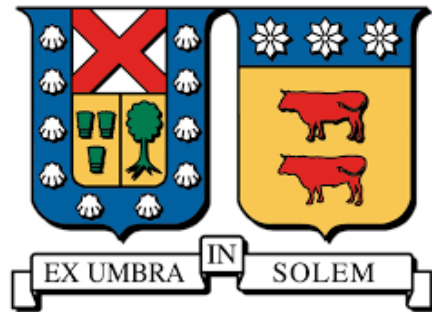


**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO
SANTA MARÍA**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL



**“SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS DE
BRASINOESTEROIDES FUNCIONALIZADOS EN CARBONO C-
23 CON GRUPOS BENZOATOS, CON APLICACIÓN EN
CULTIVO HIDROPÓNICO DE HORTALIZAS Y SU
PROYECCIÓN EN EL MERCADO DE ESTIMULANTES DE
CRECIMIENTO VEGETAL.”**

JOHAN EDUARDO ALCORCE SILVA

TESIS DE TITULACIÓN PARA OPTAR POR TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA
HENRIK HANSEN

PROFESORES CORREFERENTES
KATY DÍAZ PERALTA
MAURICIO OSORIO
LUIS ESPINOZA

2023
VALPARAÍSO CHILE

Agradecimientos

A mis padres, Wilson Alcorce y María Silva, por apoyarme siempre incondicionalmente, por alentarme y motivarme siempre a crecer y estudiar, a la vez de permitirme decidir libremente respecto a mi futuro y mi felicidad. Gracias por estar siempre presente, especialmente en los momentos más complejos, por apoyarnos mutuamente y por ser mi pilar más importante. Este logro es gracias a ustedes.

Agradezco a toda mi familia, quienes siempre creyeron en mí a pesar de los desafíos que encontré en el camino, que siempre están presente y conforman un núcleo diverso, lleno de amor, respeto y preocupación.

Quisiera agradecer también a mis amigos, aquellos con los que no nos vemos tanto porque las circunstancias de la vida no lo permiten, en especial a Íride, Eduardo, Marcos y Jazmín, a los cuales admiro muchísimo por lo que han logrado en el ámbito en el que decidieron desarrollarse y confío que logran cualquier meta que se propongan. A aquellos que conocí en esta universidad, en especial a Diego, Aura y Nacho con quienes compartí noches eternas de estudio y quienes hicieron la vida universitaria mucho más agradable y llevadera. A Vale y Sky, personas increíbles que me siento afortunado de haber cruzado caminos, que me han brindado consejos, soporte, comprensión y que espero pronto podamos encontrarnos. Y por supuesto a aquellos que he conocido durante el desarrollo de esta tesis, quienes han hecho de este año por lejos mi mejor experiencia en la universidad.

Un agradecimiento especial a Soledad Torres, “la profe”, quién fue un gran apoyo durante mi preparación para entrar a la universidad, ayudándome en mis estudios cuando más lo necesitaba y más compleja era la situación escolar a nivel nacional. Gracias por su vocación, por su entrega, por motivarme y alentarme a estudiar la carrera que escogí, y a quién en parte debo este logro.

Doy gracias también a mis profesores correferentes, al profesor Mauricio Osorio por ser mi mentor durante toda la etapa práctica, a la profesora Katy Díaz por ser mi guía en la componente biológica y en la confección de este escrito, al profesor Luis Espinoza por su tremendo apoyo en el aspecto teórico de esta tesis y al profesor Henrik Hansen por ser el profesor guía de este trabajo de título. Agradezco en general al departamento de química de la Universidad Técnica Federico Santa María por generar un grato ambiente de trabajo, con personas de gran calidad humana y docente, siempre dispuestos a escuchar, resolver consultas, compartir conocimiento y entregar consejos.

Finalmente, quisiera agradecer a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) y Dirección General de Investigación, Innovación y emprendimiento (DGIIE) de la Universidad Técnica Federico Santa María, cuyo financiamiento permitió el desarrollo de esta tesis.

Resumen Ejecutivo

La agricultura es una industria que está enfrentando grandes desafíos, el constante crecimiento de la población que conlleva a un aumento en la demanda de alimentos, los efectos del cambio climático en los métodos de cultivo, y la búsqueda de procesos menos contaminantes para el medioambiente, exigen encontrar nuevas técnicas de producción más eficientes y sostenibles.

Existen dos alternativas que han demostrado un alto potencial en el último tiempo, la primera es la implementación de técnicas hidropónicas en cultivos, donde destaca la técnica de film nutritivo con el mayor uso a nivel mundial. La segunda es la aplicación de estimulantes de crecimiento vegetal, los cuales generan múltiples beneficios que mejoran la calidad y rendimiento de los cultivos, y de entre los cuales los Brasinoesteroides (en adelante BRs) en particular han captado el interés de estudios por su actividad biológica en bajas concentraciones, variedad de efectos en diversas especies vegetales y el aumento en el rendimiento de cultivos. Sin embargo, a la fecha no existen estudios del efecto que tiene implementar ambas opciones simultáneamente en cultivos, especialmente en aquellos de importancia comercial.

El objetivo de este trabajo fue sintetizar nuevos análogos de BRs funcionalizados en Carbono C-23 con grupos benzoatos sustituidos con halógenos en posición 4, y aplicarlos en forma exógena en sistemas de cultivos hidropónicos para aumentar el rendimiento de *Lycopersicum*. Adicionalmente, se realizó un análisis de mercado para los nuevos análogos, determinando si existe demanda en la agroindustria y si su comercialización es factible.

Se logró la síntesis de tres análogos: **45a**, **45b** y **45c**, a través de la ruta de síntesis propuesta, donde se puede observar que las etapas desarrolladas generan los productos esperados con, en general, buenos rendimientos. Los compuestos finales e intermedios de síntesis fueron caracterizados por medio de sus propiedades físicas y espectroscópicas.

Se evaluó la actividad promotora de crecimiento vegetal en estado libre de estos análogos por medio de la aplicación del bioensayo estándar de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA), e *in vivo* en condiciones hidropónicas, donde destacó el compuesto **45a** con la mayor actividad, a la mayor concentración evaluada (1×10^{-6} M). Sin embargo, todas las actividades resultaron ser menos de la mitad de la brasinólida (**1**) utilizado como control positivo. El compuesto **45b** por su parte, muestra una actividad independiente de la concentración aplicada.

La prueba hidropónica se llevó a cabo durante un mes, en condiciones controladas (16 h día/8 h noche, a 22°C y 50% de humedad relativa), tras lo cual se evaluaron los parámetros fisiológicos de las plantas en respuesta a la aplicación exógena de tres soluciones con análogos de BRs en forma independiente a 1×10^{-8} M (**45a**, **45b** y **45c**), más el control negativo con solución de macronutrientes y micronutrientes estándar, y los controles positivos que incorporan el compuesto **1** y **21** (de forma independiente) en sus soluciones. Los resultados indican que el análogo de **21** sintetizado en series anteriores y que destacó dentro de la batería de compuestos como bioactivo, resultó tan eficiente como la Brasinólida (**1**) en las distintas variables fisiológicas medidas, incluso superándola en los resultados de rendimiento de biomasa seca. Otras plantas que se destacaron en las distintas variables fueron las tratadas con el análogo **45b**, con resultados similares a los de **1**. Por su parte, el análogo **45a** no presenta actividad *in vivo*, mientras que el análogo **45c** presenta la mayoría de los parámetros superiores a los del compuesto **45a**, pero alcanzan cuando mucho un tercio de los valores del control negativo.

En relación con la producción de pigmentos, las plantas tratadas con los compuestos **21** y **45b** producen mayor cantidad de carotenos que el control positivo **1** y el triple que el control negativo. Es posible concluir que estos compuestos administrados en modalidad de cultivo hidropónico podrán mejorar el crecimiento y calidad de las plantas, así como las variables de los frutos.

En cuanto al estudio de mercado, se determinó que el mercado de reguladores de crecimiento vegetal es uno robusto, con un crecimiento proyectado de un 7,4% en los próximos cinco años, lo que va de la mano con el crecimiento de la industria de alimentos orgánicos. Los “drivers” que impulsan este crecimiento son el aumento de la relevancia de desarrollar prácticas sustentables en agricultura (motivado principalmente por el cambio climático), la necesidad de aumentar la producción agrícola para satisfacer una demanda creciente, el aumento en la inversión por parte de países desarrollados en la agroindustria, la investigación y desarrollo de nuevas patentes y tecnologías asociadas, y el interés de los consumidores por acceder a alimentos de mayor calidad.

Latinoamérica se vislumbra como uno de los futuros líderes en el mercado de bioestimulantes, alcanzando tasas de crecimiento de 12,71% entre 2020 y 2025. Por ello se determina que el mercado objetivo para un potencial producto es la industria de la agricultura nacional, con aplicación en producción de frutas, cereales y hortalizas. Se determinó que es factible el ingreso de productos que incluyan nuevos análogos de BRs al mercado nacional, pero la clave para su éxito es encontrar un factor diferenciador que permita que sobresalga por sobre la competencia. Los principales desafíos que enfrenta este mercado son la prevalencia de la comercialización de productos de baja calidad, la falta de diversidad de productos en mercados fragmentados, las barreras regulatorias que dificultan la homologación y venta de productos en diferentes regiones y la competencia con otros reguladores de crecimiento vegetal.

Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen Ejecutivo	2
Índice	4
Índice de figuras	7
Índice de tablas.....	9
Abreviaturas generales.	10
<i>Abreviaturas en resonancia magnética nuclear.</i>	10
<i>Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo.</i>	10
<i>Abreviaturas en espectrometría de masas.</i>	11
Lista de compuestos y asignación numérica	11
Capítulo 1: Introducción.	14
1.1. Situación agrícola en Chile.	15
1.2. Oportunidad: Método sustentable para favorecer la productividad agrícola.	16
1.3. Ventajas y desventajas del Cultivo Hidropónico.	19
1.4. Perspectiva global.	20
1.5. Cultivo hidropónico de tomate.	20
1.6. Integración de técnicas de cultivo hidropónico y aplicación de nuevos bioestimulantes o reguladores del crecimiento.	22
1.7. Clasificación de los reguladores de crecimiento vegetal.	23
1.8. Brasinoesteroides.	25
1.9. Efectos fisiológicos	28
1.10. Aplicaciones en la agricultura.	28
1.11. Mecanismo de acción.	31
1.12. Bioensayos aplicados a BRs: relación estructura actividad.	32
1.12.1. Inclinación de la lámina de arroz.	33
1.12.2. Elongación del segundo internudo del frijol.	33
1.12.3. Bioensayo de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	34
1.13. Síntesis de brasinoesteroides y sus análogos.	35
1.14. Análogos sintéticos con modificación en la cadena lateral.	36
Capítulo 2: Metodología Y Procedimiento Experimental.	41
2.1. Metodología síntesis química.	41
2.2. Materiales e insumos síntesis química.	42
2.2.1. Solventes.	42
2.2.2. Insumos.	42
2.2.3. Reactivos.	43

2.2.4. Cromatografía en capa fina.	43
2.2.5. Cromatografía en columna.	43
2.2.6. Instrumentos y Equipos.	43
2.3. Parte experimental Síntesis química.....	44
2.3.1. Síntesis de 3 α , 6 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (46).	44
2.3.2. Síntesis de 3,6-dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (47).	45
2.3.3. Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (48).	45
2.3.4. Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (49).	46
2.3.5. Síntesis de ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (50).	46
2.3.6. Síntesis de ácido 3 α -acetoxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (51).	47
2.3.7. Síntesis de 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-22-en-6-ona (52).	47
2.3.8. Síntesis de 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-22(S)-23-dihidroxi-6-ona (53a).	48
2.3.9. Síntesis de (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-cloro) benzoato (45a).	49
2.3.10. Síntesis de (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-bromo) benzoato (45b).	49
2.3.11. Síntesis de (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-fluoro) benzoato (45c).	50
2.4. Materiales e insumos componente biológica.....	52
2.4.1. Solventes y soluciones.	52
2.4.2. Controles y medios.	52
2.4.3. Instrumentos y equipos.	52
2.5. Evaluación actividad componente biológica.....	52
2.5.1. Ensayo de inclinación de la lámina de arroz.....	52
2.5.2. Evaluación de efecto de BRs bioactivos sobre el rendimiento de <i>Lycopersicum esculentum</i> en sistema de cultivo hidropónico.	53
2.5.3. Análisis de clorofila y carotenos totales.	58
2.5.4. Análisis estadístico.	59
Capítulo 3: Resultados y Discusión.....	60
3.1. Parte Química.	60
3.1.1 Síntesis y determinación estructural.....	60
3.2. Componente biológica.....	68
3.2.1. Resultados in-vitro.	68
3.2.2. Resultados in-vivo	70
Capítulo 4: Estudio de mercado.	76
4.1. Mercado de reguladores de crecimiento vegetal.	76
4.1.1. Segmentación de mercado.....	78
4.1.2. Escala del mercado objetivo.	79
4.2. Situación actual de Reguladores de crecimiento.	80

4.2.1. Principales productores en el mundo.	80
4.2.2. Principales productores a nivel nacional.	81
4.2.3. Especificaciones de producto.	82
4.3. Consumo de Reguladores de crecimiento.	85
4.3.1. Principales usos.	85
4.3.2. Patrón de consumo.	85
4.3.3. Importación de Reguladores de crecimiento.	86
4.4. Estudio de precios de reguladores de crecimiento.	87
4.5. Limitaciones y desafíos.	88
4.6. Análisis de mercado.	89
4.6.1. Análisis FODA.	89
4.6.2. Análisis PESTEL.	89
4.6.3. Análisis de 5 fuerzas de Porter.	90
4.7. Proyecciones.	91
4.7.1. Proyecciones de consumo y producción.	91
4.7.2. Nuevas tecnologías.	91
4.7.3. Etapas previas a comercialización.	92
5. Conclusiones	93
6. Bibliografía.	94
7. Anexos	107
Anexo 1: Espectros de ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN, DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC.	107
Anexo 1.A: Espectros compuesto 3 α , 6 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (46).	107
Anexo 1.B: Espectros compuesto 3, 6-dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (47).	108
Anexo 1.C: Espectros compuesto 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (48).	110
Anexo 1.D: Espectros compuesto 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (49). ...	113
Anexo 1.E: Espectros compuesto Ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (50).	115
Anexo 1.F: Espectros compuesto Ácido 3 α -acetoxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (51).	118
Anexo 1.G: Espectros compuesto 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-22-en-6-ona (52).	119
Anexo 1.H: Espectros compuesto 22(S), 23-dihidroxi-24-nor-5 α -colan-22-en-6-ona-3 α -acetato (53a).	121
Anexo 1.I: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-cloro) benzoato (45a).	122
Anexo 1.J: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-bromo) benzoato (45b).	125
Anexo 1.K: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-fluoro) benzoato (45c).	127
Anexo 2: Espectros de Masas de Alta Resolución.	130
Anexo 2.A: Espectro de masas compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-cloro) benzoato (45a).	130

Anexo 2.B: Espectro de masas compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5α-colan-3,23-diilo-3α-acetato-23-(4-bromo) benzoato (45b).	130
Anexo 2.C: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5α-colan-3,23-diilo-3α-acetato-23-(4-fluoro) benzoato (45c).	130

Índice de figuras

Figura 1.1: Evolución proyectada de la población mundial al año 2100 (Epdata, 2022).	14
Figura 1.2: Técnicas más comunes para cultivo hidropónico: A. sistema de film nutritivo: flujo constante de solución nutritiva; B. sistema de flujo y reflujo: Sumergir las raíces y luego drenar la solución nutritiva; C. sistema de mecha: La mecha transporta la solución nutritiva a las plantas (Senft, 2019).	18
Figura 1.3: Fitohormonas vegetales (Moore, 2020).	23
Figura 1.4: Primeros brasinoesteroides naturales caracterizados: brasinólida (1); dolicólida (2); epibrasinólida (3).	26
Figura 1.5: Variación estructural de sustituyentes en el anillo A, anillo B y cadena lateral de BRs naturales.	27
Figura 1.6: Mezclas epiméricas de análogos de BR, con estereoquímica <i>S</i> y <i>R</i> en carbono 22, aplicadas en la germinación de semillas de <i>Lycopersicum esculentum</i> (Soto et al, 2020).	30
Figura 1.7: Esquema de señalización en ausencia y presencia de BRs en <i>A. thaliana</i> (Manghwar et al, 2022).	32
Figura 1.8: Cambios inducidos en la longitud de células mesófilas de la segunda lámina en plantas de arroz al aplicar análogos de BRs. a corresponde a planta de arroz sin BR, y b a planta con BR. Las secciones longitudinales de los sitios adaxiales de la segunda articulación de la lámina de arroz: (a) control negativo; (b) en presencia de análogos. Microscopio óptico 40x, escala de barras = 20 μ m. (Durán et al, 2017).	33
Figura 1.9: Curva de dosis-respuesta aplicada al compuesto 24-epibrasinólida mediante el bioensayo de segundo internudo de frijol (Slavikova et al, 2008).	33
Figura 1.10: Efecto de sombra simulada en la respuesta del hipocótilo a la aplicación de hormonas.	34
Figura 1.11: Efectos visuales del bioensayo de inhibición del hipocótilo en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratados con distintos tratamientos a una concentración de 1 μ M, en oscuridad después de 5 días de crecimiento (Nuñez et al, 2023; Datos No publicados).	34
Figura 1.12: Estructura de esteroides que se han utilizado como precursores en la síntesis de brasinoesteroides naturales y sus análogos.	35
Figura 1.13: Estructuras de análogos de brasinoesteroides con modificaciones importantes en la cadena lateral.	36
Figura 1.14: Análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales del tipo 23,24-norpregnanos, funcionalizadas en forma de éteres, ésteres y ácidos carboxílicos.	37
Figura 1.15: Análogos de brasinoesteroides con sustituyentes aromáticos en la cadena lateral (arilbrasinoesteroides).	38
Figura 1.16: Análogos de brasinoesteroides benzoilados en C-22 (44a-b) y dibenzoilado en C-22 y C-23 (45).	38
Figura 1.17: Estructuras de nuevos análogos de Brasinoesteroides propuestos del tipo 24-Nor-colanos con 3 α -acetoxi-5 α -6-oxo y funcionalizados en carbono C-23 con grupos benzoatos 4-sustituidos.	39
Figura 2.1: Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los nuevos análogos de BRs 45a-c . 41	

Figura 2.2: Semillero utilizado para la germinación de las semillas de tomate. a) preparación del semillero esterilizado con tres semillas por cada surco. b) semillas germinadas tras un periodo de una semana.....	53
Figura 2.3: Cámaras de cultivo hidropónico para evaluar los análogos de BRs.	54
Figura 2.4: Soluciones Nutritivas Stock A y B (Hidro A+B, Top Grow, Cocina y Jardín SPA, Chile).	56
Figura 2.5: Solución nutritiva final (A+B) preparada para cada una de las cámaras de cultivo hidropónico.	56
Figura 2.6: Visualización de los distintos Tratamientos de Análogos de BRs y sus respectivos controles sobre <i>Lycopersicum esculentum</i> en cultivo hidropónico, bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento de cultivo vegetal.	57
Figura 3.1: Estructura 3D del compuesto 47 y ataque preferencial regio y estereoselectivo del agente reductor.	61
Figura 3.2: Reacción de isomerización del compuesto 48 catalizada por HCl, para obtener el compuesto 49 . Se observa el cambio dramático que experimentan las conformaciones al pasar de una fusión cis de anillos A/B a fusión trans.....	61
Figura 3.3: Espectros de ¹ H RMN de los compuestos 48 y 49 , y las principales diferencias espectrales observadas en ¹ H y ¹³ C RMN entre los compuestos 48 y 49 , en el cambio conformacional al pasar de una fusión cis de anillos A/B a fusión trans.	62
Figura 3.4: Espectro de ¹ H RMN parcial, donde se indican las integrales relativas de los grupos CH ₃ -21 en la mezcla de epímeros 53a/53b	64
Figura 3.5: a) Espectro de ¹ H RMN, donde se indican las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos H-2' y H-3'. b) Espectro de ¹³ C RMN, donde se indican las señales de los carbonos aromáticos C-4', C-2', C-3' y C-1'.	66
Figura 3.6: Espectro 2D HSQC parcial que muestra las correlaciones heteronucleares a ¹ J _{HC} entre los hidrógenos H-22 y H-23 con sus respectivos carbonos C-22 y C-23.	67
Figura 3.7: Espectro 2D HMBC parcial donde se muestran las principales correlaciones heteronucleares a ³ J _{HC} (color azul) entre los hidrógenos H-23ab y el carbono del grupo benzoato (ArCO ₂). Mientras que en color rojo se muestran las correlaciones a ² J _{HC} entre los hidrógenos H-23ab y H-22 con los carbonos C-22 y C-23.....	68
Figura 3.8: CE (a) y pH (b) de las soluciones hidropónicas que contienen distintos análogos de brasinoesteroides (1 , 21 y 45a-45c) aplicados para el cultivo de <i>Lycopersicum esculentum</i>	71
Figura 3.9: Efectos de análogos de brasinoesteroides (1 , 21 y 45a-45c) sobre los parámetros fisiológicos de plantas de <i>Lycopersicum esculentum</i> cultivadas bajo condiciones hidropónicas durante 26 días posterior al trasplante.	72
Figura 3.10: Visualización del sistema radicular en el tiempo de los análogos más activos (21 y 45b) aplicados en forma exógena en la solución hidropónica.	72
Figura 3.11: Rendimiento en peso seco follaje (a) y peso seco raíces (b) de plantas de <i>Lycopersicum esculentum</i> cultivadas en condiciones hidropónicas con distintos análogos de brasinoesteroides (1 , 21 y 45a-45c).....	73
Figura 4.1: Actores clave en el mercado mundial de Brasinólida.....	80
Figura 4.2: 14-hydroxylated Brassinosteroid (Natural brassinolide) 90% TC® producida por Newsun.	83
Figura 4.3: Producto 24-epibrassinolide (Brassinolide) plant growth accelerator® en polvo en sus formatos de 100 g (a) y 1 kg (b), producido por Senyo.	84
Figura 4.4: 14-Hydroxylated Brassinosteroid (Natural brassinolide) 90% Tc Plant Hormone® producido por Jinan Tianbang, formato 200 mL.....	84

Índice de tablas

Tabla 1.1: Distintos tipos de sustrato usados en sistemas hidropónicos (Ranganathapura et al, 2022).....	17
Tabla 1.2: Superficies de hortalizas frescas en el país (Villagrán 2020).....	21
Tabla 1.3: Efectos y precursores de los principales grupos de reguladores de crecimiento vegetal (Steven et al, 2019).....	24
Tabla 1.4: Patentes asociadas a aplicaciones de Brasinoesteroides en diferentes tipos de cultivos.	29
Tabla 1.5: Ejemplos de análogos de brasinoesteroides y sus efectos en cultivos (Salgado et al, 2008).....	31
Tabla 2.1: Resumen de nutrientes y propiedades de la solución nutritiva a utilizar en experimento de hidroponía.....	55
Tabla 2.2: Resumen experimentos realizados y objetivo específico asociado.....	59
Tabla 3.1: Actividad de análogos de BRs disueltos en DMSO mediante bioensayos <i>in Vitro</i> de Inclínación de la lámina de arroz. Letras indican el nivel de significancia de acuerdo con test de tukey $P<0,05$	69
Tabla 3.2: Actividad de análogos de BRs reportados por Díaz et al 2020, disueltos en DMSO mediante bioensayos <i>in Vitro</i> de Inclínación de la lámina de arroz.....	70
Tabla 3.3: Efectos de análogos de brasinoesteroides (1, 21 y 45a-45c) sobre los parámetros fisiológicos de plantas de <i>Lycopersicum esculentum</i> cultivadas bajo condiciones hidropónicas. .	73
Tabla 3.4: Efectos de análogos de brasinoesteroides (1, 21 y 45a-45c) en contenido de nutrientes (clorofila y carotenos) en plantas de <i>Lycopersicum esculentum</i> cultivadas bajo condiciones hidropónicas.	74
Tabla 4.1: Estimación en % del crecimiento del mercado de bioestimulantes por región.	78
Tabla 4.2: Especificaciones comerciales de producto 14- hydroxylated Brassinosteroid®	83
Tabla 4.3: Precio, formato y componentes de los productos que contienen análogos de Brasinoesteroides ofrecidos en el mercado nacional.	87
Tabla 4.4: Análisis FODA para mercado de análogos de Brasinoesteroides.....	89

Abreviaturas generales.

- Ac₂O : Anhídrido acético
- AcOEt : Acetato de etilo
- anh. : Anhidro
- CC : Cromatografía en columna
- CCF : Cromatografía en capa fina
- DCM : Diclorometano
- DMAP : 4-dimetil amino piridina
- Et₂O : Éter dietílico
- Hex. : Hexano
- MeOH : Metanol
- N₂ : Nitrógeno
- NMO : N-metilmorfolina N-óxido
- Pi : Piridina
- T°amb : Temperatura ambiente
- 0.2:9.8 → 10:0.0 : Gradientes de polaridad en C.C.

Abreviaturas en resonancia magnética nuclear.

- RMN : Resonancia Magnética Nuclear.
- δ : desplazamiento químico.
- ppm : partes por millón.
- s : singlete.
- s.a : singlete ancho.
- d : doblete.
- t : triplete.
- dd : doble doblete.
- dt : doble triplete.
- ddd : doblete de doble doblete.
- m : multiplete.
- J : constante de acoplamiento.
- ^2J y ^3J : acoplamiento escalar heteronuclear a dos y tres enlaces, respectivamente (HMBC)
- DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
- HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation.
- HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Connectivities.
- 1D : Espectro mono-dimensional.
- 2D : Espectro bidimensional.
- *H : Asignación intercambiable con otro hidrógeno marcado con asterisco.
- *C : Asignación intercambiable con otro carbono marcado con asterisco.

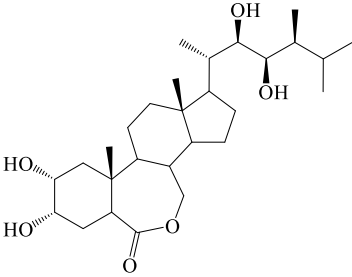
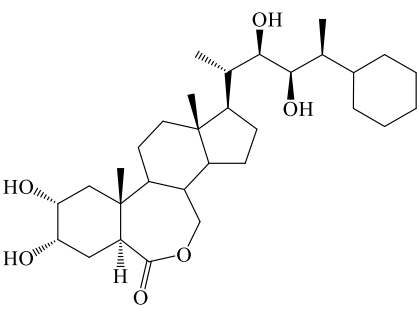
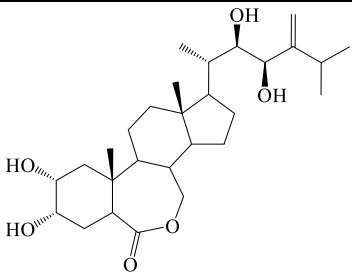
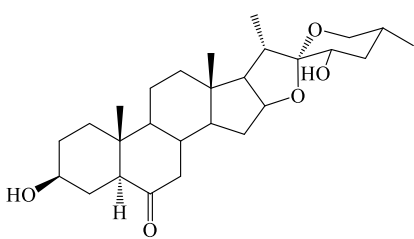
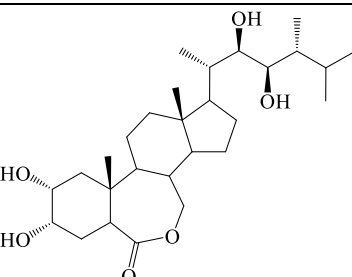
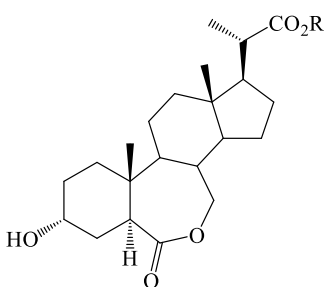
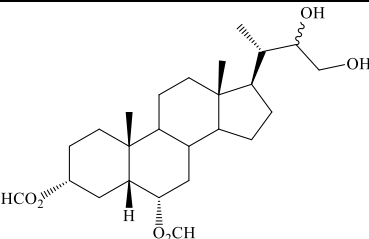
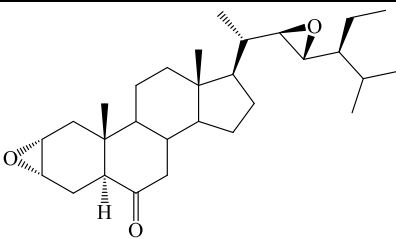
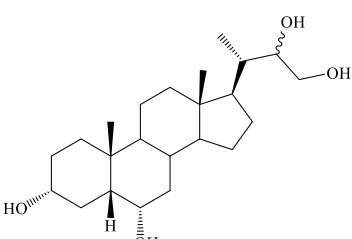
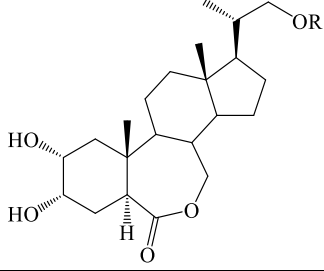
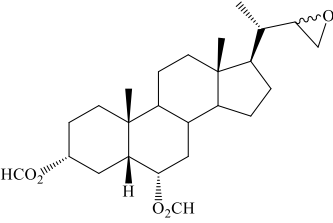
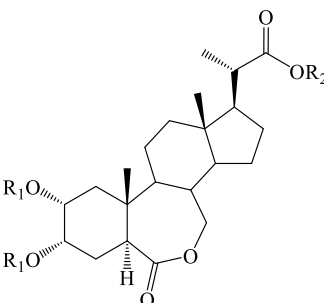
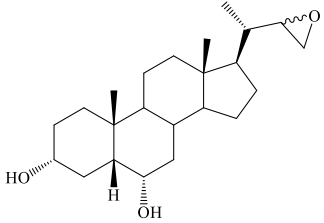
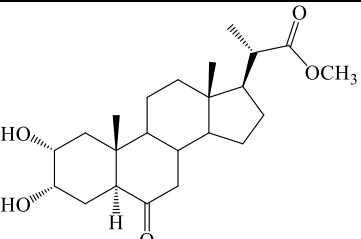
Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo.

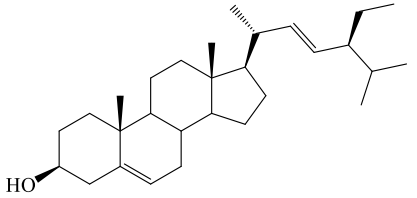
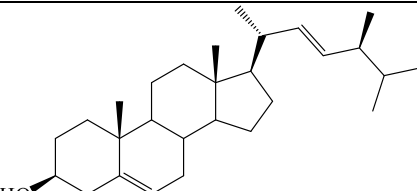
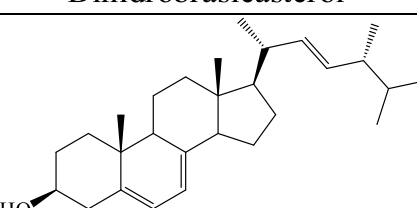
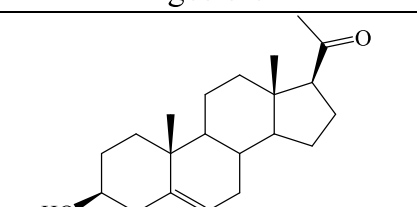
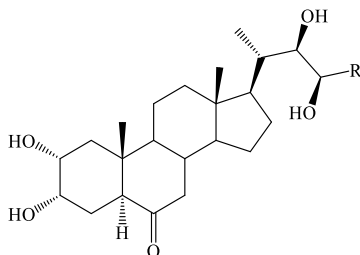
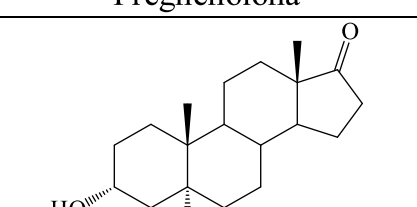
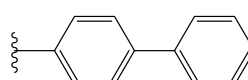
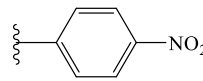
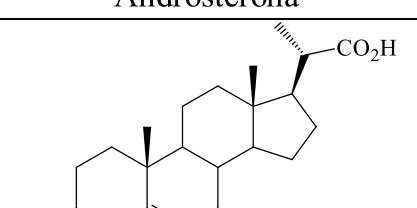
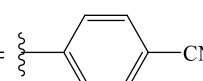
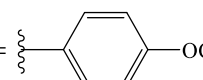
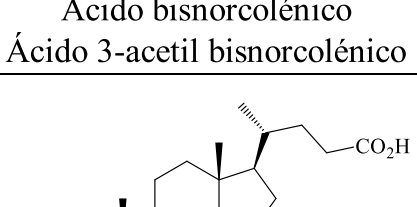
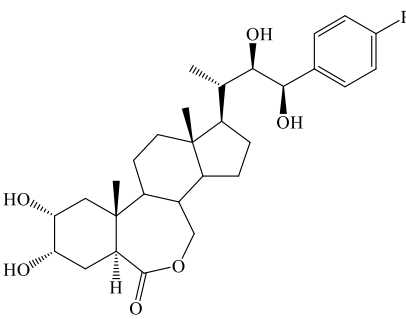
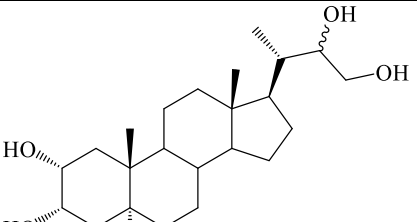
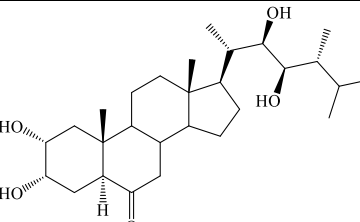
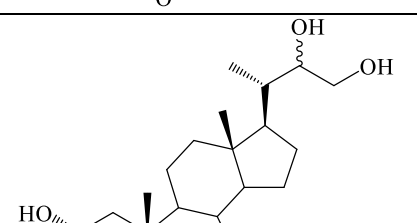
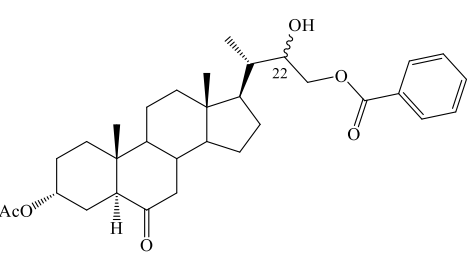
- IR : Espectro Infrarrojo
- cm⁻¹ : Frecuencia en centímetros a la inversa

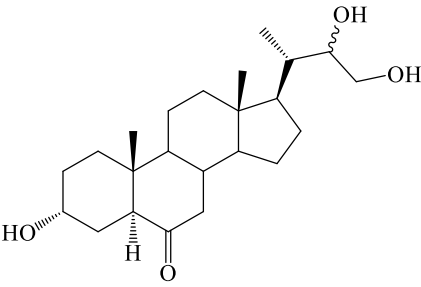
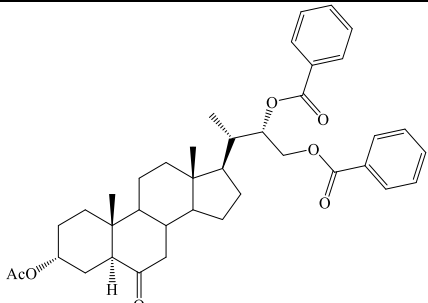
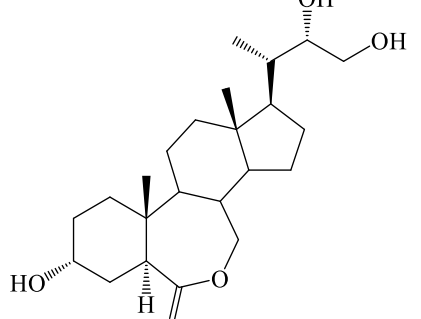
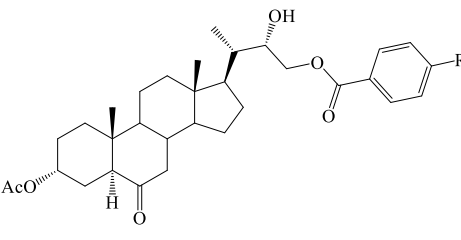
Abreviaturas en espectrometría de masas.

- HRMS-ESI o EMAR ESI: High Resolution Mass Spectrometry Electrospray Ionization
- $[M + NH_4]^+$: Ion molecular + NH_4 (NH_3 como gas reactivo)

Lista de compuestos y asignación numérica

Estructura	Número asignado	Estructura	Número asignado
 Brasinólida	1	 23	
 Dolicólida	2	 24	
 Epibrasinólida	3	 25: R = CH ₃ 26: R = H	
 4a: C-22 (S) 4b: C-22 (R)		 27	
 5a: C-22 (S) 5b: C-22 (R)		 28a: R= CH ₃ 28b: R= CH ₂ CH ₃ 28c: R= n-propilo 28d: R= CH ₂ CH ₂ -OCH ₃ 28e: R= CH ₂ CH ₂ -OC ₄ H ₉ 28f: R= t-butilo	
 6a: C-22 (S) 6b: C-22 (R)		 29a: R ₁ = Ac; R ₂ = CH ₃ 29b: R ₁ = H; R ₂ = OH 29c: R ₁ = Ac; R ₂ = OH 29d: R ₁ = H; R ₂ = OCH ₃ 29e: R ₁ = Ac; R ₂ = Cl 29f: R ₁ = Ac; R ₂ = OCH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂ 29g: R ₁ =H; R ₂ = OCH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	
 7a: C-22 (S) 7b: C-22 (R)		 30	

 Estigmaesterol	8		R = 30a:   30b:  31a: <i>o</i>-F 31b: <i>m</i>-F 31c: <i>p</i>-F 31d: 2,6-F 30c: 
 Dihidrobrasicasterol	9		R = 32a: <i>o</i>-Cl 33a: <i>o</i>-Br 32b: <i>m</i>-Cl 33b: <i>m</i>-Br 32c: <i>p</i>-Cl 33c: <i>p</i>-Br
 Ergosterol	10		R = 34  35a: <i>o</i>-CH₃ 35b: <i>m</i>-CH₃ 35c: <i>p</i>-CH₃ 35d: 2,4-CH₃ 35e: 2,5-CH₃ 35f: 2,4,6-CH₃
 Pregnenolona	11		R = 36a: <i>o</i>-CF₃ 37a: -CH-(CH₃)₂ 36b: <i>m</i>-CF₃ 37b: -C(CH₃)₃ 36c: <i>p</i>-CF₃
 Androsterona	12		38: R =  39: R = 
 Ácido bisnorcolénico Ácido 3-acetil bisnorcolénico	13: R = H 14: R = OAc		40: R =  41: R = 
 Ácido Hiodeoxicólico	15		42a: R = H 42b: R = F 42c: R = Cl 42d: R = Br 42e: R = NO₂ 42f: R = CH₃ 42g: R = CH(CH₃)₂ 42h: R = CN
	16: C-22 (R) 17: C-22 (S)	 24-Epicasterona	43
	18: C-22 (R) 19: C-22 (S)		44a: C-22 (R) 44b: C-22 (S)

	20: C-22 (R) 21: C-22 (S)		45
	22		45a: R = Cl 45b: R = Br 45c: R = F

Capítulo 1: Introducción.

La industria de la agricultura presenta desafíos evidentes para un futuro cercano, debe aumentar la producción de alimento para satisfacer a una población en constante crecimiento, lo que exige una mayor cantidad de materias primas, energía y mano de obra; sortear los efectos del cambio climático en los métodos de cultivo, que exigen migrar a formas de producción más eficientes, resilientes y sostenibles; y adaptarse a las tendencias actuales de buscar alternativas más amigables con el medioambiente. Todos estos factores obligan a desarrollar nuevas estrategias de producción y tecnologías que permitan asegurar la seguridad alimentaria que se predice seguirá en aumento en los próximos años (FAO F. U., 2021).

Según proyecciones, al año 2050 la población mundial se acercará a los 10.000 millones de personas, un crecimiento superior al 20% comparado con la actualidad, lo que significa tener que duplicar la producción de alimentos en un entorno ambientalmente más adverso, usando la misma cantidad de tierra y una menor cantidad de recursos naturales y productos químicos (Figura 1.1).

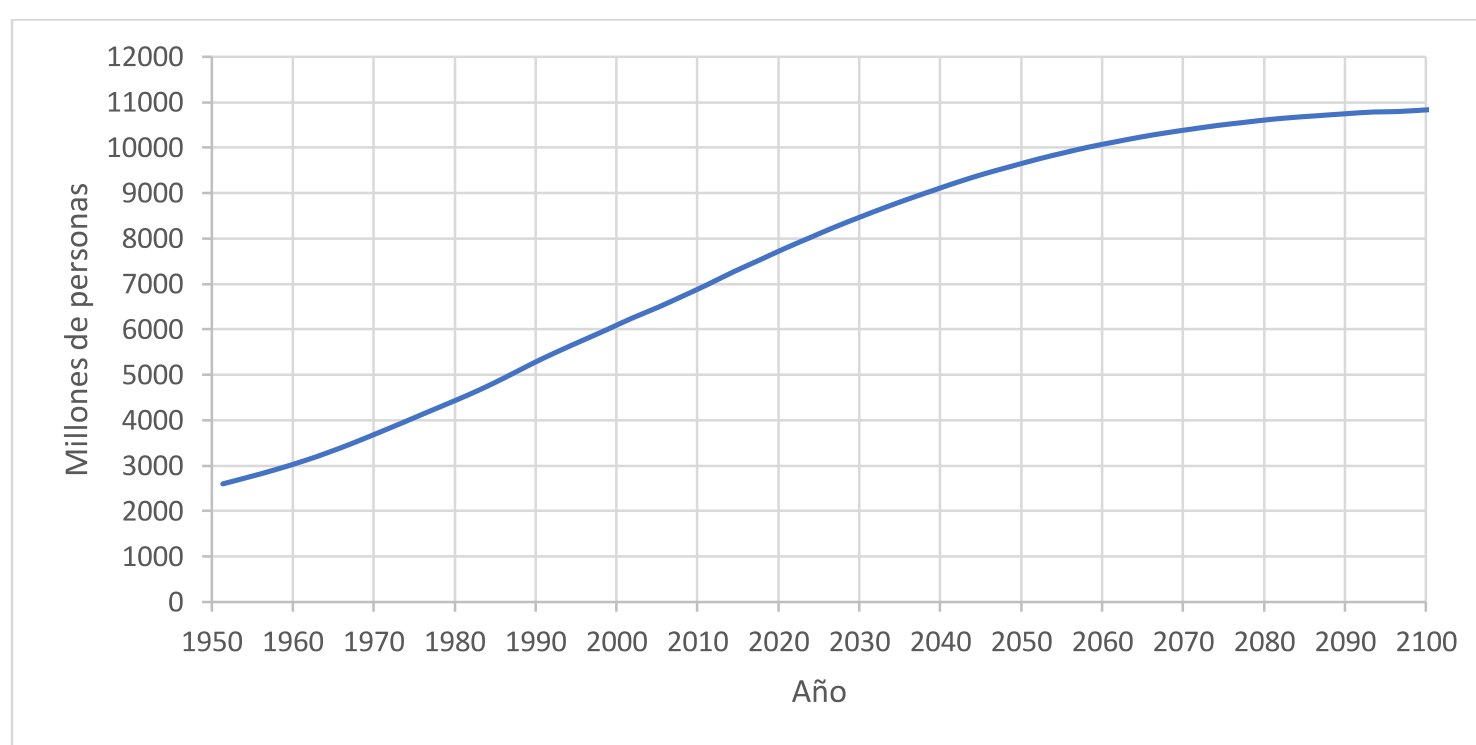


Figura 1.1: Evolución proyectada de la población mundial al año 2100 (Epdata, 2022).

Aun cuando la tendencia del crecimiento de la población mundial se ha desacelerado, Asia y África concentran el mayor aumento de habitantes previsto, lo que perjudicará sus perspectivas de desarrollo tomando en cuenta que gran parte de las comunidades locales dependen directamente de la agricultura para la generación de empleos e ingresos, pero su expansión está limitada por el estrés al que ya se encuentran sometidas sus tierras y los recursos hídricos.

Por su parte, el apreciable crecimiento económico de las últimas décadas, impulsado por los países de ingresos medianos y bajos, promueve cambios en la dieta: la demanda de alimentos se inclina al consumo de carne y productos lácteos, entre otros alimentos de producción intensiva, lo que repercute en el abuso de recursos naturales y hace más difícil la producción sostenible. Se proyecta que al año 2050 el PIB per cápita a nivel mundial aumentará con un índice de crecimiento anual del 1,4% (FAO, 2017).

Otro aspecto relevante es la competencia por los recursos naturales. El incremento de la producción alimentaria y el crecimiento económico se traducen en una mayor explotación de dichos recursos. En la actualidad, la expansión de los terrenos agrícolas sigue siendo la principal causa de la deforestación y el agotamiento de las aguas subterráneas, pues el uso del recurso hídrico para la agricultura representa el 70% del total de extracciones de agua, siendo los otros dos grandes competidores por el suministro la industria y las ciudades. La biodiversidad también se ha visto gravemente afectada (Worldbank, 2017).

El requerimiento energético también es causa de competencia, evidenciándose principalmente en los usos alimentarios y no alimentarios de la biomasa. El consumo de cereales, semillas oleaginosas y caña de azúcar para la producción de biocombustibles han visto un aumento en el último tiempo, como también el uso de biomasa para sustituir sustancias petroquímicas con el fin de disminuir la quema de combustibles fósiles, responsables de la emisión de miles de millones de toneladas de gases de efecto invernadero a la atmósfera anualmente, y cuyas consecuencias son el calentamiento global y el cambio climático (López et al, 2018).

Las altas temperaturas y un suministro de agua menos fiable provocarán serias dificultades para la pequeña ganadería, especialmente en ecosistemas de pastos áridos y semiáridos en latitudes bajas. El cambio en la variabilidad de las precipitaciones y la frecuencia de sequías e inundaciones podrían tener gran impacto en el rendimiento de los cultivos (Holleman et al, 2020). Las consecuencias del cambio climático en la alimentación mundial serán evidentes no solo en el suministro de alimentos, sino también en su calidad, acceso, la utilización de estos y en la estabilidad de la seguridad alimentaria.

Sin embargo, la problemática no solo se proyecta al futuro. Actualmente, numerosos países se enfrentan a una crisis alimentaria y nutricional causada por condiciones socioeconómicas desfavorables, peligros naturales agudizados por el cambio climático, plagas y enfermedades transfronterizas e interrupción de las cadenas de suministro causadas por la pandemia y conflictos armados. Lo anterior se ve claramente reflejado en el brusco aumento del costo de las importaciones de alimentos promovida por el elevado costo de los insumos, altos costos de transporte e interrupciones del comercio regular. Al mes de mayo de 2022, el índice de precios agrícolas registró un aumento del 38 % respecto al nivel de enero de 2021 (Falces, 2022), lo cual contribuye a que varios países presenten una alta inflación de los precios minoristas de alimentos, y genera un mayor impacto en los países subdesarrollados pues estos tienen mayor dependencia de las importaciones de alimentos y la población de ingreso bajo y mediano gasta un porcentaje mayor de sus ingresos en alimentación que la de los países de mayores ingresos (Stoevska, 2020).

Otro de los productos afectados son los fertilizantes, cuyos precios se dispararon en marzo de 2021, con un alza que representa más del triple de su valor de hace un año para los fertilizantes nitrogenados y fosforados (FAO W. , 2022). Esto podría indudablemente afectar la producción de alimentos de muchos cultivos en diferentes regiones del mundo, intensificando aún más la problemática.

De acuerdo al informe de las naciones unidas *“El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo”* (FAO F. U., 2021), cerca de 811 millones de personas padecieron hambre durante el año 2020, lo que representa un aumento del 15% respecto a 2019 y pone en riesgo el logro de unos de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las naciones unidas: erradicar el hambre en el mundo. La subalimentación y la inseguridad alimentaria van al alza en regiones de África y Sudamérica y más aún, según la escala de experiencia de inseguridad alimentaria (FIES), más de 2.000 millones de personas no cuentan con un acceso continuo a alimentos inocuos, nutritivos y suficientes incluso en países de ingresos altos. Pero la inseguridad alimentaria no solo se limita a la desnutrición, sino a todas las formas de malnutrición, entre ellas sobrepeso, obesidad y anemia, causadas principalmente por la desigualdad de ingresos y acceso a almacenamiento apropiado, utensilios, agua potable y educación, ingesta de nutrientes en proporciones inadecuadas y aumento de consumo de alimentos procesados con exceso de azúcar, sal y conservantes (Herforth et al, 2020).

1.1. Situación agrícola en Chile.

Desde hace al menos una década Chile sufre una intensa sequía, la cual se ha intentado resolver mediante medidas de mitigación aplicadas por las instituciones como la construcción de embalses,

acomodar las fechas de siembra en periodos favorables, mejoras en sistemas de regadío, entre otras. Sin embargo, no han sido suficientes para solucionar la problemática.

Entre las regiones de Coquimbo y la Araucanía se observa un déficit persistente que alcanza el 30%, lo que se intensifica considerando que la última década ha sido la más cálida en los últimos 100 años. La denominada megasequía no se vislumbra como un escenario transitorio, pues gran parte de ella se atribuye al cambio climático antropogénico, que se prevé seguirá generando aridificación de la zona centro y sur del país (Bustos et al, 2015).

La crisis hídrica tiene un alto impacto en la agricultura familiar campesina, responsable de la producción de entre el 70 y 75% de los alimentos consumidos a nivel país, por lo que resulta fundamental que este sector tenga acceso a métodos que hagan más eficiente el uso del agua y hace necesario replantear la forma en la que se practica la agricultura actualmente (Melo, 2021).

Sumado a lo anterior, el país no muestra una capacidad de respuesta en relación con la innovación; la baja inversión pública y privada en investigación y desarrollo además de la rigidez institucional del sistema de innovación, limitan el crecimiento de la productividad sectorial, la aplicación de nuevas formas de producción, la generación de productos de mayor valor y la posibilidad de resolver los desafíos que esta industria enfrenta actualmente (ODEPA, 2017).

En nuestra historia se han logrado aumentos explosivos en la producción agrícola para hacer frente a los requerimientos de la población, sin embargo, pese a las mejoras en la eficiencia agrícola, los aumentos en cuanto a rendimiento han visto una desaceleración y mantener un ritmo de crecimiento constante en la producción resulta complejo en las condiciones actuales. La clave entonces es encontrar métodos sustentables que permitan incrementar la productividad con un uso más eficiente de recursos y que contribuyan a reducir el impacto ambiental de determinadas prácticas agrícolas, como el uso de fertilizantes y pesticidas (Billen et al, 2018).

1.2. Oportunidad: Método sustentable para favorecer la productividad agrícola.

Las técnicas genéticas y químicas ya no son suficientes para compensar la creciente demanda de producción agrícola. El aumento del requerimiento de tierras disponibles para cultivo merma ecosistemas clave en el balance del dióxido de carbono atmosférico, siendo esta la segunda mayor causa antropogénica del calentamiento global, después del uso de combustibles fósiles (Boylan, 2020).

Es en ese contexto en el cual las tecnologías hidropónicas cobran relevancia, al mitigar muchas de las amenazas que enfrenta la agricultura tradicional. Las plantas son organismos autótrofos, capaces de sintetizar todos los metabolitos que necesitan a partir de iones inorgánicos, agua y dióxido de carbono, usando la energía que capturan del sol mediante la fotosíntesis. El sistema de cultivo hidropónico es un método de crecimiento que permite proveer a las plantas de todos los nutrientes necesarios (en forma inorgánica) en una solución líquida, con o sin medio sólido. Esta técnica forma parte de la llamada agricultura de ambiente controlado, en la cual las plantas son cultivadas en espacios interiores donde se les suministran los nutrientes y la luz de forma artificial. La energía de la luz solar es reemplazada por iluminación tipo led según los requerimientos del tipo de planta, y la tierra es reemplazada por un medio que permita la sujeción de las raíces y el suministro de nutrientes.

Existen registros históricos del uso de esta técnica de cultivo por parte de diversas civilizaciones en el mundo, tales como los jardines colgantes en babilonia, jardines flotantes de México y China e incluso jeroglíficos en Egipto que datan de cientos de años antes de cristo. Sin embargo, las bases de la tecnología hidropónica se sustentan en los trabajos de Julius Sachs, quién estudió el crecimiento de las plantas en tierra y en agua y concluyó que la tierra no es el factor determinante en el desarrollo vegetal, sino los nutrientes que este medio les suministra. Con esta premisa, en

1860 propone una fórmula para una solución nutritiva que permite el crecimiento de plantas en medio acuoso, sentando las bases de la tecnología hidropónica actual. En resumen, las plantas requieren de los siguientes nutrientes para su crecimiento y desarrollo: C, H, O obtenidos desde el aire, y N, P, K, Ca, Cl, S, Mg (macronutrientes) y Cu, B, Fe, Mn, Zn, Mo (micronutrientes) suministrados en este caso mediante sales disueltas en el agua (Giménez et al, 2015). Además de nutrientes, las plantas necesitan un suministro constante de oxígeno para que las raíces tengan la capacidad de capturar y transportar los nutrientes al resto de la estructura de la planta.

Los sistemas hidropónicos actuales implementan tecnologías sofisticadas, como monitoreo de temperatura y pH del agua, así como de la cantidad de luz que reciben las plantas. En términos generales, un sistema hidropónico se compone principalmente de una bandeja de cultivo, un reservorio para la solución nutritiva, sistema temporizador, bomba sumergible, bomba de aireación, medio de fijación y sistema de iluminación. El sistema puede ser implementado al exterior o en invernaderos, aislados del ambiente y con variables controladas, tales como iluminación, temperatura, niveles de CO₂, nutrientes, pH, entre otros (Eek et al, 2016).

De esta forma, los sistemas de cultivo hidropónico pueden ser clasificados según el tipo de suministro de oxígeno y otros nutrientes: entrega de oxígeno saturando la solución con aire (cultivo hidropónico clásico), manteniendo las raíces sumergidas de forma intermitente, o permitiendo que las raíces estén siempre expuestas al aire (aeropónicas). En las primeras, la solución con nutrientes es saturada con aire antes de su uso y renovada con cierta frecuencia, o bien, se puede suministrar el aire de forma continua a la solución durante el ciclo de vida de la planta. En las segundas, el cultivo se hace crecer en un medio inerte como lana de roca, vermiculita o pellets de arcilla y se somete a ciclos secos y húmedos al rociar solución al medio o sumergiendo periódicamente el sustrato en la solución. Finalmente, en el medio aeropónico las raíces son rociadas con solución de nutrientes en forma de aerosol para evitar desecación (Nguyen et al, 2016). La tabla 1.1 muestra algunos de los sustratos más comunes que se emplean en hidroponía.

Tabla 1.1: Distintos tipos de sustrato usados en sistemas hidropónicos (Ranganathapura et al, 2022).

Sustrato	Características	Ejemplo
Orgánico	Sustratos orgánicos o sus residuos/subproductos, derivados de agricultura o de la industria de la madera previamente tratados	Fibra de coco, turba
Inorgánico	Materiales naturales o productos minerales producidos industrialmente	Arena, piedra pómez, vermiculita, perlita, arcilla, lana de roca, zeolitas
Sintético	Resinas sintéticas de intercambio iónico y plásticos de baja densidad, conocidos como “expandidos” porque se obtienen por procesos de dilatación térmica	Poliestireno expandido, espuma de poliuretano

A grandes rasgos, es posible distinguir tres tipos de sistemas de cultivo hidropónico (Figura 1.2) utilizados en la actualidad:

- **Sistema de film nutritivo:** las plantas son dispuestas en una bandeja con una ligera inclinación, por sobre un depósito que contiene el agua con los nutrientes. Una pequeña corriente es bombeada hacia la bandeja, irrigando las raíces de las plantas y volviendo

nuevamente al depósito, asegurando un suministro continuo de agua, nutrientes y aireación. Actualmente es el sistema más utilizado.

- **Sistema de flujo y refluo:** las plantas son parcialmente inundadas con la solución nutritiva, lo suficiente para que las raíces capten los nutrientes. Tras cierto periodo de tiempo, el agua es drenada hacia un reservorio para posterior reutilización.
- **Sistema de mecha:** es el método más simple, en el cual los nutrientes son suministrados pasivamente a través de una mecha o cuerda de forma ascendente, desde el reservorio de agua, mediante el principio de capilaridad. Las plantas crecen en un medio inerte como arena, roca, lana o esferas de arcilla que sirven de soporte a las raíces.

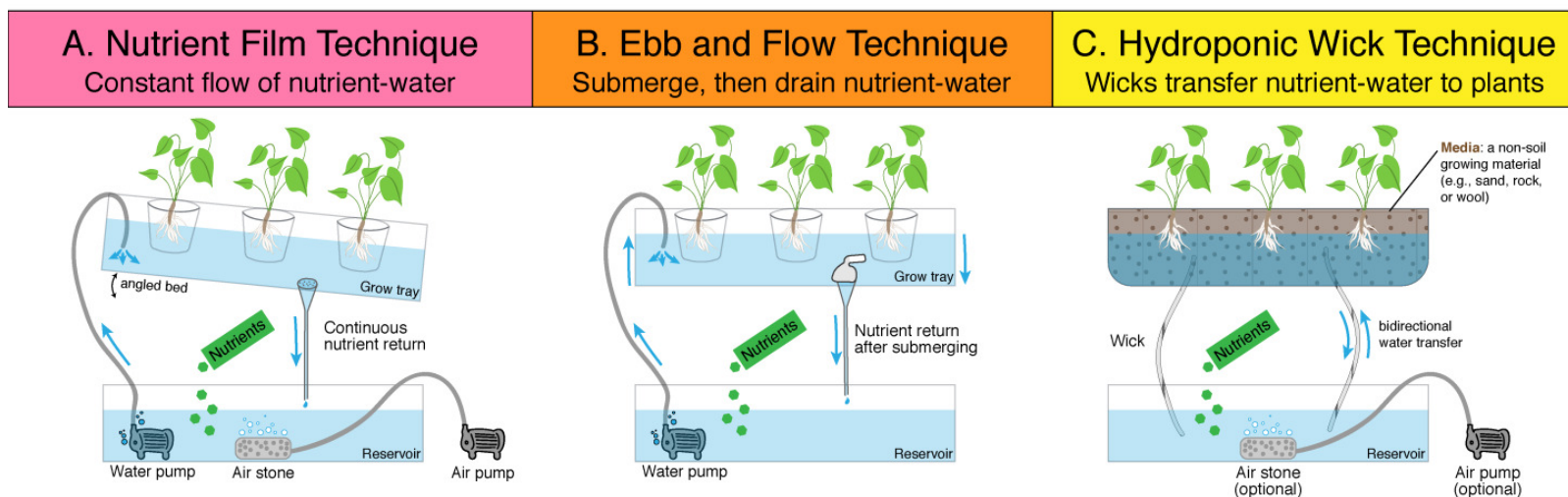


Figura 1.2: Técnicas más comunes para cultivo hidropónico: A. sistema de film nutritivo: flujo constante de solución nutritiva; B. sistema de flujo y refluo: Sumergir las raíces y luego drenar la solución nutritiva; C. sistema de mecha: La mecha transporta la solución nutritiva a las plantas (Senft, 2019).

En todos los sistemas el agua es suplementada con una solución nutritiva y dispuesta en un reservorio. El agua es bombeada a la bandeja de cultivo y es descargada al reservorio mediante gravedad, escurriendo gracias a la inclinación de la bandeja (A) o drenada después de cierto periodo de tiempo (B). La solución nutritiva también puede ser suministrada pasivamente a través de una mecha para humedecer el medio de cultivo (C).

Algunos de estos sistemas pueden presentar ventajas de aplicación por sobre otros dependiendo del tipo de planta a cultivar, pero en general son equivalentes entre sí. El monitoreo y control se lleva a cabo utilizando una gran variedad de sensores, sistemas de gestión remota y equipamiento de control, con los que se logran distintos niveles de automatización (Gesto et al, 2021).

La aplicación de tecnologías hidropónicas va en aumento con miras a una agricultura más sustentable, lo que se evidencia en el aumento de compañías amigables con el medioambiente en todo el mundo, que utilizan la denominada “agricultura vertical” para producir cultivos a gran escala. La más grande se encuentra en Dubái, con una instalación de 12.000 m², una producción de 2.700 kg de alimento al día y un consumo de agua 2.500 veces menor que una operación tradicional equivalente.

Sin embargo, estas granjas verticales son costosas de implementar y complejas desde el punto de vista técnico pues requieren de personal capacitado con conocimientos en agricultura, fisiología de plantas, química y sistemas informáticos y de control. Por otro lado, los costos operacionales son mucho menores que los de la agricultura convencional, reduce los costos de mantención y mano de obra al implementar sistemas de control sofisticados. Se estima que los alimentos producidos mediante tecnología hidropónica al año 2019 alcanzan un valor de 32.000 millones de dólares, y se proyecta que crezcan a un ritmo del 5% anual hasta el año 2025 (Lagomarsino, 2019).

1.3. Ventajas y desventajas del Cultivo Hidropónico.

A continuación, se presentan las principales ventajas de la tecnología de sistemas hidropónicos:

- Además de reducir la dependencia a el uso de tierra para el cultivo, esta tecnología minimiza el riesgo de invasión de plagas u otras pestes, asegurando un proceso más limpio sin el uso de pesticidas o herbicidas, y permitiendo identificar y aislar cultivos en mal estado de forma más rápida y directa, evitando el compromiso del resto de las plantas.
- La disposición de los cultivos de forma vertical, con una configuración que permite optimizar el uso de espacio al reducir el área sin sacrificar productividad. Esta disposición modular por apilamiento en capas verticales permite aumentar hasta 10 veces la cantidad de cultivo en una determinada área comparado con la agricultura tradicional.
- Permite una forma de producción más simple en la cual la transferencia y o empaquetamiento de productos finales no perturba al resto de los cultivos. Esta técnica es independiente del clima, ubicación geográfica, estación y disponibilidad de tierra, así, el espacio destinado al crecimiento de las plantas tiene disponibilidad constante, sin períodos de espera. (Boylan, 2020)
- Este tipo de sistema de cultivo es también útil cuando se necesita cosechar raíces intactas para aplicaciones posteriores, ya que se evita dañar la raíz al momento extraer las plantas de la tierra. También es ventajoso cuando se requiere que el nutriente deba estar bien controlado en el medio, pues en cultivos en tierra la disponibilidad de nutriente no es homogénea y la dispersión de moléculas en la matriz genera microambientes. Por el contrario, una solución hidropónica es homogénea y puede ser fácilmente reemplazada de manera tal de estudiar la respuesta inducida en las plantas al modificar la concentración, ya sea de nutrientes como de posibles contaminantes. (Nguyen et al, 2016).
- El crecimiento en ambientes controlados promueve el estudio y optimización de la tecnología, permitiendo por ejemplo medir el contenido de nutrientes en el agua para cada etapa del crecimiento de las plantas con tal de maximizar el rendimiento de los cultivos y mejorar los medios de irrigación. Lo mismo puede aplicarse al suministro de luz, determinando la longitud de onda a la cual la absorción de la planta es máxima (usualmente luz de tonalidad violeta) y con ello reducir el desperdicio de energía.

En cuanto a las desventajas, es posible mencionar las siguientes:

- Presenta costos de inversión altos: el costo de construcción de la unidad hidropónica por unidad de área es relativamente alto y los alimentos producidos mediante estos sistemas son, en general, más caros que aquellos cultivados en suelo debido principalmente a los altos costos energéticos.
- Una capacitación adecuada y conocimientos técnicos son un requisito importante antes de iniciar cualquier cultivo hidropónico de hortalizas, así como también conocimientos de control climático dentro de ambientes.
- En un sistema cerrado existe la posibilidad de que se propaguen rápidamente nematodos y enfermedades que se transmiten por el suelo, a todas las cámaras que compartan el mismo depósito de nutrientes.
- Cada variedad de planta requiere de investigación y desarrollo exhaustivo para adaptar y determinar condiciones de crecimiento óptimas.
- El cultivador debe observar las plantas con frecuencia porque la respuesta a una buena o mala nutrición puede ser muy veloz (Swain et al, 2021).
- Este tipo de sistema expone a las plantas a condiciones que pueden ser consideradas no fisiológicas. Así, los fenotipos o las respuestas detectadas en las plantas usando sistemas hidropónicos pueden variar en magnitud cuando las plantas se cultivan en sistemas alternativos (por ejemplo, suelo o medios a base de agar). Estas consideraciones no son

exclusivas de los sistemas hidropónicos, pues se pueden observar también respuestas diferenciales si por ejemplo las plantas son cultivadas en distintos tipos de suelo (Grigatti et al, 2007)

- Finalmente, existe un riesgo potencial de contaminación ambiental si la solución nutritiva residual, con altos contenidos de fósforo y nitratos, no se dispone de forma correcta, lo que podría generar problemas serios como la eutrofización (Velázquez-González et al, 2022).

