritats.

S'espera, altra vegada, que quan es disposi dels corresponents anàlegs amb funcionalitat lactona a l'anell B, l'activitat augmentarà.

Així, doncs, la metodologia SHOP combinada amb alineaments dels compostos seleccionats, ha resultat ser una eina molt valuosa per al disseny de BRs actius amb cadenes laterals allunyades de les convencionals presents en els BRs naturals, resultant la seva síntesi molt més econòmica. Cal recordar que, en l'ordre de prioritats establert pels àcids carboxílics estudiats atenent els índex de similitud emprats, una vintena d'aquests àcids presentaven uns índex de similitud molt semblants i amb estructures

força diverses. Això obre una altra porta molt interessant pel disseny de noves estructures amb activitat promotora del creixement vegetal. Tanmateix, ajudarà, sens dubte, a un estudi més profund de la importància del resta hidrofòbic de la cadena lateral dels BRs en la interacció BR-receptor, en poder incorporar a l'esquelet esteroidal convenientment funcionalitzat, cadenes hidrocarbonades allunyades de la síntesi racional.

Els resultats obtinguts emprant la metodologia SHOP en el camp dels BRs amplien la validesa d'aquesta per a tot tipus de compostos bioactius: fàrmacs, fitosanitaris...

E. CONCLUSIONS

- ▶ S'ha desenvolupat una metodologia sintètica per a l'obtenció d'anàlegs androstànics de forma sistemàtica i eficient, basada en l'esterificació de Yamaguchi entre l'esquelet androstànic, degudament funcionalitzat, i diferents àcids carboxílics, cadenes laterals.

- ▶ L'elevada activitat mostrada pels compostos **19**, **211**, **212** i **213**, tot i no tenir els requeriments estructurals òptims, ha permès concloure que els anàlegs androstànics poden ser útils per a ser emprats com a promotors del creixement vegetal, presentant com a principal avantatge la seva bona relació cost sintètic-activitat.

- ▶ S'ha validat la metodologia computacional SHOP, emprada per a la selecció d'àcids carboxílics comercials com a cadenes laterals d'anàlegs androstànics. L'alineament flexible emprant el programa MOE ha resultat una tècnica útil i eficient per a establir un ordre de prioritats per a la síntesi d'anàlegs androstànics actius. Es suggereix la possibilitat d'aplicar la combinació d'ambdues metodologies per al disseny de tot tipus de compostos bioactius: fàrmacs, productes fitosanitaris...

- ▶ S'ha aprofundit en l'estudi de la interacció BR-receptor a partir de la síntesi i avaluació de l'activitat dels anàlegs BR androstànics obtinguts:
 - S'ha observat la gran importància de la part terminal de la cadena lateral, obtenint-se anàlegs més actius amb el grup ciclohexil (**212**) que l'isopropil (**154**) en l'extrem apolar d'aquesta.

 - Tant el grup protector de la funcionalitat amínica en α de carbonil de la cadena lateral (**12**, **19** i **151**) com la posició d'aquest grup (**12** i **213**) semblen jugar un paper essencial per a l'activitat d'anàlegs androstànics.

 - El fet que anàlegs amb substituent alcòxycarbonilamino (**18** i **151**), amina lliure (**213**) o hidroxil (**211** i **212**) en la cadena lateral mostrin major activitat que els fluoro (**161**), azido (**146**) o cetoderivats (**144**) corrobora la hipòtesi anterior formulada en l'equip segons la qual l'hidroxil a C23 de la BL actua com a donador de pont d'hidrogen en la interacció BR-receptor.

**F. PART
EXPERIMENTAL**

M'agradaria agrair la col·laboració de totes aquelles persones que han contribuït a dur a terme aquesta part experimental.

Al Dr. Xavier Batllori del Departament de Química Orgànica i Bioquímica de l'IQS, per la realització dels espectres de ressonància magnètica nuclear.

A la Sra. M^a Carme Meca, per la realització dels espectres d'infrarroig i a la Sra. Núria Ruiz per les mesures de rotació òptica, ambdues sota la direcció del Dr. Xavier Batllori del Departament de Química Orgànica i Bioquímica de l'IQS.

Al Dr. Fernando Lafont del *Servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Córdoba* i al Dr. Esteban Guitián de la *Unidad de resonancia magnetica de la Universidad de Santiago de Compostela*, per l'elaboració dels espectres de masses.

A la Sra. Sara Puigdengolas, al Sr. Albert Ardèvol, al Sr. Miguel Vidal i al Sr. Jaume Bosch per l'avaluació dels anàlegs sintetitzats en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (*RLIT*).

A totes les persones que han intervingut en la realització d'aquesta part experimental: tant el Sr. Lluís Quintana, el Sr. Pep Rayó i la Sra. Cristina Peinado (alumnes de TFC de l'IQS) com al Dr. Miroslav Šiša (investigador en estada postdoctoral de l'Acadèmia de Ciències de la República Txeca).

Al Dr. Ladislav Kohout de l'Acadèmia de Ciències de la República Txeca per tot el seu suport i consells rebuts durant la realització d'aquesta tesi.

O. OBSERVACIONS GENERALS

Purificació de dissolvents i reactius

En cas que no s'indiqui d'una altra manera, els dissolvents i reactius emprats en les reaccions es preparen tal i com es descriu a continuació:

Dissolvent	Purificació
Acetat d'etil sec	es destil·la sobre K_2CO_3
Acetona seca	s'agita sobre K_2CO_3 i es destil·la.
Ciclohexà sec	es destil·la sobre $CaCl_2$
Cloroform sec	es destil·la sobre $CaCl_2$
Diclorometà sec	es destil·la sobre $CaCl_2$
Dimetilformamida seca	s'agita sobre BaO i es destil·la
Metanol sec	s'agita sobre $MgSO_4$ i es destil·la.
Piridina seca	s'agita sobre CaH_2 i es destil·la
Tetrahidrofur sec	es destil·la sobre CaH_2 .
Toluè sec	es destil·la sobre P_2O_5
Trietilamina seca	es destil·la sobre CaH_2 .

Atmosfera inerta

En les reaccions realitzades sota atmosfera inerta s'ha utilitzat argó. Consisteix en omplir un globus amb argó, que es connecta al muntatge de reacció. A continuació es purga el sistema d'aire seguint la següent seqüència d'operacions: es tanca la clau de pas del globus, es fa el buit al sistema, s'obre la clau de pas del globus i es repeteix el procés un parell de vegades més.

Control de reacció

El mètode emprat pel control i seguiment de l'evolució de les reaccions, així com el criteri de puresa de les fraccions eluïdes en les cromatografies de columna per a la seva posterior recombinació ha estat la cromatografia de capa fina (CCF).

La cromatografia de capa fina es realitza utilitzant plaques plàstiques Macherey-Nagel (MN) Silicagel Polygram[®] UV₂₅₄ de 0.2 mm de gruix. Després de la seva elució, les taques es detecten, primer, per observació directa amb llum ultraviolada a 254 nm i, posteriorment, després de ser revelades mitjançant la pulverització amb H_2SO_4 al 50% seguit de calefacció a 120 °C durant 5 minuts, per observació amb llum visible i llum ultraviolada de 360 nm.

Extracció

El procés d'extracció es refereix a la dilució en H_2O del cru de reacció, extracció amb el dissolvent orgànic que s'indica en cada cas, netejat de la fase orgànica fins pH neutre, assecat sobre $MgSO_4$ anhidre i eliminació del dissolvent per destil·lació a pressió reduïda.

Separació cromatogràfica

S'usen diferents tècniques de cromatografia, que es detallen a continuació. El dissolvent o barreja de dissolvents emprats s'indiquen en cada cas.

Cromatografia convencional: columna recta emprant gel de sílice SDS de tamany de partícula 70-200 μm suspesa en un l'eluent formant una papilla que, després de ser desgasificada, s'introdueix en la columna i es compacta per gravetat. En el cas de que no s'indiqui el contrari, la relació cru/adsorbent és de 1:100.

Cromatografia flash: columna recta emprant gel de sílice SDS de tamany de partícula 0035-0.070 mm que s'introdueix en sec, es compacta per succió. A continuació, es mulla amb l'eluent i, després de carregar la barreja a separar, s'elueix sota pressió de nitrogen, a un flux de 50-100 ml/min. La relació utilitzada és de 1:50 en pes.

Per a carregar el cru a la columna hi ha dos tipus de càrregues, en *dissolució* i *seca*. En el cas de la càrrega en dissolució, el cru es dissol en la mínima quantitat de l'eluent a utilitzar en la cromatografia o menys polar que aquest, s'afegeix sobre la capa de sorra introduïda prèviament sobre la sílice mullada i es deixa que s'elueixi a la columna. Per a la càrrega seca, el cru també es dissol en el dissolvent adequat i s'afegeix sílice, amb una relació pes cru/pes sílice 1:5. S'agita a ultrasons, s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda i s'asseca al buit. Una vegada sec, es diposita sobre la capa de sorra i a continuació s'afegeix una segona capa de sorra. Finalment, un cop introduït el cru d'una manera o d'una altra, s'afegeix l'eluent i es procedeix a l'elució.

Cromatografia Lobar-Merk: S'utilitza una columna preparada Lichoprep Si 60 de gel de sílice, de tamany de partícula 0.040-0.063 mm (230-400 mesh). Per a la circulació de l'eluent s'utilitza una bomba dosificadora de polsos Duramat amb amortiguador, amb una pressió de treball de 4-6 bar. En les columnes Flash, les fraccions es recullen manualment, mentre que en les columnes rectes i Lobar es fa automàticament amb un col·lector Ultro-Rac LKB-7000.

Cromatografia preparativa: plaques plàstiques Macherey-Nagel (MN) Silicagel Polygram[®] UV₂₅₄ de 0.2 mm de gruix. El tamany de les plaques és de 20 x 20 cm. El cru es dissol en la mínima quantitat de dissolvent i s'introdueix uniformement a la part baixa de la cromatoplaca. Un cop eluïda la placa, es rasca la sílice de les zones on es detecta el producte, conegut per referència o per observació amb llum ultraviolada de 254 nm. La sílice, junt amb el producte, es macera amb un dissolvent i es deixa agitar durant 30 min o 1 hora, es filtra, s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda i es deixa assecar al buit.

Dades espectroscòpiques

Espectres d'infrarroig (IR)

Els espectres d'infrarroig (IR) s'han enregistrat en un espectrofotòmetre Nicolet Magna IR 560. Les mostres s'han preparat en film evaporat de CHCl_3 (film evap. CHCl_3) o en pastilla de KBr. Es fa constar la posició en cm^{-1} de les bandes d'absorció més significatives de cada espectre.

Espectres de ressonància magnètica nuclear de protó (¹H-RMN)

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de protó (¹H-RMN) de 300 MHz s'han registrat en un instrument Varian Gemini-300. En cada cas, s'ha fet servir el dissolvent que s'indica. La posició dels senyals es dona en valor de δ en ppm, prenent com a referència interna els senyals dels protons de (CH₃)₄Si ($\delta=0$). Entre parèntesi es fa constar el nombre de protons mesurats mitjançant integració electrònica, el tipus de senyal caracteritzat com s (singulet), d (doblet), dd (doblet de dobles), dm (doblet de multiplets), t (triplet), m (multiplet), seguida de la/es constant/s d'acoblament (J) o l'amplada de banda ($W_{1/2}$, pels multiplets) expressada en Hz i, per últim, l'assignació del senyal.

Espectres de ressonància magnètica nuclear de carboni (¹³C-RMN)

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de carboni (¹³C-RMN) s'han realitzat en un aparell Varian Gemini-300 (75 MHz). En cada cas s'indica el dissolvent utilitzat. Els espectres es registren amb desacoplament de protó (WALTZ-16) i amb acoplament de protó (gated ¹H-decoupling) i la multiplicitat dels senyals es determina mitjançant l'ús de la seqüència de polsos DEPT. (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer). La posició dels senyals es dona en valor de δ ppm, prenent com a referència interna el senyal dels carbonis de (CH₃)₄Si ($\delta=0$), seguit de la multiplicitat del senyal s (singulet), d (doblet), t (triplet) i q (quadruplet) i la seva assignació.

Espectres de doble ressonància (HETCOR)

Els espectres de doble ressonància, com l'HETCOR, s'han enregistrat en un instrument Varian Gemini-300.

Espectre de masses d'impacte electrònic (EM-IE) i espectre de masses de ionització química d'alta resolució (EM-IQ)

Els EM-IE i els EM-IQ han estat enregistrats en instruments Hewlett-Packard 5995-A i 5988-A, respectivament. En ells, s'indica la relació massa/càrrega dels fragments més significatius i l'abundància expressada en tant per cent respecte el pic base.

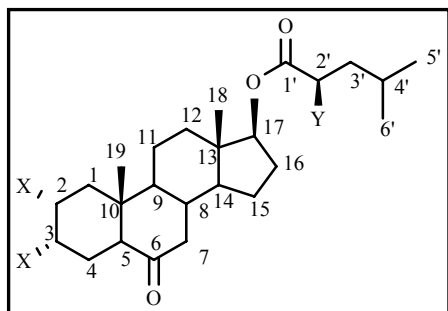
Constants físiques

Punt de fusió

S'ha realitzat amb un instrument Stuart Scientific SMP3 amb un bany d'aire, en capil·lar obert i sense correcció posterior.

Nomenclatura

Si bé per a molts anàlegs androstànics s'ha emprat la nomenclatura IUPAC, en alguns casos s'ha modificat l'ordre dels substituents amb la finalitat d'homogenitzar els noms dels diferents compostos esteroidals.



1. PREPARACIÓ DE L'ESQUELET ANDROSTÀNIC

1.1. Intent de síntesi d'anàlegs BRs androscànics amb funcionalitat 2,3-dicetona

1.1.1. Intent de síntesi d'anàlegs 2,3-diceto a partir de 17 β -hidroxi-5 α -androsc-2-en-6-ona (**25**).

Es dissolen **A** mg/mmol de **25** en **B** ml de DMSO i s'addicionen **C** ml d'HBr (45%). La barreja es deixa agitant a **D** °C durant **E** h. S'afegeix dissolució aquosa saturada de NaHCO₃ fins a pH > 7 i s'extreu amb AcOEt. La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se **F** mg d'un cru que correspon a **G**.

Exp.	A mg/mmol	B ml DMSO	C ml HBr 45%	D °C	E h	F mg	G 25 : 50
1	100/0.35	2	0.20	100	16	52	cc
2	30/0.10	5	0.20	t.a.	5	26	60 : 40
3	30/0.10	5	0.20	100	20	25	cc on es detecta 50
4	30/0.10	5	0.20	t.a.	20	31	0 : 100

- Dades espectroscòpiques més significatives de 17 β -hidroxi-5 β -androsc-2-en-6-ona (**50**)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.68-5.67 (2H, m, H-C3 + H-C2), 3.66 (1H, t, J = 8.5 Hz, α H-C17), 0.86 (3H, s, 19-CH₃), 0.73 (3H, s, 18-CH₃).

1.1.2. Intent de síntesi d'anàlegs 2,3-diceto a partir de 2 ξ ,3 ξ -androscans (**52**).

1.1.2.1. Síntesi de 17 β -acetoxi-5 α -androsc-2-en-6-ona (**51**)

Es dissolen 510 mg (1.77 mmol) de 17 β -hidroxi-5 α -androsc-2-en-6-ona (**25**) en 2 ml d'anhidrid acètic i s'addicionen 145 mg de 4-(pirrolidin-1-il)piridina dissolts en 1 ml de Py seca. Es deixa agitant en atmosfera d'argó, a t.a. i protegit de la llum. El seguiment de la reacció es realitza per CCF (Cy/AcOEt 2:1) i aquesta es para al cap de 2 h. S'elimina el dissolvent i es redissol el cru en AcOEt. La fase orgànica es renta amb dissolucions aquoses saturades de NaHCO₃ i NaCl. S'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se 560 mg (1.70 mmol) d'un

sòlid blanc pur que correspon a 17 β -acetoxi-5 α -androst-2-en-6-ona (**51**, rdt = 96%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.68-5.66 (1H, m, H-C3), 5.59-5.57 (1H, m, H-C2), 4.64 (1H, t, $J = 8.2$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 2.35 (1H, dd, $J = 3.9$ i 12.6 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 2.05 (3H, s, CH_3COO), 0.80 (3H, s, 18- CH_3), 0.72 (3H, s, 19- CH_3).

1.1.2.2. Síntesi de 17 β -acetoxi-2 ξ ,3 ξ -dihidroxi-5 α -androstan-6-ona (**52**).

Es dissolen 560 mg (1.69 mmol) de 17 β -acetoxi-5 α -androst-2-en-6-ona (**51**) en 50 ml de $t\text{-BuOH}$, 15 ml de THF i 5 ml d' H_2O . S'hi afegeixen 6.5 g (55.48 mmol) de NMO i 31 mg (0.12 mmol) de OsO_4 . La reacció es manté agitant en condicions d'atmosfera inerta i a t.a. Es segueix la reacció per CCF (Cy/AcOEt 2:1). Al cap de 12 h no es detecta producte de partida i es para la reacció afegint 50 ml d'una dissolució aquosa saturada de bisulfit sòdic, que es deixa agitant durant 1 h. S'eliminen els dissolvents orgànics a pressió reduïda per evitar emulsions en la posterior etapa d'extracció. S'hi afegeixen 100 ml d' H_2O i s'extreu amb 6 x 150 ml de AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb 3 x 150 ml d'una solució aquosa saturada de clorur sòdic. Les fases orgàniques s'assequen sobre MgSO_4 anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 596 mg (rdt = 97%) d'una barreja dels dos isòmers 2 α ,3 α -diol (**52a**)/2 β ,3 β -diol (**52b**) en una proporció 75:25, les dades espectroscòpiques més significatives dels quals són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.65 (2H, t, $J = 8.2$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.06 (2H, m, H-C3), 3.80-3.76 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$ (**52a**)), 3.68-3.61 (1H, m, $\alpha\text{H-C2}$ (**52b**)), 2.70 (2H, dd, $J = 3.0$ i 12.3 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 2.32 (2H, dd, $J = 4.5$ i 13.0 Hz, $\beta\text{H-C7}$), 1.00 (3H, s, 19- CH_3 (**52b**)), 0.79 (6H, s, 18- CH_3), 0.78 (3H, s, 19- CH_3 (**52a**)).

1.1.2.3. Intent d'obtenció de la funcionalitat 2,3-dicetona (**53**) emprant NBS

Es dissolen **A** mg/mmol de 17 β -acetoxi-2 ξ ,3 ξ -dihidroxi-5 α -androstan-6-ona (**52**) en **B** ml de CCl_4 i s'addicionen **C** ml/mmol de Py i 58 mg (0.28 mmol) de NBS. Es deixa agitant la reacció a **D** °C durant **E** h. Es renta el cru amb H_2O , s'extreu amb CHCl_3 i s'assequen les fases orgàniques sobre MgSO_4 anhidre. S'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda.

Exp.	A mg/mmol	B ml CCl_4	C ml/mmol Py	D °C	E h
1	50/0.14	3	0.01/0.14	70	4
2	50/0.14	3	-	t.a.	5
3	50/0.14	5	0.01/0.14	t.a.	72
4	1837/5.04	108	-	40	25
5	100/0.30	3	0.02/0.27	80	96

En cap de les 5 experiències realitzades es detecta, mitjançant CCF comparativa de referència (veure apartat 1.1.2.5.) i $^1\text{H-RMN}$, la formació majoritària de la dicetona d'interès.

Per tal d'identificar algun dels compostos formats, el cru obtingut en l'experiència 4 es purifica mitjançant cromatografia flash (SiO₂, Cy/AcOEt (1:1)) seguit de cromatografia preparativa (SiO₂, Cy/AcOEt (1:6)), aïllant-se 38 mg de 17β-acetoxi-7ξ-bromo-2ξ,3ξ-dihidroxi-5α-androstan-6-ona (**68**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl₃): 3454, 3165, 2945, 1774, 1711, 1245, 1183.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.69 (1H, t, J = 8.5 Hz, αH-C17), 4.17 (1H, m, H-C7), 4.08 (1H, m, H-C3), 3.82-3.73 (1H, m, H-C2), 3.66 (1H, dd, J = 3.6 i 12.6 Hz, αH-C5), 2.05 (3H, s, OCOCH₃), 0.82 (3H, s, 18-CH₃), 0.77 (3H, s, 19-CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 205.1/s C6, 170.9/s OCOCH₃, 81.9/d C17, 68.1/d C3, 68.0/d, C2, 57.3/d C7, [47.0/d + 46.0, C9 + C14], 44.5/d C5, 42.8/s C13, 42.7/s C10, 40.0/t C1, 39.7/d C8, 35.8/t C12, 27.2/t C16, 26.4/t C4, 22.2/t C15, 21.2/q OCOCH₃, 20.3/t C11, 13.3/q C19, 12.5/q C18.

HETCOR ¹H-¹³C (300 MHz – 75 MHz, CDCl₃): 4.69 (αH-C17)-81.9 (C17), 4.17 (H-C7)-57.3 (C7), 4.08 (H-C3)-68.1 (C3), 3.72 (H-C2)-68.0 (C2), 3.66 (H-C5)-44.5 (C5), 2.05 (OCOCH₃)-21.2 (OCOCH₃), 1.79 (H-C12)-35.8 (C12), 1.76 (H-C1)-40.0 (C1), [1.60 + 1.77, (H-C9 + H-C14)]-[47.0 + 46.0, (C9 + C14)], 1.45 (H-C15)-22.2(C15), 1.28 (H-C8)-39.7 (C8), 0.72 (H-C18)-12.5 (C18), 0.68 (H-C19)-13.3 (C19).

EM-AR: trobat 443.1298 [M]⁺, (calc. 443.1256, C₂₁H₃₁BrO₅)

EM-IE: 426 ([M-OH]⁺, 6), 425 ([M-H₂O]⁺, 25), 364 (31), 363 (50), 347 (76), 346 (54), 345 (100), 329 (35), 327 (62), 305 (32), 303 (49), 287 (53), 285 (71), 269 (32), 267 (38), 100 (56).

1.1.2.4. Intent d'obtenció de la funcionalitat 2,3-dicetona (**53**) emprant polivinil-PCC

Es dissolen 100 mg (0.27 mmol) de 17β-acetoxi-2ξ,3ξ-dihidroxi-5α-androstan-6-ona (**52**) en 3 ml CH₂Cl₂ i 5 ml de Cy. S'addicionen 927 mg (3.24 mmol) de polivinil-PCC (3.5 mmol/g resina) i es deixa agitant a 80 °C durant 3 dies. Tant per CCF (Cy/AcOEt 1:5) com per ¹H-RMN, no es detecta avanç de la reacció i només es recupera producte de partida **52**.

1.1.2.5. Intent d'obtenció de la funcionalitat 2,3-dicetona (**53**) emprant PCC

Es dissolen 398 mg de **52** (1.09 mmol) en 60 ml CH₂Cl₂, s'hi addicionen 932 mg (4.4 mmol) de PCC dissolts en 100 ml CH₂Cl₂ i es deixa agitant en atmosfera inerta i t.a. durant 6 h. Es renta amb dissolució aquosa saturada de NaHCO₃ i NaCl i s'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda i s'obtenen 524 mg d'un cru que conté elevades quantitats de compostos cromats. S'intenta purificar mitjançant cromatografia flash (SiO₂, Cy/AcOEt, 3:2), aconseguint-se aïllar només una fracció impura de 17 mg on es detecta la presència de 17β-acetoxi-5α-androstan-2,3,6-triona (**53**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.65 (1H, t, J = 8.4 Hz, αH-C17), 2.79 (1H, dd, J = 3.0 i 12.9 Hz, αH-C5), 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 0.72 (3H, s, 19-CH₃).

1.2. Síntesi d'anàlegs BRs androscànics amb funcionalitat 2,3-difluor (91 i 92)

1.2.1. Intent de síntesi de 2 α ,3 α -difluoroandrostans emprant difluorur de *p*-iodotoluè

Es dissolen A mg/mmol de 17 β -hidroxi-5 α -androst-2-en-6-ona (**25**) en 2 ml de CH₂Cl₂ i s'addiciona B g/mmol de difluorur de *p*-iodotoluè (**89**) dissolts en 3 ml de Et₃N-3HF i 1 ml de CH₂Cl₂ en atmosfera inerta i a -78 °C. Es deixa agitar la reacció a D °C durant E h.

Exp.	A mg/mmol	B mg/mmol	D °C	E h
1	100/0.35	118/0.46	0	2
2	25/0.09	60/0.23	0	48
3	25/0.09	60/0.23	t.a.	48

El cru de reacció s'aboca sobre dissolució aquosa saturada de Na₂CO₃ i s'extreu amb AcOEt. La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. Tant per CCF (AcOEt/THF 4:1) com per ¹H-RMN, no es detecta en cap cas evolució de la reacció, recuperant-se en les tres experiències el producte de partida **25**.

1.2.2. Síntesi de 2 ξ ,3 ξ -difluoro-17 β -acetoxi-5 α -androstan-6-ona emprant difluorur de xenon

Es dissolen 1145 mg (3.46 mmol) de 17 β -acetoxi-5 α -androst-2-en-6-ona (**51**) en 58 ml d'una barreja éter/CH₂Cl₂ 1:1 i s'addicionen sobre 880 mg (5.19 mmol) de XeF₂. S'afegeix una dissolució de 300 mg de BF₃-eterat en 25 ml de benzè i es deixa agitant a t.a. i en atmosfera d'argó durant 14 h. S'elimina l'èter i el benzè mitjançant destil·lació a pressió reduïda i s'addiciona CHCl₃. La fase orgànica es renta amb NaHCO₃ i l'aquosa s'extreu amb CHCl₃. S'ajunten les fases orgàniques, s'assequen sobre MgSO₄ anhidre i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se 1643 mg de cru de reacció. Després de realitzar dues cromatografies flash (Cy/AcOEt, 4:1 i Cy/AcOEt, 8:1) i vàries recristal·litzacions, es recuperen 92 mg de **51** (8%) sense reaccionar i diverses fraccions de compostos difluorats. Aquestes fraccions contenen barreges dels 8 isòmers possibles de 2 ξ ,3 ξ -difluoro-17 β -acetoxi-5 ξ -androstan-6-ona, els quals no ha estat possible diferenciar i separar per CCF.

δ (ppm)	Acoblament	J (Hz)	Assignació
5.00	dm	51	H-C2 i H-C3 de compostos amb funcionalitat 2 ξ ,3 ξ -difluor
4.92	dm	45	
4.62	dm	45	
1.07	s	-	19-CH ₃ de 2 β ,3 β i 2 β ,3 α -difluors amb els anells A/B <i>trans</i>
1.08	s	-	
0.85	s	-	19-CH ₃ de 2 β ,3 β i 2 β ,3 α -

δ (ppm)	Acoblament	J (Hz)	Assignació
0.84	s	-	difluors amb els anells A/B <i>cis</i>
0.71	s	-	19-CH ₃ de 2 α ,3 β i 2 α ,3 α -
0.72	s	-	difluors amb els anells A/B <i>trans</i>

1.3. Síntesi d'anàlegs BRs androstrànics amb funcionalitat 2 α ,3 α -diol

1.3.1. Síntesi de 2 α ,3 α ,17 β -trihidroxí-5 α -androstan-6-ona (**26**)

Es dissolen 1130 mg (3.91 mmol) de 17 β -hidroxí-5 α -androstr-2-en-6-ona (**25**) en 127 ml de *t*-BuOH, 40 ml de THF i 14 ml d'H₂O. S'hi afegeixen 15 g de NMO (128 mmol) i 1 ml d'una solució de OsO₄ en *t*-BuOH (100 mg de OsO₄ (0.39 mmol) en 1 ml de *t*-BuOH). La reacció es manté agitant en condicions d'atmosfera inerta i a t.a. Es segueix la reacció per CCF (AcOEt/THF 4:1). Al cap de 7.5 h no es detecta producte de partida i es para la reacció afegint 100 ml d'una dissolució aquosa saturada de bisulfit sòdic, que es deixa agitant durant 1 h. S'eliminen els dissolvents orgànics a pressió reduïda per evitar emulsions en la posterior etapa d'extracció. S'hi afegeixen 200 ml d'H₂O i s'extreu amb 5 x 300 ml de AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb dissolucions aquoses saturades de clorur sòdic. Les fases orgàniques s'assequen sobre MgSO₄ anhidre, s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda i s'obtenen 1345 mg de cru. Per ¹H-RMN es detecta, per comparació amb mostres independents, la presència de 2 α ,3 α ,17 β -trihidroxí-5 α -androstan-6-ona (**26**), 2 β ,3 β ,17 β -trihidroxí-5 α -androstan-6-ona (**94**) i 2 β ,3 β ,17 β -trihidroxí-5 β -androstan-6-ona (**95**), amb una relació **26/94/95** de 70:30:<1.

La purificació d'aquest cru es troba detallada en l'apartat 1.3.3.

1.3.2. Dihidroxilació asimètrica de Sharpless

Es dissolen 349 mg (1.21 mmol) de 17 β -hidroxí-5 α -androstr-2-en-6-ona (**25**) en 20 ml de THF. Es prepara una solució de 1.60 g de NMO (13.66 mmol), 204 mg (0.408 mmol) de DHQD-PHN i 1 ml d'una solució de OsO₄ en *t*-BuOH (10.3 mg de OsO₄ (0.04 mmol) en 1 ml de *t*-BuOH) en 15 ml de *t*-BuOH, 5 ml de THF i 3 ml d'H₂O. S'afegeix la solució de **25** sobre la solució de NMO/OsO₄/DHQD-PHN, prèviament refredada a 0 °C. La reacció es manté agitant a 0 °C en condicions d'atmosfera inerta. Se segueix la reacció per CCF (AcOEt/THF 4:1). Al cap de 20 h no es detecta producte de partida i es para la reacció afegint 25 ml d'una dissolució aquosa saturada de bisulfit sòdic, que es deixa agitant durant 1 h. S'eliminen els dissolvents orgànics a pressió reduïda per evitar emulsions en la posterior etapa d'extracció. S'hi afegeixen 50 ml d'H₂O i s'extreu amb 5 x 75 ml de AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb 3 x 75 ml d'una solució aquosa saturada de clorur sòdic. Les fases orgàniques s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda obtenint-se 356 mg d'un cru compost per **26**, **94** i **95**, amb una relació 79.1:20.3:0.6 (valorat per ¹H-RMN) i un rdt del 58% des de **25**. Aquesta mescla s'intenta purificar per cromatografia flash AcOEt/Cy 4:1 sense èxit.

1.3.3. Purificació del cru de la reacció 1.3.1.

1.3.3.1. Intent d'isomerització del trihidroxiandrostà **94** a **95**.

Es dissolen 178 mg de cru de la reacció 1.3.1. en THF/MeOH (99.5:0.5) i s'hi afegixen 32 ml d'una solució de 4.44 g de NaOH en 55 ml de MeOH/H₂O (10:1). El seguiment es fa per CCF (AcOEt/THF 4:1). Es para la reacció al cap de 46 h sense detectar cap evolució significativa per CCF.

1.3.3.2. Mitjançant cromatografia flash i Lobar® (AcOEt/THF 4:1)

Es purifiquen 210 mg de cru de la reacció 1.3.1. mitjançant cromatografia flash, amb una relació cru/silice 1:350, seguida de cromatografia Lobar® fent servir com a eluent AcOEt/THF 4:1. S'obtenen 49 mg de 2β,3β,17β-trihidroxi-5α-androstan-6-ona (**94**), amb un rdt del 15% des de **25**, 41 mg d'una mescla de **26** i **94** amb una relació molar de 83:17, quantificada per ¹H-RMN, amb un rdt del 13% des de **25** i 130 mg de 2α,3α,17β-trihidroxi-5α-androstan-6-ona (**26**), amb un rdt del 41% des de **25**.

1.3.3.3. Mitjançant cromatografia flash (AcOEt/THF 8:1)

368 mg del cru de la reacció 1.3.1. es purifica per cromatografia flash (SiO₂/substrat (150:1), AcOEt/THF (8:1)). Es realitza càrrega seca del cru de reacció, el dissolvent amb el qual es dissol el cru és MeOH. Les fraccions obtingudes es descriuen a continuació.

Fraccions	Quantitat (mg)	Composició
F1	53	25 + imp.
F2	14	94
F3	89	94 (26%) + 26 (74%) *
F4	197	26
F5	4	c.c.

* Determinat per ¹H-RMN. rdt columna: 97%.

▪ La fracció 2 s'identifica com a 2β,3β,17β-trihidroxi-5α-androstan-6-ona (**94**) amb un rdt del 4%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.04 (1H, m, αH-C3), 3.68 (1H, dd, J = 8.5 i 8.5 Hz, αH-C17), 3.63 (1H, m, αH-C2), 2.33 (1H, dd, J = 4 i 12 Hz, αH-C5), 2.22 (1H, dd, J = 3 i 12 Hz, βH-C7), 2.14 (1H, dd, J = 3 i 14 Hz, αH-C7), 1.00 (3H, s, 19-CH₃), 0.75 (3H, s, 18-CH₃).