1.4. Perspectiva global.

Las ventajas del cultivo hidropónico han captado la atención de la industria agrícola global. El mercado de vegetales obtenidos mediante hidroponía va en un crecimiento constante por tener una perspectiva de oferta-demanda mucho más favorable que los métodos tradicionales, aumentar el valor de las cosechas para los productores y reducir la huella de carbono. Las regiones que más han aprovechado la oportunidad de crecimiento de este mercado son América, Europa y Asia Pacífico, con EE.UU como el mayor mercado de vegetales hidropónicos, registrando un tercio de la cuota de mercado al año 2014, seguido por Alemania y Canadá. Si bien India no está en el mismo nivel de implementación de esta tecnología, la pasada década ha visto un aumento en los agricultores que han experimentado con la hidroponía. Aunque su aplicación se ha visto limitada al crecimiento de vegetales exóticos debido a las dinámicas de mercado de la región, su alta viabilidad económica ha hecho que el gobierno incentive la hidroponía mediante subsidios e inversiones en granjas locales. (Ranganathapura et al, 2022).

Pero el crecimiento del mercado no es la única razón por la cual la hidroponía es el área de mayor crecimiento en la agricultura y producción de alimentos. Varios países han adoptado esta técnica con el objetivo de producir alimentos en espacios muy limitados, como Tokio por ejemplo, en donde se cultiva arroz por hidroponía para alimentar a su población, o en áreas donde los cultivos y el agua son escasas como África y Asia. Otra razón para implementar esta tecnología es sortear las condiciones climáticas adversas en países como Israel, donde se ha logrado producir frutos rojos, cítricos y plátanos a pesar de su clima árido. En Europa esta tecnología se emplea en la producción de hortalizas y berenjenas, pimientos, melones, fresas y hierbas, mientras que en Estados Unidos tiene aplicación en el cultivo extensivo de hortalizas de alta calidad, tomates, pepinos y en especial lechuga (Singh, 2022).

Latinoamérica también ha tenido un importante desarrollo en el área, siendo Brasil y México sus actores más destacados. En la región predomina el sistema de film nutritivo para el cultivo de lechuga, apio y frutillas, pero adaptado a la realidad de cada país, principalmente mediante el reemplazo de aquellos materiales que son más escasos comparados con los países desarrollados. Otro sistema empleado en la producción comercial de lechuga es el de raíz sumergida, siendo ampliamente usado en Chile, aunque la tendencia apunta a migrar al sistema de film nutritivo por ser más apto para la producción comercial. Otros sistemas usados son el de mecha con distintos sustratos principalmente en la producción de tomate, mientras que en países andinos se aplican técnicas aeropónicas para producir papa (Rodríguez-Delfina, 2012).

1.5. Cultivo hidropónico de tomate.

Las hortalizas, junto con las frutas, son consideradas parte fundamental de una alimentación saludable, lo que ha llevado a un aumento creciente en su consumo y, por consiguiente, de su producción a nivel mundial. Según las cifras de la FAO, la producción mundial de hortalizas creció un 65% entre 2000 y 2019, pasando de 446 millones de toneladas a 1.128 millones. Las cinco principales especies de hortalizas representaron cerca del 45% del total durante ese período: tomates (16 %), cebollas (9%), pepinos y pepinillos (8%), coles (6%) y berenjenas (5%) (FAO, 2021).

Gracias a nuevas tecnologías y métodos de producción, la producción hortícola presenta una tasa de crecimiento prácticamente lineal, con un TCPA-10 (tasa de crecimiento promedio anual de los últimos diez años) de 2,1%, alcanzando los 1.206 millones de toneladas de hortalizas producidas en el mundo. Los principales países productores son China, con un 51,5% de la producción mundial, seguido por India con el 10,7% y en tercer lugar Estados Unidos que concentra un 2,8% de participación en la producción (Villagrán 2020).

En Chile el cultivo de hortalizas está presente a lo largo de todo el territorio nacional y considera más de 50 especies distintas, alcanzando al año 2019 más de 86.000 hectáreas. Solo 13 especies representan más del 75% de la superficie de hortalizas a nivel nacional, siendo las principales: tomate, choclo, cebolla y lechuga. La Tabla 1.2 muestra las especies que conforman el 77% de la superficie hortícola nacional. La superficie de tomate se divide en 65 % para uso industrial y 35% para uso en fresco.

Tabla 1.2: Superficies de hortalizas frescas en el país (Villagrán 2020).

Especie	Ha	% del total
Tomate	15.168	16,65
Choclo	9.899	10,87
Cebolla	7.662	8,41
Lechuga	7.136	7,83
Achicoria	3.989	4,38
Zapallo	3.853	4,23
Poroto verde y granado	6.346	6,97
Zanahoria	3.627	3,98
Melón	3.142	3,45
Sandía	2.965	3,26
Repollo	2.217	2,43
Haba	2.069	2,27
Espárrago	1.921	2,11

De acuerdo con el “*Boletín de hortalizas*” de la ODEPA (Villagrán, 2020), la producción nacional es principalmente destinada al mercado interno, pero también tiene participación en el mercado de exportación. La principal hortaliza exportada corresponde al tomate, con 32,4% del valor exportado de hortalizas el año 2019, mayoritariamente en forma de pasta de tomate. Le siguen los espárragos con 6,9% del valor exportado, casi en su totalidad como producto congelado, y en tercer lugar la cebolla con 5,4% del valor exportado, en su mayoría como producto fresco.

En Chile y en el mundo el cultivo de tomate ha incrementado de la mano del consumo, con nuestro país posicionándose en lugar 21 entre los principales productores de esta hortaliza y segundo en el hemisferio sur (solo por detrás de Brasil) alcanzando un equivalente al 14% de la superficie hortícola nacional al año 2020, lo que la ubica como la especie más cultivada en el país (Villagrán, 2021).

Si bien la mayor parte de la producción mundial de tomate se obtiene mediante cultivo tradicional en tierra, existe un creciente interés por implementar tecnologías alternativas y sustentables que permitan mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos. Se ha demostrado que tomates cultivados mediante técnicas hidropónicas permiten obtener mejoras en el sabor, la acidez,

contenido de carotenoides y vitaminas comparado con tomates obtenidos por métodos tradicionales. Se ha observado también que es posible mejorar el rendimiento de tomates en un treinta por ciento en comparación con suelo, al utilizar una mezcla de 80% piedra pómez + 10% perlita + 10% turba como medio de cultivo. Tomates cultivados hidropónicamente se consideraron más suaves y más sabrosos que los provenientes de cultivo tradicional (Jan et al, 2020).

En el estudio reportado por Gaetano et al, 2021 se cultivó tomate (*Lycopersicon Solanum*) en sistema hidropónico vs sistema tradicional de crecimiento bajo control y monitoreo del uso de agua y de los niveles de nutrientes. Se suministraron nutrientes clave como N, P, K, Ca, Mg y S en cantidades muy similares a través de todo el ciclo de crecimiento. Cada experimento se replicó en dos medios de crecimiento (invernadero tipo polytunnel y glasshouse) para generalizar las conclusiones entre los medios de cultivo de tomate más populares. Se midieron el rendimiento y tasa de crecimiento, y se controlaron variables ambientales como temperatura y humedad relativa. Se comparó la calidad nutricional de los tomates cultivados contrastando niveles de licopeno, actividad antioxidante total (TAA) y relación entre azúcares (TSS), concluyendo que las plantas en el sistema hidropónico perdieron menos agua y fueron más eficientes en su uso, con un menor gasto de agua por producto que las plantas cultivadas en el suelo. El rendimiento de frutos fue similar y los sólidos solubles totales y los niveles de azúcar no fueron significativamente diferentes entre los sistemas de cultivo. Sin embargo, Los niveles de licopeno y β -caroteno fueron similares o significativamente más altos en cultivo hidropónico en comparación con el sistema de crecimiento usando tierra, lo que posiciona a los sistemas hidropónicos como más eficientes y capaces de generar productos de mayor calidad.

Otro estudio que respalda al sistema hidropónico como una opción superior a métodos tradicionales es el efectuado por Bozo et al, 2019, en el que se compara el rendimiento y la calidad de tomates cultivados con un sistema hidropónico de bolsa abierta (plantas cultivadas en contenedores donde la solución nutritiva se suministra a las plantas por medio de rocío en ciclos de riego, sin recirculación de la solución) y un sistema en suelo, ambos en un entorno semicontrolado. En este estudio se determinó que las plantas en el sistema sin suelo se desarrollaron más rápido y con un mayor rendimiento total en comparación con el cultivo en suelo. Además, los tomates producidos por sistema hidropónico obtuvieron un mayor contenido de azúcares y mayor pH del jugo. Estos resultados indican que el cultivo hidropónico puede mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos.

1.6. Integración de técnicas de cultivo hidropónico y aplicación de nuevos bioestimulantes o reguladores del crecimiento.

Una opción interesante para enfrentar el desafío alimentario es diseñar, sintetizar e implementar nuevos reguladores de crecimiento junto con los sistemas hidropónicos, evaluando sus efectos combinados en el cultivo de especies de relevancia en la agroindustria. Los reguladores de crecimiento son moléculas orgánicas que se aplican como estimulantes del desarrollo y resistencia al estrés biótico y abiótico de cultivos comerciales. Estos reguladores, también llamados hormonas vegetales o fitohormonas (Figura 1.3), son sustancias orgánicas que participan en los mecanismos de regulación de las plantas y permiten coordinar distintas actividades, incluyendo el desarrollo, crecimiento, procesos de maduración, respuesta al estrés, etc. Las hormonas vegetales han demostrado ser eficaces y competitivas para obtener beneficios en términos de calidad de producto, velocidad-capacidad de producción, y reducción del impacto de los cultivos al medioambiente (Casaretto et al, 2006).

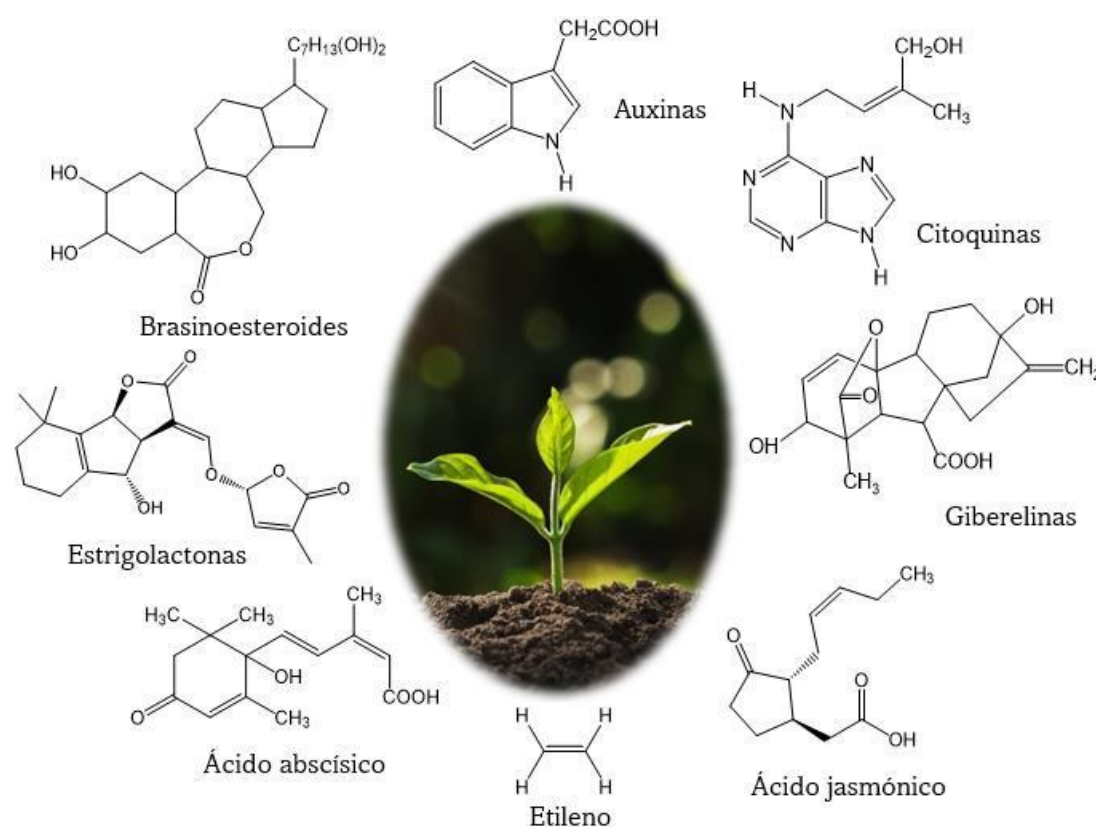


Figura 1.3: Hormonas vegetales (Moore, 2020).

Estas sustancias, capaces de actuar en muy bajas concentraciones, son menos específicas que las hormonas de origen animal, puesto que variaciones en la concentración, sensibilidad de los tejidos, e incluso interacciones con el ambiente a modo de adaptación, permiten una amplia variedad de efectos en las plantas. Así mismo, no existen glándulas ni efectos específicos para cada hormona: una misma fitohormona puede ser sintetizada en distintos órganos de la planta y estas no siempre requieren de transporte, pudiendo actuar sobre células vecinas o incluso en el mismo tejido en las que fueron sintetizadas. Más aún, una misma puede actuar sobre varios procesos, así como en un proceso pueden estar involucradas varias hormonas. Todo lo anterior sumado a la superposición de efectos de distintas fitohormonas hacen que la regulación sea un mecanismo complejo que involucra la interacción simultánea de muchos factores (Hussain et al, 2012). Análogos sintéticos se utilizan para emular la acción de ciertas hormonas vegetales, ya que para algunas resulta compleja la aislación desde las plantas pues se encuentran presentes naturalmente en muy bajas concentraciones. Sin embargo, dichas aplicaciones implican consideraciones relevantes con tal de optimizar el efecto buscando: oportunidad de aplicación, sensibilidad de la especie, dosis apropiada, condición de la planta, factores abióticos, etc (Steven et al, 2019).

1.7. Clasificación de los reguladores de crecimiento vegetal.

Los reguladores de crecimiento vegetal pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura molecular, actividad a nivel vegetal, efectos fisiológicos inhibitorios o estimulantes, etc. Algunos se clasifican en familias que agrupan compuestos con estructura o actividad similar.

Hasta la fecha se han clasificado como hormonas vegetales a auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico, conocidos como los cinco grupos hormonales clásicos (Tabla 1.3). Sin embargo, basándose en sus efectos, recientemente se han incluido a este grupo a las oxilipinas (el más conocido es el ácido jasmónico), poliaminas, salicilatos, oligopéptidos y óxido nítrico (Jordán, 2006).

Tabla 1.3: Efectos y precursores de los principales grupos de reguladores de crecimiento vegetal (Steven et al, 2019).

Fitohormona	Efecto a nivel vegetal	Precursor orgánico
Auxinas	Formación y elongación de tallos	L-Triptófano
	Producción de diferentes raíces adventicias	
	Aumento de la dominancia apical	
Giberelinas	Aumenta el desarrollo de tejidos de manera constante	Ent-Kaureno
	Elongación de raíces, hojas jóvenes, floración	
	Alargamiento de segmentos nodales	
	Participan en procesos de iniciación floral	
	Vital en fertilidad de plantas masculinas y femeninas	
	Induce germinación de semillas	
Citoquinas	Induce la iniciación y elongación de raíces	Adenina
	Activa la senescencia de las hojas	
	Estimulan desarrollo fotomorfogénico vegetal	
	Estimula la generación de brotes axilares a nivel vegetal	
Ácido abscísico	Regula y mantiene la dormancia de las semillas	Isopentil Pirofosfato
	Estimula la maduración de semillas	Carotenoides
	Puede inhibir el proceso de germinación vegetal	
	Regula la transpiración celular (Estomas)	
	Puede inducir la senescencia y floración vegetales	
Ácido salicílico	Potencializa el crecimiento de la floración	Fenilalanina
	Incrementa la longevidad floral	
	Control y protección de procesos de estrés	
	Mejora la tolerancia de la germinación a bajas temperaturas	
	Aumenta resistencia en ambientes de alta salinidad o sequía	
Poliaminas	Promueve la elongación y desarrollo de la raíz	Arginina
	Promueve el desarrollo del sistema radicular primario, lateral y adventicio	
	Disminución del contenido de poliaminas puede causar la disminución de la elongación radicular	
Ácido Jasmónico y derivados	Regulación del desarrollo de órganos embrionarios	Ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA)
	Regulación de la germinación de semillas	

	Regula la formación de raíces	Ácidos grasos poliinsaturados
	Involucrados en la adaptación a procesos de estrés y fototropismos	
Etileno	Regula maduración y senescencia vegetal	Metionina
	Maduración de hojas, inicio de floración y frutos	
	Desarrollo de órganos sexuales	
	Puede mejorar las características de maduración de frutos	
Estrigolactonas	Involucrado en respuestas adaptativas cuando se presenta deficiencia de fósforo y nitrógeno en el medio	Carotenoides
	Potencia el desarrollo de raíces	
	Puede aumentar el desarrollo radicular cuando se combina con ciertas auxinas	

Entre los usos y aplicaciones comerciales de los reguladores de crecimiento destacan la aceleración de la maduración de frutos de varias especies, regulación de la floración para cultivos de relevancia alimentaria u ornamental, germinación de semillas, aumento de la tolerancia a estrés ambiental, mejorando la adaptación a condiciones adversas como suelos salinos, pobres en agua o a temperaturas bajas, entre muchos otros (Gray, 2004).

Una familia de estos estimulantes, cuyo descubrimiento es relativamente reciente y que ha demostrado gran potencial en aplicaciones comerciales por poseer múltiples propiedades importantes son los Brasinoesteroides (BRs), hormonas esteroidales capaces de inducir un amplio rango de respuestas a bajas concentraciones (hasta 100 veces menores que otros estimulantes vegetales), entre ellas: incremento en tasa de elongación de tallo, aumento en expansión de hojas, crecimiento de tubo polínico, reorientación de microfibras de celulosa, adaptación al estrés vegetal biótico y abiótico, etc. Los Brasinoesteroides también confieren resistencia a las plantas contra estrés abiótico y biótico, por lo que se les considera como una nueva clase de hormonas vegetales con efectos pleiotrópicos altamente promisorias, amigables con el ambiente y aptas para su uso en protección de las plantas y aumento de la producción agrícola (Salgado et al, 2008).

1.8. Brasinoesteroides.

Los BRs son un tipo de poli hidroxiesteroides de lactona que fueron descubiertos a principios de la década de los 70 en extractos de polen pertenecientes a la especie vegetal *Brassica napus L* (de ahí el nombre “brassinos”) a través del bioensayo de elongación del segundo internudo del frijol. En ese entonces, se les clasificó como hormonas vegetales porque eran compuestos orgánicos específicos, aislados desde plantas y que tenían la capacidad de inducir crecimiento al ser aplicados en cantidades mínimas a otras plantas.

Posteriormente fue descubierta su estructura base, la cual comparte similitudes con las hormonas esteroidales de origen animal. Para ello, se debieron extraer desde una carga de 227 kg de polen de *B. napus*, solo 4 mg de una sustancia que fue identificada como una lactona esteroideal mediante cristalografía de rayos x. Dicha sustancia se denominó Brasinólida y fue caracterizada como (22R, 23R)-2 α , 3 α , 22, 23-tetrahidroxi-6, 7seco-5 α -campestan-6,7-lactona (Moreira, 2011).

La dificultad de aislarlo desde el medio natural llevó a la necesidad de encontrar formas de síntesis química. Ya para la década de 1980 existía una variedad de compuestos análogos, por lo que el

enfoque de la investigación estaba orientada a estudiar sus efectos fisiológicos en diversos sistemas biológicos con tal de desarrollar aplicaciones en diversas áreas (Ibarrola, 2006).

A pesar de lo anterior, no fue sino hasta el año 1996 cuando se descubrió que los BRs eran indispensables en el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, tal como fue descrito por varios trabajos independientes en los que observaron comparativamente a una mutante insensible a los BRs con tres mutantes deficientes (que no contenían o tenían en cantidades deficientes ciertos tipos de BRs). Las especies mutantes presentaron enanismo y otras alteraciones que fueron revertidas al adicionar BRs, lo que demostró que los BRs juegan un papel crucial en el desarrollo de las plantas. Además de ello, se tiene evidencia de que los BRs se encuentran presentes en cantidades y formas distintas en varias especies vegetales, específicamente en polen, hojas, yemas, flores y semillas.

Actualmente, los esfuerzos científicos se centran en estudiar la actividad fitofisiológica, mecanismos de acción, relación estructura actividad, métodos de síntesis, interacción con otras fitohormonas, aplicaciones en cultivos, entre otras, de los compuestos análogos de Brasinoesteroides, dado que, si bien la Brasinólida es el compuesto más activo de los Brasinoesteroides conocidos, su obtención por vía natural y sintética es muy costosa como para tener aplicaciones viables (Hernández, 2016).

La estructura base de la Brasinólida corresponde a esteroides que tienen un oxígeno presente en el átomo de carbono C-3, C-2, C-6, C-22 y C-23 tal como muestra la figura:

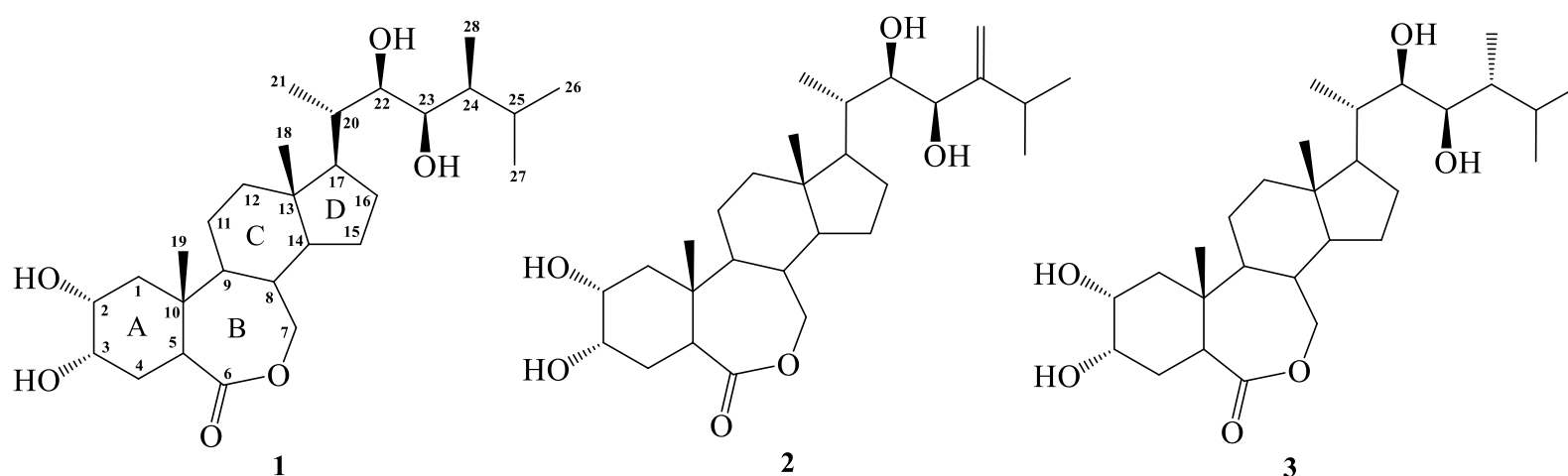


Figura 1.4: Primeros Brasinoesteroides naturales caracterizados: Brasinólida (1); Dolicolida (2); Epibrasinólida (3).

La Brasinólida (1) se distingue de otros compuestos esteroidales por poseer una estructura caracterizada por la presencia de una agrupación diol en las posiciones dos y tres del anillo A, un anillo B de tipo 7-oxa-lactona y una cadena lateral portadora de cuatro centros quirales contiguos (20S, 22R, 23R, 24S) con grupos metilos en las posiciones C-20 y C-24 y grupos hidroxilos en las posiciones C-22 y C-23.

Tras la identificación de la Brasinólida, se han logrado aislar y caracterizar decenas de compuestos con características estructurales similares, como la Dolicolida (2) y la Epibrasinólida (3) que han exhibido distintos grados de actividad estimuladora de la elongación y división celular. Los BRs naturales comparten el esqueleto 5 α -colestano, y las variaciones estructurales (en conjunto con lo que se cree son los responsables de la actividad biológica de estos compuestos) están determinadas por tres zonas puntuales: el anillo A, el anillo B y la cadena lateral (Figura 1.5).

La variedad estructural presente en el anillo A es amplia, identificándose 10 tipos de variaciones según las funciones oxigenadas presentes, su posición y su orientación espacial.

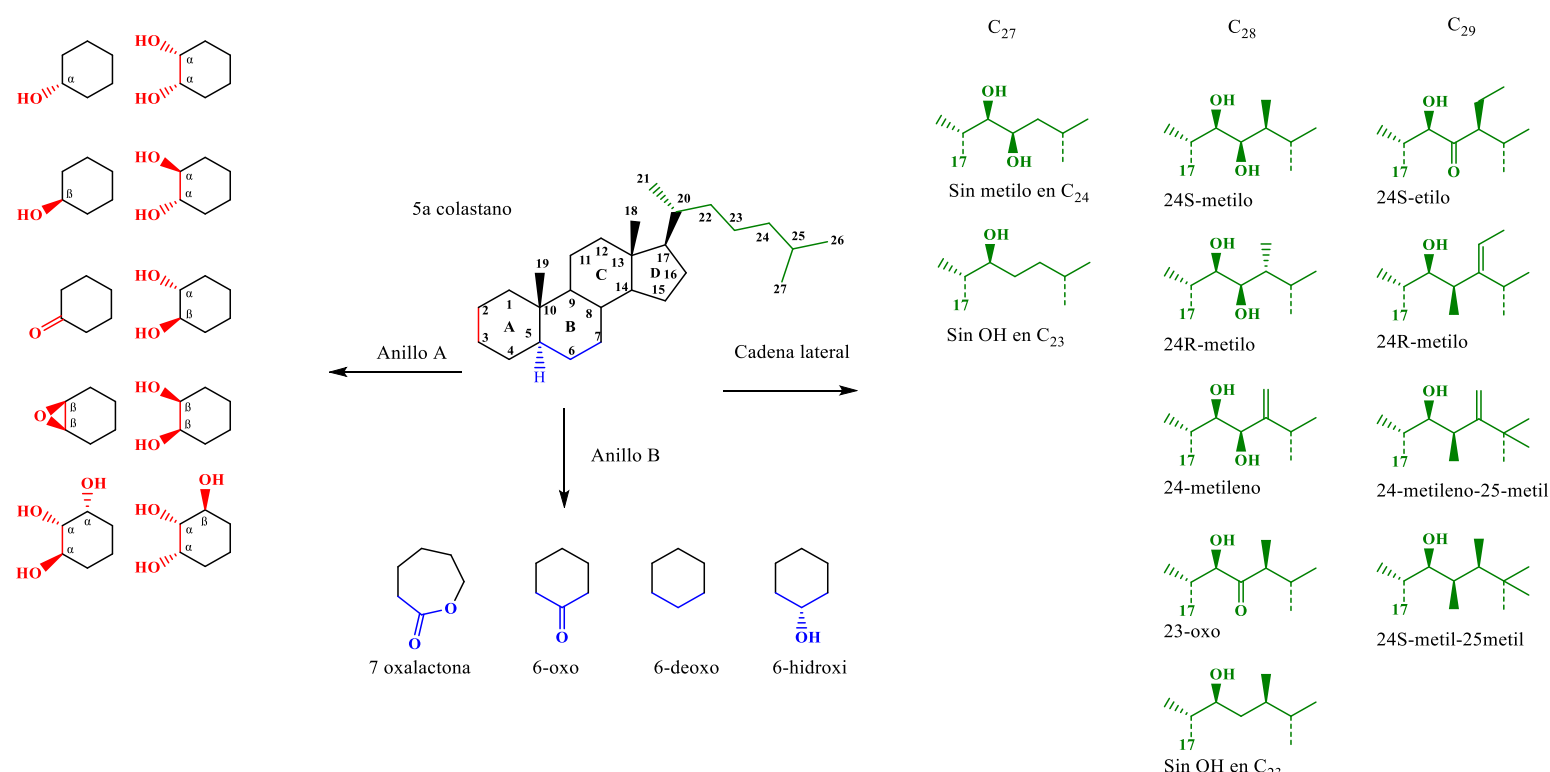


Figura 1.5: Variación estructural de sustituyentes en el anillo A, anillo B y cadena lateral de BRs naturales.

En el caso de BRs naturales, la elevada actividad biológica viene dada por el grupo diol 2α , 3α presentes en la mayor parte de estos. Aquellos que solo poseen una función oxigenada en C-3 son considerados precursores de los anteriores, mientras que las configuraciones 2β , 3α y 2β , 3β están asociadas a la degradación metabólica de los mismos. Así, se ha determinado experimentalmente que la actividad biológica decrece en el siguiente orden: $2\alpha, 3\alpha > 2\alpha, 3\beta > 2\beta, 3\alpha > 2\beta, 3\beta$, lo que sugiere que la orientación 2α del grupo hidroxilo es clave para mostrar una elevada actividad.

El anillo B presenta una menor diversidad estructural en comparación al anillo A. Los BRs más activos presentan un anillo B de siete miembros con una función 7-oxalactona, para los cuales se considera como precursores aquellos BRs naturales que presentan un anillo B de seis miembros sin funciones oxigenadas o con una función 6-ceto o 6-hidroxi. A pesar de lo anterior y aunque los BRs naturales con función 6-deoxo son prácticamente inactivos, los análogos con una función cetona en el C-6 poseen un 50% de la actividad biológica de los grupos con función 7-oxalactona y constituyen la mayoría de los BRs aislados hasta el momento (Fujioka et al, 1997).

Respecto a la cadena lateral, esta se clasifica en tres grupos según el número de átomos de carbono presentes: C27-BRs, C28-BRs y C29-BRs. Todos los BRs naturales presentan un diol $22R$, $23R$ y las diferencias en la cadena lateral están principalmente dadas por los sustituyentes en el C-24, siendo este centro muy importante en la actividad biológica pues en el sustituyente y la estereoquímica de este carbono radica la diferencia entre la mayoría de los BRs naturales (Clouse, 2011).

Actualmente se conocen más de 70 tipos diferentes de análogos similares a la Brasinólida, los cuales juegan un rol crucial en la regulación vegetal y el control de procesos como la producción de etileno, resistencia a estrés ambiental, respuesta gravitrópica de la raíz, entre muchas otras (Bajguz et al, 2020).

Los BRs han sido encontrados en todo tipo de plantas (gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas) organismos vegetales como algas, cianobacterias y plantas ancestrales, por lo que se cree que son una de las hormonas más antiguas dentro del reino vegetal. Estos se encuentran en diferentes tipos de órganos vegetales como lo son el polen, semillas inmaduras, raíces y flores (1-100 ng/g), presentándose también en brotes y hojas, pero en concentraciones menores en comparación a los tejidos reproductivos. Su biosíntesis comienza en el retículo endoplasmático teniendo como precursor el campesterol, siendo sintetizado por las plantas por medio de una ruta

metabólica de oxidación tardía y una de oxidación temprana. Los plastidios se han identificado como organelos clave para estos compuestos, mientras que se cree que la estoma sea el sitio de síntesis y los gránulos del almidón el sitio donde se almacenan y reservan los BRs (Yokota et al, 2017).

1.9. Efectos fisiológicos de Brasinoesteroides.

Como se mencionó anteriormente, los BRs cumplen diferentes funciones dentro de la fisiología vegetal tanto en regulación del metabolismo como en la señalización celular, teniendo un amplio espectro de efectos en el desarrollo de las plantas.

Entre estos es posible mencionar fundamentalmente el control de la elongación y división celular, el crecimiento de la raíz, regulación de la fotomorfogénesis, germinación de semillas, diferenciación de estomas y sistema vascular, regulación de expresión génica, influyen en la síntesis de clorofila, elongación de vástago vegetal y otras funciones relacionadas con el control de la inmunidad y reproducción. Además, les confieren a las plantas no sólo resistencia a pesticidas y herbicidas artificiales, sino que también son capaces de atenuar los cambios de estrés provocados por factores bióticos y abióticos del medio, tales como infecciones virales y fúngicas, escasez de nutrientes, salinidad, temperaturas extremas, sequía, etc (Casaretto et al, 2006).

Es sabido que la aplicación exógena de distintos tipos de BRs en distintas concentraciones permite mejorar la germinación de semillas e inducir la promoción del crecimiento de hipocótilos, cotiloides, láminas de hojas, elongación de raíz y diferenciación del meristemo apical, siendo las aplicaciones comerciales más relevantes su uso para aumentar el rendimiento de la producción de biomasa y para acelerar la maduración de frutos. Los análogos de BRs ejercen efectos cualitativamente similares a sus contrapartes naturales, lo que atrae a científicos, específicamente del área de la química, biología y agricultura a establecer la relación estructura-actividad para optimizar resultados de las aplicaciones en el cultivo de diversas especies. Entre sus ventajas es posible mencionar que presentan actividad en concentraciones extremadamente bajas, aproximadamente 100 veces menor que la de otros reguladores de crecimiento vegetal, no causan deformaciones en las plantas y ejercen sus efectos principalmente cuando estas están sometidas a condiciones adversas. Por último, estudios toxicológicos han demostrado que estos compuestos no presentan genotoxicidad, antigenotoxicidad ni ecotoxicidad (Khripach et al, 2000).

1.10. Aplicaciones en la agricultura.

Desde su descubrimiento, los BRs han sido estudiados para encontrar potenciales aplicaciones en la agricultura, generando a la fecha numerosas patentes, reportes y descubrimientos en todo el mundo. En Rusia, por ejemplo, la producción de Epibrasinólida data del año 1992 para el tratamiento de cultivos de producción masiva tales como papa, tomate, pepino y pimiento. El cultivo de arroz en países orientales también se ha visto beneficiado por la aplicación de BRs a través de la técnica de aspersión foliar o por riego, con aumentos de producción de hasta el 15% y el aumento en la velocidad de maduración de las plantas de arroz, en particular aquellas cultivadas en condiciones de frío, las cuales aumentaron su resistencia al frío y salinidad durante su crecimiento.

Otras patentes especifican aplicaciones en el aumento de producción de rábano, cebolla, trigo y racimos de uva, incremento del tamaño en plantas de soya y maíz y mayor producción en poroto. Su aplicación también ha logrado reducir la caída de frutos en cultivos de tomates, peras, duraznos, limones, kaki y manzanas. La tabla 1.4 muestra algunas patentes relacionadas a la aplicación de Brasinoesteroides en agricultura.

Tabla 1.4: Patentes asociadas a aplicaciones de Brasinoesteroides en diferentes tipos de cultivos.

Código	Autor	Contenido de patente
GB2127022A	Kerb et al, 1983	Derivados de 28-metil-brasinoesteroides con acción reguladora del crecimiento de las plantas y su fabricación y uso
EP0315921A1	Takatsuto et al, 1988	Derivados de Brasinoesteroides y reguladores de crecimiento vegetal
JPH01313401A	Nitani et al, 1989	Preservante de frescura vegetal con Brasinoesteroide como ingrediente activo
DE4039017A1	Margita et al, 1992	Agente mejorador de calidad de fruta que contiene Brasinoesteroide y auxina utilizadas sinérgicamente con manzanas y peras, para alto volumen celular
EP0702027A1	Kamuro et al, 1994	Derivados de Brasinoesteroides y reguladores de crecimiento vegetal que contienen al menos uno de ellos como ingredientes activos
CA2828237C	Hidalgo et al, 2011	Método para inducir resistencia a enfermedades en plantas utilizando la fitohormona Brasinoesteroide
CN105494372A	Wang et al, 2015	Agente regulador del crecimiento incluyendo 2,4-Epibrasinólida capaz de mejorar la producción de semillas de arroz híbrido y su aplicación en la reproducción de semillas de líneas estériles
US10440954B2	Mandava et al, 2017	Mayores rendimientos de almendras con la aplicación de Brasinoesteroides seleccionados del grupo que comprende Brasinólida, Epibrasinólida y Homobrasinólida
CN108739158A	Lianmeng et al, 2018	Aplicación de Brasinoesteroide para aliviar la florecencia del arroz ante estrés por alta temperatura
CN114276399A	Ming et al, 2021	Análogo de Brasinoesteroide, nueva forma de cristal, método de preparación y aplicación

Pruebas de campo llevadas a cabo en China demostraron una mejora en la producción de trigo de hasta el 15% para distintas variedades y en distintos climas (Sairam, 1994). Por otro lado, la producción de centeno en invierno ha visto un incremento de un 20% tras la aplicación de BRs en la fase de germinación (Khripach et al, 2000).

El trabajo de Soto et al, (2020) demostró que mezclas epiméricas de análogos de BRs (Figura 1.6) ejercen un efecto similar a **1** al ser aplicadas en la germinación de tomate, reduciendo el periodo de germinación en hasta un 22%. Esto indica que el uso de análogos puros no es imprescindible, lo que presenta grandes ventajas desde el punto de vista de producción, con una síntesis más rápida, económica y con mayores rendimientos.

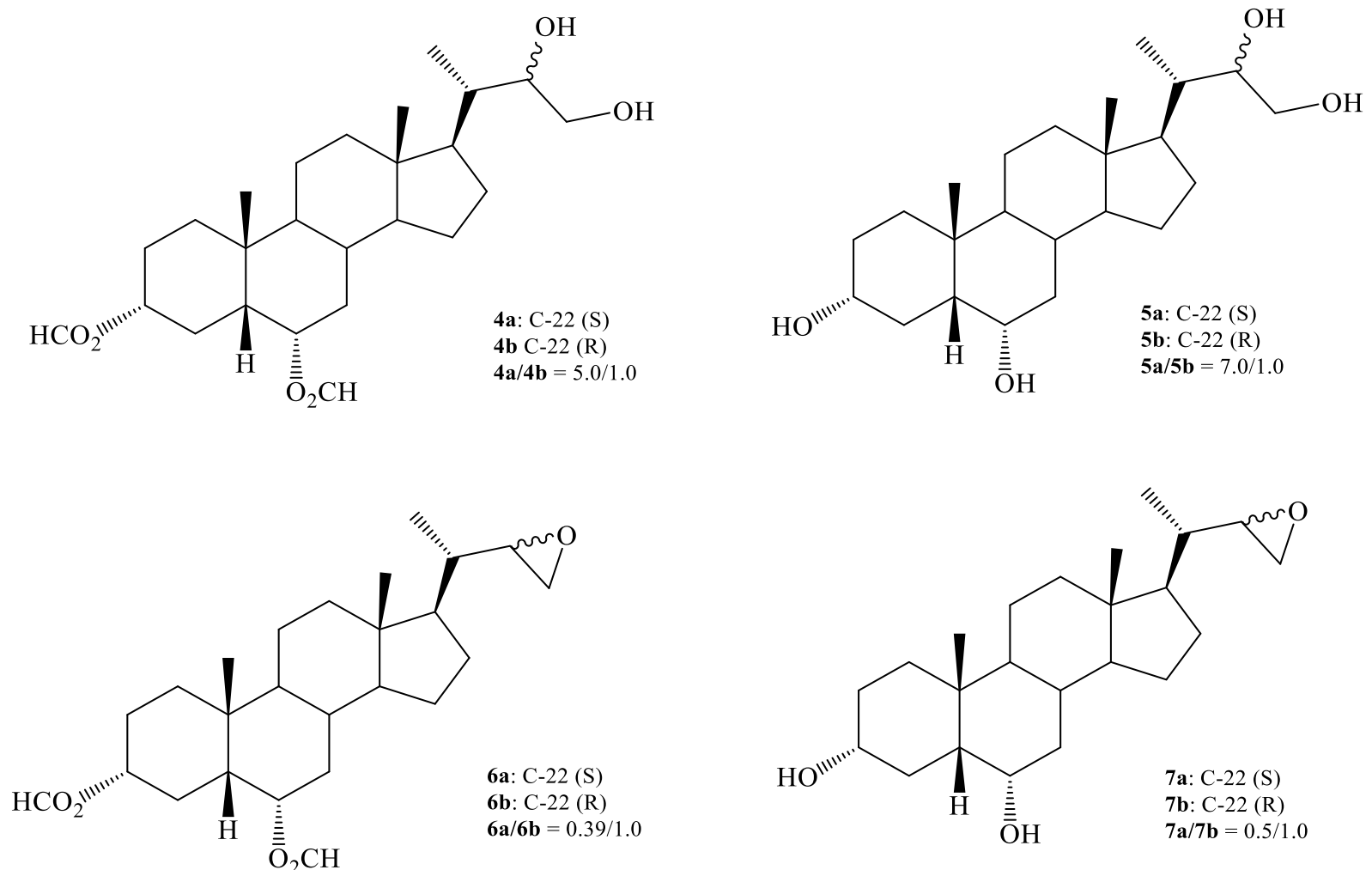


Figura 1.6: Mezclas epiméricas de análogos de BR, con estereoquímica *S* y *R* en carbono 22, aplicadas en la germinación de semillas de *Lycopersicum esculentum* (Soto et al, 2020).

Una característica importante que otorgan los BRs es no solo el aumento en la producción sino también la calidad de las cosechas. Por ejemplo, en plantas de papa, la aplicación de 0,1 a 0,2 mg/L de BRs (Biobras-16, Cetona esteroidal polihidroxilada) genera un aumento de 20% en la producción, pero además genera un aumento en la calidad del alimento disminuyendo el contenido de nitrato y aumentando el contenido de almidón y vitamina C. Otros análogos de Brasinoesteroides y sus aplicaciones en cultivos se muestran en la tabla 1.5 (Salgado et al, 2008).

En ciertos casos, el efecto de los BRs en el sistema inmune en las plantas es más efectivo que la aplicación de fungicidas comunes y se ha observado en los compuestos actividad antiecdiesterioide y neurodepresora en insectos, reflejando un potencial efecto insecticida (Xia et al, 2009). Más aun, existe evidencia de una disminución de los efectos del estrés tras aplicar BRs en plantas cultivadas en suelos contaminados con metales, salinos y en condiciones de altas temperaturas. Para el caso de trigo y cebada se observó aumento de resistencia a choque térmico y estrés hídrico (Bhardwaj et al, 2006).

Desde el punto de vista de la morfogénesis, la adición de análogos induce respuestas de elongación y división celular, así como también estimula el desarrollo de brotes, bulbos y raíces, además de mejorar el desarrollo y crecimiento floral (Runkova et al, 1999).

Tabla 1.5: Ejemplos de análogos de Brasinoesteroides y sus efectos en cultivos (Salgado et al, 2008).

Análogo de Brasinoesteroide	Concentración [mg/L]	Efecto
Biobras-16 (Cetona esteroidal polihidroxilada)	0,1	Incremento del 10-25% en rendimiento de arroz, ajo, cebolla, papa, maíz, tomate, soya y vid
Epin (24-epibrasinólida)	25	Incremento del 35% en rendimiento de cebada
EBR (24-epibrasinólida)	0,1	Organogénesis in vitro (brotes) en <i>Capsicum annuum</i> L. cvs Júpiter y Pimiento Perfection
Epibrasinólida	0,25	Resistencia a enfermedades >33%
Brasinólida	0,5 - 1	Mayor rendimiento de arroz (10%)
Biobras—16	0,4	Incremento en rendimiento de semillas (68%)
CIDF-4 (80% de compuesto esteroidal)	0,3	Mayor rendimiento de híbridos fértiles de maíz (2,5 veces más)

1.11. Mecanismo de acción.

La vía de transducción de las señales de BRs ha sido estudiada en profundidad durante las últimas dos décadas, y se describe como un mecanismo complejo que juega un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La vía de transducción indica que receptores de quinasa de repetición rica en Leucina (LRR), ubicados en la membrana plasmática, son capaces de percibir BRs fuera de la célula. BRI1 interactúa con el receptor quinasa 1 asociado (BAK1) y modula los reguladores positivos de la señalización de BR, BZR1 y BES1. El aumento en los niveles de BR provoca la desfosforilación de BZR1 a dBZR1 y permite la unión de este a elementos E-box (CANNTG) y/o elementos BRRE (CGTGT/CG) en los promotores de genes diana sensibles a BR (Figura 1.7). BRI1 activa los factores de transcripción (TF) de BZR1 y BES1 para inducir tolerancia al estrés (Li et al, 2020).

Tras la percepción de BRs, sus señales se transmiten a BES1 y BZR1 mediante una cascada de señalización, la cual es capaz de controlar la transcripción de genes regulados por los BRs. Otro receptor de quinasa LRR, BAK1, interactúa con BRI1 y actúa como correceptor. La forma bioactiva del BR, la Brasinólida (**1**) mejora la interacción entre BRI1 y BAK1; esta última desencadena las vías de señalización intracelular que incluyen la proteína fosfatasa BSU1, la proteína serina/treonina quinasa BSK1, proteína fosfatasa 2a (PP2A), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) similar a la cinasa de Brasinoesteroide insensible 2 (BIN2) y TF de la familia BZR1. Por tanto, las mutaciones en los genes que codifican la síntesis de BR y los principales componentes de su señalización causan limitado rendimiento y fertilidad, crecimiento y desarrollo de órganos alterado y enanismo severo (Planas-Riverola et al, 2019).

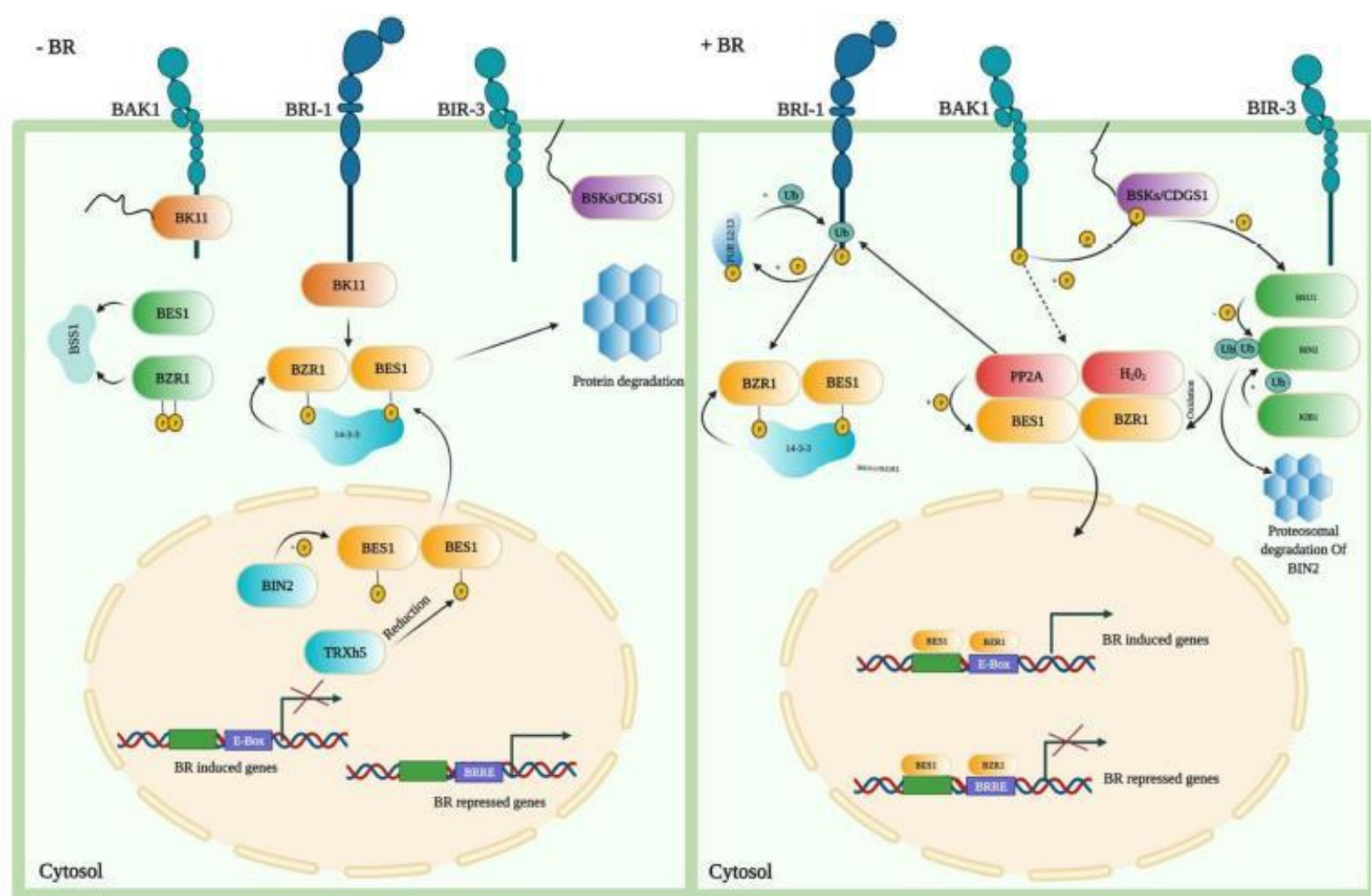


Figura 1.7: Esquema de señalización en ausencia y presencia de BRs en *A. thaliana* (Manghwar et al, 2022).

Cuando los BRs están ausentes, BZR1 y las proteínas BES1 son fosforiladas por el BIN2, que las activa, promoviendo la unión de estas proteínas a las proteínas 14-3-3, lo que resulta en la retención y degradación citoplasmática. Esta mejora la retención citoplasmática de los TF, evitando que entren en el núcleo y transmitan la respuesta inducida por el BR. Cuando hay BR presentes, BR se une a BRI1 y al correceptor BAK1 hace que BKI1 se disocie de BRI1, lo que provoca la transfosforilación entre BRI1 y BAK1 a través de la fosforilación directa, el complejo receptor BRI1-BAK1 activado transmite su señal a BSKs y a Crecimiento diferencial constitutivo 1 (CDG1). La fosfatasa BSU1 es activada por BSK o CDG1. BSU1 posteriormente desfosforila el BIN2 para inactivarlo, y la ligasa E3 KIB1 media la degradación de BIN2. Mientras tanto, PP2A desfosforila BZR1 y BES1 para activarlos, permitiendo que los TF ingresen al núcleo y regulen la expresión de los genes objetivo de BR, ya sea por interacción directa o a través de interacciones con otros TF. Además, PP2A regula positivamente la señalización de BR por la desfosforilación de BZR1 y BES1, mientras que el SBI1 (Supresor de BRI1) desactiva el Metilación de BRI1 a PP2A (Manghwar et al, 2022).

Se ha demostrado que algunos de los genes regulados por los BRs codifican enzimas relacionadas con cambios en la pared celular, enzimas de la ruta de biosíntesis de los mismos y están implicados en la transcripción de proteínas relacionadas al metabolismo primario y secundario de las plantas (Azcón-Bieto et al, 2013).

1.12. Bioensayos aplicados a BRs: relación estructura actividad.

Con tal de producir un compuesto con uso práctico en la agricultura que pueda ser sintetizado de forma rentable, se requiere determinar qué grupos funcionales son los responsables de conferir la actividad a los Brasinoesteroides. Es sabido que pequeñas variaciones estructurales, ya sea en el anillo A, B o en la cadena lateral, tienen impactos de diversa consideración en el estímulo que son capaces de ejercer sobre el crecimiento de las plantas. Existen diversos bioensayos estándar que permiten evaluar la actividad de los compuestos con alta sensibilidad y especificidad. A continuación, se describen los más relevantes:

1.12.1. *Inclinación de la lámina de arroz.*

El ensayo de inclinación de la lámina de arroz es una prueba cuantitativa, con aplicaciones en varias hormonas vegetales, pero que resulta especialmente útil y específica para Brasinoesteroides dada su sensibilidad extrema a bajas cantidades del compuesto. Por esta razón se ha establecido como un método analítico micro-cuantitativo estándar para estos estimulantes de crecimiento (Oklest et al, 2013).

El ensayo se basa en el efecto que produce el BR en la estructura de la planta, la articulación de la lámina de arroz conectada a la hoja con la vaina produce como rasgo característico el ángulo de la hoja. Una hoja más erecta es una ventaja pues facilita la incidencia de luz solar, mejorando la fotosíntesis y ocupando menos espacio en plantaciones densas. El BR es el principal regulador de ese rasgo, aunque otras hormonas vegetales, como el etileno, la giberelina y la auxina, también influyen en el ángulo de la hoja. La aplicación de BR induce una mayor expansión celular de las células adaxiales por sobre las células abaxiales en las regiones articulares (Figura 1.8), provocando una inclinación laminar que depende de la concentración de la muestra aplicada (Li et al, 2017).

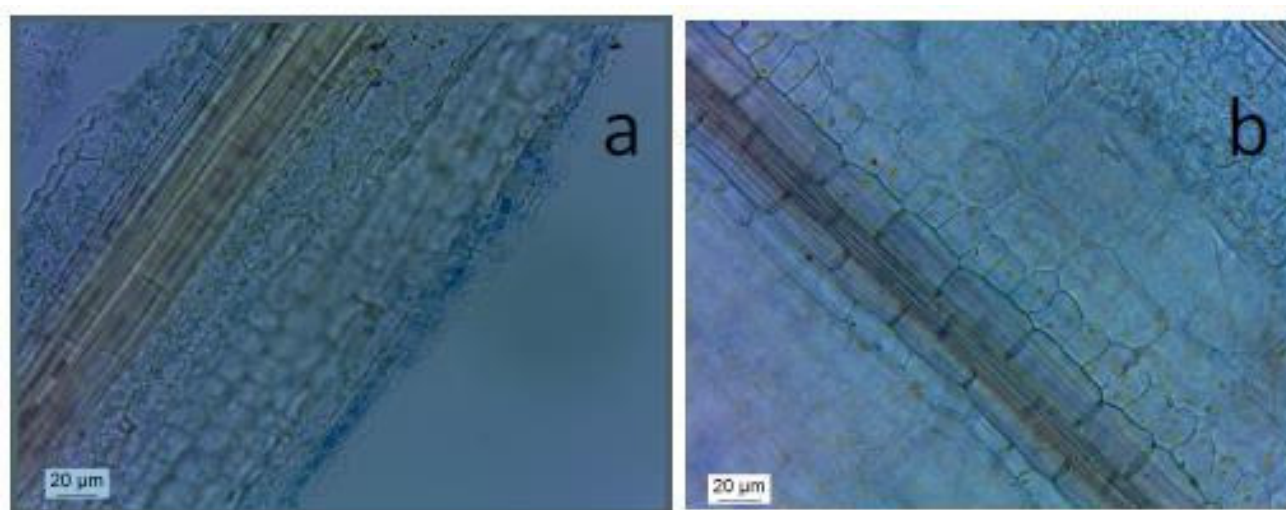


Figura 1.8: Cambios inducidos en la longitud de células mesófilas de la segunda lámina en plantas de arroz al aplicar análogos de BRs. **a** corresponde a planta de arroz sin BR, y **b** a planta con BR. Las secciones longitudinales de los sitios adaxiales de la segunda articulación de la lámina de arroz: (a) control negativo; (b) en presencia de análogos. Microscopio óptico 40x, escala de barras = 20 µm. (Durán et al, 2017).

1.12.2. *Elongación del segundo internudo del frijol.*

Este ensayo encontró aplicación en la determinación de actividad biológica de fracciones resultantes de la separación y purificación del complejo brasino y posteriormente en Brasinólida (**1**) pura. El ensayo es sensible a giberelinas y BRs. Ambos son capaces de generar elongación del internudo, pero solo el último causa cambios en el volumen, la curvatura y división del internudo (Figura 1.9), características indicativas de actividad de Brasinoesteroides, por lo que se le emplea como un ensayo específico para evaluar estos compuestos. El efecto depende de la cantidad de BR aplicada y se estima tiene un límite de detección de 0,5 ppm para los BRs.

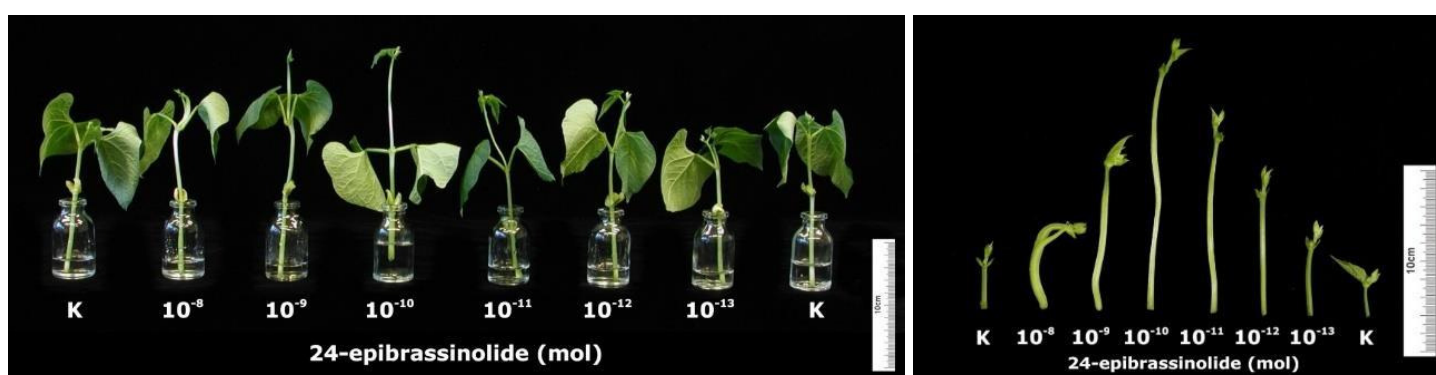


Figura 1.9: Curva de dosis-respuesta aplicada al compuesto 24-epibrasinólida mediante el bioensayo de segundo internudo de frijol (Slavikova et al, 2008).

1.12.3. Bioensayo de *Arabidopsis thaliana*.

La medición de la sensibilidad hormonal deriva de la capacidad de respuesta de tejidos específicos a hormonas exógenas y/o reguladores del crecimiento vegetal. En *Arabidopsis thaliana*, los BRs son necesarios para el alargamiento de hipocótilos en condición de oscuridad, bajo luz monocromática, o en respuesta a la proximidad de otras plantas o sombra (Wang et al, 2012).

Se ha sugerido que tanto los niveles hormonales como los cambios de sensibilidad son necesarios para promover el alargamiento del hipocótilo, de esta forma, medir la longitud de los hipocótilos en *Arabidopsis* (Figura 1.10 y 1.11) es un método útil y sencillo para medir la capacidad de respuesta de las plántulas a la luz y los BRs, así como para establecer si la luz afecta la sensibilidad a BRs o viceversa (Turk et al, 2005).

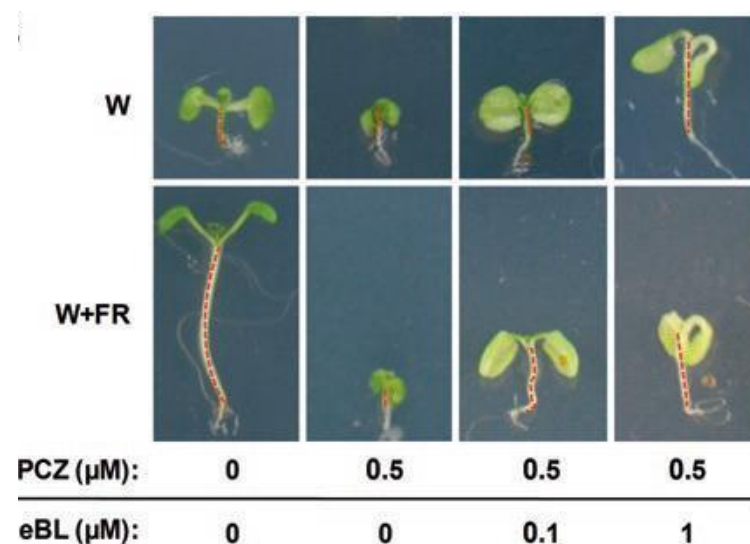


Figura 1.10: Efecto de sombra simulada en la respuesta del hipocótilo a la aplicación de hormonas. Semillas de *Arabidopsis* suplementadas con proplconazole (PCZ) y con o sin 24-epibrassinólida (eBL) (Russeinova, 2017).

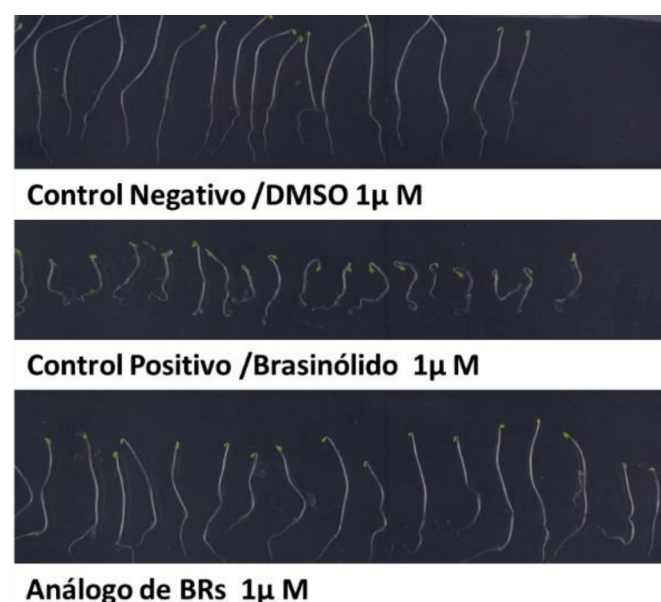


Figura 1.11: Efectos visuales del bioensayo de inhibición del hipocótilo en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratados con distintos tratamientos a una concentración de 1 μ M, en oscuridad después de 5 días de crecimiento (Nuñez et al, 2023; Datos No publicados).

Existe evidencia de que, aun cuando en menor cantidad que en los brotes, los BRs también son sustancias reguladoras importantes en las raíces (Bancos et al, 2002). El ensayo de arabidopsis es utilizado ampliamente para analizar los efectos de BR en la elongación de la raíz principal y formación de raíces laterales. Este método es capaz de proporcionar indicios respecto a si las raíces responden directamente a los BR, o indirectamente a través de efectos primarios en los brotes.

El ensayo permite también determinar si existen efectos positivos o negativos sobre el crecimiento de las raíces al aplicar BRs de forma exógena, según concentración aplicada, así como la dependencia del efecto estimulador de crecimiento que tienen los BRs al interactuar con otras fitohormonas (Müssig et al, 2003).

Otro ensayo aplicado en la medición y determinación de actividad biológica es el ensayo de elongación del hipocótilo en frijol, rábano y tomate, que se caracteriza por ser rápido pero destructivo y menos sensible que los anteriormente mencionados, por lo que tiene menor aplicación en los Brasinoesteroides.

1.13. Síntesis de Brasinoesteroides y sus análogos.

Los BRs se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, sin embargo, se encuentran en concentraciones demasiado bajas en las plantas como para que sea rentable su extracción, debido a esto se ha requerido realizar la síntesis de análogos de BRs como un método más económico de obtención de BRs naturales y sus análogos semisintéticos (Khripach et al, 1998).

Para conseguir este objetivo, se debe tener en consideración el hecho de que estos compuestos poseen una estructura compleja (10-13 centros quirales) y la presencia de un variado número de funcionalizaciones en su estructura, por lo que realizar una síntesis total no parece ser un método práctico de obtención de estas hormonas tal como señalan los trabajos de Temmem et al, 2002 y Zoller et al, 2002. Una de las soluciones a este problema radica en realizar un diseño semi-sintético, utilizando como sustratos de partida esteroides naturales abundantes. Preferentemente se han de elegir precursores con características estereoquímicas similares al target molecular a sintetizar (Khripach et al, 1998).

Los precursores más apropiados y utilizados para la síntesis de BRs naturales y sus análogos son esteroides con un enlace doble Δ^{22} , tal como el estigmasterol (8), el dihidrobrasicasterol (9) y ergosterol (10), que pueden ser utilizados en la síntesis de Brasinoesteroides con C-29 y C-28, respectivamente. La mayoría de los compuestos precursores de cadena lateral larga son difíciles de encontrar o tienen cadenas laterales saturadas que complican la funcionalización de estas. Otra posibilidad es utilizar esteroides como la serie del androstano y pregnano, de los cuales destacan la pregnenolona (11), androsterona (12) y los ácidos bisnorcolénico (13) y su derivado acetilado 14. Adicionalmente el uso de ácidos cólicos como precursores, es otra opción como es el caso del ácido hiodeoxicólico (15). Estos esteroides se encuentran de forma abundante debido a su uso en la producción de hormonas esteroideas farmacéuticas (Khripach et al, 1998). En la Figura 1.12 se muestran algunos de los esteroides más utilizados como precursores para la síntesis de análogos de BRs.

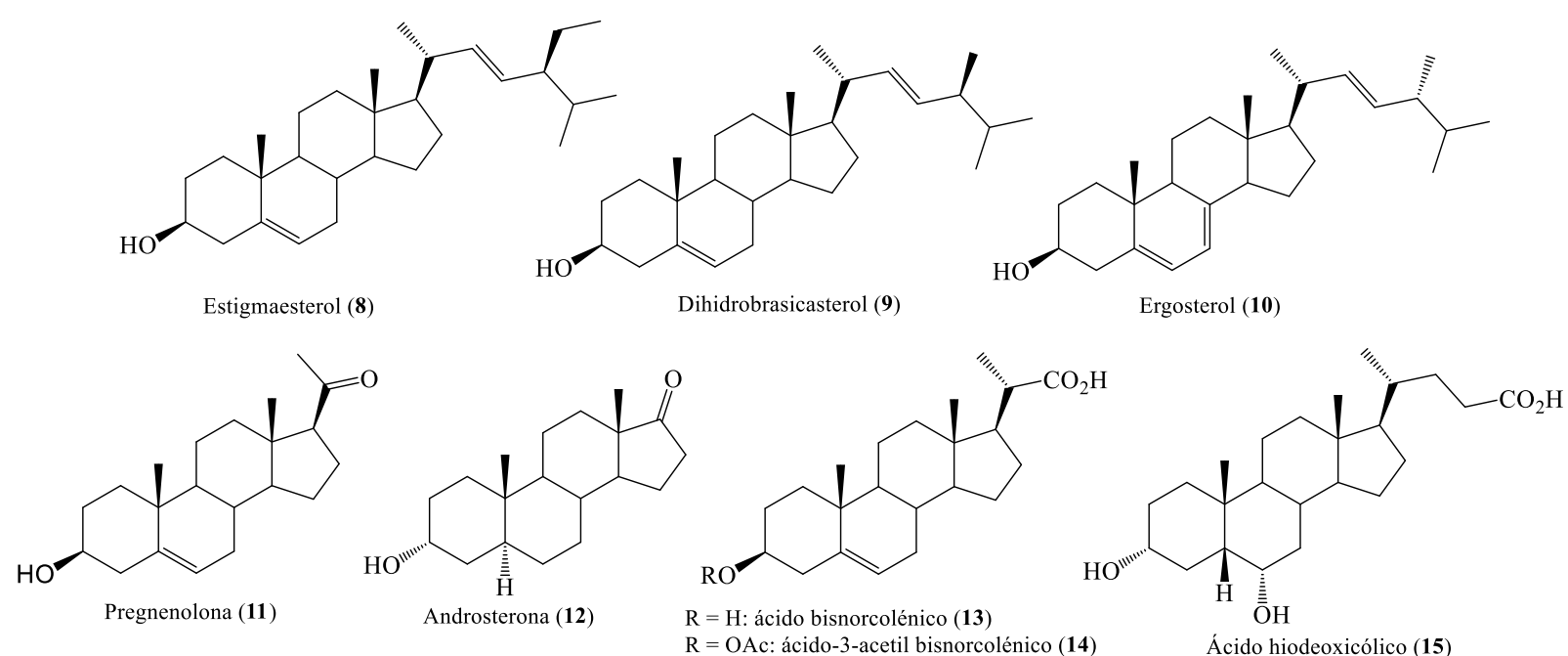


Figura 1.12: Estructura de esteroides que se han utilizado como precursores en la síntesis de Brasinoesteroides naturales y sus análogos.

Desde los estudios desarrollados en síntesis de BRs naturales y sus análogos, se obtuvieron interesantes resultados relacionados con la estructura y actividad biológica (SAR) de los que se llegaron a definir los requerimientos estructurales que deben poseer los BRs para presentar actividad biológica (Yokota, 1997, Yokota, 1999, Bajguz et al, 2003).

- 1) Funciones cis 2 α , 3 α -glicol en el anillo A.
- 2) Función 6-ceto o 7-oxalactona en anillo B.
- 3) Fusión de anillos A/B de tipo trans.
- 4) Cadena lateral funcionalizada con grupos oxigenados en posiciones 22R y 23R.

1.14. Análogos sintéticos con modificación en la cadena lateral.

Algunos de los requisitos mencionados anteriormente no parecen estar del todo claros, especialmente el relacionado con la cadena lateral, dado que se han preparado un gran número de análogos de Brasinoesteroides con importantes cambios estructurales en la cadena lateral como por ejemplo cadenas laterales más cortas, diferentes funciones oxigenadas, cadenas de tipo espirostánicas, cíclicas, cadenas laterales con funciones carboxílicas, ésteres, epóxidos, etc. (compuestos **16-27**) y donde algunos de estos han mostrado actividades biológicas en distintos ensayos (Zhou et al, 1989, Brosa et al, 1997, Iglesias-Arteaga et al, 2001, Back et al, 2003, Oklestkova et al, 2014, Carvajal et al, 2018). Algunos ejemplos de estos análogos se muestran en la Figura 1.13.

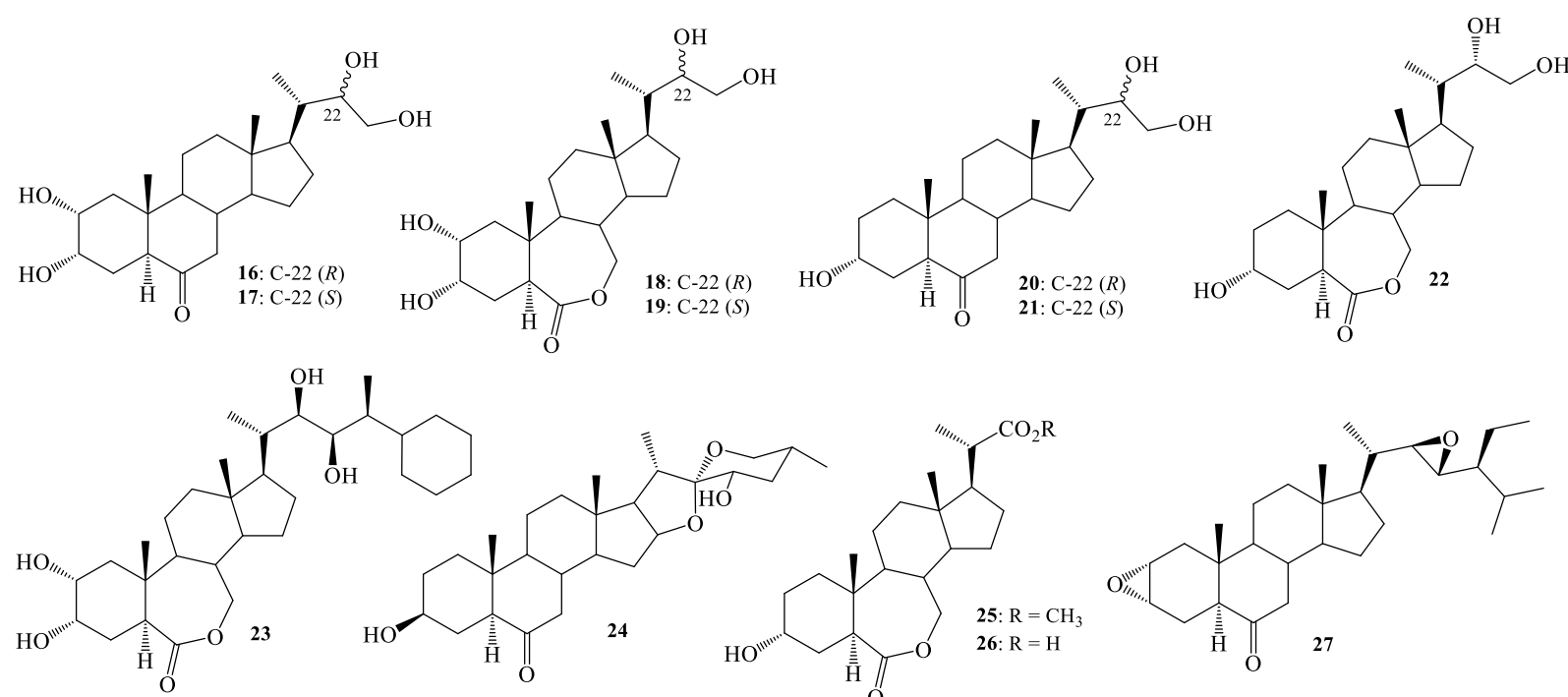


Figura 1.13: Estructuras de análogos de Brasinoesteroides con modificaciones importantes en la cadena lateral.

Un compuesto que resultó particularmente destacado en el ensayo de la lámina de arroz corresponde al compuesto **21**, tanto en su forma pura como en mezcla epimérica con el isómero **20** en proporción **21/20**, 1,0:0,24; para los cuales las actividades medidas en el rango de concentraciones del ensayo son similares a las exhibidas por la Brasinólida (**1**), y donde se observa que el análogo con configuración S en C22 (**21**), resultó tres veces más activo que el epímero R (**20**) (Díaz et al, 2020).

Otro grupo importante de análogos de Brasinoesteroides con cadenas laterales más cortas y funciones de ácidos carboxílicos, ésteres y éteres, se han sintetizado desde esqueletos de pregnanos y 23,24-bisnocolanos. Es el caso de los análogos mostrados en la Figura 1.14.

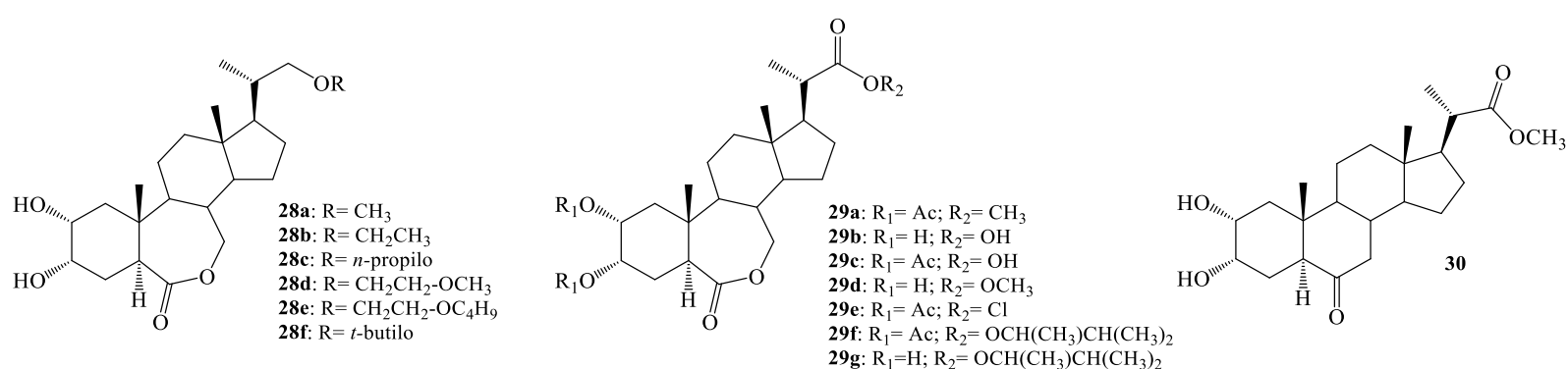


Figura 1.14: Análogos de Brasiñoesteroides con cadenas laterales del tipo 23,24-norpregnanos, funcionalizadas en forma de éteres, ésteres y ácidos carboxílicos.

Los compuestos de la serie (**28a-28f**), fueron evaluados en el bioensayo de elongación del segundo entrenudo del frijol, donde el análogo **28b** mostró una destaca actividad biológica por sobre el resto de la serie (Cerny et al, 1987). Mientras que la serie de análogos **29a-29g** fue evaluada en los bioensayos de curvatura del primer entrenudo y elongación del segundo entrenudo del frijol, donde todos los compuestos evaluados mostraron actividad biológica, destacando el análogo **29b**, con actividad comparable a la 24-epibrasinóloda (**3**), utilizado como control positivo (Strnad et al, 1986). Sí bien el análogo **30** fue preparado desde 23,24-bisnorcolanos, no se informaron datos de actividad biológica (Kohout et al, 2000).

Por otra parte, se han reportado interesantes trabajos relacionados con la síntesis de análogos de BRs, con incorporación de sistema heterocíclicos aromáticos y aromáticos sustituidos. Todos ellos en la cadena lateral (arilbrasiñoesteroides). Estos análogos fueron preparados por investigadores de varios grupos diferentes, correspondientes a los análogos **30a-42** (Figura 1.15). Los análogos **30b** y **30c** lograron producir el alargamiento de 37rasinólid en el ensayo *Arabidopsis* det-2 (Huang et al, 1994) y, además, mostraron como resultado una actividad significativa en el ensayo de elongación del segundo entrenudo de frijol francés (Wendeborn et al, 2017). Mientras que los análogos **30a** y **31c** mostraron actividades comparables a los efectos inducidos por 24-epicastasterona (**43**). El correspondiente análogo de Brasiñoesteroide **42a** que posee un anillo lactona de 7 miembros, fue el compuesto más potente que se identificó, con una actividad cercana a la mostrada por la Brasinólida (**1**) (Kvasnica et al, 2016). El análogo **42a** junto con **30a** y **31c** mostraron una potente actividad para inducir la producción de la hormona etileno en plántulas de guisantes y en el ensayo de sensibilidad de enraizamiento de *Arabidopsis thaliana* L. mostrando actividad comparable a la de Brasinólida (**1**) (Kvasnica et al, 2016, Kvasnica et al, 2017). De la serie de arilbrasiñoesteroides halogenados, los análogos **31a**, **32b** y **33a**, (Figura 1.15) fueron los más activos en ambos ensayos biológicos, comparados con 24-epibrasinólida (**3**) (Kvasnica et al, 2017).

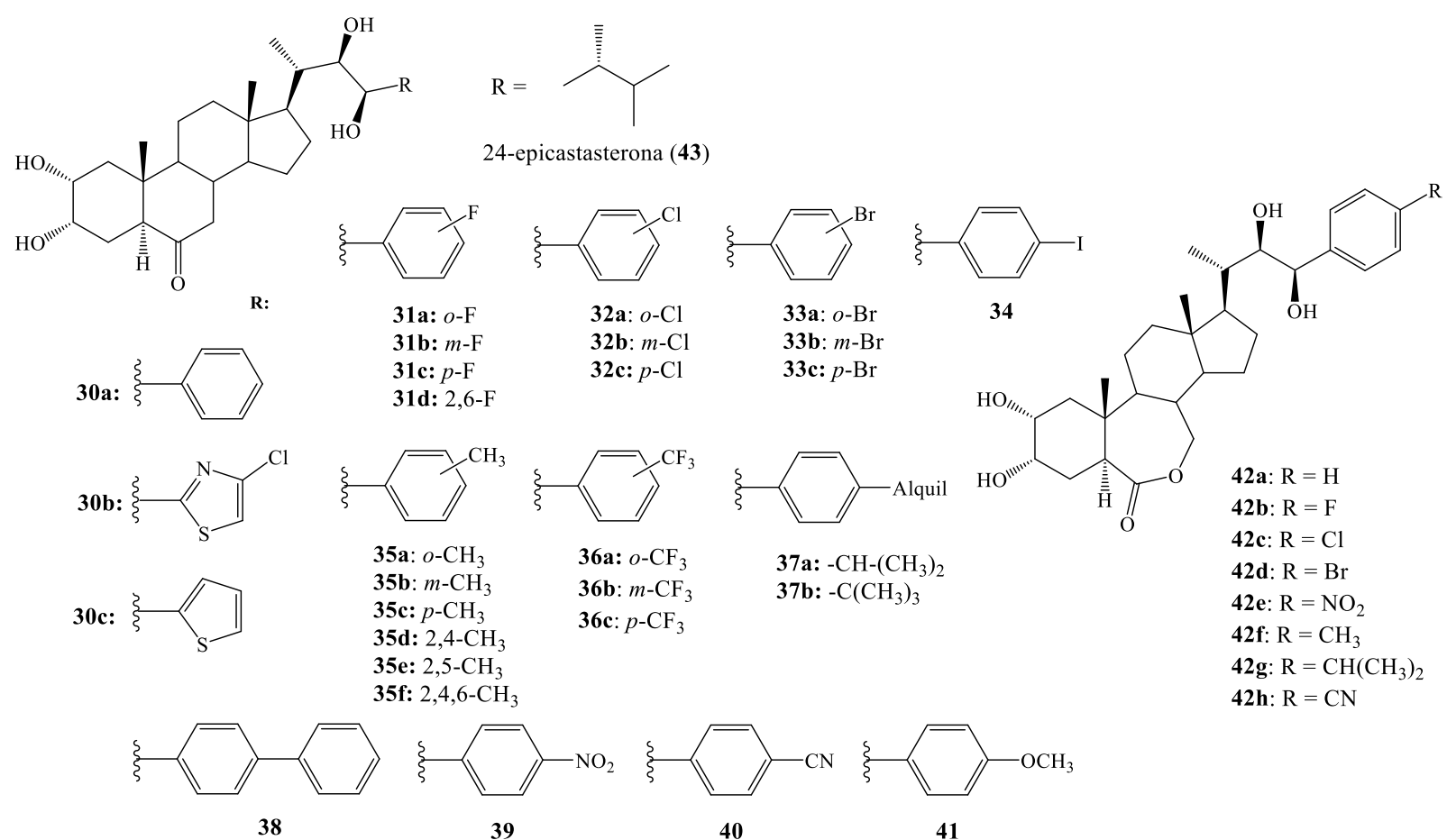


Figura 1.15: Análogos de Brasiñoesteroides con sustituyentes aromáticos en la cadena lateral (arilbrasiñoesteroides).

Otro interesante trabajo reportó la síntesis de los nuevos análogos benzoilados en la cadena lateral **44a**, **44b** y **45** (Figura 1.16). Estos análogos fueron obtenidos desde ácido hiodeoxicólico (**15**) y evaluados en el Ensayo ILA. Donde los análogos **44a-b** mostraron actividad biológica comparable con la Brasinólida (**1**) en el rango de concentraciones de 1×10^{-6} ; 1×10^{-7} y 1×10^{-8} M, mientras que el análogo dibenzoilado **45**, mostró una importante disminución de la actividad biológica, en los mismos rangos de concentraciones aplicadas (Carvajal et al, 2018, Espinoza et al, 2019, Conde-González et al, 2020).

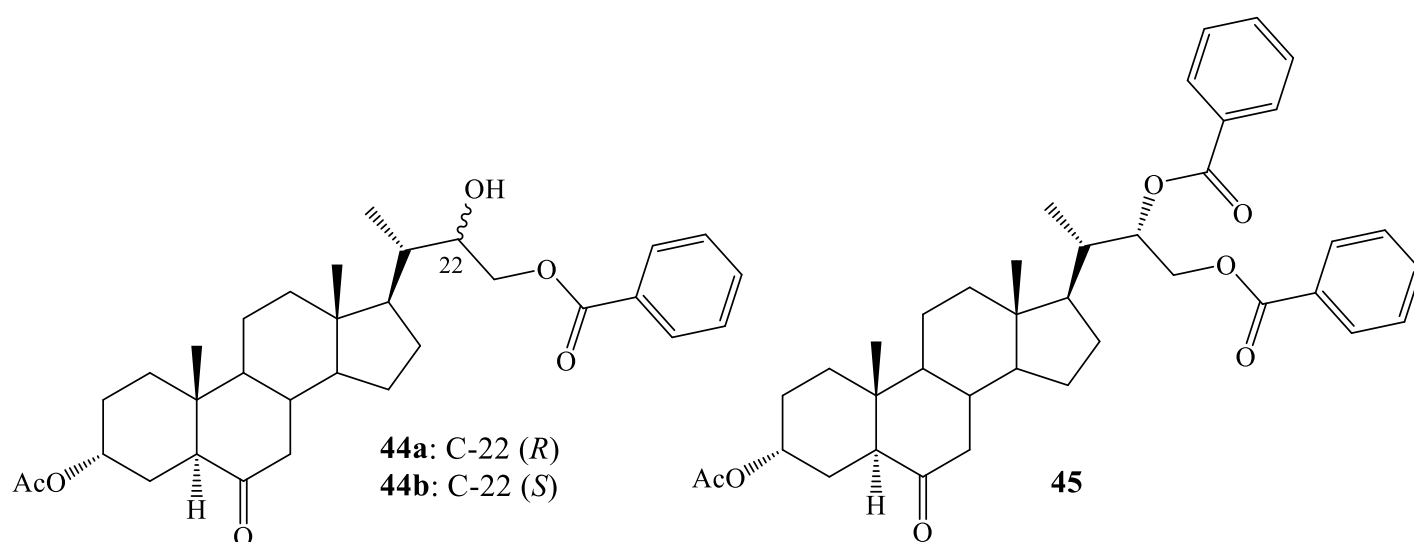


Figura 1.16: Análogos de Brasiñoesteroides benzoilados en C-22 (**44a-b**) y dibenzoilado en C-22 y C-23 (**45**).

Considerando la interesante actividad biológica mostrada por los análogos benzoilados **44a-b**, y el efecto que podría tener un grupo sustituyente en el anillo aromático, como en las estructuras de los análogos **31a**, **32b** y **33a**, (Figura 1.15), en este trabajo se plantea la síntesis química de nuevos análogos de BRs del tipo 24-Nor-colanos, los cuales tendrán en sus estructuras, tres de los cuatro requisitos estructurales de los BRs naturales y sus análogos, como lo son:

- 1) grupo 3 α acetoxi en el anillo A,
- 2) fusión de anillos A/B de tipo trans, y
- 3) función cetona y/o lactona en el anillo B.

Adicionalmente los grupos benzoatos en la posición C-23 de la cadena lateral estarán sustituidos en posición 4 con átomos de naturaleza atractor de electrones, como los indicados en la Figura 1.17. Estos análogos serán preparados a escala de laboratorio usando una ruta sintética que considera nueve etapas a partir de ácido hiodeoxicólico (**15**). Estos nuevos análogos de BRs serán aplicados en sistemas de cultivo hidropónico de tomate con el objetivo de evaluar su potencial incremento en el rendimiento. Adicionalmente, se busca realizar un análisis de mercado para los nuevos análogos de BRs, determinando si existe demanda en la agroindustria y si su producción para comercialización es factible.

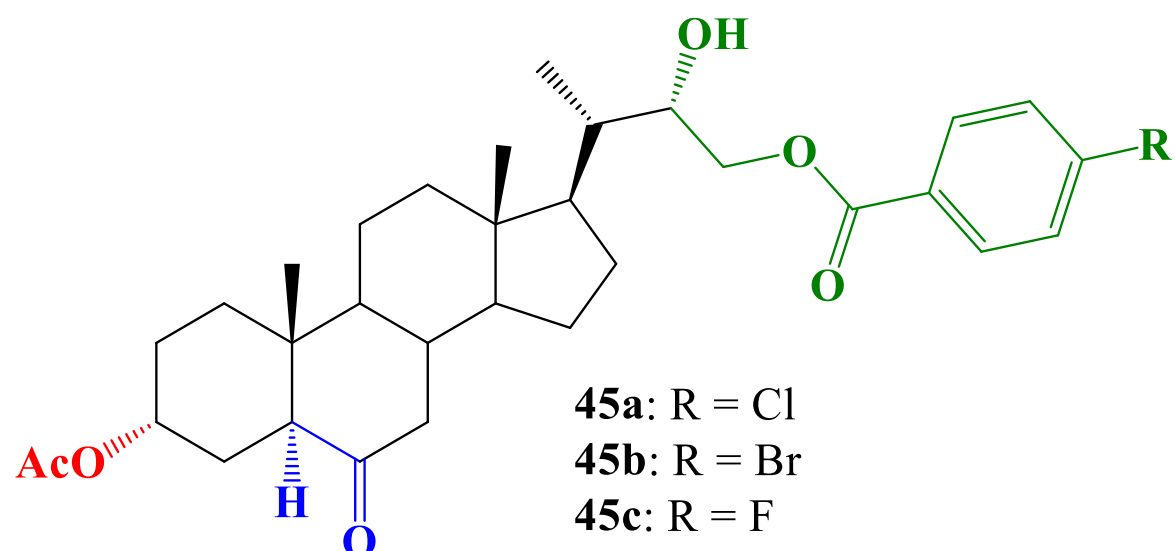


Figura 1.17: Estructuras de nuevos análogos de Brasinoesteroides propuestos del tipo 24-Norcolanos con 3 α -acetoxi-5 α -6-oxo y funcionalizados en carbono C-23 con grupos benzoatos 4-sustituidos.

HIPOTESIS.

- En función de los antecedentes bibliográficos expuestos, nuevos análogos de BRs funcionalizados en Carbono C-23 con grupos benzoatos sustituidos con átomos atractores de electrones (halógenos) en posición 4, incrementarán el rendimiento de *Lycopersicum esculentum*, cuando son aplicados en forma exógena en sistemas de cultivos hidropónicos. Los resultados obtenidos permitirán el diseño potencial de promotores de crecimiento más potentes que puedan usarse en la industria agroquímica.

OBJETIVOS.

Objetivos generales.

Sintetizar nuevos análogos de Brasinoesteroides del tipo 24-Nor-colanos con 3 α -Acetoxi-5 α -6-oxo funcionalizados en carbono C-23 de la cadena lateral con grupos benzoatos, que promuevan el rendimiento vegetal en sistema de cultivos hidropónicos.

Realizar análisis de proyección de mercado para los análogos de BRs que resulten activos.

Objetivos específicos.

- ✓ Sintetizar nuevos análogos de Brasinoesteroides del tipo 24-Nor-colanos con 3 α -Acetoxi-5 α -6-oxo funcionalizados en carbono C-23 con grupos benzoatos, a partir de ácido hiodeoxicólico (**15**), estandarizando una ruta de síntesis.
- ✓ Caracterizar e identificar todos los compuestos obtenidos usando técnicas espectroscópicas de IR, RMN y EMAR.
- ✓ Evaluar la actividad biológica de los compuestos obtenidos a partir de bioensayos estándar de la Inclinação de la lámina de arroz (ILA).
- ✓ Evaluar el efecto de los nuevos análogos de BRs sobre el rendimiento de *Lycopersicum esculentum* en sistemas de cultivo hidropónico.
- ✓ Realizar un estudio de mercado para los estimulantes de desarrollo vegetal que permita determinar la proyección de los nuevos análogos de BRs en la industria agrícola.

Capítulo 2: Metodología Y Procedimiento Experimental.

2.1. Metodología síntesis química.

Para la obtención de los nuevos análogos de BRs **45a-c**, se desarrollará la ruta de síntesis indicada en la figura 2.1, de acuerdo con lo reportado previamente (Carvajal et al, 2018) y se utilizará ácido hiodeoxicólico (**15**) como sustrato de partida. Este sustrato tiene las funciones orgánicas requeridas para modificaciones químicas necesarias para la obtención de los nuevos análogos **45a-c**. Además, este sustrato es comercial y de costo relativamente bajo (AK Scientific, 2023).

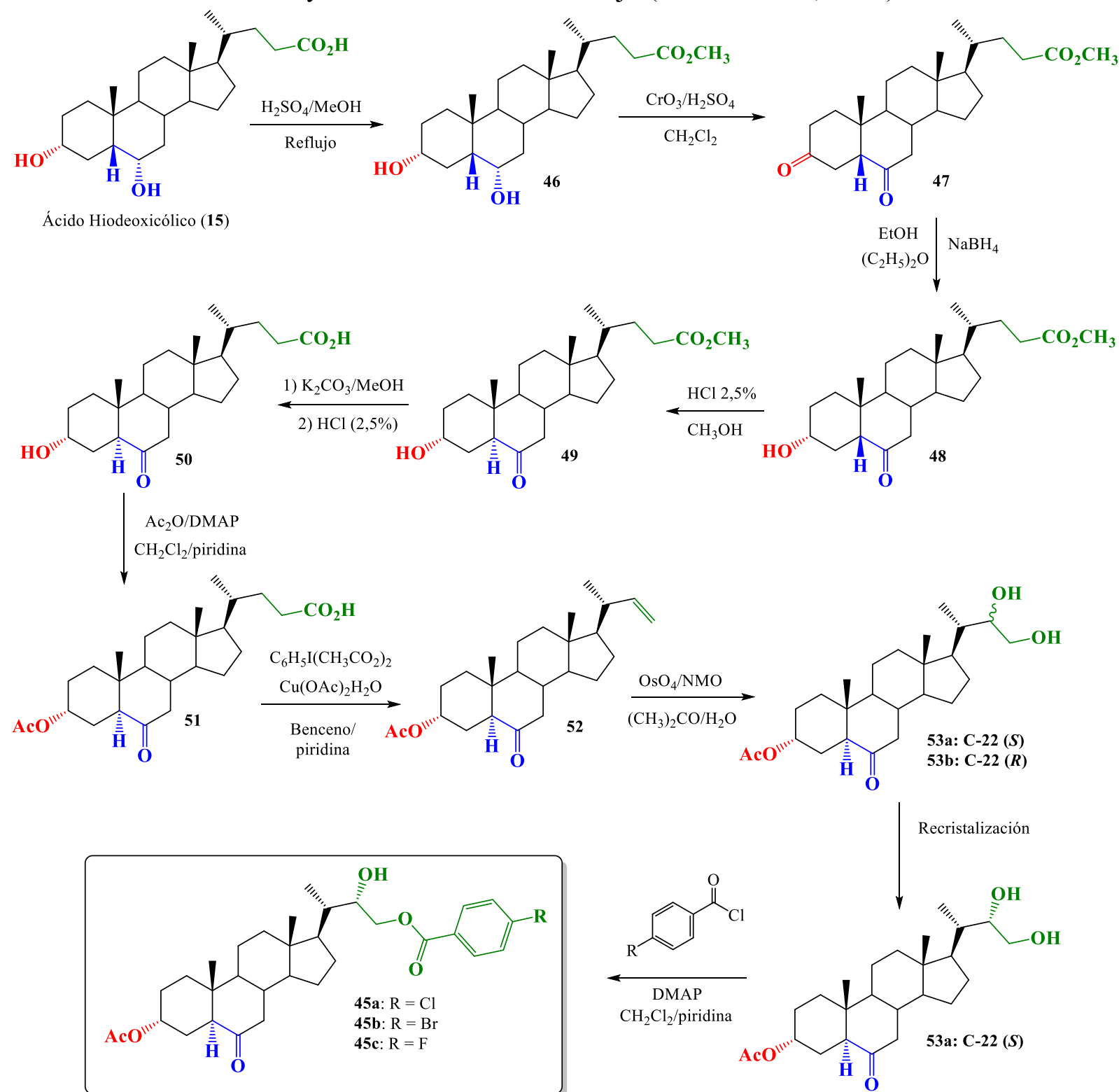


Figura 18: Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los nuevos análogos de BRs **45a-c**.

Por esterificación de Fischer con el sistema $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$, se obtendrá el derivado metilado **46** en forma cuantitativa (Espinoza et al, 2002), que se prepara principalmente para cambiar las propiedades polares y ácido-base del ácido hiodeoxicólico (**15**) y de esta forma mejorar los procedimientos de extracción y purificación. Posteriormente por medio de oxidación de Jones ($\text{CrO}_3/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) del derivado metilado **46**, producirá la dicetona **47** (Zhou, 1989). Posteriormente, reducción regio-estereoselectiva de **47** con NaBH_4 , producirá el derivado **48** según fue informado anteriormente para un análogo con similar estructura (Huang et al, 1994).

La reacción de isomerización de **48** a **49**, es un paso clave en la ruta de síntesis, dado que como requisito estructural se necesita fusión de anillos A/B de tipo trans para lograr mayor actividad

biológica. Esta isomerización puede conseguirse fácilmente por tratamiento de **48** en medio ácido con HCl 2,5% en metanol (Tian et al, 1984). Adicionalmente otros derivados similarmente estructurales de **48** fueron isomerizados por este método con rendimientos de reacción por sobre el 90% (Zhou et al, 1988, Zhou et al, 1985, Zhou et al, 1992, Huang et al, 1994). Saponificación de **49** con el sistema K_2CO_3/CH_3OH y posterior acidificación con HCl 2,5% producirá el ácido carboxílico **50** (Carvajal et al, 2018). Acetilación estándar ($Ac_2O/DMAP$) de **50** permitirá la obtención del derivado acetilado **51** (Carvajal et al, 2018).

La degradación oxidativa de la cadena lateral para transformar **51** en derivados del tipo 24-nor, de tal forma que el alqueno **52** puede realizarse por reacción de ácidos carboxílicos con los sistemas $Pb(OAc)_4/Cu(OAc)_2$ o $PhI(OAc)_2/Cu(OAc)_2$, como se ha reportado para la obtención de otros ácidos biliares con estructuras similares (Vaidya, 1968, Tian et al, 1984, Cortés et al, 2002, Carvajal et al, 2018, Espinoza et al, 2019, Soto et al, 2020, Ferrer et al, 2021). El paso siguiente consiste en la reacción de dihidroxilación de Upjohn del alqueno **52**, aun cuando algunos autores han reportado que la adición electrofílica al doble enlace en la posición C-22 con OsO_4 (Ishiguro et al, 1975), produce una mezcla de diasterómeros en C-22, donde predomina el epímero con configuración (*S*) en C-22 (Tian et al, 1984, Carvajal et al, 2018, Espinoza et al, 2019, Soto et al, 2020, Ferrer et al, 2021). Finalmente, la reacción de benzoilación selectiva en la posición C-23 se realizará de acuerdo con método reportado (Carvajal et al, 2018).

Todos los compuestos obtenidos serán purificados por técnicas de Cromatografía en Columna y/o recristalización, según corresponda. Compuestos intermedios y productos finales serán caracterizados por propiedades físicas (punto de fusión) y completamente por técnicas espectroscópicas de IR, RMN en 1D ^1H , ^{13}C y DEPT-135 y 2D ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HBQC. Adicionalmente, los nuevos análogos de BRs serán caracterizados por técnica de Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR).

2.2. Materiales e insumos síntesis química.

2.2.1. Solventes.

Los solventes utilizados fueron adquiridos desde Sigma-Aldrich, Merck y Fluka A.G. en grado analítico (p.a.)

Solventes de grado técnico purificados por destilación y posterior secado con sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$) o sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

- Acetato de etilo, $CH_3COOC_2H_5$, Merck (EMSURE) (destilación a 77° C).
- Benceno, C_6H_6 , Merck, (EMSURE).
- Cloroformo deuterado 99,96 atom % D, $CDCl_3$, Sigma-Aldrich.
- Cloroformo, $CHCl_3$, Merck (EMSURE).
- Diclorometano, CH_2Cl_2 , Merck (EMSURE) (destilación a 40° C).
- Éter dietílico, $(C_2H_5)_2O$, Merck (EMSURE).
- Éter de petróleo, MTEDIA.
- Hexano, $CH_3(CH_2)_4CH_3$, Merck (EMSURE) (destilación entre 60° a 80° C).
- Metanol, CH_3OH , Merck (EMSURE).
- Metanol deuterado 99,8 atom % D, CD_3OD , Sigma-Aldrich.

2.2.2. Insumos.

- Bicarbonato de sodio, $NaHCO_3$, Merck.
- Bisulfato de potasio, $KHSO_4$, Sigma-Aldrich.
- Bromuro de potasio, KBr , Merck (EMSURE).

- Cloruro de sodio, NaCl, Merck (EMSURE).
- Cromatoplasmas de sílicagel 60 F254 Merck.
- Papel filtro 125 mm, Filtros Anioia S. A.
- Papel pH, Prolabo.
- Sílicagel para cromatografía en columna (0,040-0,063 mm), Merck.
- Sílicagel 60 para cromatografía en columna (0,063-0,200mm) Merck.
- Sodio, 99,9%, Na, Sigma-Aldrich.
- Tiosulfato de sodio pentahidratado, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Analar.

2.2.3. *Reactivos.*

- Acetato de cobre II monohidratado, 98%, $\text{Cu}(\text{AcO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich.
- (Diacetoxiiodo)benzeno $\text{C}_6\text{H}_5\text{I}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$, 98%, Merck.
- Ácido hioideoxicólico p.a, 98%, $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$, AK Scientific, Inc.
- Ácido sulfúrico, 98%, 1,84 g/mL, H_2SO_4 , Merck (EMSURE).
- Ácido clorhídrico, p.a, 37%, 1,19 g/mL, HCl, Merck (EMSURE).
- Borohidruro de sodio p.a. 98%, MERCK
- Óxido crómico p.a., 2,7 g/mL, 99%, ALFA AESAR
- 4-N, N-dimetil amino piridina p.a., Merck
- Anhídrido acético p.a. 1,08 g/mL, 97%, Sigma-Aldrich.
- Ácido acético glacial p.a., 100%, Merck
- Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 , Sigma-Aldrich.
- Carbonato de potasio, 99%, K_2CO_3 , Sigma-Aldrich.
- Cloruro de benzoilo, PhCOCl , 99%, Sigma-Aldrich.
- Cloruro de 4-cloro benzoato 4-ClPhCOCl , 99%, Sigma-Aldrich.
- Cloruro de 4-bromo benzoato 4-BrPhCOCl , 99%, Sigma-Aldrich.
- Cloruro de 4-fluoro benzoato 4-FPhCOCl , 99%, Sigma-Aldrich.
- Piridina, anhidra 99,8%, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, Sigma-Aldrich.
- Solución reveladora H_2SO_4 10% v/v.
- Tetraóxido de osmio, 98%, OsO_4 , Sigma-Aldrich.
- 4-(dimetilamino)piridina, (DMAP), $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$, Alfa-Aesar.

2.2.4. *Cromatografía en capa fina.*

Se utilizaron placas cromatográficas de Sílicagel Merck 60F 254. Fueron eluidas con mezclas de acetato de etilo y hexano en proporciones adecuadas para cada muestra. Los cromatogramas se revelaron en luz ultravioleta (UV 365 nm) y por inmersión de la placa con una solución acuosa de ácido sulfúrico al 10%, con posterior calcinación sobre una placa calefactora.

2.2.5. *Cromatografía en columna.*

Se realizaron con Sílica gel Merck 60 (0,032-0,063 mm) o Sílicagel 60 Merck (0,063-0,2 mm). Los eluyentes fueron mezclas de acetato de etilo y hexano aplicadas en diferentes gradientes de polaridad y se indican en cada caso.

2.2.6. *Instrumentos y Equipos.*

Puntos de Fusión (PF): Los puntos de fusión fueron medidos en un instrumento StuartTM melting point apparatus SMP3. El cual posee bloque de calefacción que se acomoda en 3 tubos capilares. Para el control de temperatura cuenta con sensores Pt100. La calefacción es programable, contiene calentamiento rápido a 10°C/min a unos pocos grados del punto de fusión esperado y también cuenta con velocidades de rampa más lentas.

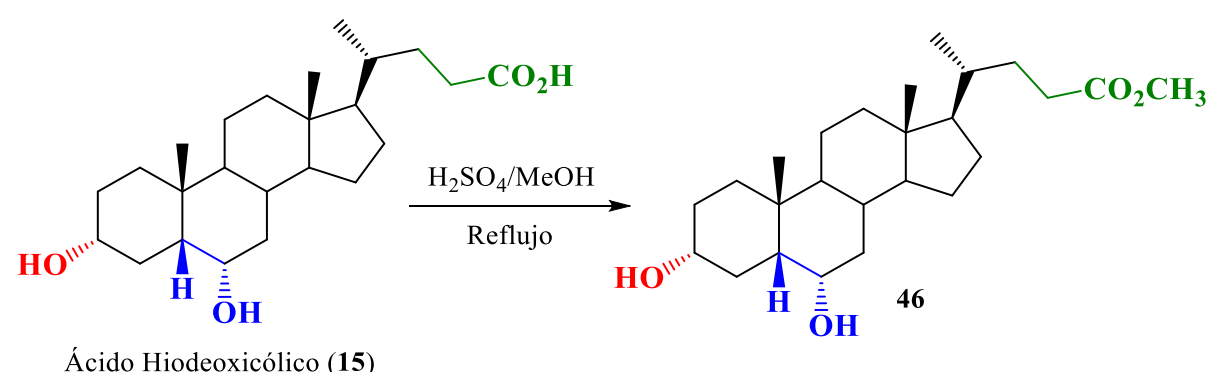
Espectros de infrarrojo (IR): Los espectros IR fueron registrados en un espectrómetro Thermo® Nicolet 6700 (Massachusetts, USA) y se medirán en discos de bromuro de potasio (KBr). Las frecuencias de absorción serán expresadas en número de onda (cm^{-1}).

Espectro de Masa de Alta Resolución (EMAR ESI o HRMS ESI): Los espectros de masas de alta resolución (EMAR ESI o HRMS-ESI) se registraron en un espectrómetro Bruker Daltonik (Alemania). El análisis de los productos de reacción se realizó con los siguientes parámetros relevantes: temperatura seca, 180°C ; Nebulizador 0,4 Bar; Gas seco, 4 L/min; y voltaje de pulverización, 4,5 kV en modo positivo. Las mediciones de masa precisas se realizaron con un poder de resolución de: 140.000 FWHM en el rango m/z 50-1300.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN): Los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC serán registrados en un espectrómetro digital Bruker Avance Neo 400 (Rheinstetten, Germany). Las mediciones serán llevadas a cabo utilizando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3) o metanol deuterado (CD_3OD) al 99,8%. Los desplazamientos químicos (δ) serán expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento J en Hertz (Hz). Como referencia se utilizará el desplazamiento químico de las señales residuales para los espectros de ^1H : $\delta\text{CDCl}_3 = 7,24$ ppm, $\delta\text{CD}_3\text{OD}(1) = 3,31$ ppm, $\delta\text{CD}_3\text{OD}(2) = 4,78$ ppm; y las señales residuales para los espectros de ^{13}C : $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm y $\delta\text{CD}_3\text{OD} = 49,2$ ppm, respectivamente.

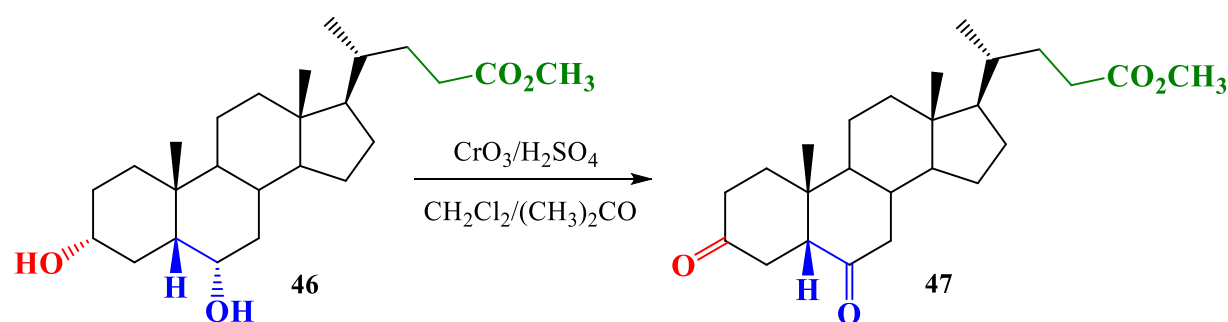
2.3. Parte experimental Síntesis química.

2.3.1. Síntesis de 3 α , 6 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (46).



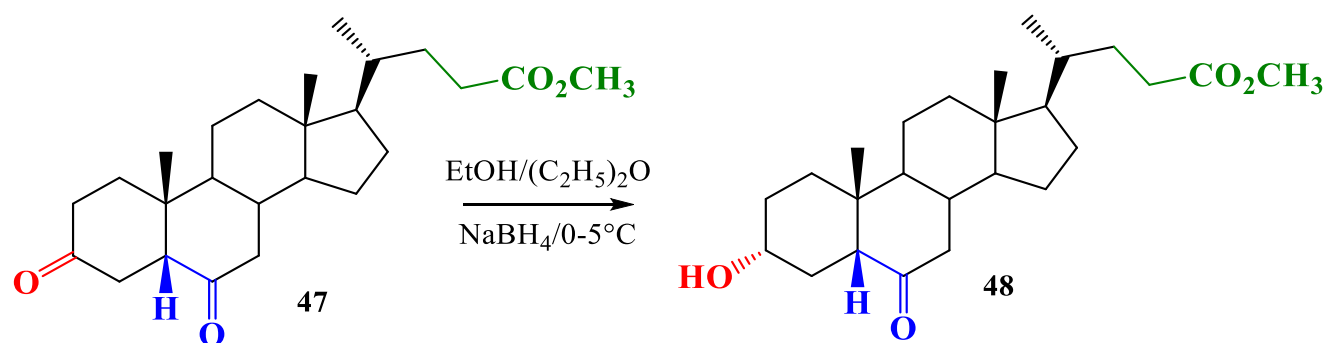
En un balón de dos bocas de 500 [mL] con una barra de agitación magnética (ovoide), se disolvieron 20,00 [g] (50,945 [mmol]) de ácido hiodeoxicólico (**15**) (PM 392,58 [g/mol]) en 150 [ml] de CH_3OH . Luego, se le agregaron 2 [ml] de H_2SO_4 98% p/p y se mantuvo a reflujo a 80°C con trampa Dean-Stark por 1,5 horas (usando 4 gramos de MgSO_4 Anhidro como desecante). Se trabajó en duplicados. El término de la reacción se monitoreó por C.C.F. 80% acetato/hexano. Finalizada la reacción, se concentró en rotavapor y se lavó en embudo de separación con 200 ml de agua destilada y 2 x 100 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución al 5 % de NaHCO_3 para remover restos de ácido y posteriormente se secó con Na_2SO_4 anhidro. Finalmente, el solvente se evaporó a sequedad en rotavapor y se obtuvieron 40,8 [g] del compuesto **46**, con un rendimiento de 98,5%. Sólido incoloro (pf = $60-65^{\circ}\text{C}$). IR (cm^{-1}): 3385 (O-H); 2938 (C- CH_3); 2858 (C- CH_2 -C); 1743 (C=O); 1452 (CH_2); 1376 (CH_3); 1169 (C-O). ^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 4,05 (ddd, $J = 11,9$; 4,8 y 4,8 Hz, 1H, H-6); 3,66 (s, 3H, CH_3O); 3,62 (m, 1H, H-3); 2,35 (ddd, $J = 15,0$; 10,1 y 5,1 Hz, 1H, H-23); 2,21 (ddd, $J = 15,0$; 9,6 y 6,6 y Hz, 1H, H-23); 0,91 (d, $J = 5,1$ Hz, 3H, H-21); 0,90 (s, 3H, H-19); 0,63 (s, 3H, H-18). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 174,71 (C24); 71,48 (C3); 67,98 (C6); 56,14 (C17); 55,89 (C14); 51,48 (CH_3O); 48,40 (C5); 42,80 (C13); 39,92 (C12); 39,81 (C9); 35,90 (C10); 35,56 (C1); 35,32 (C20); 34,86 (C4); 34,79 (C8); 31,02 (C23); 30,91 (C22); 30,11 (C7); 29,20 (C2); 28,10 (C15); 24,17 (C16); 23,48 (C19); 20,72 (C11); 18,21 (C21); 11,98 (C18).

2.3.2. Síntesis de 3,6-dioxo-5 β -colan-24-oato de metilo (47).



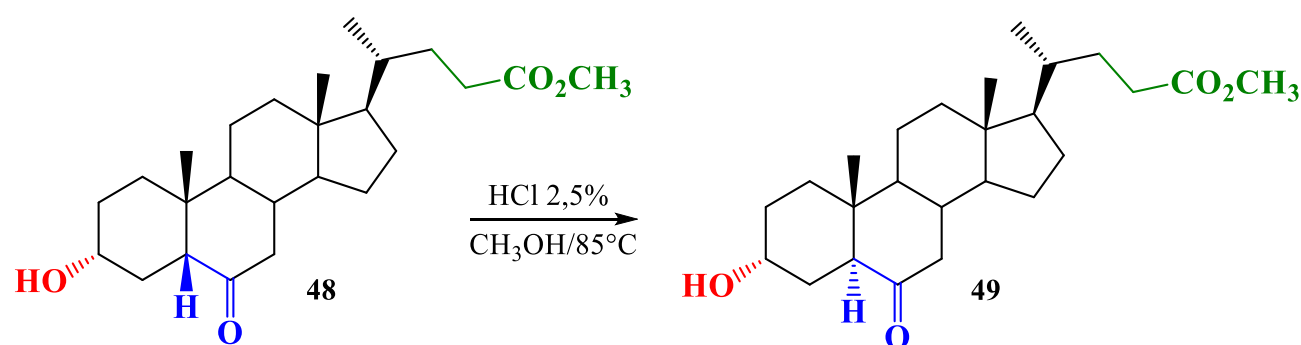
Se disolvieron 10,0 [g] (24,594 [mmol]) del compuesto **46** (PM 406,61 [g/mol]) en 20 [ml] de CH_2Cl_2 y 180 [ml] de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (ambos secos), en agitación constante a temperatura ambiente. Se agregó gota a gota 25 [ml] de reactivo de Jones (66,75 [g] de CrO_3 , 57,5 [ml] H_2SO_4 , aforando a 250 [ml] con H_2O), y se mantuvo en agitación durante 1 hora. Se trabajó en duplicados. El término de la reacción se monitoreó por C.C.F. Finalizada la reacción se agregaron 5 [mL] de CH_3OH a la reacción. El producto se rotavaporó para eliminar solventes y se lavó tres veces con diclorometano (separación de fases puede durar varias horas). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró. El producto se diluyó con 3 - 5 [mL] de CH_2Cl_2 y se mezcló con sílica gel fina (0,032 – 0,063 [mm]) para ser separado por C.C. isocrática, utilizando una mezcla al 50% de acetato de etilo/hexano. Se obtuvieron 15,9 [g] del compuesto **47**, con un rendimiento de 80,3%. Sólido incoloro (pf = 106-107°C). IR (cm^{-1}): 2947 (C- CH_3), 2874 (C- CH_3), 1743 (C=O), 1717 (C=O), 1689 (C=O), 1469 (CH_2), 1383 (CH_3), 1164 (C-O). ^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 3,64 (s, 3H, CH_3O); 2,63 (dd, $J = 14,7$ y $13,4$ Hz, 1H, H-12); 0,93 (s, 3H, H-19); 0,91 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, H-21); 0,67 (s, 3H, H-18). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 210,75 (C6); 208,58 (C3); 174,50 (C24); 59,67 (C5); 56,70 (C17); 55,74 (C14); 51,44 (CH_3O); 43,02 (C13); 42,08 (C7); 40,83 (C9); 39,83 (C4); 39,41 (C12); 38,22 (C10); 36,42 (C2); 39,41 (C12); 35,71 (C1); 35,19 (C20); 30,95 (C23); 30,80 (C22); 27,88 (C15); 23,85 (C16); 22,40 (C19); 21,23 (C11); 18,18 (C21); 11,92 (C18).

2.3.3. Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (48).



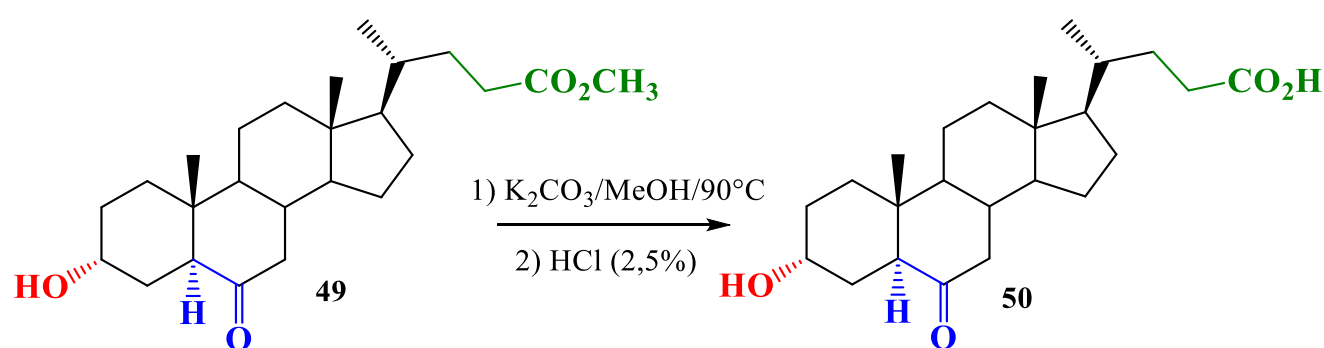
Se disolvieron 12,6 [g] (31,299 [mmol]) del compuesto **47** (PM 402,57 [g/mol]) en 300 [ml] de etanol seco y 50 [ml] de éter dietílico, bajo condiciones de baño refrigerante de acetona-hielo-sal (<5°C) y con agitación magnética muy suave. Se agregaron lentamente 0,395 [g] (10,44 [mmol]) de NaBH_4 (PM 37,83) (1/4 de reactivo cada 15 minutos) y con agitación suave. El avance y término de la reacción se monitoreó por medio de C.C.F. Para finalizar la reacción, se agregaron 100 [ml] de acetona y 25 [ml] de HCl 2,5 %), luego se eliminó todo el etanol en rotavapor. Se obtuvieron 12,09 [g] del producto **48**, equivalentes a un 95,5% de rendimiento. Sólido incoloro (pf = 95-100°C). IR (cm^{-1}): 3301 (O-H), 2943 (C- CH_3), 2867 (C- CH_2 -C), 2849 (C- CH_2 -C), 2828 (CH_3O), 1740 (C=O), 1709 (C=O), 1436 (CH_2), 1326 (CH_3), 1171 (C-O). ^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 3,66 (s, 3H, CH_3O); 3,62 (m, 1H, H-3); 2,33 (ddd, $J = 15,2$; 10,0 y 5,0 Hz, 1H, H-23); 0,92 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-21); 0,83 (s, 3H, H-19); 0,64 (s, 3H, H-18). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 213,88 (C6); 174,67 (C24); 70,15 (C3); 59,40 (C5); 56,82 (C17); 55,79 (C14); 51,52 (CH_3O); 43,09 (C13); 42,91 (C12); 39,99 (C10); 39,60 (C9); 37,97 (C7); 37,06 (C8); 35,28 (C20); 34,86 (C2); 34,37 (C1); 31,05 (C23); 30,90 (C22); 29,85 (C4); 27,98 (C15); 23,96 (C16); 23,16 (C19); 20,83 (C11); 18,23 (C21); 11,96 (C18).

2.3.4. Síntesis de 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oato de metilo (49).



Se disolvieron 4,5 [g] (11,12 [mmol]) del compuesto **48** (PM 404,59 [g/mol]) en una solución de 300 [mL] 2,5% v/v HCl en CH₃OH, manteniendo en agitación constante y a temperatura elevada a reflujo (85°C), durante 3 horas. El término de la reacción se determinó por C.C.F. Se agregaron 100 [mL] de acetato de etilo a la mezcla para arrastrar el CH₃OH, lo cual permitió reducir el volumen de la solución en rotavapor y una vez que se eliminó todo el metanol, se agregaron 50 [mL] de acetato de etilo y agua destilada (dos veces) para obtener la fase orgánica. Esta fase se lavó con solución al 5% de NaHCO₃ (150 [mL]) y se secó con Na₂SO₄ anhidro, y luego se evaporó la totalidad del solvente en rotavapor. El producto se diluyó en CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica gel fina (0,032 – 0,063 [mm]) para ser finalmente separado por C.C. en polaridad creciente con mezcla acetato-hexano de 5% a 70%. Se obtuvieron 3,7 [g] del compuesto **49** isomerizado, con un 82,2% de rendimiento. Sólido incoloro (pf = 128-132°C). IR (cm⁻¹): 3302 (O-H), 2943 (C-CH₃), 2867 (C-CH₂-C), 2849 (C-CH₂-C), 2828 (CH₃O), 1740 (C=O), 1709 (C=O), 1436 (CH₂), 1375 (CH₃), 1257 (C-O), 1172 (C-O). ¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,16 (m, 1H, H-3); 3,66 (s, 3H, CH₃O); 2,70 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H-5); 2,33 (ddd, J = 15,5; 10,3 y 5,3 Hz, 1H, H-23); 0,91 (d, J = 6,4 Hz, 3H, H-21); 0,72 (s, 3H, H-19); 0,65 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 212,70 (C6); 174,67 (C24); 65,41 (C3); 56,73 (C17); 55,71 (C14); 53,77 (C9); 51,65 (C5); 51,50 (CH₃O); 46,83 (C7); 42,89 (C13); 41,53 (C10); 39,45 (C12); 37,94 (C8); 35,29 (C20); 31,65 (C1); 31,03 (C23); 30,89 (C22); 28,16 (C2); 27,90 (C4); 27,67 (C15); 23,88 (C16); 21,03 (C11); 18,21 (C21); 12,29 (C19); 12,00 (C18).

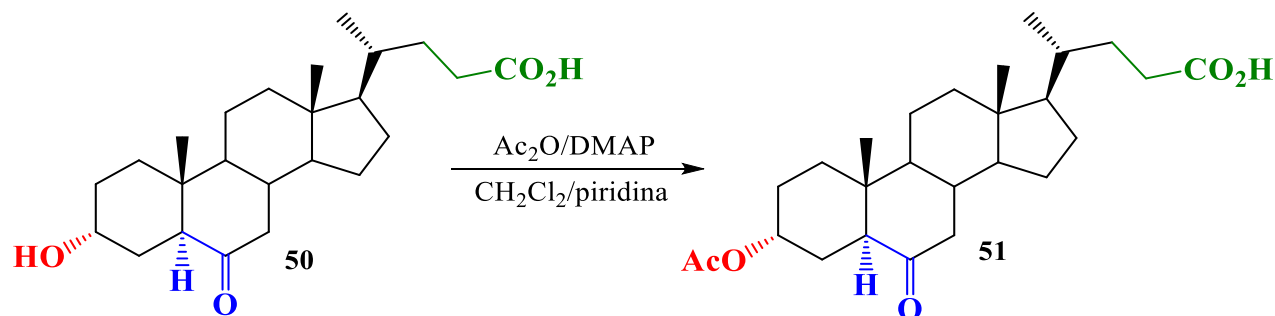
2.3.5. Síntesis de ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (50).



Se disolvieron 5,0 [g] (12,36 [mmol]) del compuesto **49** (PM 404,59 [g/mol]) en 100 [mL] de CH₃OH. Se agregaron 20 [mL] de una solución de K₂CO₃ al 15 % p/v, manteniendo la reacción en agitación bajo condiciones de reflujo constante (90°C). El término de la reacción se monitoreó por C.C.F. (1 hora). La solución se concentró en rotavapor hasta 1/3 del volumen inicial y luego se acidificó con solución de HCl 5 M y un poco de agua destilada, hasta obtener un pH entre 2-3. La muestra se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 [mL]) y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó todo el solvente en rotavapor. Se obtuvieron 3,98 [g] del compuesto **50** con un 82,4% de rendimiento. Sólido incoloro (pf = 102-107°C). IR (cm⁻¹): 3403-2500 (O-H); 2945 (CH₃); 2869 (CH₂); 1712 (C=O); 1689 (C=O); 1442 (CH₂); 1380 (CH₃). ¹H RMN (CD₃OD) δ (ppm): 4,04 (m, 1H, H-3); 2,75 (t, J = 8,1 Hz, 1H, H-5); 2,31 (ddd, J = 15,2; 9,9 y 5,3 Hz, 1H, H-23); 0,96 (d, J = 6,5 Hz, 3H, H-21); 0,730 (s, 3H, H-19); 0,710 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CD₃OD) δ (ppm): 215,65 (C6); 178,19 (C24); 66,01 (C3); 57,89 (C17); 57,18 (C14); 55,03 (C9); 52,83 (C5); 47,59 (C7); 44,16 (C13); 43,71 (C10); 40,78 (C12); 39,41 (C8); 36,60 (C20); 32,87 (C1); 32,24

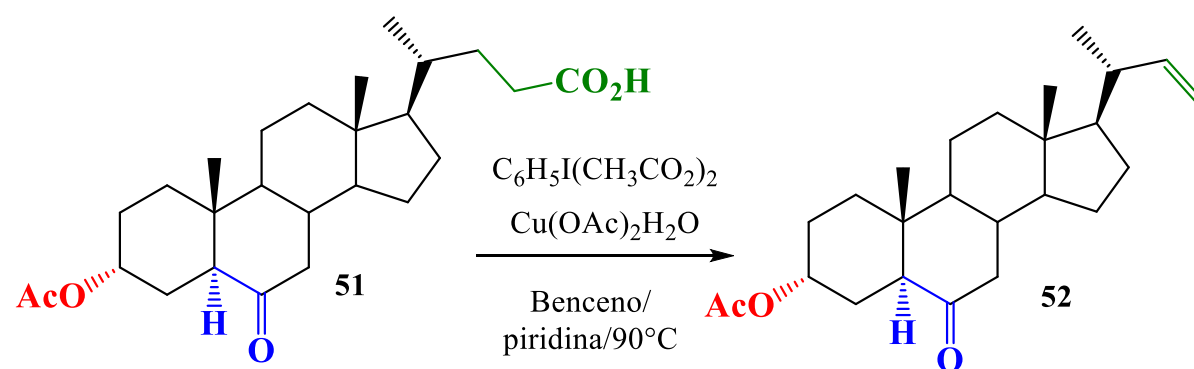
(C23); 32,01 (C22); 28,96 (C2); 28,70 (C4); 28,42 (C15); 24,92 (C16); 22,17 (C11); 12,68 (C19); 12,41 (C18); 18,72 (C21).

2.3.6. Síntesis de ácido 3 α -acetoxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (51).



Se disolvieron 5,0 [g] (12,80 [mmol]) del compuesto **50** (PM 390,56 [g/mol]) en 100 [ml] de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente y con agitación constante. Se agregaron 0,156 [g] (10% en moles del compuesto **50**) de DMAP, 2,5 [mL] de anhídrido acético (100% exceso) y 4 [ml] de piridina. El término de la reacción se monitoreó por C.C.F. (a las 21 h de tiempo de reacción, se alcanzó equilibrio). Una vez finalizada, se lavó con solución acuosa de HCl a pH = 2 (2 x 25 [mL]), fase acuosa se extrajo con diclorometano y se agregaron 2 gotas de HCl 37% para aumentar acidez (pH 3), esta se extrajo por última vez con acetato de etilo para eliminar turbidez de fase acuosa. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el solvente se removió por rotavapor. El producto se diluyó en 3 [mL] de CH₂Cl₂ y se mezcló con sílica gel fina (0,032 – 0,063 [mm]). Finalmente se purificó por C.C., utilizando una mezcla de acetato de etilo-hexano en polaridad creciente desde 0% a 70%. Se obtuvieron 3,66 [g] del compuesto **51** con un 66,1 % de rendimiento. Sólido incoloro (pf = 171-177°C). IR (cm⁻¹): 3373-2495 (O-H); 2947 (CH₃); 2869 (CH₂); 1736 (C=O); 1708 (C=O); 1444 (CH₂); 1376 (CH₃). ¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 5,12 (m, 1H, H-3); 2,56 (dd, J = 12,0 y 3,3 Hz, 1H, H-5); 2,38 (ddd, J = 15,4; 10,3 y 5,4 Hz, 1H, H-23); 2,03 (s, 3H, CH₃CO); 0,94 (d, J = 6,4 Hz, 3H, H-21); 0,74 (s, 3H, H-19); 0,67 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 211,84 (C6); 179,20 (C24); 170,33 (CH₃CO); 68,85 (C3); 56,75 (C17); 55,76 (C14); 53,72 (C9); 52,56 (C5); 46,73 (C7); 43,07 (C13); 41,24 (C10); 39,47 (C12); 37,93 (C8); 35,25 (C20); 32,36 (C1); 30,83 (C23); 30,65 (C22); 27,88 (C2); 25,28 (C4); 25,00 (C15); 23,87 (C16); 21,41 (CH₃CO); 21,09 (C11); 18,17 (C21); 12,40 (C19); 12,01 (C18).

2.3.7. Síntesis de 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-22-en-6-ona (52).



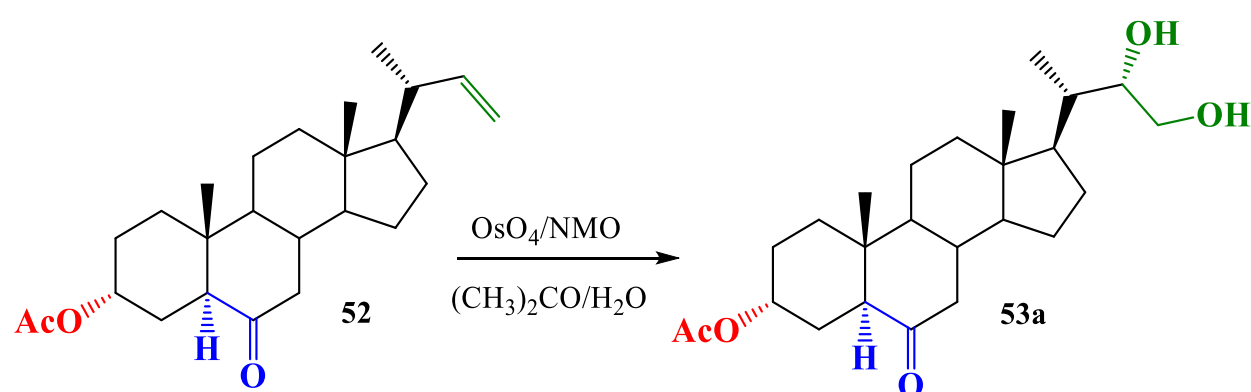
Se disolvieron 3,30 [g] (7,62 [mmol]) del compuesto **51** (432,6 [g/mol]) en 165 [ml] de benceno (secado mediante destilación sobre KOH). Se agregaron 1,65 [ml] de piridina (al inicio de la reacción), 0,38 [g] de acetato de cobre pentahidratado y 4,9 [g] de yodobenceno diacetato, ambos en dos porciones según se describe a continuación:

- Al inicio de la reacción se agregaron 0,191 [g] de acetato de cobre
- Tras una hora de reflujo se agregaron los 0,191 [g] de acetato de cobre restantes y 2,45 [g] de yodobenceno diacetato.
- Tras dos horas de reflujo se agrega la última porción de 2,45 [g] de yodobenceno diacetato.