▪ La fracció 3 s'identifica com a una mescla de 2β,3β,17β-trihidroxi-5α-androstan-6-ona (**94**) i 2α,3α,17β-trihidroxi-5α-androstan-6-ona (**26**) (26:74, quantificat per ¹H-RMN) amb un rdt del 26%.

▪ La fracció 4 s'identifica com a 2α,3α,17β-trihidroxi-5α-androstan-6-ona (**26**) amb un rdt del 59%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.05 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 3.76 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 3.69 (1H, dd, $J = 8.5$ i 8.5 Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 2.69 (1H, dd, $J = 2.5$ i 12.5 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 2.31 (1H, dd, $J = 4.5$ i 12.5 Hz, $\beta\text{H-C7}$), 0.77 (3H, s, 19- CH_3), 0.75 (3H, s, 18- CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): 211.4/s C6, 81.5/d C17, [68.4/d + 68.3/d, C2 + C3], 53.9/d C9, 51.4/d C14, 50.8/d C5, 46.3/t C7, 43.4/s C13, 42.6/s C10, 40.3/t C1, 37.8/d C8, 36.3/t C12, [26.4/t + 23.3/t, C4 + C15 + C16], 21.0/t C11, 13.7/q C19, 11.2/q C18.

1.3.3.4. Mitjançant recristal·lització i cromatografia flash (AcOEt/THF 8:1)

1.063 g del cru de la reacció 1.3.1. es purifiquen mitjançant recristal·lització amb EtOH, aïllant-se 276 mg (0.86 mol) de **26** amb una elevada puresa i amb un rdt de recristal·lització de 25%. S'identifica mitjançant espectres de $^1\text{H-RMN}$. Per augmentar el rdt en producte aïllat, 616 mg de les aigües mares es purifiquen per cromatografia flash (SiO_2 , AcOEt/THF (8:1)). Es realitza càrrega seca d'aquest cru. Les fraccions obtingudes es descriuen a continuació.

Fraccions	Quantitat (mg)	Composició	rdt (%)
F1	54	25 + imp.	-
F2	17	94	1
F3	126	94 (75%) + 26 (25%) *	11
F4	467	26	91
F5	46	c.c.	-

* Determinat per $^1\text{H-RMN}$.

El compost d'interès **26** s'ha aïllat amb un rdt global del 66%.

1.3.4. Intent de protecció del diol **26** emprant MeCOMe

Es dissolen 100 mg (0.31 mmol) de **26** en 40 ml d'acetona i s'hi afegeix 1 mg (0.006 mmol) de PTSA. Es deixa agitar a t.a. Al cap de 24 h s'afegeixen 1.5 mg (0.009 mmol) de PTSA per accelerar la reacció. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/THF 4:1). Es para la reacció a les 72 h ja que la reacció quasi no ha evolucionat. S'elimina l'acetona a pressió reduïda i, per $^1\text{H-RMN}$, es verifica que només hi ha producte de partida **26**.

1.3.5. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -isopropilidendioxi-17 β -hidroxi-5 α -androstan-6-ona (**96**) emprant DMP

Es dissolen 100 mg (0.31 mmol) de **26** en 24 ml de DMP i s'hi afegeixen 28 mg (0.16 mmol) de PPTS. Es deixa agitar en atmosfera inerta a t.a. durant 28 h. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/THF 4:1). S'evapora tot el dissolvent a pressió reduïda, rendint un cru de reacció de color marró fosc. S'hi afegeixen 40 ml de AcOEt i es renta aquesta fase orgànica amb 2 x 20 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO_3 i, seguidament, amb 2 x 20 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO_4 anhidre i s'evapora el AcOEt a pressió reduïda. S'obtenen 137 mg de **96** amb una elevada puresa i amb rdt quantitatiu, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 3472, 2951, 1710, 1380, 1367, 1242, 1215, 1057.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.28 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 4.11 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 3.68 (1H, t, $J=8.2$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 2.54 (1H, dd, $J=12.6$ Hz, 3.8 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 2.36 (2H, dd, $J=4.3$ i 13.0 Hz, $\beta\text{H-C7}$), 0.74 (3H, s, 18- CH_3), 0.69 (3H, s, 19- CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): 210.8/s C6, 107.9/s $\text{CH}_3\text{-C}(\text{O})_2$, 81.5/d C17, [72.3/d + 72.1/d, C2 + C3], 53.5/d C9, [51.6/d + 51.4/d, C5 + C14], 46.5/t C7, 43.3/s C13, 42.5/s C10, 41.2/t C12, 37.6/d C8, 36.2/t C4, 30.4/t C1, [28.7/q + 28.6/q, $(\text{CH}_3)_2\text{-acetal}$], 23.3/t C16, 22.7/t C15, 20.9/t C11, 12.8/q C19, 11.1/q C18.

2. INTENT DE SÍNTESI DE LA “CASTASTERONA ANDROSTÀNICA”

2.1. Síntesi d'epòxids racèmics

2.1.1. Obtenció de compostos insaturats

2.1.1.1. Síntesi del (E)-4-metil-2-pentenoat d'etil (**114**)

A una suspensió de 15 g (0.37 mol) de NaH (60%) en 300 ml de THF, a 0 °C i sota atmosfera d'argó, s'addiciona, gota a gota, 100 ml (0.49 mmol) de trietil fosfonoacetat (**116**, 97%). S'afegeix, gota a gota, una dissolució de 46 ml (0.49 mmol) d'isobutiraldehid (**115**, 98%). Es deixa agitant durant 4 hores a 0 °C. Posteriorment s'addicionen, gota a gota, 200 ml d' H_2O , s'extreu amb AcOEt i s'asseca sobre MgSO_4 anhidre. Es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. El cru es destil·la a pressió reduïda (100 °C, 8 mmHg) obtenint 58.34 g de **114** (rdt = 83%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 6.94 (1H, dd, $J = 6.6$ i 15.6 Hz, H-C3), 5.77 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-C2), 4.18 (2H, q, $J = 7.2$ MHz, OCH_2CH_3), 2.45 (1H, m, H-C4), 1.29 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 1.06 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-C5 + H-C6)

2.1.1.2. Síntesi de l'àcid 4-metil-2-pentenoic (**122**)

Es dissolen 5.0 g (35 mmol) de **114** en 15 ml de MeOH i s'addicionen 8.76 g (63.4 mmol) de K_2CO_3 en 5 ml d' H_2O . Es porta la mescla a reflux durant 5 h. S'extreu amb Et_2O , s'acidula la fase aquosa amb HCl fins pH < 2 i s'extreu altra vegada. S'ajunten les fases orgàniques, s'assequen sobre MgSO_4 anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 3.82 g d'un cru que correspon majoritàriament a l'àcid **122** (rdt = 96%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.06 (1H, dd, $J = 6.6$ i 15.9 Hz, H-C3), 5.77 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-C2), 2.49 (1H, m, H-C4), 1.08 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-C5 + H-C6)

2.1.1.3. Síntesi de (E)-4-metil-2-pentenoat de metil (**123**)

Es fan bombollejar 9.40 mmol de CH_2N_2 (obtinguts en barrejar 2.87 g de Diazald, 20 ml d'EtOH i 1 ml de dissolució aquosa saturada de NaOH) en una dissolució d'1.0 g (8.8 mmol) de l'àcid **122** en 20 ml de CH_2Cl_2 a 0 °C. S'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se quantitativament **123**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 6.95 (1H, dd, $J = 15.6$ Hz, 6.6 Hz, H-C3), 5.75 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-C2), 3.73 (3H, s, OCH_3), 2.46 (1H, m, H-C4), 1.06 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-C5 + H-C6)

2.1.1.4. Síntesi del crotonat de 2'S-metilbutil (**120**)

Es dissolen 13.03 g (151 mmol) d'àcid crotonic (**121**) i 13.30 g (151 mmol) de 2S-metil-1-butanol en 20 ml de Cy. S'addicionen 1.5 ml d' H_2SO_4 98% i es porta la dissolució a reflux (Dean-Stark) durant 12 h. S'extreu amb AcOEt, es renta la fase orgànica amb dissolució aquosa saturada de NaHCO_3 i NaCl, s'asseca sobre MgSO_4 anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 15.12 g d'un cru que correspon majoritàriament a **120** (rdt = 64%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 6.97 (1H, dq, $J = 6.0$ i 15.6 Hz, H-C3), 5.86 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-C2), [4.00 (1H, dd, $J = 6.6$ i 10.8 Hz), 3.92 (1H, dd, $J = 6.6$ i 10.8 Hz), H-C1'], 1.87 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-C4), 1.75 (1H, m, H-C2'), 1.29 (2H, m, H-C3'), 0.93 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-C4')

2.1.1.5. Síntesi de crotonat de benzil (**119**)

Es dissolen 5.40 g (62.7 mmol) d'àcid crotonic (**121**) en 100 ml de CH_2Cl_2 i es refreda a 0 °C. S'addicionen 10.16 g d'alcohol benzílic (93.9 mmol), 760 mg (6.2 mmol) de DMAP i 14.71 g (71 mmol) de DCC i es deixa agitant a aquesta temperatura durant 24 h. Es filtra sobre cotó per eliminar les urees i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. El sòlid obtingut es suspèn en una dissolució d'èter de petroli/èter etílic 10:1, es torna a filtrar i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 29.4 g d'un cru que es purifica mitjançant cromatografia flash (SiO_2 , Cy/AcOEt 40:1), aïllant-se 7.20 g (40.9 mmol) de **119** (rdt = 65%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.40-7.26 (5H, m, aromàtics), 7.02 (1H, dq, $J = 6.6$ i 15.6 Hz, H-C3), 5.92 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-C2), 5.17 (2H, s, H-C1'), 1.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-C4).

2.1.2. Epoxidacions de compostos insaturats

2.1.2.1. Síntesi de l'àcid 2,3-epoxibutanoic (**124**)

Es dissolen **A** g/mmol d'àcid crotonic (**121**, 98%), **B** g/mmol de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en **C** ml d' H_2O . S'escalfa el sistema a 60 °C i s'ajusta el pH a 6.2 mitjançant l'addició d'una dissolució aquosa de KOH 1N i d'una dissolució d' HNO_3 1N. Posteriorment, s'addicionen **D** ml (mmol) d' H_2O_2 (30%). Es deixa agitant durant **E** hores, mantenint el pH entre 5.8 i 6.8. Finalment, s'acidula el cru a un pH < 2, mitjançant l'addició, gota a gota, d'una dissolució d' H_2SO_4 (50%) saturat amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. S'extreu amb èter etílic,

s'ajunten les fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. Es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen **F** g d'uns cristalls blancs (identificats per ¹H-RMN com a **124**), amb una conversió **G**%.

Exp	A (g/mmol)	B (g/mmol)	C (ml)	D (ml/mmol)	E (h)	F (g)	G (%)
1	3.59/40.1	2.04/6.2	120	5.0/48.6	3	0.78	33
2	1.81/21.1	1.04/3.1	70	2.5/24.4	23	0.73	38

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.28 (1H, dq, J = 1.8 i 5.1 Hz, H-C3), 3.23 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-C2), 1.43 (3H, d, J = 5.1 Hz, H-C4).

2.1.2.2. Síntesi de l'àcid (E)-2,3-epoxi-4-metilpentanoic (**129**) via epoxidació de **122**

Es dissolen 1.50 g (8.69 mmol) de MCPBA i 500 mg (4.38 mmol) de **122** en 10 ml de CH₂Cl₂. La barreja s'escalfa a reflux, sota atmosfera d'argó, durant 12 hores. Es concentra eliminant parcialment el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, es filtra i el precipitat es renta amb CH₂Cl₂. S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb dissolucions de Na₂CO₃ al 5%, H₂O i dissolució aquosa saturada de NaCl. S'assequen sobre Na₂SO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se 478 mg d'un cru complex on el producte de partida **122** n'és el compost majoritari, sense detectar-se formació de **129**.

2.1.2.3. Síntesi de 2,3-epoxibutanoat de metil (**126**)

S'addicionen 12.8 g (52 mmol) de MCPBA (70%) a una dissolució de 4.81 g (48 mmol) de crotonat de metil (**125**) en 35 ml de CH₂Cl₂. Es deixa agitant a reflux durant 24 hores. El sòlid blanc es filtra i la fase orgànica es renta successivament amb una dissolució aquosa de 3×50 ml de NaHCO₃(5%), 50 ml d'H₂O i 50 ml d'una dissolució aquosa saturada de NaCl. Finalment, la fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 4.73 g (40.7 mmol) d'un oli incolor que correspon majoritàriament a **126** (rdt = 85%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.78 (3H, s, -COOCH₃), 3.25 (1H, qd, J = 5.1 Hz, 2.1 Hz, H-C3), 3.20 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-C2), 1.40 (3H, d, J = 5.1 Hz, H-C4)

2.1.2.4. Síntesi de 2,3-epoxibutanoat de benzil (**127**)

S'addicionen 320 mg (1.8 mmol) de MCPBA (100%) a una dissolució de 120 mg (0.68 mmol) de **119** en 5 ml de CH₂Cl₂ i es porta a reflux. Transcorregudes 24 h, per CCF (Cy/AcOEt 5:1) s'observa que la reacció no avança, el sòlid blanc es filtra i la fase orgànica es renta successivament amb dissolucions aquoses de NaHCO₃ 5%, H₂O i saturada de NaCl. Finalment, s'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 131 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (SiO₂, Cy/AcOEt 7:1), aïllant-se 82 mg (0.43 mmol) de **127** (rdt = 62%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.40-7.26 (5H, m, aromàtics), [5.24 (1H, d, $J = 12.3$ Hz) + 5.17 (1H, d, $J = 12.3$ Hz), H-C1'], 3.26-3.22 (2H, m, H-C2 + H-C3), 1.39 (3H, d, $J = 5.1$ Hz, H-C4).

2.1.2.5. Síntesi del (E)-2,3-epoxi-4-metilpentanoat d'etil (131)

Es dissolen **A** mg/mmol de **114** i **B** g/mmol de MCPBA en **C** ml de CH_2Cl_2 i es deixa agitant sota atmosfera d'argó a **D** °C durant **E** h. S'elimina parcialment el dissolvent, es refreda a 0 °C i es filtra. El precipitat obtingut es renta amb CH_2Cl_2 . S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb una dissolució aquosa de Na_2CO_3 al 5%, H_2O i una dissolució aquosa saturada de NaCl. La fase orgànica s'asseca sobre MgSO_4 anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen **F** g d'un cru que es purifica per cromatografia flash (SiO_2 , Cy/AcOEt 1:0, 4:1), aïllant-se **131** amb un rdt del **G**%:

Exp	A g/mmol	B g/mmol	C ml	D °C	E dies	F g	G %
1	1.30 g/9.1 mmol	1.79 g/10.4 mmol	7 ml	reflux	0.9 dies	0.50	35%
2	2.81 g/19.8 mmol	6.08 g/35.4 mmol	117 ml	t.a.	0.7 dies	2.50	0%
3	1.00 g/7.0 mmol	2.88/16.7 mmol	54 ml	reflux	0.4 dies	1.68	16%
4	2.00 g/14.1 mmol	4.00 g/23.4 mmol	50 ml	reflux	10 dies	2.22	99%

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 4.23 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$), 3.25 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-C2), 2.98 (1H, dd, $J = 1.8$ i 6.6 Hz, H-C3), 1.65 (1H, m, H-C4), 1.31 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, COCH_2CH_3), [1.06 (3H, d, $J = 6.9$ Hz) + 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), H-C5 + H-C6]

2.1.2.6. Síntesi del (E)-2,3-epoxi-4-metilpentanoat de metil (130)

Es dissolen 540 mg (3.16 mmol) de MCPBA (100%) i 200 mg (1.56 mmol) de **123** en 10 ml de CH_2Cl_2 . La barreja s'escalfa a reflux, sota atmosfera d'argó, durant 12 hores. Es concentra eliminant parcialment el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, es filtra i el precipitat es renta amb CH_2Cl_2 . S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb una dissolució aquosa de Na_2CO_3 al 5%, H_2O i una dissolució aquosa saturada de NaCl. S'asseca sobre Na_2SO_4 anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se 110 mg que corresponen majoritàriament a **130** (rdt = 49%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 3.78 (3H, s, $-\text{COCH}_3$), 3.27 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-C2), 2.99 (1H, dd, $J = 1.8$ i 6.6 Hz, H-C3), 1.66 (1H, m, H-C4), [1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz) + 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), H-C5 + H-C6]

2.1.2.7. Síntesi de 2,3-epoxibutanoat de 2'S-metilbutil (128)

Es dissolen 1.53 g (9.8 mmol) de l'èster α,β -insaturat **120** en 20 ml de CHCl_3 . Es refreda la dissolució fins a 0 °C, s'addicionen 3.0 g de (17.4 mmol) MCPBA i es deixa agitar durant 7 h a t.a. Es filtra el sòlid format, s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, es redissol el cru en 20 ml d'AcOEt i s'afegeixen 20 ml d'una dissolució aquosa de Na_2SO_3 5% per tal d'eliminar l'excés de MCPBA. Es deixa agitar 11 h, se separen les fases i l'orgànica es renta amb dissolucions aquoses

saturades de NaHCO₃ i NaCl. S'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 1.20 g d'un cru barreja **120:128** en proporció 1:3, valorada per ¹H-RMN, que s'emprarà directament per a la següent etapa sintètica sense posterior purificació. **128** s'identifica per les següents dades espectroscòpiques:

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 4.34 (2H, m, H-C1'), 3.48 (1H, m, H-C3), 2.97 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-C2), 1.50 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-C4), 1.20 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-C4')

2.1.3. Esterificació entre alcohols i α,β-epoxiàcids

2.1.3.1. Síntesi de **129** via saponificació de **131**

Es dissolen 500 mg (3.16 mmol) de **131** en 20 ml d'MeOH i s'addicionen 2.0 g (14.5 mmol) de K₂CO₃ en 5 ml d'H₂O. Es deixa agitar a t.a. durant 2 h i s'elimina el MeOH mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'extreu amb Et₂O, s'acidula la fase aquosa amb HCl 10% fins pH<2 i s'extreu altra vegada. S'ajunten les fases orgàniques, s'assequen sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 370 mg d'un cru que correspon majoritàriament a l'àcid **129** (rdt = 90%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.22 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-C2), 3.03 (1H, dd, J = 1.8 i 6.3 Hz, H-C3), 1.70 (1H, m, H-C4), [1.05 (3H, d, J = 6.9 Hz) + 1.01 (3H, d, J = 6.9 Hz), H-C5 + H-C6]

2.1.3.2. Síntesi de 2α,3α-isopropilidendioxi-17β-(2',3'-epoxi-4'-metilpentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**132**)

Es dissolen 101 mg (≈ 0.78 mmol) de l'àcid **129** en 10 ml de THF sec i s'hi afegeixen 106 μL (0.78 mmol) de Et₃N seca i 124 μL (0.78 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil. Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 40 min. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 4 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 115 mg (0.32 mmol) de **96** en 2 ml de CH₂Cl₂, s'addicionen 97 mg (0.77 mmol) de DMAP i la dissolució d'anhidrid mixt recentment preparada *in situ*. Després d'agitar sota atmosfera inerta, a t.a. durant 25 h, s'addicionen 20 ml de CH₂Cl₂. S'ajunten les fases orgàniques, es renten amb dissolucions aquoses saturades de NH₄Cl, H₂O, NaHCO₃ i NaCl. S'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 83 mg d'un cru que s'identifica majoritàriament com a **132** (rdt = 55%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.64 (1H, t, J = 8.1 Hz, αH-C17), 4.28 (1H, m, βH-C3), 4.10 (1H, m, βH-C2), 3.27 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-C2'), 3.02 (1H, dd, J = 1.8 i 6.9 Hz, H-C3'), 2.56 (1H, dd, J = 3.9 i 12.3 Hz, αH-C5), 1.10 (6H, d, J = 6.6 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.69 (3H, s, 19-CH₃).

2.2. Síntesi d'epòxids quirals via epoxidació asimètrica de Sharpless

2.2.1. Síntesi de l'alcohol al·lilic **113**

Es dissolen 11.73 g (82 mmol) de l'èster **114** en 180 ml d'Et₂O i es refreda a 0 °C. Sota atmosfera d'argó, s'afegeixen, gota a gota, 167 ml de DIBAL-H (1M en hexà) i s'agita la dissolució durant 4 h a aquesta temperatura i 2 h més a t.a. Posteriorment, s'addicionen, gota a gota a 0 °C, 50 ml de dissolució aquosa saturada de NaCl i 50 ml HCl 4 M. Es decanten les dues fases resultants i la fase aquosa s'extreu amb Et₂O. S'ajunten les fases orgàniques, es renten amb una dissolució aquosa saturada de NaCl i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 10.82 g d'un cru que es purifica per cromatografia flash (SiO₂, Cy/AcOEt 2:1), aïllant-se 5.89 g (58.8 mmol) de **113** (rdt = 71%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 5.65-5.57 (2H, m, H-C2 + H-C3), 4.08 (2H, d, J = 5.4 Hz, H-C1), 2.30 (1H, m, H-C4), 1.00 (6H, d, J = 6.9 Hz, H-C5 + H-C6).

2.2.2. Síntesi de (2*S*,3*S*)-2,3-epoxi-4-metil-1-pentanol (**117**)

A una suspensió de 0.79 g de tamisos moleculars de 4 Å en 75 ml de CH₂Cl₂, a -20 °C i sota atmosfera d'argó, s'addicionen 300 mg (1.5 mmol) de (+)-L-Tartrat de dietil dissolts en 2 ml de CH₂Cl₂, 205 µl de Ti(OⁱPr)₄ i 9.5 ml (34.2 mmol) de TBHP (3.6 M en isooctà). S'agita durant 1 h a -20 °C i, finalment, s'afegeix, gota a gota durant aprox. 1 h, una dissolució de 1.36 g (13.5 mmol) de **113** en 8.4 ml de CH₂Cl₂. Es deixa agitant durant 3 dies a -20 °C. S'addicionen 1.2 ml de NaOH 10% en dissolució aquosa saturada de NaCl i 8 ml d'Et₂O. Es calenta fins a 10 °C i s'afegeixen 1.3 g de MgSO₄ anhidre i 0.2 g de celite. Es deixa agitant durant 15 min a t.a. i es filtra sobre un llit de celite.

S'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda i els 4.04 g de cru obtingut es purifiquen per cromatografia flash (SiO₂, Cy/AcOEt 7:2), aïllant-se 695 mg (6.0 mmol, rdt = 44%) de l'epoxialcohol d'interès **117** i 514 mg (5.1 mmol, rdt = 38%) de producte de partida **113**.

▪ Dades espectroscòpiques més significatives de (2*S*,3*S*)-2,3-epoxi-4-metil-1-pentanol (**117**):

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): [3.93 (1H, m) + 3.63 (1H, m), H-C1], 2.97 (1H, m, H-C2), 2.76 (1H, dd, J = 2.1 i 6.6 Hz, H-C3), 1.58 (1H, m, H-C4), [1.03 (3H, d, J = 6.9 Hz) + 0.97 (3H, d, J = 6.9 Hz), H-C5 + H-C6].

[α]_D²⁰: -0.6° (c 3.1, CH₂Cl₂). L'excés enantiomèric per **117** és inferior al 2%.

2.2.3. Síntesi de l'epoxiàcid **118**

Es prepara una suspensió de 0.96 g (4.5 mmol) de NaIO₄ en 2.9 ml CCl₄, 2.9 ml CH₃CN i 4.3 ml H₂O i s'addiciona sobre 167 mg (1.4 mmol) de l'epoxialcohol **117**. Transcorreguts 20 min, s'afegeixen 20 mg de RuCl₃·H₂O i es deixa agitar 6 h a t.a. Es refreda fins a 0 °C i s'addicionen 3 ml HCl 4 N. Es filtra el catalitzador sobre un llit de SiO₂, s'extreu amb Et₂O fred i la fase orgànica es renta amb dissolució aquosa saturada de NaCl. S'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació

a pressió reduïda. S'obtenen 183 mg (1.4 mmol) d'un cru que s'identifica majoritàriament com a **118** (rdt del 98%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 3.30 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-C2), 3.01 (1H, dd, $J = 1.8$ i 6.6 Hz, H-C3), 1.65 (1H, m, H-C4), [1.05 (3H, d, $J = 6.9$ Hz) + 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), H-C5 + H-C6].

2.3. Obertura d'epòxids

2.3.1. Emprant TMA

2.3.1.1. Intents d'obertura de 2,3-epoxibutanoat de metil (**126**)

A una dissolució d'**A** ml/mmol de TMA (2M en toluè) en **B** ml de dissolvent a **C** °C s'addicionen 200 mg (1.73 mmol) de l'epòxid **126** i es deixa agitar la barreja a **D** °C durant **E** h. Seguidament s'addicionen **F** ml d'una dissolució HCl/H₂O gel al 10% i s'escalfa fins a **G** °C. S'extreu amb CHCl_3 i es renta la fase orgànica amb dissolució 10% d'HCl, H₂O i dissolucions aquoses saturades de NaCl. S'asseca sobre MgSO_4 anhidre i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se **H** mg de cru:

Exp	A ml/mmol	B ml	C °C	D °C	E h	F ml	G °C	H Mg
1	1.1/2.16	2.5 ml heptà	- 10	-10	0.50	2.9	45 °C	80
2	1.1/2.16	3 ml CHCl_3	- 25	-25	0.25	1.3	t.a.	120
3	6.0/12.0	5 ml CHCl_3	- 15	0	12	13	t.a.	56
4	11.0/22.0	5 ml CHCl_3	- 35	0	20	20	t.a.	86

Exp	Composició cru
1	cc difícil d'interpretar
2	producte de partida
3	formació de la funcionalitat 2-hidroxílica (doblet al voltant de 4.0 ppm) sense poder-se confirmar la formació del 2-hidroxi-3-metilbutanoat de metil ja que
4	es detecta la hidròlisi parcial de la funcionalitat èster (desaparició del singulet a 3.78 ppm).

2.3.1.2. Intents d'obertura del 2,3-epoxibutanoat de benzil (**127**)

Es dissolen 100 mg (0.52 mmol) de l'epòxid **127** en **A** ml de Cy (**exp.1**) o CH_2Cl_2 (**exp.2**), es refreda a **B** °C i s'addicionen **C** ml/mmol de TMA (2M en toluè). Es deixa agitant a aquesta temperatura durant **D** h. El cru s'aboca sobre 10 ml H_2SO_4 20%, s'afegeixen 10 ml de toluè i 5 ml d' H_2O . Es separen fases i l'aquosa s'extreu amb toluè. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO_4 anhidre. Es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se **E** mg de cru:

Exp	A ml	B °C	C ml/mmol	D h	E mg	Composició cru
1	3 ml Cy	20	0.89/1.8	8	66	doblets a 4.0 ppm i presència de senyal a 5.27-5.15 ppm corresponent a α i β -hidroxièstersbenzílics + 40% producte de partida
2	25 ml CH ₂ Cl ₂	-20	4.50/9.0	48	51	Hidròlisi de l'èster benzílic Presència de la funcionalitat epòxid

2.3.1.3. Intents d'obertura del 2,3-epoxi-4-metilpentanoat de metil (**130**)

Es dissolen 200 mg (1.40 mmol) de l'epòxid **130** en 5 ml de CHCl₃ i es refreda la dissolució fins a -35 °C. Gota a gota s'addicionen 7 ml (14 mmol) de TMA (2 M en toluè), es calenta fins a 0 °C i es deixa agitar a aquesta temperatura durant 12 h. Seguidament, s'addicionen 5 ml d'H₂O i 20 ml d'una dissolució d'H₂SO₄ 18% a -35 °C. S'extreu amb CHCl₃, es renta la fase orgànica amb dissolucions HCl 10%, H₂O i dissolució aquosa saturada de NaCl. S'asseca sobre MgSO₄ anhidre i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 140 mg d'un cru complex en el que s'observa hidròlisi parcial de la funcionalitat ester, sense modificar-se l'epòxid.

2.3.1.4. Intents d'obertura del 2,3-epoxi-4-metilpentanoat d'etil (**131**)

Experiència 1: Dissolució en Cy

Es dissolen 200 mg (1.27 mmol) de **131** en 5.2 ml de Cy i la dissolució es refreda fins a 0 °C i s'addiciona, gota a gota i sota atmosfera d'argó, 0.95 ml (1.9 mmol) de TMA (2 M en toluè). Es deixa agitant a 0 °C durant 24 hores, passades les quals s'addicionen 1 ml (2 mmol) de TMA (2 M) i es deixa agitant 1 h a t.a. Finalment, s'addicionen 3 ml d'HCl (1 M), es decanta i la fase aquosa s'extreu amb toluè i s'asseca sobre MgSO₄ anhidre. Es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. Es recupera producte de partida **131** sense reaccionar.

Experiència 2: Dissolució en CHCl₃

Es dissolen 200 mg (1.27 mmol) de l'epòxid **131** en 5 ml de CHCl₃, es refreda a -35 °C i s'addicionen, gota a gota, 8 ml (16 mmol) de TMA (2 M en toluè). Es calenta fins a 0 °C i es deixa agitant durant 12 h a aquesta temperatura. Es torna a refredar a -35 °C i s'addicionen 20 ml d'H₂SO₄ al 18%. S'extreu amb CHCl₃ i es renta la fase orgànica amb HCl 10%, H₂O i dissolució aquosa saturada de NaCl. S'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda.

S'obtenen 140 mg d'un cru en el que sembla detectar-se la presència de l' α -hidroxièster d'interès [4.23 (2H, q, J = 7.2 Hz, -COCH₂CH₃), 4.10 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-C2), 2.33 (1H, m, H-C3)]. Tot i realitzar diverses columnes cromatogràfiques (Cy/AcOEt), la dificultat de detecció per CCF d'aquest tipus de compostos impedeixen el seu aïllament i purificació.

2.3.2. Intent d'obertura de l'àcid 2,3-epoxibutanoic (**124**)

A una dissolució, sota atmosfera d'argó, de A g (mmol) de CuI (**exp.1**) o CuCN (**exp.2**) en B ml d'èter s'hi adicionen, gota a gota, a -20 °C, C ml (mmol) de ^tPrLi (0.7 M). S'addicionen, gota a gota, 304 g (2.97 mmol) d'àcid **124**. Es deixa agitant D h a aquesta temperatura. Finalment, s'afegeixen 2 ml HCl 3N i la fase aquosa s'extreu amb AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques, s'assequen sobre MgSO₄

anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen **E** mg de cc, que s'intenten purificar per cromatografia sense èxit.

Exp.	A g/mmol	B ml	C ml/mmol	D h	E mg
1	1.17/6.0 mmol CuI	15	9.0/6.0	15	115
2	0.40/4.5 mmol CuCN	8	12.8/9.0	10	360

2.3.3. Intent d'obertura de 2,3-epoxibutanoat de metil (**126**)

Es dissolen **A** g/mmol de CuI (**exp.1**) o CuCN (**exp.2**) en **B** ml d'Et₂O, sota atmosfera d'argó. Es refreda a **C** °C i s'afegeix, gota a gota, **D** ml/mmol de ⁱPrM. Es deixa escalfar a -25 °C i s'addicionen, gota a gota, **E** g/mmol de **126**. S'agita durant **F** h a -30 °C i s'addicionen 2 ml d'una dissolució aquosa saturada de (NH₄)₂SO₄ en NH₄OH (28% en H₂O). La fase aquosa s'extreu amb Et₂O i AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques, s'assequen sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda.

Exp.	A g/mmol	B ml	C °C	D ml/mmol	E mg/mmol	F h
1	0.78 g/4.1 mmol CuI	6	-30	11.6 ml/8.0 mmol ⁱ PrLi	400/3.4	2
2	0.05 g/0.55 mmol CuCN	3	-78	2.4 ml/4.8 mmol ⁱ PrMgCl	540/4.6	8

Tot i que en ambdues experiències es va poder observar la presència de senyals que demostren la possibilitat de l'obertura de l'epòxid, els intents de purificació per cromatografia flash i lobar® no va permetre obtenir amb èxit l'α-hidroxièster d'interès.

3. SÍNTESI DE BRs ANDROSTÀNICS AMB DIFERENTS FUNCIONALITATS A C2'

3.1. Sense funcionalitat a C2'

3.1.1. Síntesi de 2α,3α-isopropilidendioxi-17β-(4'-metilpentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**143**) via DCC/AcOEt

Es dissolen 165 mg del cru de l'acetal **96** (~0.41 mmol) i 140 mg de l'àcid 4-metilpentanoic (**162**, 1.20 mmol) en 35 ml AcOEt i s'hi addicionen 222 mg de DCC (1.08 mmol) i 20 mg de DMAP. Es deixa agitant a t.a durant 96 h. S'afegeixen 25 ml d'H₂O i s'extreu amb 3 x 100 ml d'AcOEt. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 514 mg d'un cru que correspon majoritàriament al compost d'interès 2α,3α-isopropilidendioxi-17β-(4'-metilpentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**184**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.64 (1H, t, J = 7.2 Hz, αH-C17), 4.28 (1H, m, βH-C3), 4.09 (1H, m, βH-C2), 2.56 (1H, dd, J = 3.9 i 12.3 Hz, αH-C5), 0.90 (6H, d, J = 6.3 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.69 (3H, s, 19-CH₃).