La reacción se mantuvo en reflujo a 90°C con trampa de vapor. El avance de la reacción se monitoreó por C.C.F. (4 h). Una vez finalizada la reacción se eliminó la totalidad del solvente por

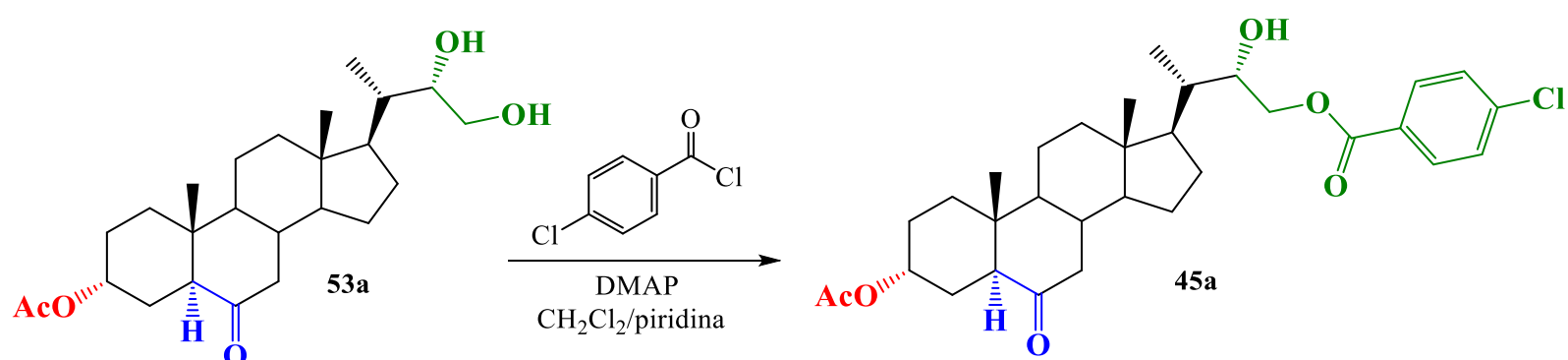
rotavapor, y se lavó el producto con una solución acuosa de HCl pH 2 y acetato de etilo en partes iguales. La fase acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. El crudo se diluyó en diclorometano, se mezcló con sílica gel fina (0,032 – 0,063 [mm]) y finalmente se separó por C.C., utilizando una mezcla de acetato de etilo-hexano de etilo en polaridad creciente, desde 0% a 50%. Se obtuvieron 0,79 [g] del producto **52**, con un rendimiento final del 26,8 %. Sólido incoloro (pf = 111-117°C). IR (cm⁻¹): 3074 (CH=CH₂); 2944; 2908 y 2870 (C-H), 1736 (C=O); 1711 (C=O); 1637 (C=C); 1461 (CH₂); 1380 (CH₃); 1243 (C-O); 1030 (C-O); 908 (CH=CH₂); 756 (CH=CH₂). ¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 5,66 (ddd, *J* = 17,0; 10,2 y 8,4 Hz, 1H, H-22); 5,12 (m, 1H, H-3); 4,93 (dd, *J* = 17,0 y 1,8 Hz, 1H, H_{trans}-23); 4,83 (dd, *J* = 10,2 y 1,8 Hz, 1H, H_{cis}-23); 2,56 (dd, *J* = 12,1 y 3,2 Hz, 1H, H-5); 2,31 (dd, *J* = 13,1 y 4,5 Hz, 1H, H-7α); 2,04 (s, 3H, CH₃CO); 1,04 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, H-21); 0,748 (s, 3H, H-19); 0,694 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 211,81 (C6); 170,26 (CH₃CO); 144,89 (C22); 111,84 (C23); 68,85 (C3); 56,80 (C17); 55,41 (C14); 53,79 (C9); 52,58 (C5); 46,75 (C7); 42,94 (C13); 41,28 (C10); 41,10 (C20); 39,36 (C12); 37,92 (C8); 32,38 (C1); 28,19 (C2); 25,27 (C4); 25,01 (C15); 23,91 (C16); 21,41 (CH₃CO); 21,06 (C11); 20,04 (C21); 12,41 (C19); 12,18 (C18).

2.3.8. Síntesis de 3α-acetoxi-24-nor-5α-colan-22(S)-23-dihidroxi-6-ona (**53a**).



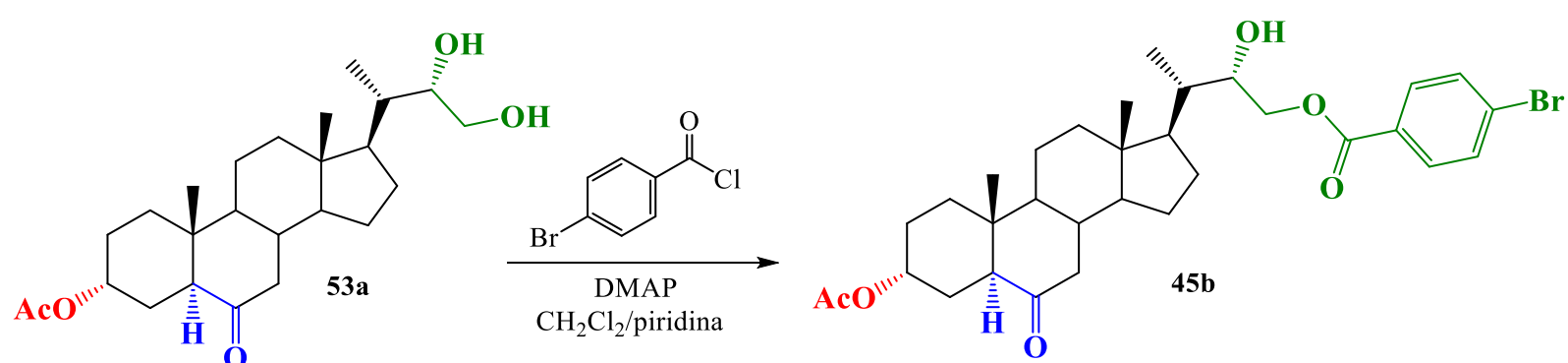
Se disolvieron 1,2 [g] (3,10 [mmol]) de compuesto **52** (PM 386,58 [g/mol]) en 100 [mL] de acetona, se añadieron 0,69 [g] *N*-metilmorfolina *N*-óxido (NMO) en dos porciones. Luego de la primera porción, la mezcla se homogenizó mediante agitación magnética y se agregaron 2,4 [mL] de tetraóxido de Osmio 4% (OsO₄) gota a gota y se mantuvo con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. El término de la reacción se determinó por C.C.F. Una vez finalizada la reacción se eliminó el solvente, hasta 25 [mL] de volumen aproximado y se agregaron 25 [mL] de acetato de etilo y 2 x 25 [mL] de solución saturada de Na₂S₂O₃·5H₂O. Finalmente, la fase orgánica se lavó con agua (50 [mL]), se secó con Na₂SO₄, se filtró por gravedad y el disolvente se eliminó en rotavapor. El producto se purificó por cristalización disolviendo con acetona en caliente y agregando hexano (aproximadamente un 20% del volumen total). Se obtuvieron 0,973 [g] del compuesto **53a** con un rendimiento del 74,53%. Sólido incoloro (pf = 250,1-253,8 °C). IR (cm⁻¹): 3389 (O-H), 2943 (C-CH₃), 2868 (C-CH₃), 1739 (C=O), 1705 (C=O), 1463 (CH₂), 1379 (CH₃). ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 5,11 (m, 1H, H-3); 3,79 (dt, *J* = 9,6 y 3,6 Hz, 1H, H-22); 3,64 (dd, *J* = 10,8 y 3,6 Hz, 1H, H-23a); 3,51 (dd, *J* = 10,8 y 9,6 Hz, 1H, H-23b); 2,55 (dd, *J* = 12,1 y 3,2 Hz, 1H, H-5); 2,31 (dd, *J* = 13,1 y 4,5 Hz, 1H, H-7α); 2,03 (s, 3H, CH₃CO); 0,954 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, H-21); 0,735 (s, 3H, H-19); 0,675 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 211,75 (C6); 170,30 (CH₃CO); 73,81 (C22); 68,82 (C3); 62,46 (C23); 56,33 (C17); 53,70 (C14), 52,80 (C9); 52,56 (C5); 46,68 (C7); 43,35 (C13); 41,22 (C10); 40,02 (C20); 39,37 (C12); 37,89 (C8); 32,34 (C1); 27,35 (C2); 25,22 (C4); 24,97 (C15); 24,01 (C16); 21,40 (CH₃CO); 21,03 (C11); 13,02 (C21); 12,38 (C19); 11,72 (C18).

2.3.9. Síntesis de (22*S*)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-cloro) benzoato (45a).



Se disolvieron 300 [mg] (0,71 [mmol]) del compuesto **53a** en 20 [ml] de diclorometano, se agregaron 0,6 [ml] de piridina, 3 [mg] de DMAP y 0,11 [ml] de cloruro de 4-cloro benzoilo (4-ClPhCOCl; 0,783 [mmol]) con agitación lenta a temperatura ambiente. El final de la reacción se verificó mediante C.C.F. (2 horas). Después, el solvente se eliminó por rotavapor, se añadieron 20 [ml] de acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de HCl a pH 2 una vez y con agua destilada (2 x 10 [ml]). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor. El producto crudo se disolvió en 5 [mL] de diclorometano, se filtró para separar precipitado (ácido 4-clorobenzóico) y luego se purificó mediante de C.C. isocrática en gel de sílice con mezcla de acetato de etilo/hexano al 40%. Después, se purificó la fracción con producto por cristalización (cinco veces), disolviendo con acetato de etilo en caliente y agregando hexano (aproximadamente 10 % del volumen total). Finalmente, se purifica el precipitado mediante C.C. en gel de sílice con mezcla de acetato de etilo/hexano en polaridad creciente, desde 0% a 55%, obteniéndose 40,1 [mg] del compuesto **45a**, con un rendimiento del 10,1 %. El compuesto **45a** se obtuvo como un sólido incoloro (pf = 170,5-171,4°C). IR (cm⁻¹): 3503 (O-H); 2967 (C-CH₃); 2950 (C-CH₂); 2870 (C-CH); 1736 (C=O); 1716 (C=O); 1690 (C=O); 1596 (C=C Ar); 1384 (CH₃); 1276 (C-O); 1070 (C-O); 850-726 (=C-H Ar). ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,98 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-2'); 7,42 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-3'); 5,11 (t.a, J = 2,7 Hz, 1H, H-3); 4,47 (dd, J = 11,7 y 2,0 Hz, 1H, H-23a); 4,18 (dd, J = 11,7 y 9,4 Hz, 1H, H-23b); 4,06-4,02 (m, 1H, H-22); 2,56 (dd, J = 12,5 y 3,3 Hz, 1H, H-5); 2,30 (dd, J = 13,0 y 4,5 Hz, 1H, H-7 α); 2,03 (s, 3H, CH₃CO); 1,04 (d, J = 6,9 Hz, 3H, H-21); 0,734 (s, 3H, H-19); 0,693 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 211,67 (C6); 170,28 (CH₃CO); 166,12 (COAr); 139,66 (C4'); 131,00 (C2'); 128,77 (C3'); 128,27 (C1'); 71,62 (C22); 68,78 (C3); 66,55 (C23); 56,35 (C17); 53,64 (C14); 52,85 (C9); 52,53 (C5); 46,63 (C7); 43,36 (C13); 41,20 (C10); 40,41 (C20); 39,35 (C12); 37,86 (C8); 32,31 (C1); 27,38 (C2); 25,20 (C4); 24,95 (C15); 23,97 (C16); 21,39 (CH₃CO); 21,00 (C11); 12,85 (C21); 12,36 (C19); 11,77 (C18). HRMS-ESI (modo positivo): m/z calculado para C₃₂H₄₃ClO₆: 576,3086 [M + NH₄]⁺; encontrado 576,3083 [M + NH₄]⁺.

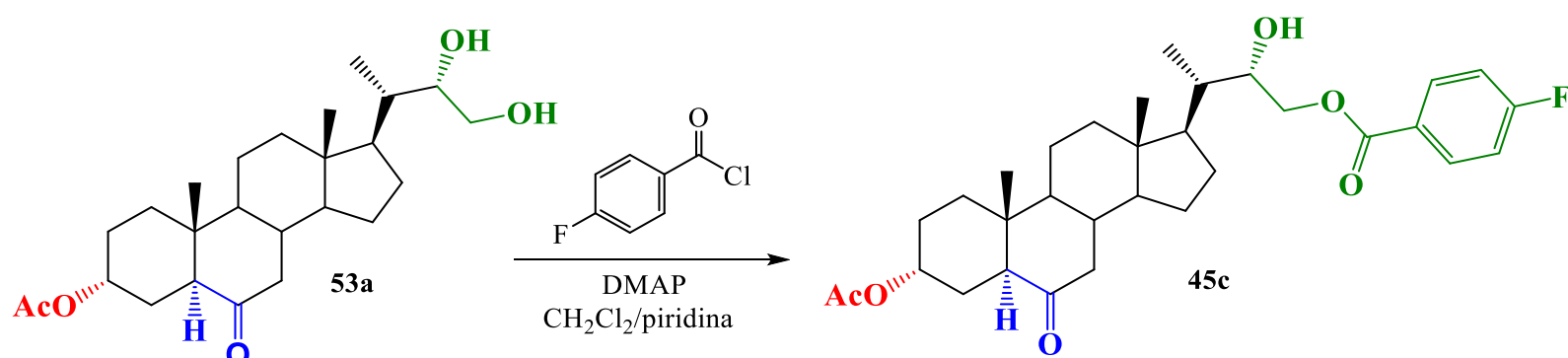
2.3.10. Síntesis de (22*S*)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-bromo) benzoato (45b).



Se disolvieron 336,5 [mg] (0,8 [mmol]) del compuesto **53a** en 25 [ml] de diclorometano, se agregaron 0,7 [ml] de piridina, 3,37 [mg] de DMAP y 0,21 [g] de cloruro de 4-bromo benzoilo (4-BrPhCOCl; 0,96 [mmol]) con agitación lenta a temperatura ambiente. El final de la reacción se

verificó mediante C.C.F. (a las 24 horas se llegó al equilibrio). Después, el solvente se eliminó por rotavapor, se añadieron 20 [ml] de acetato de etilo y se lavó con solución acuosa de HCl a pH = 2 una vez y con agua destilada (2 x 10 [ml]). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor. El crudo se disolvió en 5 [mL] de diclorometano, se filtró para separar precipitado (ácido 4-bromobenzoico) y luego se purificó mediante C.C. isocrática en gel de sílice con mezcla de acetato de etilo/hexano al 40% obteniéndose 88,2 [mg] del compuesto **45b**, con un rendimiento del 18,3%. El compuesto **45b** se obtuvo como un sólido incoloro (pf = 151,3-152,0 °C). IR (cm⁻¹): 3461 (O-H); 2945 (C-CH₃); 2892 (C-CH₂); 2868 (C-CH); 1713 (C=O); 1590 (C=C Ar); 1376 (CH₃); 1271 (C-O); 1012 (C-O); 849-731 (=C-H Ar). ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,94 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H-2'); 7,63 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H-3'); 5,15 (t.a, *J* = 2,6 Hz, 1H, H-3); 4,51 (dd, *J* = 11,5 y 1,8 Hz, 1H, H-23a); 4,22 (dd, *J* = 11,5 y 9,1 Hz, H-23b); 4,08-4,02 (m, 1H, H-22); 2,60 (dd, *J* = 12,3 y 3,2 Hz, 1H, H-5); 2,35 (dd, *J* = 13,2 y 4,5 Hz, 1H, H-7α); 2,07 (s, 3H, CH₃CO); 1,08 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, H-21); 0,775 (s, 3H, H-19); 0,733 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 211,65 (C6); 170,29 (CH₃CO); 166,29 (COAr); 131,81 (C3'); 131,15 (C2'); 128,74 (C1'); 128,39 (C4'); 71,69 (C22); 68,79 (C3); 66,61 (C23); 56,38 (C17); 53,68 (C14); 52,88 (C9); 52,56 (C5); 46,67 (C7); 43,40 (C13); 41,22 (C10); 40,42 (C20); 39,38 (C12); 37,88 (C8); 32,34 (C1); 27,40 (C2); 25,23 (C4); 24,98 (C15); 24,00 (C16); 21,42 (CH₃CO); 21,03 (C11); 12,87 (C21); 12,39 (C19); 11,80 (C18). HRMS-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C₃₂H₄₃BrO₆: 622,267 [M + NH₄]⁺; encontrado 622,2565 [M + NH₄]⁺.

2.3.11. Síntesis de (22*S*)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5α-colan-3,23-diilo-3α-acetato-23-(4-fluoro) benzoato (**45c**).



Se disolvieron 200 [mg] (0,48 [mmol]) del compuesto **53a** (420,59 [mmol]) en 10 [ml] de diclorometano, se agregaron 0,4 [ml] de piridina, 2 [mg] de DMAP y 0,1 [ml] de cloruro de 4-fluoro benzoilo (4-FPhCOCl; 0,85 [mmol]) con agitación lenta a temperatura ambiente. El final de la reacción se verificó mediante C.C.F. (4 horas). Después, el solvente se eliminó en rotavapor, se añadieron 20 [ml] de acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de HCl a pH 2 una vez y con agua destilada (2 x 10 [ml]). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor. El crudo se disolvió en diclorometano 5 [mL] y se purificó mediante C.C. en gel de sílice con mezclas de acetato de etilo/hexano en polaridad creciente, desde 0% a 50%. Después, se purificó la fracción con producto por cristalización, disolviendo con acetato de etilo en caliente y agregando hexano (aproximadamente 10 % del volumen total) obteniéndose 59,7 [mg] del compuesto (**8**), con un rendimiento del 23,1%. El compuesto **45c** se obtuvo como un sólido incoloro (pf = 183,0-184,9 °C). IR (cm⁻¹): 3502 (O-H); 2950 (C-CH₃); 2894 (C-CH₂); 2869 (C-CH); 1731 (C=O); 1713 (C=O); 1692 (C=O); 1601 (C=C Ar); 1380 (CH₃); 1410 (C-F); 1276 (C-O); 1071 (C-O); 856-604 (=C-H Ar). ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,07 (dd, *J* = 8,7 y 5,4 Hz, 2H, H-2'); 7,13 (t, *J* = 8,7 Hz, 2H, H-3'); 5,12 (s.a, 1H, H-3); 4,48 (dd, *J* = 11,6 y 1,5 Hz, 1H, H-23a); 4,19 (dd, *J* = 11,6 y 9,4 Hz, 1H, H-23b); 4,08-4,02 (m, 1H, H-22); 2,75 (dd, *J* = 12,3 y 2,9 Hz, 1H, H-7α); 2,04 (s, 3H, CH₃CO); 1,05 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, H-21); 0,756 (s, 3H, H-19); 7,05 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 211,66 (C6); 170,29 (CH₃CO); 166,05 (COAr); 165,91 (d, ¹*J*_{CF} = 254,0 Hz, C4'); 132,2 (d, ³*J*_{CF} = 9,4 Hz, C-2'); 126,08 (d, ⁴*J*_{CF} = 2,9 Hz, C1'); 114,63 (d, ²*J*_{CF} = 21,9 Hz, C3'); 71,75 (C22); 68,79 (C3); 66,49 (C23); 56,39 (C17); 53,68 (C14); 52,88 (C9); 52,56

(C5); 46,67 (C7); 43,40 (C13); 41,22 (C10); 40,39 (C20); 39,39 (C12); 37,88 (C8); 32,34 (C1); 27,40 (C2); 25,24 (C4); 24,99 (C15); 24,00 (C16); 21,42 (CH₃CO); 21,03 (C11); 12,88 (C21); 12,39 (C19); 11,80 (C18). HRMS-ESI (modo positivo): m/z calculado para C₃₂H₄₃FO₆: 560,3382 [M + NH₄]⁺; encontrado 560,3375 [M + NH₄]⁺.

2.4. Materiales e insumos componente biológica.

2.4.1. Solventes y soluciones.

- Agua destilada estéril.
- DMSO, (CH₃)₂SO, 99,7%, Sigma-Aldrich.
- Alcohol etílico, C₂H₆O, Merck (EMSURE).
- NH₄OH 1 N/Acetona 80%, 10%.
- Acetona/Agua 80%.

2.4.2. Controles y medios.

- Brasinólida (1), APE x BIO technology.
- Solución nutritiva Hidro A+B, Top Grow, Cocina y Jardín SPA.

2.4.3. Instrumentos y equipos.

- Centrifuga Variseal TM VSC-127, Vulcon Technologies.
- Espectrofotómetro ThermoFisher scientific, Multiskan Go, 1510.
- Balanza granataria Revel.
- Balanza analítica OHAUS Corporation PX224, USA.
- Medidor de pH BANTE instruments, PHS-25CW.
- Medidor de conductividad eléctrica HANNA instruments.
- Bomba sumergible.
- Kit cámara de cultivo hidropónico.
- Cámara de crecimiento BIOBASE, BJPX-A450.
- Lupa LEICA, EZ4HD.
- Agitador magnético Thermo scientific, CIENTEC.
- Gabinete de bioseguridad NUARE, LABGARD clase II, NU-425-400E.

2.5. Evaluación actividad componente biológica.

2.5.1. Ensayo de inclinación de la lámina de arroz.

Los estudios de evaluación de la actividad de promoción de crecimiento vegetal de los nuevos análogos de BRs se llevaron a cabo bajo la dirección de la Dra. Katy Díaz Peralta, en el Laboratorio de Pruebas Biológicas, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

El método consiste en sembrar semillas de arroz, *Oryza sativa* variedad Zafiro (facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-La Platina), dada su alta sensibilidad a los Brasinólidos y análogos de BRs, y su facilidad de manejo en bioensayos (altura de las plántulas), las cuales luego de ser lavadas y remojadas en agua destilada estéril durante 24 h, se cultivaron en macetas (2 sustrato+ 1perlita+1vermiculita), en el interior de una cámara de

crecimiento bajo condiciones controladas de fotoperiodo, 16 h día / 8 h noche, a 22°C con 50-60% de humedad relativa. Cuando las plántulas de arroz se encuentren etioladas y uniformes se extraen pequeños segmentos de hoja que consisten en la lámina de la segunda hoja y la segunda lámina de articulación y vaina (5 cm), los cuales son sumergidos en una cantidad definida de la muestra (análogo de Brasinoesteroide) a distintas concentraciones (1×10^{-8} - 1×10^{-6}). Posteriormente a la incubación por 72 horas a 25°C en oscuridad, se mide la magnitud del ángulo formado entre la hoja y la vaina con un transportador, pudiéndose obtener la correlación entre el ángulo de los segmentos de hoja y la concentración de muestra utilizada. Se utilizó la Brasinólida (1) como control positivo, adquirido desde APE x BIO Technology. El control negativo solo contenía agua destilada. Las imágenes son tomadas con una cámara incorporada en la Lupa estereoscopia Leica EZ4HD. Los resultados fueron expresados como el promedio del ángulo medido ($^{\circ}$) $\pm$ su desviación estándar (SD) desde 10 muestras por tratamiento (Díaz et al, 2020).

2.5.2. Evaluación de efecto de BRs bioactivos sobre el rendimiento de *Lycopersicum esculentum* en sistema de cultivo hidropónico.

Para este experimento se utilizó un kit de cultivo hidropónico (longitud: 410 mm, ancho: 275 mm, alto: 140 mm. Diámetro de agujeros: 35 mm) por tratamiento. Cada cámara contenía 7 litros de capacidad de solución nutritiva, en la que se disponen 12 plántulas de tomate de tal forma que sus raíces quedaron completamente sumergidas en el interior del canastillo. Previamente, las semillas fueron sembradas en un semillero (Figura 2.2) colocando 3 semillas por cada surco, a una profundidad de 0,5 cm.



Figura 19: Semillero utilizado para la germinación de las semillas de tomate. a) preparación del semillero esterilizado con tres semillas por cada surco. b) semillas germinadas tras un periodo de una semana.

Se cubrió el semillero para generar una cámara de humedad constante y así las semillas puedan acelerar el proceso de germinación. Las semillas se mantuvieron en la cámara de crecimiento por una semana hasta que las plántulas tuvieran 1 par de hojas para ser

trasplantadas a cada canastillo de la cámara de cultivo hidropónico. Por cada canastillo se colocó una sola planta sostenida por medio de una esponja del mismo diámetro (Figura 2.3)



Figura 20: Cámaras de cultivo hidropónico para evaluar los análogos de BRs.

Se recomienda modificar el medio de soporte de las plantas en las cámaras de cultivo hidropónico, por uno más poroso que permita retirar sin problemas las raíces para facilitar manipulación al momento de tomar mediciones.

A cada cámara de tratamiento se incorpora la solución Nutritiva (Top Grow, Cocina y Jardín SPA, Chile), cuyas características se muestran en la tabla 2.1 (mezcla de soluciones madres A y B) según recomendación del fabricante, a la cual se le adicionó una concentración finita igual a 1×10^{-8} M de cada uno de los análogos de BRs a evaluar. La solución se oxigena de forma continua mediante la agitación que genera una bomba sumergible de caudal fijo que se encuentra bajo la solución nutritiva. El pH óptimo para mantener el cultivo es de 5,5-6,5 para que los nutrientes estén disponibles para la planta.

Tabla 2.1: Resumen de nutrientes y propiedades de la solución nutritiva a utilizar en experimento de hidroponía.

Propiedades solución nutritiva A+B	
Concentración de nutrientes (ppm)	
Nitrógeno (N)	161
Fósforo (F)	36
Potasio (K)	193
Calcio (Ca)	182
Magnesio (Mg)	32
Azufre (S)	26
Hierro (Fe)	1,5
Manganeso (Mn)	0,5
Boro (B)	0,5
Zinc (Zn)	0,15
Cobre (Cu)	0,1
Molibdeno (Mb)	0,05
Concentración metales pesados (ppm)	
Arsénico (As)	1,77
Plomo (Pb)	4,48
Cadmio (Cd)	0,95
Mercurio (Hg)	0,5
Otras propiedades	
Conductividad eléctrica en agua destilada (mS/cm)	1,11
pH	7

Preparación de solución madre: se disolvió el contenido de la sal A en 3 L de agua esterilizada tibia (60° C), luego se aforó hasta 5 L. Se repitió el paso anterior para la solución B (Figura 2.4). El contenido total de ambas sales es de 1,430 kg.



Figura 21: Soluciones Nutritivas Stock A y B (Hidro A+B, Top Grow, Cocina y Jardín SPA, Chile).

Preparación solución nutritiva final: Se disolvieron 35 mL de la solución madre A y B en 5 litros de agua destilada, tras agitación, se aforó hasta completar 7 litros de solución (Figura 2.5).



Figura 22: Solución nutritiva final (A+B) preparada para cada una de las cámaras de cultivo hidropónico.

Finalmente, se ajustó el pH de la solución entre 5,5 y 6,5 utilizando los reguladores de pH incluidos en el producto (Top Down, Top Grow, Cocina y Jardín SPA, Chile).

Se considera un control negativo, el cual solo posee la solución nutritiva, y el control positivo con **1** a la misma concentración evaluada. Los tratamientos se disponen en una cámara de crecimiento de plantas (Figura 2.6) bajo condiciones controladas de temperatura 22°C y humedad relativa 50% por un periodo de 30 días.



Figura 23: Visualización de los distintos Tratamientos de Análogos de BRs y sus respectivos controles sobre *Lycopersicum esculentum* en cultivo hidropónico, bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento de cultivo vegetal.

Se considera un periodo de adaptación de 7 días, que incluye reemplazo de plántulas inviables para asegurar el mayor número de plantas al final del experimento. Tras ello, se renueva la solución nutritiva con características idénticas a las descritas en tabla 7 y con la misma concentración de análogos de BRs. A los 14 días del trasplante se realizó una recarga de la solución nutritiva para compensar las pérdidas por evaporación, y la consiguiente aplicación proporcional de los distintos tratamientos de BRs para mantener la concentración de prueba constante en cada sistema.

Se recomienda utilizar un soporte suficientemente resistente en la cámara de crecimiento, que sea capaz de sostener las cajas de cultivo hidropónico sin deformarse y así mantener un nivel homogéneo de la solución nutritiva para todas las plantas.

Todas las variables de crecimiento serán evaluadas posterior a los 30 días desde trasplante de las plántulas:

- Altura de las plantas que conforman cada tratamiento: Con una regla graduada se medirá desde el tallo hasta el ápice de la hoja en 4 plantas tomadas al azar de cada tratamiento.
- Número de hojas: se contabilizaron las hojas de 4 plantas tomadas al azar de cada tratamiento.
- Longitud de las hojas: Se registrará la longitud de las hojas desde el tallo hasta el ápice de la hoja, con la ayuda de una regla graduada de 4 plantas tomadas al azar de cada cámara.
- Área Foliar. Se medirá el área de 3 hojas por planta al azar. Se utilizará el software Image J para el cálculo del área foliar.
- Longitud de la raíz principal: Con una regla graduada se medirá desde el cuello hasta la cofia en 4 plantas tomadas al azar de la cámara.
- Peso seco de las plantas: Se seleccionarán 4 plantas en los respectivos tratamientos, para obtener su masa en una balanza tras ser secadas a 60°C por 100 horas.
- Peso seco de las raíces también será evaluado al final de la cosecha.

2.5.3. Análisis de clorofila y carotenos totales.

La determinación del contenido de clorofila y carotenos (junto con otras sustancias como compuestos fenólicos y flavonoides) permiten estudiar el impacto de distintos métodos de cultivo en el contenido de nutrientes de los productos, siendo esta otra variable de interés comercial además del rendimiento y velocidad de crecimiento.

La obtención de clorofila y carotenos se realiza mediante la extracción con 5 mL de solvente (NH₄OH 1 N en acetona 80%, en proporción 1:10), de las hojas frescas aplastadas con mortero. El extracto se afora hasta 10 mL con acetona 80% para ser centrifugado a 1.200 RCF x G por 20 minutos. Se recuperan 8 mL del sobrenadante y se afora hasta 10 mL con acetona al 80%, para finalmente disolver en proporción 1:4. Todo el procedimiento se realiza en oscuridad.

La muestra se analiza utilizando un equipo espectrofotómetro marca ThermoFisher scientific, modelo Multiskan Go, 1510 determinando el contenido de clorofila al medir la absorbancia entre 663 y 645 nm, mientras que el contenido de carotenos se determina midiendo la absorbancia a 470 nm. (Ahmed et al, 2021).

La concentración de cada pigmento se obtiene mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/mL)} = 12,7A_{663} - 2,69A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/mL)} = 22,9A_{645} - 4,68A_{663}$$

$$\text{Carotenos (mg/mL)} = (1000A_{470} - 1,82[\text{Clorofila } a] - 85,02[\text{Clorofila } b])/198$$

Con A_i : Absorbancia en longitud de onda i .

2.5.4. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se someterán a análisis estadístico con 4 réplicas, (3 para el caso de medición de nutrientes) utilizando el software Microsoft Excel, Microsoft 365 MSO, Windows 10. Las medias de parámetros de crecimiento y rendimiento de los dos tratamientos (diferentes análogos de BRs) serán comparados mediante la prueba de las diferencias mínimas significativas (LSD) a un nivel $p \leq 0,05$.

La siguiente tabla resume los experimentos llevados a cabo para este estudio, incluyendo el objetivo especificado asociado a cada uno de ellos:

Tabla 2 2: Resumen experimentos realizados y objetivo específico asociado.

Experimento	Objetivo específico a cumplir
Síntesis química a escala de laboratorio.	Sintetizar nuevos análogos de Brasinoesteroides del tipo 24-Nor-colanos con 3 α -Acetoxi-5 α -6-oxo funcionalizados en carbono C-23 con grupos benzoatos, a partir de ácido hiodeoxicólico (15), estandarizando una ruta de síntesis.
Ensayo de inclinación de la lámina de arroz.	Evaluar la actividad biológica de los compuestos obtenidos a partir de bioensayos estándar de la Inclinación de la lámina de arroz (ILA).
Ensayo en condiciones hidropónicas.	Evaluar el efecto de los nuevos análogos de BRs sobre el rendimiento de <i>Lycopersicum esculentum</i> en sistemas de cultivo hidropónico.

Capítulo 3: Resultados y Discusión.

3.1. Parte Química.

3.1.1 Síntesis y determinación estructural.

Esterificación de Fischer del ácido hiodeoxicólico (**15**) permitió modificar químicamente este compuesto para disminuir su polaridad produciendo el derivado metilado **46**, con esto se logró mayor facilidad de trabajo en el laboratorio, tanto en el proceso de identificación por CCF, como en la extracción y purificación. Este método se realizó según fue reportado anteriormente (Zhou, 1984, Zhou et al, 1997, Yang et al, 2014). Para ello se preparó una solución de ácido hiodeoxicólico (**15**) en CH₃OH, utilizando H₂SO₄ como catalizador. De esta forma se obtuvo el derivado metilado **46**, con un 98,5% de rendimiento. En el espectro de ¹H RMN se observó la señal del grupo CH₃O a $\delta_H = 3,66$ ppm, que fue comprobada por ¹³C RMN al observar la presencia de dos señales a $\delta_C = 174,71$ ppm (C-24, CH₃CO₂) y $\delta_C = 51,48$ ppm (CH₃O), (ver Anexo 1.A).

Posteriormente, oxidación de Jones (CrO₃/CH₃COOH/CH₂Cl₂/acetona) del compuesto **46** de acuerdo con método reportado (Zhou, 1989) produjo la dicetona **47** con un 80,3% de rendimiento. La estructura del compuesto **47**, fue confirmada principalmente por las señales observadas en el espectro de ¹³C RMN a $\delta_C = 208,58$ y $210,75$ ppm, asignadas a los carbonos C-3 y C-6 respectivamente (ver Anexo 1.B).

Reducción estereoselectiva de **47** se llevó a cabo con el sistema NaBH₄/MeOH a 5°C, según fue informada anteriormente para estructuras esteroideas similares (Huang et al, 1994, Cortés et al, 2002, Carvajal et al, 2018). La regio y estereoselectividad en la reducción puede observarse analizando el modelo molecular 3D, que indica claramente la preferencia de ataque del agente reductor en el carbono C-3 por la cara superior del grupo carbonilo en el anillo A, de tal forma de generar la función 3 α -OH, requerida para la actividad biológica. De este estudio se observó que la posición C-3 (C=O) en dicho compuesto aparentemente debe ser más reactiva que la posición C-6, por efectos estéricos asociados a interacciones 1,3-diaxiales del grupo metilo en la posición C-19, a diferencia de un posible ataque en el C-6 del anillo B (con impedimento estérico), como se muestra en la Figura 3.1. En este caso el compuesto **47** fue convertido en **48**, con un rendimiento de 95,5% y la estructura fue determinada principalmente por la señal a $\delta_H = 3,62$ ppm (m, 1H) asignada al H-3, en el espectro de ¹H RMN y las señales a $\delta_C = 213,88$ ppm (CO) asignada al C-6 y a $\delta_C = 70,15$ ppm (CHOH), asignada al C-3, en el espectro de ¹³C RMN (ver Anexo 1.C).

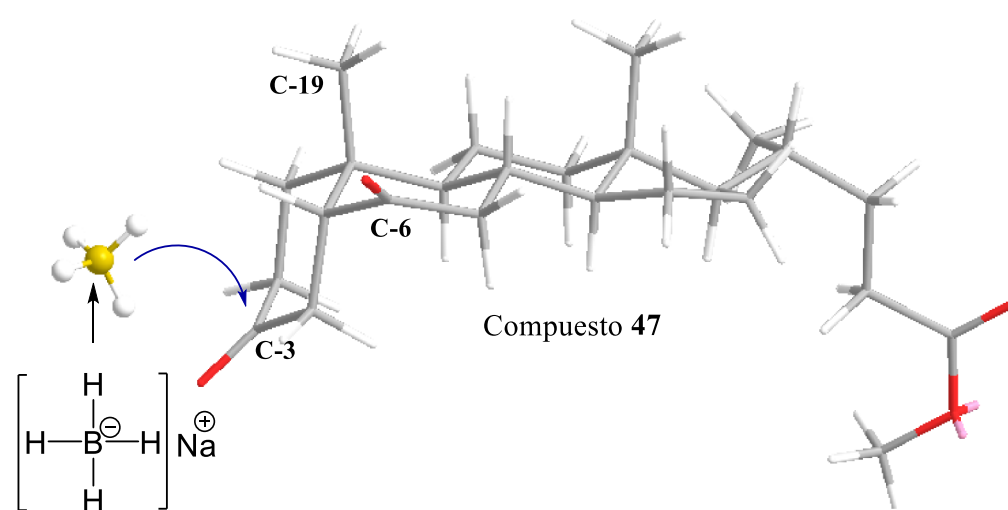


Figura 24: Estructura 3D del compuesto **47** y ataque preferencial regio y estereoselectivo del agente reductor.

El paso siguiente correspondió a uno de los más importantes desde el punto de vista estructural y conformacional. Este consistió en la reacción de isomerización del compuesto **48**, catalizada por el sistema HCl/MeOH al 2,5% (Zhou, 1984, Carvajal et al, 2018), para formar el compuesto **49**. Esta transformación es requerida, debido a que la Brasinólida (**1**) y la mayoría de sus análogos estructurales, presentan fusión de tipo “*trans*” entre los anillos A y B, que se ve reflejado en una mayor actividad de la promoción del crecimiento en plantas (Seto et al, 1998, Seto et al, 1999, Yang et al, 2014). Esta reacción de epimerización en la posición C-5 desde una orientación espacial 5β hacia 5α se favorece debido a que las fusiones *trans* de anillos A/B, son por lo general más estables que las fusiones *cis* de anillos A/B. El análisis conformacional para esta reacción de epimerización se muestra en la Figura 3.2.

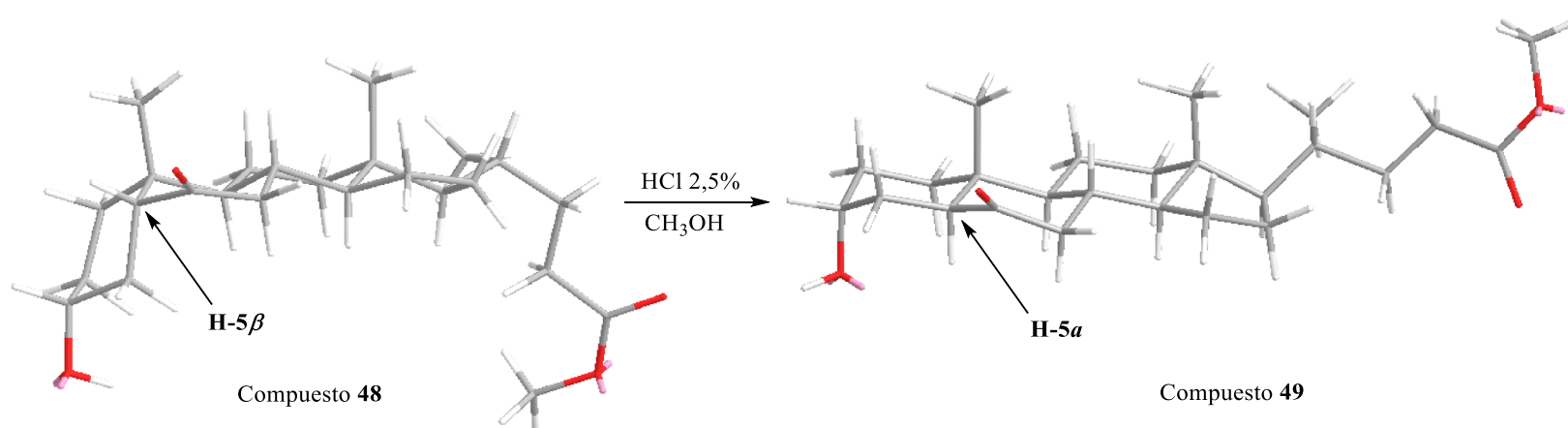


Figura 25: Reacción de isomerización del compuesto **48** catalizada por HCl, para obtener el compuesto **49**. Se observa el cambio dramático que experimentan las conformaciones al pasar de una fusión *cis* de anillos A/B a fusión *trans*.

Por medio de esta reacción se obtuvo el compuesto **49** con un 82,2% de rendimiento. Al tratarse de isómeros la caracterización por IR no entrega información que permita diferenciar entre ambos compuestos. Sin embargo, desde el espectro de ^1H RMN se observan diferencias importantes y éstas se evidencian principalmente en las señales $\delta_{\text{H}} = 4,16$ ppm (m, 1H, CHOH) y $\delta_{\text{H}} = 2,70$ ppm (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), asignadas a los hidrógenos de las posiciones C-3 y C-5 respectivamente, ambas desplazadas a bajo campo, en comparación con su isómero

48 ($\delta_H = 3,62$ ppm para H-3 y la señal de H-5 solapada a $\delta_H = 2,33$ ppm con las señales de H-23), como se indica en la Figura 4.3. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN para **48** se observa la señal a $\delta_C = 12,29$ ppm (CH_3) asignada al grupo metilo enlazado al carbono cabeza de puente de la posición C-10, que al cambiar la fusión de anillos A/B cis hacia la fusión *trans* de estos anillos, se ve evidenciado por un cambio significativo en el desplazamiento químico de la señal hacia alto campo en el espectro de ^{13}C RMN (desde $\delta_C = 23,16$ ppm (C-19) en el compuesto **48** hacia $\delta_C = 12,29$ ppm, en el compuesto **49**), como se muestra en la Figura 3.3. La estructura de la molécula fue confirmada principalmente por los espectros de correlación 2D HSQC y HMBC (ver Anexo 1.D).

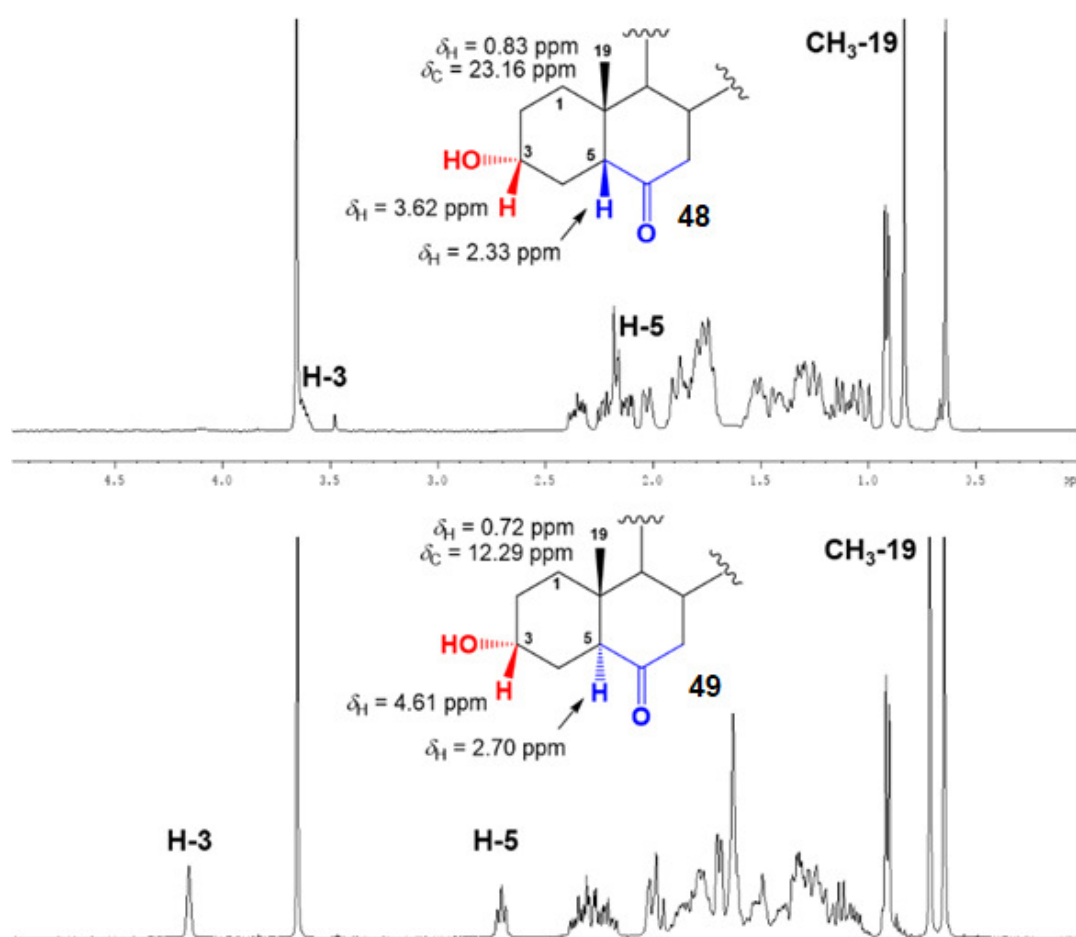


Figura 26: Espectros de ^1H RMN de los compuestos **48** y **49**, y las principales diferencias espectrales observadas en ^1H y ^{13}C RMN entre los compuestos **48** y **49**, en el cambio conformacional al pasar de una fusión cis de anillos A/B a fusión *trans*.

Continuando con la ruta de síntesis, el derivado **49** fue saponificado, utilizando el sistema de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ con posterior acidificación, método descrito para otros análogos de estructura similar (Cortés et al, 2002). De esta forma, el compuesto **50** fue obtenido con un 82,4% de rendimiento. Evidencia espectroscópica de IR indica la presencia de una banda, observada entre $3403\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$, atribuida a la función de ácido carboxílico en la molécula. Adicionalmente, en el espectro de ^{13}C RMN, se observa la presencia del grupo carbonilo de la función carboxílica a $\delta_C = 178,19$ ppm, confirmando la presencia de dicha función (Carvajal et al, 2018) (ver Anexo 1.E).

Posteriormente, el ácido carboxílico **50** fue acetilado bajo condiciones estándares ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMAP}$) para producir el derivado acetilado **51** con un rendimiento de 66,1%. La principal evidencia espectroscópica para este compuesto fue la observación en el espectro de ^1H RMN de la señal a $\delta_{\text{H}} = 2,03$ ppm (s, 3H) asignada al grupo CH_3CO . Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN, la presencia de las señales a $\delta_{\text{C}} = 170,33$ y $21,41$ ppm confirman la presencia del grupo acetato (Huang et al, 1994) (ver Anexo 1.F).

El paso siguiente consistió en realizar la reacción de descarboxilación oxidativa del ácido **51**, usando el sistema $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2$. Este método ha sido propuesto para obtener enlaces dobles terminales a partir de ácidos carboxílicos (Vaidya et al, 1968, Zhou et al, 1985, Zhou et al, 1988, Cortés et al, 2002, Carvajal et al, 2018, Espinoza et al, 2019). Específicamente, se ha aplicado ampliamente para la degradación de la cadena lateral de un gran número de ácidos biliares, incluidos derivados del ácido hiodeoxicólico (**15**) (Cortés et al, 2002, Yang et al, 2014, Espinoza et al, 2019). Adicionalmente, la reacción de degradación carboxílica también se puede llevar a cabo usando el sistema $\text{PhI}(\text{OAc})_2/\text{CuSO}_4$ (Yang et al, 2014).

En este caso, el ácido **51** fue tratado con el sistema $\text{PhI}(\text{OAc})_2/\text{CuSO}_4$ por ser menos tóxico, con lo que se logró descarboxilar la cadena lateral y se obtuvo el alqueno terminal **52** con 26,8% de rendimiento. La formación del alqueno en la posición C22-C23 fue confirmada por datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN. De esta forma, las señales observadas a $\delta_{\text{H}} = 5,66$ ppm (ddd, $J = 17,0$; $10,2$ y $8,4$ Hz, 1H), $5,12$ ppm (dd, $J = 17,0$ y $1,8$ Hz, 1H) y $4,93$ ppm (dd, $J = 10,2$ y $1,8$ Hz, 1H) fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23_{trans} y H-23_{cis}, respectivamente. Mientras que las señales observadas en el espectro de ^{13}C RMN a $\delta_{\text{C}} = 144,89$ y $111,84$ ppm fueron asignadas a los carbonos C22 y C23, respectivamente (ver Anexo 1.G). Estos datos espectroscópicos fueron consistentes con los reportados, por otros autores, para alquenos esteroidales con estructuras similares (Zhou et al, 1985, Yang et al, 2014, Cortés et al, 2002, Espinoza et al, 2019, Soto et al, 2020, Ferrer et al, 2021).

Dihidroxilación del alqueno **52** por medio del método de Upjohn (OsO_4/NMO) produjo la mezcla de dioles epiméricos **53a/53b** (22*S*/22*R*) con 74,53% de rendimiento. La obtención de la mezcla epimérica fue un resultado esperado dado que también fue informado cuando otros núcleos esteroidales con enlace doble en la posición C22-C23 (24-nor-colánicos-22-eno) fueron hidroxilados con el mismo procedimiento (Ishiguro et al, 1975, Zhou et al, 1984, Carvajal et al, 2018, Espinoza et al, 2019, Soto et al, 2020, Ferrer et al, 2021). Esta reacción es estereoselectiva, debido a que el epímero 22(*S*) fue obtenido como el isómero mayoritario al igual que otros análogos con estructuras similares, los cuales fueron informados previamente. Luego de sucesivas purificaciones, la proporción de los epímeros **53a/53b** (22*S*/22*R*) presente en la mezcla fue determinada utilizando los datos espectroscópicos de las señales dobles observadas a $\delta_{\text{H}} = 0,955$ y $0,919$ ppm (d, $J = 7,0$ Hz y d, $J = 6,6$ Hz, respectivamente), asignadas a los hidrógenos de los grupos metilo de H-21 (Figura 3.4), donde la proporción relativa de las integrales para estos hidrógenos indica que el componente mayoritario fue el epímero 22(*S*) en una proporción aproximada de 1,0:0,1.

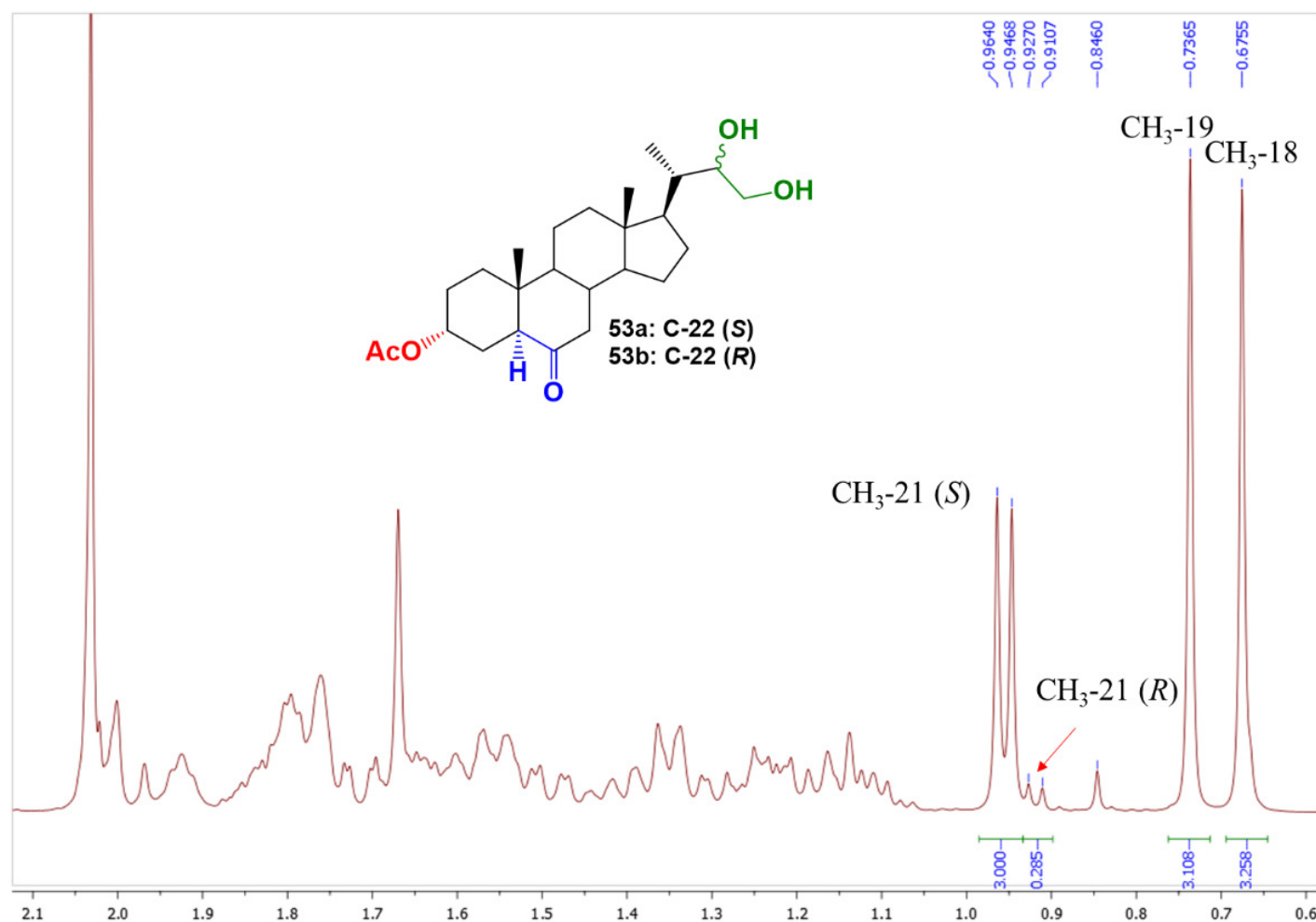


Figura 27: Espectro de ^1H RMN parcial, donde se indican las integrales relativas de los grupos $\text{CH}_3\text{-21}$ en la mezcla de epímeros **53a/53b**.

Dado que la mezcla **53a/53b** fue sujeta a sucesivas purificaciones por re-cristalización, sólo se logró separar y purificar el epímero mayoritario **53a** (22*S*) con un rendimiento de 74,53%.

La mayor evidencia espectroscópica de ^1H RMN para la determinación estructural del derivado **53a**, fue por la observación de las señales a $\delta_{\text{H}} = 3,79$ ppm (dt, $J = 9,6$ y $3,6$ Hz, 1H), $3,64$ ppm (dd, $J = 10,8$ y $3,6$ Hz, 1H), $3,51$ ppm (dd, $J = 10,8$ y $9,6$ Hz, 1H), que fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23a y H-23b, respectivamente. Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN fueron observadas las señales a $\delta_{\text{C}} = 73,81$ y $62,46$ ppm que fueron asignadas a los carbonos carbonílicos C22 y C23, respectivamente (ver Anexo 1.H).

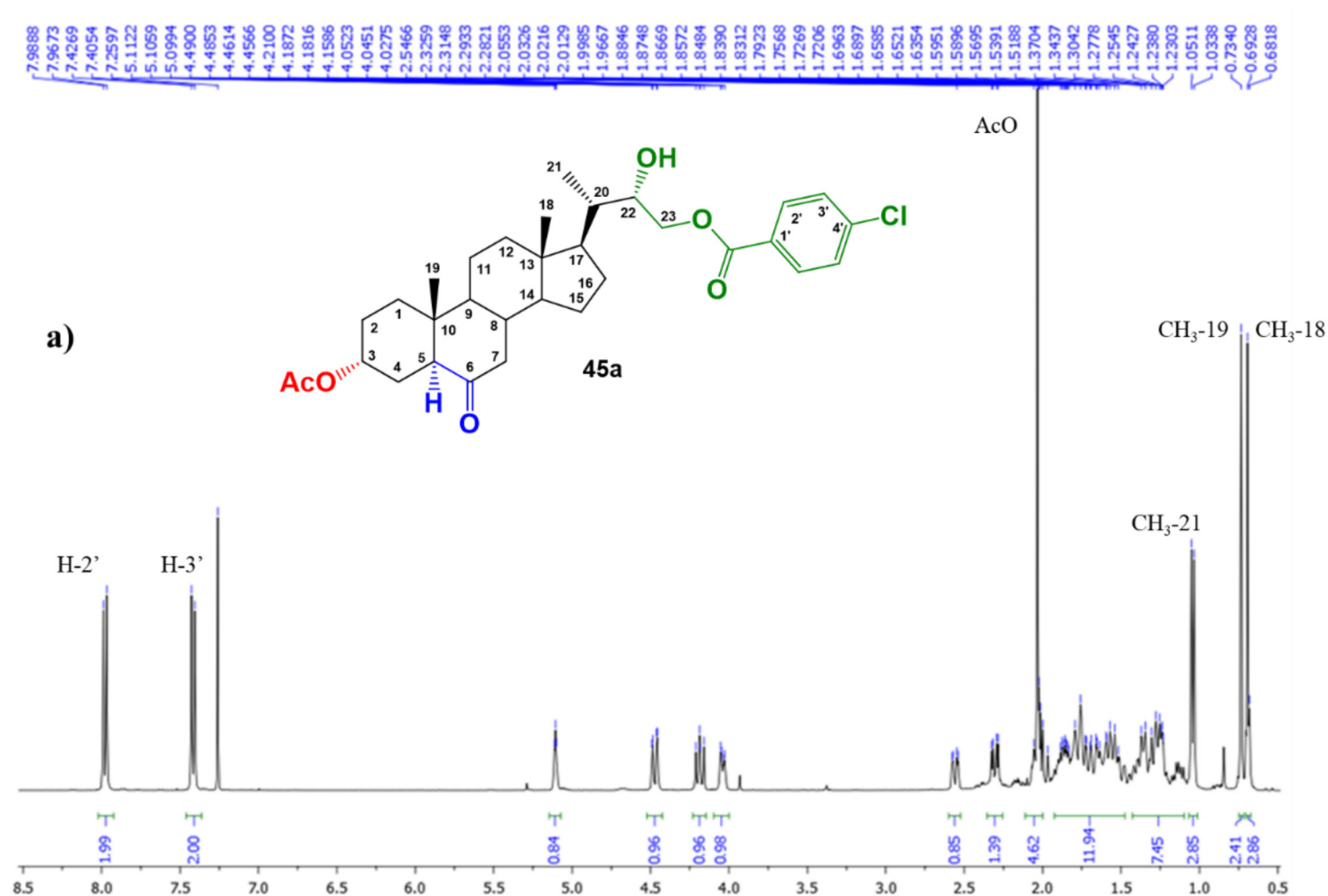
La estereoquímica en el carbono C22 del compuesto **53a** fue establecida como 22(*S*), basada en resultados reportados previamente para la reacción de dihidroxilación de otros análogos de estructuras similares (Ishiguro et al, 1975, Zhou et al, 1984, Carvajal et al, 2018, Espinoza et al, 2019, Soto et al, 2020, Ferrer et al, 2021). Sin embargo, en orden a establecer la configuración absoluta en el carbono C22 del glicol **53a**, se procedió a la preparación del derivado benzoilado **44b** y posterior determinación de su estructura cristalina (Carvajal et al, 2018).

Posteriormente, reacción de esterificación selectiva en la posición C-23 del glicol **53a** por medio de cloruros de ácidos 4-sustituídos produjo los derivados benzoilados **45a-c**, de

acuerdo con el protocolo descrito para la obtención de análogos de estructuras similares (Carvajal et al, 2018, Soto et al, 2021).

Debido a que las estructuras de los compuestos **45a-c** son similares, donde la única diferencia es el átomo de halógeno en la posición 4 del anillo aromático, la determinación estructural fue establecida principalmente por técnicas espectroscópicas de ^1H y ^{13}C RMN mono y bidimensionales. A modo de ejemplo se describe la determinación estructural del compuesto **45a**.

En el espectro de ^1H RMN del compuesto **45a** se observaron las señales a $\delta_{\text{H}} = 7,98$ ppm (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) y 7,42 ppm (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), que fueron asignadas a los hidrógenos H-2' y H-3', del anillo aromático, lo que confirma la presencia de este sistema en la estructura (Figura 3.5). Esta información fue confirmada además desde el espectro de ^{13}C RMN, donde se observaron las señales a $\delta_{\text{C}} = 139,66$; 131,00; 128,77 y 128,27 ppm, que fueron asignadas a los carbonos C4', C2', C3' y C1' respectivamente, que corresponden a los carbonos del anillo aromático (Figura 3.5).



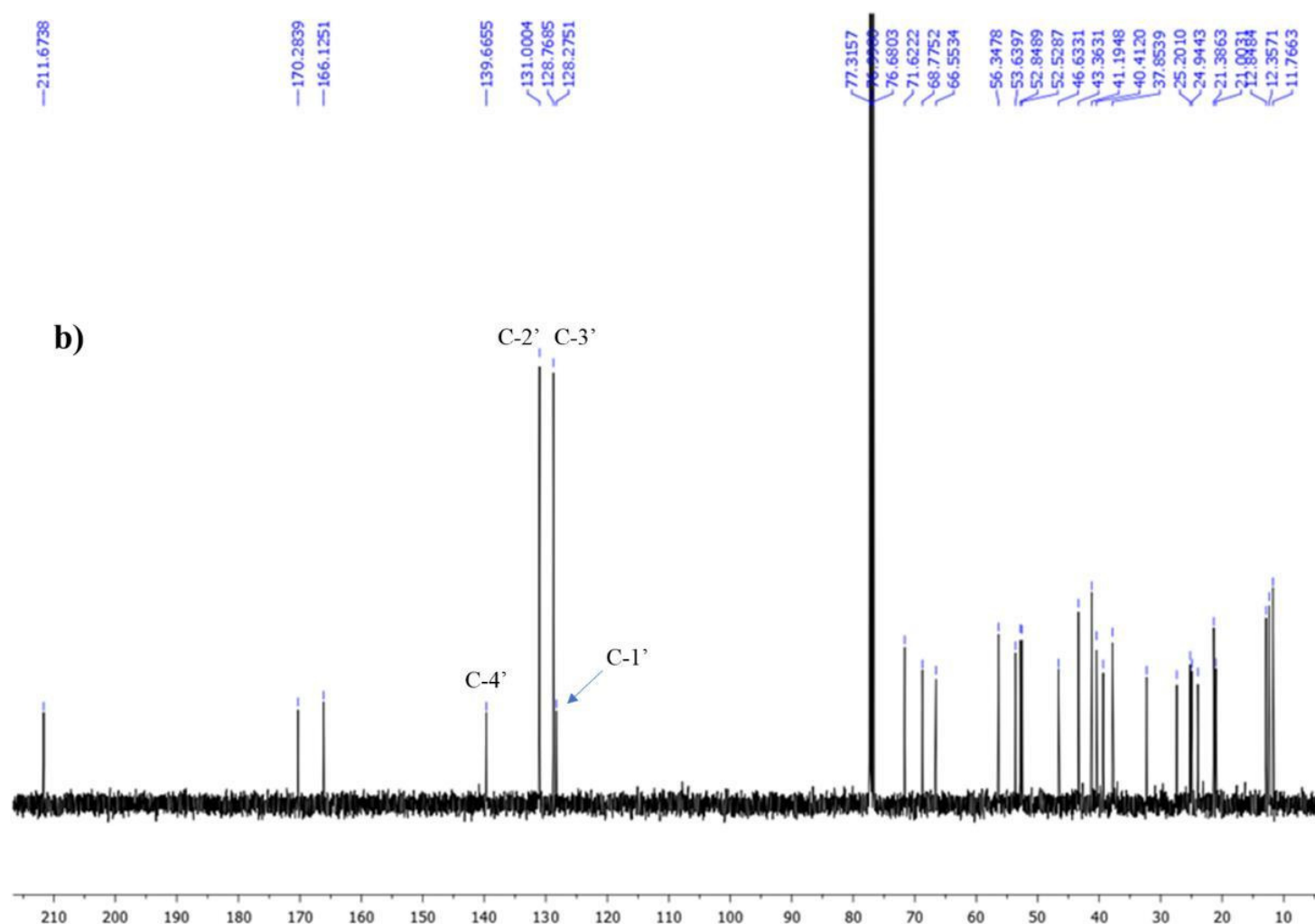


Figura 28: a) Espectro de ^1H RMN, donde se indican las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos H-2' y H-3'. b) Espectro de ^{13}C RMN, donde se indican las señales de los carbonos aromáticos C-4', C-2', C-3' y C-1'.

Mientras que la confirmación de la esterificación en la posición C-23 fue establecida por espectros combinados 2D HSQC y 2D HMBC. De esta forma las señales observadas en el espectro de ^1H RMN a $\delta_{\text{H}} = 4,47$ ppm (dd, $J = 11,7$ y $2,0$ Hz, 1H); $4,18$ ppm (dd, $J = 11,7$ y $9,4$ Hz, 1H) y $4,06$ - $4,02$ ppm (m, 1H), fueron asignadas a los hidrógenos H-23a, H-23b y H-22 respectivamente. Los que fueron correlacionados por 2D HSQC de tipo heteronucleares $^1J_{\text{HC}}$ con los carbonos observados a $\delta_{\text{C}} = 71,62$ y $66,55$ ppm, asignados a los carbonos C-23 y C-22 respectivamente, según se indica en la Figura 3.6.

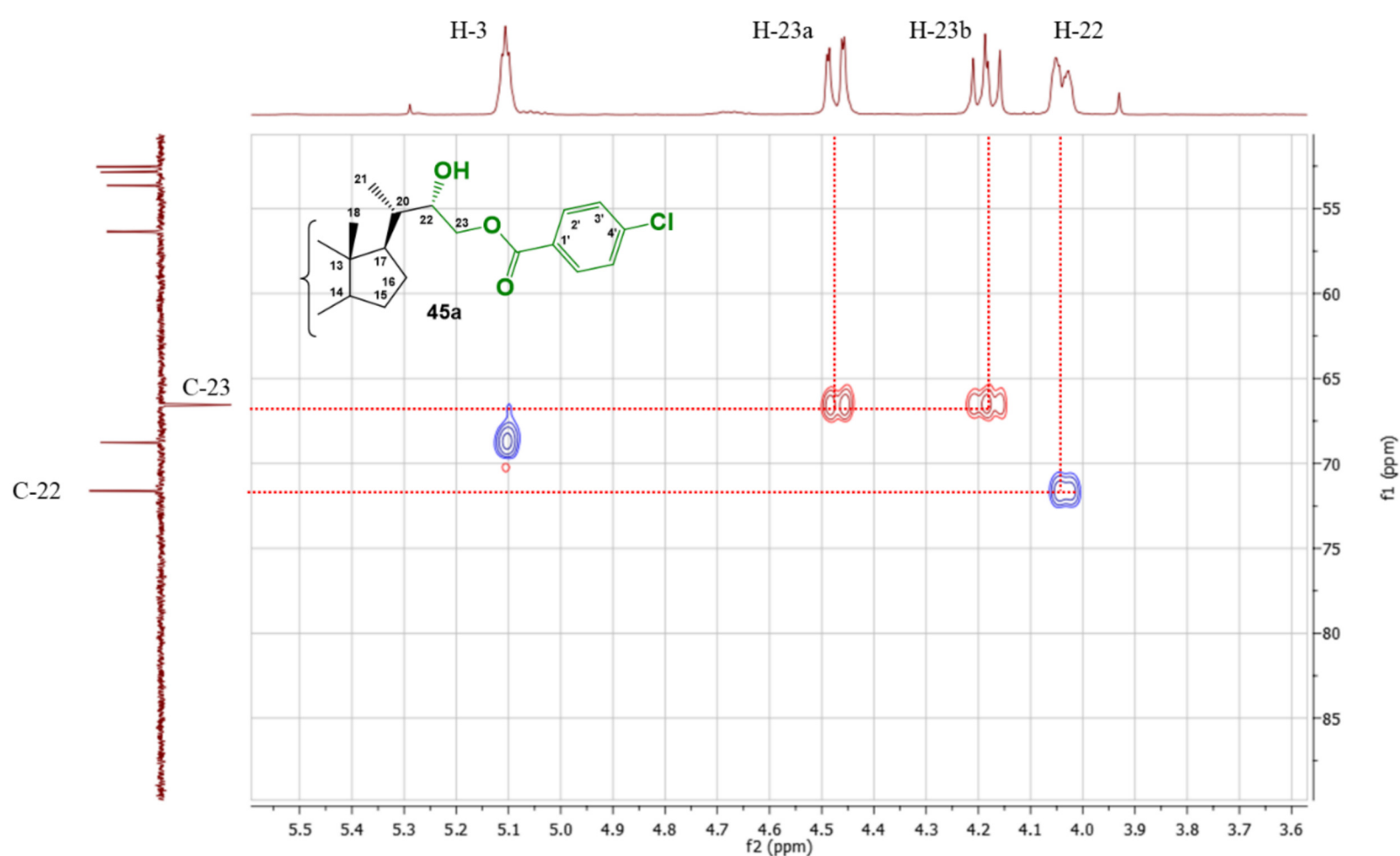


Figura 29: Espectro 2D HSQC parcial que muestra las correlaciones heteronucleares a $^1J_{\text{HC}}$ entre los hidrógenos H-22 y H-23 con sus respectivos carbonos C-22 y C-23.

Luego la confirmación de unión del grupo benzoato al C-23 fue establecida desde los datos proporcionados por el espectro 2D HMBC, donde las señales asignadas a los hidrógenos H-23a, H-23b mostraron correlaciones heteronucleares 2D HMBC a $^3J_{\text{HC}}$ con el carbono observado a $\delta_{\text{C}} = 166,12$ ppm que fue asignado como ArCO_2 , según se indica en la Figura 4.7. De esta forma se confirma la conexión del grupo benzoato con el carbono en la posición C-23.

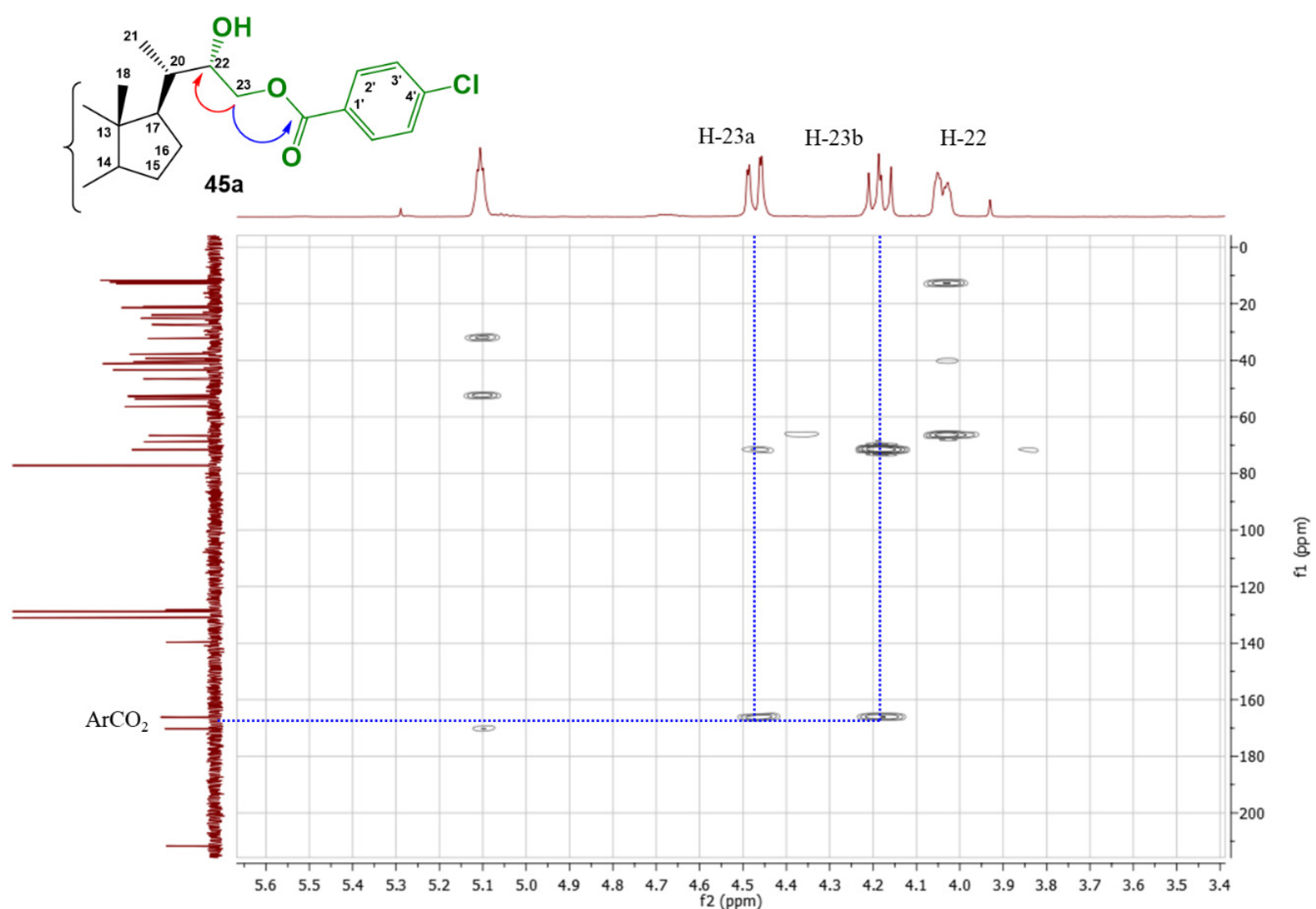


Figura 30: Espectro 2D HMBC parcial donde se muestran las principales correlaciones heteronucleares a $^3J_{\text{HC}}$ (color azul) entre los hidrógenos H-23ab y el carbono del grupo benzoato (ArCO_2). Mientras que en color rojo se muestran las correlaciones a $^2J_{\text{HC}}$ entre los hidrógenos H-23ab y H-22 con los carbonos C-22 y C-23.

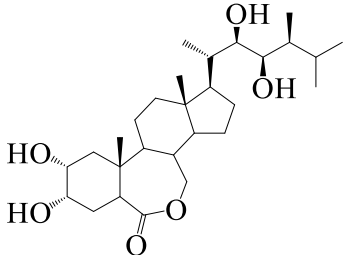
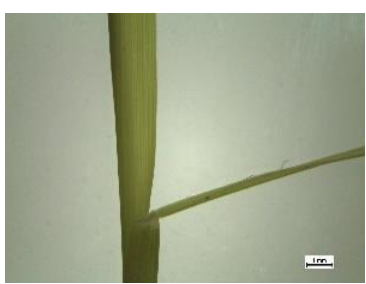
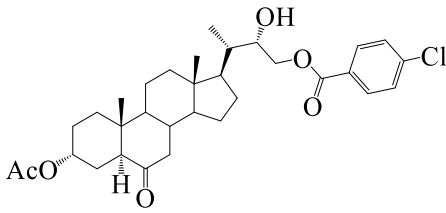
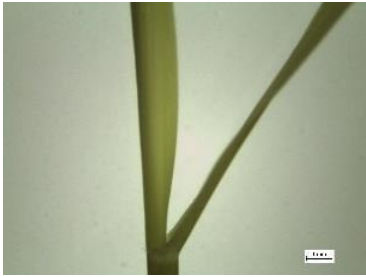
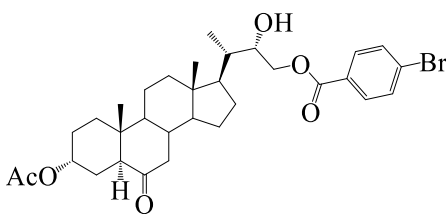
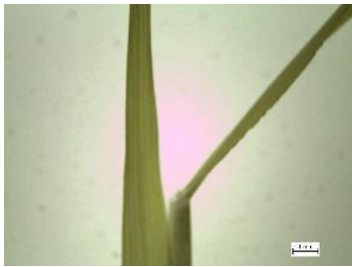
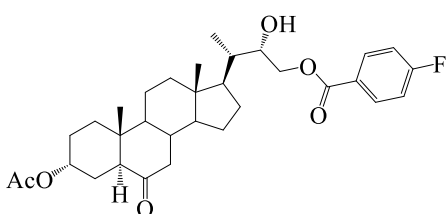
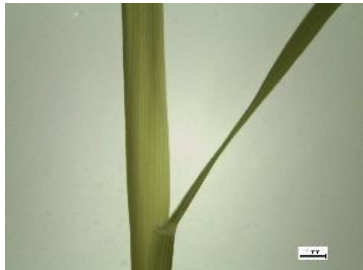
Todos estos análisis fueron realizados de forma similar para establecer las estructuras de los compuestos **45b** y **45c** (ver Anexo 1.I, 1.J y 1.K). Se adjunta además los espectros de masas de alta resolución para los tres nuevos compuestos (Anexo 2).

3.2. Componente biológica.

3.2.1. Resultados *in-vitro*.

Los resultados indican que los análogos de tipo 24-Nor-colanos funcionalizados en carbono C-23 con grupos benzoatos 4-sustituídos (**45a**, **45b** y **45 c**) exhiben actividad promotora del crecimiento, de acuerdo a la evaluación de la inclinación de la lámina de arroz (Tabla 3.1).

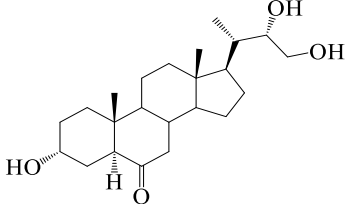
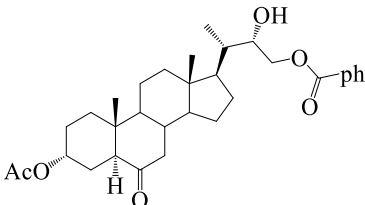
Tabla 3.1: Actividad de análogos de BRs disueltos en DMSO mediante bioensayos *in Vitro* de Inclínación de la lámina de arroz. Letras indican el nivel de significancia de acuerdo con test de tukey P<0,05.

Compuesto	Angulo de Inclínación de la Lámina de Arroz ((°) ± DS)		
	1 x 10 ⁻⁸ M	1 x 10 ⁻⁷ M	1 x 10 ⁻⁶ M
 1	 22±3,5^a	 31±2,6^a	 71±4,5^a
 45a	 22±2,0^a	 12±2,0^c	 37±2,0^b
 45b	 32±4,9^b	 29±3,7^a	 31±2,0^b
 45c	 6±4,1^c	 13±4,5^c	 27±2,0^c

Los valores muestran que el efecto promotor de crecimiento que ejerce el compuesto **45b** es prácticamente independiente de la concentración, mostrando valores similares a **1** para las concentraciones 1 x 10⁻⁸ M y 1 x 10⁻⁷ M, pero menos de la mitad para 1 x 10⁻⁶ M. Por su parte, el compuesto **45c** es el que muestra menor actividad en las tres concentraciones evaluadas, mientras que el compuesto **45a** exhibe la mayor actividad entre los tres análogos testeados, a la concentración de 1 x 10⁻⁶ M; sin embargo, alcanza solo la mitad del valor del control positivo (**1**) a esa concentración.

De acuerdo a lo reportado en Díaz et al, 2020 se observa que tanto la presencia de grupos hidroxilos en C22 y C23 específicamente, como la configuración del C22 son claves para la actividad biológica. Además, el compuesto **44b**, de estructura similar a **45a-c** pero sin el grupo halógeno en C-4 del anillo aromático, produce ángulos de inclinación similares o incluso mayores que los obtenidos para el compuesto **21** (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Actividad de análogos de BRs reportados por Díaz et al 2020, disueltos en DMSO mediante bioensayos *in Vitro* de Inclinación de la lámina de arroz.

Compuesto	1 x 10 ⁻⁸ M	1 x 10 ⁻⁷ M	1 x 10 ⁻⁶ M
 21	35±3	60±3	62±12
 44b	49 ± 5	60 ± 5	78 ± 15

Es decir, los análogos con una sustitución completa de los grupos hidroxilo por grupos acetilo y/o benzoílo mantienen una actividad considerable, pero la presencia de los halógenos en el anillo aromático de la cadena lateral no es efectiva para mejorar la actividad biológica.

3.2.2. Resultados in-vivo

La prueba hidropónica permitió la evaluación experimental de parámetros fisiológicos de plantas de tomate en respuesta a la aplicación exógena de cuatro soluciones que incluyen los análogos de BRs **45a**, **45b** y **45c**, en forma independiente, a una concentración de 1x10⁻⁸ M. Como control negativo se utilizó solo la solución de macronutrientes y micronutrientes estándar, y como control positivo se utilizaron la Brasinólida (**1**) y el compuesto **21**, el cual resultó ser un análogo con actividad destacada como se menciona en la sección 1.14; ambos aplicados de manera independiente y a la misma concentración. Los sistemas de cultivo hidropónico se mantuvieron por aproximadamente 1 mes en las siguientes condiciones ambientales: temperatura 22°C, humedad relativa 50% y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Fue necesario adicionar entre 500 y 900 mL de solución nutritiva (con la cantidad de análogo requerida para mantener la concentración de prueba inicial) a cada cámara de cultivo

hidropónico a los 14 días del experimento, con la finalidad de compensar las pérdidas por evaporación y evitar que las raíces no estén sumergidas en la solución.

Durante el desarrollo del ensayo los parámetros químicos controlados se mantuvieron en un rango de pH 5,6-6,4, cumpliendo con las recomendaciones del fabricante de la solución nutritiva, y una conductividad entre 1,4 y 2,6 mS (Figura 3.8).

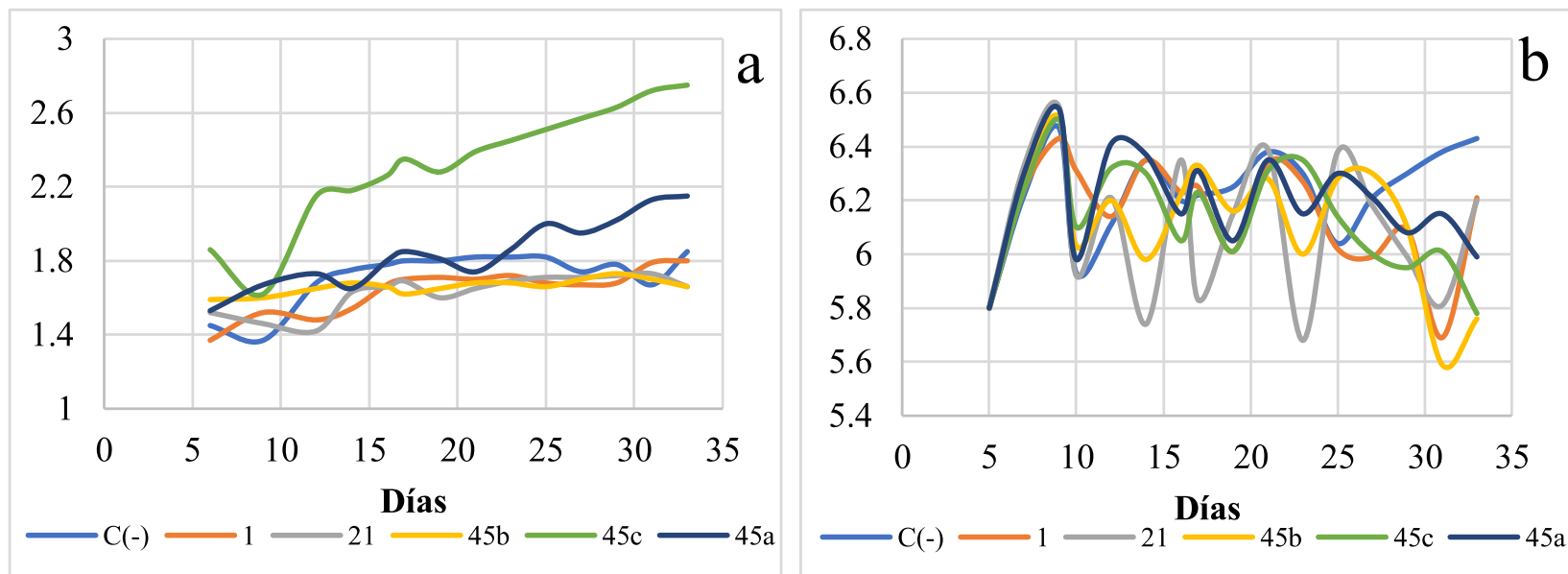


Figura 31: CE (a) y pH (b) de las soluciones hidropónicas que contienen distintos análogos de Brasinoesteroides (**1**, **21** y **45a-45c**) aplicados para el cultivo de *Lycopersicum esculentum*.

Es posible observar en la Figura 3.9 y Figura 3.10, que las soluciones tratadas con los análogos **21** y **45b** a una concentración de 1×10^{-8} M destacan con plantas de tomate más grandes y vigorosas, así como con raíces extensas. Por lo tanto, el análogo **45b** se comporta similar al control positivo **21** y superior al control positivo **1** (Brasinólida).

Sin embargo, las plantas tratadas con el análogo **45a** experimentaron un desarrollo y crecimiento poco homogéneo y con una tasa de sobrevivencia muy deficiente en comparación a los otros tratamientos evaluados (Figura 3.9).

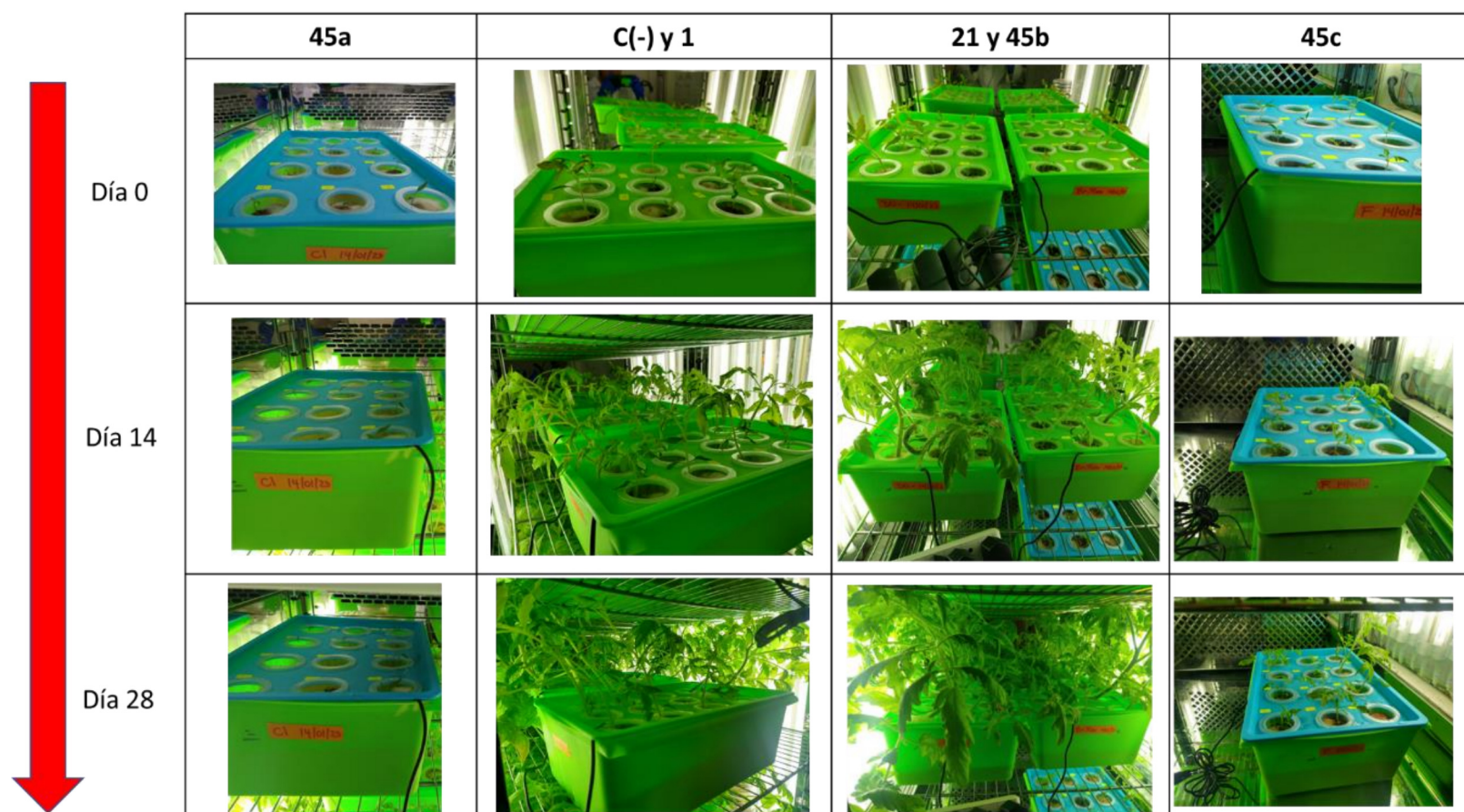


Figura 32: Efectos de análogos de Brasinoesteroides (1, 21 y 45a-45c) sobre los parámetros fisiológicos de plantas de *Lycopersicum esculentum* cultivadas bajo condiciones hidropónicas durante 26 días posterior al trasplante.

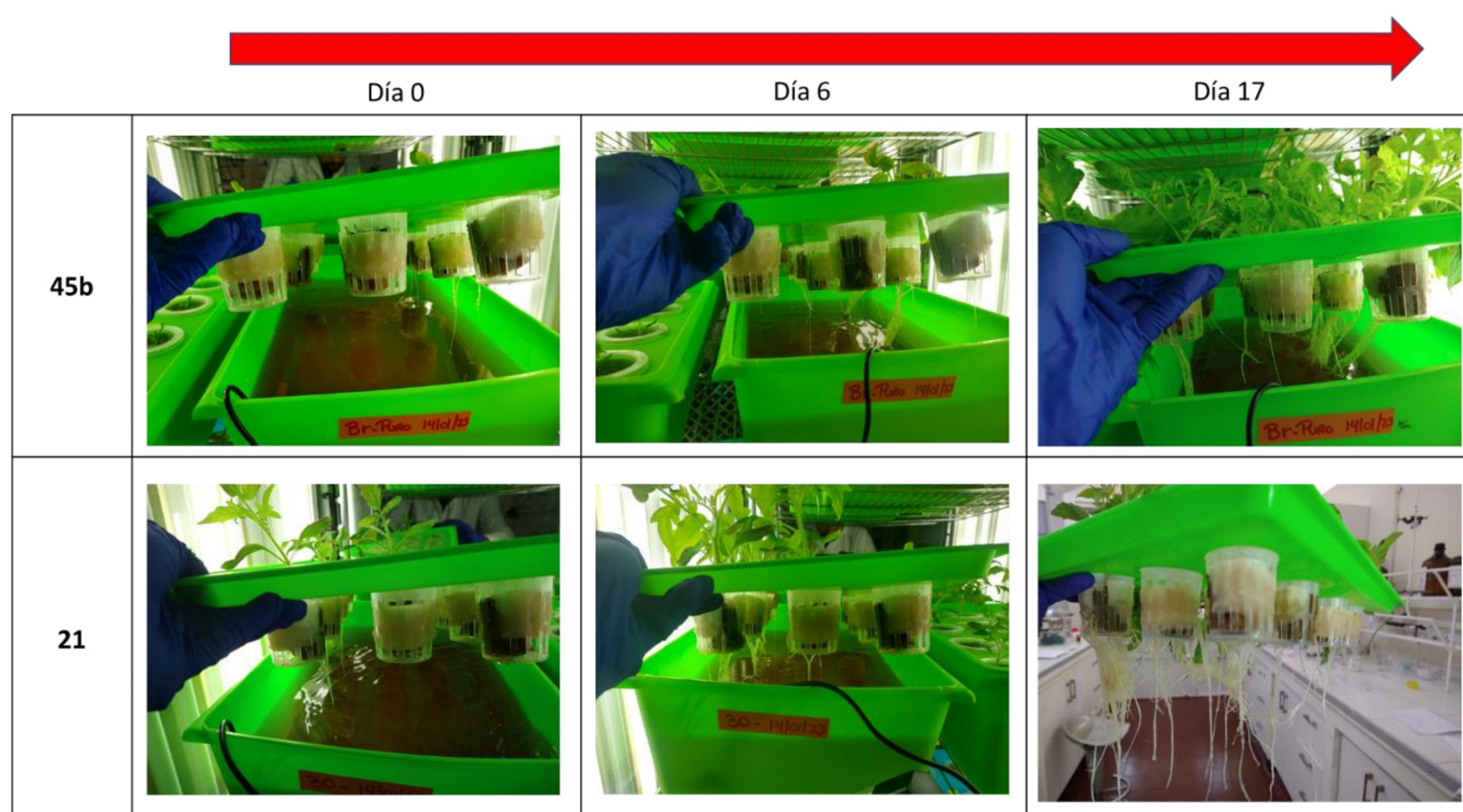


Figura 33: Visualización del sistema radicular en el tiempo de los análogos más activos (21 y 45b) aplicados en forma exógena en la solución hidropónica.

De acuerdo con los datos mostrados en la tabla 3.2, el análogo de BRs **21** sintetizado igualmente a partir de ácido hiodeoxicólico en la serie reportada por Díaz et al, 2020, resultó tan eficiente como la Brasinólida (**1**) en las distintas variables fisiológicas evaluadas, superando incluso los resultados de rendimiento de biomasa (Figura 3.11), con un 55% más de rendimiento en peso seco de follaje.

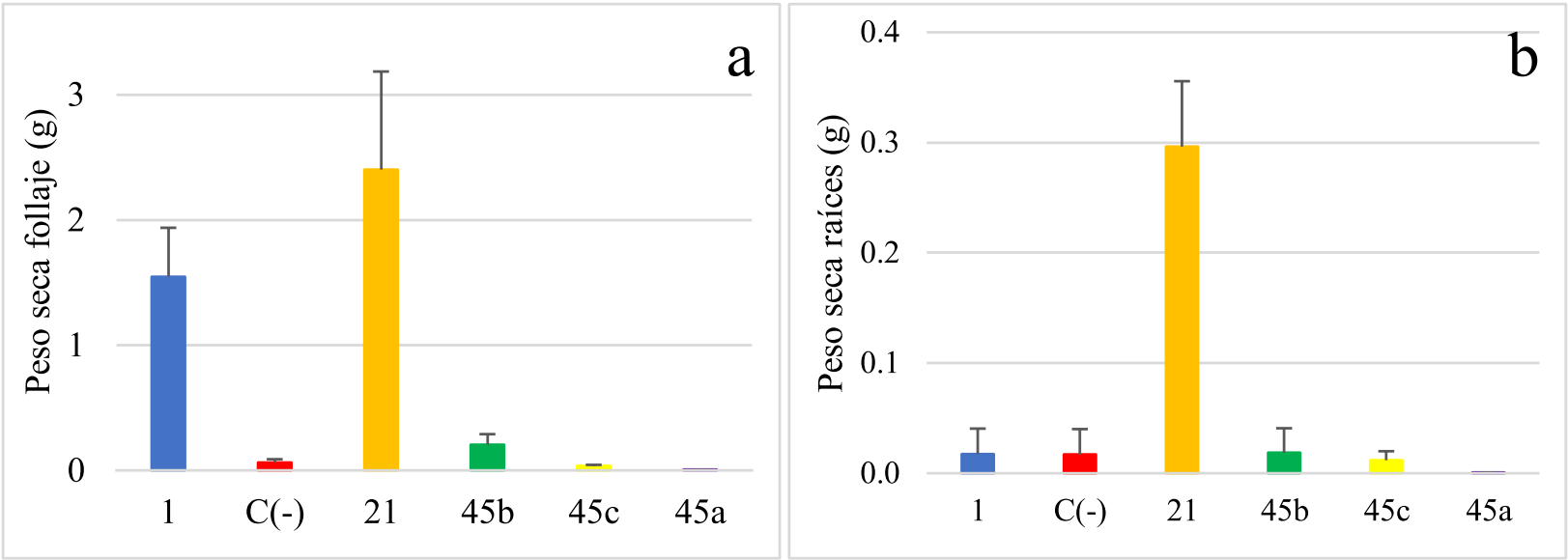


Figura 34: Rendimiento en peso seco follaje (a) y peso seco raíces (b) de plantas de *Lycopersicon esculentum* cultivadas en condiciones hidropónicas con distintos análogos de brasinoesteroides (**1**, **21** y **45a-45c**).

Por su parte, el análogo **45b** obtuvo resultados similares a los de **1** en la mayoría de las variables evaluadas (Tabla 3.3), excepto en el número de hojas y área foliar, donde se observan resultados inferiores en un 57% y un 69% respectivamente, en relación al control positivo (**1**). El análogo **45a** no presenta actividad *in vivo*, con parámetros de altura y largo de hojas que alcanzan solo el 10% del control positivo **1** y control negativo, aproximadamente. El área foliar es 70 veces más pequeña comparada con el control negativo, y la supervivencia de plantas alcanza un 41,7 %.

Tabla 3.3: Efectos de análogos de Brasinoesteroides (**1**, **21** y **45a-45c**) sobre los parámetros fisiológicos de plantas de *Lycopersicon esculentum* cultivadas bajo condiciones hidropónicas.

Tratamientos	Altura [cm]	Largo hojas [cm]	Nº hojas	Longitud raíz principal [cm]	Área foliar [cm ²]	% Supervivencia
1	26,25±1,71 ^{ab}	17,25±2,87 ^{bc}	8,25±0,50 ^a	12,75±6,18 ^{ab}	45,09±7,01 ^{ab}	100
21	31±4,08 ^a	23,75±2,63 ^a	8,50±1,29 ^{ab}	23,75±10,97 ^a	44,37±12,23 ^a	100
45a	2,63±0,25 ^d	2,00±0,41 ^e	3,25±0,50 ^{bc}	2,25±0,96 ^{cd}	0,57±0,07 ^e	41,7
45b	25±5,1 ^{ab}	18,75±3,40 ^{ab}	5,25±1,50 ^b	20,75±9,74 ^a	26,71±3,55 ^{bc}	100
45c	5,88±1,31 ^c	5,25±2,02 ^d	4,25±0,50 ^b	1,00±0,71 ^c	13,05±8,32 ^{cd}	83,3
C(-)	27,25±8,34 ^{ab}	14,50±3,87 ^a	5,75±1,26 ^b	13,67±8,39 ^{ab}	38,17±11,31 ^{ab}	100

El compuesto **45c** alcanza un porcentaje de supervivencia del 83,3%, y presenta todos los parámetros superiores a los del compuesto **45a**, con excepción de la longitud de raíz, la cual presenta valores 50% más bajos. En comparación al control negativo, presenta un valor 4 veces menor para altura, 3 veces menor para largo de hojas, 1,3 veces menor para número de hojas, 13 veces menor para la longitud de raíz y 3 veces menor para el área foliar.

En relación con la producción de pigmentos, las plantas tratadas con los compuestos **21** y **45b** producen mayor cantidad de carotenos que el control positivo **1** y el triple que el control negativo (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Efectos de análogos de Brasinoesteroides (**1**, **21** y **45a-45c**) en contenido de nutrientes (clorofila y carotenos) en plantas de *Lycopersicum esculentum* cultivadas bajo condiciones hidropónicas.

Tratamientos	Contenido de Clorofila mg/g peso fresco			mg/g peso fresco
	Clorofila a	Clorofila b	Total de Clorofila	Total de Carotenos
1	191,03±16,60 ^a	71,52±7,28 ^a	262,55±23,87 ^a	29,51±0,57 ^a
21	198,79±23,69 ^{ac}	74,89±13,42 ^{ac}	273,69±47,08 ^{ac}	35,17±6,84 ^{ac}
45b	218,89±52,75 ^{acd}	84,22±17,43 ^{acd}	303,12±70,15 ^{acd}	39,19±8,46 ^{cd}
45c	205,25±48,27 ^{acde}	81,05±18,25 ^{acde}	286,30±66,46 ^{acde}	41,34±10,11 ^{cde}
C(-)	84,42±3,41 ^b	30,79±0,33 ^b	115,21±3,74 ^b	14,54±0,43 ^b

Los valores mostrados en esta tabla son la media de n=3. Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Tratamiento **45a** no fue posible evaluarlo debido a que el material vegetal no fue suficiente, en razón de los parámetros fisiológicos y mortalidad de plantas.

A pesar que las variables fisiológicas del compuesto **45c** no son favorables en comparación a los controles negativo y positivo, este análogo produce plantas con contenidos altos de clorofila y carotenos (de hecho, estas presentan el mayor contenido de carotenos de todas las muestras). Un resultado similar reporta Ahmed et al, 2021, quienes en su trabajo compararon el crecimiento de *Lactuca sativa* en medio hidropónico, usando una solución nutritiva orgánica derivada de desechos de pescado, con una solución nutritiva inorgánica, y descubrieron que había mayor presencia de clorofila total y carotenos en las plantas con menor biomasa. La concentración de estos pigmentos se asocia a la capacidad fotosintética de las plantas, y entregan información respecto a su vigor, productividad y capacidad metabólica. El hecho de que el mayor contenido de pigmentos no se refleje en la producción de biomasa se atribuye a que el crecimiento y el rendimiento de las plantas son características complejas que dependen de muchos factores (luz, otros nutrientes, CO₂, agua, medio de cultivo, actividad enzimática de las plantas, entre otros), por tanto, la clorofila no es el único factor que regula el crecimiento de los cultivos.

Otro estudio en el que se reporta un impacto positivo en plantas tras la aplicación de bioestimulantes en medio hidropónico es el de Abdelkader et al, 2021; en el cual se observaron mejoras metabólicas y alteraciones de procesos bioquímicos que resultaron en un aumento del rendimiento de masa seca, parámetros fisiológicos y calidad de frutos de plantas de tomate de la especie híbrida *Merlice*. En el estudio, se aplicaron dos bioestimulantes: RutfarmMaxifol® (Extracto de *Ascophyllum nodosum* 17,5%, aminoácidos, macro y microelementos) y Radifarm® (polisacáridos, glucósidos, aminoácidos y micro-elementos), a diferentes concentraciones, en forma de remojo de semillas y aspersiones foliares, tanto en la etapa de floración como en etapas iniciales de desarrollo del fruto, bajo un sistema hidropónico. Los resultados positivos fueron atribuidos al efecto sinérgico que ejercen los nutrientes, como la acción estimulante del componente activo que contiene el regulador de crecimiento.

Estos resultados permiten concluir que los compuestos **21** y **45b** utilizados en conjunto con técnicas de cultivo hidropónico permitirían mejorar el crecimiento y calidad de las plantas.

En cuanto a la relación estructura actividad de los compuestos propuestos, al tener estos como única variación estructural el halógeno en posición cuatro del anillo aromático, se puede concluir que el compuesto que presenta mayor actividad *in vivo* es aquel que tiene acoplado el átomo más voluminoso (Bromo). Sin embargo, el compuesto **21**, que no posee grupo benzoato acoplado a la cadena lateral, es el único que muestra resultados superiores a la Brasinólida (**1**). Es posible entonces prever que aquellos compuestos de cadena lateral menos voluminosa presentan mayor actividad biológica.

De acuerdo a referencia (Díaz et al, 2020) la actividad promotora del crecimiento de los análogos de BRs depende principalmente de la distribución espacial de los átomos de oxígeno o de las potenciales conformaciones de la molécula, y no de la presencia o ausencia de algún grupo funcional en específico. Además, los análogos de cadena corta y con sustituyentes ligeramente voluminosos en la cadena tienen actividades de promoción del crecimiento de las plantas comparables a Brasinoesteroides naturales, lo que es consistente con los resultados obtenidos en este estudio.

Esto refuerza la conclusión de que la regulación hormonal de las plantas es multifactorial y existen otras variables, además de la estructura del compuesto, que afectan el acoplamiento hormona receptor.

Capítulo 4: Estudio de mercado.

4.1. Mercado de reguladores de crecimiento vegetal.

El mercado de los reguladores de crecimiento vegetal es un sector que se encuentra en rápido crecimiento. Al año 2022, el valor de este mercado se estimaba en más de 2,6 billones de dólares, con un crecimiento esperado de un 7,4% desde el año 2023 al 2030 (Grand View Research, 2020). Los bioestimulantes han ganado popularidad como parte fundamental de la agricultura orgánica, recibiendo una creciente demanda en aplicaciones de crecimiento de frutos y en la industria de alimentos orgánicos, siendo esta última una de las industrias con mayor crecimiento en el mundo. Esta expansión acelerada y el aumento de la relevancia en desarrollar prácticas sustentables en agricultura son los principales factores que impulsan el crecimiento del mercado de los reguladores vegetales; el consecuente aumento en la inversión por parte de países desarrollados en la industria de la agricultura no solo permite el acceso a mejores recursos como los son las hormonas vegetales, sino que también motiva a la investigación y desarrollo de nuevas patentes y tecnologías (Gupta, 2023).

Como se mencionó en el capítulo 1, la aplicación de reguladores de crecimiento cuenta con las ventajas de implicar una baja inversión, permite obtener efectos rápida y significativamente, requiere de pequeñas dosis, permite mejorar el rendimiento de siembras y a su vez puede mejorar la salud de las plantas, mejorar la inmunidad, promover resistencia a condiciones adversas y reducir el uso de pesticidas. La investigación en promotores de crecimiento y sus aplicaciones en producción agrícola es uno de los mayores avances en fisiología de plantas y ciencias de la agricultura.

La demanda de reguladores del crecimiento de las plantas ha ido en aumento debido a su capacidad para reducir el acame (doblez que sufre el tallo de las plantas por efecto del viento) en la producción intensiva de cereales, controlar la altura de los brotes y estimular el flujo de látex en las plantas de caucho. Estos factores hacen que el proceso de producción sea más rápido en comparación con los fertilizantes tradicionales, lo que se prevé tendrá un impacto positivo en el crecimiento del mercado en los próximos años. Pero no solo eso, el cambio climático también juega un rol importante en el aumento de la demanda de productos que mejoren la resistencia al estrés de los cultivos, pues el clima es un factor crucial en la producción agrícola, y el cambio climático trae consigo condiciones adversas tales como una mayor frecuencia de desastres naturales, condiciones climáticas extremas y reducción en la disponibilidad de agua, lo que causa fluctuaciones en la producción y aumento en los costos de producción e inversión (Research, Plant Growth Regulators Market Size, Share, PGR Industry Report 2020, 2020).

Las crecientes iniciativas que buscan hacer de la agricultura una industria más sostenible también impulsan la demanda de reguladores del crecimiento en todo el mundo. De acuerdo al Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA), el país invirtió más de 146 millones de

dólares en proyectos de investigación sobre producción agrícola sostenible en octubre de 2021, lo que pone de manifiesto que los reguladores de crecimiento son un componente esencial en el avance de la sustentabilidad en producción de alimentos (BlueWeave, 2020).

La tendencia actual de desarrollo en la integración económica internacional requiere con urgencia una restructuración de la industria agrícola, que permita cultivos intensivos y eficientes, mecanizados, informatizados, con menor requerimiento de mano de obra, independientes de temporada, así como mejoramiento en la variedad de frutas y agricultura de invernadero. La demanda de una regulación precisa del crecimiento de las plantas es cada vez mayor, y el rendimiento y la calidad de los cultivos son cada vez más inseparables de la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal.

Las actividades agrícolas a gran escala en países como India y China generan perspectivas de mercado bien definidas en la región. Además, estos países han dependido en gran medida de los agroquímicos para fines de nutrición y protección de cultivos, incluyendo reguladores de crecimiento. Países como Indonesia, Filipinas, Tailandia y Vietnam están registrando un crecimiento veloz en el mercado debido a la creciente conciencia sobre los beneficios de productividad de los reguladores de crecimiento y la creciente demanda de agroquímicos. Es probable que estos países ayuden a la región de Asia Pacífico a mantener su dominio durante los próximos años.

China representa el mercado más grande para reguladores de crecimiento de plantas en Asia-Pacífico. El aumento de la población (particularmente los consumidores de clase media), el creciente interés en la sustentabilidad y la popularidad de la agricultura orgánica han creado un mercado atractivo para los reguladores de crecimiento de plantas en el país. Por su parte, los reguladores de crecimiento juegan un papel vital en el avance de la tecnología agrícola, ya que se aplican en los campos para mantener la seguridad alimentaria en Japón, donde existen preocupaciones sobre la sostenibilidad agrícola incluyendo los problemas de escasez de agua pronosticados para 2030.

Europa por su parte, representa el mayor mercado, con un 45% de la cuota del mismo, seguida por norte américa, para la cual se proyecta un crecimiento pues sus compañías requieren de un suministro cada vez mayor de productos de alta calidad. Para esta última se espera un crecimiento del 7,3% en la tasa de crecimiento anual compuesta durante el periodo 2021-2029 gracias al aumento en la conciencia respecto a la salud alimentaria y prácticas de cultivo sustentables. La investigación continua en universidades de los Estados Unidos permite mantener a la industria actualizada sobre los requisitos del producto y los últimos avances en el desarrollo de bioestimulantes. Las tendencias actuales del mercado en el país muestran que la demanda de cultivos de primera calidad va en rápido aumento, sin embargo, los costos de los insumos se están reduciendo, lo que seguirá impulsando el crecimiento del mercado, ayudando a los productores a lograr el equilibrio deseado.

El mercado de hormonas vegetales en el medio oriente y áfrica espera un crecimiento de un 6,6% en la tasa anual compuesta con el constante aumento en la aplicación de estos productos en frutas. Un crecimiento relativamente moderado debido a la limitada área disponible para cultivar.

Latinoamérica por su parte, espera un crecimiento en sus mercados principalmente a causa de la creciente tendencia de implementar prácticas sustentables en agricultura. Esta región se perfila como uno de los futuros líderes en el mercado de bioestimulantes, entre los que destacan aminoácidos, ácidos orgánicos (húmicos y ácido fúlvico), compuestos microbiales y extractos de algas.

Según proyecciones (Dunhamtrimmer, 2020) el mercado de bioestimulantes en esta región alcanzará tasas de crecimiento de 12,71% entre 2020 y 2025 (Tabla 4.1), comparado con el crecimiento esperado de un 12,53% para Asia Pacífico, 10,58% para Europa y de 10,04% para Estados Unidos y Canadá. Aun cuando la principal región para el mercado de bioestimulantes es Europa, los factores de crecimiento se han extendido a todas las regiones.

Tabla 4 1: Estimación en % del crecimiento del mercado de bioestimulantes por región.

Periodo	US/Canadá	Europa	Asia/Pac	LATAM	MENA	R.O.W.	Global
2015-2020	10,42	9,99	11,70	11,72	10,01	13,35	10,97
2020-2025	10,04	10,58	12,53	12,71	9,76	14,97	11,56

Donde R.O.W.: Rest of the world (resto del mundo) y MENA: agrupación de países situados alrededor del medio oriente y el norte de África.

Si bien en América Latina el mercado de bioestimulantes viene ganando más protagonismo en países productores de frutas y hortalizas como Perú y Chile, Brasil es y seguirá siendo el principal mercado en la región.

Junto a Brasil, México presenta índices de crecimiento elevados. Para este caso tanto el mercado local como el norteamericano, muestran un poder adquisitivo alto, lo que implica consumidores dispuestos a pagar por hortícolas fuera de estación y con ciertos aspectos cualitativos diferenciadores, como mayor tamaño, mejor color y contenido de azúcar (Izaguirre, 2021).

4.1.1. Segmentación de mercado.

El mercado actual de las fitohormonas se encuentra muy segmentado en varias categorías, a continuación, se presentan las más relevantes (Forecast, 2023):

Segmentación por tipo de producto: actualmente la citoquinas dominan el mercado global, representando un 40% del total de mercado. Estas son aplicadas en relativamente altas concentraciones durante el periodo de crecimiento y maduración de las plantas para retardar su envejecimiento y regular la senescencia de las hojas. En cuanto a los bioestimulantes, se

estima que un 37,5% son productos originados de algas marinas, seguido por los aminoácidos, en tercer lugar los productos húmicos y poco más del 10% restante en diferentes clases de productos.

Segmentación por tipo de cultivo: El área de frutas y vegetales representa la segunda mayor cuota de mercado, lo que se puede atribuir a que esta es la fracción más grande y dinámica del mercado de los alimentos orgánicos, además del creciente interés respecto a alimentación saludable por parte de los consumidores.

Segmentación por tipo de formulación: aquellos productos en formato gránulos solubles en agua (dispersable en agua) son los que representan una mayor cuota de mercado por sobre productos en solución o polvos húmedos, esto debido a su facilidad de manejo y estabilidad durante distribución y suministro, además de facilidad de aplicación y de combinación con biopesticidas o biofertilizantes para sinergia de beneficios. Se espera por ello que sea el segmento con mayor crecimiento en el mercado de la agricultura.

Segmentación por función: La creciente necesidad por promotores de crecimiento de plantas en varias frutas y verduras para mejorar el proceso de floración y los rendimientos en respuesta al crecimiento de la industria ha determinado su preferencia por sobre aquellos productos con efectos inhibidores.

Segmentación por región: La región Asia-Pacífico espera registrar el mayor crecimiento de la tasa de crecimiento anual compuesto debido al incremento en la implementación de agricultura sustentable y el aumento del consumo de alimentos orgánicos.

Considerando los datos anteriores se determina que el mercado objetivo para este tipo de producto final es la industria de la agricultura, considerando inicialmente una cobertura nacional para los productos que mejor respuesta presenten en las pruebas de terreno, con potencial aplicación en producción de frutas, cereales y hortalizas u otros productores con certificación orgánica.

4.1.2. Escala del mercado objetivo.

De acuerdo a datos de la Encuesta Hortícola INE 2020 y la encuesta de superficie sembrada de cultivos anuales 2020, se estima que la superficie nacional de hortalizas en la temporada 2020/21 es de 92.720 hectáreas, de las cuales 80.392 se dedican principalmente a la producción de hortalizas frescas y el resto a la producción para uso industrial. Sólo el mercado de vegetales frescos alcanza al año 2023 un valor de 2,81 billones de dólares, con una tasa de crecimiento anual esperada del 3,6% al año 2027 (Statista, 2023).

En términos de superficie solo 12 especies abarcan más del 75% de la superficie de hortalizas nacional, siendo las principales: tomate, choclo, cebolla, lechuga y poroto, con cerca del 50% del total. La superficie hortícola presenta una tasa de crecimiento promedio anual para los últimos 5 años (TCPA 5) de 4,2%, lo que equivale a 5.969 hectáreas en ese período.

La Región Metropolitana lidera la producción hortícola nacional, alcanzando el 28,4% de la superficie destinada a ese segmento, le sigue la región de O'Higgins con 15,8% y en tercer lugar la región de Maule que representa el 16,1%.

La superficie de hortalizas, tanto por región como por cultivo, es dinámica, debido a que los grandes productores están especializados y producen ciertos productos bajo contrato, mientras que medianos y pequeños productores adaptan sus superficies de siembra anualmente según los precios de la temporada anterior, demanda relativa, condiciones climáticas y suministro de agua de riego (Villagrán, 2023).

4.2. Situación actual de Reguladores de crecimiento.

4.2.1. Principales productores en el mundo.

El mercado mundial de reguladores del crecimiento vegetal está muy fragmentado, con un gran número de empresas que ofrecen una amplia gama de reguladores de crecimiento vegetal. Sin embargo, el mercado está experimentando una fuerte competencia entre los principales actores como BASF, Corteva, Bayer y Syngenta. Estas empresas disfrutan de una sólida posición en el mercado en términos de ventas, red de distribución y reputación de marca para sus agroquímicos. El mercado global también está integrado con una gran cantidad de pequeños y medianos fabricantes. FMC Corporation, Tata Chemicals, Dhanuka Agritech, Nufarm y Valent Biosciences son otros actores importantes. El mercado está presenciando un gran número de lanzamientos de nuevos productos y expansiones geográficas de marcas existentes. El enfoque del fabricante se centra en el desarrollo de formulaciones orgánicas para satisfacer la creciente demanda de los consumidores y los organismos de protección ambiental (BlueWeave, 2020).

Actores clave:



Figura 35: Actores clave en el mercado mundial de Brasinoesteroides.

En cuanto a la producción de Brasinoesteroides se distinguen dos procesos: extracción natural y síntesis artificial. Desde su extracción y aislación a principios de 1980, se han desarrollado diversas de patentes, la más destacada es la de la empresa Chengdu Newsun Crop Science Co., primera empresa en obtener Brasinoesteroides naturales mediante extracción direccional enzimática y otras nuevas tecnologías. El producto de Brasinoesteroide 14-hidroxilado fue registrado oficialmente en ICAMA (Institute for the Control of Agrochemicals) de China por primera vez en 2017 junto con el primer registro en el mundo de su industrialización (Dan et al, 2018).

Las investigaciones sobre la síntesis artificial de análogos de Brasinoesteroides buscan la producción industrializada, a gran escala y de bajo costo como alternativa a la extracción del compuesto debido a su baja concentración en medios naturales. En la actualidad, los análogos de Brasinoesteroides sintéticos que han obtenido el registro de plaguicidas en China incluyen: 24-epibrassinólido, 28-homobrassinólido, 28-epihomobrassinólido, 22, 23, 24-trisepibrassinólido y propionil-brasinólido. Sus actividades biológicas difieren según sus variaciones estructurales.

Como regulador de crecimiento de plantas de amplio espectro y altamente activo, el Brasinoesteroide 14-hidroxilado se ha convertido en un bioproducto con gran popularidad en el mercado de reguladores de crecimiento, debido a su actividad fisiológica única, amplio rango de aplicación, dosis baja, alta seguridad y efectos significativos de aumento de rendimiento y ganancias. Al mismo tiempo, con el incremento de la demanda por productos agrícolas de calidad, el desarrollo verde de la agricultura global, la promoción e implementación de estrategias de desarrollo de seguridad alimentaria y bioseguridad, los Brasinoesteroides desempeñarán un papel cada vez más importante en la promoción del desarrollo agrícola verde de alta calidad. Además, con el avance innovador en la tecnología en forma de cristal de los Brasinoesteroides y las características de su mayor actividad biológica y seguridad, se espera que lidere el desarrollo tecnológico de la industria de los Brasinoesteroides y desempeñe un rol más importante en la solución de los problemas de estrés abiótico global y seguridad alimentaria (Yuzhu et al, 2022).

4.2.2. Principales productores a nivel nacional.

En la actualidad existen al menos 70 empresas de bioinsumos en Chile, con un mercado nacional estimado de aproximadamente 150 millones de dólares, y un ritmo de crecimiento anual de entre el 12 y el 14% (Aldunate, 2023).

Entre las empresas más destacadas en nuestro país en la producción de bioestimulantes es posible mencionar:

ADAMA Chile, anteriormente conocida como Chile Agro, se especializa en el desarrollo, producción y comercialización de bionutrición vegetal y productos fitosanitarios en Chile, siendo uno de sus productos más destacados ExpertGrow®, un bioestimulante de triple modo

de acción para aumentar el rendimiento en una variedad de frutas y verduras, basado en un proceso de fermentación patentado que mejora la fotosíntesis de la planta, lo que reduce el estrés abiótico y mejora la retención de frutos/vainas y el crecimiento de la planta. Entre su portafolio de productos ofrece herbicidas, fungicidas, insecticidas, reguladores de crecimiento y productos de nutrición vegetal (Adama, 2023).

Otra empresa corresponde a Syngenta Chile, la cual ofrece, entre otros productos de uso agrícola, una gama de productos bioestimulantes y reguladores de crecimiento, algunos de los cuales contienen como compuesto activo un complejo nutricional en base al alga *Ascophyllum nodosum* (Syngenta, 2023).

La empresa IONA, fabricante de insumos orgánicos para nutrición vegetal, agricultura y jardinería, como abonos, adherente foliar, bioestimulantes y reguladores de crecimiento, ofrece productos que contienen análogos de Brasinoesteroides en su formulación, bajo el nombre comercial de BRASINOST-1, con aplicaciones para incrementar el rendimiento y calidad de las cosechas en hortalizas, cereales y especies forestales; y B-2000, recomendado principalmente para árboles frutales como uvas, cítricos, carozos, paltos, olivos, berries, manzanos, almendros, entre otros (Iona, 2023).

La empresa MIP-Agro, dedicada a la importación, desarrollo y comercialización de insumos agrícolas orgánicos, socios y representantes en Chile de Grupo Rovensa (líder en Bioestimulantes), ofrece también un producto que incluye Brasinoesteroides en su formulación. El producto BRASSTEC, Bioestimulante en base a extractos de algas (*Ascophyllum nodosum*) y Brasinoesteroides naturales, ofrece tras aplicación mejora de color, calidad y uniforma la terminación de la fruta. Se caracteriza además por producir estimulación del crecimiento vegetativo y radicular, así como también aumentos en el rendimiento, la producción de biomasa y una maduración más rápida de los frutos (MIP-agro, 2023).

4.2.3. Especificaciones de producto.

Actualmente se comercializa Brasinólida tanto natural (extraída de polen de canola mediante tecnología de hidrólisis enzimática) o sintética en distintas concentraciones. De acuerdo al estándar de la industria agrícola, se entiende comercialmente por Brasinólida® los siguientes compuestos (Agents, 2017):

- 24-epibrassinolide (síntesis química)
- 22, 23, 24-epibrassinolide (síntesis química)
- 28-epibrassinolide (síntesis química)
- 28-homobrassinolide (síntesis química)
- 14-hydroxylated Brassinosteroid (extracción de fuente natural)

Chengdu Newsun Crop Science Co., Ltd., Siguan, China comercializa el producto como promotor de crecimiento y rendimiento para cultivos, extraída desde polen de flores de la especie *Brassica* (Focus Technology Co., 2023).



Figura 36: 14-hydroxylated Brassinosteroid (Natural brassinolide) 90% TC® producida por Newsun.

Otro productor es Senyo, quien comercializa 14- hydroxylated Brassinosteroid® producida en forma sintética, en distintos formatos: 95% TC, 90% TC, 70% TC 0,15% SP y GA3 + BR 45 g/L SL (mezcla con giberelina). El producto tiene las siguientes especificaciones (Henan Senyo Industry Co., 2023):

Tabla 4.2: Especificaciones comerciales de producto 14- hydroxylated Brassinosteroid®

Característica	valor
Apariencia	Polvo blanco
pH	5,0-8,0
CAS	78821-43-9
Formato	Bolsa de 100 g, 1 kg (grado técnico) y 25 Kg por tarro (grado SP)



Figura 37: Producto 24-epibrassinolide (Brassinolide) plant growth accelerator® en polvo en sus formatos de 100 g (a) y 1 kg (b), producido por Senyo.

Otro producto comercializado como regulador de crecimiento vegetal es 14-Hydroxylated Brassinosteroid (Natural brassinolide) 90% Tc-Plant Hormone® producido por Jinan Tianbang y consiste en una mezcla de 22,23,24-Epibrassinolide 0,0003% + 24-Epibrassinolide 0,0097% de ingrediente activo, en formato 100-200 ml para formulación líquida o 100g – 25 kg para formulación sólida (Jinan Tianbang Chemical Co., 2023).



Figura 38: 14-Hydroxylated Brassinosteroid (Natural brassinolide) 90% Tc Plant Hormone® producido por Jinan Tianbang, formato 200 mL.

4.3. Consumo de Reguladores de crecimiento.

4.3.1. Principales usos.

Los principales usos de los reguladores de crecimiento vegetal son variados, e incluyen aplicaciones en una amplia gama de productos tales como frutas y verduras, césped y plantas ornamentales, cereales y granos, aceite y semillas, entre otros. Las principales frutas que utilizan bioestimulantes son manzanas, plátanos, uvas, mango, sandía, piña, kiwi y para el caso de verduras son el pepino, la lechuga, la espinaca, el repollo, la calabaza entre otras. También se utilizan para aumentar el rendimiento de la caña de azúcar mediante el incremento de la longitud de las células y la tasa de división celular, lo que da como resultado una mayor producción de azúcar (Grand View Research, 2020).

En términos generales, los reguladores de crecimiento son empleados en la agricultura con múltiples propósitos, como: promover una maduración temprana y homogénea, reducir la floración, mejorar el color y la calidad de la fruta, disminuir el “russeting”, atrasar la madurez, mejorar la conservación, incrementar la emisión de ramas laterales, alterar la forma de los frutos y disminuir su caída antes de la cosecha (Halder, 2021).

El segmento césped y plantas ornamentales se compone de césped, plantas de vivero, plantas y flores ornamentales, plantas de jardín, plantas de invernadero, entre otras. En ellas los bioestimulantes tienen aplicaciones para iniciar y mantener el crecimiento del césped, prevenir el cambio de color durante condiciones de estrés por frío, reducir la frecuencia de poda, aumentar el grosor de la planta y mejorar la calidad general del césped (Kisvarga et al, 2022).

Otro de los usos es el tratamiento de semillas para aumentar su vigor durante las etapas de crecimiento, pues la producción de semillas eficientes y de alta calidad es crucial para obtener mejores rendimientos de cultivos. Semillas tratadas presentan mejor actividad en suelo, mejorando el enraizamiento además de protegerlas contra enfermedades y plagas (Biostimulants Market, 2022).

4.3.2. Patrón de consumo.

La necesidad de los productores de incrementar la resistencia de las plantas al estrés y de optar por un sistema productivo intensivo, junto a la mayor disponibilidad del consumidor de pagar por un cultivo de calidad, se han convertido en los principales factores que impulsan el crecimiento del consumo de bioestimulantes.

La implementación de sistemas productivos intensivos está ganando relevancia debido a la necesidad de incrementar la productividad agrícola. A la par, existe la necesidad de ser más eficientes y sostenibles en la producción agrícola para hacer frente a la escasez de recursos naturales y el cambio climático.

En razón de lo anterior, durante los últimos años se han promulgado políticas favorables para el mercado de bioestimulantes. Con el fin alcanzar un sistema alimentario justo, saludable y que no perjudique el medioambiente al año 2050, la Comisión de la Unión europea presentó la estrategia ‘Farm to Fork’, que busca una producción y consumo más sostenible de alimentos, estableciendo objetivos en el uso de pesticidas y fertilizantes, y el aumento de la superficie destinada a cultivos orgánicos, en línea con la Estrategia de Biodiversidad 2030.

La estrategia propuesta por la UE busca reducir en un 50% el uso de pesticidas químicos promoviendo el uso de productos biológicos, así como disminuir en un 50% las pérdidas de nutrientes, reducir en un 20% el uso de fertilizantes y lograr que al menos un 25% de la producción de las tierras agrícolas de la UE adquieran certificación ecológica.

Respecto a América Latina, Brasil lanzó recientemente su nueva Política Nacional de Bioinsumos, que promueve el uso de bioestimulantes en los cultivos en el país. De esa forma, se busca fomentar la fabricación de productos biológicos y promover las acciones encaminadas a estimular la producción, procesado, distribución, marketing y consumo de bioinsumos. Actualmente en el país más de 2 millones de hectáreas utilizan bioinsecticidas y más de 40 millones de hectáreas implementan promotores de crecimientos y bacterias (Izaguirre, 2021).

La mayor predisposición de los consumidores por cultivos de alta calidad, pero que a la vez respeten el medio ambiente, continuará siendo en un futuro uno de los principales drivers de crecimiento del mercado de bioestimulantes.

4.3.3. Importación de Reguladores de crecimiento.

Si bien la base de datos de comercio exterior de la Odepa (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias) no informa datos de importaciones para reguladores de crecimiento para los últimos cinco años, existen otras referencias menos recientes, pero que de igual forma permiten concluir sobre el patrón de consumo de este tipo de productos en el mercado nacional.

Entre los años 2009 y 2011, Chile importó un total de 184 fitorreguladores, entre los cuales se identificaron 98 reguladores de crecimiento diferentes. En ese mismo período se importó un total de US\$ 8.0465.432,29 valor CIF, desde diversos países de procedencia, marcas y empresas compradoras. La importación de estos insumos ha ido creciendo de manera sostenida, registrando durante los años 2009, 2010 y 2011, una importación de: US\$ 21.307.760, US\$ 27.737.365 y US\$ 31.420.307 valor CIF respectivamente. El país de procedencia que tuvo mayor participación es Estados Unidos, del cual se registraron US\$ 19.279.070 valor CIF para el año 2011. Las empresas que se posicionaron como grandes importadoras de reguladores de crecimiento son Valent Biosciences Chile S.A. y Rohm and Haas, las que juntas representaron un 57,3% del total de las empresas importadoras para ese mismo año. En relación con las principales marcas importadas, Agrofresh-f finalizó el 2011

con una importación total de US\$ 8.007.548,23 valor CIF, seguida por Sunny con US\$ 2.750.291 valor CIF y Retain con US\$1.932.078 valor CIF. Las importaciones chilenas de reguladores de crecimiento deberían seguir en aumento, ya que estos insumos ofrecen una amplia gama de beneficios a distintos productores, mejorando los procesos de producción y la calidad final del producto (Fuenzalida, 2012).

4.4. Estudio de precios de reguladores de crecimiento.

No existe suficiente información pública en referencia al precio de los reguladores de crecimiento, pues la mayor parte de los datos se ofrecen en reportes de pago de carácter financiero y orientados al negocio y la inversión. Sin embargo, es posible estudiar cuales son los precios de los productos más destacados dentro del país para determinar cuál es la competencia a la que se enfrentará un potencial nuevo participante en el mercado.

La siguiente tabla resume el valor de los productos *B-2000*, *BRASINOST-1* y *Brasstec*, actualizados a abril de 2023:

Tabla 4.3: Precio, formato y componentes de los productos que contienen análogos de Brasinoesteroides ofrecidos en el mercado nacional.

Producto	Componentes	Formato	Precio
	- (25R)-3β, 5-Dihidroxi-5α- espirostan-6-ona: 0,002% p/V	Botella de 1 Litro	\$36.100
	- (25R)-3β, 5- Dihidroxiespirostan-6-ona: 0.002% p/V - Sulfato de magnesio heptahidratado: 10% p/V	Botella de 1 Litro	\$31.900



- Análogo: No informa
- Materia orgánica: 4,84% p/p

Envases de
1, 5 y 20
Litros

Entre
\$25.832 y
\$28.253,75
por litro
(dependiendo
del formato)

4.5. Limitaciones y desafíos.

Comercialización de productos de baja calidad: la falta de transparencia en protección de patentes de algunos países ha llevado a la prevalencia de productos de baja calidad. Aun cuando el mercado de bioestimulantes tiene pocas barreras de entrada y permite la competencia de variados productores, la naturaleza del mercado se ha fragmentado en cuotas pequeñas de participantes. Esto ha sido un factor importante en la introducción de productos de baja calidad en el mercado por parte de productores locales o regionales, para aprovecharse de los beneficios de una demanda creciente. Los precios bajos de estos productos fabricados a pequeña escala resultan atractivos para pequeños agricultores.

Falta de diversidad de productos: Formulaciones de productos similares para varios competidores reduce la fidelidad del consumidor, así como el valor de la marca del producto. Esto debe resolverse con el desarrollo de productos innovadores (más que nada en formulación, aplicación o mecanismo de acción) que actúen sobre un amplio rango de cultivos, expandiendo la presencia de los actores más allá del mercado regional.

Barreras regulatorias: si bien la disposición de varias organizaciones gubernamentales está abierta a fomentar el uso de nuevas tecnologías en la agricultura, los bioestimulantes aún no están estandarizados y categorizados en todo el mundo. La disyuntiva entre clasificar productos como para “protección de plantas” o “nutrición de plantas” dificulta la homologación y venta de productos en diferentes regiones. A veces, las leyes no están claramente definidas, lo que crea desafíos de interpretación y genera confusión y, por lo tanto, aumenta las complejidades para las empresas que comercializan productos para los cultivos. Para consolidar un marco regulatorio la European Biostimulants Industry Consortium (EBIC) ha trazado directivas basadas en sugerencias de productores e investigaciones con el fin de evitar que los productos deban enfrentar repetitivos procesos de registro bajo las respectivas regulaciones de cada país (Biostimulants Market, 2022).