3.1.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**184**) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 116 mg (1.0 mmol) de l'àcid 4-metilpentanoic (**162**) en 12 ml de THF sec i s'hi afegeixen 134 μ L (1.0 mmol) de Et₃N seca i 151 μ L (1.0 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 6 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 140 mg de DMAP i 168 mg (~0.46 mmol) de l'acetal **96** en 3 ml de CH₂Cl₂. En condicions de t.a. i atmosfera inerta s'afegeix a la mescla la solució d'anhidrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i es para a les 25 h. S'afegeixen 50 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 3 x 40 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 2 x 40 ml d'H₂O, 3 x 40 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃ i 40 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 193 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **184**.

3.1.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**143**)

3.1.3.1. Hidròlisi de l'acetònid emprant HCl

Es dissolen 113 mg (~ 0.31 mmol) del cru de **184** en 8 ml de MeOH i s'addiciona una dissolució de 0.1 ml d'HCl 37% en 12 ml MeOH. Es deixa agitar protegit de la llum, a t.a. i en atmosfera d'argó durant 3.5 h. S'addicionen 75 ml de dissolució aquosa saturada de NaHCO₃, s'extreu amb AcOEt i es renta la fase orgànica amb una dissolució aquosa saturada de NaCl. S'asseca sobre MgSO₄ anhidre i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se 411 mg d'un cru que es purifica mitjançant cromatografia flash (Cy/AcOEt, 1:1, 1:2) aïllant-se les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	215	cc que conté DCC i DCU
F2	5	143
F3	64	cc
F4	92	26
F5	17	cc

rdt de cromatografia = 96%.

- S'obté **143** (les dades espectroscòpiques més significatives del qual es mostren a continuació) amb un rdt del 4% des de **26**:

P.f.: 177 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3375, 2953, 2872, 1734, 1709, 1172

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.65 (1H, dd, $J = 7.8, 16.8$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.05 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 3.79-3.75 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 2.71 (1H, dd, $J = 2.4$ i 12.3 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 0.90 (6H, d, $J = 6.3$ Hz, $5'\text{-CH}_3 + 6'\text{-CH}_3$), 0.79 (3H, s, 18- CH_3), 0.77 (3H, s, 19- CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 211.3/s C6, 173.9/s C1', 81.9/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.7/d C9, 51.1/d C14, 50.8/d C5, 46.3/t C7, 43.1/s C13, 42.6/s C10, 40.3/t C1, 37.5/d C8, 36.5/t C12, 34.0/d C2', 32.7/t C3', 27.7/d C4', 27.4/t C16, 26.4/t C4, 23.4/t C15, [22.3/q + 21.3/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.2/q C18.

EM-AR: trobat 420.2867 $[\text{M}]^+$, (calc. 420.2876, $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_5$)

EM-IE: 420 ($[\text{M}]^+$, 100), 405 ($[\text{M-CH}_3]^+$, 48), 402 ($[\text{M-H}_2\text{O}]^+$, 45), 375 (32), 305 (31), 304 (37), 289 (31), 287 (36), 286 (56), 271 (32).

3.1.3.2. Hidròlisi de l'acetònid **184** emprant CF_3COOH

Es dissolen 188 mg (~0.46 mmol) del cru de **184** en 7 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a una temperatura de 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). S'observa que a les 10 h de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeixen 10 ml de toluè i s'eliminen a pressió reduïda. S'obtenen 192 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 3:2) aïllant-se (rdt de columna del 95%) 70 mg de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**143**) amb un rdt del 38% des de **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **143** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 54 mg d'aquest es recristal·litzen amb EtOH/ H_2O en fred, obtenint-se 24 mg de **143** (rdt recristal·lització: 44%).

3.2. Funcionalitat cetona a C2'.

3.2.1. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (**187**) via DCC/AcOEt

Es dissolen 180 mg del cru de l'acetal **96** (~0.45 mmol) i 156 mg de l'àcid 4-metil-2-oxopentanoic (**163**, 1.20 mmol) en 38 ml AcOEt i s'hi addicionen 240 mg de DCC (1.16 mmol) i 22 mg de DMAP. Es deixa agitant a t.a. durant 96 h. S'afegeixen 25 ml d' H_2O i s'extreu amb 3 x 75 ml. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO_4 anhidre i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 454 mg d'un cru que correspon majoritàriament al compost d'interès $2\alpha,3\alpha$ -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (**187**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.74 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.27 (1H, m, $\text{H}\alpha\text{-C3}$), 4.10 (1H, m, $\text{H}\alpha\text{-C2}$), 0.97 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, $5'\text{-CH}_3 + 6'\text{-CH}_3$), 0.85 (3H, s, 18- CH_3), 0.69 (3H, s, 19- CH_3).

3.2.2. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (**187**) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 266 mg (2.04 mmol) de l'àcid 4-metil-2-oxopentanoic (**163**) en 15 ml de THF sec i s'hi afegeixen 273 μL (2.04 mmol) de Et_3N seca i 308 μL (2.04 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil

(**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 10 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 210 mg de DMAP i 243 mg (~0.68 mmol) de l'acetal **96** en 5 ml de CH₂Cl₂. En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhídrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i aquesta es para a les 23 h. S'afegeixen 50 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 2 x 50 ml d'H₂O, 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃ i 40 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 347 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **187**.

3.2.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (**144**)

Es dissolen 347 mg (~0.46 mmol) del cru de **187** en 10 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a una temperatura de 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 2:1). S'observa que a les 20 h de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeixen 10 ml de toluè i s'eliminen a pressió reduïda. S'obtenen 353 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 1:1) aïllant-se 55 mg de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-2',6-diona (**144**) amb un rdt del 20% des del compost **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **144** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 54 mg d'aquest es recristal·litzen amb EtOH/H₂O en fred, obtenint-se 33 mg de **144** (rdt recristal·lització: 61%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 146 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3405, 2949, 2874, 1723, 1711, 1264, 1053

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.75 (1H, t, J = 7.5 Hz, α H-C17), 4.06 (1H, m, β H-C3), 3.81-3.74 (1H, m, β H-C2), 2.72-2.67 (2H, m, α H-C5 + H-C3'), 0.97 (6H, d, J = 6.6 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.86 (3H, s, 18-CH₃), 0.77 (3H, s, 19-CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 210.6/s C6, 194.2/s C2', 161.3/s C1', 84.2/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.6/d C9, 51.0/d C14, 50.8/d C5, 48.1/t C3', 46.2/t C7, 43.5/s C13, 42.5/s C10, 40.2/t C1, 37.4/d C8, 36.4/t C12, 27.3/t C16, 26.3/t C4, 24.4/d C4', 23.4/t C15, [22.6/q + 22.6/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.2/q C18.

EM-AR: trobat 434.2656 [M]⁺, (calc. 434.2668, C₂₅H₃₈O₆)

EM-IE: 434 ([M]⁺, 2), 305 (58), 287 (100), 149 (47).

3.3. Funcionalitat 2R-azida a C2'

3.3.1. Síntesi de l'àcid 2R-azido-4-metilpentanoic (**164**)

3.3.1.1. Preparació de Tf-N₃ en CH₂Cl₂

Es dissolen 4.90 g (75.40 mmol) d'azida sòdica en 12.5 ml d'H₂O. S'hi afegeixen 20 ml de CH₂Cl₂ i es deixa refredar la mescla fins a 0 °C. S'hi addicionen 2.5 ml (15.14 mmol) d'anhídrid trifluoroacètic gota a gota. Es deixa agitar la mescla durant dues hores. Se separa la fase orgànica de la fase aquosa. S'extreu la fase aquosa amb 2 x 10 ml de CH₂Cl₂. S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb 10 ml d'una solució aquosa saturada de carbonat sòdic.

3.3.1.2. Azidació de la D-leucina (**166**)

Es dissolen 500 mg (3.81 mmol) de D-Leu (**166**) i 792 mg (7.47 mmol) de carbonat sòdic en 24 ml d'H₂O. S'hi afegeixen 7 mg (0.04 mmol) de sulfat de coure i 24 ml de MeOH. S'hi addicionen 20 ml de solució de Tf-N₃ en CH₂Cl₂ preparada in situ i s'hi afegeix més MeOH fins a homogeneïtzar la mescla. Es deixa agitant el cru a t.a. durant 22.5 h. El control de reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:8) emprant verd de bromocresol com a revelador.

Quan ja no s'aprecia D-Leu, s'eliminen els dissolvents orgànics a pressió reduïda, s'hi afegeix H₂O fins a dissoldre el contingut del cru i es neutralitza amb H₂SO₄ 2N fins a un pH < 4. S'extreu la solució aquosa amb 5 x 50 ml de AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques, es renta amb dissolucions aquoses saturades de NaCl, s'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 476 mg d'un cru que es purifica per cromatografia convencional (AcOEt/Cy 1:5), aïllant-se 356 mg de l'àcid 2R-azido-4-metilpentanoic (**164**) amb un rdt del 59%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$[\alpha]_D^{20}$: +26.5° (c 3.5, MeOH)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.88 (1H, dd, J= 3 i 4.5 Hz, H-C2), 1.84 (1H, m, H-C4), 1.73 (2H, m, H-C3), 0.99 (6H, t, J= 3 Hz, 5-CH₃+6-CH₃).

3.3.2. Síntesi de 2α,3α-isopropilidendioxi-17β-(2'R-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**189**)

Es dissolen 65 mg (0.41 mmol) de **164** en 5 ml de THF sec i s'hi afegeixen 53 μL (0.39 mmol) de Et₃N seca i 62 μL (0.39 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 40 min. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 2 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 96 mg (0.75 mmol) de DMAP i 131 mg (0.36 mmol) de **96** en 2 ml de CH₂Cl₂. En condicions de t.a. i atmosfera inerta s'afegeix a la mescla la solució d'anhídrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). Passades 21.5 h, s'observa encara la presència de **96**. Es tornen a preparar 2 ml de solució d'anhídrid mixt

(0.39 mmol)/CH₂Cl₂ i s'afegeixen al cru de reacció a les 23.5 h. A les 47 h encara s'aprecia producte de partida i s'afegeix 1 ml (0.20 mmol) de solució d'anhidrid mixt/CH₂Cl₂. A les 49 h es dona per acabada la reacció. S'afegeixen 20 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 3 x 30 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 3 x 30 ml d'H₂O, 3 x 30 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃, 20 ml d'H₂O i 30 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 207 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **189**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.71 (1H, t, J = 4 Hz, αH-C17), 4.28 (1H, s.a., βH-C3), 4.10 (1H, m, βH-C2), 3.785 (1H, dd, J = 3 i 4 Hz, H-C2'), 2.56 (1H, dd, J = 2 i 6 Hz, αH-C5), 2.34 (2H, dd, J = 2 i 6.5 Hz, αH-C7 + βH-C7), 0.96 (6H, t, J = 3 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.82 (3H, s, 18-CH₃), 0.69 (3H, s, 19-CH₃).

3.3.3. Síntesi de 2α,3α-dihidroxi-17β-(2'R-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**146**)

Es dissolen 207 mg (~0.33 mmol) del cru de **189** en 3 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). S'observa que a les 5 h de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeixen 10 ml de toluè al cru, aquest i l'aigua es destil·len azeotròpicament a pressió reduïda. S'obtenen 243 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 3:1) obtenint-se 2α,3α-dihidroxi-17β-(2'R-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**146**) (rdt de columna 76%), amb un rdt global del 61% des de **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **146** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 83 mg de **146** es recristal·litzen amb EtOH/H₂O en fred, obtenint-se 49 mg de **146** (Rdt recristal·lització: 59%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 135 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3379, 2959, 2938, 2874, 2853, 2827, 2115, 1783, 1738, 1710, 1277, 1190.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.72 (1H, t, J = 4 Hz, αH-C17), 4.06 (1H, m, βH-C3), 3.78 (2H, m, βH-C2 + H-C2'), 2.70 (1H, dd, J = 1.5 i 6 Hz, αH-C5), 2.32 (2H, dd, J = 2 i 6.5 Hz, αH-C7 + βH-C7), 0.97 (6H, t, J = 3 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.83 (3H, s, 18-CH₃), 0.77 (3H, s, 19-CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 211.1/s C6, 170.8/s C1', 83.7/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 60.5/d C2', 53.6/d C9, 51.0/d C14, 50.8/d C5, 46.2/t C7, 43.2/s C13, 42.5/s C10, 40.2/t C1, 39.9/t C3', 37.4/d C8, 36.4/t C12, 27.4/t C16, 26.4/t C4, 25.1/d C4', 23.4/t C15, [22.8/q + 21.8/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.3/q C18.

EM-AR: trobat 461.2908 [M]⁺, (calc. 461.2903, C₂₅H₃₉N₃O₅)

EM-IE: 461 ([M]⁺, 43), 446 ([M-CH₃]⁺, 14), 443 ([M-H₂O]⁺, 15), 305 (41), 287 (100), 129 (40).

3.4. Funcionalitat 2S- azida a C2'

3.4.1. Síntesi de l'àcid 2S-azido-4-metilpentanoic (**165**)

3.4.1.1. Preparació de Tf-N₃ en CH₂Cl₂

Es dissolen 4.90 g (75.40 mmol) d'azida sòdica en 12.5 ml d'H₂O. S'hi afegeixen 20 ml de CH₂Cl₂ i es deixa refredar la mescla fins a 0 °C. S'hi addicionen 2.5 ml (15.14 mmol) d'anhídrid trifluoroacètic gota a gota. Es deixa agitar la mescla durant dues hores. Se separa la fase orgànica de la fase aquosa. S'extreu la fase aquosa amb 2 x 10 ml de CH₂Cl₂. S'ajunten les fases orgàniques i es renten amb 10 ml d'una solució aquosa saturada de carbonat sòdic.

3.4.1.2. Azidació de la L-Leucina (**167**)

Es dissolen 1.0 g (7.63 mmol) de L-Leu (**167**) i 1.576 g (14.87 mmol) de carbonat sòdic en 24 ml d'H₂O. S'hi afegeixen 13 mg (0.08 mmol) de sulfat de coure i 48 ml de MeOH. S'hi addiciona la solució de Tf-N₃ en CH₂Cl₂ preparada *in situ* i s'hi afegeixen uns 20 ml de MeOH, fins a homogeneïtzar la mescla. Es deixa agitant el cru a t.a. durant 21.5 h. El control de reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:8) emprant verd de bromocresol com a revelador.

Quan ja no s'aprecia L-Leu, s'eliminen els dissolvents orgànics a pressió reduïda, s'hi afegeix H₂O fins a dissoldre el contingut del cru i es neutralitza amb H₂SO₄ 2 N fins a un pH < 4. S'extreu la solució aquosa amb 5 x 50 ml de AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques, es renten amb dissolució aquosa saturada de NaCl, s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 1.260 g d'un cru que es purifica per cromatografia convencional (AcOEt/Cy 1:5) aïllant-se 726 mg de l'àcid 2S-azido-4-metilpentanoic (**165**) amb un rdt del 61%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$[\alpha]_D^{20}$: -26.5 ° (c 4, MeOH)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.88 (1H, dd, J = 5.5 i 8.5 Hz, H-C2), 1.84 (1H, m, H-C4), 1.73 (2H, m, H-C3), [0.99 (3H, d, J = 6.5 Hz) + 0.97 (3H, d, J = 6.5 Hz), 5-CH₃+6-CH₃].

3.4.2. Intent de síntesi de 2α,3α-isopropilidendioxi-17β-(2'S-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**188**) via DCC

3.4.2.1. Intent de síntesi de **188** via DCC/Acetona

Es dissolen 145 mg (0.40 mmol) de **96** en 35 ml d'acetona i s'hi afegeixen 63 mg (0.40 mmol) de **165**, 92 mg (0.44 mmol) de DCC i 2 mg (0.02 mmol) de DMAP. Es deixa agitar la mescla a t.a. Se segueix la reacció per CCF (AcOEt/Cy 3:2). Passades 24 h no s'observa evolució en la reacció i s'afegeixen 116 mg (0.56 mmol) de DCC i 4 mg (0.03 mmol) de DMAP. Al cap de 24 h no s'observa evolució i s'atura la reacció. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i per ¹H-RMN es verifica que només hi ha producte de partida **96**.

3.4.2.2. Intent de síntesi de **188** via DCC/CHCl₃

Es dissolen 109 mg (0.30 mmol) de **96** en cloroform i s'hi afegeixen 63 mg (0.40 mmol) de **165**, 91 mg (0.44 mmol) de DCC i 4 mg (0.03 mmol) de DMAP. Es deixa agitar la mescla a t.a. Es fa el seguiment de la reacció per CCF (AcOEt/Cy 3:2). Després de 147 h no s'ha observat cap avanç en la reacció. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda i per ¹H-RMN es verifica que només hi ha producte de partida **96**.

3.4.3. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'S-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**188**) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 61 mg (0.39 mmol) de **165** en 5 ml de THF sec i s'hi afegeixen 53 μ L (0.39 mmol) de Et₃N seca i 62 μ L (0.39 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 40 min. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 2 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 96 mg (0.75 mmol) de DMAP i 120 mg (0.33 mmol) de **96** en 2 ml de CH₂Cl₂. En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhidrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). Passades 18.5 h s'observa encara la presència de **96**. Es tornen a preparar 2 ml de solució d'anhidrid mixt (0.39 mmol)/CH₂Cl₂ i s'afegeixen al cru de reacció a les 21.5 h. Per CCF gairebé no s'aprecia producte de partida i es para la reacció a les 25 h, afegint 20 ml de CH₂Cl₂. Es renta la fase orgànica amb 3 x 30 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 3 x 30 ml d'H₂O, 3 x 30 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃, 20 ml d'H₂O i 30 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 136 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **188**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.71 (1H, dd, J = 8 i 9 Hz, α H-C17), 4.28 (1H, m, β H-C3), 4.10 (1H, m, β H-C2), 3.79 (1H, dd, J = 6 i 8.5 Hz, H-C2'), 2.56 (1H, dd, J = 2 i 6 Hz, α H-C5), 2.34 (1H, dd, J = 5 i 12.5 Hz, β H-C7), [0.98 (3H, d, J = 6.5 Hz) + 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz), 5'-CH₃+6'-CH₃], 0.83 (3H, s, 18-CH₃), 0.69 (3H, s, 19-CH₃).

3.4.4. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxí-17 β -(2'S-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**145**)

Es dissolen 119 mg (~0.33 mmol) del cru de **188** en 3 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). S'observa que a les 5.5 h de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeixen 10 ml de toluè i s'eliminen a pressió reduïda. S'obtenen 131 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 3:1) obtenint-se 52 mg de 2 α ,3 α -dihidroxí-17 β -(2'S-azido-4'-metilpentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**145**) (rdt de cromatografia 78%), amb un rdt global del 35% des de **26**.

Amb la finalitat d'avaluar l'activitat de **145** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 52 mg d'aquesta fracció 2 es recristal·litzen amb EtOH/H₂O en fred, obtenint-se 35 mg de **145** (Rdt recristal·lització: 68%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 128 °C

IR (film evap. CHCl_3): 3405, 2951, 2872, 2853, 2113, 1781, 1739, 1710, 1265, 1190.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.73 (1H, dd, $J = 8$ i 8 Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.06 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 3.78 (2H, m, $\beta\text{H-C2} + \text{H-C2}'$), 2.70 (1H, dd, $J = 3.5$ i 12.5 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 2.32 (1H, dd, $J = 4$ i 13 Hz, $\beta\text{H-C7}$), [0.98 (3H, d, $J = 6.5$ Hz) + 0.96 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), $5'$ - CH_3 + $6'$ - CH_3], 0.84 (3H, s, 18- CH_3), 0.77 (3H, s, 19- CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 211.1/s C6, 170.8/s C1', 83.7/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 60.5/d C2', 53.6/d C9, 51.0/d C14, 50.8/d C5, 46.2/t C7, 43.2/s C13, 42.5/s C10, 40.2/t C1, 40.0/t C3', 37.4/d C8, 36.4/t C12, 27.4/t C16, 26.4/t C4, 25.1/d C4', 23.4/t C15, [22.8/q + 21.8/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.3/q C18.

EM-AR: trobat 461.2868 $[\text{M}]^+$, (calc. 461.2863, $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_5$)

EM-IE: 461 ($[\text{M}]^+$, 46), 446 ($[\text{M-CH}_3]^+$, 12), 443 ($[\text{M-H}_2\text{O}]^+$, 11), 305 (44), 287 (100), 149 (64), 129 (32).

3.5. Funcionalitat 2R-amina a C2'.

3.5.1. Síntesi de l'àcid 2R-metoxicarbonilamino-4-metilpentanoic (170)

Es dissolen 500 mg de D-leucina (**166**, 3.81 mmol) en 7 ml NaOH 2M i s'addicionen 760 mg cloroformat de metil (8.04 mmol ClCOOCH_3). Es deixa agitant a -3 °C durant 15 h i a t.a. durant 6 h més. S'extreu amb 3 x 50 ml d' Et_2O i s'acidifica la fase aquosa fins a $\text{pH} \leq 2$ amb 7 ml HCl 2M. Es torna a extreure amb 3 x 30 ml d'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO_4 anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda obtenint-se 742 mg d'un cru que es purifica per cromatografia Flash emprant Cy/AcOEt 2:1 com a eluent (rdt de columna 95%). S'obtenen 650 mg (rdt del 90%) de l'àcid 2R-metoxicarbonilamino-4-metilpentanoic (**170**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 3322, 2959, 1717, 1539, 1058.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.07 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, NH), 4.40 (1H, m, H-C2), 3.70 (3H, s, COOCH_3), 0.96 (6H, d, $J = 6.3$ Hz, H-C5 + H-C6)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 177.7/s C1, 156.7/s COOCH_3 , 52.5/q COOCH_3 , 52.3/d C2, 41.4/t C3, 24.7/d C4, [22.9/q + 21.7/q, C5' + C6']

3.5.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metil-2'R-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (190)

Es dissolen 792 mg (~ 3.81 mmol) de l'àcid 2R-metoxicarbonilamino-4-metilpentanoic (**170**) en 45 ml de THF sec i s'hi afegixen 510 μL (3.81 mmol) de Et_3N seca i 575 μL (3.81 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 25 ml de CH_2Cl_2 .

Es dissolen 383 mg de DMAP i 443 mg (~1.24 mmol) de l'acetal **96** en 10 ml de CH₂Cl₂. En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhidrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i es para a les 18 h. S'afegeixen 100 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 2 x 100 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 2 x 100 ml d'H₂O, 2 x 100 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃ i 80 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 888 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **190**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.12 (1H, m, NH), 4.66 (1H, t, J = 8.4 Hz, αH-C17), 4.35 (1H, m, H-C2'), 4.27 (1H, m, βH-C3), 4.10 (1H, m, βH-C2), 0.95 (6H, d, J = 6.3 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.69 (3H, s, 19-CH₃).

3.5.3. Síntesi de 2α,3α-dihidroxi-17β-(4'-metil-2'R-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**151**)

Es dissolen 873 mg (~1.22 mmol) del cru de **190** en 17 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a una temperatura de 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). S'observa que a les 5.5 h de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeixen 10 ml de toluè i s'eliminen a pressió reduïda. S'obtenen 1211 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 3:2) aïllant-se les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	316	cc
F2	333	192 + imp.
F3	186	cc
F4	212	151
F5	63	cc

rdt de cromatografia = 92%.

El compost 2α,3α-dihidroxi-17β-(4'-metil-2'R-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**151**) s'obté amb un rdt del 35% des del compost **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **151** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, es varen provar diferents recristal·litzacions emprant èter de petroli/CH₂Cl₂, èter diisopropílic/CH₂Cl₂, Et₂O/CH₂Cl₂, MeCOMe/H₂O i EtOH/H₂O en fred. Degut a que en cap d'elles es va aconseguir cristal·litzar el producte d'interès, 189 mg d'aquest es purifiquen per cromatografia flash (AcOEt/Cy, 3:1), obtenint-se 138 mg de **151** (rdt purificació: 73%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 67 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3344, 2951, 1709, 1264, 1202, 1055, 755

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.05 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, NH), 4.67 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.35 (1H, m, H-C2'), 4.05 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 3.79-3.74 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 3.67 (3H, s, COOCH_3), 2.69 (1H, dd, $J = 3.3$ i 12.6 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 0.96 (6H, d, $J = 6.3$ Hz, $5'$ - CH_3 + $6'$ - CH_3), 0.80 (3H, s, 18- CH_3), 0.77 (3H, s, 19- CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 211.1/s C6, 173.0/s C1', 156.4/s NHCOOCH_3 , 83.2/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.6/d C9, 52.5/d C2', 52.4/q NHCOOCH_3 , 51.0/d C14, 50.8/d C5, 46.2/t C7, 43.2/s C13, 42.6/s C10, 42.0/t C3', 40.2/t C1, 37.4/d C8, 36.4/t C12, 27.3/t C16, 26.3/t C4, 24.9/d C4', 23.4/t C15, [22.8/q + 22.0/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.1/q C18.

EM-AR: trobat 493.3041 $[\text{M}]^+$, (calc. 493.3039, $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_7$)

EM-IE: 478 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 2), 476 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$, 21), 144 (100)

3.6. Funcionalitat 2S-amina a C2'.

3.6.1. Síntesi de l'àcid 2S-metoxicarbonilaminoisopentanoic (**171**)

Es dissolen 500 mg de L-leucina (**167**, 3.81 mmol) en 7 ml NaOH 2M i s'addicionen 760 mg cloroformiat de metil (8.04 mmol ClCOOCH_3). Es deixa agitant a -3 °C durant 15 h i a t.a. durant 6 h més. S'extreu amb 3 x 50 ml d' Et_2O i s'acidifica la fase aquosa fins a $\text{pH} \leq 2$ amb 7 ml HCl 2M. Es torna a extreure amb 3 x 30 ml d'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO_4 anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda, obtenint-se 742 mg d'un cru que es purifica per cromatografia Flash emprant Cy/AcOEt 2:1 com a eluent (rdt de columna 95%). S'obtenen 591 mg de l'àcid 2S-metoxicarbonilamino-4-metilpentanoic (**171**) amb un rdt del 82%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 3323, 2959, 1716, 1538, 1058

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.05 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, NH), 4.38 (1H, m, H-C2), 3.70 (3H, s, COOCH_3), 0.96 (6H, d, $J = 6.3$ Hz, H-C5' + H-C6')

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 177.8/s C1, 156.7/s COOCH_3 , 52.5/q COOCH_3 , 52.3/d C2, 41.4/t C3, 24.8/d C4, [22.9/q + 21.7/q, C5' + C6']

3.6.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(4'-metil-2'S-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**191**) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 386 mg (2.04 mmol) de l'àcid 2S-metoxicarbonilamino-4-metilpentanoic (**171**) en 15 ml de THF sec i s'hi afegeixen 273 μL (2.04 mmol) de Et_3N seca i 308 μL (2.04 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 10 ml de CH_2Cl_2 .

Es dissolen 210 mg de DMAP i 243 mg (~0.68 mmol) de l'acetal **96** en 5 ml de CH_2Cl_2 . En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhidrid mixt en CH_2Cl_2 recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i aquesta es para a les 24 h. S'afegeixen 50 ml de CH_2Cl_2 i es renta la fase orgànica amb 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NH_4Cl , 2 x 50 ml d' H_2O , 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO_3 i 40 ml d'una solució

aguosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 461 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **191**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.04 (1H, m, NH), 4.67 (1H, t, J = 8.4 Hz, αH-C17), 4.35 (1H, m, H-C2'), 4.27 (1H, m, βH-C3), 4.10 (1H, m, βH-C2), 0.96 (6H, d, J = 6.3 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.69 (3H, s, 19-CH₃).

3.6.3. Síntesi de 2α,3α-dihidroxi-17β-(4'-metil-2'S-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**152**)

Es dissolen 454 mg (~0.68 mmol) del cru de **191** en 10 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 2:1). S'observa que a les 4 h de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeixen 10 ml de toluè i s'eliminen a pressió reduïda. S'obtenen 619 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 3:2) aïllant-se 74 mg de 2α,3α-dihidroxi-17β-(4'-metil-2'S-metoxicarbonilaminopentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**152**) amb un rdt del 23% des del compost **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **152** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 74 mg d'aquest es recristal·litzen amb EtOH/H₂O en fred, obtenint-se 44 mg de **152** (rdt recristal·lització: 62%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 209 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3347, 2952, 1711, 1250, 1203, 755

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.06 (1H, d, J = 8.7 Hz, NH), 4.68 (1H, t, J = 8.4 Hz, αH-C17), 4.35 (1H, m, H-C2'), 4.06 (1H, m, βH-C3), 3.80-3.75 (1H, m, βH-C2), 3.70 (3H, s, COOCH₃), 2.69 (1H, dd, J = 2.1 i 11.7 Hz, αH-C5), 2.31 (2H, dd, J = 4.2 Hz, 12.6 Hz, βH-C7), 0.96 (6H, d, J = 6.3 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 0.77 (3H, s, 19-CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 211.1/s C6, 173.0/s C1', 156.4/s NHCOOCH₃, 83.2/d C17, [68.4/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.6/d C9, 52.7/d C2', 52.4/q NHCOOCH₃, 51.0/d C14, 50.7/d C5, 46.2/t C7, 43.2/s C13, 42.5/s C10, 42.1/t C3', 40.2/t C1, 37.4/d C8, 36.5/t C12, 27.4/t C16, 26.4/t C4, 24.9/d C4', 23.4/t C15, [22.9/q + 22.9/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.2/q C18.

EM-AR: trobat 493.2999 [M]⁺, (calc. 493.2995, C₂₇H₄₃NO₇)

EM-IE: 493 ([M]⁺, 12), 478 ([M-CH₃]⁺, 476 ([M-OH]⁺, 30), 475 ([M-H₂O]⁺, 12), 11), 191 (33), 174 (70), 165 (32), 153 (32), 151 (35), 144 (99), 139 (43), 137 (42), 125 (63), 123 (52), 111 (83), 109 (65), 99 (33), 97 (100), 95 (86), 85 (71), 83 (87), 80 (72).

3.7. Funcionalitat 2R-hidroxil a C2'.

3.7.1. Síntesi de l'àcid 2R-acetoxi-4-metilpentanoic (175)

Es dissolen 500 mg de l'àcid 2R-hidroxil-4-metilpentanoic (**174**, 3.78 mmol) en 1.2 ml anhídrid acètic i s'addicionen 175 mg 4-(pirrolidin-1-il)piridina dissolts en 1.2 ml Py (seca sobre CaH₂). Es deixa agitant a t.a., sota atmosfera d'argó i protegit de la llum durant 20 h. S'elimina la Py mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 674 mg d'un cru que correspon majoritàriament al compost d'interès àcid 2R-acetoxi-4-metilpentanoic (**175**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.08 (1H, dd, J = 3.9 i 9.6 Hz, H-C2), 2.17 (3H, s, CH₃CO), 1.90-1.71 (2H, m, H-C3 + H-C4), 0.98 (6H, dd, J = 6.3 i 8.4 Hz, H-C5 + H-C6).

3.7.2. Síntesi de 2α,3α-isopropilidendioxi-17β-(2'R-acetoxi-4'-metipentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (196) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 665 mg (≈ 3.72 mmol) del cru de l'àcid 2R-acetoxi-4-metilpentanoic (**175**) en 41 ml de THF sec i s'hi afegeixen 500 μL (3.73 mmol) de Et₃N seca i 562 μL (3.73 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 15 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 317 mg de DMAP i 742 mg (~1.24 mmol) del cru de l'acetal **96** en 8 ml de CH₂Cl₂. En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhídrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. La reacció es para a les 24 h afegint 100 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 2 x 50 ml d'H₂O, 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃ i 40 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 1040 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **196**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.00 (1H, m, H-C2'), 4.67 (1H, t, J = 7.5 Hz, αH-C17), 4.28 (1H, m, βH-C3), 4.09 (1H, m, βH-C2), 2.55 (1H, dd, J = 3.9 i 12.3 Hz, αH-C5), 0.95 (6H, dd, J = 6.3 i 7.8 Hz, 5'-CH₃ + 6'-CH₃), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.68 (3H, s, 19-CH₃).

3.7.3. Síntesi de 2α,3α-dihidroxi-17β-(2'R-hidroxi-4'-metipentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (153)

Experiència 1

Es dissolen 1020 mg (1.24 mmol) del cru de **196** en 11 ml CHCl₃ i 88 ml MeOH. S'addicionen 6.4 ml HCl 37% a 0 °C. Es deixa agitant durant 44 h a t. a. i es para la reacció addicionant NaHCO₃ (s) fins a pH ≥ 7. S'addicionen 50 ml d'H₂O i s'extreu amb 3 x 250 ml d'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 699 mg d'un cru que conté una relació **153:197:26** 1:0:9, valorada per ¹H-RMN. Es purifica mitjançant cromatografia Flash Cy/AcOEt (2:5) obtenint-se les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	309	cc + 174
F2	82	153 + 2 <i>R</i> -hidroxi-4-metilpentanoat de 3,4,6-triclorobenzoïl
F3	288	26 + imp

rdt de cromatografia = 97%.

La fracció 2 (82 mg) s'intenta purificar mitjançant recristal·lització amb EtOH/H₂O en fred, però s'obtenen 18 mg (rdt de recristal·lització = 22%) d'una barreja del compost d'interès **153** impurificat amb 2*R*-hidroxi-4-metilpentanoat de 3,4,6-triclorobenzoïl **174**, subproducte de la reacció de Yamaguchi.