4.6. Análisis de mercado.

4.6.1. Análisis FODA.

El análisis de fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas asociado a los análogos de Brasinoesteroides se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4.4: Análisis FODA para mercado de análogos de Brasinoesteroides.

Fortalezas	Debilidades
Alta eficacia en mejorar rendimiento de cultivos	Alto costo de producción
Amplia variedad de aplicaciones	Lenta penetración en el mercado
Oportunidades	Amenazas
Demanda creciente en el mercado objetivo	Regulaciones lentas y políticas estrictas asociadas
Disponibilidad de materias primas económicas para su producción	Competición con otros reguladores de crecimiento vegetal.
	No existen estudios de ingeniería publicados que permitan escalar producción

4.6.2. Análisis PESTEL.

Factores políticos: Los factores políticos juegan un rol muy importante en el éxito de los mercados, y el de análogos de Brasinoesteroides no es la excepción. Las políticas de gobierno, regulaciones y acuerdos comerciales influyen en gran medida en el mercado; los aranceles o barreras comerciales pueden aumentar el costo de las importaciones y exportaciones, lo que puede tener un impacto directo en el precio del producto y rentabilidad del negocio.

Factores económicos: considera factores como la inflación, los tipos de cambio de divisas y las políticas fiscales. Aumentos en la inflación pueden generar aumentos de los precios, lo que podría tener un efecto negativo en la demanda. De manera similar, los tipos de cambio de divisas pueden influir en el costo de las importaciones y exportaciones.

Factores sociales: los factores como las preferencias y tendencias de los consumidores pueden tener un impacto significativo en el mercado de los BRs. Como se mencionó anteriormente, existe un aumento en la conciencia sobre los beneficios de la alimentación saludable y el interés por la industria de encontrar procesos más sustentables, lo que podría traducirse en un aumento de la demanda del producto.

Factores tecnológicos: los avances en biotecnología pueden generar procesos de producción más eficientes y generar productos de mayor calidad. Así mismo, los avances en la tecnología de distribución pueden ayudar a mejorar la eficiencia y, a su vez, el alcance del mercado.

Factores ambientales: considera el impacto del cambio climático y la contaminación. Si, como se prevé, el clima cambia y las temperaturas aumentan, se podría generar un aumento en la demanda de Brasinólida (1) o sus análogos para mejorar la resistencia de los cultivos. Lo mismo aplica si aumentan los niveles de contaminación.

Factores Legales: incluye factores como la legislación y las reglamentaciones. Cambios en las regulaciones de un país que incentiven la aplicación de reguladores de crecimiento impactan directamente en la demanda del producto. En Chile, en particular, se ha actualizado recientemente la normativa sobre regulación de fertilizantes y bioestimulantes, estableciendo directrices sobre parámetros de calidad, composición, envasado y etiquetado, entre otros, asociados a la importación, exportación, fabricación y comercialización de los mencionados (Bcn, 2021).

4.6.3. Análisis de 5 fuerzas de Porter.

Amenaza de nuevos participantes: La amenaza de nuevos participantes en el mercado es baja. Esto principalmente debido a los altos costos de investigación y desarrollo asociados con la producción de análogos de Brasinoesteroides. Además, el mercado ya está dominado por algunos actores clave que tienen una fuerte presencia en el mercado, por lo que los nuevos participantes pueden tener dificultades para establecerse en él.

Amenaza de sustitutos: La amenaza de sustitutos es baja. Esto se debe a que los análogos de Brasinoesteroides son productos únicos que ofrecen una amplia gama de beneficios, no disponibles en ningún otro producto. Además, no hay otros productos que puedan ofrecer el mismo nivel de rendimiento, haciendo que este producto sea altamente competitivo.

El poder de negociación de los proveedores: El poder de negociación de los proveedores es bajo. La producción de análogos de Brasinoesteroides requiere una serie de materias primas específicas que no están fácilmente disponibles en el mercado. Como tal, los proveedores tienen un poder de negociación limitado y no tienen mucha influencia sobre los precios de las materias primas.

Poder de negociación de los consumidores: El poder de negociación de los consumidores es alto. Esto se debe a que hay cada día más proveedores que ofrecen productos en bases a análogos de Brasinoesteroides de alta calidad y los clientes pueden comparar productos y precios para encontrar la mejor oferta. De esta forma, los clientes tienen un gran poder de negociación y por ende alta incidencia en los precios del producto.

Rivalidad competitiva: La rivalidad competitiva es alta debido a que, como se mencionó en el punto anterior, hay una serie de proveedores que ofrecen productos en bases a análogos de Brasinoesteroides y que compiten por la cuota de mercado. Los proveedores entonces deben

esforzarse constantemente por ofrecer los mejores productos a los precios más competitivos para destacar sobre la competencia.

4.7. Proyecciones.

4.7.1. Proyecciones de consumo y producción.

La reciente pandemia ha tenido un impacto positivo en el crecimiento del mercado de reguladores de crecimiento vegetal a causa de una mayor conciencia en nutrición saludable, lo que se traduce en una mayor demanda de productos orgánicos. A su vez, el Covid-19 ha obstaculizado el crecimiento a causa de las restricciones de importación y exportación en todo el mundo, pero a medida que el mundo reestablece la normalidad y las operaciones se recuperan del impacto de la pandemia, el crecimiento del mercado también se recupera.

Debido a los estudios de efectos residuales (principalmente potenciales reacciones alérgicas u otras afecciones relacionadas al consumo de alimento) y pruebas de campo, el proceso de aprobación de las patentes es estricto y conlleva mucho tiempo (el promedio para aprobar un nuevo producto de este tipo va de 5 a 10 años), lo cual restringe el crecimiento del mercado. Además, la exclusividad y la protección de patentes son esenciales para incentivar inversiones futuras y recuperar los costos de investigación y desarrollo. Lo anterior sumado a los altos costos de producción dan como resultado un aumento en los precios del producto, siendo la consiguiente disminución del margen de beneficio otra limitante del crecimiento del mercado.

Otro desafío para el crecimiento del mercado es la falta de conocimiento respecto a los reguladores del crecimiento entre los agricultores en cuanto a aplicación, efectos y resultados deseados. Canales de distribución apropiados podrían ayudar a los agricultores a adquirir conocimientos relacionados con los bioestimulantes y los efectos positivos que su aplicación tiene en los cultivos.

En cuanto a las oportunidades para el crecimiento del mercado es posible mencionar la disponibilidad de mejores recursos financieros, el mayor acceso de los agricultores a los bioestimulantes y el aumento de las inversiones en el sector agrícola (Markets, 2020).

4.7.2. Nuevas tecnologías.

El polimorfismo (dos o más estados sólidos de una sustancia) de las sustancias sólidas está presente en muchos compuestos y, al igual que las sustancias inorgánicas, las sustancias con formas cristalinas diferentes tienen propiedades diferentes. El polimorfismo de una sustancia afecta directamente a su eficacia, seguridad y calidad, un consenso en el campo de la farmacéutica (Bolla et al, 2022).

En términos generales, un compuesto tiene múltiples formas cristalinas, pero la tecnología de producción en forma de cristal no es sencilla para todos, y no todas las formas de cristal presentan actividad biológica. Entre todos los compuestos de Brasinoesteroides, el

Brasinoesteroide 14-hidroxilado cuenta con la investigación más completa sobre los factores químicos que pueden inducir el polimorfismo, incluidos el tipo de solvente, cantidad, proporción, saturación, etc. y los factores físicos, como la temperatura, la presión, la velocidad, la humedad, etc. Para este compuesto fue posible obtener la forma de cristal dominante capaz de regular significativamente el crecimiento de las plantas. En comparación con otros compuestos de Brasinoesteroides, sus actividades biológicas son más de un 50 % más rápidas, lo que resuelve los problemas de otros compuestos de Brasinoesteroides actualmente en el mercado, como efecto lento, seguridad inestable y actividad biológica variable (Yuzhu et al, 2022). Sus efectos son evidentemente apreciables de 3 a 5 días tras la aplicación, con efectos muy importantes y consistentes en el aumento del rendimiento de los cultivos, promoción del crecimiento, resistencia al estrés, mejora de la calidad y sabor de los productos agrícolas y mejora de la fotosíntesis de las plantas.

En 2022, la patente de la forma cristalina de Brasinoesteroide natural desarrollada originalmente por Chengdu Newsun obtuvo con éxito la aceptación de patente internacional PCT (Patent Cooperation Treaty), lo que significa que la tecnología podrá acceder a protección de propiedad intelectual en muchos países.

4.7.3. Etapas previas a comercialización.

Antes de la masificación de los análogos de Brasinoesteroides como producto final en el mercado hace falta cumplir con varios aspectos relevantes que permitan no solo asegurar su calidad, la seguridad de aplicación y su eficiencia, sino también el cómo se llevará a cabo una producción en masa que permita satisfacer una determinada demanda. Las etapas por seguir para que los productos puedan ser comercializados en el mercado agrícola y de agroquímicos son las siguientes:

- Validación de la aplicación de los nuevos análogos de BRs a través de pruebas en terreno para distintas especies, para determinar concentración óptima de aplicación, respuesta de cada especie con particular énfasis en variaciones en rendimiento del cultivo y respuesta al estrés.
- Escalar la síntesis química de los análogos a escala piloto preferentemente mediante empresas asociadas. Esta etapa contempla la elección de la tecnología y método de producción apropiado, determinación de aspectos técnicos como cinéticas de reacción y estudio de condiciones óptimas para maximizar rendimiento y validar resultados obtenidos en etapa previa.
- Escalar la producción desde escala piloto a escala industrial, que permita un rendimiento comercialmente viable y un sistema de producción seguro, que logre el cumplimiento de las necesidades de mercado.
- Llevar a cabo un estudio económico que abarque alternativas de financiamiento, estrategia de comercialización y modelo de negocio para determinar si un determinado proyecto es económicamente viable.

5. Conclusiones

- A través de la ruta propuesta de nueve etapas, fue posible sintetizar nuevos análogos de Brasinoesteroides a partir del ácido hiodeoxicólico (**15**), logrando la obtención de tres compuestos finales benzoilados: **45a**, **45b**, y **45c**, cada uno de los cuales fue caracterizado mediante el empleo de técnicas espectroscópicas combinadas de IR, ¹H y ¹³C NMR, 2D ¹H-¹³C HSQC, HMBC y HRMS.
- Mediante el test de inclinación de la lámina de arroz se determinó que todos los análogos **45a**, **45b**, y **45c** promueven la elongación celular a una concentración de 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M, a pesar de que ninguno resulta superior en comparación con **1**.
- En las pruebas *in vivo* el compuesto **45b** genera efectos similares a **1** (control positivo) en los parámetros fisiológicos altura de hojas, largo de hojas y longitud raíz principal, estudiados a una concentración de aplicación de 1×10^{-6} M, mientras que los compuestos **45c** y especialmente **45a** muestran inhibición del crecimiento de las plantas. Por su parte, el compuesto **21**, utilizado como un segundo control positivo, exhibe resultados iguales o superiores a **1**, especialmente en el aumento de rendimiento de peso de follaje.
- En relación a la cuantificación de pigmentos relacionados a la fotosíntesis, las plantas tratadas con los compuestos **21** y **45b** producen mayor cantidad de carotenos que **1** (control positivo) y el triple que el control negativo. Las plantas tratadas con el compuesto **45b** muestran los mayores niveles de clorofila.
- Los nuevos análogos de Brasinoesteroides tipo 24-Nor-colanos funcionalizados en carbono C-23 con grupos benzoatos 4-sustituidos al ser aplicados de forma exógena estimulan el crecimiento vegetal bajo condiciones de hidroponía, siendo el más destacado el compuesto **45b**, que tiene acoplado el átomo de halógeno más voluminoso.
- Sin embargo, entre el total de análogos evaluados, aquellos que presentan mayor actividad biológica son los compuestos que no tienen grupo halógeno acoplado al anillo aromático (**44a** en pruebas *in vitro*) ni grupo benzoato en la cadena lateral (**21** en pruebas *in vitro* e *in vivo*). Es decir, los compuestos menos voluminosos son los que presentan mayor actividad biológica, ejerciendo efectos incluso superiores a la Brasinólida natural (**1**), por lo que poseen mayor potencial para convertirse en posibles bioestimulantes.
- Finalmente, los resultados del estudio de mercado muestran que los análogos de BRs pueden tener participación en el mercado de estimulantes de crecimiento vegetal, satisfaciendo una demanda en constante crecimiento, impulsada por la necesidad de desarrollar prácticas sustentables en agricultura, el cambio climático, la demanda creciente de alimentos, y el interés de los consumidores por acceder a alimentos de mejor calidad. No obstante, los principales obstáculos que enfrentan los productos en base a BRs son la competencia con otros bioestimulantes, la falta de información técnica respecto a producción a escala industrial, y regulaciones poco expeditas.

6. Bibliografía.

- A.-S. Vaidya, S.-M. D.-S. (1968). Degradation of bile acid side chain with lead Tetraacetate. . *Tetrahedron Lett*, 5173-5174.
- Adama. (2023). *adama.com*. Obtenido de <https://www.adama.com/chile/es/products/crop-protection?f%5B0%5D=treatment%3A586>
- Agents, G. (2017). *www.gold-agents.com*. Obtenido de <https://www.gold-agents.com/product.aspx?id=14038769>
- Ainoa Planas-Riverola, A. G.-P.-D. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. doi:<https://doi.org/10.1242/dev.151894>
- AK Scientific, I. (2023). *aksci.com*. Obtenido de <https://aksci.com/>
- al, Y. X. (2014). Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: Discovery of a novel neuroinflammation inhibitor. *Bioorganic Med. Chem. Lett*, 1222–1227.
- Aldunate, F. (9 de Agosto de 2023). *biologicalslatam.com*. Obtenido de <https://biologicalslatam.com/issue-07/el-mercado-de-bioinsumos-en-chile-busca-saltar-a-nuevas-etapas-de-innovacion-y-desarrollo/>
- Andrzej Bajguz, M. C. (2020). Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections. *Plant Physiology*. Obtenido de <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01034>
- Aurosikha Swain, S. C. (2021). Hydroponics in vegetable crops: A review. *the pharma innovation*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/357825388_Hydroponics_in_vegetable_crops_A_review
- Back, T., & and Pharis, R. (2003). Structure–activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 350-361.
- Bajguz, A., & and Tretyn, A. (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 1027-1046.
- Bancos S, N. T. (2002). Regulation of transcript levels of the Arabidopsis cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology*, 504-513.

- Barbora Slavikova, L. K. (2008). Brassinosteroids: Synthesis and Activity of Some Fluoro Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*.
- Bcn. (2021). *Ley Chile*. Obtenido de <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1162023&idVersion=2022-09-27>
- Beinhauer, M. D.-M. (1989). *Germany Patente n° DE4039017A1*.
- BlueWeave. (2020). *Global Plant Growth Regulators Market Reaching a New Pinnacle—Projected to Reach worth USD 11.2 Billion in 2027*.
- Boado, C. M. (2011). *ESTUDIO TEÓRICO DE LAS INTERACCIONES DE LOS BRASINOESTEROIDES CON EL MEDIO BIOLÓGICO*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Boylan, C. (9 de Novembre de 2020). *psci princeton university*. Obtenido de <https://psci.princeton.edu/tips/2020/11/9/the-future-of-farming-hydroponics>
- Brosa, C., & and Miró, X. (1997). Synthesis of new brassinosteroids with epoxy functions: The effect on the regioselectivity of the Baeyer-Villiger Reaction. *Tetrahedron*, 11347–11354.
- Carsten Mussig, G.-H. S. (2003). Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 1261-1271. Obtenido de www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.028662.
- Carvajal, C., González, C., Olea, A., Fuentealba, M., & and Espinoza, L. (2018). Synthesis of 2-deoxybrassinosteroids analogs with 24-nor, 22(S)-23-dihydroxy-type side chains from hyodeoxycholic acid. *Molecules*, 1306.
- Casaretto, M. J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. En F. S. Cardemil, *Fisiología vegetal*.
- Cerny, V., Strnad, M., & and Kaminek, M. (1986). Preparation of 2 α ,3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23,24-dinor-b-homo-5 α -cholanic acid, its esters and amides as brassinolide analogues, *Collect. . Czechoslov. Chern*, 687–697.
- Cerny, V., Zajíčka, J., & and Strnad, M. (1987). 2 α ,3 α -Dihydroxy-7-oxa-6-oxo-B-homo-5 α -pregnan-21-oic acid and its derivatives as brassinolide analogues, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun*, 215–222.
- Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroids. *The arabidopsis book*. doi:10.1199/tab.0151
- Cumsille, F. J. (2012). *Importaciones chilenas de reguladores de crecimiento para el período 2009-2011*. Documentos de titulación de pregrado de Agronomía,

Universidad Mayor. Obtenido de <http://repositorio.umayor.cl/xmlui/handle/sibum/1031>

- Díaz, K., Espinoza, L., Carvajal, R., Conde-González, M., Niebla, V., Olea, A., & and Coll, Y. (2020). Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs. *Int. J. Mol. Sci*, 1832.
- Díaz, K., Espinoza, L., Carvajal, R., Silva-Moreno, E., Olea, A., & Rubio, J. (2020). Aplicación exógena de análogos de tipo brasinoesteroide 24-norcolano 22(S)-23-dihidroxi para mejorar la tolerancia al estrés por déficit de agua en *Arabidopsis thaliana*. *t. J. Mol. ciencia* . Obtenido de <https://doi.org/10.3390/ijms22031158>
- Dunhamtrimmer. (2020). *Global Biostimulant Report*. Obtenido de <https://dunhamtrimmer.com/products/biostimulant-global-market-report/>
- Eduardo Hernández Silva, I. G.-M. (2016). Brasinoesteroides en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7. Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n2/2007-0934-remexca-7-02-00441.pdf>
- Edward M Turk, S. F. (2005). BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *The plant journal*. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02358.x>
- Epdata. (2022). *Epdata*. Obtenido de <https://www.epdata.es/datos/tendencias-poblacion-mundo-datos-graficos/411?accion=1>
- Espinoza, L. C. (2002). Síntesis y Actividad Biológica de Análogos de Brasinoesteroides. *. Bol. Soc. Chil. Quím.* , 511-516.
- Espinoza, L., Oyarce, J., Aitken, V., Gonzalez, C., Ferrer, K., Olea, A., & and Parella, T. (2019). Synthesis and structural determination of new brassinosteroid 24-Nor-5 α -cholane type analogs. *Molecules*, 4612.
- Esteban gesto, K. h. (2021). Avances en el desarrollo de un sistema de Monitoreo y Control de un Módulo de Producción de Cultivos Hidropónicos para regiones de latitudes César prado. *Congreso Argentino de Agroinformática*. Obtenido de https://49jaiio.sadio.org.ar/pdfs/cai/CAI_11.pdf
- Falces, J. I. (7 de septiembre de 2022). *Agronews Castilla y León*. Obtenido de <https://www.agronewscastillayleon.com/mayo-2022-los-precios-que-pagan-agricultores-y-ganaderos-suben-un-38-mientras-que-los-importes-que>
- FAO. (2017). *El futuro de la alimentación y la agricultura: tedencias y desafíos*. Obtenido de (www.fao.org/publications)

- FAO, F. O. (2021). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2021*. Roma. Obtenido de <https://doi.org/10.4060/cb4474es>
- FAO, F. U. (2021). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2021*.
- FAO, W. (2022). GLOBAL FERTILIZER MARKETS AND POLICIES. Obtenido de https://www.wto.org/english/news_e/news22_e/igo_14nov22_e.pdf
- Ferrer, K., Díaz, K., Kvasnica, M., Olea, A. F., Cuellar, M., & Espinoza, L. (2021). Ferrer, K.; Díaz, K.; Kvasnica, Synthesis of New Brassinosteroid 24-Norcholane Type Analogs Conjugated in C-3 with Benzoate Groups Molecules. *Molecules*, 1173.
- Focus Technology Co., L. (2023). *Made-In-China*. Obtenido de <https://young1982.en.made-in-china.com/product/SKoJIEVHguhR/China-14-Hydroxylated-Brassinosteroid-Natural-brassinolide-90-Tc.html>
- Forecast, m. d. (2023). *www.marketdataforecast.com*. Obtenido de <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/plant-hormones-market>
- Futatsuya, S. 4.-S. (1988). *European Patent Office Patente n° EP0315921A1*.
- Garcia, O. B. (2011). *Canada Patente n° CA2828237C*.
- Geetha Bolla, B. S. (2022). Crystal Engineering of Pharmaceutical Cocrystals in the Discovery and Development of Improved Drugs. *ACS publications*. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00987>
- Gilles Billen, L. L.-C. (2018). Opening to Distant Markets or Local Reconnection of Agro-Food Systems? Environmental Consequences at Regional and Global Scales. En *Agroecosystem Diversity. Reconciling contemporary agriculture and environmental quality*. doi:10.1016/B978-0-12-811050-8.00025-X
- Gimenez, J. B. (2015). *CULTIVO EN HIDROPONÍA*. Editorial de la universidad de la plata.
- Google. (2022). *Google patents*. Obtenido de <https://patents.google.com>
- Gray, W. M. (2004). Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *PLoS Biology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020311>
- Gupta, S. (2023). *www.marketresearchfuture.com*. Obtenido de <https://www.marketresearchfuture.com/reports/plant-hormones-market-5112>
- Hakim Manghwar, A. H. (2022). Brassinosteroids (BRs) Role in Plant Development and Coping with Different Stresses. *International journal of molecular science*. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/ijms23031012>

- Halder, S. (2021). Role of Phytohormones and Growth Regulators in Fruit Crops. En S. Rout, *Agriculture and Forestry: Current Trends, Perspectives, Issues - II*. immortal publications.
- Henan Senyo Industry Co., L. (2023). *m.senyochem.com*. Obtenido de <http://m.senyochem.com/crop-protection-series/plant-growth-hormone/24-epibrassinolide-br-cas-72962-43-7.html>
- Héqí míng, r. d. (2021). *China Patente n° CN114276399A*.
- Herforth, A. B. (2020). *Cost and affordability of healthy diets across and within countries. Background paper for The State of Food Security and Nutrition in the world 2020*. FAO. Obtenido de <https://doi.org/10.4060/cb2431en>
- Holleman, C. R. (2020). The impact of climate variability and extremes on agriculture and food security - An analysis of the evidence and case studies. doi:<https://doi.org/10.4060/cb2415en>
- Hsing-Yi Li, H.-M. W. (20 de julio de 2017). Rice Lamina Joint Inclination Assay. *bio-protocol*, 7. doi:0.21769/BioProtoc.2409
- Huang, L. F. (1994). Studies on steroidal plant-growth regulators. Part 33. Novel method for construction of the side-chain of 23-arylbrassinosteroids via Heck arylation and asymmetric dihydroxylation as key steps. . *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 3581-3586.
- Hussain A, A. Q. (2012). *Recennt advances in plant in vitr culture* (Vol. 1). Intechopen.
- Ibarrola, M. d. (Octubre-Diciembre de 2006). Los brasinoesteroides. Una nueva clase de hormonas vegetales. *Ciencia*, 57(4).
- Iglesias-Arteaga, M., Pérez-Gil, R., Pérez-Martínez, C., & and Coll-manchado, F. (2001). Spirostanic analogues of teasterone. Synthesis, characterisation and biological activity of laxogenin, (23S)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin). *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 261–266.
- *infoagronomo.net/*. (s.f.). Obtenido de <https://twitter.com/interesagro/status/1491214191742840832>
- Iona. (2023). *Iona chile*. Obtenido de <https://ionachile.cl/>
- Izaguirre, M. R. (22 de Diciembre de 2021). *redagricola*. Obtenido de <https://www.redagricola.com/cl/los-drivers-detras-del-crecimiento-del-mercado-de-bioestimulantes/>

- J. D. Baacha, J. K. (1967). ALKENES FROM ACIDS BY OXIDATIVE DECARBOXILATION. *tetrahedron*.
- Jana Oklestková, L. R. (2013). Brassinosteroids and their Biological Activities. *Researchgate*. doi:10.1007/978-3-642-22144-6_174
- JAY K. KOCHI, J. D. (1968). Solvent Effects on the Oxidation of Alkyl Radicals by Lead(IV) and Copper(II) Complexes. *The journal of organic chemistry*.
- Jinan Tianbang Chemical Co., L. (2023). *chinapesticidefactory.com*. Obtenido de <https://www.chinapesticidefactory.com/showroom/14-hydroxylated-brassinosteroid-natural-brassinolide-90-tc-plant-hormone.html>
- Joaquín Azcón-Bieto, M. T. (2013). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill.
- Johan Steven, J. A. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal.
- Jordán, M. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En F. S. Cardemil. Obtenido de <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Jung Eek Son, H. J. (2016). Hydroponic Systems. En *Plant Factory* (págs. 213-221).
- Katy Díaz, L. E.-G. (2020). Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs. *International journal of molecular science*. doi:<https://doi.org/10.3390%2Fijms21051832>
- Khripach, V. A. (2000). Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI Century. . *Annals of Botany*, 441-447.
- Kohout, L., Chodoundká, H., Macek, T., & and Strnad, M. (2000). Synthesis of (20S)-2 α ,3 α -dihydroxy-6-oxo-7-oxa-7 α -homo-5 α -pregnane-20-carboxylic acid as a brassinosteroid part of ligand for binding to affinity, Collect. *Czech. Chem. Commun*, 1754–1761.
- Kojiro Wada, S. M. (s.f.). A Rice Lamina Inclination Test—A Microquantitative Bioassay for Brassinosteroids. *Agricultural and Biological Chemistry*, 719-726. doi:10.1080/00021369.1984.10866208
- Krahmer, U. K. (1983). *United Kingdom Patente n° GB2127022A*.
- Kuriyama, S. G. (1994). *European Patent Office Patente n° EP0702027A1*.

- Kvasnica, M., Korinkova, P., Bazgier, V., Oklestkova, J., Rarova, L., & and Strnad, M. (2017). Synthesis of novel aryl brassinosteroids through alkene cross-metathesis and preliminary biological study. *Steroids*, 46-55.
- Kvasnica, M., Oklestkova, J., Bazgier, V., Rárová, L., Korinkova, P., Mikulík, J., . . . and Strnad, M. (2016). Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8691-8701.
- L. Espinoza, M. C. (2002). Síntesis y actividad biológica de dos nuevos análogos de brasinoesteroides funcionalizados en el anillo C. . *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 335-347.
- L. G. Wade, j. (2004). *Química orgánica* (Quinta ed.). Pearson, Prentice Hall.
- Lagomarsino, V. (26 de Septiembre de 2019). *Science in the news*. Obtenido de <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2019/hydroponics-the-power-of-water-to-grow-food/>
- Li Yuzhu, H. J. (20 de Septiembre de 2022). *news.agropages.com*. Obtenido de <https://news.agropages.com/News/NewsDetail---44061.htm>
- López, S. (13 de Febrero de 2018). *revistalimentaria*. Obtenido de <https://revistaalimentaria.es/agricultura/alimentacion-especial/soluciones-energeticas-con-biomasa-en-la-industria-alimentaria>
- M. Ishiguro, N. I. (1975). Stereochemistry of electrophilic reactions at the steroidal C-22 double bond. *Chem. Pharm. Bull*, 2860-2866.
- Marco Grigatti, M. E. (2007). Compost-based growing media: influence on growth and nutrient use of bedding plants. *Elsevier Science*. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.016
- María Isabel Durán, C. G. (2017). Synthesis of Five Known Brassinosteroid Analogs from Hyodeoxycholic Acid and Their Activities as Plant-Growth Regulators. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:doi:10.3390/ijms18030516
- Market, B. (2022). *Biostimulants markets by active ingredient, mode of applications, form, crop type and region - Global forecast to 2027*.
- Markets, F. (2020). *www.globenewswire.com*. Obtenido de <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2020/07/28/2068349/0/en/Global-Plant-Growth-Regulators-Market-Is-Expected-to-Reach-USD-11-00-Billion-by-2027-Fior-Markets.html>
- Melo, C. (2021). *upa.utem.cl*. Obtenido de <https://upa.utem.cl/2021/12/01/crisis-hidrica-en-chile-repensar-la-forma-de-hacer-agricultura/>

- MIP-agro. (2023). *mipagro.cl*. Obtenido de <https://www.mipagro.cl/productos/brasstec/>
- Moore, S. (2020). *AZO life science*. Obtenido de <https://www.azolifesciences.com/article/A-Guide-to-Plant-Hormones.aspx>
- MordorIntelligence. (2020). *MERCADO DE BIOESTIMULANTES: CRECIMIENTO, TENDENCIAS, IMPACTO DE COVID-19 Y PRONÓSTICOS (2023 - 2028)*.
- Moreira, J. C. (2011). Estudio teórico de las interacciones de los brasinoesteroides con el medio biológico.
- Mostafa M. Abdelkader, M. S. (2021). THE INFLUENCE OF BIOSIMULANTS ON TOMATO PLANTS CULTIVATED UNDER HYDROPONIC SYSTEMS. *Journal of Horticultural Research*. doi:10.2478/johr-2021-0012
- Nga T. Nguyen, S. A.-C. (2016). Hydroponics: A Versatile System to Study Nutrient Allocation and Plant Responses to Nutrient Availability and Exposure to Toxic Elements. doi:doi:10.3791/54317
- Nguyen, N. M.-C. (2016). Hydroponics: A Versatile System to Study Nutrient Allocation and Plant Responses to Nutrient Availability and Exposure to Toxic Elements. *Journal of Visualized Experiments*, 113. doi:10.3791/54317
- Nitza Soto, C. G. (2020). Epimeric Mixtures of Brassinosteroid Analogs: Synthesis, Plant Growth, and Germination Effects in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Agronomy*. doi:doi:10.3390/agronomy10060808
- ODEPA. (2017). *AGRICULTURA CHILENA, REFLEXIONES Y DESAFÍOS AL 2030*. Obtenido de https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/01/ReflexDesaf_2030-1.pdf
- Oklestkova, J., Kvasnica, M., Bazgier, V., Rarova, L., Berka, K., & and Strnad, M. (2014). Biological activities of new monohydroxylated brassinosteroid analogues with a carboxylic group in the side chain. *Steroids*, 58–64.
- Qu Ping Ping, G. Y. (2015). *China Patente n° CN105494372A*.
- Rafael Salgado Garciglia, M. A. (2008). Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la *Biología*.
- *Redagícola*. (2 de Noviembre de 2017). Obtenido de <https://www.redagricola.com/cl/fitohormonas-reguladores-de-crecimiento-y-bioestimulantes/>

- Ren Dan, J. Y. (2018). Plant growth regulator 14-hydroxylated brassinosteroid. *Pesticide Science and Management*.
- Renu Bhardwaj, H. K. (2006). Brassinosteroids - A Novel Group of Plant Hormones. Obtenido de <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fwww.worldcat.org%2Ftitle%2Fplant-molecular-physiology-current-scenario-future-projections-festschrift-in-honour-of-prof-cp-malik%2Foclc%2F297508390>
- Research, G. V. (2020). *Plant Growth Regulators Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Cytokinins, Auxins), By Region (North America, Europe, Asia Pacific, RoW), Vendor Landscape, And Segment Forecasts, 2012 - 2020*.
- Research, G. V. (2020). *Plant Growth Regulators Market Size, Share, PGR Industry Report 2020*.
- Roberto S. Velázquez-González, A. L.-G.-Z.-S.-S. (2022). A Review on Hydroponics and the Technologies Associated for Medium- and Small-Scale Operations. *Agricultura*.
- Rodríguez-Delfina, A. (2012). Advances of Hydroponics in Latin America. Lima, Perú.
- Runkova, L. V. (1999). The action of epin on taking roots of perspective varieties of roses. *Agricultural Academy*,, 245-246.
- Russinova, E. (2017). *Brassinosteroids methods and protocols*. Humana press.
- Sairam, R. K. (1994). Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions on two wheat varieties. *Plant Growth Regulators*, 173-181.
- Salvatore Gaetano Verdoliva, D. G.-J. (2021). Controlled comparisons between soil and hydroponic systems reveal increased water use efficiency and higher lycopene and β -carotene contents in hydroponically grown tomatoes. *Scientia Horticulturae*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109896>
- Sato, H. T. (1988). *Japan Patente n° JPH01313401A*.
- Seerat Jan, Z. R. (2020). Hydroponics – A Review. *ijemas*. Obtenido de <https://doi.org/10.20546/ijemas.2020.908.206>
- Senft, R. (26 de Septiembre de 2019). *sitn.hms.harvard.edu*. Obtenido de <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2019/hydroponics-the-power-of-water-to-grow-food/>

- Seto, H. F. (1998). Epimerization at C-5 of brassinolide with sodium methoxide and the biological activity of 5-epibrassinolide in the rice lamina inclination assay. . *Journal of Chemistry Society*, 3355-3358.
- Seto, H. F. (1999). 2,3,5-Triepi-brassinolide: preparation and biological activity in rice lamina inclination test. . *Phytochemistry*, 815-818.
- Shozo Fujioka, A. S. (1997). Brassinosteroids. *Natural Product Reports*. doi:<https://doi.org/10.1039/NP9971400001>
- Singh, S. (2022). *Hydroponics Market by Type (Aggregate systems and Liquid systems), Equipment, Input (Nutrients and Grow media), Crop Type (Vegetables, Fruits, Flowers), Farming method (Indoor and Outdoor), Crop area, and Region - Global Forecast to 2027*. Obtenido de <https://www.researchandmarkets.com/reports/5239111/hydroponics-market-by-type-aggregate-systems-and#product--description>
- Skoog, H. N. (2001). *Principios de análisis instrumental* (Quinta ed.). Mc Graw Hill.
- Soto, N., Ferrer, K., Díaz, K., González, C., Taborga, L., F. Olea, A. F., . . . and Espinoza, L. (2021). Synthesis and Biological Activity of New Brassinosteroid Analogs of Type 24-Nor-5 β -Cholane and 23-Benzoate Function in the Side Chain. . *Int. J. Mol. Sci.*, 4808.
- Sotomayor, N. B. (2017). *United States Patente n° US10440954B2*.
- Sowmya Ranganathapura Sathyanarayana, W. V. (2022). Hydroponics: An Intensified Agriculture Practice to Improve Food Production. *J-Stage*, 101-114. doi:https://doi.org/10.7831/ras.10.0_101
- Statista. (Marzo de 2023). www.statista.com. Obtenido de <https://www.statista.com/outlook/cmo/food/vegetables/fresh-vegetables/chile>
- Stoevska, V. (9 de Septiembre de 2020). ilostat.ilo.org. Obtenido de <https://ilostat.ilo.org/es/covid-19-is-driving-up-food-prices-all-over-the-world/>
- Susana Bustos, L. G. (2015). *La megasequía 2010-2015: una lección para el futuro*. Obtenido de <https://www.cr2.cl/wp-content/uploads/2015/11/informe-megasequia-cr21.pdf>
- Syngenta. (2023). www.syngenta.cl. Obtenido de <https://www.syngenta.cl/product/crop-protection/acadian>
- Szilvia Kisvarga, D. F. (2022). Effects of Biostimulants in Horticulture, with Emphasis on Ornamental Plant Production. *Agronomy*. doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy12051043>

- T., B. T., B., M., A., M., & S., M. (2019). Comparative Studies On Yield And Quality Response Of Soil And Soiless Grown Tomatoes: The Case Study Of Masiphathisane Community Project And Bathurst Experimental Farm. *South African Journal of Agricultural Extension*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.17159/2413-3221/2019/v47n4a527>
- Takao Yokota, T. O. (2017). Occurrence of brassinosteroids in non-flowering land plants, liverwort, moss, lycophyte and fern. *Phytochemistry*, 46-57. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.020>
- Temmem, O., Uguen, D., De Cian, A., & Gruber, N. (2002). Toward a total synthesis of brassinosteroids; structure assessment of the Ireland-Claisen products of geranyl and neryl esters. *Tetrahedron Lett*, 3169–3173. doi:10.1016/S0040-4039(02)00515-4
- Temmem, O., Zoller, T., & Uguen, D. (s.f.). Toward a total synthesis of brassinosteroids; stereoselective generation of the hydrindane ring system. . *Tetrahedron Lett*, 3181–3184 . doi:10.1016/S0040-4039(02)00517-8
- V. A. Khripach, V. N. (1998). Brassinosteroids: a New Class of Plant Hormones. *Academic Press, 1st*.
- Villagrán, M. M. (2020). *Hortalizas: vaivén de precios*. Obtenido de https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/70559/Hortalizas_Vaiven_de_precios.pdf
- Villagrán, M. M. (28 de Abril de 2020). *odepa.gob.cl*. Obtenido de <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletin-de-hortalizas-abril-2020>
- Villagrán, M. M. (2021). *Tomate: una especie de exportación*. Odepa, Departamento de Política Sectorial y Análisis de Mercado . Obtenido de <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71089/ArtTomate202109.pdf>
- Villagrán, M. M. (27 de Enero de 2023). *Odepa.gob.cl*. Obtenido de <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-hortalizas-enero-2023>
- Vladimir Khripach, V. Z. (2000). Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of botany*, 441-447. Obtenido de <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1227>
- Wang Ling, H. S. (2018). *China Patente n° CN108739158A*.
- Wendeborn, S., Lachia, M., Jung, P., Leipner, J., Brocklehurst, D., Mesmaeker, A., & and Mondiere, R. (2017). Biological activity of Brassinosteroids-direct comparison of known and new analogs in planta, *Helvetica Chimica Acta*. 1–42.

- Worldbank. (12 de Julio de 2017). *Banco mundial*. Obtenido de <https://www.bancomundial.org/es/topic/water-in-agriculture#1>
- W-S., Z., & and Huang, L.-F. (1994). Studies on steroidal plant- growth regulators. Part 33. Novel method for construction of the side-chain of 23-arylbrassinosteroids via Heck arylation and asymmetric dihydroxylation as key steps. *Journal Chemical Society*, 3579-3585.
- *www.bancomundial.org*. (24 de Mayo de 2022). Obtenido de <https://www.bancomundial.org/es/topic/agriculture/brief/food-security-update>
- Xiao Jian Xia, Y. Z. (2009). Brassinosteroids promote metabolism of pesticides in cucumber. *J Agric Food Chem*. doi:10.1021/jf901915a
- Yang, Y.-X. Z.-T.-J.-K.-C.-L.-C.-C. (2014). Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: Discovery of a novel neuroinflammation inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1222-1227.
- Yokota, T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science*, 137–143.
- Yokota, T. (1999). *Brassinosteroids*. In: Hooykaa. *Bsiochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. London: Hall, M.A., Libbenga, K.R. (Eds.).
- Zhi-Yong Wang, M.-Y. B.-Y. (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annual review of genetics*. Obtenido de <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163450>
- Zhou, W. J. (1997). *Peop. Rep. China. Patente n° CN 1184113*.
- Zhou, W. T. (1984). The Synthesis of Steroids Containing Structural Unit of A, B Ring of Brassinolide and Ecdysone from Hyodesoxycholic Acid. . *Acta Chimica Sinica (Chinese edition)*, 1173-1177.
- Zhou, W.-S. (1989). The Synthesis of Brassinosteroid. . *Pure & App/. Chem*, 431-434.
- Zhou, W.-S. H.-F. (1992). Studies on Steroidal Plant-growth Regulator 25. Concise Stereoselective Construction of Side Chain of Brassinosteroid from the intact Side Chain of hydeoxycholic acid: Formal Syntheses of Brassinolide, 25-methylbrassinolide, 26, 27-Bisnorbrassinolide . *Tetrahedron*, 1837-1852.
- Zhou, W.-S. J.-Z.-S.-Y. (1988). Studies on Steroidal Plant-growth Regulator: VII. Synthesis of 2 α , 3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23, 24-dinor-B-homo-5 α -cholanolic acid and 2 α , 3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-24-nor-B-homo-5 α -cholanolic acid. . *Acta Shimica Sinica*, 332-340.

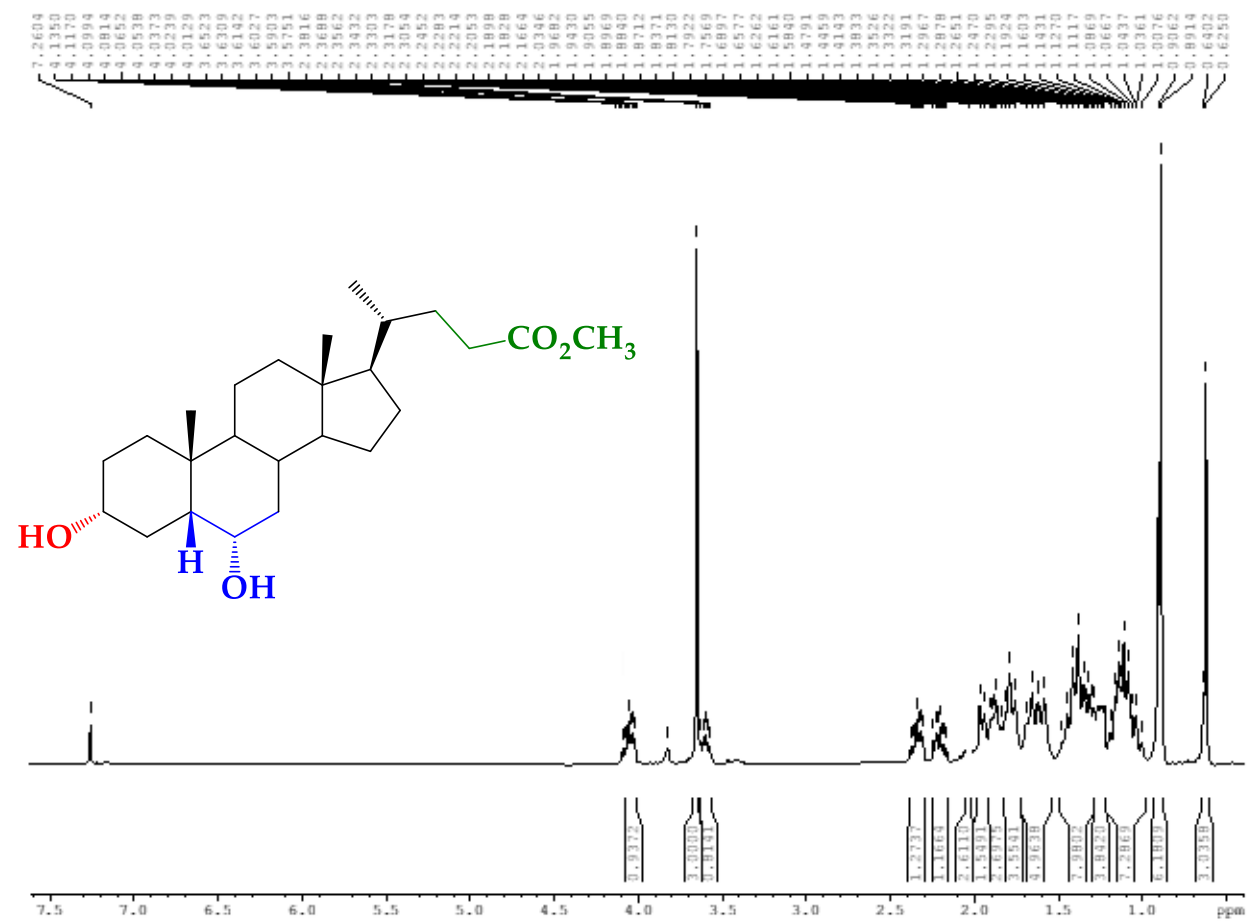
- Zhou, W.-S. T.-S. (1985). Studies on Steroidal Plant-growth Hormones II: Stereoselective Synthesis of (22s,23s)-typhasterol from Hyodeoxycholic acid. . *Acta Shimica Sinica* . , 1060-1067.
- Zhou, W.-S., & and Tian, W.-S. (1989). Studies on Steroidal Plant-Growth Hormones IX. The Preparation of 22R-and 22S-24, 25, 26, 27, 28-Penta-Nor-Brassinolides. *Acta Chimica Sinica*, 1017–1021.
- Zicong Li, Y. H. (2020). Roles of Brassinosteroids in Plant Reproduction. *Int J Mol Sci*. doi:<https://doi.org/10.3390%2Fijms21030872>
- Zienab F. R. Ahmed, A. K. (2021). Evaluation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Production under Hydroponic System: Nutrient Solution Derived from Fish Waste vs. Inorganic Nutrient Solution. *Horticulturae*. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/horticulturae7090292>

7. Anexos

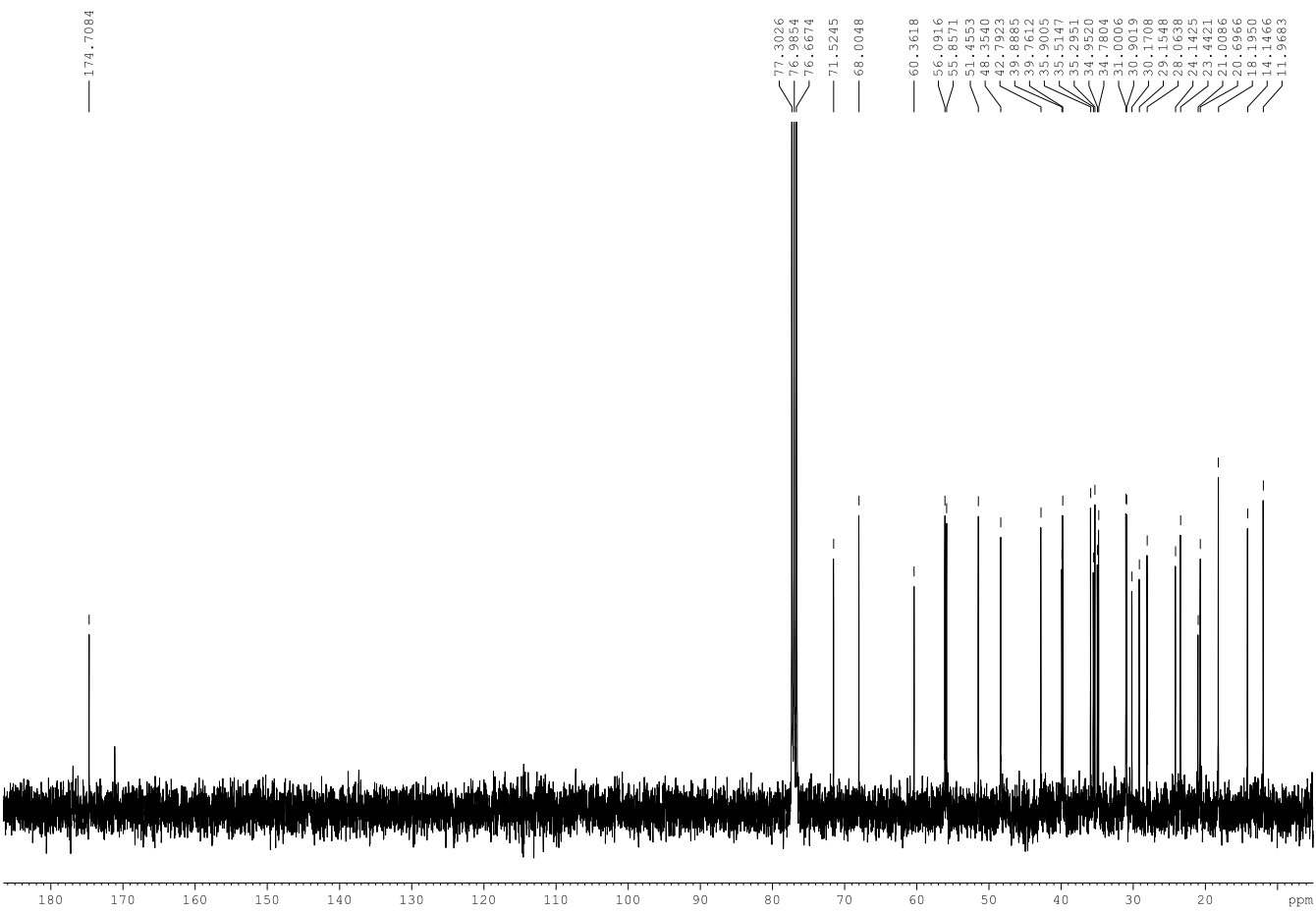
Anexo 1: Espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC

Anexo 1.A: Espectros compuesto 3a, 6a-dihidroxi-5β-colan-24-oato de metilo (46).

Espectro ¹H RMN

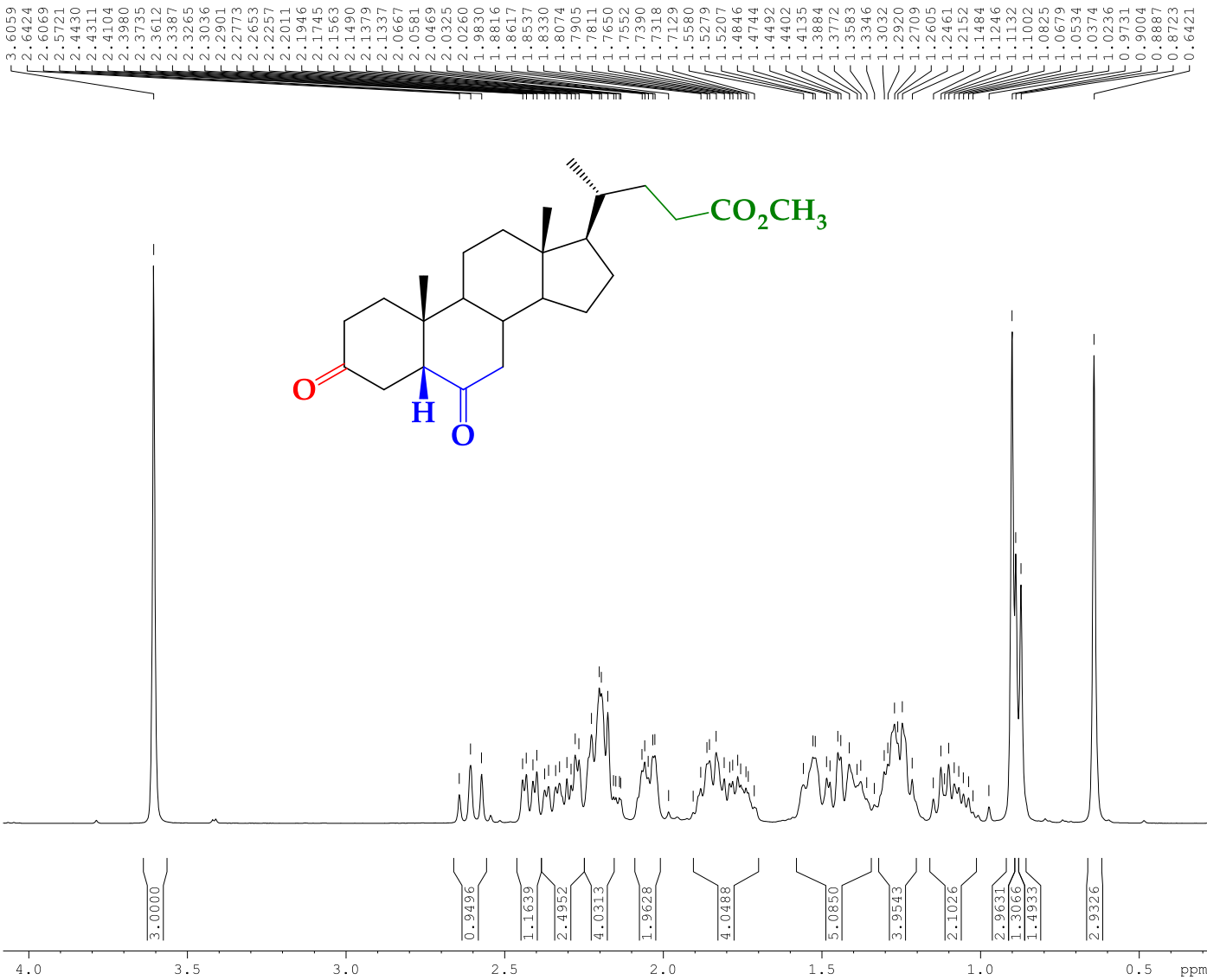


Espectro ¹³C RMN

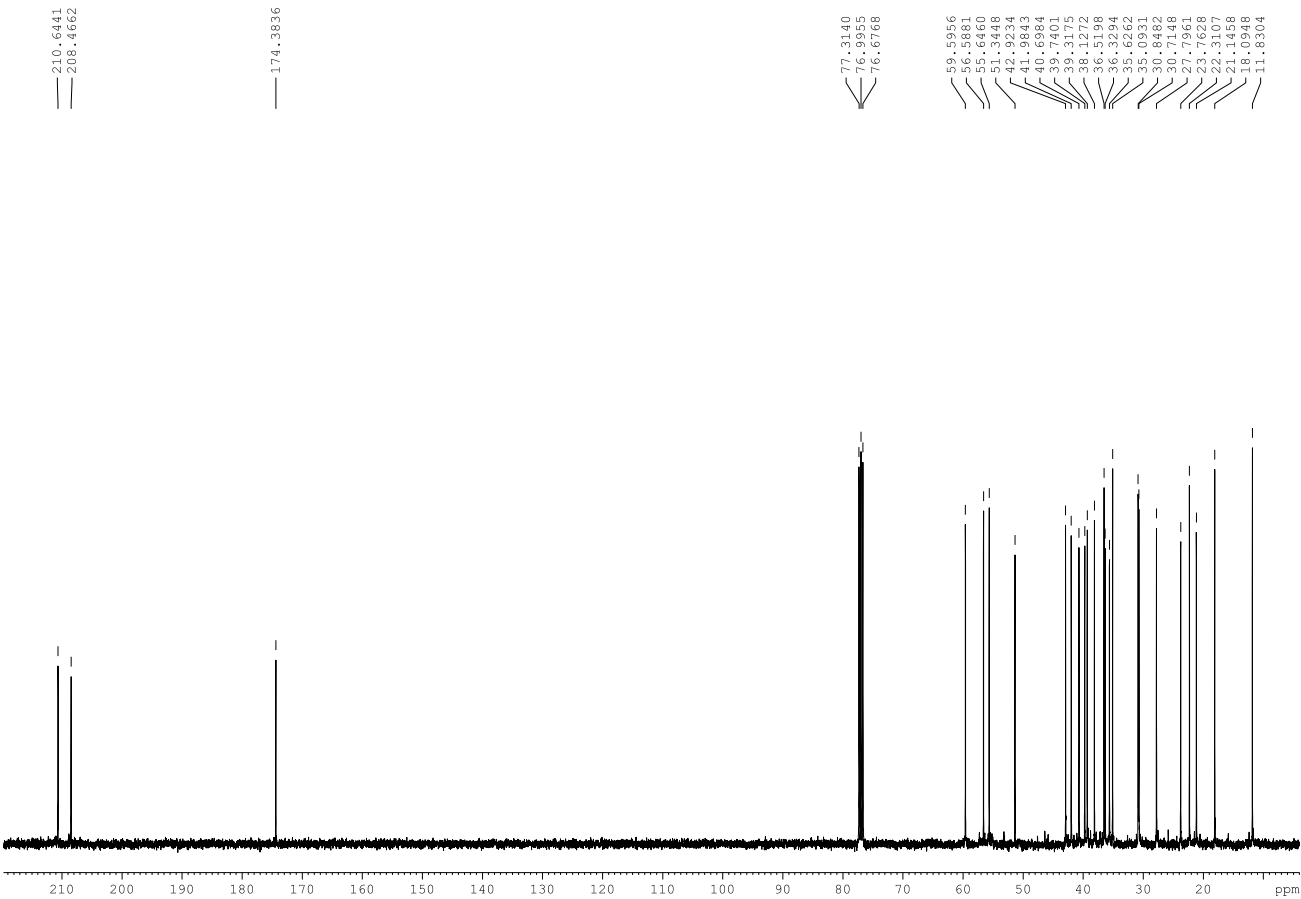


Anexo 1.B: Espectros compuesto 3, 6-dioxo-5β-colan-24-oato de metilo (47).

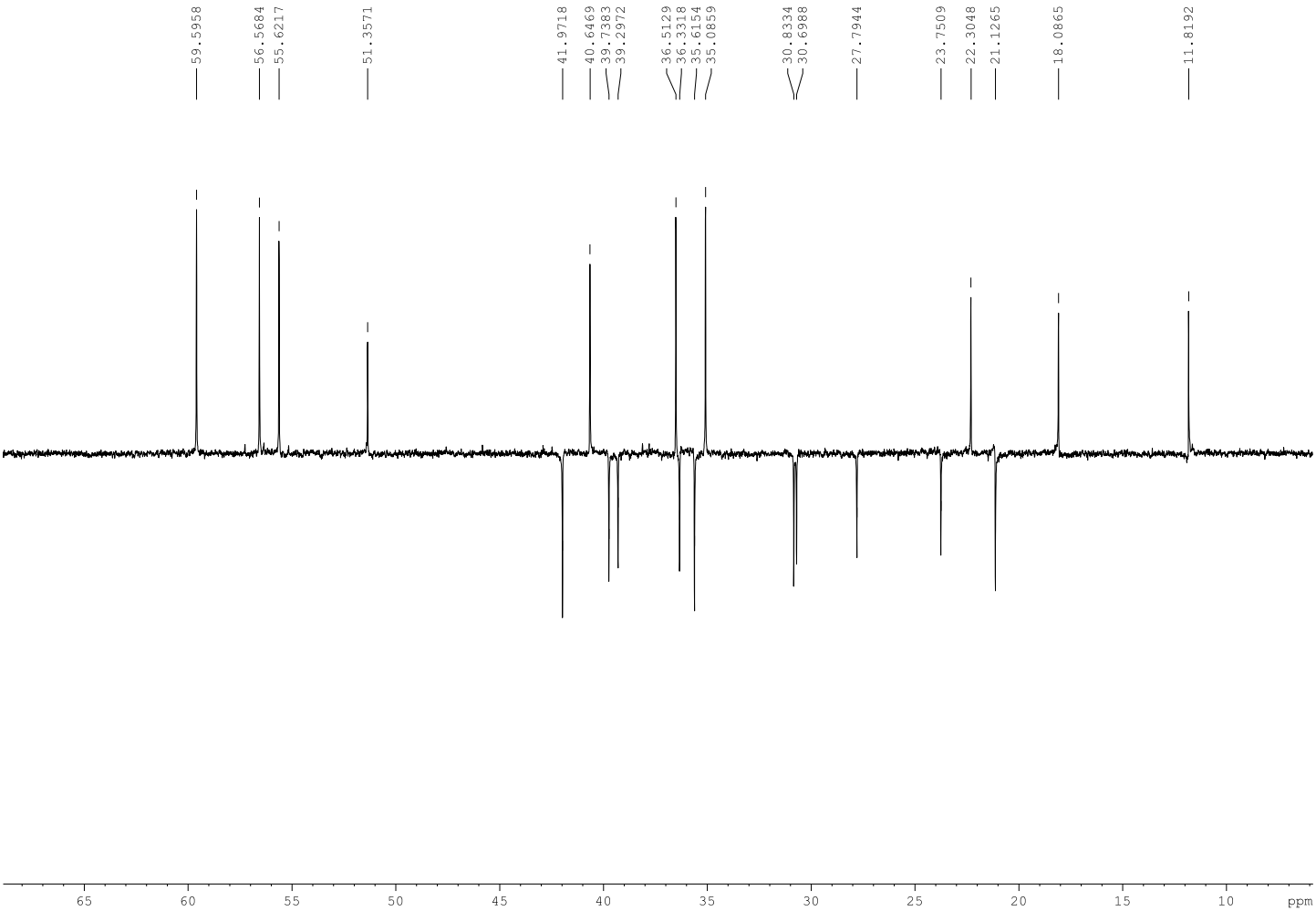
Espectro ¹H RMN



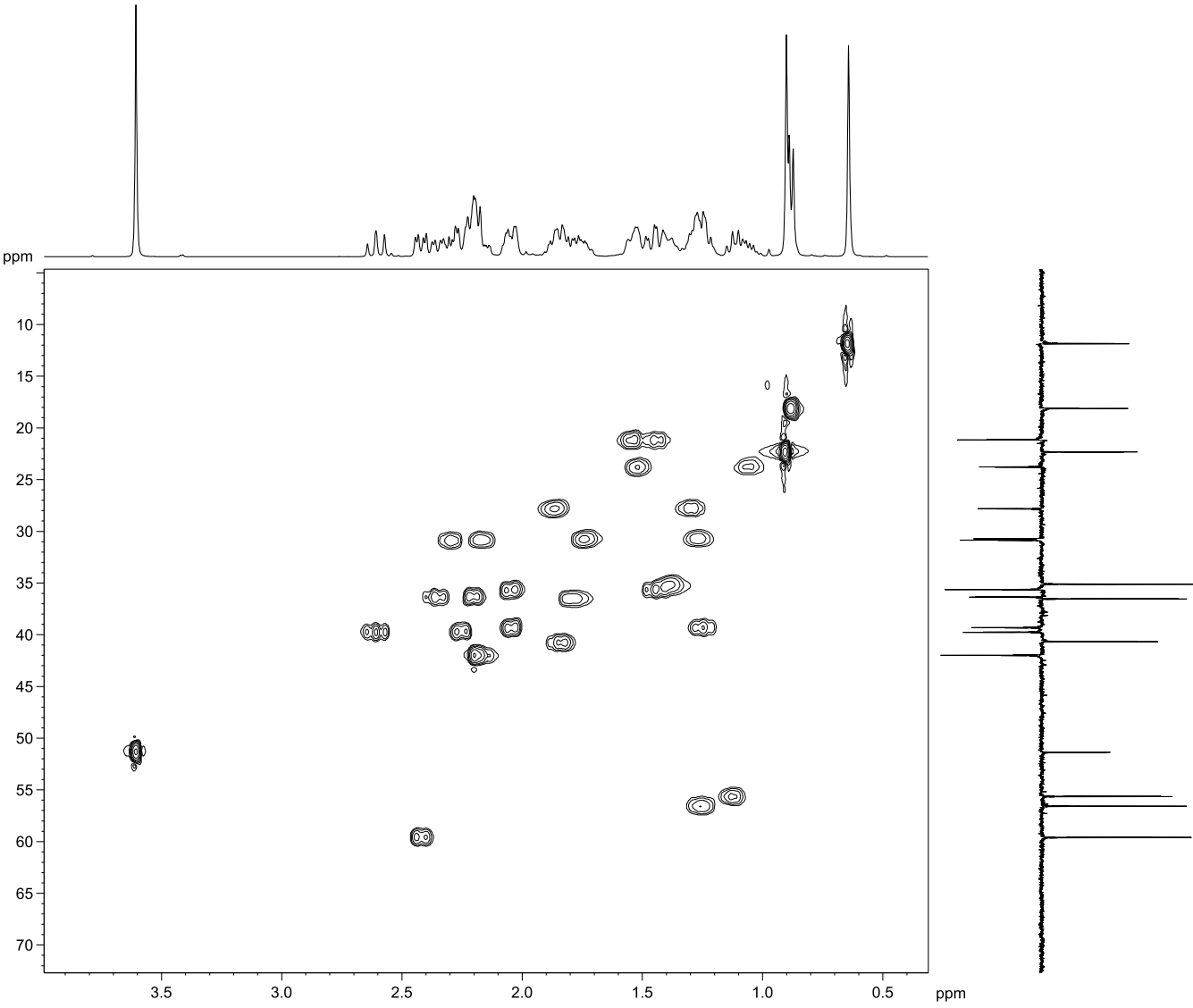
Espectro ¹³C RMN



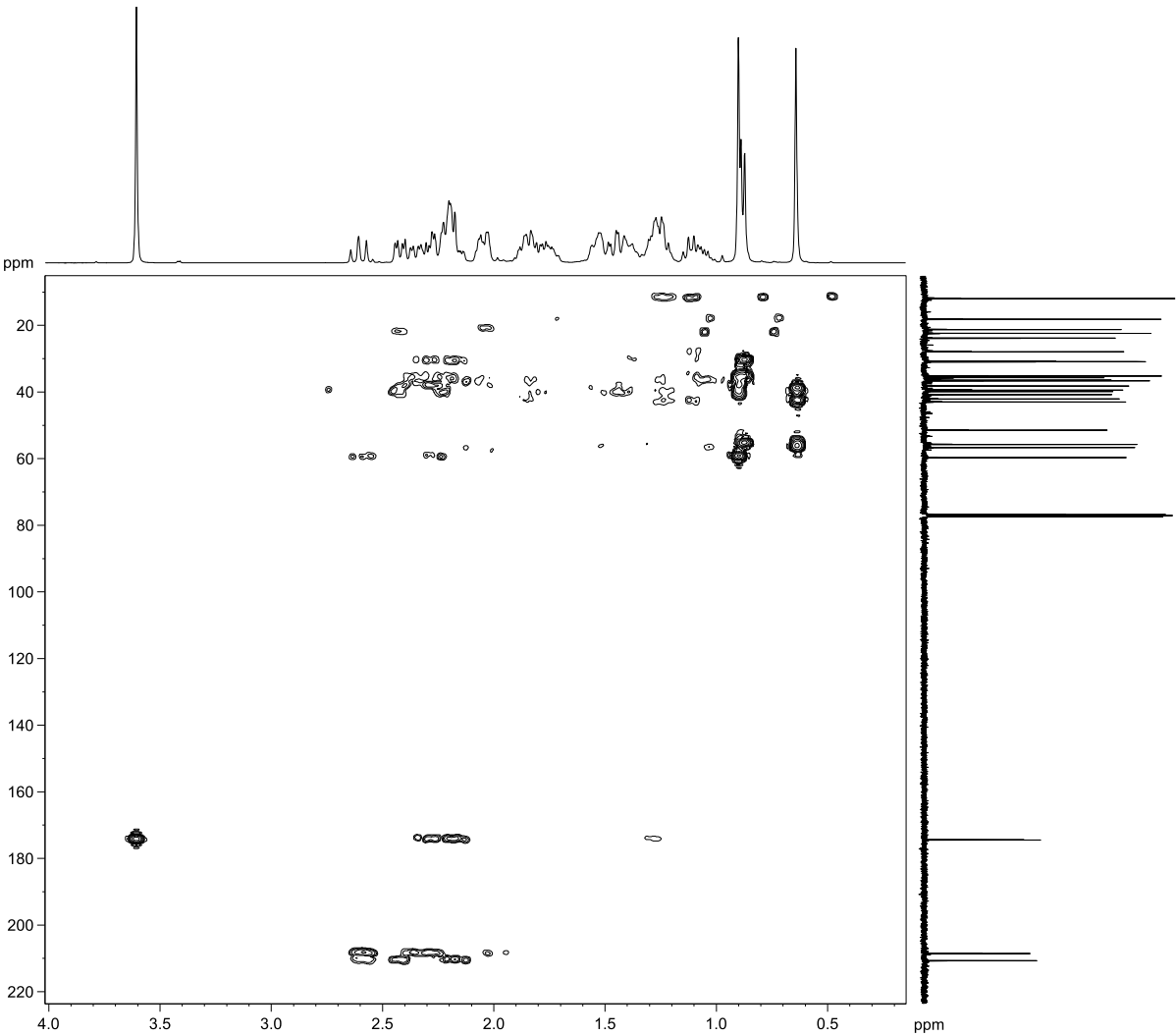
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro 2D ¹H-¹³C HSQC

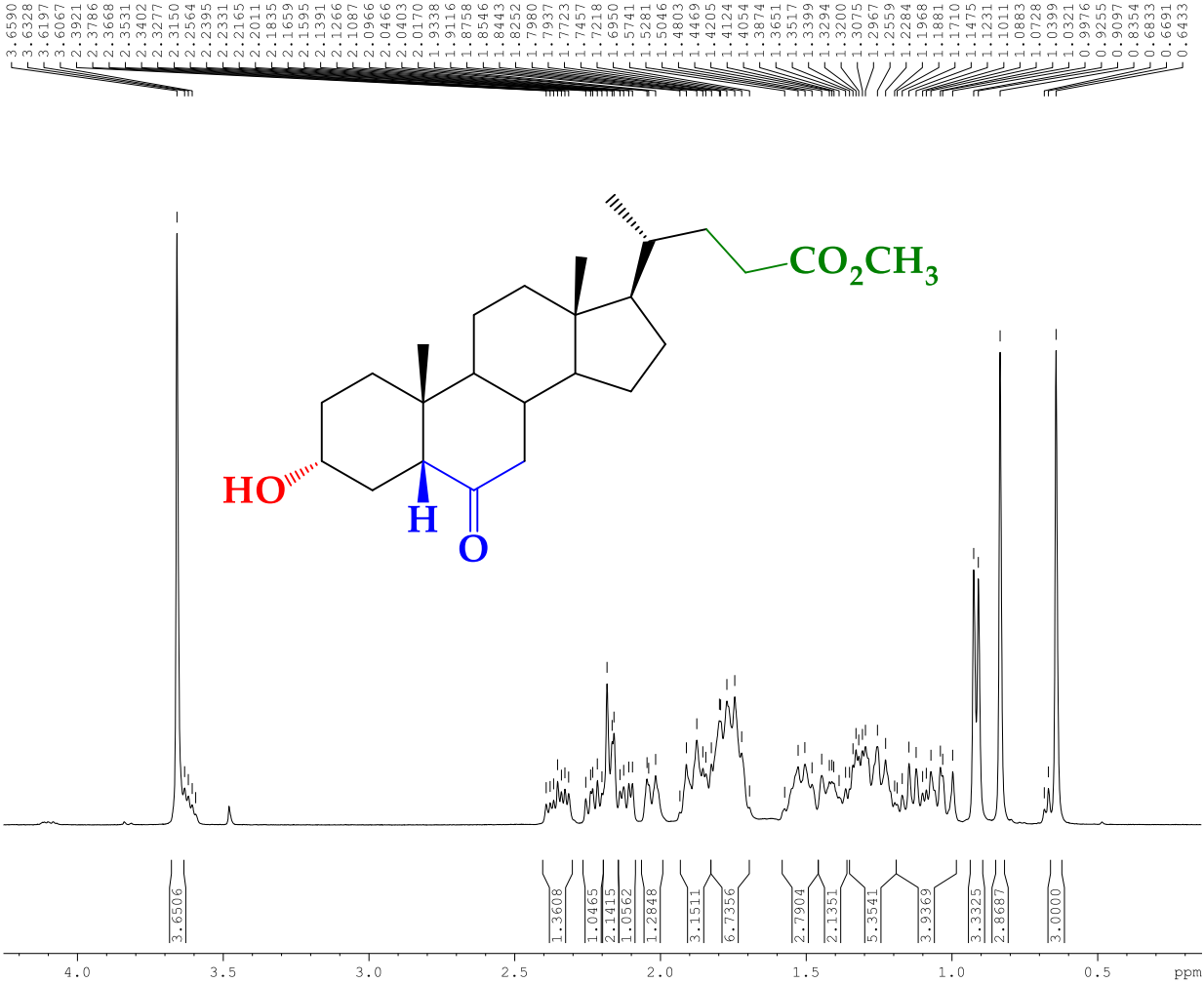


Espectro 2D ¹H–¹³C HMBC

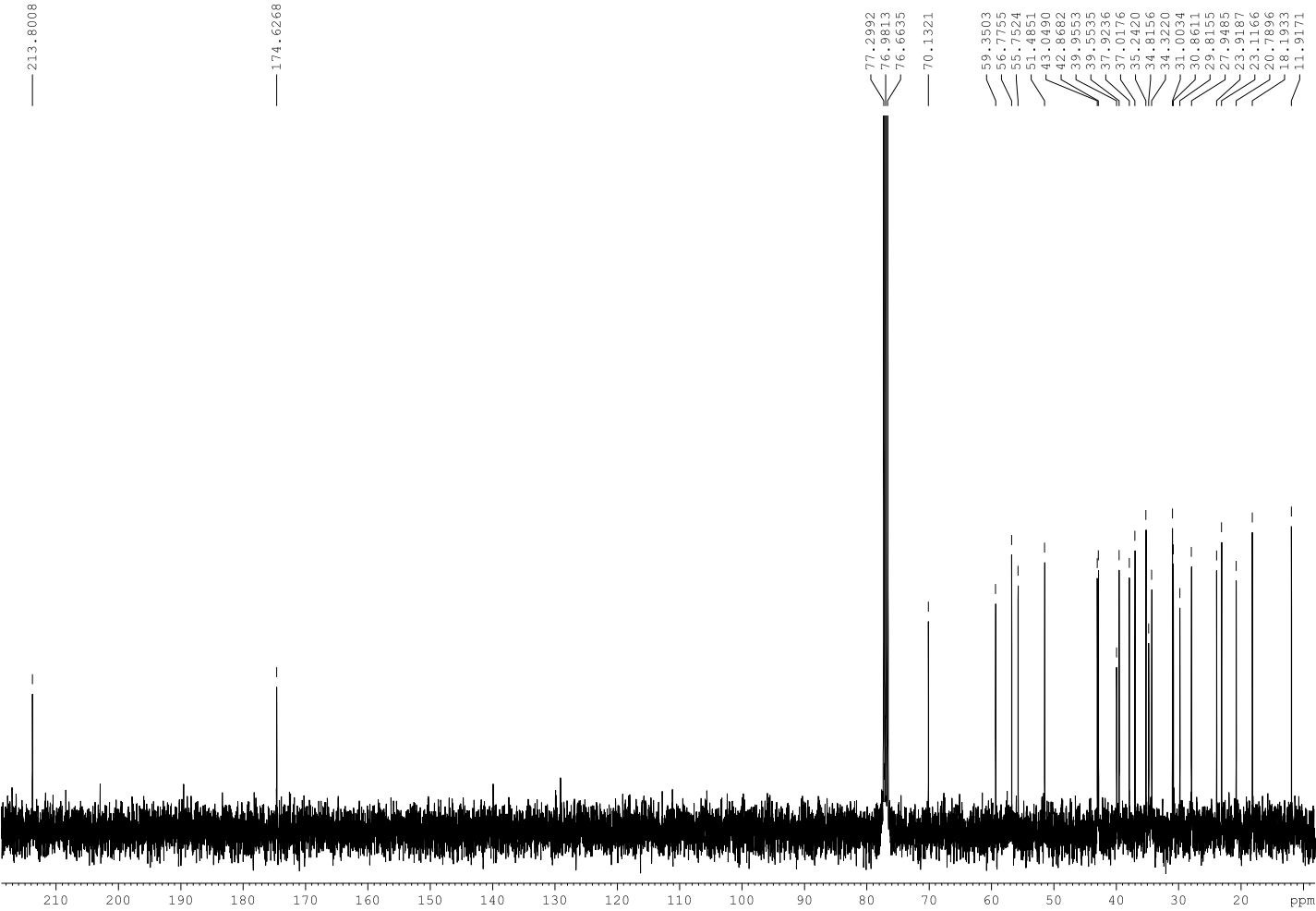


Anexo 1.C: Espectros compuesto 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (48).

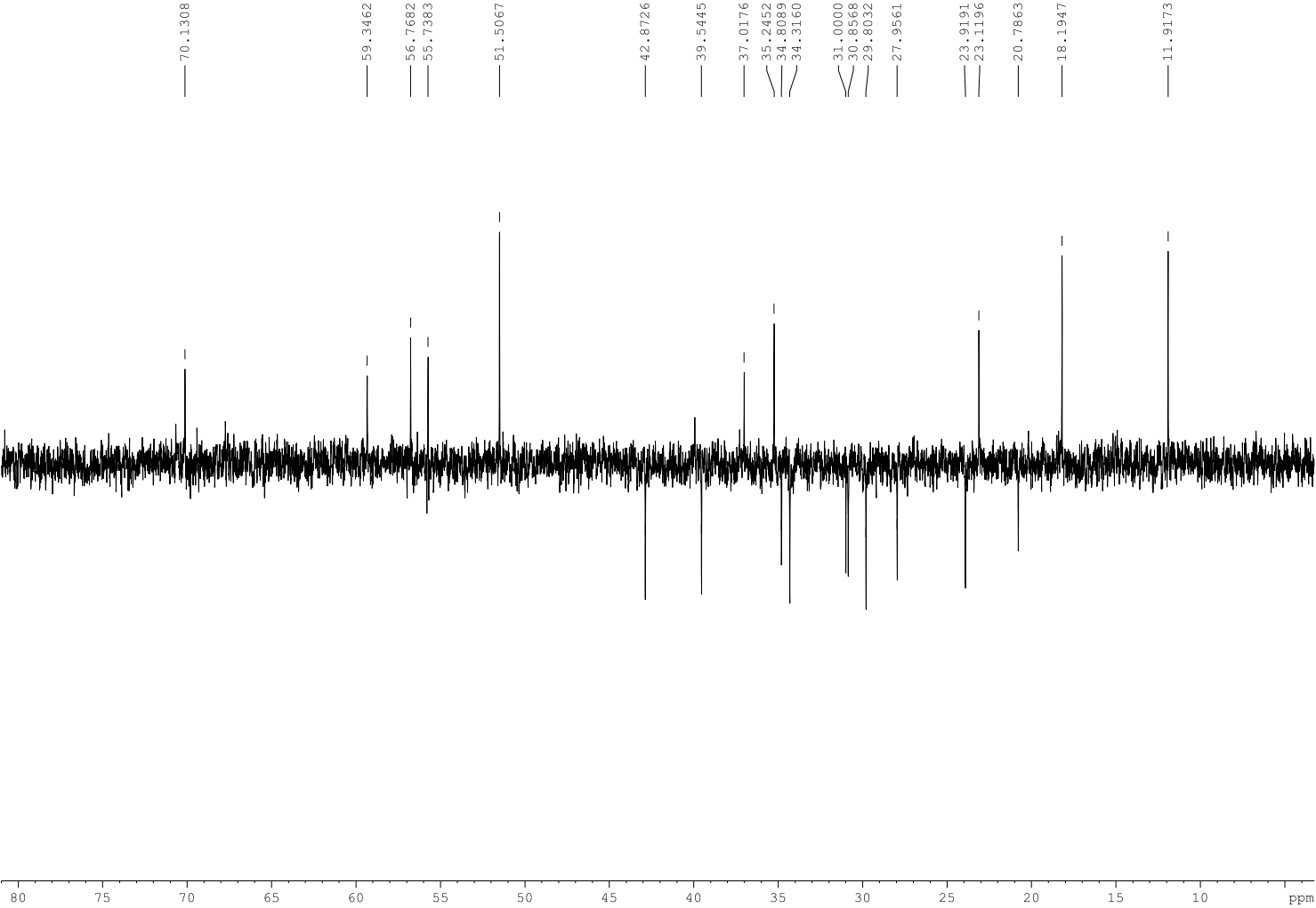
Espectro ¹H RMN



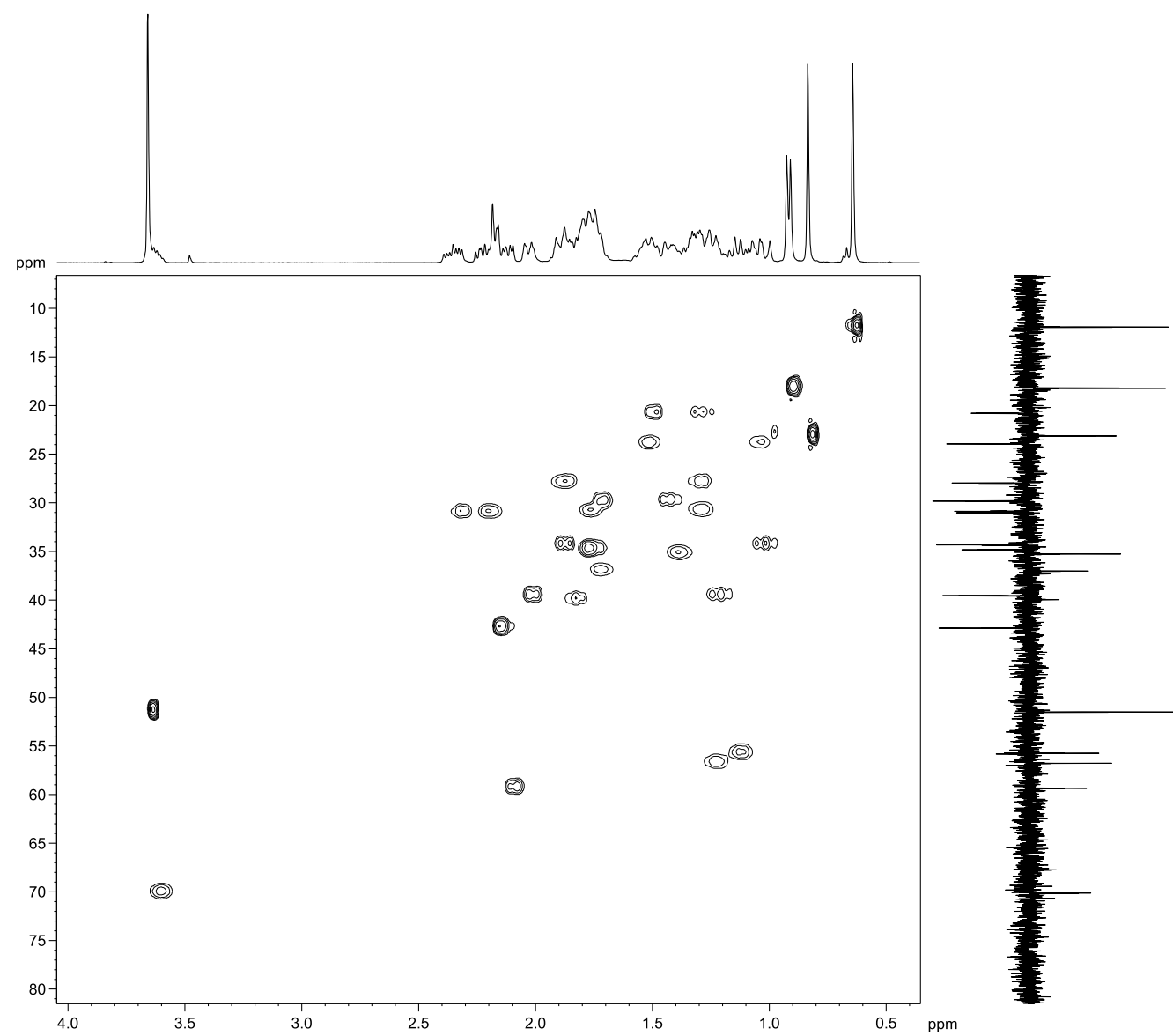
Espectro ¹³C RMN



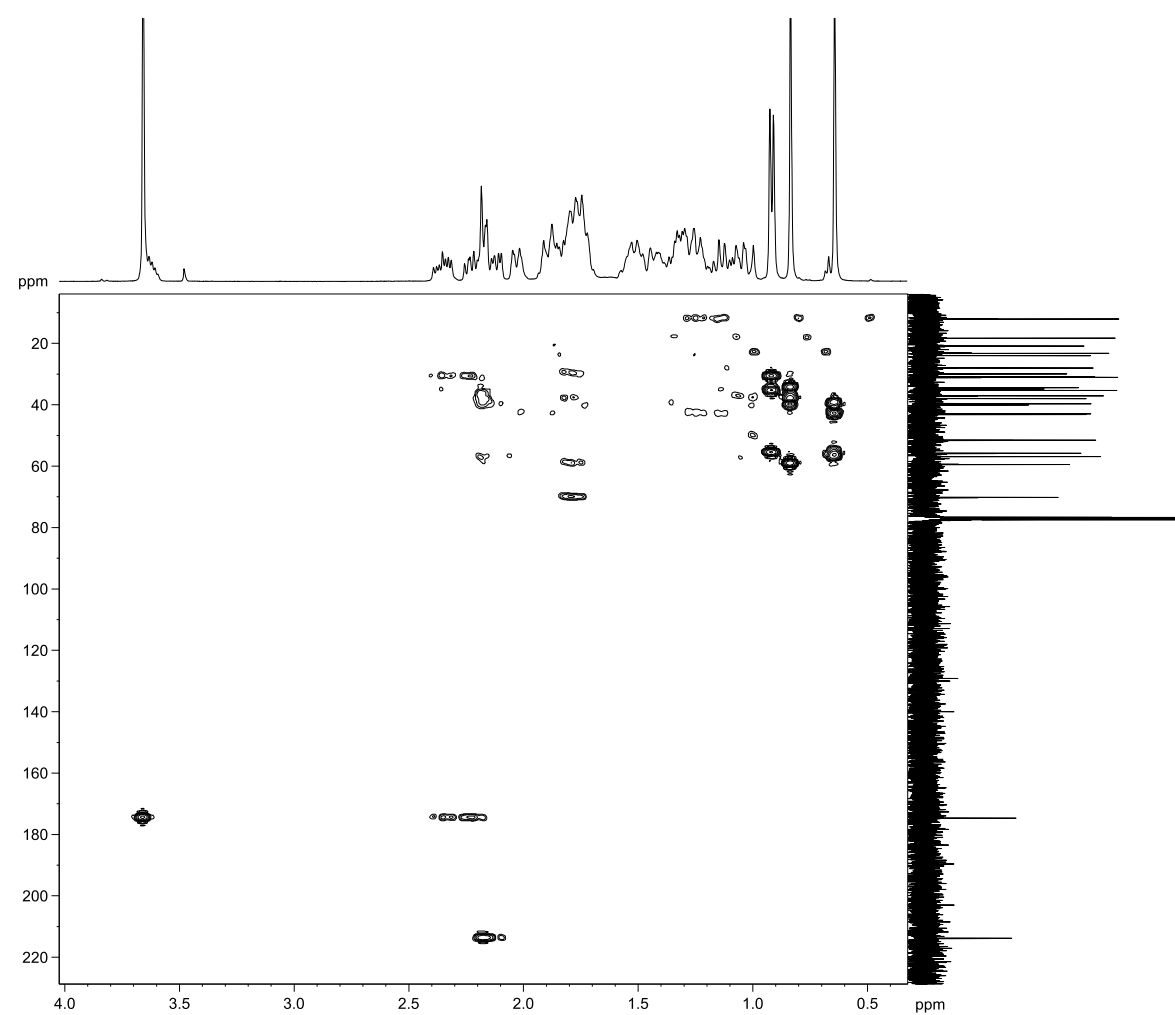
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro ^1H - ^{13}C HSQC

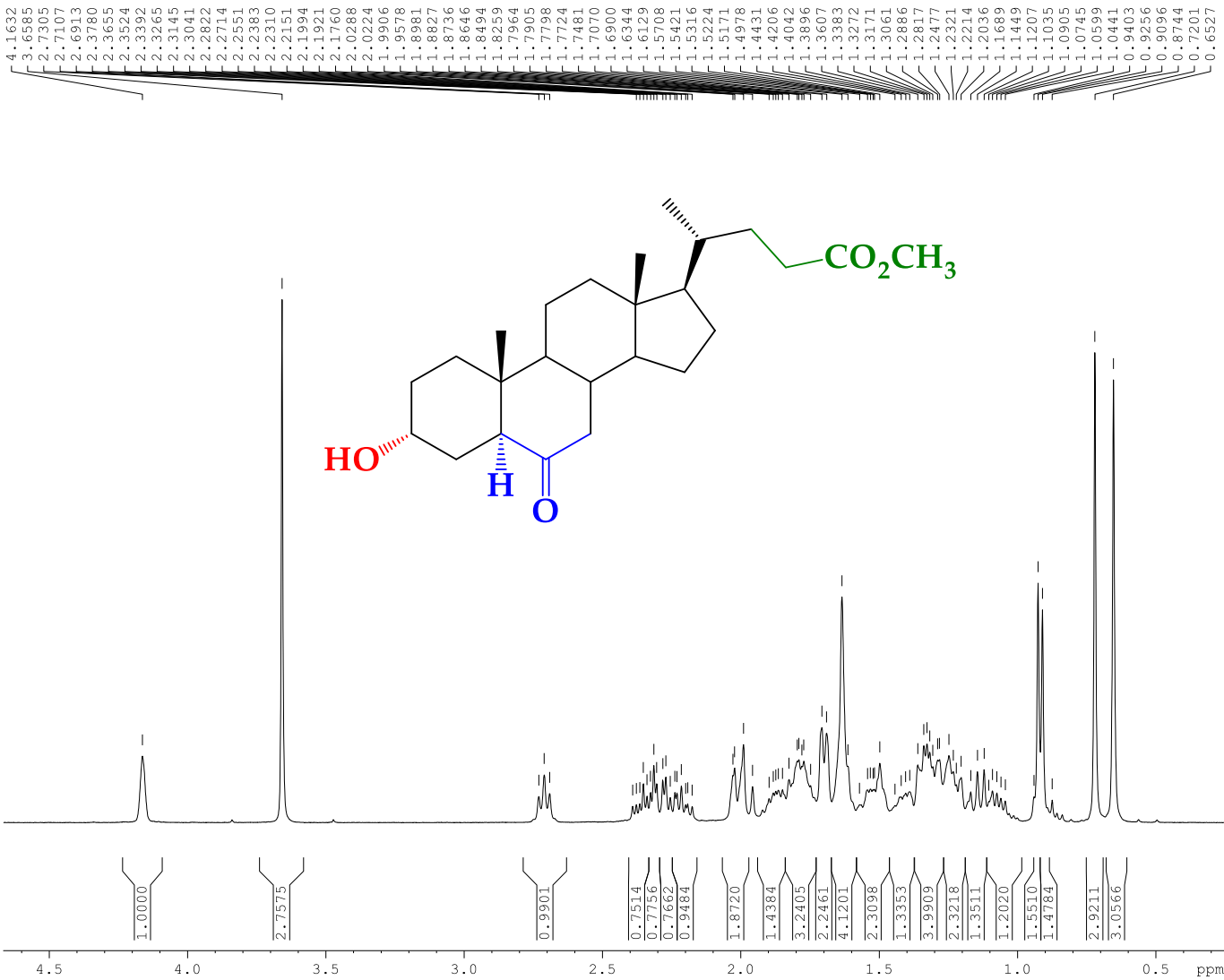


Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC

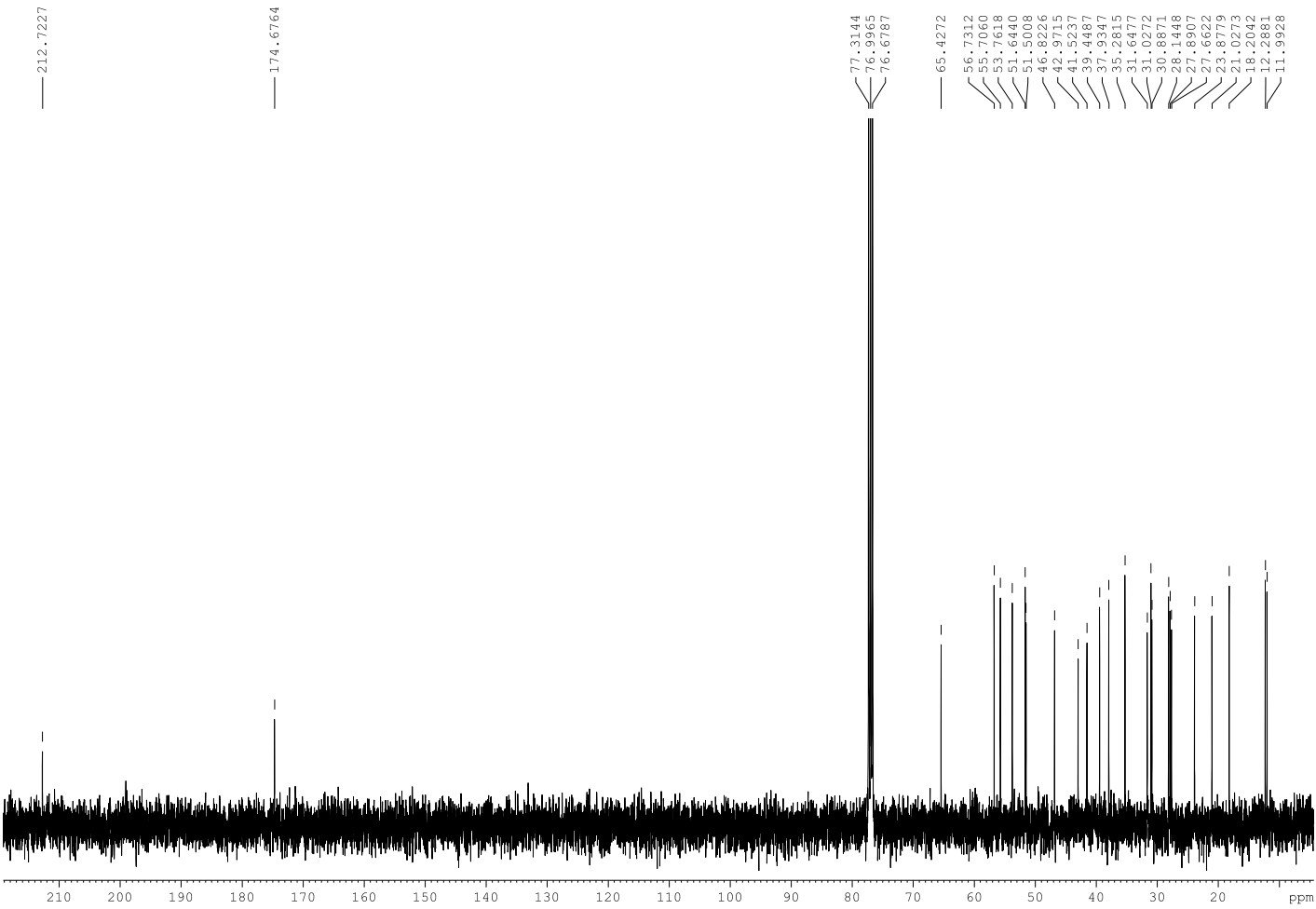


Anexo 1.D: Espectros compuesto 3α-hidroxi-6-oxo-5α-colan-24-oato de metilo (49).

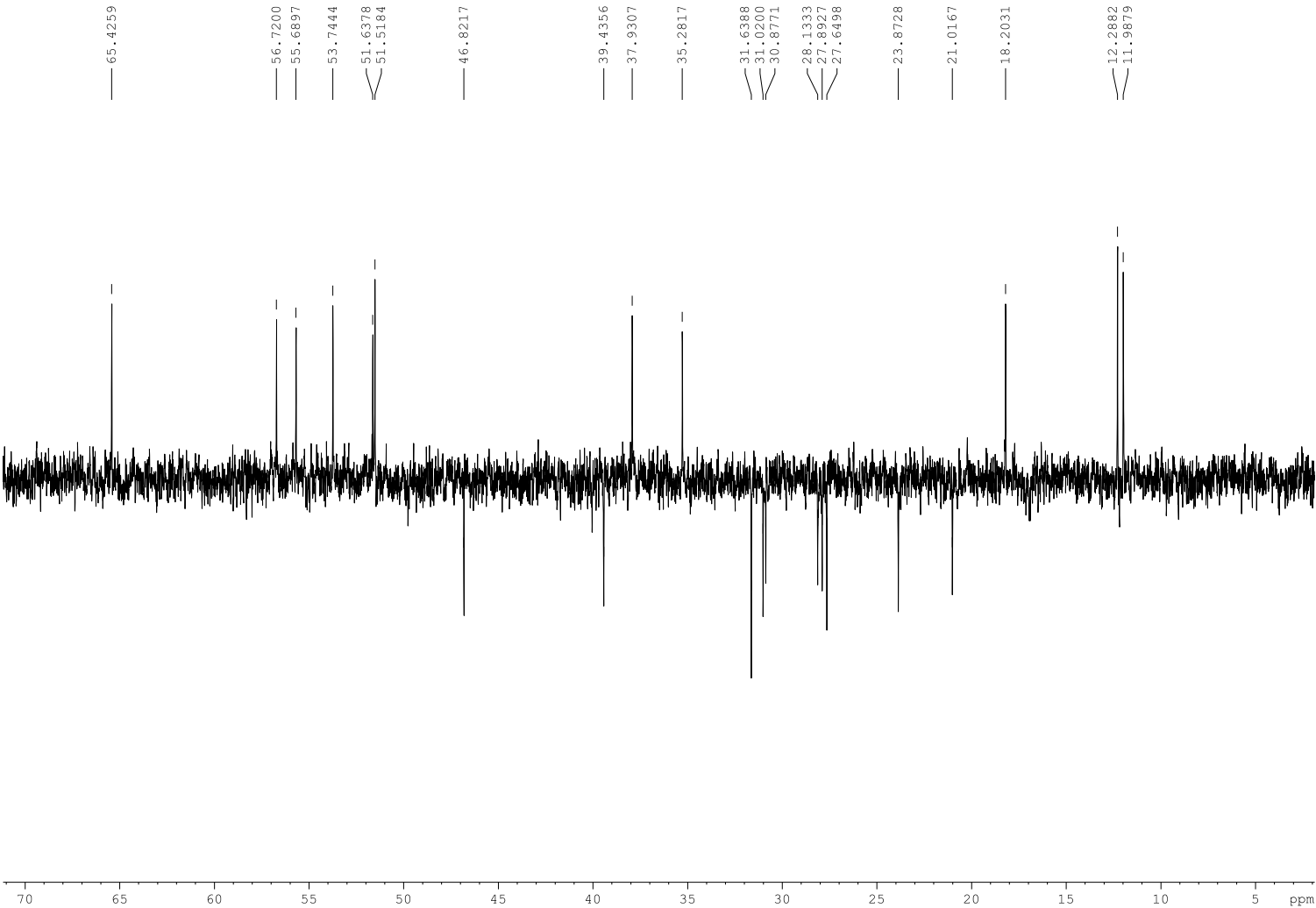
Espectro ¹H RMN



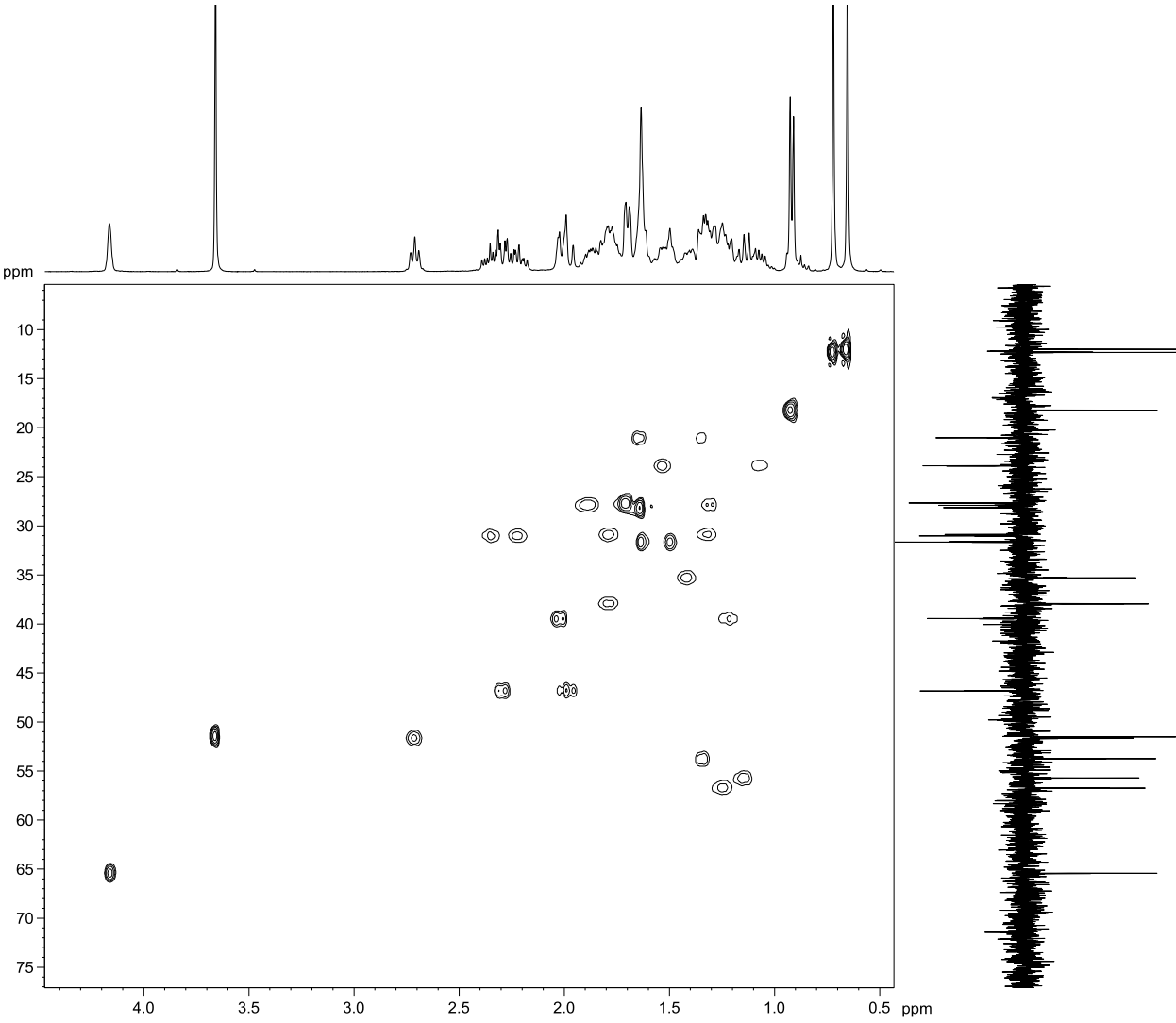
Espectro ¹³C RMN



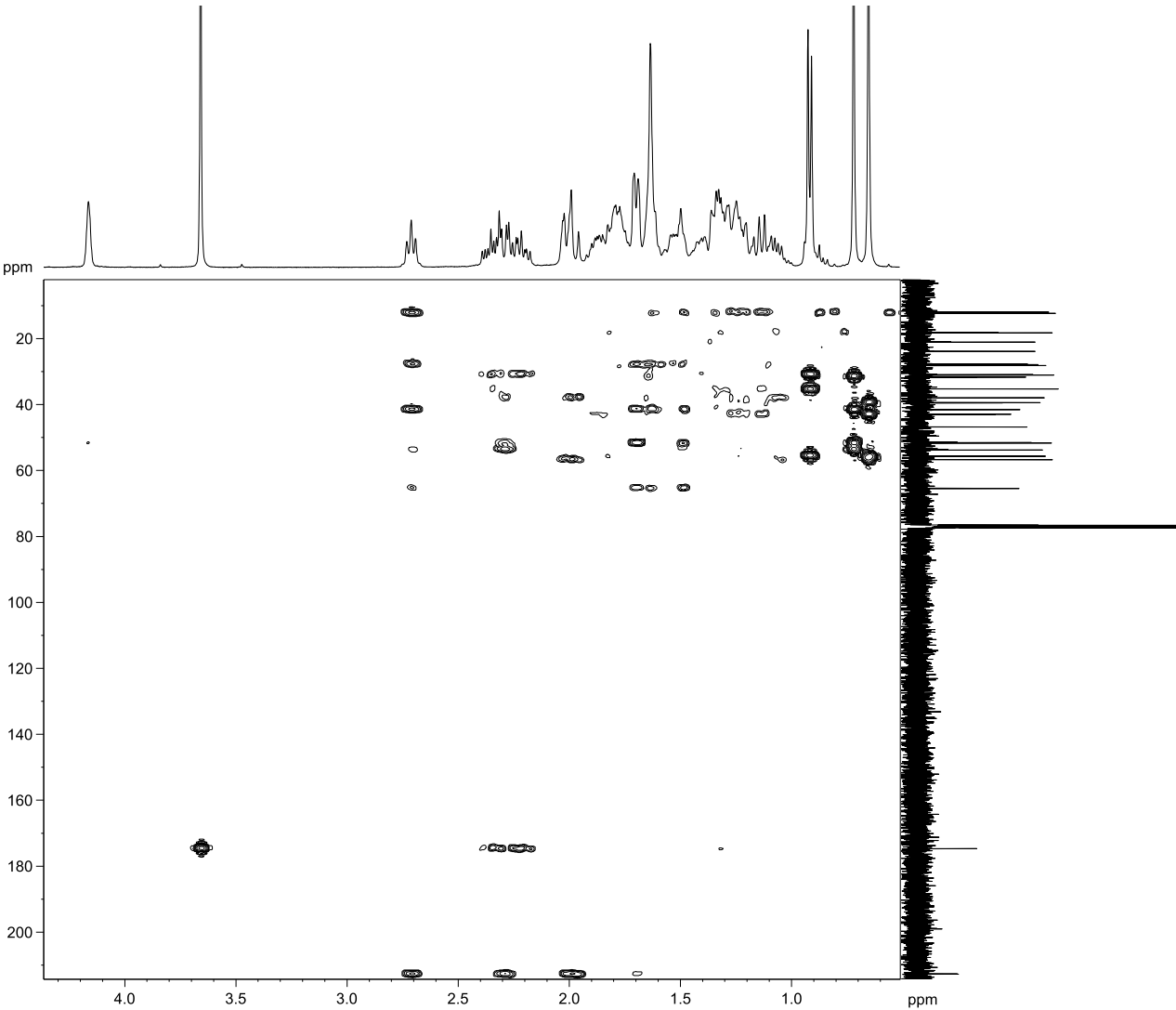
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro 2D ¹H-¹³C HSQC

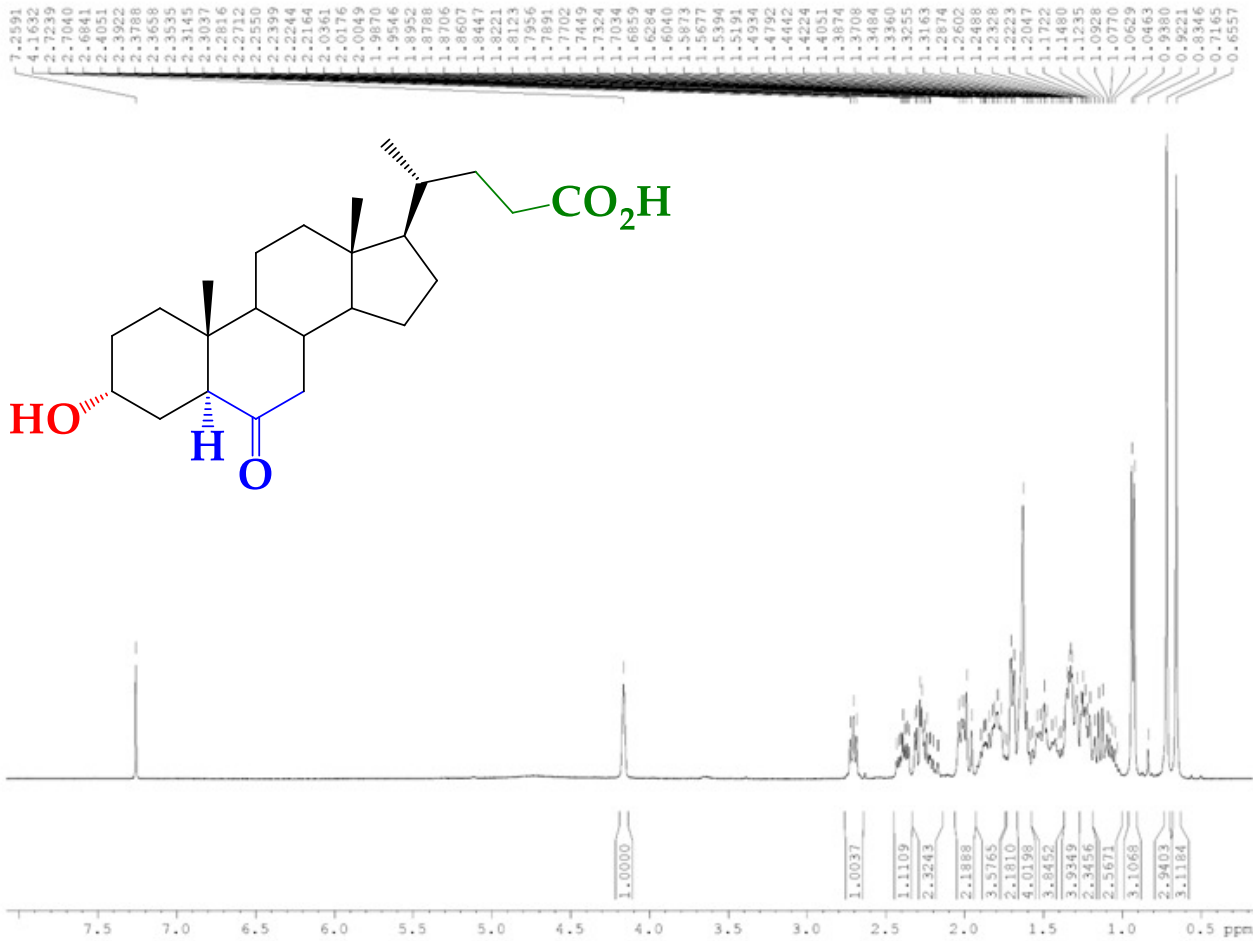


Espectro 2D ¹H–¹³C HMBC

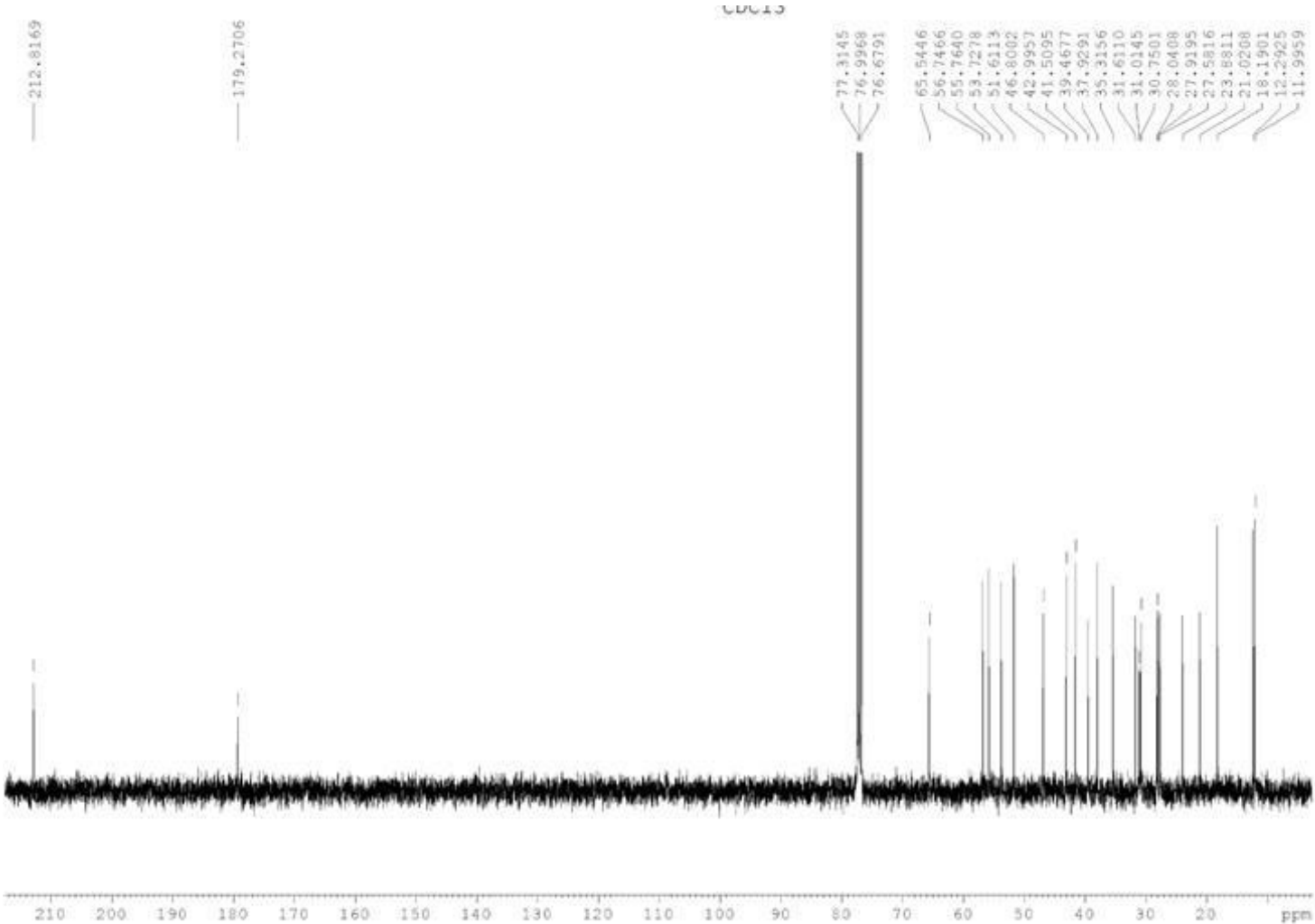


Anexo 1.E: Espectros compuesto Ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (50).

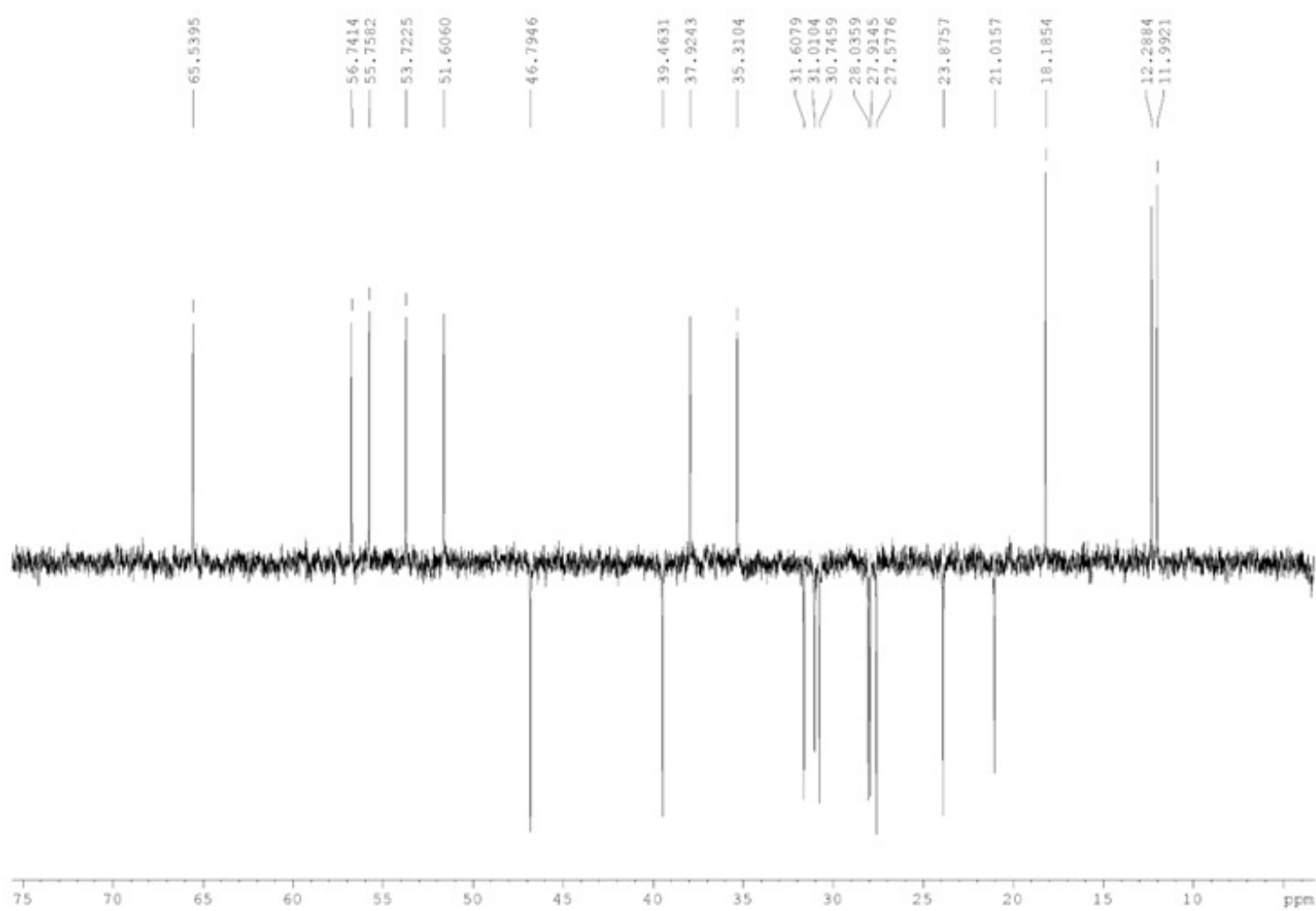
Espectro ¹H RMN



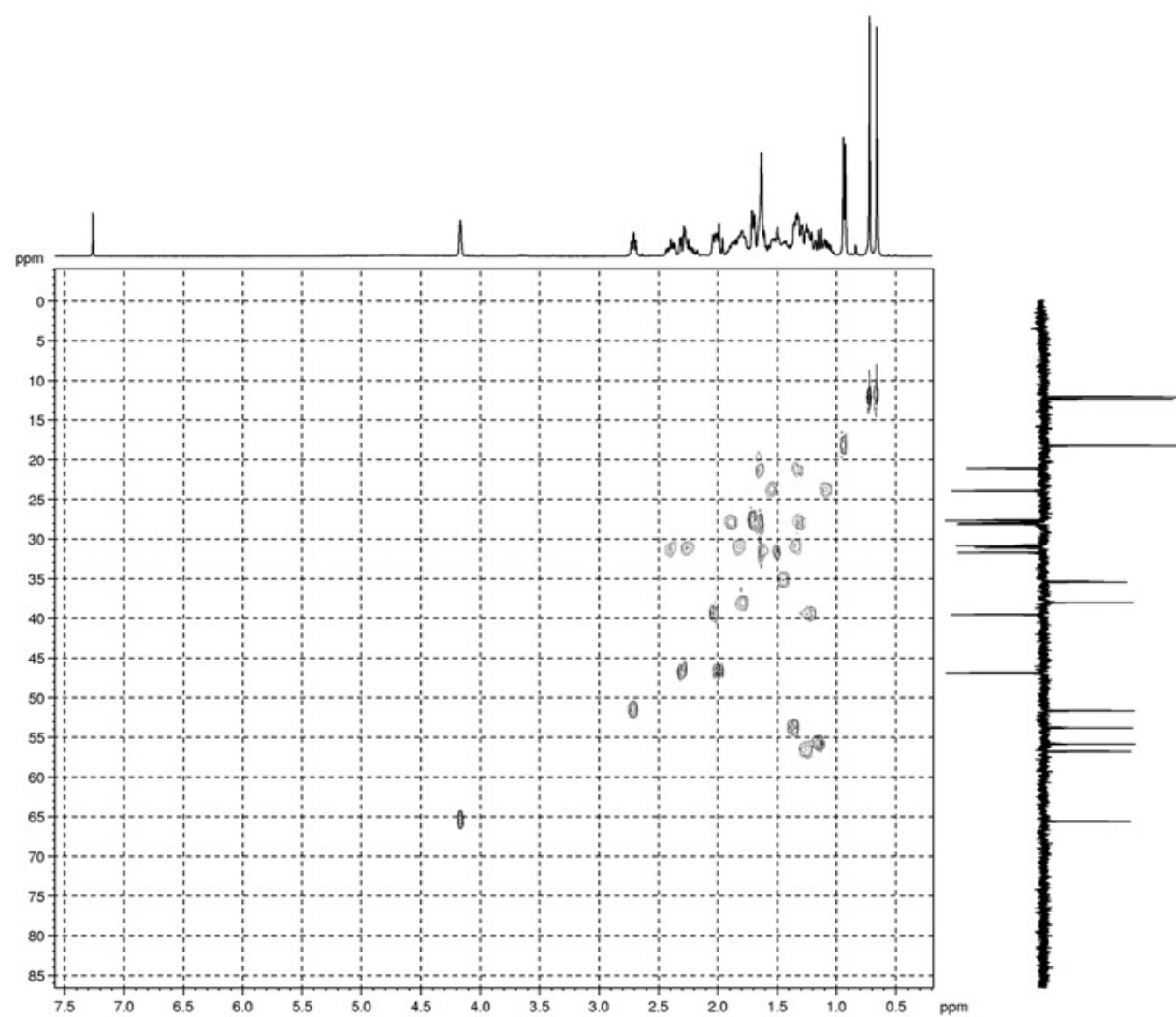
Espectro ¹³C RMN



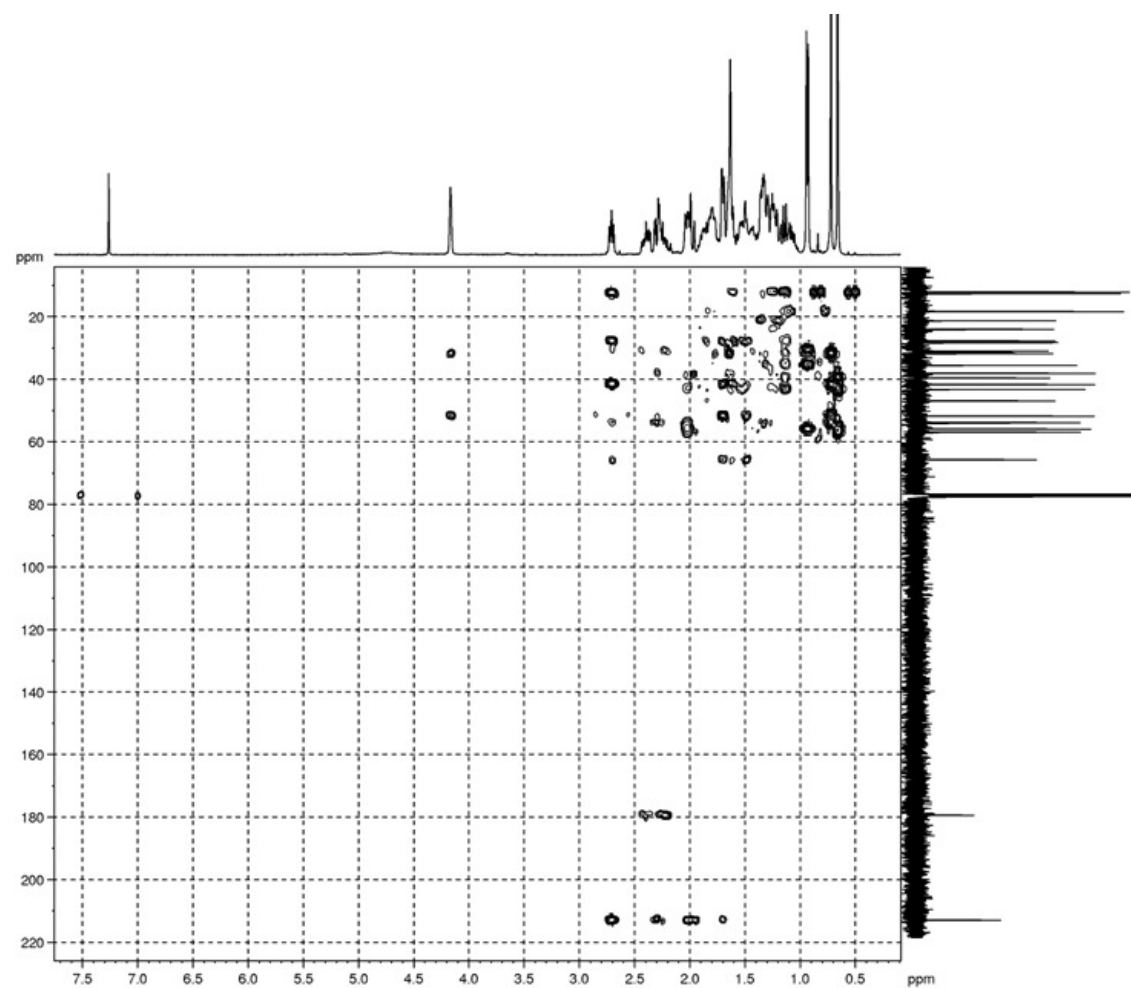
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC

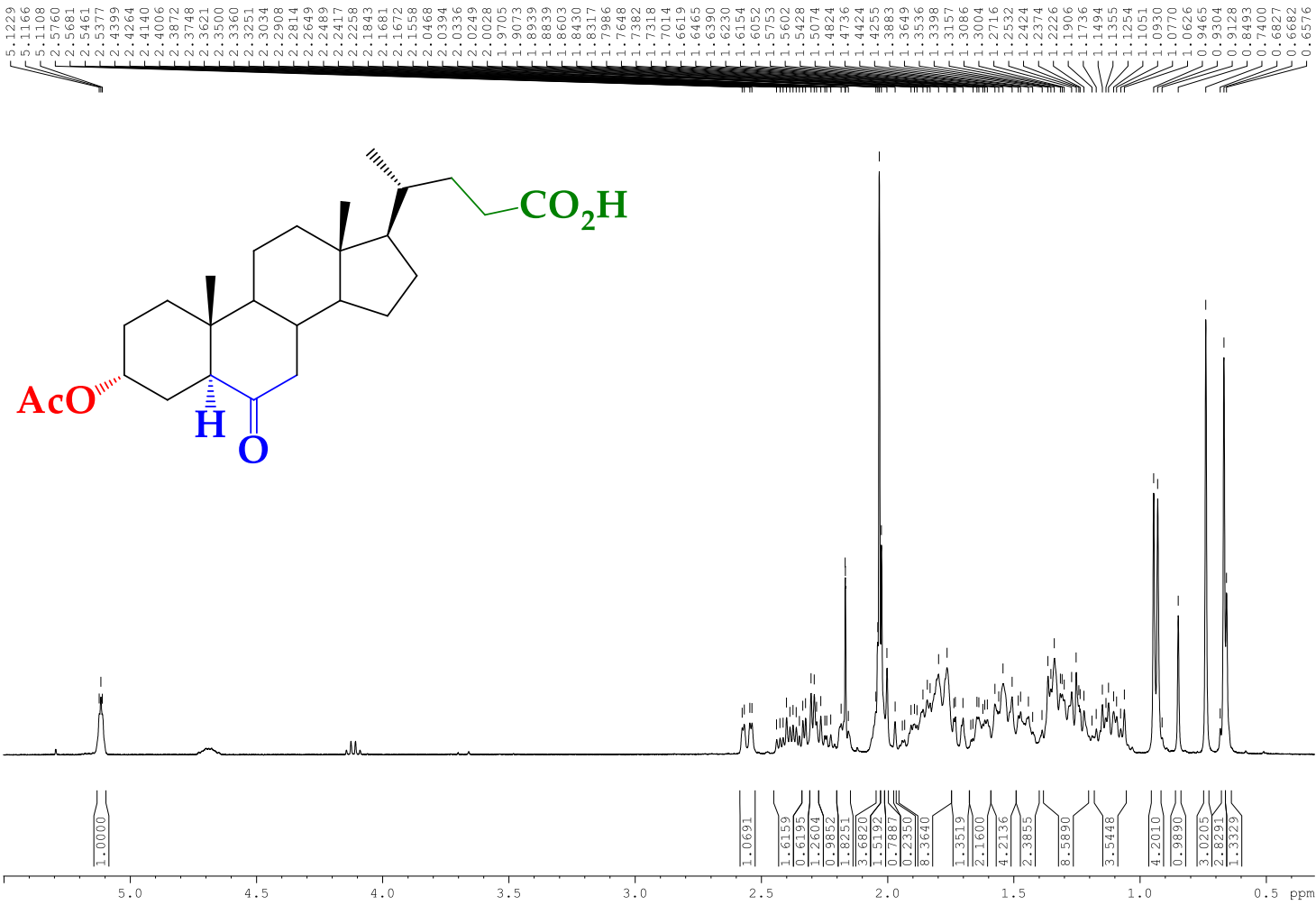


Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC

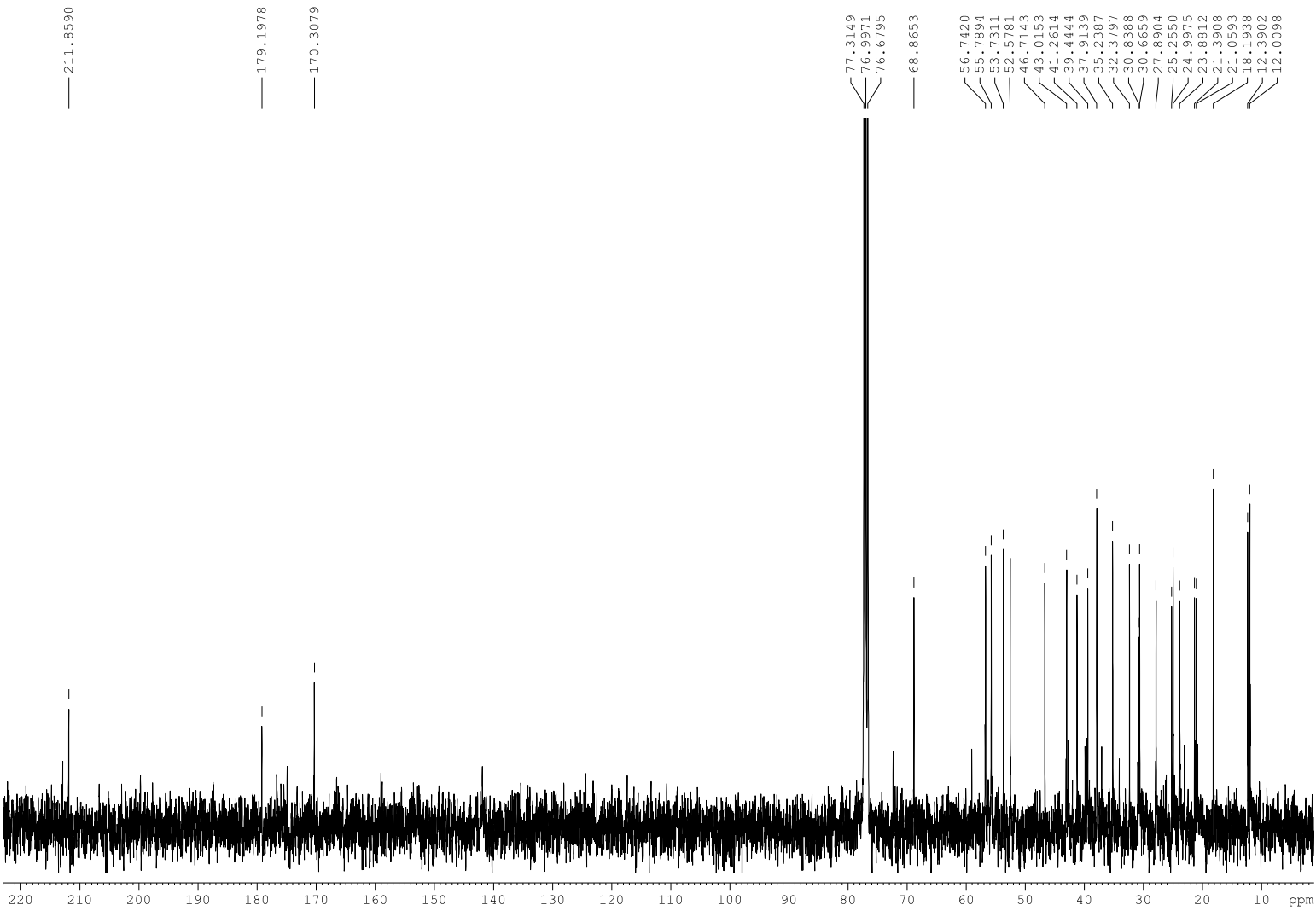


Anexo 1.F: Espectros compuesto Ácido 3 α -acetoxi-6-oxo-5 α -colan-24-oico (51).