Experiències 2-8

Es dissolen **A** mg/mmol del cru de **196** en **B** µL de CHCl₃ i **C** µL de MeOH. S'addicionen **D** µL d'HCl 37% a 0 °C. Es deixa agitant durant **E** h a t. a. i es para la reacció addicionant NaHCO₃ (s) fins a pH ≥ 7. S'addicionen 10 ml d'H₂O i s'extreu amb 3 x 10 ml d'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen **F** mg d'un cru que conté una relació **153:197:26 G**, valorada per ¹H-RMN:

Exp.	A mg/mmol	B ml HCl ₃	C ml MeOH	D ml HCl	E h	F mg	G 153:197:26
2	20/0.024	0.50	4.2	0.10	1.20	15	2:7:1
3	20/0.024	0.50	4.2	0.25	1.20	20	2:6:2
4	20/0.024	0.50	4.2	0.20	22	17	2:1:7
5	20/0.024	0.55	4.4	0.32	22	21	2:0:8
6	10/0.012	0.50	4.4	0.20	4	8	3:4:3
7	10/0.012	0.50	4.4	0.20	7	6	3:2:5
8	10/0.012	0.50	4.4	0.11	15	7	3:1:6

Experiència 9

Es dissolen 872 mg (1.03 mmol) del cru de **196** en 44 ml CHCl₃ i 380 ml MeOH. S'addicionen 17 ml HCl 37% a 0 °C. Es deixa agitant durant 4 h a t. a. i s'elimina el MeOH mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'addiciona NaHCO₃ (s) fins a pH ≥ 7. S'addicionen 50 ml d'H₂O i s'extreu amb 3 x 250 ml s'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 1840 mg d'un cru que conté una relació **153:197:26** 2:3:5. Es purifica mitjançant cromatografia Flash Cy/AcOEt (2:1) obtenint-se les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	64	cc
F2	87	153 (50%) + 197 (%50%)*
F3	132	153 + 2 <i>R</i> -hidroxi-4-metilpentanoat de 3,4,6-triclorobenzoil
F4	1407	26 + imp

rdt de cromatografia = 95%

* Identificat mitjançant espectres de ¹H-RMN

▪ La fracció 2 s'identifica com una barreja 1:1 entre el producte d'interès **153** i **197**, les dades espectroscòpiques més significatives dels quals són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.97 (1H, dd, J = 4.5 i 9.3 Hz, H-C2' (**197**)), [4.69 (1H, t, J = 7.8 Hz) + 4.64 (1H, t, J = 8.1 Hz), αH-C17 (**153**) + αH-C17 (**197**)], 4.30 (1H, t, J = 6.9 Hz, H-C2' (**153**)), 4.05 [2H, m, βH-C3 (**153**) + βH-C3 (**197**)], 3.80-3.74 [2H, m, βH-C2 (**153**) + βH-C2 (**197**)], 2.69 [2H, dd, J = 3.0 i 12.3 Hz, αH-C5 (**153**) + αH-C5 (**197**)], 0.98-0.92 [12H, m, (5'-CH₃ + 6'-CH₃) (**153**) + (5'-CH₃ + 6'-CH₃) (**197**)], 0.80 [3H, s, 18-CH₃ (**153**)], 0.79 (3H, s, 18-CH₃ (**197**)), 0.77 [6H, s, 19-CH₃ (**153**) + 19-CH₃ (**197**)].

3.8. Funcionalitat 2*S*-hidroxil a C2'.

3.8.1. Síntesi de l'àcid 2*S*-hidroxi-4-metilpentanoic (**168**)

Es dissolen 500 mg (3.81 mmol) de L-Leu (**167**) en 3.25 ml d'àcid sulfúric 4 N i es refreda a 0 °C. A aquesta dissolució s'hi afegeixen, gota a gota, 2.6 ml d'una solució de 800 mg (11.6 mmol) de NaNO₂ en H₂O i es deixa agitar la mescla durant 24 h. S'afegeixen 10 ml d'H₂O i s'extreu la fase aquosa amb 7 x 50 ml de AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 741 mg d'un cru que per ¹H-RMN s'identifica, majoritàriament, com el compost **168**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (Pastilla KBr): 3423, 2956, 2931, 2904, 2875, 2702, 2625, 2485, 1716, 1467, 1226, 1137, 1078.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.30 (1H, dd, J = 5 i 8.5 Hz, H-C2), 1.92 (1H, m, H-C4), 1.64 (2H, m, H-C3), 0.97 (6H, d, J = 6.5 Hz, 5-CH₃+6-CH₃).

3.8.2. Intent de síntesi de l'àcid 2*S*-(ξ-tetrahidropirani)oxi-4-metilpentanoic (**172**)

Es dissolen 200 mg (1.51 mmol) de **168** i 408 mg (4.85 mmol) de DHP en 10 ml de CH₂Cl₂ sec i s'hi afegeixen 10 mg (0.06 mmol) de PTSA. Es deixa agitar la mescla a t.a. durant 22.5 h. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i es visualitza amb H₂SO₄ 50% i amb verd de bromocresol. S'afegeixen 20 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 2 x 25 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'eliminen els dissolvents orgànics a pressió reduïda i s'obtenen 291 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash AcOEt/Cy 1:8. S'obté un cru

complex que, per $^1\text{H-RMN}$ i per IR, s'identifica com a dímers i trímers de THP, lliures i formant èsters tetrahidropiranílics amb **168**, les dades espectroscòpiques més significatives dels quals es mostren a continuació. La relació cadena/THP és 1:2.5.

IR (Film evap. CHCl_3): 3580, 2944, 2870, 2732, 2661, 1797, 1748, 1728, 1467, 1353, 1202, 1124, 1076, 1035, 968.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.5 (1H, t, H-C1' de l'èster tetrahidropiranílic), 4.25 (1.1H, m, H-C2), 3.86 (5.5H, m, H-C6')

3.8.3. Síntesi de l'àcid 2*S*-(ξ -tetrahidropiraniloxi)-4-metilpentanoic (**172**)

3.8.3.1. Síntesi de PPTS

Es dissolen 2.85 g (16.5 mmol) de PTSA en 6.1 ml de Py. Es deixa agitant la solució a 40-60 °C durant 30 min. S'evapora l'excés de Py a pressió reduïda. El sòlid obtingut es purifica per recristal·lització amb acetona rendint 2.95 g d'un sòlid blanc, que per $^1\text{H-RMN}$ s'identifica com PPTS, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3COCD_3): 9.05 (2H, d, $J = 2.5$ Hz, H-C2' + H-C6'), 8.74 (1H, t, $J = 4$ Hz, H-C4'), 8.22 (2H, t, $J = 3.5$ Hz, H-C3' + H-C5'), 7.72 (2H, d, $J = 4$ Hz, H-C2 + H-C6), 7.18 (2H, d, $J = 4$ Hz, H-C3 + H-C5), 2.33 (3H, s, 7- CH_3).

3.8.3.2. Síntesi de l'àcid 2*S*-(ξ -tetrahidropiraniloxi)-4-metilpentanoic (**172**)

Es dissolen 202 mg (1.53 mmol) de **168** i 395 mg (4.70 mmol) de DHP en 10 ml de CH_2Cl_2 sec i s'hi afegeixen 20 mg (0.08 mmol) de PPTS. Es deixa agitar la mescla a t.a. durant 17.5 h. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i es visualitza amb H_2SO_4 50% i amb verd de bromocresol. S'afegeixen 20 ml de CH_2Cl_2 i es renta la fase orgànica amb 2 x 25 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO_4 anhidre. S'eliminen els dissolvents orgànics a pressió reduïda i s'obtenen 517 mg d'un cru que per $^1\text{H-RMN}$ s'identifica majoritàriament com el producte d'interès **172** però impurificat amb dímers de THP, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 3427, 3193, 2956, 2871, 2744, 2663, 1797, 1726, 1201, 1139, 1077, 1025.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.40 (1H, m, $\xi\text{H-C2}\cdot\text{THP}$), 4.05 (1H, m, $\xi\text{H-C2}\cdot\text{THP}$), 3.70 (2H, m, $\xi\text{H-C6}\cdot\text{THP}$), 3.54 (2H, m, $\xi\text{H-C6}\cdot\text{THP}$), 3.44 (2H, m, H-C3), 0.96 (6H, m, 5- CH_3 + 6- CH_3).

3.8.4. Síntesi de l'àcid 2*S*-acetoxi-4-metilpentanoic (**173**)

Es dissolen 500 mg (3.78 mmol) de l'àcid 2*S*-hidroxi-4-metilpentanoic (**168**) en 1.2 ml anhídrid acètic i s'addicionen 175 mg 4-(pirrolidin-1-il)piridina dissolts en 1.2 ml Py seca. Es deixa agitant a t.a., sota atmosfera d'argó i protegit de la llum durant 24 h. S'elimina la Py mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 724 mg d'un cru que correspon majoritàriament al compost d'interès, l'àcid 2*S*-acetoxi-4-metilpentanoic (**173**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.08 (1H, dd, $J = 3.9$ i 9.6 Hz, H-C2), 2.17 (3H, s, CH_3CO), 1.90-1.71 (1H, m, H-C3 + H-C4), 0.98 (6H, dd, $J = 6.3$ i 8.4 Hz, H-C5 + H-C6).

3.8.5. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi-17 β -(2'S-hidroxi-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**154**)

Es dissolen 705 mg (≈ 3.72 mmol) del cru de l'àcid 2S-acetoxi-4-metilpentanoic (**173**) en 41 ml de THF sec i s'hi afegeixen 500 μL (3.73 mmol) de Et_3N seca i 562 μL (3.73 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 15 ml de CH_2Cl_2 .

Es dissolen 317 mg de DMAP i 742 mg (~ 1.24 mmol) de **96** en 8 ml de CH_2Cl_2 . En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhidrid mixt en CH_2Cl_2 recentment preparada. La reacció es para a les 24 h afegint 100 ml de CH_2Cl_2 i es renta la fase orgànica amb 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NH_4Cl , 2 x 50 ml d' H_2O , 2 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO_3 i 40 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl . S'asseca la fase orgànica sobre MgSO_4 anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 1040 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **193**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.00 (1H, m, H-C2'), 4.63 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.27 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 4.08 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 2.53 (1H, m, $\alpha\text{H-C5}$), 0.94 (6H, dd, $J = 6.3$ i 7.8 Hz, 5'- CH_3 + 6'- CH_3), 0.78 (3H, s, 18- CH_3), 0.69 (3H, s, 19- CH_3).

3.8.6. Síntesi de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi-17 β -(2'S-hidroxi-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**154**)

Experiència 1

Es dissolen 1310 mg (≈ 1.24 mmol) del cru de **193** en 11 ml CHCl_3 i 88 ml MeOH. S'addicionen 6.4 ml HCl 37% a 0 °C. Es deixa agitant durant 24 h a t. a. i es para la reacció addicionant NaHCO_3 (s) fins a $\text{pH} \geq 7$. S'addicionen 50 ml d' H_2O i s'extreu amb 3 x 250 ml s'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 881 mg d'un cru que conté una relació **154:195:26** 2:0:98, mesurada per $^1\text{H-RMN}$.

Experiència 2

Es dissolen 930 mg (≈ 1.18 mmol) del cru de **193** en 10 ml CF_3COOH (85%) i se segueix la reacció per CCF AcOEt (100%). Al cap de 4 dies no es detecta producte de partida per CCF i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, afegint toluè per afavorir l'eliminació de l' H_2O . S'obtenen 1166 mg d'un cru en el que es detecta per $^1\text{H-RMN}$ una gran proporció de trifluoroacetats en els hidroxils a C2, C3 i/o C2'.

δ (ppm)	Acoblament	Assignació
4.83	t ($J = 8.4$ Hz)	$\alpha\text{H-C17}$
~ 4.0	varis senyals	formació d'esters
0.79, 0.80, 0.82, 0.85, 0.86, 0.87, 0.90	s	18- CH_3 + 19- CH_3

Hidròlisi de trifluoroacetats

700 mg del cru de l'experiència 2 anterior es dissolen en 210 ml de THF i s'afegeixen 400 mg de NaHCO₃ dissolts en 140 ml d'H₂O. Es deixa agitar a t.a. durant 0.5 h i, un cop finalitzada la reacció (seguiment per CCF AcOEt 100%) es realitzen extraccions amb AcOEt. La fase orgànica es renta amb una dissolució aquosa saturada de NaCl i s'asseca sobre MgSO₄ anhidre. Es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, obtenint-se 824 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash Cy/AcOEt (1:3), obtenint-se les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	320	cc
F2	109	192
F3	48	192 + 154
F4	40	154
F5	277	26 + imp

rdt de cromatografia = 95%.

▪ S'obté 2 α ,3 α -dihidroxí-17 β -trifluoroacetoxi-5 α -androstan-6-ona (**192**) amb un rdt del 37% des de **26**. Les dades espectroscòpiques més significatives de **192** són:

P.f.: 168 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3392, 2942, 1780, 1710, 1222, 1168, 758.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.83 (1H, dd, J = 7.5 i 9.0 Hz, α H-C17), 4.05 (1H, m, β H-C3), 3.80-3.74 (1H, m, β H-C2), 2.70 (1H, dd, J = 3.0 i 12.3 Hz, α H-C5), 0.85 (3H, s, 18-CH₃), 0.77 (3H, s, 19-CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 210.8/s C6, 157.3/s C1' (q_{C-F}, J = 41.8 Hz), 114.5/s C2' (q_{C-F}, J = 285.3 Hz), 86.2/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.5/d C9, 50.9/d C14, 50.8/d C5, 46.1/t C7, 43.6/s C13, 42.5/s C10, 40.2/t C1, 37.3/d C8, 36.2/t C12, 27.0/t C16, 26.3/t C4, 23.3/t C15, 20.7/t C11, 13.7/q C19, 12.0/q C18.

EM-AR: trobat 418.1962 [M]⁺, (calc. 418.1967, C₂₁H₂₉F₃O₅)

EM-IE: 418 ([M]⁺, 38), 403 ([M-CH₃]⁺, 45), 401 ([M-OH]⁺, 100), 400 ([M-H₂O]⁺, 55), 383 (47), 373 (43).

▪ S'obté 2 α ,3 α -dihidroxí-17 β -(2'*S*-hidroxí-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (**154**) amb un rdt del 13% des de **26**. Les dades espectroscòpiques més significatives de **154** són:

P.f.: 206 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3247, 2925, 1742, 1706, 1201.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.76 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.21-4.17 (1H, m, H-C2'), 4.06 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 3.81-3.72 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 2.68 (1H, dd, $J = 2.4$ i 12.9 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 0.96 (6H, dd, $J = 6.6$ i 3.0 Hz, $5'\text{-CH}_3 + 6'\text{-CH}_3$), 0.80 (3H, s, 18- CH_3), 0.77 (3H, s, 19- CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 211.0/s C6, 175.8/s C1', 83.4/d C17, 69.1/d C2', [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.6/d C9, 51.0/d C14, 50.8/d C5, 46.2/t C7, 43.8/t C3', 43.3/s C13, 42.5/s C10, 40.2/t C1, 37.4/d C8, 36.5/t C12, 27.3/t C16, 26.4/t C4, 24.6/d C4', 23.4/t C15, [21.8/q + 21.8/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.3/q C18.

EM-AR: trobat 436.2828 $[\text{M}]^+$, (calc. 436.2825, $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_6$)

EM-IE: 436 ($[\text{M}]^+$, 32), 421 ($[\text{M-CH}_3]^+$, 19), 419 ($[\text{M-OH}]^+$, 71), 418 ($[\text{M-H}_2\text{O}]^+$, 20), 305 (97), 287 (100), 269 (36).

3.9. Funcionalitat 2R- fluor a C2'

3.9.1. Síntesi de l'àcid 2R-fluoro-4-metilpentanoic (176)

A una dissolució a 0 °C de 3 ml de Py seca i 4.4 ml de HF-Py 70%, s'addicionen 500 mg (3.8 mmol) de D-Leucina (**166**). Seguidament s'afegeixen 0.40 g NaNO_2 (5.7 mmol) en 6 porcions i durant 1 h. Es calenta fins t.a. i es deixa agitar durant 6 h. S'aboca el cru de reacció sobre H_2O i el producte s'extreu amb 3 x 50 ml d' Et_2O i 3 x 50 ml d'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 340 mg d'un cru que s'identifica mitjançant espectres de $^1\text{H-RMN}$ com una barreja del compost d'interès (**176**, 53%) i l'àcid 2R-hidroxi-4-metilpentanoic (**174**, 13%) en una proporció 80:20. Per CCF no és possible visualitzar cap dels dos compostos formats, ni a 254 nm, ni emprant H_2SO_4 com agent revelador, ni verd de bromocresol, ni tampoc emprant dissolució d'àcid fosfomolibdic. Es decideix emprar directament aquest cru per a la següent etapa de reacció.

L'àcid **174** s'identifica per comparació amb mostra de referència i l'àcid **176** s'identifica a través de les següents dades espectroscòpiques més significatives:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.01 (1H, ddd, $J = 49.8, 9.3$ i 3.6 Hz, H-C2 (**176**)), 4.30 (1H, dd, $J = 8.2$ i 5.2 Hz, H-C2 (**174**)), 1.94-1.78 (4H, m, H-C3 (**176** + **174**)), 1.67-1.63 (2H, m, H-C4 (**176** + **174**)), [0.99 (6H, d, $J = 5.9$ Hz) + 0.95 (6H, d, $J = 5.9$ Hz), H-C5 + H-C6 (**176** + **174**)]

3.9.2 Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'R-fluoro-4'-metipentanoiloxi)-5 α -androstan-6-ona (202) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 340 mg del cru de **176** en 30 ml de THF sec i s'hi afegeixen 339 μL (2.53 mmol) de Et_3N seca i 382 μL (2.53 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 40 min. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 35 ml de CH_2Cl_2 .

Es dissolen 371 mg (2.90 mmol) de DMAP i 500 mg (≈ 1.20 mmol) de **96** en 10 ml de CH_2Cl_2 . En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhídrid mixt en CH_2Cl_2 recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). Passades 24 h gairebé

no s'aprecia producte de partida i es para la reacció. S'afegeixen 50 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 3 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 50 ml d'H₂O, 3 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃, i 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 960 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **202**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.01 (1H, m, H-C2'), 4.74 (1H, t, J = 7.5 Hz, αH-C17), 4.28 (1H, m, βH-C3), 4.10 (1H, m, βH-C2), 2.56 (1H, dd, J = 2 i 6 Hz, αH-C5), [0.99 (3H, d, J = 6.0 Hz) + 0.96 (3H, d, J = 6.0 Hz), 5'-CH₃+6'-CH₃], 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 0.69 (3H, s, 19-CH₃).

3.9.3. Síntesi de 2α,3α-dihidroxi-17β-(2'R-fluoro-4'-metipentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**161**)

Es dissolen 960 mg (~1.20 mmol) del cru de **202** en 16 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1). Transcorreguts 30 min de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeixen 30 ml de toluè i s'eliminen a pressió reduïda. S'obtenen 1023 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 2:1) obtenint-se les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	462	cc
F2	64	161 + imp.
F3	141	161
F4	15	161 + imp.
F5	63	cc

rdt de cromatografia = 87%.

El compost 2α,3α-dihidroxi-17β-(2'R-fluoro-4'-metipentanoiloxi)-5α-androstan-6-ona (**161**) s'obté amb un rdt del 27% des del compost **26**.

Amb la finalitat d'avaluar l'activitat de **161** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, els 141 mg de la fracció 3 es recristal·litzen amb EtOH/H₂O en fred, obtenint-se 113 mg de **161** (rdt recristal·lització: 80%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 141 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3397, 2945, 2874, 1760, 1736, 1710, 1278, 758.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.03 (1H, ddd, J = 49.5, 8.7 i 3.6 Hz, H-C2'), 4.75 (1H, t, J = 8.4 Hz, αH-C17), 4.05 (1H, m, βH-C3), 3.80-3.75 (1H, m, βH-C2), 2.72 (1H, dd, J = 3.3 i 12.3 Hz, αH-C5), 2.30 (1H, dd, J = 4.2 i 12.3 Hz, βH-C7), [0.98 (3H, d, J = 6.3 Hz) + 0.97 (3H, d, J = 6.3 Hz), 5'-CH₃+6'-CH₃], 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 0.77 (3H, s, 19-CH₃).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 211.1/s C6, 170.2/s (d, $J_{\text{C-F}} = 24.1$ Hz) C1', 87.8/d (d, $J_{\text{C-F}} = 183.3$ Hz) C2', 83.1/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.6/d C9, 51.0/d C14, 50.7/d C5, 46.2/t C7, 43.3/s C13, 42.5/s C10, 41.2/t (d, $J_{\text{C-F}} = 20.7$ Hz) C3', 40.2/t C1, 37.4/d C8, 36.4/t C12, 27.3/t C16, 26.3/t C4, 24.5/d (d, $J_{\text{C-F}} = 2.3$ Hz) C4', 23.3/t C15, [23.1/q + 21.8/q, C5' + C6'], 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.2/q C18.

EM-AR: trobat 438.2777 $[\text{M}]^+$, (calc. 438.2781, $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{FO}_5$)

EM-IE: 438 ($[\text{M}]^+$, 38), 423 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 46), 421 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$, 100), 420 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 49), 403 (41), 305 (95), 287 (93), 269 (45).

4. SÍNTESI DE BRs ANDROSTÀNICS AMB CADENES COMERCIALS ESCOLLIDES PER MÈTODES COMPUTACIONALS

4.1. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'R-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (211)

4.1.1. Síntesi de l'àcid 2R-(tetrahidropiranyl-2'- ξ -iloxi)-ciclohexanacètic (215)

Es dissolen 300 mg (1.90 mmol) de l'àcid 2R-ciclohexilhidroxiacètic (**205**) en 15 ml de CH_2Cl_2 i s'addicionen 50 mg (0.20 mmol) de PPTS i 600 mg (6.92 mmol) de 3,4-dihidro-2H-pirà. Es deixa agitant a t.a. i en atmosfera inerta d'argó durant 12 h (CCF: AcOEt/Cy (1:1), revel·lant amb verd de bromocresol). S'addicionen 25 ml de CH_2Cl_2 i es renta amb una dissolució aquosa saturada de NaCl. La fase orgànica s'asseca sobre MgSO_4 anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 677 mg d'un cru de reacció que es purifica mitjançant cromatografia flash (SiO_2 , Cy/AcOEt (10:1)). Les fraccions obtingudes es mostren en la següent taula:

Fraccions	Quantitat (mg)	Composició
F1	444	217
F2	62	216
F3	7	215
F4	104	c.c.

rdt de columna = 91%.

▪ La fracció 1 s'identifica com a 2R-(tetrahidropiranyl-2'- ξ -iloxi)-ciclohexanacetat de tetrahidropiranyl (**217**) amb un rdt del 72%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 2929, 1751, 1124, 1036, 1022.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 6.09 (1H, m, $-\text{COOCH}(\text{THP})$), 4.65 (1H, m, $\xi\text{H-C2}\cdot\text{THP}$).

▪ La fracció 2 s'identifica com a 2R-hidroxiciclohexanacetat de tetrahidropiranyl (**216**) amb un rdt del 10%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 3440, 2933, 2854, 1715.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 6.10 (1H, m, $-\text{COO}\underline{\text{T}}\text{HP}$), 4.08 (1H, m, H-C2).

▪ La fracció 3 s'identifica com a àcid 2*R*-(tetrahidropiranyl-2'- ξ -iloxi)-ciclohexanacètic (**215**) amb un rdt del 2%, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 9.78 (2H, s, COOH), 4.58 (1H, m, $\xi\text{H-C2}\cdot\text{THP}$), 4.29 (1H, t, $J=6.9$ Hz, $\xi\text{H-C2}\cdot\text{THP}$), 2.46-2.41 (2H, m, H-C2).

Per tal d'augmentar el rdt de reacció del producte d'interès (**215**), s'han realitzat varies proves modificant algunes de les condicions de reacció:

- Experiència 1: relació estequiomètrica entre substrat (**205**) i DHP.
- Experiència 2: temperatura de 0 °C.
- Experiència 3: reduint la proporció de catalitzador.
- Experiència 4: afegint piridina per tal de controlar el pH del cru de reacció.

Es dissolen **A** mg (**B** mmol) de l'àcid 2*R*-ciclohexil-2-hidroxiacètic (**205**) en **C** ml de CH_2Cl_2 i s'addicionen **D** mg de PPTS, **E** ml (**F** mmol) de DHP i **G** gotes de piridina a **H** °C. Es deixa agitant en atmosfera inerta d'argó durant 12 h.

Exp.	A	B	C	D	E	F	G	H
1	300	1.90	25	37	0.18	1.90	0	t.a.
2	30	0.19	5	4	0.02	0.19	0	0 °C
3	30	0.19	5	0.5	0.02	0.19	0	t.a.
4	30	0.19	5	4	0.02	0.19	1	t.a.

Tant per CCF, com mitjançant espectre de ressonància magnètica de protó, s'ha detectat en les tres primeres experiències, la formació de l'èster de tetrahidropiranyl en una relació ester/producte d'interès en cap cas inferior a 70:30. En l'experiència 4, s'ha obtingut un cru complex on es poden detectar traces del producte d'interès.

4.1.2. Síntesi de l'àcid 2*R*-acetoxi-2-ciclohexil-acètic (**218**)

Es dissolen 600 mg de l'àcid 2*R*-ciclohexil-2'-hidroxiacètic (**205**, 3.79 mmol) en 1.2 ml anhidrid acètic i s'addicionen 175 mg 4-(pirrolidin-1-il)piridina dissolts en 1.2 ml Py (seca sobre CaH_2). Es deixa agitant a t.a., sota atmosfera d'argó i protegit de la llum durant 25 h. S'elimina la Py mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 708 mg d'un cru que es purifica mitjançant cromatografia flash Cy/AcOEt (3:1), obtenint-se 634 mg de l'àcid 2*R*-acetoxi-2-ciclohexilacètic (**218**, rdt = 83%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 3072, 2931, 2856, 1744, 1238

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.86 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-C2), 2.15 (3H, s, CH_3CO), 1.91 (1H, m, H-C3), 1.79-1.17 (10H, m, $-(\text{CH}_2)_5$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 175.3/s C1, 170.7/s CH_3COO , 76.0/d C2, 39.3/d C3, [29.1/t + 27.5/t + 26.0/t + 25.9/t + 25.9/t, $-(\text{CH}_2)_5$], 20.6/q CH_3COO .

4.1.3. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'R-acetoxi-2'-ciclohexilacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (**220**) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 634 mg (3.16 mmol) de l'àcid 2R-acetoxi-2-ciclohexilacètic (**218**) en 25 ml de THF sec i s'hi afegeixen 425 μ L (3.16 mmol) de Et₃N seca i 480 μ L (3.16 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 15 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 480 mg de DMAP i 900 mg (~1.56 mmol) de l'acetal **96** en 12 ml de CH₂Cl₂. En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhidrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i aquesta es para a les 6 h. S'afegeixen 50 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 3 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 3 x 50 ml d'H₂O, 3 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO₃ i 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 1516 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **220**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.77 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-C2'), 4.68 (1H, t, J = 8.4 Hz, α H-C17), 4.31-4.27 (1H, m, β H-C3), 4.13-4.08 (1H, m, β H-C2), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.68 (3H, s, 19-CH₃).

4.1.4. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'R-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (**211**) emprant CF₃COOH

Es dissolen **A** mg/mmol del cru de **220** en **B** ml d'àcid trifluoroacètic (%) i es deixa agitar a t.a. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda al cap de **C** h de reacció. S'afegeixen 10 ml de toluè i s'eliminen a pressió reduïda. S'obtenen **D** mg d'un cru que conté una relació **211:222:26 E**, valorada per ¹H-RMN)

Exp.	A mg/mmol	B ml CH ₃ COOH (%)	C h	D mg	E 211:222:26
1	10/0.01	2 ml (50%)	48	12	1:1:0
2	10/0.01	8 ml (80%)	60	10	1:1:0
3	10/0.01	5 ml (100%)	20	12	cc

4.1.5. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'R-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (**211**) emprant HCl

Experiències prèvies

Es dissolen **A** mg/mmol del cru de **220** en **B** μ L CHCl₃, **C** μ L MeOH i **D** μ L ¹PrOH. S'addicionen **E** μ L HCl 37%. S'agita durant **F** h a t. a. i es para la reacció addicionant NaHCO₃ (s) fins a pH \geq 7. S'addicionen 10 ml d'H₂O i s'extreu amb 3 x 10 ml d'AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen **G** mg d'un cru que conté una relació **211:222:26 H**, mesurada per ¹H-RMN:

Exp.	A mg/mmol	B $\mu\text{L CHCl}_3$	C $\mu\text{L MeOH}$	D $\mu\text{L }^i\text{PrOH}$	E $\mu\text{L HCl}$	F h	G mg	H 211:222:26
1	10/0.01	100	800	0	60	2	25	0:1:0
2	10/0.01	300	2400	0	60	2	15	0:1:0
3	10/0.01	100	800	0	60	48	10	4:1:0
4	10/0.01	0	0	1000	80	2	12	0:1:0
5	10/0.01	100	800	0	150	20	25	7:1:3
6	10/0.01	0	0	1000	250	20	12	2:2:1

Experiència a escala mitjana

Es dissolen 1287 mg de (~1.32 mmol) de **220** en 13 ml CHCl_3 i s'hi addicionen 7.5 ml HCl 37% dissolts en 103 ml MeOH a 0 °C. Es deixa agitant a 0 °C durant 3 h i després es calenta lentament fins a t.a. S'agita durant 44 h i es para la reacció addicionant dissolució aquosa saturada de NaHCO_3 . S'elimina el MeOH per destil·lació a pressió reduïda, s'addicionen 100 ml H_2O i s'extreu la fase aquosa amb 3 x 50 ml AcOEt. S'ajunten fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO_4 anhidre. S'elimina el dissolvent i s'obté un cru de 1028 mg que es valora mitjançant espectres de ^1H -RMN com una barreja **211:222:26** 6.8:1:3.3. Després de purificació per cromatografia flash Cy/AcOEt (1:5), s'aïllen les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	633	cc
F2	167	211
F3	133	26 + imp
F4	11	cc

rdt de cromatografia = 92%.

El compost 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'*R*-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (**211**) s'ha obtingut amb un rdt del 27% des del compost **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **211** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 167 mg d'aquest es recristal·litzen amb EtOH/ H_2O en fred, obtenint-se 140 mg de **211** (rdt recristal·lització: 84%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 216 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3427, 2921, 2853, 1725, 1710, 1211, 755

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 4.71 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.05 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 4.01 (1H, m, H-C2'), 3.79-3.75 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 2.73-2.67 (2H, m, $\alpha\text{H-C5} + \beta\text{H-C7}$), 0.81 (3H, s, 18- CH_3), 0.77 (3H, s, 19- CH_3).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 211.1/s C6, 174.7/s C1', 83.6/d C17, 74.7/d C2', [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.6/d C9, 51.0/d C14, 50.8/d C5, 46.2/t C7, 43.2/s C13, 42.6/s C10, 42.1/t C3', 40.2/t C1, 37.4/d C8, 36.4/t C12, [29.1/t + 26.5/t + 26.3/t + 26.1/t + 26.1/t, anell $-(\text{CH}_2)_5-$], 27.5/t C16, 26.3/t C4, 23.4/t C15, 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.3/q C18.

EM-AR: trobat 463.3059 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 463.3060, $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6$)

EM-IQ: 463 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 35), 462 ($[\text{M}]^+$, 9), 445 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$, 67), 306 (32), 305 (100), 287 (78), 269 (31), 95 (35).

4.2. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'S-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (212)

4.2.1. Síntesi de l'àcid 2S-acetoxi-2-ciclohexilacètic (219)

Es dissolen 500 mg de l'àcid 2S-ciclohexil-2-hidroxiacètic (**206**, 3.16 mmol) en 1.0 ml d'anhidrid acètic i s'addicionen 146 mg 4-(pirrolidin-1-il)piridina dissolts en 1.0 ml Py seca. Es deixa agitant a t.a., sota atmosfera d'argó i protegit de la llum durant 24 h. S'elimina la Py mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 709 mg d'un cru que correspon majoritàriament al compost d'interès àcid 2S-acetoxi-2-ciclohexilacètic (**218**), amb les mateixes dades espectroscòpiques que el seu enantiòmer l'àcid 2S-acetoxi-2-ciclohexilacètic (**219**), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 4.86 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-C2), 2.15 (3H, s, CH_3CO), 1.91 (1H, m, H-C3), 1.79-1.17 (10H, m, $-(\text{CH}_2)_5$).

4.2.2. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(2'S-acetoxi-2'-ciclohexilacetoxi-)-5 α -androstan-6-ona (221) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 634 mg (3.16 mmol) de l'àcid 2S-acetoxi-2-ciclohexilacètic (**219**) en 25 ml de THF sec i s'hi afegeixen 425 μL (3.16 mmol) de Et_3N seca i 480 μL (3.16 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (**180**). Es deixa agitar la mescla a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 15 ml de CH_2Cl_2 .

Es dissolen 377 mg de DMAP i 629 mg (~1.24 mmol) de **96** en 10 ml de CH_2Cl_2 . En condicions de t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix a la mescla la solució d'anhidrid mixt en CH_2Cl_2 recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) i aquesta es para a les 24 h. S'afegeixen 50 ml de CH_2Cl_2 i es renta la fase orgànica amb 3 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NH_4Cl , 3 x 50 ml d' H_2O , 3 x 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaHCO_3 i 50 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl . S'asseca la fase orgànica sobre MgSO_4 anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obtenen 1290 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **221**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 4.77 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-C2'), 4.78-4.67 (1H, m, αH -C17), 4.29-4.21 (1H, m, βH -C3), 4.19-4.11 (1H, m, βH -C2), 0.79 (3H, s, 18- CH_3), 0.68 (3H, s, 19- CH_3).

4.2.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'S-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (**212**)

Es dissolen 1290 mg del cru de **212** en 11 ml CHCl₃ i s'addicionen 6.4 ml HCl al 37% dissolts en 88 ml MeOH a 0 ° C. Es deixa agitant a 0 ° C durant 2 h i després es calenta fins t.a i s'agita durant 44 h a t. a. i es para la reacció addicionant NaHCO₃ (s) fins a pH \geq 7. S'addicionen 100 ml H₂O i s'extreu la fase aquosa amb 3 x 50 ml AcOEt. S'ajunten fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent mitjançant destil.lació a pressió reduïda, obtenint-se 875 mg d'un cru que es valora mitjançant espectres de ¹H-RMN com una barreja **212/223/26** 13:1:6. Després d'una purificació mitjançant cromatografia flash Cy/AcOEt (1:2), s'aïllen les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	604	cc
F2	197	212
F3	45	26 + 223
F4	10	cc

rdt de cromatografia = 98%.

El compost 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(2'S-ciclohexil-2'-hidroxiacetoxi)-5 α -androstan-6-ona (**212**) s'ha obtingut amb un rdt del 34% des de **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **212** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 193 mg d'aquest es recristal.litzen amb EtOH/H₂O en fred, obtenint-se 89 mg de **212** (rdt recristal.lització = 46%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

P.f.: 167 °C

IR (film evap. CHCl₃): 3435, 2931, 2853, 1722, 1710, 1262, 755

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.77 (1H, t, J = 8.5 Hz, α H-C17), 4.06-4.02 (2H, m, H-C2' + β H-C3), 3.80-3.74 (1H, m, H-C2), 2.73-2.68 (2H, m, α H-C5 + β H-C7), 2.35-2.29 (1H, dd, J = 4.5 Hz, 12.9 Hz, H α -C7), 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 0.77 (3H, s, 19-CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 211.0/s C6, 174.7/s C1', 83.4/d C17, 74.9/d C2', [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.6/d C9, 51.0/d C14, 50.7/d C5, 46.2/t C7, 43.3/s C13, 42.5/s C10, 42.2/t C3', 40.2/t C1, 37.4/d C8, 36.5/t C12, [29.2/t + 26.5/t + 26.4/t + 26.1/t + 26.1/t, anell -(CH₂)₅-], 27.3/t C16, 26.4/t C4, 23.3/t C15, 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.3/q C18.

EM-AR: trobat 463.3056 [M+H]⁺ (calc. 463.3059, C₂₇H₄₂O₆)

EM-IQ: 463 ([M+H]⁺, 70), 462 ([M]⁺, 24), 446 (81), 445 ([M-OH]⁺, 94), 427 (55), 306 (94), 305 (100), 303 (34), 288 (70), 287 (59), 95 (62).

4.3. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(3'-amino-3'-ciclohexilpropioniloxi)-5 α -androstan-6-ona (213)

4.3.1. Intent de síntesi de l'àcid 3-ciclohexil-3-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)propanoic (224)

Es dissolen 166 mg (0.64 mmol) de Fmoc-Cl en 5 ml de dioxà i s'afegeix a una dissolució de 100 mg (0.58 mmol) de l'àcid 3-amino-3-ciclohexilpropanoic en 5 ml de NaOH (1 M) a 0 °C. Es deixa agitar i calentar fins a t.a. durant 4 h. S'aboca el cru de reacció sobre 10 ml d'H₂O i s'elimina el dioxà mitjançant destil·lació a pressió reduïda. La fase aquosa es renta amb Et₂O, s'acidifica amb HCl (6 N) a 0 °C fins a pH = 2 i es torna a extreure amb Et₂O. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. Es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 73 mg d'un cru on només s'identifiquen senyals del grup protector però no de l'amina d'interès protegida.

4.3.2. Síntesi de l'àcid 3-ciclohexil-3-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)propanoic (224)

Es dissolen 925 mg (3.57 mmol) de Fmoc-Cl en 30 ml de dioxà i s'afegeix a una dissolució de 500 mg (2.92 mmol) de l'àcid 3-amino-3-ciclohexilpropanoic i 725 mg de K₂CO₃ en 30 ml d'H₂O a 0 °C. Es deixa agitar i calentar fins a t.a. durant 4 h. S'aboca el cru de reacció sobre 50 ml d'H₂O i s'elimina el dioxà mitjançant destil·lació a pressió reduïda. La fase aquosa s'extreu amb Et₂O, s'acidifica amb HCl (6 N) a 0 °C fins a pH = 2 i es torna a extreure amb Et₂O i AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. Es filtra i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 1343 mg d'un cru que correspon majoritàriament al compost d'interès, l'àcid 3R-ciclohexil-3-N-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)propanoic (224, rdt = 96%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (pastilla de KBr): 3316, 3063, 2921, 2852, 1702, 1544, 744

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): 7.77-7.28 (8H, m, aromàtics), 5.12 (1H, d, J = 9.6 Hz, NH), 4.41 (2H, d, J = 6.6 Hz, NHCOO-CH₂-), 4.19 (1H, t, J = 6.6 Hz, NHCOO-CH₂-CH-), 3.80 (1H, m, H-C3), 2.58 (2H, m, H-C2), 1.17-0.88 (10H, m, -(CH₂)₅).

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-d₆): 172.6/s C1, 155.4/s NHCO, [143.8/s + 143.6/s + 140.5/s + 140.5/s, aromàtics-C], [127.4/d, 126.9/d + 126.8/d + 125.1/d + 119.9/d + 119.9/d, aromàtics-CH], 65.0/t OCH₂, 52.4/d C3, 46.8/d OCH₂-CH-, 41.7/d C4, 36.8/t C2, [29.1/t + 28.1/t + 26.0/t + 25.7/t + 25.7/t, -(CH₂)₅].

4.3.3. Síntesi de 2 α ,3 α -isopropilidendioxi-17 β -(3'-ciclohexil-3'-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)propioniloxi)-5 α -androstan-6-ona (225) mitjançant l'esterificació de Yamaguchi

Es dissolen 1572 mg (3.43 mmol) de l'àcid 3-ciclohexil-3-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)propanoic (224) en 38 ml de THF sec i s'hi afegeixen 461 μ L (3.43 mmol) de Et₃N seca i 518 μ L (3.43 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (180). S'agita a t.a. i sota atmosfera inerta durant 1 h. Es filtra el clorhidrat de trietilamina, s'elimina el THF a pressió reduïda i es dissol l'oli resultant en 35 ml de CH₂Cl₂.

Es dissolen 300 mg de DMAP i 615 mg (~1.24 mmol) de **96** en 8 ml de CH₂Cl₂. A t.a. i atmosfera inerta, s'afegeix la solució d'anhídrid mixt en CH₂Cl₂ recentment preparada. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 1:2) i s'agita tota la nit. S'afegeixen 100 ml de CH₂Cl₂ i es renta la fase orgànica amb 3 x 100 ml d'una solució aquosa saturada de NH₄Cl, 3 x 100 ml d'H₂O, 3 x 100 ml d'una solució

aquosa saturada de NaHCO₃ i 100 ml d'una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre MgSO₄ anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda, obtenint-se 3075 mg d'un cru taronja que correspon majoritàriament al compost **225**, les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.78-7.27 (16H, m, aromàtics), 5.22 (1H, d, J = 9.9 Hz, ξNH), 5.17 (1H, J = 9.6 Hz, ξNH), 4.66-4.63 (2H, m, αH-C17), 4.49-4.36 (4H, m, NHCOO-CH₂-), 4.29-4.21 (2H, m, βH-C3), 4.22-4.11 (4H, m, NHCOO-CH₂-CH- + βH-C2), 3.81-3.75 (2H, m, H-C3'), 2.54 (4H, m, H-C2'), [0.76 (3H, s) + 0.75 (3H, s), 18-CH₃], 0.67 (6H, s, 19-CH₃).

4.3.4. Síntesi de 2α,3α-dihidroxi-17β-(3'-ciclohexil-3'-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)- propionil-oxi)-5α-androstan-6-ona (**226**)

Es dissolen 3040 mg (~1.20 mmol) del cru de **225** en 40 ml d'àcid trifluoroacètic 50% i es deixa agitar a 0 °C. El seguiment de la reacció es fa per CCF (AcOEt/Cy 2:1). S'observa que al cap d'1 h de reacció ha desaparegut el producte de partida. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda, s'afegeixen 20 ml de toluè per tal d'eliminar l'H₂O per formació de l'azeòtrop i s'eliminen els dissolvents mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 2656 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (AcOEt/Cy 1:4, 1:1, 2:1, 3:1, 1:0) aïllant-se les següents fraccions:

Fracció	Quantitat (mg)	Composició
F1	3	cc
F2	923	224 + imp
F3	380	224
F4	559	cc
F5	345	226
F6	111	cc

rdt de cromatografia = 95%.

El compost 2α,3α-dihidroxi-17β-(3'-ciclohexil-3'-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino) propionil-oxi)-5α-androstan-6-ona (**226**) s'ha obtingut amb un rdt del 40% des del compost **26**.

Per tal d'avaluar l'activitat de **226** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 345 mg d'aquest es recristal·litzen amb etanol/H₂O en fred, obtenint-se 280 mg de **226** (rdt recristal·lització: 81%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl₃): 3433, 3355, 2930, 2853, 1708, 1450, 1247, 758, 741

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.78-7.28 (16H, m, aromàtics), 5.22 (1H, d, J = 9.9 Hz, ξNH), 5.17 (1H, J = 9.6 Hz, ξNH), 4.65 (2H, dd, J = 8.4 i 16.5 Hz, αH-C17), 4.46-4.31 (4H, m, NHCOO-CH₂-), 4.20 (2H, t, J = 6.8 Hz, NHCOO-CH₂-CH-), 4.04 (2H, m, βH-C3), 3.81-3.73 (4H, m, βH-C2 + H-C3'), 2.67 (2H, m, αH-C5), 2.56-2.53 (4H, m, H-C2'), 0.77 (6H, s, 19-CH₃), [0.75 (3H, s) + 0.73 (3H, s), 18-CH₃]

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 211.2/s C6, 171.7/s C1', 155.8/s NHCO , [143.8/s + 143.8/s + 141.2/s, aromàtics-C], [127.6/d + 127.6/d + 126.9/d + 125.1/d + 125.0/d + 124.9/d + 119.9/d, aromàtics-CH], [82.5/d + 82.4/d, C17], [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 66.6/t OCH_2 , 53.6/d C9, [52.9/d + 53.0/d, C3'], 51.1/d C14, 50.7/d C5, 47.4/d OCH_2CH , 46.2/t C7, 43.1/s C13, 42.6/s C10, [41.6/t + 41.5/t, C4'], 40.2/t C1, 37.4/d C8, 37.1/t C12, [36.4/t + 36.5/t, C2'], [29.8/t + 29.8/t + 29.1/t + 26.3/t + 26.1/t + 26.0/t, anell - $(\text{CH}_2)_5$ -], 27.3/t C16, 26.3/t C4, 23.4/t C15, 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.3/q C18.

EM-ESI-TOF: 698 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 41), 477 (29), 476 (100), 432 (29), 324 (46), 307 (42).

4.3.5. Síntesi de 2 α ,3 α -dihidroxi-17 β -(3'-amino-3'-ciclohexilpropioniloxi)-5 α -androstan-6-ona (**213**)

230 mg de **226** (0.33 mmol) es tracten amb 23 ml DMF/piperidina (20%) i es deixa agitar durant 45 min. S'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda, s'afegeix H_2O i s'extreu amb AcOEt. La fase aquosa s'acidula amb CF_3COOH (50%) i es torna a extreure amb AcOEt. S'ajunten les fases orgàniques i s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 1129 mg d'un cru que es purifica mitjançant cromatografia flash (MeCOMe/AcOEt, 1:1). La fracció que conté la amina d'interès (475 mg) es tracta amb EtOH/ H_2O en fred durant $\frac{1}{2}$ h. S'elimina l'EtOH mitjançant destil·lació a pressió reduïda i s'extreu amb AcOEt. La fase orgànica es renta successivament amb dissolucions aquoses saturades de NaHCO_3 i NaCl. S'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda i s'obtenen 146 mg de **213** (rdt = 93%)

Per tal d'avaluar l'activitat de **213** en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, 145 mg d'aquest es recristal·litzen amb etanol/ H_2O en fred, obtenint-se 97 mg de **213** (rdt recristal·lització: 67%), les dades espectroscòpiques més significatives del qual són:

IR (film evap. CHCl_3): 3382, 2928, 2852, 1727, 1710, 1015, 755

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 4.68 (1H, t, J = 8.3 Hz, $\alpha\text{H-C17}$), 4.05 (1H, m, $\beta\text{H-C3}$), 3.78-3.73 (1H, m, $\beta\text{H-C2}$), 3.00-2.95 (1H, m, H-C3'), 2.69 (1H, dd, J = 3.0 i 12.6 Hz, $\alpha\text{H-C5}$), 2.53-2.46 (1H, m, $\beta\text{H-C7}$), 0.79 (3H, s, 18- CH_3), 0.77 (3H, s, 19- CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 211.3/s C6, 173.0/s C1', 82.2/d C17, [68.3/d + 68.2/d, C2 + C3], 53.7/d C9, [53.2/d + 53.1/d, C3'], 51.1/d C14, 50.8/d C5, 46.2/t C7, [43.7/d + 43.6/d, C4'], 43.1/s C13, 42.6/s C10, 40.3/t C1, [40.1/t + 40.0/t, C2'], 37.5/d C8, 36.6/t C12, [29.4/t + 28.4/t + 27.4/t + 26.5/t + 26.4/t, anell - $(\text{CH}_2)_5$ -], 27.6/t C16, 26.4/t C4, 23.4/t C15, 20.8/t C11, 13.7/q C19, 12.3/q C18.

EM-AR: trobat 476.3382 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 476.3376, $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{NO}_5$)

EM-IQ: 476 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 30), 475 ($[\text{M}]^+$, 2), 458 ($[\text{M-OH}]^+$, 21), 179 (23), 154 (23), 115 (23), 112 (21), 87 (77), 85 (100), 79 (24).

G. BIBLIOGRAFIA

1. Gray, W. M. Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *PLoS Biology*, **2004**, 2, 1270-1273.
2. Johri, M. M.; Mitra, D. Action of Plant Hormones. *Current Science*, **2001**, 80, 199-205.
3. Hofmann, A. Auxin, Gibberellic Acid and Ethylene. *Praxis der Naturwissenschaften, Biologie in der Schule*, **2005**, 54, 28-31.
4. Seitz, H. U. Plant Hormones Control Growth and Development. *Praxis der Naturwissenschaften, Biologie in der Schule*, **2005**, 54, 1-5.
5. Latimer, J. G. Trends and Uses of Plant Growth Regulators on Herbaceous Perennials. *Proceedings - Plant Growth Regulation Society of America*, **2004**, 31st, 1-4.
6. Stover, E. W.; Greene, D. W. Environmental Effects on the Performance of Foliar Applied Plant Growth Regulators: A Review Focusing on Tree Fruits. *HortTechnology*, **2005**, 15, 214-221.
7. Rajala, A. Plant Growth Regulators to Manipulate Oat Stands. *Agricultural and Food Science*, **2004**, 13, 186-197.
8. Cutler, Horance G.; Yokota, T., Adam, Guenter. *ACS Symposium Series*, **1991**, 474, 358.
9. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; De Groot, A. E. *Brassinosteroids: A new class of plant hormones*; Academic Press: EUA, **1998**; pp.464.
10. Sakurai, A.; Yokota, T.; Clouse, S. D. *Brassinosteroids. Steroidal plant hormones*; Springer: Tokyo, **1999**; pp.254.
11. Bajguz, A.; Tretyn, A. The Chemical Characteristic and Distribution of Brassinosteroids in Plants. *Phytochemistry (Elsevier)*, **2003**, 62, 1027-1046.
12. Clouse, S. D.; Sasse, J. M. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1998**, 49, 427-451.
13. Takatsuto, S. Brassinosteroids: Distribution in Plants, Bioassays and Microanalysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, **1994**, 658, 3-15.
14. Braun, P.; Wild, A. The Influence of Brassinosteroid on Growth and Parameters of Photosynthesis of Wheat and Mustard Plants. *Journal of Plant Physiology*, **1984**, 116, 189-196.
15. Haubrick, L. L.; Assmann, S. M. Brassinosteroids and Plant Function: Some Clues, More Puzzles. *Plant, Cell and Environment*, **2006**, 29, 446-457.
16. Altmann, T. Molecular Physiology of Brassinosteroids Revealed by the Analysis of Mutants. *Planta*, **1999**, 208, 1-11.
17. Khripach, V.; Zhabinskii, V., de Groot, A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany (London)*, **2000**, 86, 441-447.
18. Sasse, J. Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update. *Journal of Plant Growth Regulation*, **2003**, 22, 276-288.

19. Cutler, H. G. Brassinosteroids Through the Looking Glass. An Appraisal. *ACS Symposium Series*, **1991**, 474, 334-345.
20. www.hhmi.org/news/chory20060504.html, 2-11-2006.
21. Runkova, L. V. Effect of Growth Regulators on Ornamental Plants. *Nauka, Moscow (USSR)*, **1985**, 150.
22. Tambe, T. B. Effect of Gibberellic Acid in Combination With Brassinosteroid on Berry Size, Yield and Quality of Thompson Seedless Grapes. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*, **2002**, 27, 151-153.
23. Bhat, Z. A.; Srihari, D., Reddy, Y. N. Effect of New Generation Growth Regulators Brassinosteroid and CPPU Along With Benzyladenine on Quality of Seedless Grape CV Flame Seedless for Export. *Environment and Ecology*, **2004**, 22, 52-55.
24. Bhat, Z. A.; Srihari, D., Reddy, Y. N. Influence of Brassinosteroid and CPPU Alongwith BA on Brix: Acid Ratio and Brix Yield in Grape Cv. Flame Seedless. *Annals of Biology (Hisar, India)*, **2004**, 20, 75-77.
25. Clouse, S. D. Recent Advances in Brassinosteroid Research: From Molecular Mechanisms to Practical Applications. *Journal of Plant Growth Regulation*, **2003**, 22, 273-275.
26. Hamada, K. Brassinolide in Crop Cultivation. *FFTC Book Series*, **1986**, 34, 188-197.
27. Mandava, N. B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1988**, 39, 23-52.
28. Fujioka, S.; Sakurai, A. Brassinosteroids. *Natural Product Reports*, **1997**, 14, 1-10.
29. Anuradha, S.; Rao, S. S. R. Effect of Brassinosteroids on Salinity Stress Induced Inhibition of Seed Germination and Seedling Growth of Rice (*Oryza Sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, **2001**, 33, 151-153.
30. Sasse, J.; Smith, R., Hudson, I. Effect of 24-Epibrassinolide on Germination of Seeds of *Eucalyptus Camaldulensis* in Saline Conditions. *Proceedings of the Plant Growth Regulator Society of America*, **1995**, 22nd, 136-141.
31. Dhaubhadel, S.; Chaudhary, S.; Dobinson, K. F., Krishna, P. Treatment With 24-Epibrassinolide, a Brassinosteroid, Increases the Basic Thermotolerance of Brassica Napus and Tomato Seedlings. *Plant Molecular Biology*, **1999**, 40, 333-342.
32. Wilen, R. W.; Sacco, M.; Gusta, L. V., Krishna, P. Effects of 24-Epibrassinolide on Freezing and Thermotolerance of Bromegrass (*Bromus Inermis*) Cell Cultures. *Physiologia Plantarum*, **1995**, 95, 195-202.
33. Sairam, R. K. Effects of Homobrassinolide Application on Plant Metabolism and Grain Yield Under Irrigated and Moisture-Stress Conditions of Two Wheat Varieties. *Plant Growth Regulation*, **1994**, 14, 173-181.
34. Schilling, G.; Schiller, C., Otto, S. Influence of Brassinosteroids on Organ Relations and Enzyme Activities of Sugar-Beet Plants. *ACS Symposium Series*, **1991**, 474, 208-219.
35. Hetru, C.; Roussel, J. P.; Mori, K., Nakatani, Y. Anticdysteroid Activity of Brassinosteroids. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Serie II: Mecanique, Physique, Chimie, Sciences de la Terre et de l'Univers*, **1986**, 302, 417-420.

36. Richter, K.; Adam, G. Neurodepressing Effect of Brassinosteroids in the Cockroach *Periplaneta Americana*. *Naturwissenschaften*, **1991**, *78*, 138-139.
37. Khripach, V. A., Use of epibrassinolide for decreasing of heavy metals accumulation by agricultural crops, 2119285, **1998**.
38. Yu, W.; Zhao, P., Wang, Q. Interaction Between Brassinosteroid and Auxin. *Xibao Shengwuxue Zazhi*, **2005**, *27*, 165-167.
39. Bao, F.; Shen, J.; Brady, S. R.; Muday, G. K.; Asami, T., Yang, Z. Brassinosteroids Interact With Auxin to Promote Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **2004**, *134*, 1624-1631.
40. Handschack, M.; Adam, G.; Vorbrodth, H. M.; Marquardt, V., Beinhauer, K., Stone fruit quality improvement by synergistic mixtures of auxins with brassinosteroids, 4039017.
41. Yopp, J. H.; Mandava, N. B.; Thompson, M. J., Sasse, J. M. Activity of Brassinosteroid in Selected Bioassays in Combination With Chemicals Known to Synergize or Retard Responses to Auxin and Gibberellin. *Proceedings - Plant Growth Regulation Society of America*, **1981**, *8th*, 138-145.
42. Ikekawa, N.; Zhao, Y. Application of 24-Epibrassinolide in Agriculture. *ACS Symposium Series*, **1991**, *474*, 280-291.
43. Mitchell, J. W.; Whitehead, M. R. Responses of Vegetative Parts of Plants Following Application of Extract of Pollen From *Zea Mays*. *Botanical gazette*, **1941**, *102*, 770-790.
44. 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 (London, United Kingdom)*, **1970**, *225*, 1065-1066.
45. Mandava, N.; Mitchell, J. W. Structural Elucidation of Brassins. *Chemistry & Industry (London, United Kingdom)*, **1972**, 930-931.
46. Mandava, N.; Mitchell, J. W. New Plant Hormones. Chemical and Biological Investigations. *Indian Agriculturist*, **1971**, *15*, 19-31.
47. Kim, S. K. Natural Occurrences of Brassinosteroids. *ACS Symposium Series*, **1991**, *474*, 26-35.
48. Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen, J. D., Jr.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L., Cook, J. C., Jr. Brassinolide, a Plant Growth-Promoting Steroid Isolated From Brassica Napus Pollen. *Nature (London, United Kingdom)*, **1979**, *281*, 216-217.
49. Yokota, T.; Arima, M., Takahashi, N. Castasterone, a New Phytosterol With Plant Hormone Potency, From Chestnut Insect Gall. *Tetrahedron Letters*, **1982**, *23*, 1275-1278.
50. Choe, S. Brassinosteroid Biosynthesis and Inactivation. *Physiologia Plantarum*, **2006**, *126*, 539-548.
51. Fujioka, S. Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. *Shokubutsu Saibo Kogaku Shirizu*, **2004**, *20*, 166-175, 26, 1.
52. Vert, G.; Nemhauser, J. L.; Geldner, N.; Hong, F., Chory, J. Molecular Mechanisms of Steroid Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **2005**, *21*, 177-201.

-
53. Prusakova, L. D.; Chizhova, S. I. Application of Brassinosteroids in Plants Under Extreme Conditions. *Agrokhimiya*, **2005**, 87-94.
 54. Muessig, C. Brassinosteroid-Promoted Growth. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, **2005**, 7, 110-117.
 55. Nakamura, A.; Matsuoka, M. New Development of Studies on Brassinosteroid. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **2005**, 50, 121-130.
 56. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N., Khripach, N. B. New Practical Aspects of Brassinosteroids and Results of Their Ten-Year Agricultural Use in Russia and Belarus. *Brassinosteroids*, **2003**, 189-230.
 57. Bajguz, A.; Tretyn, A. The Chemical Structures and Occurrence of Brassinosteroids in Plants. *Brassinosteroids*, **2003**, 1-44.
 58. Oh, M. H.; Clouse, S. D. Brassinosteroids: Modes of BR Action and Signal Transduction. *Journal of Plant Biology*, **2003**, 46, 1-9.
 59. Adam, G.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Schneider, B., Voigt, B. New Developments in Brassinosteroid Research. *Studies in Natural Products Chemistry*, **1996**, 18, 495-549.
 60. Adam, G.; Marquardt, V. Brassinosteroids. *Phytochemistry*, **1986**, 25, 1787-1799.
 61. Brosa, C. Structure-Activity Relationship. A *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*; Sakurai, A.; Yokota, T.; Clouse, S. D. Eds. Eds.; Springer: Tokyo, **1999**,
 62. Khripach, V. A.; Lakhvich, F. A.; Zhabinskii, V. N. *Brassinosteroidy*; Minsk, **1993**; pp.-288.
 63. Abe, H. Advances in Brassinosteroid Research and Prospects for Its Agricultural Application. *Japan Pesticide Information*, **1989**, 55, 10-14.
 64. Meudt, W. J.; Thompson, M. J. Investigations on the Mechanism of the Brassinosteroid Response. II. A Modulation of Auxin Action. *Proceedings - Plant Growth Regulation Society of America*, **1983**, 10th, 306-311.
 65. Takematsu, T.; Ikekawa, N., Shida, A., Increasing the yields of cereals by means of brassinolide derivative, 218945.
 66. Mori, K.; Takematsu, T.; Sakakibara, M., Oshio, H., Homobrassinolide, and its use, 80381.
 67. Kuraishi, S.; Yamaki, Y., Yamanaka, Y., Plant growth-stimulating solutions containing brassinolides, 02129103.
 68. Matevosyan, G. L.; Kudashov, A. A.; Ezaov, A. K., Sotnik, V. G. Effect of Plant Growth Regulators on the Growth, Development, Yield, and Quality of Tomatoes Under Greenhouse Conditions. *Agrokhimiya*, **2001**, 49-58.
 69. Boiko, V. V.; Babosha, A. V. Application of Bioregulators With Antistress Activity for Virus Eradication in Potatoes by Apical Meristem Method. *Biotekhnologiya*, **2002**, 42-44.
 70. Vil'dflush, I. R.; Deeva, V. P., Gurban, K. A. The Influence of Growth Regulators on Barley Plants (*Hordeum Vulgare* L.) on Sod-Podzolic Light-Loamy Soils. *Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi, Seryya Biyalagichnykh Navuk*, **2001**, 23-26.
-

71. Alekseeva, K. L.; Churikova, V. V. Epin Use for Growth Stimulation of the Oyster Mushroom. *Doklady Rossiiskoi Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk*, **2004**, 18-20.
72. Nilovskaya, N. T.; Ostapenko, N. V., Seregina, I. I. The Effect of Epibrassinolide on the Productivity and Drought Resistance of Spring Wheat. *Agrokimiya*, **2001**, 46-50.
73. Seregina, I. I. Possible Use of Plant Growth Regulators for Decreasing the Negative Effect of Cadmium on the Growth, Development and Yield of Spring Wheat. *Agrokimiya*, **2004**, 71-74.
74. Kovalenko, E. M.; Andrianova, G. P., Zelepukhin, V. D. Increase in Productivity and Quality of Strawberries on Anthropogenically Polluted Soil. *Sadovodstvo i Vinogradarstvo (Moscow, Russian Federation)*, **2003**, 15-17.
75. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N., Malevannaya, N. N. Recent Advances in Brassinosteroids Study and Application. *Proceedings of the Plant Growth Regulator Society of America*, **1997**, 24th, 101-106.
76. Kamuro, Y.; Takatsuto, S.; Watanabe, T.; Noguchi, T.; Kuriyama, H., Suganuma, H. Practical Effects of Brassinosteroid Compound [TS303]. *Proceedings of the Plant Growth Regulator Society of America*, **1997**, 24th, 111-116.
77. Kaul, S.; Koo, H. L.; Jenkins, J.; Rizzo, M.; Rooney, T.; Tallon, L. J.; Feldblyum, T.; Niernan, W.; Benito, M. I.; Lin, X.; Town, C. D.; Fraser, C. M.; Tabata, S.; Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Sato, S.; Asamizu, E.; Kato, T.; Kotani, H.; Sasamoto, S.; Ecker, J. R.; Theologis, A.; Federspiel, N. A.; Palm, C. J.; Osborne, B. I.; Shinn, P.; Conway, A. B.; Vysotskaia, V. S.; Dewar, K.; Conn, L.; Lenz, C. A.; Kim, C. J.; Hansen, N. F.; Liu, S. X.; Buehler, E.; Altafi, H.; Sakano, H.; Dunn, P.; Lam, B.; Pham, P. K.; Chao, Q.; Nguyen, M.; Yu, G.; Chen, H.; Southwick, A.; Lee, J. M.; Miranda, M.; Toriumi, M. J.; Davis, R. W.; Wambutt, R.; Murphy, G.; Dusterhoft, A.; Stiekema, W.; Pohl, T.; Entian, K. D.; Terry, N.; Volckaert, G.; Salanoubat, M.; Choise, N.; Rieger, M.; Anson, W.; Unsel, M.; Fartmann, B.; Valle, G.; Artiguenave, F.; Weissenbach, J.; Quetier, F.; Wilson, R. K.; de la Bastide, M.; Sekhon, M.; Huang, E.; Spiegel, L.; Gnoj, L.; Pepin, K.; Murray, J.; Johnson, D.; Habermann, K.; Dedhia, N.; Parnell, L.; Preston, R.; Hillier, L.; Chen, E.; Marra, M.; Martienssen, R.; McCombie, W. R.; Mayer, K.; White, O.; Bevan, M.; Lemcke, K.; Creasy, T. H.; Bielke, C.; Haas, B.; Haase, D.; Maiti, R.; Rudd, S.; Peterson, J.; Schoof, H.; Frishman, D.; Morgenstern, B.; Zaccaria, P.; Ermolaeva, M.; Perlea, M.; Quackenbush, J.; Volfovsky, N.; Wu, D.; Lowe, T. M.; Salzberg, S. L.; Mewes, H. W.; Rounsley, S.; Bush, D.; Subramaniam, S.; Levin, I.; Norris, S.; Schmidt, R.; Acarkan, A.; Bancroft, I.; Quetier, F.; Brennicke, A.; Eisen, J. A.; Bureau, T.; Legault, B. A.; Le, Q. H.; Agrawal, N.; Yu, Z.; Martienssen, R.; Copenhaver, G. P.; Luo, S.; Pikaard, C. S.; Preuss, D.; Paulsen, I. T.; Sussman, M.; Britt, A. B.; Eisen, J. A.; Selinger, D. A.; Pandey, R.; Mount, D. W.; Chandler, V. L.; Jorgensen, R. A.; Pikaard, C.; Juergens, G.; Meyerowitz, E. M.; Ecker, J. R.; Theologis, A.; Dangl, J.; Jones, J. D. G.; Chen, M.; Chory, J., Somerville, C. Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature (London)*, **2000**, 408, 796-815.
78. Yamada, J.; Morisaki, M.; Iwai, K.; Hamada, H.; Sato, N., Fujimoto, Y. 24-Methyl- and 24-Ethyl-D24(25)-Cholesterols As Immediate Biosynthetic Precursors of 24-Alkylsterols in Higher Plants. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 877-884.
79. Suzuki, H.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Murofushi, N., Sakurai, A. Biosynthesis of Brassinosteroids in Seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana glauca*, and *Oryza sativa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1995**, 59, 168-172.
80. Suzuki, H.; Inoue, T.; Fujioka, S.; Saito, T.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Murofushi, N.; Yanagisawa, T., Sakurai, A. Conversion of 24-Methylcholesterol to 6-Oxo-24-

- Methylcholestanol, a Putative Intermediate of the Biosynthesis of Brassinosteroids, in Cultured Cells of *Catharanthus Roseus*. *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 1391-1397.
81. Suzuki, H.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Murofushi, N., Sakurai, A. Biosynthesis of Brassinolide From Teasterone Via Typhasterol and Castasterone in Cultured Cells of *Catharanthus Roseus*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **1994**, *13*, 21-26.
 82. Suzuki, H.; Inoue, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yanagisawa, T.; Yokota, T.; Murofushi, N., Sakurai, A. Biosynthesis of Brassinosteroids in *Catharanthus Roseus*. Part IV. Possible Involvement of 3-Dehydroteasterone in the Conversion of Teasterone to Typhasterol in Cultured Cells of *Catharanthus Roseus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1994**, *58*, 1186-1188.
 83. Choi, Y. H.; Fujioka, S.; Harada, A.; Yokota, T.; Takatsuto, S., Sakurai, A. A Brassinolide Biosynthetic Pathway Via 6-Deoxocastasterone. *Phytochemistry*, **1996**, *43*, 593-596.
 84. Choi, Y. H.; Fujioka, S.; Nomura, T.; Harada, A.; Yokota, T.; Takatsuto, S., Sakurai, A. An Alternative Brassinolide Biosynthetic Pathway Via Late C-6 Oxidation. *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 609-613.
 85. Fujioka, S.; Choi, Y. H.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Li, J.; Chory, J., Sakurai, A. Identification of Castasterone, 6-Deoxocastasterone, Typhasterol and 6-Deoxytyphasterol From the Shoots of *Arabidopsis Thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **1996**, *37*, 1201-1203.
 86. Suzuki, H.; Kim, S. K.; Takahashi, N., Yokota, T. Metabolism of Castasterone and Brassinolide in Mung Bean Explant. *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 1361-1367.
 87. Suzuki, H.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Murofushi, N., Sakurai, A. Biosynthesis of Brassinosteroids in *Catharanthus Roseus*. Part II. Biosynthesis of Brassinolide From Castasterone in Cultured Cells of *Catharanthus Roseus*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **1993**, *12*, 101-106.
 88. Choe, S.; Dilkes, B. P.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Sakurai, A., Feldmann, K. A. The DWF4 Gene of *Arabidopsis* Encodes a Cytochrome P450 That Mediates Multiple 22a-Hydroxylation Steps in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Cell*, **1998**, *10*, 231-243.
 89. Fujioka, S.; Li, J.; Choi, Y. H.; Seto, H.; Takatsuto, S.; Noguchi, T.; Watanabe, T.; Kuriyama, H.; Yokota, T.; Chory, J., Sakurai, A. The *Arabidopsis* Deetiolated2 Mutant Is Blocked Early in Brassinosteroid Biosynthesis. *The Plant cell*, **1997**, *9*, 1951-1962.
 90. Li, J.; Biswas, M. G.; Chao, A.; Russell, D. W., Chory, J. Conservation of Function Between Mammalian and Plant Steroid 5a-Reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1997**, *94*, 3554-3559.
 91. Li, J.; Nam, K. H. Regulation of Brassinosteroid Signaling by a GSK3/SHAGGY-Like Kinase. *Science (Washington, DC, United States)*, **2002**, *295*, 1299-1301.
 92. Li, J.; Nagpal, P.; Vitart, V.; McMorris, T. C., Chory, J. A Role for Brassinosteroids in Light-Dependent Development of *Arabidopsis*. *Science (Washington, D.C.)*, **1996**, *272*, 398-401.
 93. Noguchi, Takahiro; Fujioka, Shozo; Choe, Sunghwa; Takatsuto, Suguru; Yoshida, Shigeo; Yuan, Heng; Feldmann, Kenneth A., Tax, Frans E. *Plant Physiology*, **1999**, *121*, 743-752.
 94. Clouse, S. D.; Langford, M., McMorris, T. C. A Brassinosteroid-Insensitive Mutant in *Arabidopsis Thaliana* Exhibits Multiple Defects in Growth and Development. *Plant Physiology*, **1996**, *111*, 671-678.

-
95. Choe, S.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Tissier, C. P.; Gregory, B. D.; Ross, A. S.; Tanaka, A.; Yoshida, S.; Tax, F. E., Feldmann, K. A. The Arabidopsis Dwf7/Ste1 Mutant Is Defective in the D7 Sterol C-5 Desaturation Step Leading to Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Cell*, **1999**, *11*, 207-221.
 96. 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 Catalyzes C-6 Oxidation in Brassinosteroid Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1999**, *96*, 1761-1766.
 97. Ephritikhine, G.; Fellner, M.; Vannini, C.; Lapous, D., Barbier-Brygoo, H. The Sax1 Dwarf Mutant of Arabidopsis Thaliana Shows Altered Sensitivity of Growth Responses to Abscisic Acid, Auxin, Gibberellins and Ethylene and Is Partially Rescued by Exogenous Brassinosteroid. *Plant Journal*, **1999**, *18*, 303-314.
 98. Nomura, T.; Kitasaka, Y.; Takatsuto, S.; Reid, J. B.; Fukami, M., Yokota, T. Brassinosteroid/Sterol Synthesis and Plant Growth As Affected by Lka and Lkb Mutations of Pea. *Plant Physiology*, **1999**, *119*, 1517-1526.
 99. Altmann, T. A Tale of Dwarfs and Drugs: Brassinosteroids to the Rescue. *Trends in Genetics*, **1998**, *14*, 490-495.
 100. Klahre, U.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Nomura, T.; Yoshida, S., Chua, N. H. The Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1 Gene Encodes a Protein Involved in Steroid Synthesis. *Plant Cell*, **1998**, *10*, 1677-1690.
 101. Choe, S.; Dilkes, B. P.; Gregory, B. D.; Ross, A. S.; Yuan, H.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Tanaka, A.; Yoshida, S.; Tax, F. E., Feldmann, K. A. The Arabidopsis Dwarf1 Mutant Is Defective in the Conversion of 24-Methylenecholesterol to Campesterol in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Physiology*, **1999**, *119*, 897-907.
 102. He, Z.; Wang, Z. Y.; Li, J.; Zhu, Q.; Lamb, C.; Ronald, P., Chory, J. Perception of Brassinosteroids by the Extracellular Domain of the Receptor Kinase BRI1. *Science (Washington, D.C.)*, **2000**, *288*, 2360-2363.
 103. Kinoshita, T.; Cano-Delgado, A.; Seto, H.; Hiranuma, S.; Fujioka, S.; Yoshida, S., Chory, J. Binding of Brassinosteroids to the Extracellular Domain of Plant Receptor Kinase BRI1. *Nature (London, United Kingdom)*, **2005**, *433*, 167-171.
 104. Seto, H.; Kinoshita, T. Binding Mechanism of Brassinosteroid, Plant Growth Hormone, and Receptor BRI 1. *BRAIN Techno News*, **2005**, *109*, 17-22.
 105. Wang, X.; Li, X.; Meisenhelder, J.; Hunter, T.; Yoshida, S.; Asami, T., Chory, J. Autoregulation and Homodimerization Are Involved in the Activation of the Plant Steroid Receptor BRI1. *Developmental Cell*, **2005**, *8*, 855-865.
 106. <http://www.cals.ncsu.edu/agcomm/magazine/winter05/plant.htm>, **2-11-2006**.
 107. Thompson, M. J.; Meudt, W. J.; Mandava, N. B.; Dutky, S. R.; Lusby, W. R., Spaulding, D. W. Synthesis of Brassinosteroids and Relationship of Structure to Plant Growth-Promoting Effects. *Steroids*, **1982**, *39*, 89-105.
 108. Meudt, W. J.; Bennett, H. W. Rapid Bioassay for Auxin. *Physiologia Plantarum*, **1978**, *44*, 422-428.
-

-
109. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Morishita, T., Abe, H. Synthesis of (24R)-28-Homobrassinolide Analogs and Structure-Activity Relationships of Brassinosteroids in the Rice-Lamina Inclination Test. *Phytochemistry (Elsevier)*, **1983**, 22, 1393-1397.
 110. Thompson, M. J.; Mandava, N. B.; Meudt, W. J.; Lusby, W. R., Spaulding, D. W. Synthesis and Biological Activity of Brassinolide and Its 22b,23b-Isomer: Novel Plant Growth-Promoting Steroids. *Steroids*, **1981**, 38, 567-580.
 111. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Takematsu, T.; Takeuchi, Y., Koguchi, M. Structure-Activity Relationship of Brassinosteroids. *Phytochemistry (Elsevier)*, **1983**, 22, 2437-2441.
 112. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; De Groot, A. E. Capítol X: Bioassay and Structure-Activity Relationships of Brassinosteroids. A *Brassinosteroids: A new class of plant hormones*; Academic Press: EUA, **1998**, 301-324.
 113. Takatsuto, S.; Yokota, T. Capítol 3: Biochemical Analysis of Natural Brassinosteroids. A *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*; Sakurai, A.; Yokota, T.; Clouse, S. D. Eds. Springer: Tokyo, **1999**, 47-68.
 114. Wada, K.; Marumo, S.; Abe, H.; Morishita, T.; Nakamura, K.; Uchiyama, M., Mori, K. A Rice Lamina Inclination Test - a Microquantitative Bioassay for Brassinosteroids. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1984**, 48, 719-726.
 115. Takeno, K.; Pharis, R. P. Brassinosteroid-Induced Bending of the Leaf Lamina of Dwarf Rice Seedlings: an Auxin-Mediated Phenomenon. *Plant and Cell Physiology*, **1982**, 23, 1275-1281.
 116. Terricabras, E., *Tesi doctoral*, IQS, CETS, Barcelona, **1998**.
 117. Amorós, M., *Tesi doctoral*, IQS CETS, Barcelona, **2005**.
 118. Tobella, L.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2003**.
 119. Puig, E.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2000**.
 120. Piqué, M.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2001**.
 121. Vázquez, E.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2000**.
 122. Puigdengolas, S.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2006**.
 123. Hernandex, X.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2004**.
 124. Ardèvol, A.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2005**.
 125. Singh, H.; Bhardwaj, T. R. Brassinosteroids. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, **1986**, 25B, 989-998.
 126. Brosa, C.; Capdevila, J. M., Zamora, I. Brassinosteroids: a New Way to Define the Structural Requirements. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 2435-2448.
 127. Brosa, C.; Nusimovich, S., Peracaula, R. Synthesis of New Brassinosteroids With Potential Activity As Antiecdysteroids. *Steroids*, **1994**, 59, 463-467.
 128. Debnath, A. K. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Paradigm - Hansch Era to New Millennium. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2001**, 1, 187-195.
-

129. Unger, S. H. Consequences of the Hansch Paradigm for the Pharmaceutical Industry. *Medicinal Chemistry (Academic Press)*, **1980**, *11*, 47-119.
130. Hansch, C. Quantitative Approach to Biochemical Structure-Activity Relationships. *Accounts of Chemical Research*, **1969**, *2*, 232-239.
131. Dearden, J. C.; Cronin, M. T. D. Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Drug Design. *Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action (4th Edition)*, **2006**, 185-209.
132. Dudek, A. Z.; Arodz, T., Galvez, J. Computational Methods in Developing Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR): a Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **2006**, *9*, 213-228.
133. Walters, W. P.; Goldman, B. B. Feature Selection in Quantitative Structure-Activity Relationships. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **2005**, *8*, 329-333.
134. Olah, M. M.; Bologa, C. G., Oprea, T. I. Strategies for Compound Selection. *Current Drug Discovery Technologies*, **2004**, *1*, 211-220.
135. Livingstone, D. J. Building QSAR Models: A Practical Guide. *Predicting Chemical Toxicity and Fate*, **2004**, 151-170.
136. Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Folkers, G. *Molecular Interaction Fields*, edited by Gabriele Cruciani; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, **2006**; pp.307.
137. Zamora, I., *Tesi doctoral*, IQS CETS, Barcelona, **1998**.
138. Brosa, C.; Zamora, I.; Terricabras, E.; Soca, L.; Peracaula, R., Rodriguez-Santamarta, C. Synthesis and Molecular Modeling: Related Approaches to Progress in Brassinosteroid Research. *Lipids*, **1997**, *32*, 1341-1347.
139. Brosa, C.; Rodriguez-Santamarta, C.; Pilard, J. F., Simonet, J. The Cathodic Reduction of Activated Olefins. Experimental Conditions Allowing the Specific Hydrogenation of the Enone Derived From Ergosterol. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2001**, *3*, 2655-2661.
140. Brosa, C.; Peracaula, R.; Puig, R., Ventura, M. Use of Dihydroquinidine 9-O-(9'-Phenanthryl) Ether in Osmium-Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation in the Synthesis of Brassinosteroids. *Tetrahedron Letters*, **1992**, *33*, 7057-7060.
141. Brosa, C.; Puig, R.; Comas, X., Fernandez, C. New Synthetic Strategy for the Synthesis of 24-Epibrassinolide. *Steroids*, **1996**, *61*, 540-543.
142. 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*, 12337-12348.
143. Brosa, C.; Rodriguez-Santamarta, C. A New Efficient Procedure for the Reduction of D⁷-Ergostane Derivatives. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 1793-1798.
144. Peracaula, R., *Tesi doctoral*, IQS CETS, Barcelona, **1995**.
145. Rodríguez-Santamarta, C., *Tesi doctoral*, IQS CETS, Barcelona, **2001**.
146. Soca, L., *Tesi doctoral*, IQS CETS, Barcelona, **1988**.

-
147. Brosa, C.; Amoros, M.; Molist, M., Hernandez, X. New Brassinosteroid Analogs Having Nitrogenated Functionalities at C3 to Provide More Information About the Brassinosteroid-Receptor Interaction. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 8529-8534.
 148. Kohout, L.; Velgova, H.; Strnad, M., Kamínek, M. Brassinosteroids With Androstane and Pregnane Skeleton. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1987**, *52*, 476.
 149. Kohout, L., Method of preparing the brassinolide hormone 2a, 3a-dihydroxy-17b-(3-methylbutyryloxy)-7-oxa-B-homo-5a-androstan-6-one., CS 274530, **1992**.
 150. Kohout, L., 2a, 3a-bis(acyloxy)-17b-(2-methyl-butyryloxy)-7-oxa-B-homo-5a-androstan-6-ones and method for their preparation, CS 275040, **1992**.
 151. Kohout, L., Method of preparing 2a, 3a-dihydroxy-17b-(2-methyl-butyryloxy)-7-oxa-B-homo-5a-androstan-6-one, CZ 279479, **1995**.
 152. Kohout, L. Steroids. Part CCCXLVIII. Synthesis of Brassino Steroids With a Five Carbon Atom Ester Functionality in Position 17. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1989**, *54*, 3348-3359.
 153. Strnad, M.; Kohout, L. A Simple Brassinolide Analogue 2a, 3a-Dihydroxy-17b-(3-Methyl-Butyryloxy)-7-Oxa-B-Homo-5a-Androstan-6-One Which Induces Bean Second Internode Splitting. *Plant Growth Regulation*, **2003**, *40*, 39-47.
 154. Kohout, L.; Cerny, V., Strnad, M. Steroids. Part CCCXXX. Alternative Synthesis of 2a,3a,17b-Trihydroxy-7-Oxa-B-Homo-5a-Androstan-6-One and Some Androstane Brassinolide Analogs. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1987**, *52*, 1026-1042.
 155. Uesusuki, S.; Watanabe, B.; Yamamoto, S.; Otsuki, J.; Nakagawa, Y., Miyagawa, H. Synthesis of Brassinosteroids of Varying Acyl Side Chains and Evaluation of Their Brassinolide-Like Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2004**, *68*, 1097-1105.
 156. Modolell, A.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **1998**.
 157. Jové, I., *Tesi Doctoral*, **2006**.
 158. Jové, Iban; Peinado, Cristina; Zamora, Ismael, Brosa, C. *Article en preparació*. **2006**.
 159. Marshall, G. R.; Barry, C. D.; Bosshard, H. E.; Dammkoehler, R. A., Dunn, D. A. The Conformational Parameter in Drug Design: the Active Analog Approach. *ACS Symposium Series*, **1979**, *112*, 205-226.
 160. Vilaplana, M.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2006**.
 161. Cramer, R. D., III; Patterson, D. E., Bunce, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **1988**, *110*, 5959-5967.
 162. Martin, Y. C.; Bures, M. G.; Danaher, E. A.; DeLazzer, J.; Lico, I., Pavlik, P. A. A Fast New Approach to Pharmacophore Mapping and Its Application to Dopaminergic and Benzodiazepine Agonists. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **1993**, *7*, 83-102.
 163. Miller, M. D.; Sheridan, R. P., Kearsley, S. K. SQ: A Program for Rapidly Producing Pharmacophorically Relevant Molecular Superpositions. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1999**, *42*, 1505-1514.
-

-
164. MOE, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada, **2001**.
165. Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **1996**, *17*, 490-519.
166. Sharpless, K. B.; Lauer, R. F.; Repic, O.; Teranishi, A. Y., Williams, D. R. Permanganate in Acetic Anhydride. α -Diketones Directly From Olefins. *Journal of the American Chemical Society*, **1971**, *93*, 3303-3304.
167. Clayton, M. D.; Marcinow, Z., Rabideau, P. W. Benzeneseleninic Anhydride Oxidation of 1,2-Diarylethanes and 1,2-Diarylethylenes to 1,2-Diaryl Diketones. *Tetrahedron Letters*, **1998**, *39*, 9127-9130.
168. Tamami, B.; Firouzabadi, H.; Lakouraj, M. M., Mahdavian, A. R. Poly(Vinylpyridine) Supported Versus Unsupported Ferric Dichromate in Oxidation of Different Organic Compounds. *Iranian Journal of Polymer Science & Technology (English Edition)*, **1994**, *3*, 82-87.
169. Firouzabadi, H.; Tamami, B.; Goudarzian, N.; Hatam, M., Lakouraj, M. M. Chromium(VI) Based Oxidants. III. Ferric Dichromate or Polyvinylpyridine-Supported Zinc and Ferric Dichromates As New Oxidizing Agents. *Synthetic Communications*, **1991**, *21*, 2077-2088.
170. Lee, B. H.; Jaung, J. Y.; Jang, S. C., Yi, S. C. Synthesis and Optical Properties of Push-Pull Type Tetrapyrazinoporphyrazines. *Dyes and Pigments*, **2004**, *65*, 159-167.
171. Lee, B. H.; Jaung, J. Y. Synthesis and Characteristics of Dicyanopyrazine Dyes Containing Spiropyran Group. *Dyes and Pigments*, **2003**, *59*, 135-142.
172. Lee, B. H.; Jaung, J. Y., Jeong, S. H. Synthesis of Spiropyran Substituted 2,3-Dicyanopyrazines. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2002**, *23*, 1049-1050.
173. Yusubov, M. S.; Krasnokutskaya, E. A.; Vasilyeva, V. P.; Filimonov, V. D., Chi, K. W. DMSO-Based Reagents for the Oxidation of Alkenes and Alkynes to 1,2-Diketones. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **1995**, *16*, 86-88.
174. Martinez, V.; Burgos, C.; varez-Builla, J.; Fernandez, G.; Domingo, A.; Garcia-Nieto, R.; Gago, F.; Manzanares, I.; Cuevas, C., Vaquero, J. J. Benzo[f]Azino[2,1-a]Phthalazinium Cations: Novel DNA Intercalating Chromophores With Antiproliferative Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, *47*, 1136-1148.
175. Yusubov, M. S.; Filimonov, V. D.; Vasilyeva, V. P., Chi, K. W. Chemoselective Oxidation of Carbon-Carbon Double or Triple Bonds to 1,2-Diketones With DMSO-Based Reagents. *Synthesis*, **1995**, 1234-1236.
176. Yusubov, M. S.; Filimonov, V. D., Ogorodnikov, V. D. Hydrobromic Acid in DMSO As a New Reagent for Convenient Preparative Oxidation of Stilbenes and Some Diphenylethane Derivatives into Benzils. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya*, **1991**, 868-873.
177. Knothe, G. Synthesis and Characterization of Long-Chain 1,2-Dioxo Compounds. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2002**, *115*, 85-91.
178. Genisson, V. B.; Bouniol, A. V., Nepveu, F. A New General Approach for the Synthesis of 2-Substituted-3H-Indol-3-One *N*-Oxide Derivatives. *Synlett*, **2001**, 700-702.
179. Boyer, J.; Bernardes-Genisson, V.; Farines, V.; Souchard, J. P., Nepveu, F. 2-Substituted-3H-Indol-3-One-1-Oxides: Preparation and Radical Trapping Properties. *Free Radical Research*, **2004**, *38*, 459-471.
-

-
180. Tron, G. C.; Pagliai, F.; Del Grosso, E.; Genazzani, A. A., Sorba, G. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Combretafurazans. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *48*, 3260-3268.
181. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis. 3rd Ed*; John Wiley and Sons, Inc: EUA **1998**; pp.775.
182. Van Rheenen, V.; Kelly, R. C., Cha, D. Y. An Improved Catalytic Osmium Tetroxide Oxidation of Olefins to Cis-1,2-Glycols Using Tertiary Amine Oxides As the Oxidant. *Tetrahedron Letters*, **1976**, 1973-1976.
183. McMorris, T. C.; Donaubaue, J. R.; Silveira, M. H., Molinski, T. F. Synthesis of Brassinolide. *ACS Symposium Series*, **1991**, *474*, 36-42.
184. Fetizon, M.; Golfier, M., Louis, J. M. Highly Selective Oxidations of Diols by Silver Carbonate. *Journal of the Chemical Society [Section] D: Chemical Communications*, **1969**, 1102.
185. Baskaran, S.; Das, J., Chandrasekaran, S. Heterogeneous Permanganate Oxidations: an Improved Procedure for the Direct Conversion of Olefins to α -Diketones/ α -Hydroxy Ketones. *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, *54*, 5182-5184.
186. Frigerio, M.; Santagostino, M. A Mild Oxidizing Reagent for Alcohols and 1,2-Diols: *O*-Iodoxybenzoic Acid (IBX) in DMSO. *Tetrahedron Letters*, **1994**, *35*, 8019-8022.
187. Amon, C. M.; Banwell, M. G., Gravatt, G. L. Oxidation of Vicinal Diols to α -Dicarbonyl Compounds by Trifluoroacetic Anhydride-Activated Dimethyl Sulfoxide. *Journal of Organic Chemistry*, **1987**, *52*, 4851-4855.
188. Hosokawa, S.; Kobayashi, S. Total Synthesis of Madindoline A. *Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi*, **2001**, *59*, 1103-1108.
189. Hosokawa, S.; Sekiguchi, K.; Hayase, K.; Hirukawa, Y., Kobayashi, S. Total Synthesis of Madindoline A. *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 6435-6439.
190. Hosokawa, S.; Sekiguchi, K.; Enemoto, M., Kobayashi, S. Novel Stereoselective Construction of a Quaternary Carbon: Application to Synthesis of the Cyclopentenedione Moiety of Madindolines. *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 6429-6433.
191. Peng, K.; Chen, F.; She, X.; Yang, C.; Cui, Y., Pan, X. Selective Oxidation of Benzylic or Allylic Hydroxyl Group of Sec-1,2-Diols. *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 1217-1220.
192. Anelli, P. L.; Banfi, S.; Montanari, F., Quici, S. Oxidation of Diols With Alkali Hypochlorites Catalyzed by Oxammonium Salts Under Two-Phase Conditions. *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, *54*, 2970-2972.
193. Inokuchi, T.; Matsumoto, S.; Nisiyama, T., Torii, S. Indirect Electrooxidation of Alcohols by a Double Mediator System With [R₂N⁺:O]/R₂N-O.Ovrdot. and [Br.Ovrdot. or Br⁺]/Br-Redoxes. *Synlett*, **1990**, 57-58.
194. Banwell, M. G.; Bridges, V. S.; Dupuche, J. R.; Richards, S. L., Walter, J. M. Oxidation of Vic-Diols to α -Dicarbonyl Compounds Using the Oxoammonium Salt Derived From 4-Acetamido-TEMPO and P-Toluenesulfonic Acid. *Journal of Organic Chemistry*, **1994**, *59*, 6338-6343.
195. Campestrini, S.; Di Furia, F.; Modena, G., Bortolini, O. Metal Catalysis in Oxidation by Peroxides. Part 33. Chemoselective Alcohol Oxidations by the Anionic Molybdenum-Picolinate N-Oxido Peroxo Complex MoO₅PICO. *Journal of Organic Chemistry*, **1990**, *55*, 3658-3660.
-

196. Campestrini, S.; Conte, V.; Di Furia, F.; Modena, G., Bortolini, O. Metal Catalysis in Oxidation by Peroxides. 30. Electrophilic Oxygen Transfer From Anionic, Coordinatively Saturated Molybdenum Peroxo Complexes. *Journal of Organic Chemistry*, **1988**, *53*, 5721-5724.
197. Iwahama, T.; Sakaguchi, S.; Nishiyama, Y., Ishii, Y. Aerobic Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds Catalyzed by N-Hydroxyphthalimide (NHPI) Combined With Co(Acac)₃. *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 6923-6926.
198. Iwahama, T.; Yoshino, Y.; Keitoku, T.; Sakaguchi, S., Ishii, Y. Efficient Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds With Molecular Oxygen Catalyzed by N-Hydroxyphthalimide Combined With a Co Species. *Journal of Organic Chemistry*, **2000**, *65*, 6502-6507.
199. Iwahama, T.; Sakaguchi, S.; Nishiyama, Y., Ishii, Y. A Direct Conversion of Vic-Diols into 1,2-Diketones With Aqueous Hydrogen Peroxide Catalyzed by Peroxotungstophosphate (PCWP). *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 1523-1526.
200. Sakata, Y.; Ishii, Y. A Versatile Transformation of Vic-Diols into α -Hydroxy Ketones With Hydrogen Peroxide Catalyzed by Peroxotungstophosphates. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, *56*, 6233-6235.
201. Venkatasubramanian, N.; Thiagarajan, V. Mechanism of Oxidation of Alcohols With N-Bromosuccinimide. *Canadian Journal of Chemistry*, **1969**, *47*, 694-697.
202. Hiran, B. L.; Malkani, R. K., Rathore, N. Kinetics and Mechanism of Oxidation of Some Substituted Benzhydrols by N-Bromosuccinimide. *Kinetics and Catalysis*, **2005**, *46*, 334-339.
203. Corey, E. J.; Suggs, J. W. Pyridinium Chlorochromate. Efficient Reagent for Oxidation of Primary and Secondary Alcohols to Carbonyl Compounds. *Tetrahedron Letters*, **1975**, 2647-2650.
204. Piancatelli, G.; Scettri, A., D'Auria, M. Pyridinium Chlorochromate: a Versatile Oxidant in Organic Synthesis. *Synthesis*, **1982**, 245-258.
205. Kuotsu, B.; Tiewsoh, E.; Debroy, A., Mahanti, M. K. Quinolinium Dichromate Oxidation of Diols: A Kinetic Study. *Journal of Organic Chemistry*, **1996**, *61*, 8875-8877.
206. Ivonin, S. P.; Lapandin, A. V. Conversions of Unsymmetrical Benzoin in Basic Media. *ARKIVOC (Gainesville, FL, United States)*, **2005**, 4-9.
207. Ivonin, S. P.; Lapandin, A. V. Isomerization and Alkylation of P-(Dimethylamino)Benzoin in Basic Media. *Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii*, **2005**, *3*, 46-50.
208. Foricher, J.; Montavon, F.; Pfoertner, K. H., Schoenholzer, P. Synthesis and Reactions of 5-[p-(Dimethylamino)Phenyl]-2,2-Dimethyl-4-Phenyl-3-Oxazoline. *Helvetica Chimica Acta*, **1985**, *68*, 592-599.
209. Blum-Bergmann, O. Formation of the Indene Nucleus. III. *Journal of the Chemical Society*, **1938**, 723-726.
210. Williamson, K. L.; Johnson, W. S. Ring-A α -Acetoxy Ketones in the Cholestane Series. *Journal of Organic Chemistry*, **1961**, *26*, 4653-4659.
211. Henbest, H. B.; Jones, D. N., Slater, G. P. Reactions of Ketones With Oxidizing Agents. I. Catalysis of the Ketone-Lead Tetraacetate Reaction With Boron Trifluoride. *Journal of the Chemical Society*, **1961**, 4472-4478.

-
212. Klinot, J.; Sejbal, J., Vystřil, A. Triterpenes. Part LXXXVI. Triterpenoid 2,3-Ketols, Diols and Their Acetates: Preparation and Conformation of the Ring A. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1989**, *54*, 400-412.
213. Voigt, B.; Porzel, A.; Adam, G.; Golsch, D.; Adam, W.; Wagner, C., Merzweiler, K. Synthesis of 2,24-Diepicasterone and 3,24-Diepicasterone As Potential Brassinosteroid Metabolites of the Cockroach *Periplaneta Americana*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **2002**, *67*, 91-102.
214. Khenkin, A. M.; Neumann, R. Aerobic Oxidation of Vicinal Diols Catalyzed by an Anderson-Type Polyoxometalate, [IMo6O24]5-. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2002**, *344*, 1017-1021.
215. Srinivasan, R.; Akila, S.; Caroline, J., Balasubramanian, K. Isoquinolinium Dichromate: a New and Selective Oxidant for Primary and Secondary Alcohols. *Synthetic Communications*, **1998**, *28*, 2245-2251.
216. Geethakumari, K.; Sreekumar, K. 1,4-Butanediol Dimethacrylate Crosslinked Polyacenaphthylene Supported T-Butyl Chromate As a New Class of Solid Phase Oxidizing Reagent. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, **1998**, *37B*, 331-337.
217. Cisneros, A.; Fernandez, S., Hernandez, J. E. Cleavage of Vicinal Diols by Pyridinium Chlorochromate. *Synthetic Communications*, **1982**, *12*, 833-838.
218. Khurana, J. M.; Kandpal, B. M. A Novel Method of Synthesis of 1,2-Diketones From 1,2-Diols Using N-Bromosuccinimide. *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 4909-4912.
219. Kolasa, T.; Miller, M. J. Reactions of α -Hydroxy Carbonyl Compounds With Azodicarboxylates and Triphenylphosphine: Synthesis of α -N-Hydroxy Amino Acid Derivatives. *Journal of Organic Chemistry*, **1987**, *52*, 4978-4984.
220. De Munari, S.; Cerri, A.; Gobbi, M.; Almirante, N.; Banfi, L.; Carzana, G.; Ferrari, P.; Marazzi, G.; Micheletti, R.; Schiavone, A.; Sputore, S.; Torri, M.; Zappavigna, M. P., Melloni, P. Structure-Based Design and Synthesis of Novel Potent Na⁺,K⁺-ATPase Inhibitors Derived From a 5 α ,14 α -Androstane Scaffold As Positive Inotropic Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, *46*, 3644-3654.
221. Sugimura, T.; Paquette, L. A. Enantiospecific Total Synthesis of the Sesquiterpene Antibiotics Punctatin A and Punctatin D. *Journal of the American Chemical Society*, **1987**, *109*, 3017-3024.
222. Cossy, J.; Furet, N. N-Bromosuccinimide Mediated Ring-Opening of Cyclopropylcarbinols. *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 3691-3694.
223. Das, B.; Venkateswarlu, K.; Mahender, G., Mahender, I. A Simple and Efficient Method for α -Bromination of Carbonyl Compounds Using N-Bromosuccinimide in the Presence of Silica-Supported Sodium Hydrogen Sulfate As a Heterogeneous Catalyst. *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 3041-3044.
224. Tanemura, K.; Suzuki, T.; Nishida, Y.; Satsumabayashi, K., Horaguchi, T. A Mild and Efficient Procedure for α -Bromination of Ketones Using N-Bromosuccinimide Catalyzed by Ammonium Acetate. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)*, **2004**, 470-471.
225. Meshram, H. M.; Reddy, P. N.; Sadashiv, K., Yadav, J. S. Amberlyst-15-Promoted Efficient 2-Halogenation of 1,3-Keto-Esters and Cyclic Ketones Using N-Halosuccinimides. *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 623-626.
-

-
226. Wang, C.; Tunge, J. Selenocatalytic α -Halogenation. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)*, **2004**, 2694-2695.
227. Yang, D.; Yan, Y. L.; Law, K. L.; Zhu, N. Y. Lewis Acid-Catalyzed Atom Transfer Radical Cyclization of Unsaturated β -Keto Amides. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 10465-10475.
228. Campos, K. R.; Lee, S.; Journet, M.; Kowal, J. J.; Cai, D.; Larsen, R. D., Reider, P. J. A General Method for the Highly Diastereoselective, Kinetically Controlled Alkylation of (+)-Nopinone. *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 6957-6959.
229. Muller, G.; Joly, R.; Nomine, G., Bertin, D. 2,4-Dibromo and 2,4,21-Tribromopregnane Intermediates. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1956**, 1457-1459.
230. Frechet, J. M. J.; Warnock, J., Farrall, M. J. Polymeric Reagents. 3. Poly[Vinyl(Pyridinium Chlorochromate)]: a New Recyclable Oxidizing Agent. *Journal of Organic Chemistry*, **1978**, *43*, 2618-2621.
231. Cainelli, G.; Cardillo, G.; Orena, M., Sandri, S. Polymer Supported Reagents. Chromic Acid on Anion Exchange Resins. A Simple and Practical Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones. *Journal of the American Chemical Society*, **1976**, *98*, 6737-6738.
232. Hasek, W. R.; Smith, W. C., Engelhardt, V. A. The Chemistry of Sulfur Tetrafluoride. II. The Fluorination of Organic Carbonyl Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, **1960**, *82*, 543-551.
233. Wang, C. L. Fluorination by Sulfur Tetrafluoride. *Organic Reactions (New York)*, **1985**, *34*, 319-400.
234. Kobayashi, Y.; Kumadaki, I.; Ohsawa, A.; Honda, M., Hanzawa, Y. Studies on Organic Fluorine Compounds. XVI. Stereochemistry in Fluorination of Sterols With Phenylfluorophosphoranes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1975**, *23*, 196-200.
235. Ayer, D. E. New Method for Preparation of Fluoro Steroids. *Tetrahedron Letters*, **1962**, 1065-1069.
236. Kobayashi, Y.; Taguchi, T.; Terada, T.; Oshida, J.; Morisaki, M., Ikekawa, N. Synthesis of 24,24-Difluoro- and 24x-Fluoro-25-Hydroxyvitamin D₃. *Tetrahedron Letters*, **1979**, 2023-2026.
237. Badone, D.; Jommi, G.; Pagliarin, R., Tavecchia, P. Use of Polyethylene Glycol in the Synthesis of Alkyl Fluorides From Alkyl Sulfonates. *Synthesis*, **1987**, 920-921.
238. Bosch, P.; Camps, F.; Chamorro, E.; Gasol, V., Guerrero, A. Tetrabutylammonium Bifluoride: a Versatile and Efficient Fluorinating Agent. *Tetrahedron Letters*, **1987**, *28*, 4733-4736.
239. Albanese, D.; Landini, D., Penso, M. Hydrated Tetrabutylammonium Fluoride As a Powerful Nucleophilic Fluorinating Agent. *Journal of Organic Chemistry*, **1998**, *63*, 9587-9589.
240. Colonna, S.; Re, A.; Gelbard, G., Cesarotti, E. Anionic Activation in Polymer Supported Reactions. Part 2. Stereochemical Studies on the Introduction of Fluorine at Chiral Centers and in Biologically Significant Molecules. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, **1979**, 2248-2252.
241. Middleton, W. J. New Fluorinating Reagents. Dialkylaminosulfur Fluorides. *Journal of Organic Chemistry*, **1975**, *40*, 574-578.
-

-
242. Singh, R. P.; Shreeve, J. M. Recent Advances in Nucleophilic Fluorination Reactions of Organic Compounds Using Deoxofluor and DAST. *Synthesis*, **2002**, 2561-2578.
243. Slavikova, B.; Kasal, A.; Choudounska, H., Kristofikova, Z. 3a-Fluoro Analogues of Allopregnanolone and Their Binding to GABAA Receptors. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **2002**, 67, 30-46.
244. Wenckens, M.; Gronvald, F., Hansen, J. B. Synthesis of Meiosis-Activating Sterols Containing Fluorine. *Acta Chemica Scandinavica*, **1998**, 52, 503-507.
245. Rozen, S.; Faust, Y., Ben-Yakov, H. A New Method for Fluorination of Sterols. *Tetrahedron Letters*, **1979**, 1823-1826.
246. 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, 973-980.
247. Shellhamer, D. F.; Anstine, D. T.; Gallego, K. M.; Ganesh, B. R.; Hanson, A. A.; Hanson, K. A.; Henderson, R. D.; Prince, J. M., Heasley, V. L. Reaction of Diethylaminosulfur Trifluoride With Diols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry*, **1995**, 861-866.
248. Merritt, R. F.; Johnson, F. A. Direct Fluorination. Addition of Fluorine to Indenes and Acenaphthylenes. *Journal of Organic Chemistry*, **1966**, 31, 1859-1863.
249. Chambers, R. D.; Holling, D.; Sandford, G.; Batsanov, A. S., Howard, J. A. K. Elemental Fluorine. Part 15. Selective Direct Fluorination of Quinoline Derivatives. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2004**, 125, 661-671.
250. Toyota, A.; Habutani, C.; Katagiri, N., Kaneko, C. Synthesis of Nucleotides and Related Compounds. Addition of Molecular Fluorine to Bicyclo[2.2.1]Hept-2-Ene Derivatives and Conversion to Fluorine-Containing Carbocyclic Nucleosides. *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35, 5665-5668.
251. Sato, M.; Hirokawa, T.; Hattori, H.; Toyota, A., Kaneko, C. Synthesis of Enantiomerically Pure 4-Acetoxy-2-Fluoro-2-Cyclopenten-1-One. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 975-980.
252. Rozen, S.; Brand, M. Direct Addition of Elemental Fluorine to Double Bonds. *Journal of Organic Chemistry*, **1986**, 51, 3607-3611.
253. Stavber, S.; Zupan, M. Stereochemistry of Room-Temperature Fluorination of Alkenes With Cesium Fluoroxysulfate. *Journal of Organic Chemistry*, **1987**, 52, 919-921.
254. Okazaki, M.; Seki, R.; Asaju, N., Nakatsuka, S., Preparation of organic fluorine compounds using difluoroimidazolidines, 2002284710, **2002**.
255. Nakatsuka, S.; Okazaki, M.; Seki, R., Asaju, N., Preparation of organic fluorine compounds using diaminodifluoromethanes, 2002284709, **2002**.
256. Lermontov, S. A.; Zavorin, S. I.; Bakhtin, I. V.; Pushin, A. N.; Zefirov, N. S., Stang, P. J. Fluorination of Olefins With PhSeF₃, PhSeF₅, and PhTeF₅. *Journal of Fluorine Chemistry*, **1998**, 87, 75-83.
257. Lermontov, S. A.; Zavorin, S. I.; Bakhtin, I. V.; Zefirov, N. S., Stang, P. J. Fluorinating Properties of PhTeF₅ and PhSeF₅ Towards C=C Bond. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, **1995**, 102, 283-286.
-

258. Chekhlov, A. N.; Lermontov, S. A.; Zavorin, S. I., Zefirov, N. S. Preparation and Crystal Structure of Meso-1,2-Difluoro-1,2-Diphenylethane With 5% Trans-Stilbene Admixture. *Doklady Akademii Nauk*, **1992**, 323, 1112-1115.
259. Dinoiu, V. Anodic Fluorination of Styrene Derivatives. *Scientific Bulletin - University "Politehnica" of Bucharest, Series B: Chemistry and Materials Science*, **2002**, 64, 39-46.
260. Hara, S.; Nakahigashi, J.; Ishi-i, K.; Sawaguchi, M.; Sakai, H.; Fukuhara, T., Yoneda, N. Difluorination of Alkenes With Iodotoluene Difluoride. *Synlett*, **1998**, 495-496.
261. Shieh, T. C.; Yang, N. C., Chernick, C. L. Reactions of Olefins With Xenon Fluorides. *Journal of the American Chemical Society*, **1964**, 86, 5021-5022.
262. Shellhamer, D. F.; Conner, R. J.; Richardson, R. E.; Heasley, V. L., Heasley, G. E. Fluorination of 1,3-Dienes With Xenon Difluoride and (Difluoroiodo)Benzene. *Journal of Organic Chemistry*, **1984**, 49, 5015-5018.
263. Patrick, T. B.; Qian, S. Rearrangement of Phenylethenes on Reaction With Iodine-Xenon Difluoride. *Organic Letters*, **2000**, 2, 3359-3360.
264. Tamura, M.; Quan, H. D., Sekiya, A. Vic-Difluorination of Fluoro Alkenes With Xenon Difluoride. The Effect of Fluorine Substituents on the Reaction of Alkenes With Xenon Difluoride. *European Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 3151-3153.
265. Tamura, M.; Takagi, T.; Quan, H. D., Sekiya, A. Utility of Silicon Tetrafluoride As a Catalyst of Reactions With Xenon Difluoride: Fluorinations of Phenylalkenes and Benzaldehydes. *Journal of Fluorine Chemistry*, **1999**, 98, 163-166.
266. Shellhamer, D. F.; Chiaco, M. C.; Gallego, K. M.; Low, W. S. C.; Carter, B.; Heasley, V. L., Chapman, R. D. The Fluorination of Cyclopentadiene and 3,4-Epoxy cyclopentene. *Journal of Fluorine Chemistry*, **1995**, 72, 83-87.
267. Shellhamer, D. F.; Carter, S. L.; Dunham, R. H.; Graham, S. N.; Spitsbergen, M. P.; Heasley, V. L.; Chapman, R. D., Druelinger, M. L. Regioselectivity in the Addition Reactions of Alkoxyxenon Fluorides With Indene. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)*, **1989**, 159-165.
268. Shellhamer, D. F.; Curtis, C. M.; Dunham, R. H.; Hollingsworth, D. R.; Ragains, M. L.; Richardson, R. E.; Heasley, V. L.; Shackelford, S. A., Heasley, G. E. Regioselective Chemistry of Methoxyxenon Fluoride. *Journal of Organic Chemistry*, **1985**, 50, 2751-2758.
269. Shellhamer, D. F.; Ragains, M. L.; Gipe, B. T.; Heasley, V. L., Heasley, G. E. Radical Additions of Xenon Difluoride to Cis- and Trans-1-Phenylpropenes: Comparison With Trichloramine and Iodobenzene Dichloride. *Journal of Fluorine Chemistry*, **1982**, 20, 13-18.
270. Shackelford, S. A.; McGuire, R. R., Pflug, J. L. Xenon Difluoride Fluorination. I. Aliphatic Alkenes Fluorinated by a Convenient Benchtop Procedure. *Tetrahedron Letters*, **1977**, 363-366.
271. Zupan, M.; Metelko, M., Stavber, S. Effect of Alkene Structure on the Course of Reactions With Xenon Fluoride XeF₂ and CsSO₄F. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, **1993**, 2851-2855.
272. Geilen, C. C.; Loch, N.; Reutter, W.; Seppelt, K., Oberdorfer, F. A Simple Synthesis of 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Galactose Using Xenon Difluoride. *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, 2435-2438.

273. Stavber, S.; Sotler, T.; Zupan, M., Popovic, A. Fluorination With XeF₂. Part 40. The Important Role of P-Bond Disruption in Fluorine Addition to Phenyl-Substituted Alkenes. *Journal of Organic Chemistry*, **1994**, *59*, 5891-5894.
274. Tius, M. A. Xenon Difluoride in Synthesis. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 6605-6634.
275. Ikeda, K.; Kitani, S.; Sato, K.; Suzuki, T.; Hosokawa, C.; Suzuki, Y.; Tanaka, K., Sato, M. 2b,3b-Difluorosialic Acid Derivatives Structurally Modified at the C-4 Position: Synthesis and Biological Evaluation As Inhibitors of Human Parainfluenza Virus Type 1. *Carbohydrate Research*, **2004**, *339*, 1367-1372.
276. Zupan, M.; Pollak, A. Fluorination With Xenon Difluoride, Reactions With 1,1-Diphenylethylenes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1973**, 845-846.
277. Shackelford, S. A. Xenon Difluoride Fluorination. 3. Mechanism and Selectivity of Boron Trifluoride Etherate Catalysis in the Norbornene Model. *Journal of Organic Chemistry*, **1979**, *44*, 3485-3492.
278. Kohout, L.; Kasal, A., Chodounska, H., Utilisation of 2a,3a,17b-trihydroxy-5a-androstan-6-one for influencing of plant stress, CZ 294 343, **2004**.
279. Kohout, L.; Kasal, A.; Chodounska, H.; Slavikova, B., Hnilickova, J., The use of 2a,3a,17b-trihydroxy-5a-androstan-6-one for plant development regulation, EU 1 401 278, **2005**.
280. Sisa, M.; Hnilickova, J.; Swaczynova, J., Kohout, L. Syntheses of New Androstane Brassinosteroids With 17b-Ester Groups-Butyrates, Heptafluorobutyrate and Laurates. *Steroids*, **2005**, *70*, 755-762.
281. McMorris, T. C.; Chavez, R. G., Patil, P. A. Improved Synthesis of Brassinolide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, **1996**, 295-302.
282. Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Beller, M.; Chen, H.; Hartung, J.; Kawanami, Y.; Lubben, D.; Manoury, E., Ogino, Y. New Ligands Double the Scope of the Catalytic Asymmetric Dihydroxylation of Olefins. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, *56*, 4585-4588.
283. Voigt, B.; Schmidt, J., Adam, G. Synthesis of 24-Epityphasterone, 24-Epityphasterol and Their B-Homo-6a-Oxalactones From Ergosterol. *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 1997-2004.
284. Nelson, D. W.; Gypser, A.; Ho, P. T.; Kolb, H. C.; Kondo, T.; Kwong, H. L.; McGrath, D. V.; Rubin, A. E.; Norrby, P. O.; Gable, K. P., Sharpless, K. B. Toward an Understanding of the High Enantioselectivity in the Osmium-Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation. 4. Electronic Effects in Amine-Accelerated Osmylations. *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, *119*, 1840-1858.
285. Marko, I. E., Ligand-accelerated catalytic asymmetric dihydroxylation, 8906225, **1989**.
286. Shibata, T.; Gilheany, D. G.; Blackburn, B. K., Sharpless, K. B. Ligand-Based Improvement of Enantioselectivity in the Catalytic Asymmetric Dihydroxylation of Dialkyl-Substituted Olefins. *Tetrahedron Letters*, **1990**, *31*, 3817-3820.
287. Wiechert, R.; Kerb, U.; Hocks, P.; Furlenmeier, A.; Fuerst, A.; Langemann, A., Waldvogel, G. Insect Hormones. II. Synthesis of Ecdysone. Syntheses of 2b,3b-Dihydroxy-6-Oxo-A/B-Cis-Steroids. *Helvetica Chimica Acta*, **1966**, *49*, 1581-1590.
288. Kohout, L., *Comunicació personal*, **2004**.

-
289. McMorris, T. C.; Staake, M. D., Kelner, M. J. Synthesis and Biological Activity of Enantiomers of Antitumor Irofulven. *Journal of Organic Chemistry*, **2004**, *69*, 619-623.
290. Heras, M.; Gulea, M.; Masson, S., Philouze, C. A Hetero-Diels-Alder Approach to Phosphonothiashikimic Acid and New Thiaglycosides. *European Journal of Organic Chemistry*, **2004**, 160-172.
291. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis. 2nd Ed*, **1991**, 473.
292. Sakakibara, M.; Okada, K.; Ichikawa, Y., Mori, K. Synthesis of Brassinolide, a Plant-Growth-Promoting Steroidal Lactone. *Heterocycles*, **1982**, *17*, 301-304.
293. Tomas, J.; Camps, F.; Coll, J.; Mele, E., Pascual, N. Synthesis of 25-Fluoroponasterone A, a Fluorinated Analog of 20-Hydroxyecdysone. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 9809-9818.
294. Enders, D.; Dyker, H., Raabe, G. Enantioselective Synthesis of 3-Substituted 2-Oxo Esters. *Angewandte Chemie*, **1992**, *104*, 649-651.
295. Nakagawa, M.; Nakao, H., Watanabe, K. Steric Effects of Chiral Ligands in a New Type of Aldol Condensations Catalyzed by Zinc(II) Complexes of α -Amino Acid Esters. *Chemistry Letters*, **1985**, 391-394.
296. Chow, H. F.; Seebach, D. Diastereoselective Aldol Addition Using Boron Trichloride or Alkoxydichloroborane. *Helvetica Chimica Acta*, **1986**, *69*, 604-614.
297. Evans, D. A.; Rieger, D. L.; Bilodeau, M. T., Urpi, F. Stereoselective Aldol Reactions of Chlorotitanium Enolates. An Efficient Method for the Assemblage of Polypropionate-Related Synthons. *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, *113*, 1047-1049.
298. Mahrwald, R.; Guendogan, B. Highly Regioselective Lewis Acid-Mediated Aldol Additions at the More Encumbered α -Side of Unsymmetrical Ketones. *Journal of the American Chemical Society*, **1998**, *120*, 413-414.
299. Loh, T. P.; Feng, L. C., Wei, L. L. InCl₃-Catalyzed Direct Aldol Reactions of Glyoxylic Acid Monohydrate and Glyoxylates With Various Ketones: Scope and Limitations. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 4231-4236.
300. Pu, Y.; Martin, F. M., Vederas, J. C. Synthesis and Acylation of Salts of *L*-Threonine B-Lactone: a Route to B-Lactone Antibiotics. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, *56*, 1280-1283.
301. Tsuboi, S.; Furutani, H.; Ansari, M. H.; Sakai, T.; Utaka, M., Takeda, A. Highly Enantioselective Reduction of 3-Chloro-2-Oxoalkanoates With Fermenting Bakers' Yeast. A New Synthesis of Optically Active 3-Chloro-2-Hydroxyalkanoates and Glycidic Esters. *Journal of Organic Chemistry*, **1993**, *58*, 486-492.
302. Akita, H.; Todoroki, R.; Endo, H.; Ikari, Y., Oishi, T. Practical Synthesis of Optically Pure Methyl (2*R*,3*S*)-2,3-Epoxybutanoate Via Microbial Asymmetric Reduction of α -Chloroacetoacetate. *Synthesis*, **1993**, 513-516.
303. Berti, G. Stereochemical Aspects of the Synthesis of 1,2-Epoxydes. *Topics in Stereochemistry*, **1973**, *7*, 93-251.
304. Arai, S.; Shirai, Y.; Ishida, T., Shioiri, T. Phase-Transfer-Catalyzed Asymmetric Darzens Reaction. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 6375-6386.
-

305. Caldwell, C. G.; Bondy, S. S. A Convenient Synthesis of Enantiomerically Pure (2*S*,3*S*)- or (2*R*,3*R*)-3-Hydroxyleucine. *Synthesis*, **1990**, 34-36.
306. Baker, R.; Head, J. C., Swain, C. J. Enantiospecific Synthesis of the Spiroacetal Moieties of Avermectins A1b, B1b, A1a, B1a, A2b, B2b, A2a, and B2a and Milbemycins A7 and A8. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, **1988**, 85-97.
307. Green, M. P.; Prodder, J. C., Hayes, C. J. An Enantioselective Formal Synthesis of the Proteasome Inhibitor (+)-Lactacystin. *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 6609-6611.
308. Bargiggia, F.; Dos Santos, S., Piva, O. Asymmetric Photodeconjugation: Highly Stereoselective Synthesis of α -Fluorocarboxylic Derivatives. *Synthesis*, **2002**, 427-437.
309. Kelkar, S. V.; Reddy, G. B., Kulkarni, G. H. Synthesis of Some New Pyrethroids: 3-Phenoxybenzyl (+)-Cis- and (+)-Trans-2-Isopropyl/2-Isobutyl-2-Methyl-3-(2,2-Dichlorovinyl)Cyclopropane-Carboxylates. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, **1991**, 30B, 504-507.
310. Kelkar, S. V.; Arbale, A. A.; Joshi, G. S., Kulkarni, G. H. Claisen Orthoester Rearrangement Reaction With Secondary and Tertiary Allylic Alcohols. Synthesis of 1,2 Seco-Chrysanthemates and Their Structural Analogs. *Synthetic Communications*, **1990**, 20, 839-847.
311. Katsuki, T.; Sharpless, K. B. The First Practical Method for Asymmetric Epoxidation. *Journal of the American Chemical Society*, **1980**, 102, 5974-5976.
312. Gao, Y.; Klunder, J. M.; Hanson, R. M.; Masamune, H.; Ko, S. Y., Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Epoxidation and Kinetic Resolution: Modified Procedures Including in Situ Derivatization. *Journal of the American Chemical Society*, **1987**, 109, 5765-5780.
313. Martin, V. S.; Woodard, S. S.; Katsuki, T.; Yamada, Y.; Ikeda, M., Sharpless, K. B. Kinetic Resolution of Racemic Allylic Alcohols by Enantioselective Epoxidation. A Route to Substances of Absolute Enantiomeric Purity? *Journal of the American Chemical Society*, **1981**, 103, 6237-6240.
314. Hanson, R. M.; Sharpless, K. B. Procedure for the Catalytic Asymmetric Epoxidation of Allylic Alcohols in the Presence of Molecular Sieves. *Journal of Organic Chemistry*, **1986**, 51, 1922-1925.
315. Dung, J. S.; Armstrong, R. W.; Anderson, O. P., Williams, R. M. Improved Synthesis and Absolute Configuration of (+)- and (-)-2,2,4-Trimethyl-1,3-Dioxolane-4-Carboxaldehyde. *Journal of Organic Chemistry*, **1983**, 48, 3592-3594.
316. Harris, R. N., III; Sundararaman, P., Djerassi, C. Optical Rotatory Dispersion Studies. 135. Synthesis and Chiroptical Properties of (*S*)- and (*R*)-(3-2H1)-2,2-Dimethylcyclobutanone. Evidence for Conformational Effects in Substituted Cyclobutanones. *Journal of the American Chemical Society*, **1983**, 105, 2408-2413.
317. Razus, A. C.; Arvay, Z., Glatz, A. M. Aluminum Chloride Catalyzed Reactions of Unsaturated Acids With Benzene. XI. Isomerizations During the Reaction of Benzene With 4-Methyl-2-Pentenoic Acid. *Revue Roumaine de Chimie*, **1978**, 23, 753-758.
318. Takanami, T.; Tokoro, H.; Kato, D. i.; Nishiyama, S., Sugai, T. Chemo-Enzymatic Short-Step Total Synthesis of Symbioramide. *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 3291-3295.

-
319. Cao, Z. s.; Mendoza, J.; Dejesus, A., Giovanella, B. Synthesis and Anti-Tumor Activity of Alkenyl Camptothecin Esters. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2005**, *26*, 235-241.
320. Minin, P. L.; Walton, J. C. An Exploratory Study of Ring Closures of Aryl Radicals Onto Cyclopropyl- and Oxiranyl-Isocyanate Acceptors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2004**, *2*, 2471-2475.
321. Serafin, S. V.; Zhang, K.; Aurelio, L.; Hughes, A. B., Morton, T. H. Decomposition of Protonated Threonine, Its Stereoisomers, and Its Homologues in the Gas Phase: Evidence for Internal Backside Displacement. *Organic Letters*, **2004**, *6*, 1561-1564.
322. Kato, K.; Ono, M., Akita, H. New Total Synthesis of (+)-, (-)- and (+)-Chuangxinmycins. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 10055-10062.
323. Glabe, A. R.; Sturgeon, K. L.; Ghizzoni, S. B.; Musker, W. K., Takahashi, J. N. Novel Functionalized Acylphosphonates As Phosphonoformate Analogs. *Journal of Organic Chemistry*, **1996**, *61*, 7212-7216.
324. Kumar, A.; Bhakuni, V. Enantioselective Epoxidation Using Liposomized M-Chloroperbenzoic Acid (LIP MCPBA). *Tetrahedron Letters*, **1996**, *37*, 4751-4754.
325. Moyna, G.; Williams, H. J., Scott, A. I. An Improved Procedure for the Epoxidation of Methyl Cinnamate Derivatives and Production of Acid-Sensitive Epoxides. *Synthetic Communications*, **1996**, *26*, 2235-2239.
326. Kirshenbaum, K. S.; Sharpless, K. B. Improved Procedure for the Tungstate-Catalyzed Epoxidation of α,β -Unsaturated Acids. *Journal of Organic Chemistry*, **1985**, *50*, 1979-1982.
327. Shan, Q. j. Synthesis, Characterization and Catalytic Activity of Tungstophosphates of Heteropoly Acid. *Hecheng Huaxue*, **2005**, *13*, 148-151.
328. Pfendt, L.; Drazic, B.; Popovic, G.; Drakulic, B.; Vitnik, Z., Juranic, I. Determination of All PKa Values of Some Di- and Tri-Carboxylic Unsaturated and Epoxy Acids and Their Polylinear Correlation With the Carboxylic Group Atomic Charges. *Journal of Chemical Research, Synopses*, **2003**, 247-248, 0501.
329. Detterbeck, R.; Hesse, M. Configuration and Enantioselective Synthesis of the Fungal Metabolite WF14861. *Helvetica Chimica Acta*, **2003**, *86*, 222-232.
330. Wu, X.; Liu, Z., et al., Preparation of DL-tartaric acid from maleic acid, 1050712.
331. Terris, N.; Ventura, M. Tungstate-Catalyzed Epoxidation of Half-Esters of Maleic Acid With Asymmetric Centers. *Anales de Quimica, Serie C: Quimica Organica y Bioquimica*, **1988**, *84*, 46-48.
332. Knopp, M., Regioselective process for the production of α -hydroxycarboxylate esters by the reaction of organoaluminum compounds with epoxy esters, 19944049.
333. Jansen, R.; Knopp, M.; Amberg, W.; Bernard, H.; Koser, S.; Mueller, S.; Muenster, I.; Pfeiffer, T., Riechers, H. Structural Similarity and Its Surprises: Endothelin Receptor Antagonists - Process Research and Development Report. *Organic Process Research & Development*, **2001**, *5*, 16-22.
334. Chong, J. M. Enantioselective Synthesis of Sitophilate, the Granary Weevil Aggregation Pheromone. *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 623-628.
-

-
335. Hayakawa, H.; Miyashita, M. A Tandem Synthesis of Polypropionate Chains. Highly Stereoselective Construction of C(13)-C(25) Segment Containing Nine Contiguous Chiral Centers of Swinholides A-C Based on the Stereospecific Methylation of G,d-Epoxy Acrylates by Trimethylaluminium. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1999**, 3399-3401.
336. Miyazawa, M.; Matsuoka, E.; Sasaki, S.; Oonuma, S.; Maruyama, K.; Miyashita, M. Expedient and Stereoselective Synthesis of Chiral *Trans*-b-Hydroxy-d-Lactone Systems. *Chemistry Letters*, **1998**, 109-110.
337. El Kady, M.; Mohamed, M. M., El Hashash, M. A. Some Reactions With B-Aroylacrylic Acid Epoxides. *Revue Roumaine de Chimie*, **1979**, *24*, 1499-1507.
338. Chong, J. M.; Sharpless, K. B. Regioselective Openings of 2,3-Epoxy Acids With Organocuprates. *Tetrahedron Letters*, **1985**, *26*, 4683-4686.
339. Petit, Y.; Sanner, C., Larcheveque, M. A Convenient Synthesis of Enantiomerically Pure (2*R*,3*S*)- and (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-Methylbutanoic Esters. *Synthesis*, **1988**, 538-540.
340. Chamberlain, S. D.; Koszalka, G. W.; Tidwell, J. H., Van Draanen, N., Preparation of benzimidazole nucleosides as virucides, 9725337, **1997**.
341. Ooms, L. A. A.; Degryse, A. D. A. Y., Serotonin antagonists for treating wounds, 19870918, **1988**.
342. Mitsuya, H.; Weinhold, K. J., Furman, P. A. 3'-Azido-3-Deoxythymidine (BWA509U): An Antiviral Agent That Inhibits the Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-Lymphotropicvirus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus in Vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1985**, *82*, 7096-7100.
343. Leonard, N. J.; Greenfield, J. C.; Schmitz, R. Y., Skoog, F. Photoaffinity-Labeled Auxins. Synthesis and Biological Activity. *Plant Physiology*, **1975**, *55*, 1057-1061.
344. Melhado, L. L.; Jones, A. M.; Leonard, N. J., Vanderhoef, L. N. Azido Auxins: Synthesis and Biological Activity of Fluorescent Photoaffinity Labeling Agents. *Plant Physiology*, **1981**, *68*, 469-475.
345. Mornet, R.; Theiler, J. B.; Leonard, N. J.; Schmitz, R. Y.; Moore, F. H., III, Skoog, F. Active Cytokinins. Photoaffinity Labeling Agents to Detect Binding. *Plant Physiology*, **1979**, *64*, 600-610.
346. Theiler, J. B.; Leonard, N. J.; Schmitz, R. Y., Skoog, F. Photoaffinity-Labeled Cytokinins. Synthesis and Biological Activity. *Plant Physiology*, **1976**, *58*, 803-805.
347. Willows, R. D.; Milborrow, B. V. Synthesis and Properties of C-1-Azido-ABA. *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 869-873.
348. Tanaka, F. S.; Wien, R. G., Suttle, J. C. Synthesis and Bioactivity of Photoaffinity Labels of the Plant Growth Regulator 1-(3-Chlorophthalimido)Cyclohexanecarboxamide (AC 94377). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1991**, *39*, 554-559.
349. Ojima, I.; McCarthy, J.; Welch, J. T. *Biomedical frontiers of fluorine chemistry*; ACS Symposium Series 639: USA, **1996**.
350. He, H.; Chen, T.; Wang, T.; Li, Y., Shen, P., Preparation of fluoro-substituted (phenoxyacetoxy)methylphosphonic acid esters and salts as herbicides and plant growth regulators, 1560058.
-

-
351. Medebielle, M.; Fujii, S., Kato, K. An Electrochemical Approach for the Synthesis of Perfluoroalkylated Purine and Indole Analogs of Plant Growth Regulators. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 2655-2664.
352. Katayama, M.; Fujii, S.; Kimoto, H., Kato, K., Substituted fluorine-containing b-indolebutyric acid derivatives, their preparation, and their use as plant growth regulators, 652212.
353. Katayama, M. Synthesis and Biological Activities of Plant Growth Regulators Containing Fluorine. *Bio Industry*, **1995**, *12*, 34-40.
354. Katayama, M.; Fujii, S.; Kimoto, H., Shida, A., Preparation of fluorine-containing b-indolebutyrates as plant growth regulators, 05279331.
355. Hirai, N., Preparation of fluorine-containing abscisic acid derivatives as plant growth regulators, 07242590.
356. Todoroki, Y.; Hirai, N., Ohigashi, H. Synthesis, Biological Activity and Metabolism of (S)-(+)-3'-Fluoroabscisic Acid. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 6911-6926.
357. Bush, B. L.; Sheridan, R. P. PATTY: a Programable Atom Typer and Language for Automatic Classification of Atoms in Molecular Databases. *J.Chem.Inf.Comput.Sci.*, **1993**, *33*, 756-762.
358. Barrett, A. G. M.; Beall, J. C.; Braddock, D. C.; Flack, K.; Gibson, V. C., Salter, M. M. Asymmetric Allylboration and Ring Closing Alkene Metathesis: A Novel Strategy for the Synthesis of Glycosphingolipids. *Journal of Organic Chemistry*, **2000**, *65*, 6508-6514.
359. Mungall, W. S.; Greene, G. L.; Heavner, G. A., Letsinger, R. L. Nucleotide Chemistry. XX. Use of the Azido Group in the Synthesis of 5'-Terminal Aminodeoxythymidine Oligonucleotides. *Journal of Organic Chemistry*, **1975**, *40*, 1659-1662.
360. Alper, P. B.; Hung, S. C., Wong, C. H. Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides From Amines. *Tetrahedron Letters*, **1996**, *37*, 6029-6032.
361. Cavender, C. J.; Shiner, V. J., Jr. Trifluoromethanesulfonyl Azide. Its Reaction With Alkyl Amines to Form Alkyl Azides. *Journal of Organic Chemistry*, **1972**, *37*, 3567-3569.
362. Doering, W.; DePuy, C. H. Diazocyclopentadiene. *Journal of the American Chemical Society*, **1953**, *75*, 5955-5957.
363. Rijkers, D. T. S.; van Vugt, H. H. R.; Jacobs, H. J. F., Liskamp, R. M. J. A Convenient Synthesis of Azido Peptides by Post-Assembly Diazo Transfer on the Solid Phase Applicable to Large Peptides. *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 3657-3660.
364. Ruff, J. K. Sulfur Oxyfluoride Derivatives. II. *Inorg.Chem.*, **1965**, *4*, 567-570.
365. Zaloom, J.; Roberts, D. C. Preparation of Azido Derivatives From Amino Acids and Peptides by Diazo Transfer. *Journal of Organic Chemistry*, **1981**, *46*, 5173-5176.
366. Evans, D. A.; Britton, T. C.; Ellman, J. A., Dorow, R. L. The Asymmetric Synthesis of α -Amino Acids. Electrophilic Azidation of Chiral Imide Enolates, a Practical Approach to the Synthesis of (R)- and (S)- α -Azido Carboxylic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, **1990**, *112*, 4011-4030.
367. Determann, H.; Zipp, O., Wieland, T. Plastein Reactions. IV. Syntheses of Further Plastein-Active Pentapeptides. *Ann.*, **1962**, *651*, 172-184.
-

368. Chen, H. G.; Goel, O. P. Pictet-Spengler Cyclization of 3,3-Diphenylalanine (DIP). III. Synthesis of Optically Pure 1,2,3,4-Tetrahydro-4-Phenyl-3-Isoquinolinecarboxylic Acids, Novel α -Amino Acids for Peptides of Biological Interest. *Synthetic Communications*, **1995**, *25*, 49-56.
369. Draper, R. W.; Hou, D.; Iyer, R.; Lee, G. M.; Liang, J. T.; Mas, J. L., Vater, E. J. Novel Stereoselective Syntheses of the Fused Benzazepine Dopamine D1 Antagonist (6a*S*,13b*R*)-11-Chloro-6,6a,7,8,9,13b-Hexahydro-7-Methyl-5H-Benzo[d]Naphth[2,1-b]Azepin-12-ol: 2. *L*-Homophenylalanine-Based Syntheses. *Organic Process Research & Development*, **1998**, *2*, 186-193.
370. McClure, D. E.; Lumma, P. K.; Arison, B. H.; Jones, J. H., Baldwin, J. J. 1,4-Oxazines Via Intramolecular Ring Closure of β -Hydroxydiazoacetamides: Phenylalanine to Tetrahydroindeno[1,2-*b*]-1,4-Oxazin-3(2H)-Ones. *Journal of Organic Chemistry*, **1983**, *48*, 2675-2679.
371. Ousmer, M.; Braun, N. A.; Bavoux, C.; Perrin, M., Ciufolini, M. A. Total Synthesis of Tricyclic Azaspirane Derivatives of Tyrosine: FR901483 and TAN1251C. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, *123*, 7534-7538.
372. Wardrop, D. J.; Basak, A. *N*-Methoxy-*N*-Acylnitrenium Ions: Application to the Formal Synthesis of (-)-TAN1251A. *Organic Letters*, **2001**, *3*, 1053-1056.
373. Wei, Z. Y.; Knaus, E. E. A Short Efficient Synthesis of (*S*)-4-Amino-5-Hexenoic Acid [(*S*)-Vigabatrin]. *Journal of Organic Chemistry*, **1993**, *58*, 1586-1588.
374. Brewster, P.; Hughes, E. D.; Ingold, C. K., Rao, P. A. D. S. Configuration of Carbohydrates, Hydroxy Acids, and Amino Acids. Stereochemical Standards of Configuration. *Nature (London, United Kingdom)*, **1950**, *166*, 178-179.
375. Degerbeck, F.; Fransson, B.; Grehn, L., Ragnarsson, U. Synthesis of Nitrogen-15-Labeled Chiral Boc-Amino Acids From Triflates: Enantiomers of Leucine and Phenylalanine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, **1993**, 11-14.
376. Koppenhoefer, B.; Trettin, U.; Figura, R., Lin, B. Accurate Determination of the Intrinsic Racemization in Chiral Synthesis Via Enantiomer Resolution of Underivatized Vicinal Diols. *Tetrahedron Letters*, **1989**, *30*, 5109-5110.
377. Kunz, H.; Lerchen, H. G. Stereocontrolled Synthesis of *D*- α -Hydroxy Carboxylic Acids From *L*-Amino Acids. *Tetrahedron Letters*, **1987**, *28*, 1873-1876.
378. Reese, C. B. *Protective Groups in Organic Chemistry*; Ed. Plenum Press: London, **1973**; pp. Cap.3.
379. Fieser, L. F.; Fieser, M. *Reagents for Organic Chemistry*; New York, **1967**; pp.256.
380. Kim, H. O.; Olsen, R. K., Choi, O. S. Copper(I)-Promoted Condensation of α -Amino Acids With β -Keto Thio Esters: Synthesis of *N*-Acylated *L*-Leucine Derivatives Containing (*S*)-4-Hydroxy-5-Methyl- and (*S*)-4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3-Oxohexanoic Acid. *Journal of Organic Chemistry*, **1987**, *52*, 4531-4536.
381. Kuisle, O.; Quinoa, E., Riguera, R. A General Methodology for Automated Solid-Phase Synthesis of Depsides and Depsipeptides. Preparation of a Valinomycin Analog. *Journal of Organic Chemistry*, **1999**, *64*, 8063-8075.

-
382. Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T., Yamaguchi, M. A Rapid Esterification by Mixed Anhydride and Its Application to Large-Ring Lactonization. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1979**, 52, 1989-1993.
383. Zhdanov, R. I.; Zhenodarova, S. M. Chemical Methods of Oligonucleotide Synthesis. *Synthesis*, **1975**, 222-245.
384. Weber, H.; Khorana, H. G. Polynucleotides. CIV. Total Synthesis of the Structural Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid From Yeast. Chemical Synthesis of an Icosadeoxynucleotide Corresponding to the Nucleotide Sequence 21 to 40. *Journal of Molecular Biology*, **1972**, 72, 219-249.
385. Hirschmann, R. F.; Miller, R.; Wood, J., Jones, R. E. The Reaction of Epoxides With Anhydrous Hydrogen Fluoride in the Presence of Organic Bases. The Preparation of 9a-Fluoro-4-Pregnene-11b,17a,21-Triol-3,20-Dione 21-Acetate and Its Dehydro Analog. *Journal of the American Chemical Society*, **1956**, 78, 4956-4959.
386. Fried, J.; Florey, K.; Sabo, E. F.; Herz, J. E.; Restivo, A. R.; Borman, A., Singer, F. M. Synthesis and Biological Activity of 1- and 6-Dehydro-9a-Halocorticoids. *Journal of the American Chemical Society*, **1955**, 77, 4181-4182.
387. Aranda, G.; Jullien, J., Martin, J. A. Preparation of Aliphatic Fluoro Alcohols From Epoxides and Amine Hydrofluorides. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1965**, 1890-1892.
388. Bergstrom, C. G.; Nicholson, R. T., Dodson, R. M. 9a-Fluoro-11-Deoxy Steroids. *Journal of Organic Chemistry*, **1963**, 28, 2633-2640.
389. Bolle, J. C., Amide hydrofluorides, FR 1370827, **1964**.
390. Balicheva, T. G.; Borodin, P. M., Pologikh, I. V. Inclusion Compounds Formed by Hydrohalic Acids With Hexamethylenetetramine Studied From N.M.R. and Infrared Spectroscopic Data. *Yadernyi Magnitnyi Rezonans*, **1969**, No. 3, 49-56.
391. Hecht, S. S.; Rothman, E. S. Amide Hydrofluoroborates. *Journal of Organic Chemistry*, **1973**, 38, 395-396.
392. Fluorinated steroids, FR 1374591, **1964**.
393. Van den Akker, M.; Jellinek, F. Triphenylphosphonium and Triethylphosphonium Halides. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, **1967**, 86, 275-288.
394. Politanskii, S. F.; Ivanyk, G. D.; Sarancha, V. N., Shevchuk, V. U. Reaction of Hydrogen Fluoride With Alcohols and Ethers. *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, **1974**, 10, 693-696.
395. Olah, G. A.; Welch, J. T.; Vankar, Y. D.; Nojima, M.; Kerekes, I., Olah, J. A. Synthetic Methods and Reactions. 63. Pyridinium Poly(Hydrogen Fluoride) (30% Pyridine-70% Hydrogen Fluoride): a Convenient Reagent for Organic Fluorination Reactions. *Journal of Organic Chemistry*, **1979**, 44, 3872-3881.
396. Pattison, F. L. M.; Buchanan, R. L., Dean, F. H. The Synthesis of α -Monofluoroalkanoic Acids. *Canadian Journal of Chemistry*, **1965**, 43, 1700-1713.
397. Gershon, H.; Schulman, S. G., Spevack, A. D. Organic Fluorine Compounds. III. Action of Perchloryl Fluoride on Substituted Ethyl Cyanoacetates and Animal Toxicities of the Fluorinated Products. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1967**, 10, 536-541.
-

-
398. Knunyants, I. L.; Dyatkin, B. L.; German, L. S., Mochalina, E. P. Condensation of Formaldehyde With Trifluoroethylene. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya*, **1962**, 1676-1677.
399. Dean, F. H.; Pattison, F. L. M. Monofluorosuccinic Acid. *Canadian Journal of Chemistry*, **1963**, *41*, 1833-1836.
400. Keck, R.; Retey, J. Stereospecific 1,2-Migration of Hydroxyl, Aryl, and Alkyl Groups During the Nitrosation of Amino Acids in Hydrogen Fluoride/Pyridine. *Helvetica Chimica Acta*, **1980**, *63*, 769-772.
401. Barber, J.; Keck, R., Retey, J. The Transformation of α -Amino Acids into Fluoro Acids. *Tetrahedron Letters*, **1982**, *23*, 1549-1552.
402. Olah, G. A.; Prakash, G. K. S., Chao, Y. L. Synthetic Methods and Reactions. Part 106. Suppression of Anchimerically Assisted Rearrangement Products in the Synthesis of α -Fluorocarboxylic Acids From α -Amino Acids With 48:52 (w/w) Hydrogen Fluoride/Pyridine. *Helvetica Chimica Acta*, **1981**, *64*, 2528-2530.
403. Hamman, S.; Beguin, C. G. Effect of the Concentration of Hydrofluoric Acid in Pyridine on the Regioselectivity of Fluorination by Deamination of α -Amino Esters: Synthesis of B-Fluoro Carboxyl Compounds. *Tetrahedron Letters*, **1983**, *24*, 57-60.
404. Faustini, F.; De Munari, S.; Panzeri, A.; Villa, V., Gandolfi, C. A. Stereospecificity in the Transformation of α -Amino Acids into Fluoro Acids. *Tetrahedron Letters*, **1981**, *22*, 4533-4536.
405. Olah, G. A.; Welch, J. Synthetic Methods and Reactions XII. Preparation of α -Fluorocarboxylic Acids From α -Amino Acids Via Diazotization in Polyhydrogen Fluoride/Pyridine Solution. *Synthesis*, **1974**, 652.
406. Boemelburg, J.; Heppke, G., Ranft, A. Synthesis and Ferroelectric Properties of Chiral Esters of 2,5-Diphenylpyrimidines With Different α -Fluoro Carboxylic Acids. *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences*, **1989**, *44*, 1127-1131.
407. Sierra, T.; Serrano, J. L.; Ros, M. B.; Ezcurra, A., Zubia, J. Synthesis and Study of New α -Haloacid Ferroelectric Liquid Crystal Derivatives. MM2 Approach to the Molecular Structure-Ferroelectric Activity Relationship. *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, *114*, 7645-7651.
408. Percec, V.; Oda, H. Heterochiral Interactions in Molecular and Macromolecular Pairs of Liquid Crystals of (*R*)- and (*S*)-2-Fluoro-4-Methylpentyl 4'-((8-(Vinylloxy)Octyl)Oxy)Biphenyl-4-Carboxylate Enantiomers. *Macromolecules*, **1994**, *27*, 5821-5832.
409. Hamman, S.; Barrelle, M.; Tetaz, F., Beguin, C. G. 2-Fluoro-2-Phenylacetic Acid: Synthesis, Absolute Configuration, and Use As a Chiral Derivatizing Agent. *Journal of Fluorine Chemistry*, **1987**, *37*, 85-94.
410. Lowe, G.; Potter, B. V. L. Synthesis, Absolute Configuration, and Circular Dichroism of the Enantiomers of Fluorosuccinic Acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, **1980**, 2029-2032.
411. Briggs, C. R. S.; O'Hagan, D.; Howard, J. A. K., Yufit, D. S. The C-F Bond As a Tool in the Conformational Control of Amides. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2003**, *119*, 9-13.
412. Banks, J. W.; O'Hagan, D. The Enzymatic Resolution of an α -Fluoro Amide by an Acylase. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2000**, *102*, 235-238.
-

413. Shiina, I.; Miyoshi, S.; Miyashita, M., Mukaiyama, T. A Useful Method for the Preparation of Carboxylic Esters From Free Carboxylic Acids and Alcohols. *Chemistry Letters*, **1994**, 515-518.
414. Izumi, J.; Shiina, I., Mukaiyama, T. An Efficient Esterification Reaction Between Equimolar Amounts of Free Carboxylic Acids and Alcohols by the Combined Use of Octamethylcyclotetrasiloxane and a Catalytic Amount of Titanium(IV) Chloride Tris(Trifluoromethanesulfonate). *Chemistry Letters*, **1995**, 141-142.
415. Otton, J.; Ratton, S.; Vasnev, V. A.; Markova, G. D.; Nametov, K. M.; Bakhmutov, V. I.; Komarova, L. I.; Vinogradova, S. V., Korshak, V. V. Investigation of the Formation of Poly(Ethylene Terephthalate) With Model Molecules: Kinetics and Mechanisms of the Catalytic Esterification and Alcoholysis Reactions. II. Catalysis by Metallic Derivatives (Monofunctional Reactants). *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1988**, 26, 2199-2224.
416. Steliou, K.; Szczygielska-Nowosielska, A.; Favre, A.; Poupart, M. A., Hanessian, S. Reagents for Organic Synthesis: Use of Organostannyl Oxides As Catalytic Neutral Esterification Agents in the Preparation of Macrolides. *Journal of the American Chemical Society*, **1980**, 102, 7578-7579.
417. Kumar, A. K.; Chattopadhyay, T. K. Catalytic Role of Diorganotin Dichloride in Esterification of Carboxylic Acids. *Tetrahedron Letters*, **1987**, 28, 3713-3714.
418. Otera, J.; Danoh, N., Nozaki, H. Novel Template Effects of Distannoxane Catalysts in Highly Efficient Transesterification and Esterification. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, 56, 5307-5311.
419. Ishihara, K.; Ohara, S., Yamamoto, H. Direct Condensation of Carboxylic Acids With Alcohols Catalyzed by Hafnium(IV) Salts. *Science (Washington, D.C.)*, **2000**, 290, 1140-1142.
420. Suzuki, K. Novel Lewis Acid Catalysis in Organic Synthesis. *Pure and Applied Chemistry*, **1994**, 66, 1557-1564.
421. Hachiya, I.; Moriwaki, M., Kobayashi, S. Hafnium(IV) Trifluoromethanesulfonate, an Efficient Catalyst for the Friedel-Crafts Acylation and Alkylation Reactions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1995**, 68, 2053-2060.
422. Kobayashi, S.; Moriwaki, M., Hachiya, I. The Catalytic Fries Rearrangement and O-Acylation Reactions Using Group 3 and 4 Metal Triflates As Catalysts. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1997**, 70, 267-273.
423. Blossey, E. C.; Turner, L. M., Neckers, D. C. Polymer Protected Reagents. II. Esterifications With Polymer Protected Aluminum Chloride. *Tetrahedron Letters*, **1973**, 1823-1826.
424. Kadaba, P. K. Esterification of Heterocyclic Carboxylic Acids Using a Boron Trifluoride Etherate-Alcohol Reagent. *Synthesis*, **1972**, 628-630.
425. Lowrance, W. W., Jr. Boric Acid-Catalyzed Esterification of Phenols. *Tetrahedron Letters*, **1971**, 37, 3453-3454.
426. ago-Meseguer, J.; Palomo-Coll, A. L.; Fernandez-Lizarbe, J. R., Zugaza-Bilbao, A. A New Reagent for Activating Carboxyl Groups: Preparation and Reactions of *N,N*-Bis[2-Oxo-3-Oxazolidinyl]Phosphorodiamidic Chloride. *Synthesis*, **1980**, 547-551.
427. Mandal, A. K.; Hines, J.; Kuramochi, K., Crews, C. M. Developing Microcolin A Analogs As Biological Probes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15, 4043-4047.

428. Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Sindona, G., Tagarelli, A. Regioselective Acylation of Secondary Hydroxyl Groups by Means BOP-Cl. *Synthetic Communications*, **2004**, *34*, 4207-4217.
429. De Nino, A.; Leggio, A.; Liguori, A.; Maiuolo, L.; Napoli, A.; Procopio, A.; Roberti, E.; Siciliano, C., Sindona, G. Regioselective Synthesis of Aminoacylthymidines by Direct Esterification With Bis(2-Oxooxazolidin-3-Yl)Phosphinic Chloride (BOP-Cl). *Gazzetta Chimica Italiana*, **1996**, *126*, 605-608.
430. Thottathil, J. K., Methods for the preparation of taxanes using oxazolidine intermediates, 735036.
431. Liguori, A.; Procopio, A.; Romeo, G.; Sindona, G., Uccella, N. Regioselective Acylation of Methyl α -D-Glucopyranoside and Methyl α -D-Mannopyranoside by Means of Bis(2-Oxooxazolidin-3-Yl)Phosphinic Chloride (BOP-Cl). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, **1993**, 1783-1786.
432. Liguori, A.; Perri, E.; Sindona, G., Uccella, N. Chemo- and Regioselective Acylation of Deoxyribonucleosides by Means of Chloro-*N,N*-Bis(2-Oxo-3-Oxazolidinyl) Phosphine Oxide. *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 229-234.
433. Coste, J.; Frerot, E.; Jouin, P., Castro, B. Oxybenzotriazole Free Peptide Coupling Reagents for *N*-Methylated Amino Acids. *Tetrahedron Letters*, **1991**, *32*, 1967-1970.
434. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Dourtoglou, B.; Evin, G.; Selve, C., Ziegler, J. C. Peptide Coupling Reagents. VI. A Novel, Cheaper Preparation of Benzotriazolylxytris[Dimethylamino]Phosphonium Hexafluorophosphate (BOP Reagent). *Synthesis*, **1976**, 751-752.
435. Isobe, T.; Ishikawa, T. 2-Chloro-1,3-Dimethylimidazolium Chloride. 1. A Powerful Dehydrating Equivalent to DCC. *Journal of Organic Chemistry*, **1999**, *64*, 6984-6988.
436. Fujisawa, T.; Mori, T.; Fukumoto, K., Sato, T. *N,N,N',N'*-Tetramethylchloroformamidinium Chloride As an Efficient Condensation Reagent for a Novel Esterification Applicable to the Macrolide Synthesis. *Chemistry Letters*, **1982**, 1891-1894.
437. Mitsunobu, O.; Yamada, M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid Via Quaternary Phosphonium Salts. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1967**, *40*, 2380-2382.
438. Mitsunobu, O. The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products. *Synthesis*, **1981**, 1-28.
439. Hughes, D. L. The Mitsunobu Reaction. *Organic Reactions (New York)*, **1992**, *42*, 335-656.
440. Hughes, D. L. Progress in the Mitsunobu Reaction. A Review. *Organic Preparations and Procedures International*, **1996**, *28*, 127-164.
441. Hassner, A.; Alexanian, V. Synthetic Methods. 12. Direct Room Temperature Esterification of Carboxylic Acids. *Tetrahedron Letters*, **1978**, 4475-4478.
442. Neises, B.; Steglich, W. 4-Dialkylaminopyridines As Acylation Catalysts. 5. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie*, **1978**, *90*, 556-557.
443. Hoefle, G.; Steglich, W. 4-Dialkylaminopyridines As Acylation Catalysts. III. Acylation of Sterically Hindered Alcohols. *Synthesis*, **1972**, 619-621.

444. Kappe, T.; Fruehwirth, F. Non-Steroidal Antiinflammatory Agents. V. Basic Esters of Indomethacin. *Journal fuer Praktische Chemie (Leipzig)*, **1990**, 332, 475-478.
445. Gibson, F. S.; Park, M. S., Rapoport, H. Bis[[4-(2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolyl)]Methyl]-Carbodiimide (BDDC) and Its Application to Residue-Free Esterifications, Peptide Couplings, and Dehydrations. *Journal of Organic Chemistry*, **1994**, 59, 7503-7507.
446. Boden, E. P.; Keck, G. E. Proton-Transfer Steps in Steglich Esterification: a Very Practical New Method for Macrolactonization. *Journal of Organic Chemistry*, **1985**, 50, 2394-2395.
447. Okamura, H.; Kuroda, S.; Ikegami, S.; Ito, Y.; Katsuki, T., Yamaguchi, M. A Formal Total Synthesis of Aplysiatoxin. *Tetrahedron Letters*, **1991**, 32, 5141-5142.
448. Dhimitruka, I.; Santa Lucia, J., Jr. Investigation of the Yamaguchi Esterification Mechanism. Synthesis of a Lux-S Enzyme Inhibitor Using an Improved Esterification Method. *Organic Letters*, **2006**, 8, 47-50.
449. Ghosh, A. K.; Swanson, L. Enantioselective Synthesis of (+)-Cryptophycin 52 (LY355703), a Potent Antimitotic Antitumor Agent. *Journal of Organic Chemistry*, **2003**, 68, 9823-9826.
450. Nagamitsu, T.; Takano, D.; Fukuda, T.; Otaguro, K.; Kuwajima, I.; Harigaya, Y., Omura, S. Total Synthesis of (-)-Borrelidin. *Organic Letters*, **2004**, 6, 1865-1867.
451. Ichikawa, Y.; Tsuboi, K.; Jiang, Y.; Naganawa, A., Isobe, M. Total Synthesis of (+)-Tautomycin. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 7101-7104.
452. Nicolaou, K. C.; Patron, A. P.; Ajito, K.; Richter, P. K.; Khatuya, H.; Bertinato, P.; Miller, R. A., Tomaszewski, M. J. Total Synthesis of Swinholide A, Preswinholide A, and Hemiswinholide A. *Chemistry--A European Journal*, **1996**, 2, 847-868.
453. Shimizu, S.; Nakamura, S. i.; Nakada, M., Shibasaki, M. Total Synthesis of (+)-Tautomycin. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 13363-13408.
454. Nakajima, N.; Uoto, K., Yonemitsu, O. Chiral Synthesis of Polyketide-Derived Natural Products. 29. A Stereocontrolled Synthesis of the 16-Membered Ring Macrolide Aglycones, Niddanolide, Carbonolide B, and Platenonolide W1. *Heterocycles*, **1990**, 31, 5-8.
455. Richardson, T. I.; Rychnovsky, S. D. Total Synthesis of Filipin III. *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, 119, 12360-12361.
456. Berger, M.; Mulzer, J. Total Synthesis of Tartrolon B. *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121, 8393-8394.
457. Richardson, T. I.; Rychnovsky, S. D. Total Synthesis of Filipin III. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 8977-8996.
458. Paterson, I.; Chen, D. Y.-K.; Acena, J. L., Franklin, A. S. Studies in Marine Polypropionate Synthesis: Total Synthesis of (-)-Baconipyron C. *Organic Letters*, **2000**, 2, 1513-1516.
459. Tian, Z.; Cui, H., Wang, Y. Synthesis of Linear and Cyclic Dimeric Ester Derivatives From Bile Acids and Glycine. *Synthetic Communications*, **2002**, 32, 3821-3829.
460. Queron, E.; Lett, R. Synthetic Studies on Bafilomycin A1: Stereoselective Synthesis of the C12-C17 Fragment and Its Coupling With the C1-C11 Subunit. *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 4533-4537.

-
461. Lepage, O.; Kattnig, E.; Fuerstner, A. Total Synthesis of Amphidinolide X. *Journal of the American Chemical Society*, **2004**, *126*, 15970-15971.
462. Wender, P. A.; Baryza, J. L.; Brenner, S. E.; Clarke, M. O.; Gamber, G. G.; Horan, J. C.; Jessop, T. C.; Kan, C.; Pattabiraman, K.; Williams, T. J. Inspirations From Nature. New Reactions, Therapeutic Leads, and Drug Delivery Systems. *Pure and Applied Chemistry*, **2003**, *75*, 143-155.
463. Paterson, I.; Britton, R.; Ashton, K.; Knust, H.; Stafford, J. Synthesis of Antimicrofilament Marine Macrolides: Synthesis and Configurational Assignment of a C5-C16 Degradation Fragment of Reidispongiolide A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, *101*, 11986-11991.
464. Reicheneder, S.; Unverzagt, C. Glycoside Synthesis: Synthesis of Dimeric Terpenoyl Glycoside Side Chains From Cytotoxic Saponins. *Angewandte Chemie, International Edition*, **2004**, *43*, 4353-4357.
465. Intelmann, C. M.; Dietz, H.; Plieth, W. Preparation of Gold Nanoparticles on Ultrathin Films of Polythiophene and Polythiophene Derivatives. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2005**, 3711-3716.
466. Mlynarski, J.; Ruiz-Caro, J.; Furstner, A. Total Synthesis of Macroviracin D (BA-2836-4). *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **2004**, *10*, 2214-2222.
467. Ando, K.; Yamada, T.; Shibuya, M. Synthetic Approach Toward Azinomycins. *Heterocycles*, **1989**, *29*, 2209-2218.
468. Nicolaou, K. C.; Li, Y.; Fylaktakidou, K. C.; Mitchell, H. J.; Wei, H. X.; Weyershausen, B. Total Synthesis of Apoptolidin: Part 1. Retrosynthetic Analysis and Construction of Building Blocks. *Angewandte Chemie, International Edition*, **2001**, *40*, 3849-3854.
469. Ortuno, R. M.; Merce, R.; Font, J. Reactions of Some *D*-Ribonolactone Derivatives With Alkyl Cuprates Synthesis of (+)-Eldanolide and (+)-Trans-Cognac Lactone. *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 4497-4506.
470. Tatsuta, K.; Nakano, S.; Narazaki, F.; Nakamura, Y. The First Total Synthesis and Establishment of Absolute Structure of Luminacins C1 and C2. *Tetrahedron Letters*, **2001**, *42*, 7625-7628.
471. Trost, B. M.; Krische, M. J. General Strategy for the Asymmetric Synthesis of the Picrotoxanes. *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, *118*, 233-234.
472. Wheatley, J. R.; Beacham, A. R.; Lilley, P. M.; Watkin, D. J.; Fleet, G. W. J. Ketals of *L*-Rhamnoheptonolactones: Potential Mimics of *L*-Rhamnose. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *5*, 2523-2534.
473. Yang, J.; Fu, X.; Jia, Q.; Shen, J.; Biggins, J. B.; Jiang, J.; Zhao, J.; Schmidt, J. J.; Wang, P. G.; Thorson, J. S. Studies on the Substrate Specificity of Escherichia Coli Galactokinase. *Organic Letters*, **2003**, *5*, 2223-2226.
474. Okamura, H.; Kuroda, S.; Ikegami, S.; Ito, Y.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. A Formal Total Synthesis of Aplysiatoxin. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 5141-5142.
475. Okamura, H.; Kuroda, S.; Ikegami, S.; Ito, Y.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. A Formal Total Synthesis of Aplysiatoxin. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 5141-5142.
476. Plattner, J. J.; Gless, R. D.; Rapoport, H. Synthesis of Some DE and CDE Ring Analogs of Camptothecin. *Journal of the American Chemical Society*, **1972**, *94*, 8613-8615.
-

477. Neilson, T.; Werstiuk, E. S. Oligoribonucleotide Synthesis. II. Preparation of 2'-O-Tetrahydropyranol Derivatives of Adenosine and Cytidine Necessary for Insertion in Stepwise Synthesis. *Canadian Journal of Chemistry*, **1971**, *49*, 493-499.
478. Chodounska, H.; Kasal, A. On Steroids. CCCXCVIII. Epalons: Synthesis of 3a,7a-Dihydroxy-5a-Pregnan-20-One. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1998**, *63*, 1543-1548.
479. Srikrishna, A.; Anebouselvy, K. Enantiospecific First Total Synthesis of (+)-Cis,Anti,Cis-3-Hydroxy-1,8,12,12-Tetramethyl-4-Oxatricyclo[6.4.0.0.2,6]Dodecan-9-Yl Senecioate, the Optical Antipode of a Natural Thapsane Isolated From *Thapsia Villosa*. *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 1031-1034.
480. Padwa, A.; Brodney, M. A.; Dimitroff, M.; Liu, B., Wu, T. Application of Furanyl Carbamate Cycloadditions Toward the Synthesis of Hexahydroindolinone Alkaloids. *Journal of Organic Chemistry*, **2001**, *66*, 3119-3128.
481. Kawada, K.; Kim, M., Watt, D. S. Synthesis of Quassinoids. 13. An Enantioselective Total Synthesis of (+)-Picrasin B. *Tetrahedron Letters*, **1989**, *30*, 5989-5992.
482. Siemann, H. J.; Droscher, P.; Undeutsch, B., Schwarz, S. A Novel Synthesis of 14a,15a-Methyleneestradiol (J 824). *Steroids*, **1995**, *60*, 308-315.
483. Harding, K. E.; Clement, K. S., Tseng, C. Y. Stereoselective Synthesis of (+)-Trichodiene. *Journal of Organic Chemistry*, **1990**, *55*, 4403-4410.
484. Ziegler, H. L.; Franzyk, H.; Sairafianpour, M.; Tabatabai, M.; Tehrani, M. D.; Bagherzadeh, K.; Hagerstrand, H.; Staerk, D., Jaroszewski, J. W. Erythrocyte Membrane Modifying Agents and the Inhibition of Plasmodium Falciparum Growth: Structure-Activity Relationships for Betulinic Acid Analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, *12*, 119-127.
485. Ahlstroem, M. M.; Ridderstroem, M.; Luthman, K., Zamora, I. Virtual Screening and Scaffold Hopping Based on GRID Molecular Interaction Fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2005**, *45*, 1313-1323.
486. Carbo, R.; Leyda, L., Arnau, M. How Similar Is a Molecule to Another? An Electron Density Measure of Similarity Between Two Molecular Structures. *International Journal of Quantum Chemistry*, **1980**, *17*, 1185-1189.
487. Miyashita, M.; Yoshikoshi, A., Grieco, P. A. Pyridinium P-Toluenesulfonate. A Mild and Efficient Catalyst for the Tetrahydropyranylation of Alcohols. *Journal of Organic Chemistry*, **1977**, *42*, 3772-3774.
488. Van Boom, J. H.; Herschied, J. D. M., Reese, C. B. P-Toluenesulfonic Acid As a Catalyst for the Rapid Tetrahydropyranylation and Methoxytetrahydropyranylation of Steroidal Alcohols. *Synthesis*, **1973**, 169-170.
489. Samu, E.; Huszthy, P.; Horvath, G.; Szollosy, A., Neszemlyi, A. Enantiomerically Pure Chiral Pyridino-Crown Ethers: Synthesis and Enantioselectivity Toward the Enantiomers of a-(1-Naphthyl)Ethylammonium Perchlorate. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 3615-3626.
490. Epton, R.; Editor. Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis: Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides. (*Collected Papers, Second International Symposium, 27-31 August, 1991, Canterbury, England*), **1992**, 540.
491. Hruby, V. J.; Meyer, J. P. Chemical Synthesis of Peptides. *Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins*, **1998**, 27-64, 473.

-
492. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. The Synthesis of Specific Ribonucleotides and Unrelated Phosphorylated Biomolecules by the Phosphoramidite Method. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 10441-10488.
493. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. The Synthesis of Modified Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach and Their Applications. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 6123-6194.
494. Shi, Y.; Machida, K.; Kuzuya, A., Komiyama, M. Design of Phosphoramidite Monomer for Optimal Incorporation of Functional Intercalator to Main Chain of Oligonucleotide. *Bioconjugate Chemistry*, **2005**, *16*, 306-311.
495. Lopez-Garcia, M.; Alfonso, I., Gotor, V. Chemoenzymatic Approach to a (*R*)-3,4-Diaminobutanoic Acid Derivative With a Suitable Orthogonal Protection for Solid Phase Peptide Synthesis. *Letters in Organic Chemistry*, **2004**, *1*, 254-256.
496. Watts, P.; Wiles, C.; Haswell, S. J., Pombo-Villar, E. Solution Phase Synthesis of B-Peptides Using Micro Reactors. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 5427-5439.
497. Garipey, J.; Remy, S.; Zhang, X.; Ballinger, J. R.; Bolewska-Pedyczak, E.; Rauth, M., Bisland, S. K. A Simple Two-Step Approach for Introducing a Protected Diaminedithiol Chelator During Solid-Phase Assembly of Peptides. *Bioconjugate Chemistry*, **2002**, *13*, 679-684.
498. Liu, W. Q.; Olszowy, C.; Bischoff, L., Garbay, C. Enantioselective Synthesis of (2*S*)-2-(4-Phosphonophenylmethyl)-3-Aminopropanoic Acid Suitably Protected for Peptide Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 1417-1419.
499. Marrano, C.; de Macedo, P.; Gagnon, P.; Lapierre, D.; Gravel, C., Keillor, J. W. Synthesis and Evaluation of Novel Dipeptide-Bound 1,2,4-Thiadiazoles As Irreversible Inhibitors of Guinea Pig Liver Transglutaminase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2001**, *9*, 3231-3241.
500. Qiu, Z.; Lu, M.; Zhang, C.; Hao, J.; Jiang, Z., Wang, X., Preparation of benzoates of meptazinol as its prodrugs for use as analgesics, 1569839, **2004**.
501. Johansson, A.; Poliakov, A.; Akerblom, E.; Wiklund, K.; Lindeberg, G.; Winiwarer, S.; Danielson, U. H.; Samuelsson, B., Hallberg, A. Acyl Sulfonamides As Potent Protease Inhibitors of the Hepatitis C Virus Full-Length NS3 (Protease-Helicase/NTPase): a Comparative Study of Different C-Terminals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2003**, *11*, 2551-2568.
502. Sharma, A. K.; Hergenrother, P. J. Efficient Synthesis of Enantiopure B-Amino- α -Keto Acids From *L*-Homoserine. *Organic Letters*, **2003**, *5*, 2107-2109.
503. O'Donnell, M. E.; Sanvoisin, J., Gani, D. Serine-Threonine Protein Phosphatase Inhibitors Derived From Nodularin: Role of the 2-Methyl and 3-Diene Groups in the Adda Residue and the Effect of Macrocyclic Conformational Restraint. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **2001**, 1696-1708.
504. Sulyok, G. A. G.; Gibson, C.; Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Wiesner, M., Kessler, H. Solid-Phase Synthesis of a Nonpeptide RGD Mimetic Library: New Selective Avb3 Integrin Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, *44*, 1938-1950.
505. Webster, K. L.; Maude, A. B.; O'Donnell, M. E.; Mehrotra, A. P., Gani, D. Design and Preparation of Serine-Threonine Protein Phosphatase Inhibitors Based Upon the Nodularin and Microcystin Toxin Structures. Part 3. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **2001**, 1673-1695.
-

506. Atherton, E.; Sheppard, R. C. The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group. *Peptides (New York, 1979-1987)*, **1987**, 9, 1-38.
507. Vidal, M.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2006**.