Espectro ^1H RMN

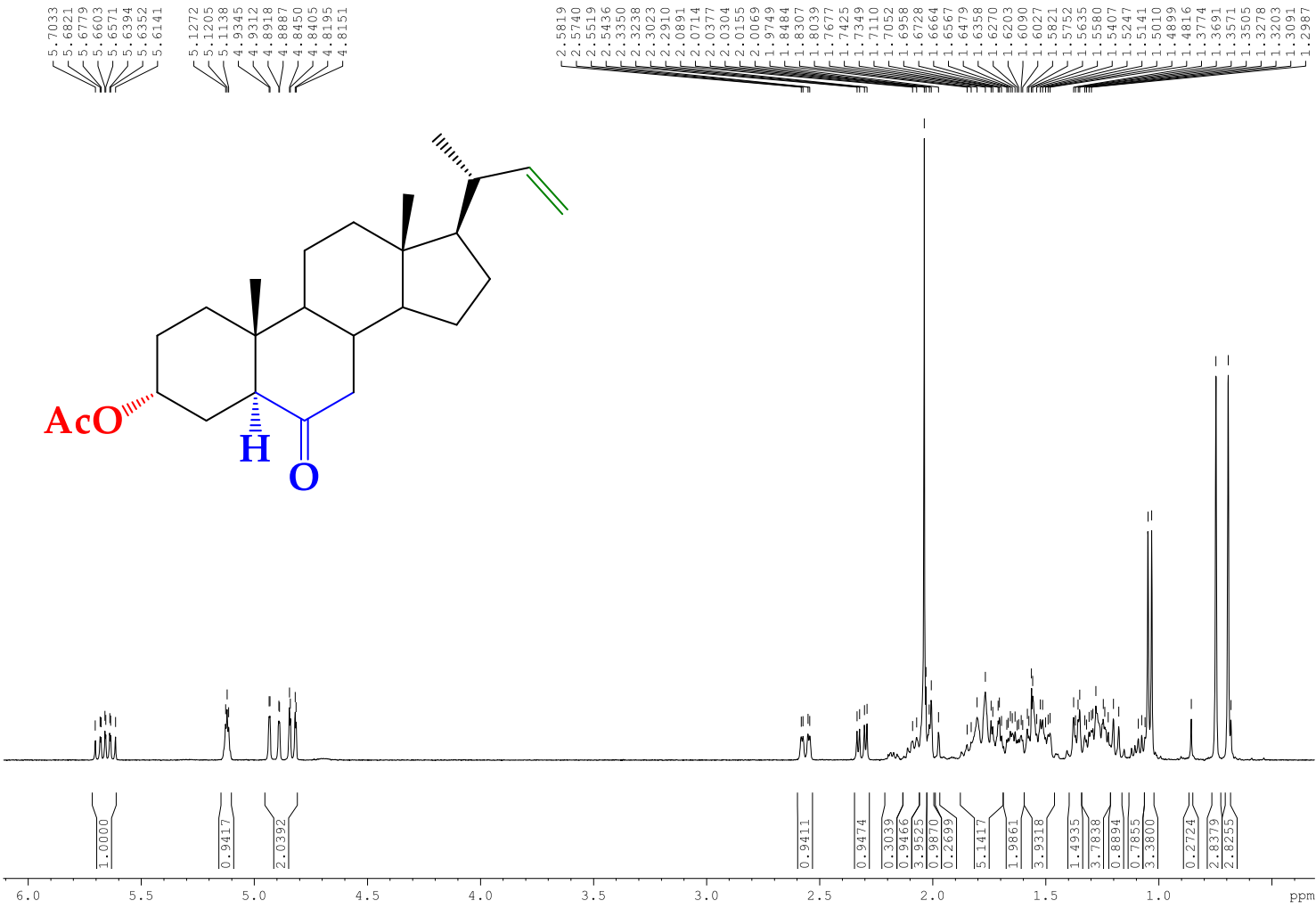


Espectro ^{13}C RMN

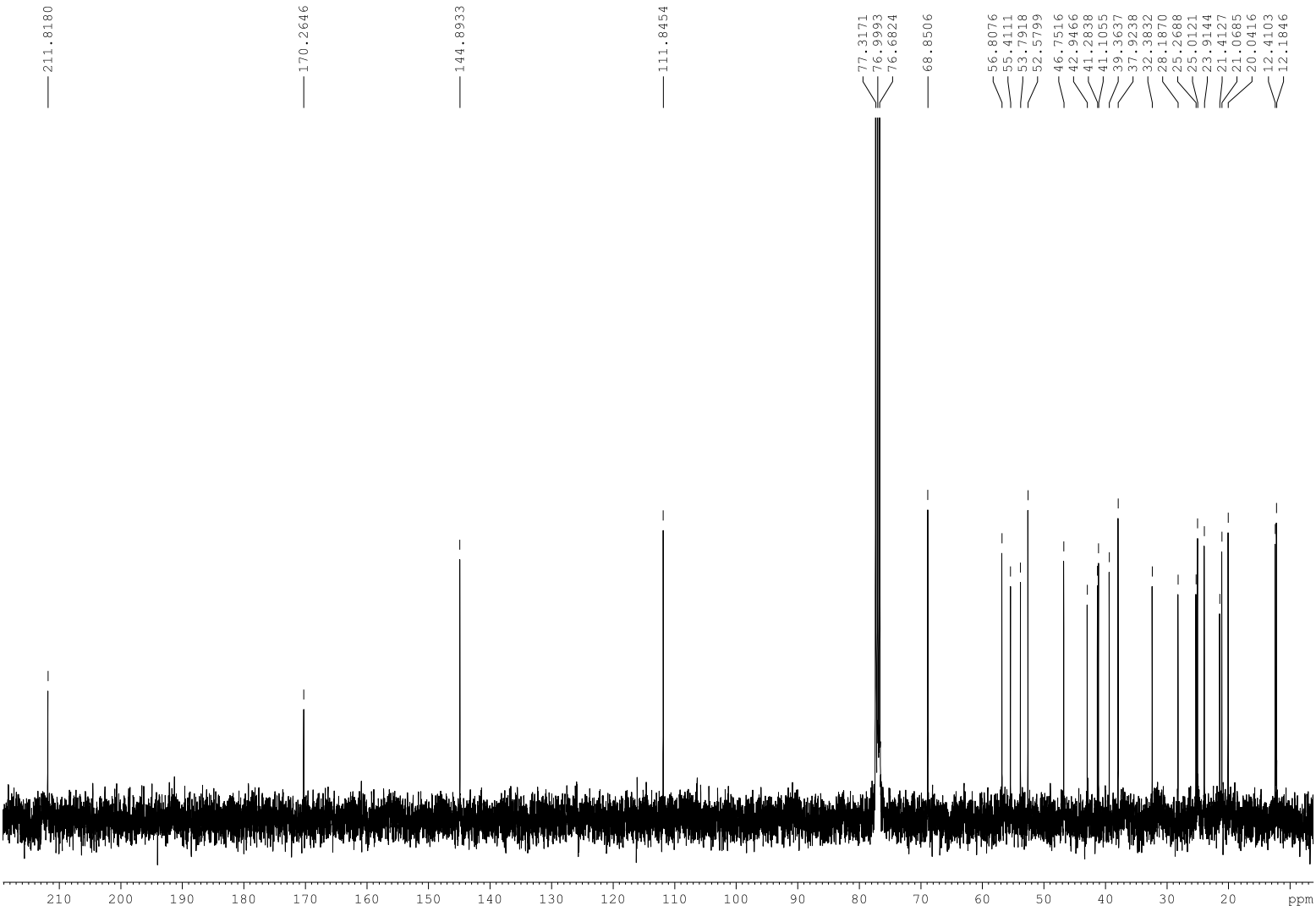


Anexo 1.G: Espectros compuesto 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -colan-22-en-6-ona (52).

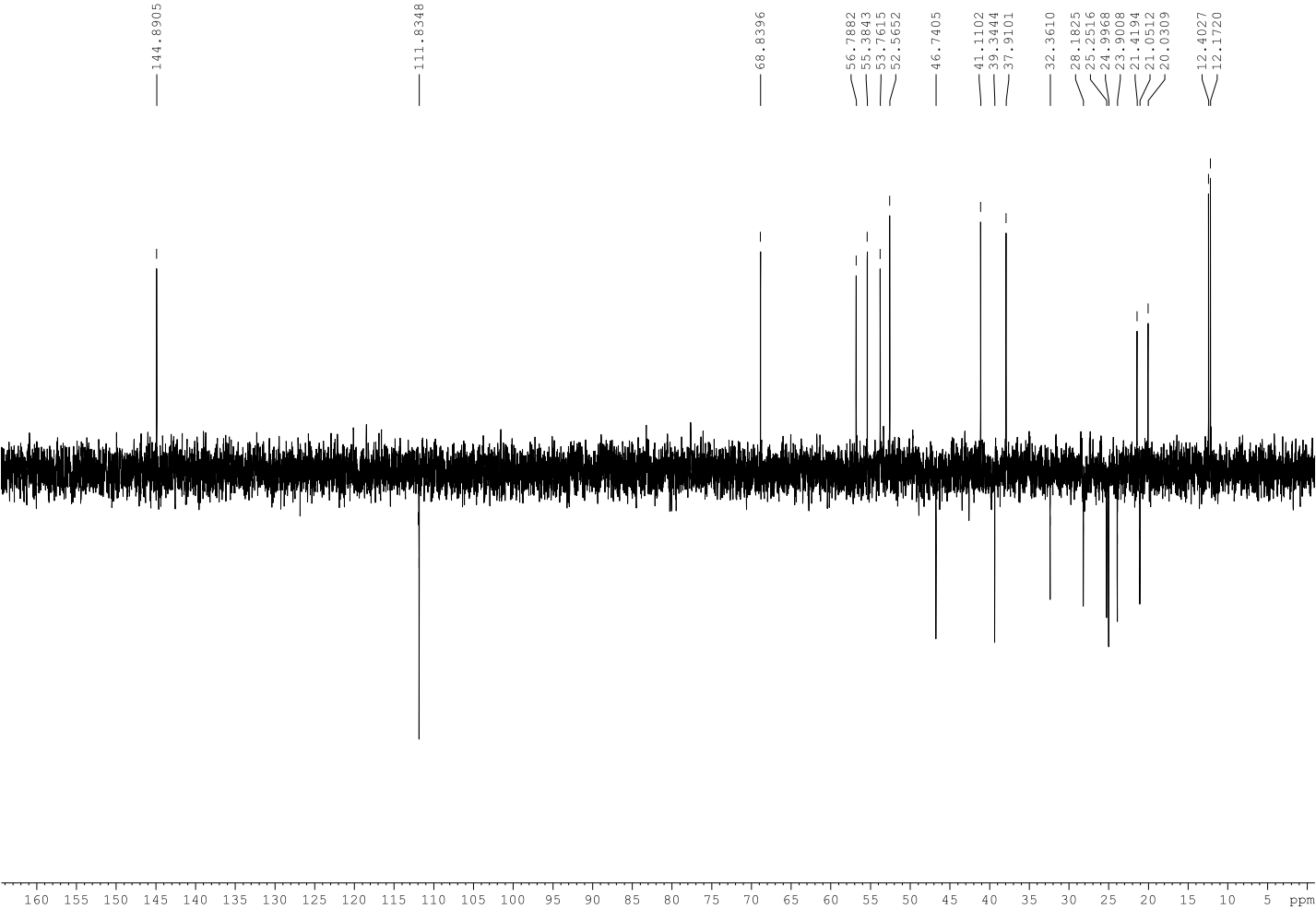
Espectro ^1H RMN



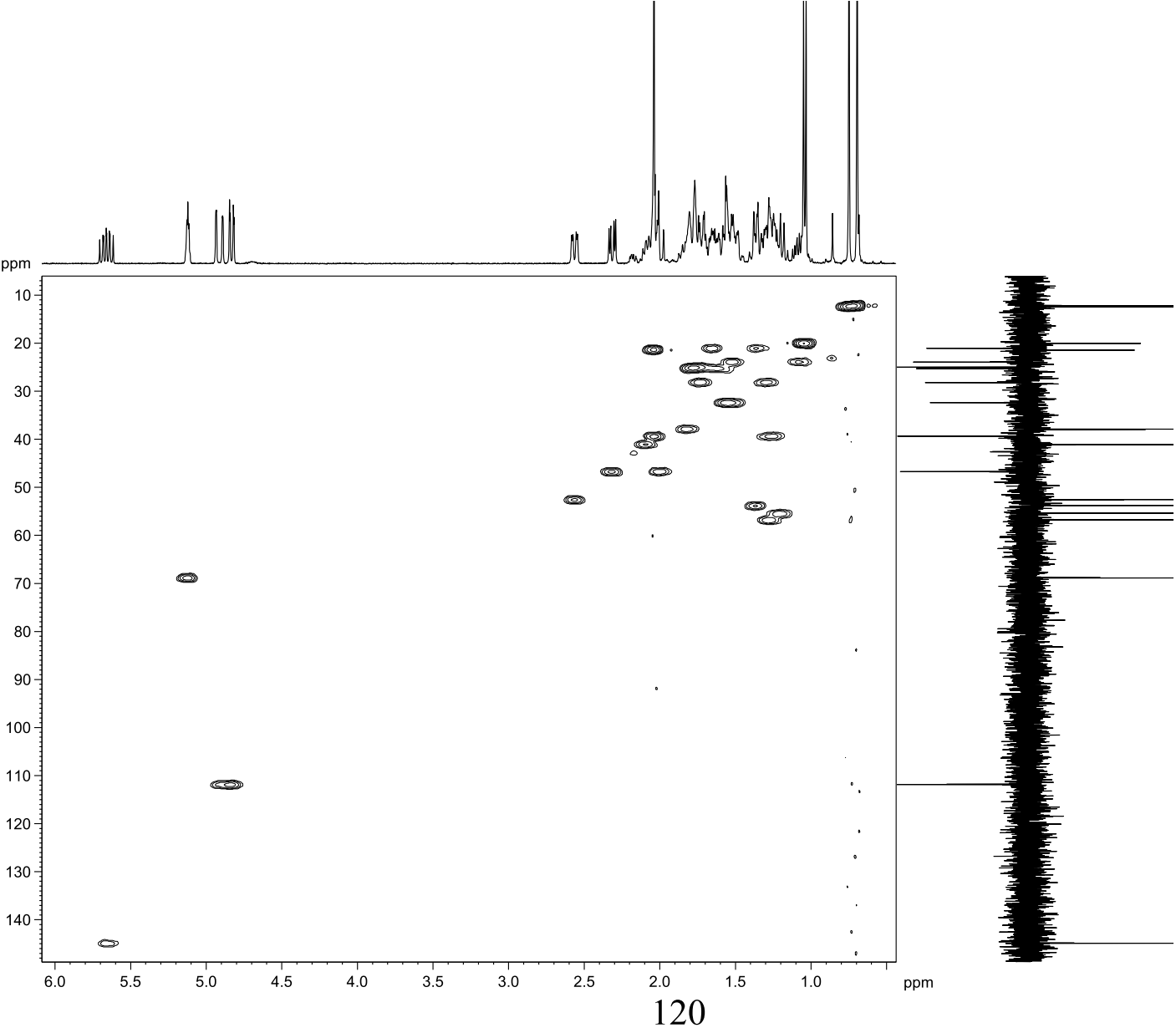
Espectro ^{13}C RMN



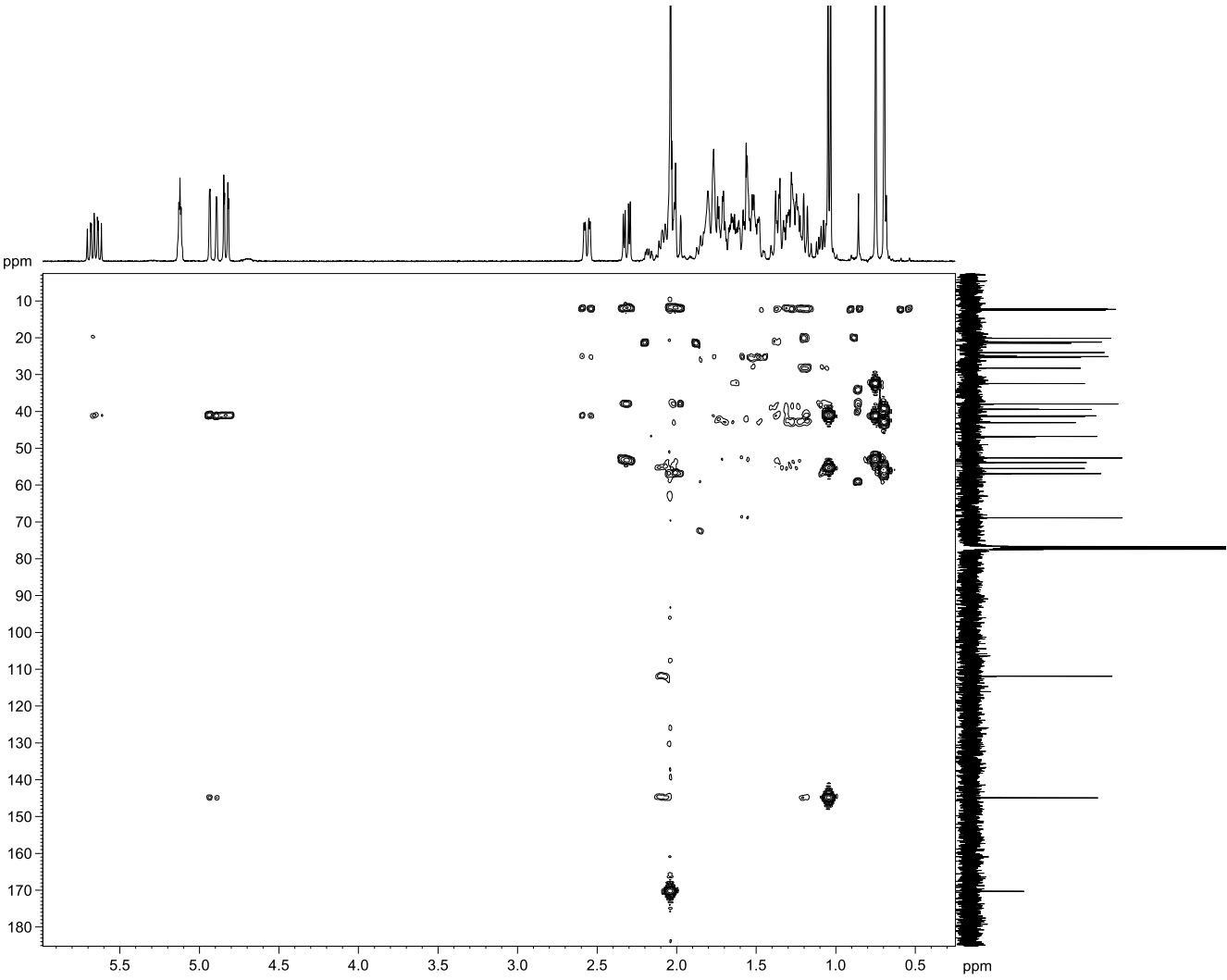
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro 2D ¹H-¹³C HSQC

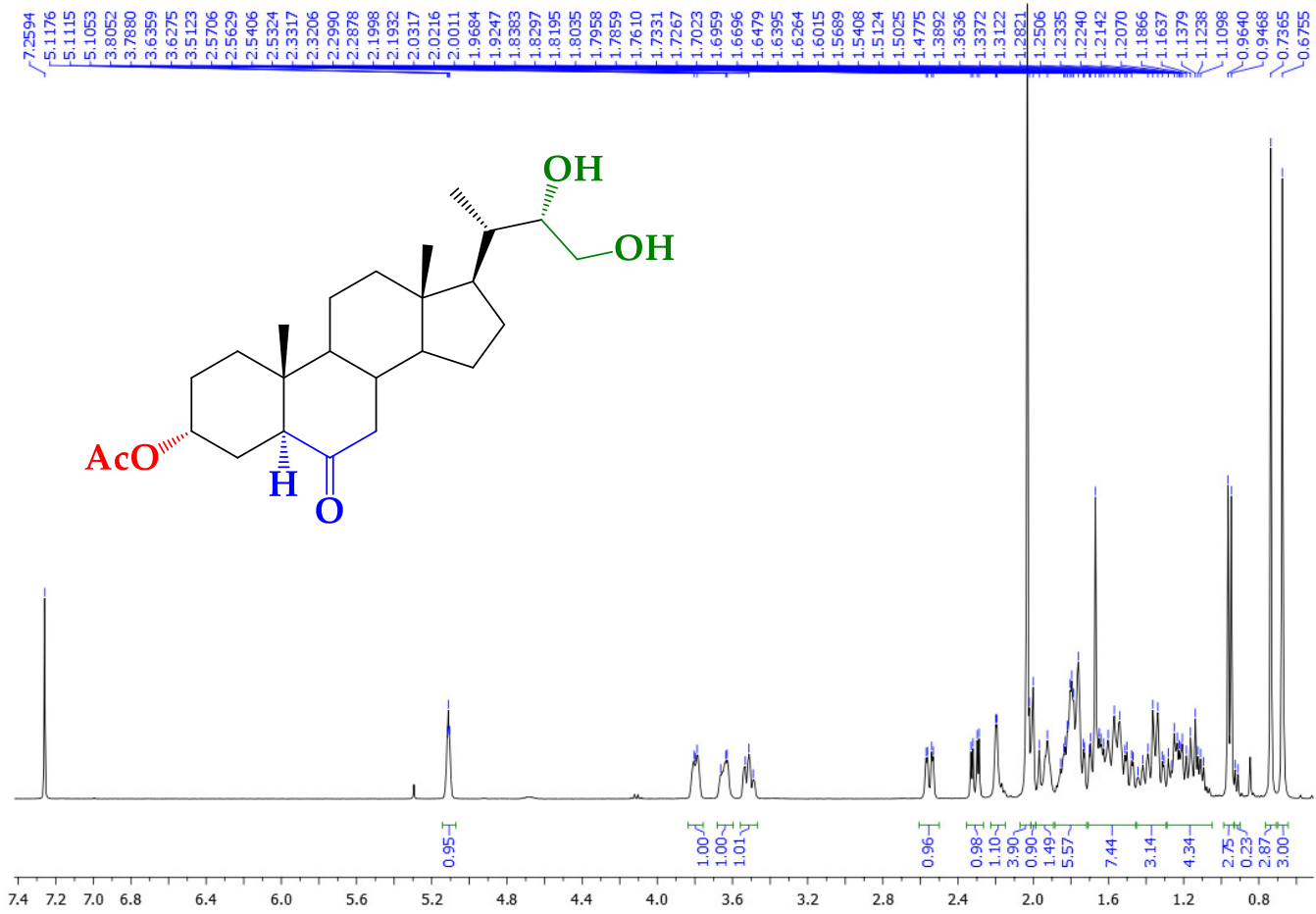


Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC

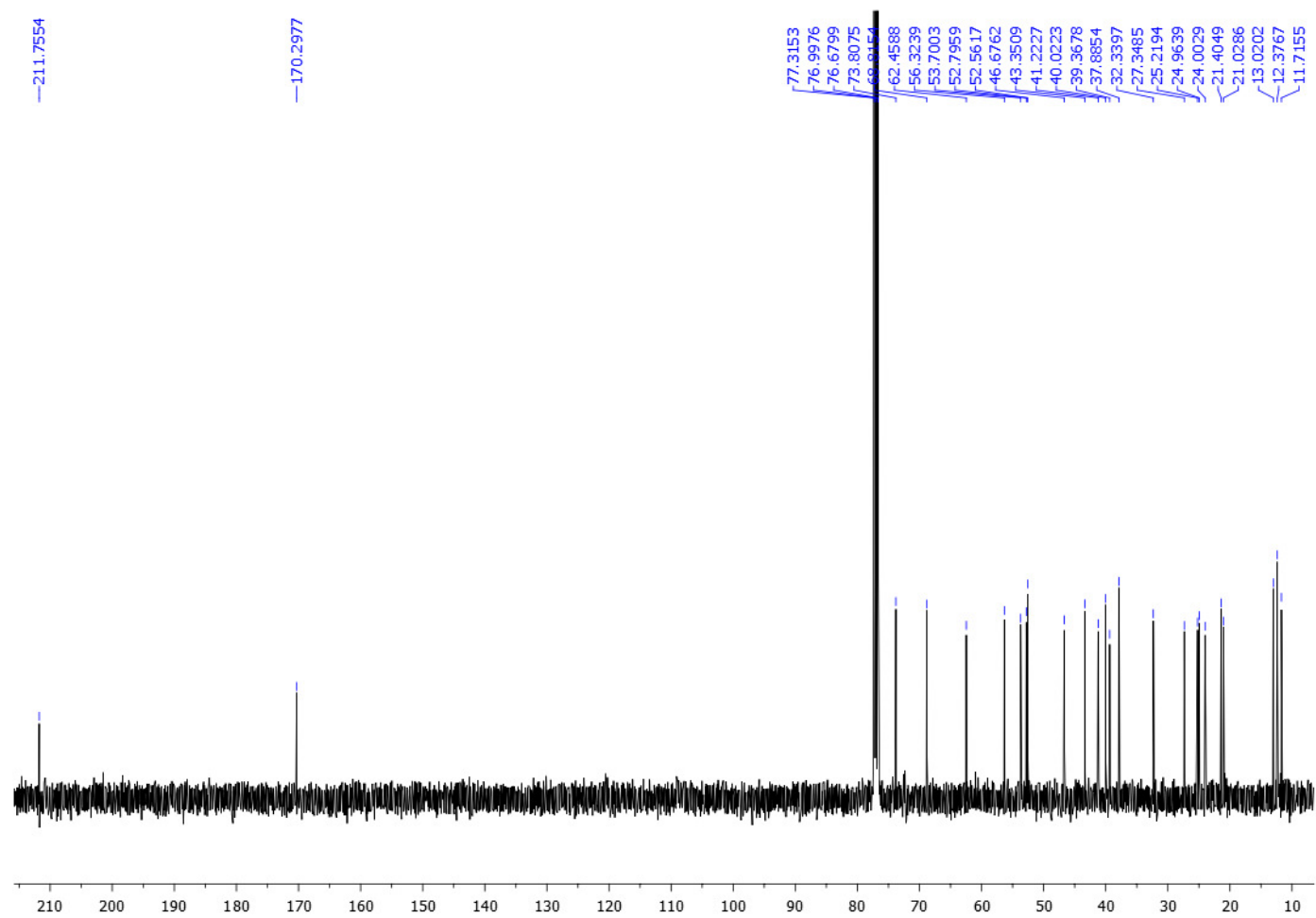


Anexo 1.H: Espectros compuesto 22(S), 23-dihidroxi-24-nor-5 α -colan-22-en-6-ona-3a-acetato (53a).

Espectro ^1H RMN

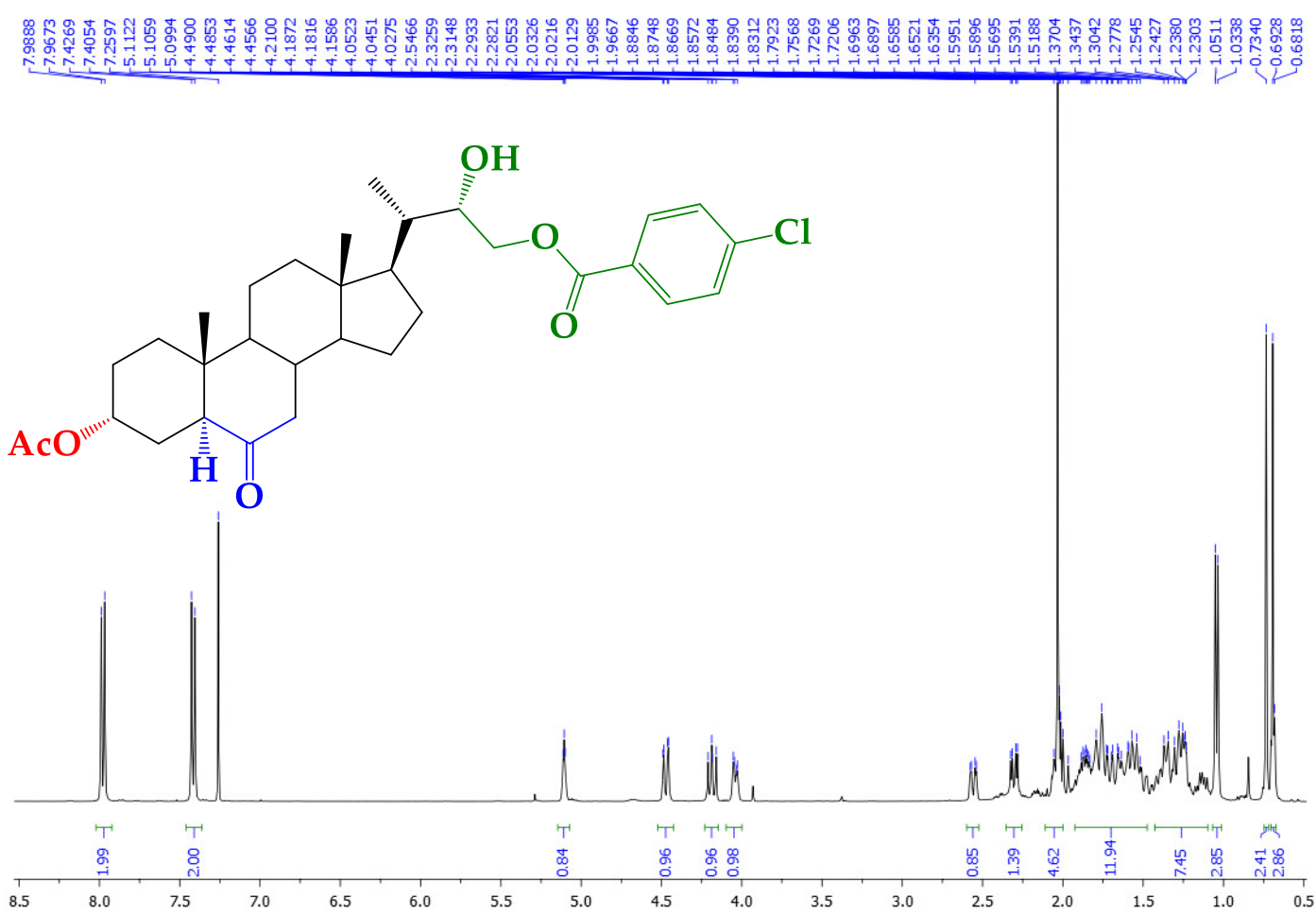


Espectro ¹³C RMN

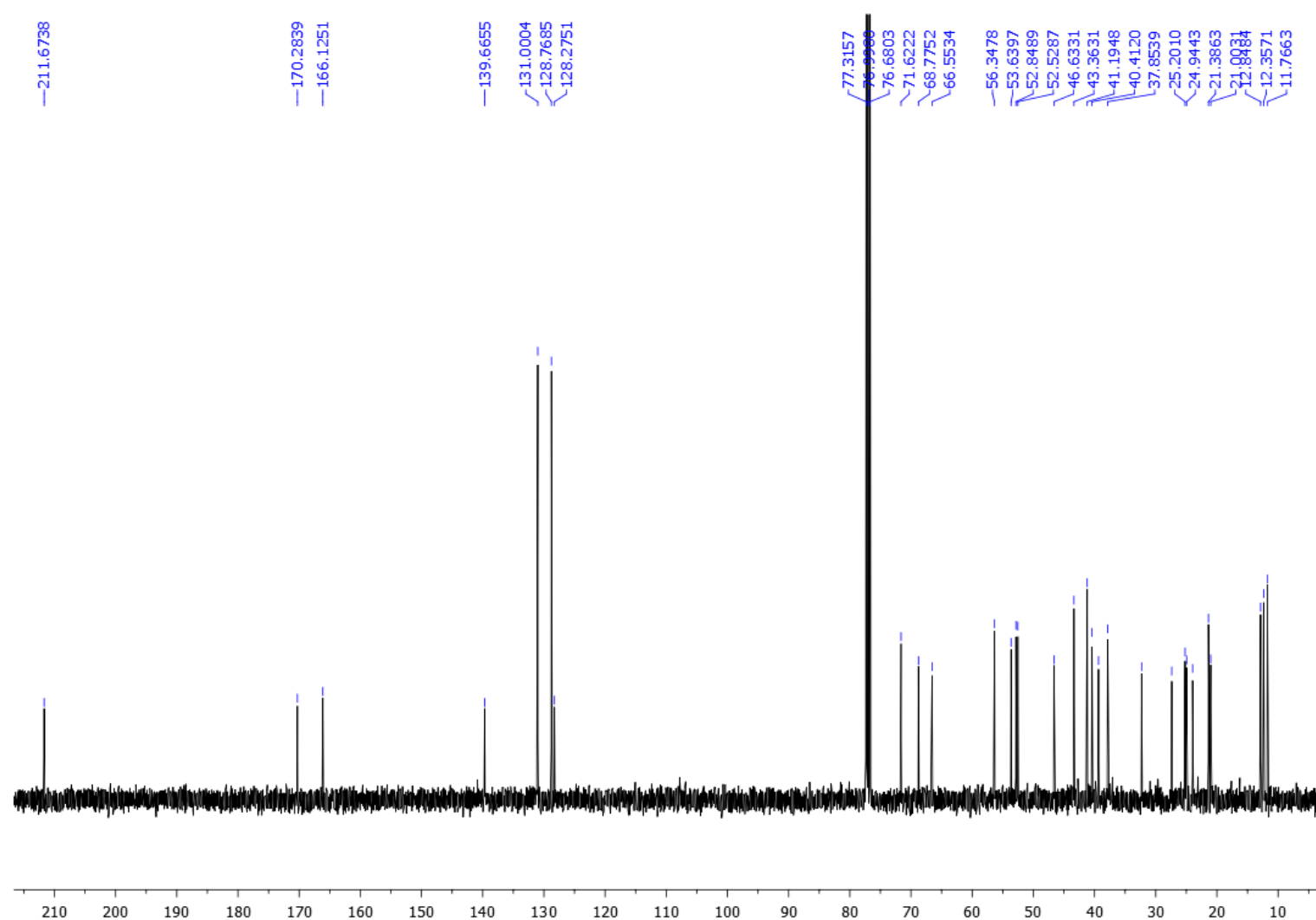


Anexo 1.I: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-cloro) benzoato (45a).

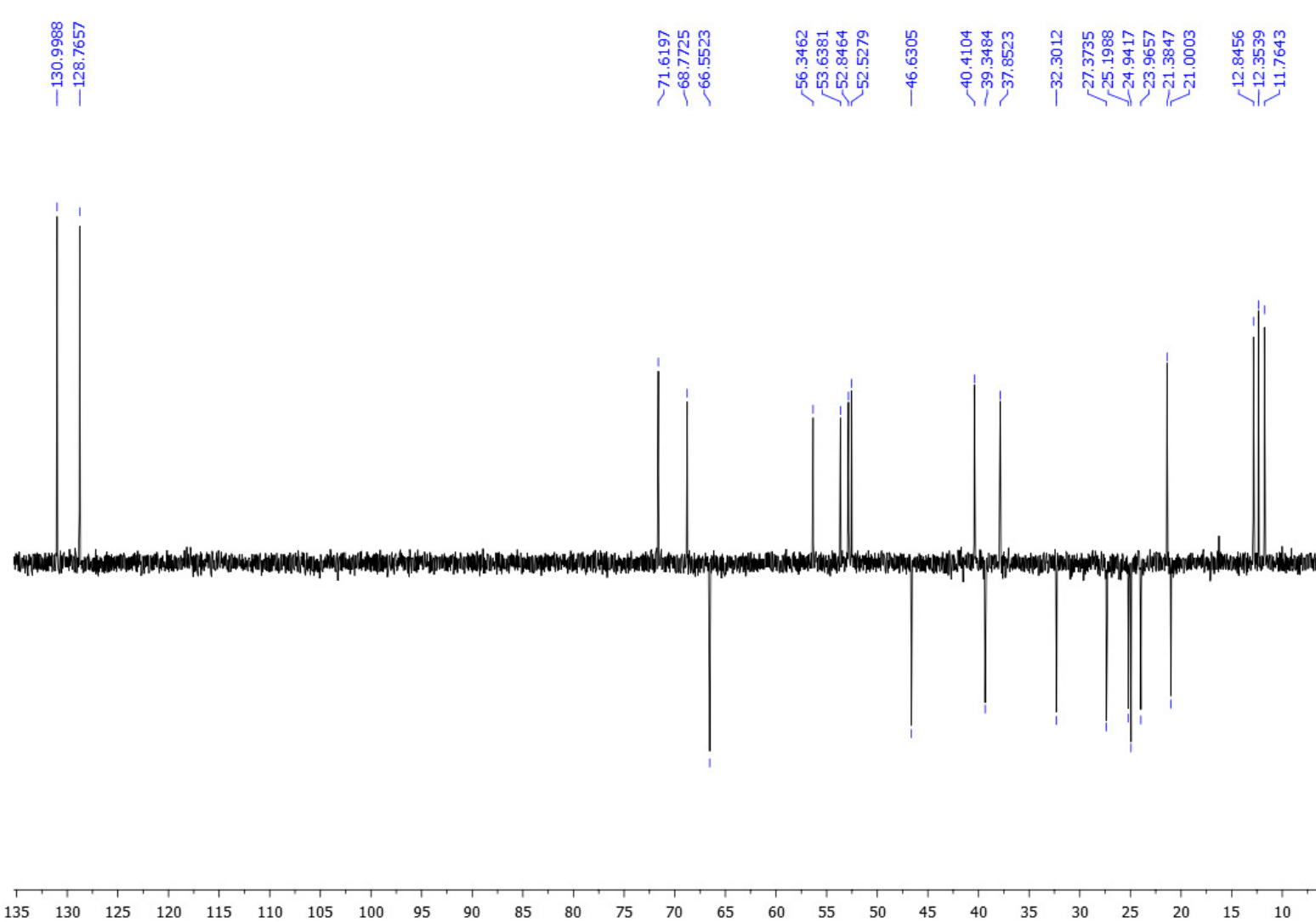
Espectro ¹H RMN



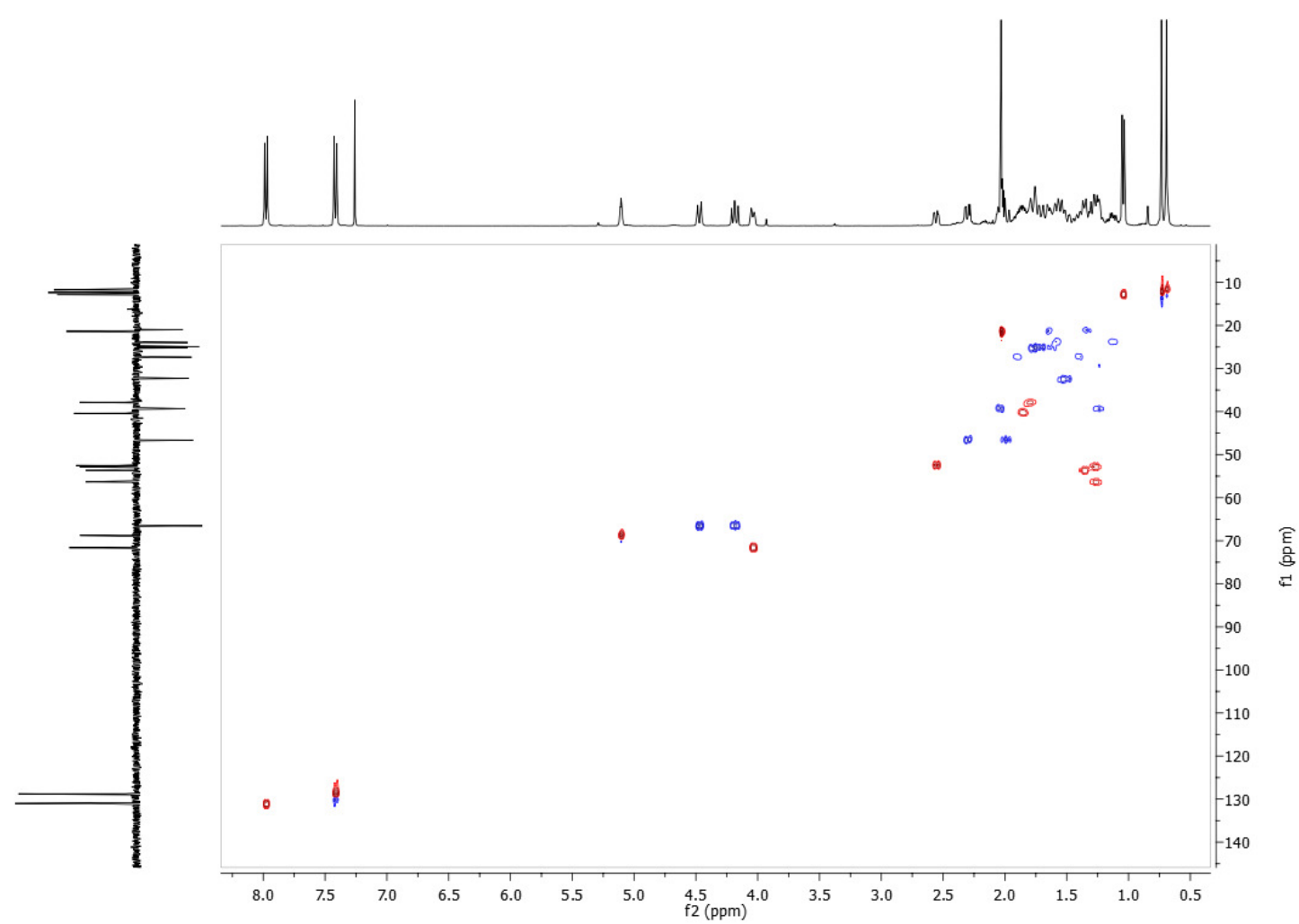
Espectro ¹³C RMN



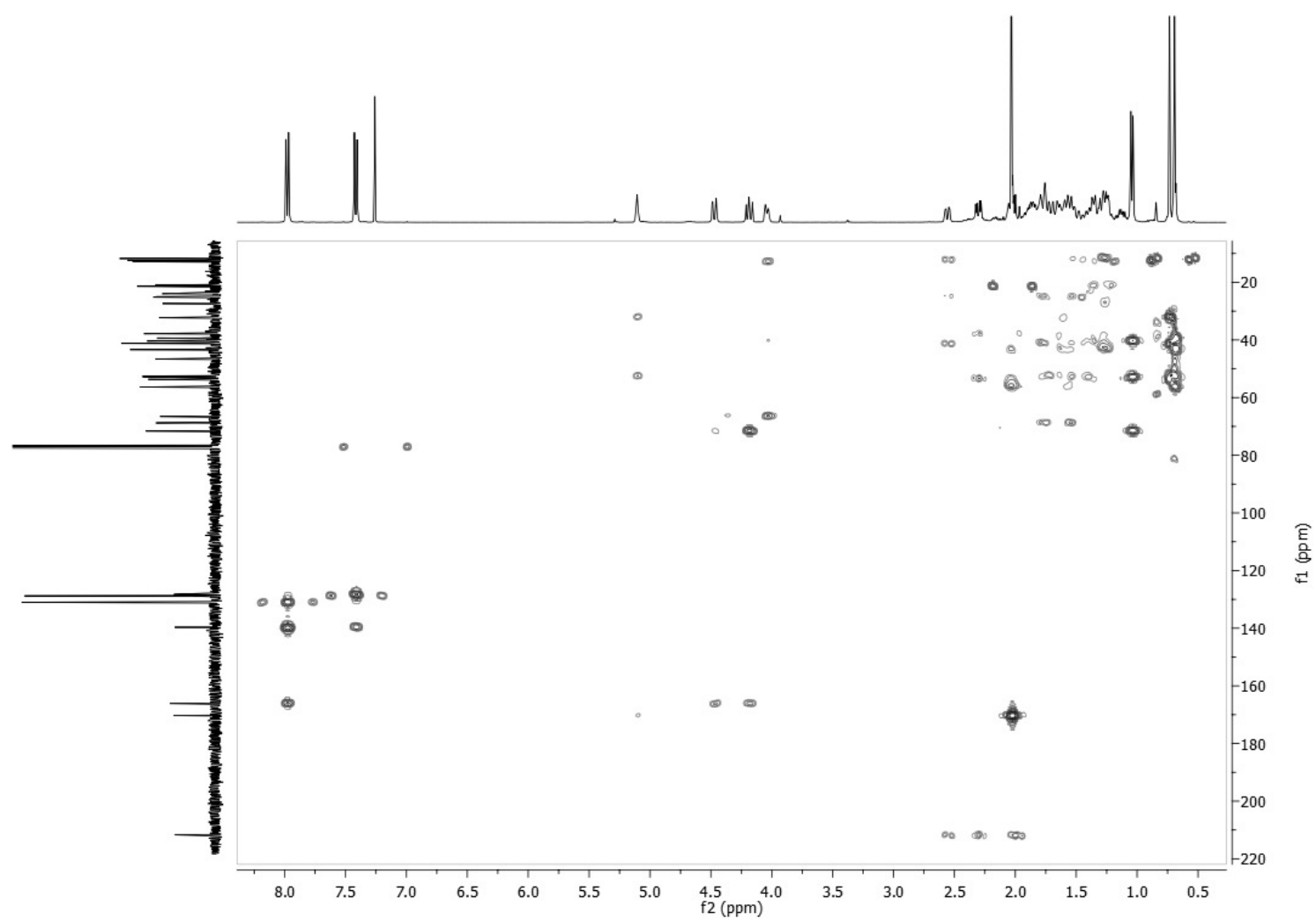
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC

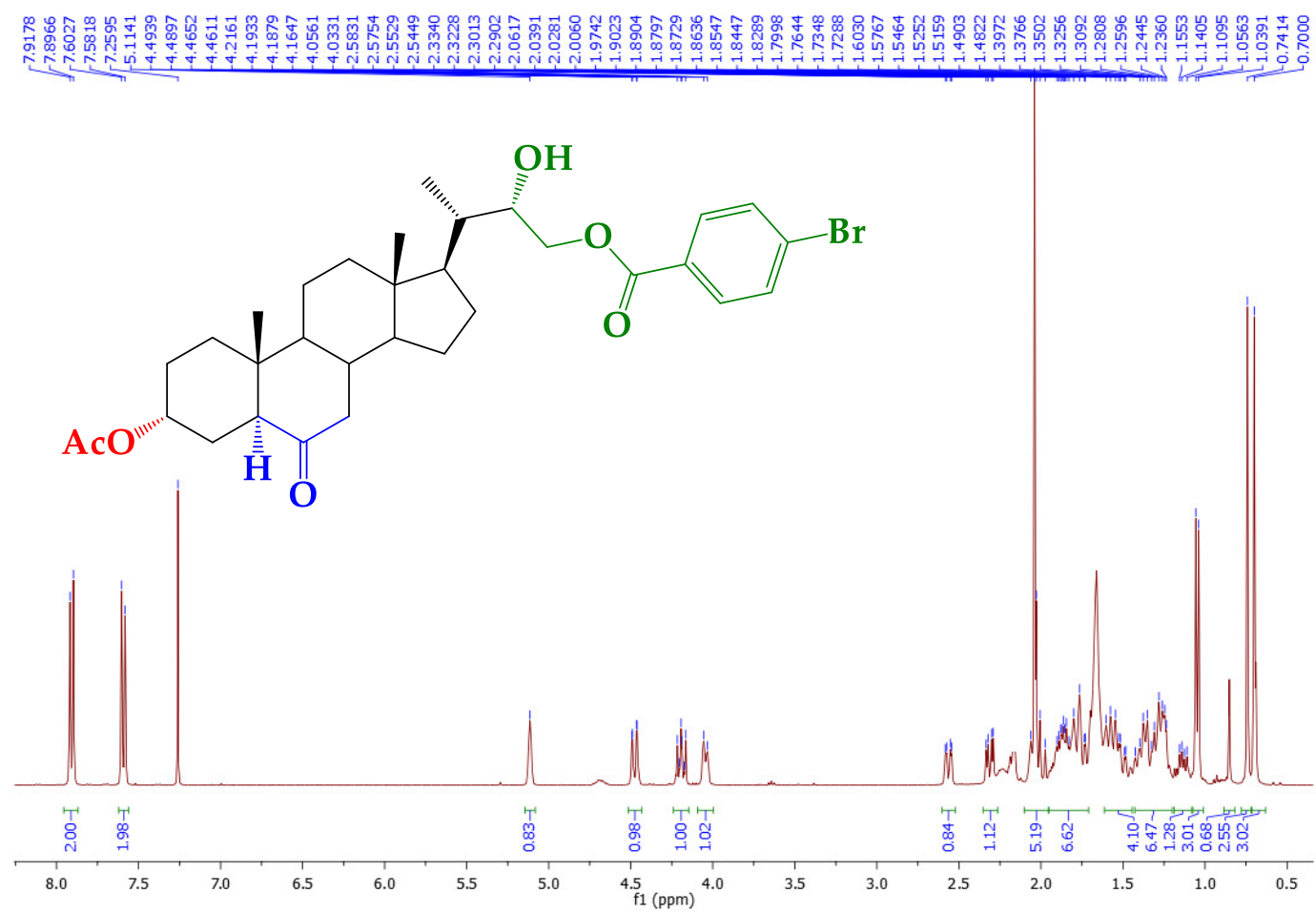


Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC

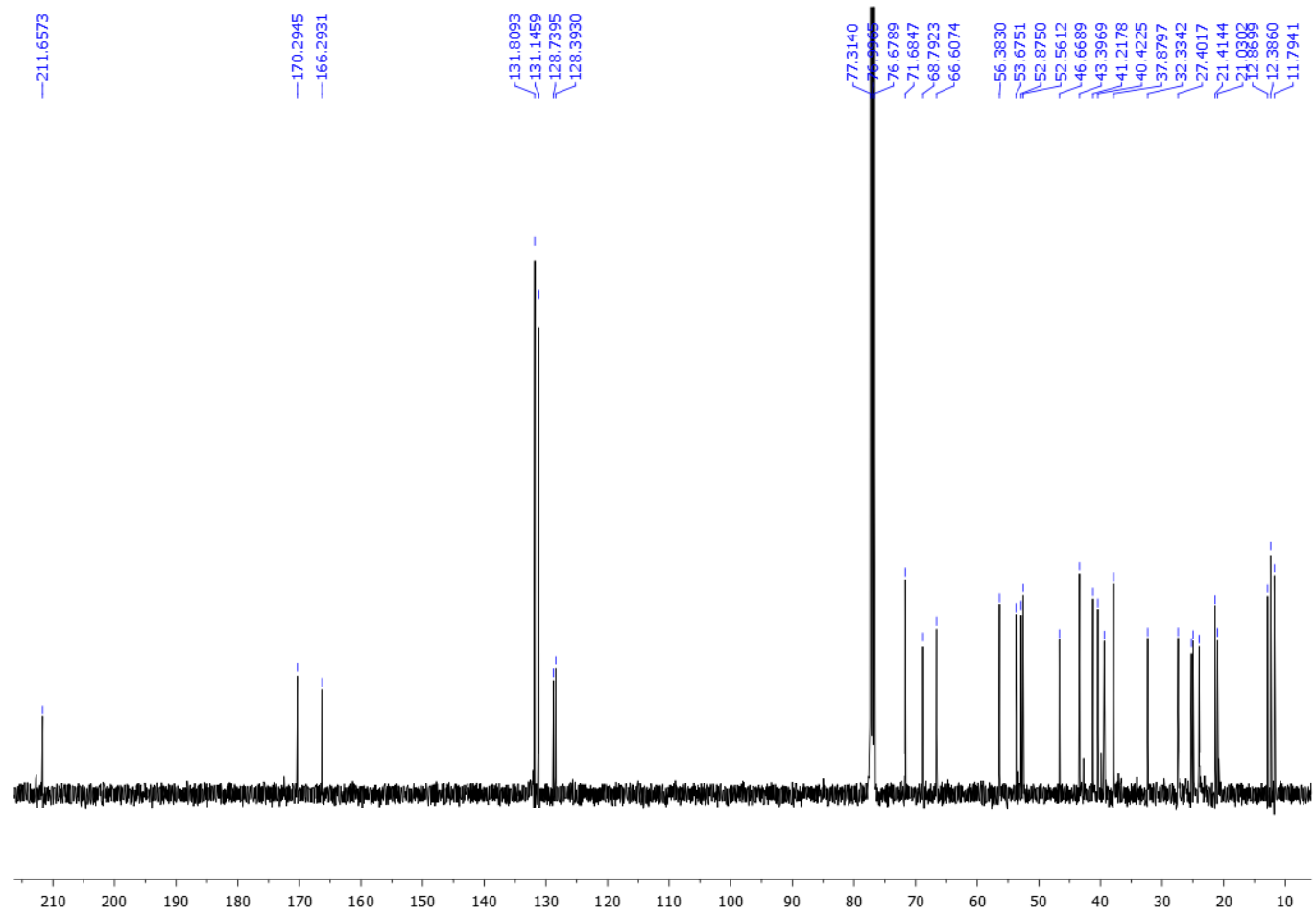


Anexo 1.J: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-bromo) benzoato (45b).

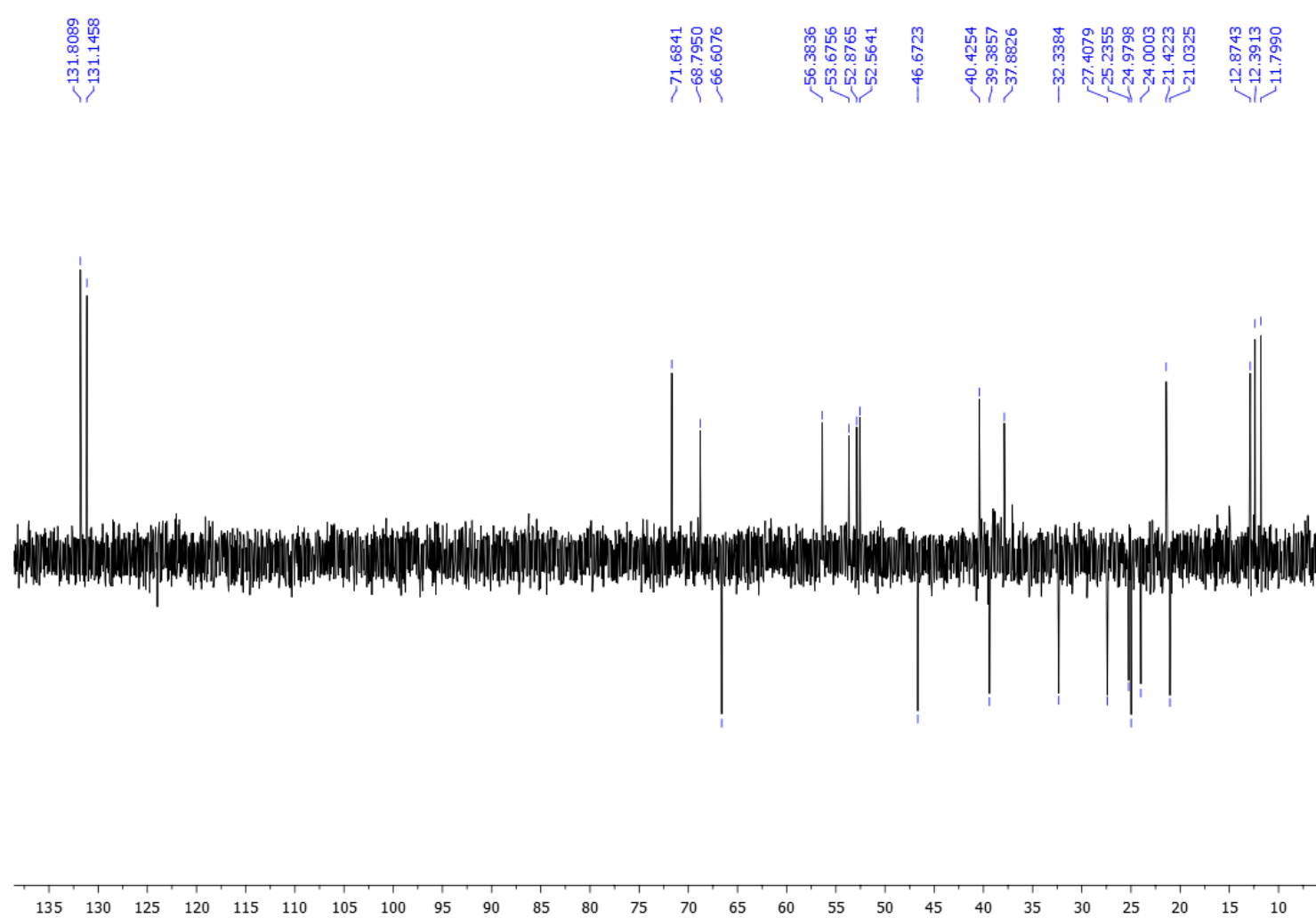
Espectro ^1H RMN



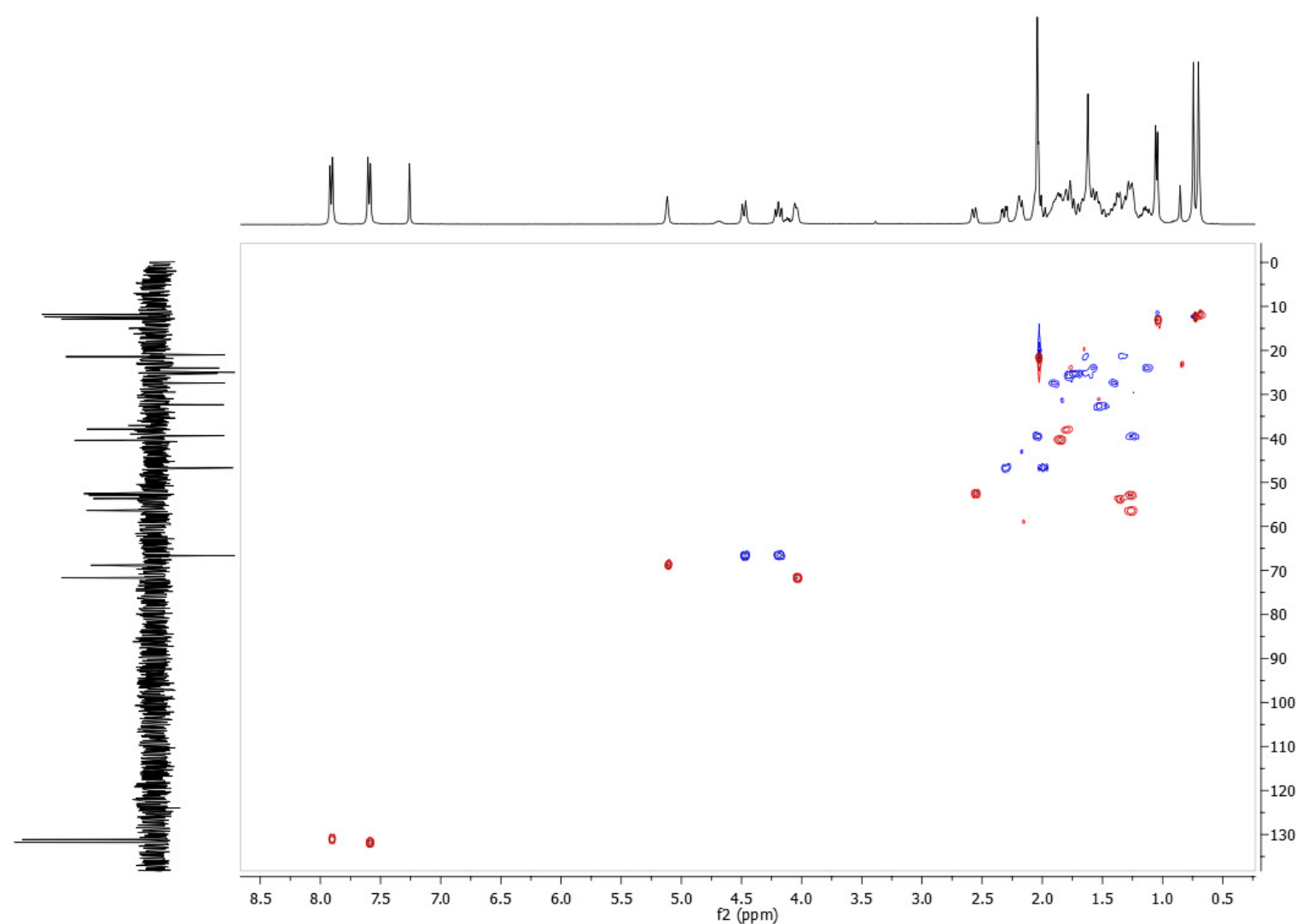
Espectro ^{13}C RMN



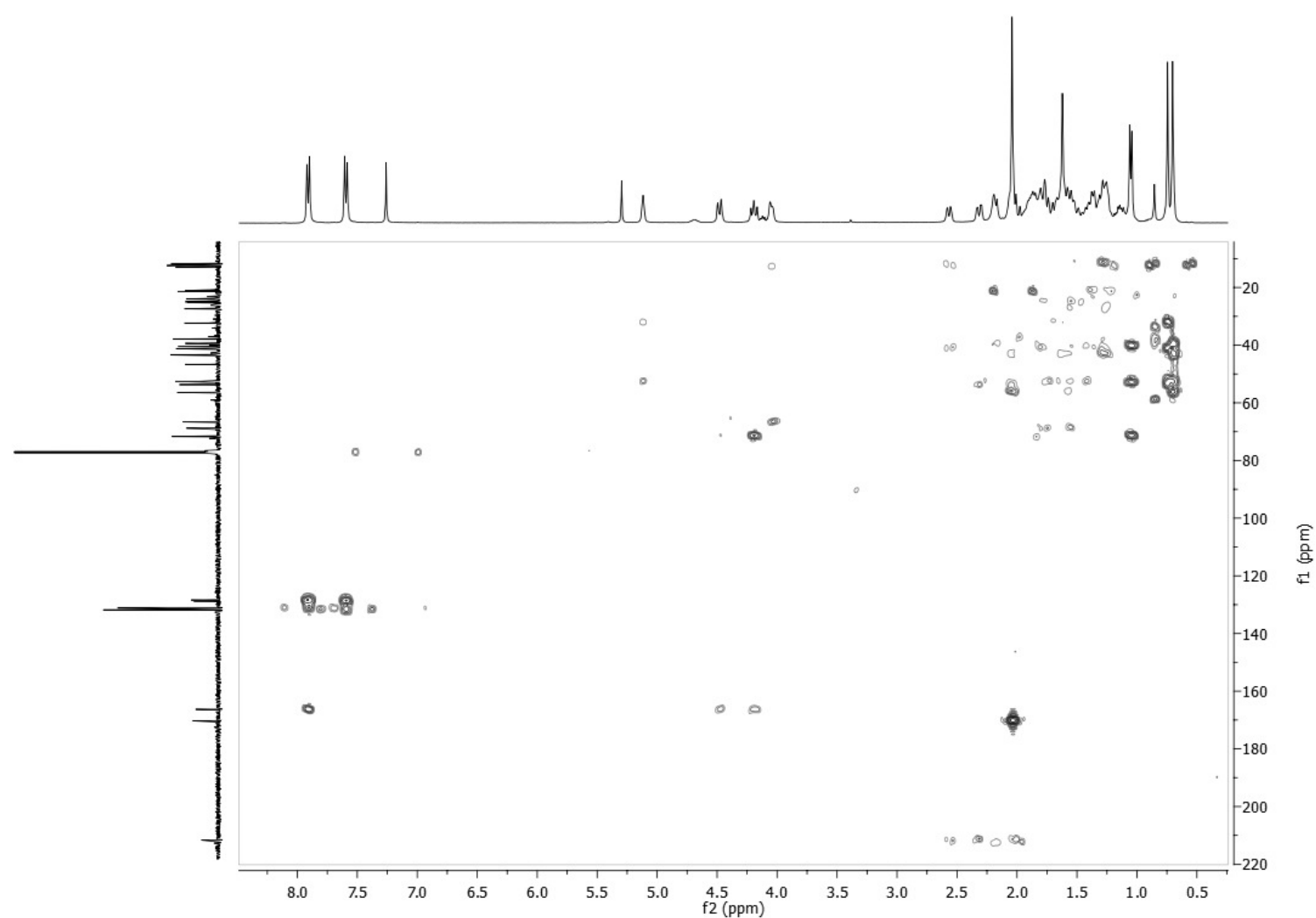
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro 2D ¹H-¹³C HSQC

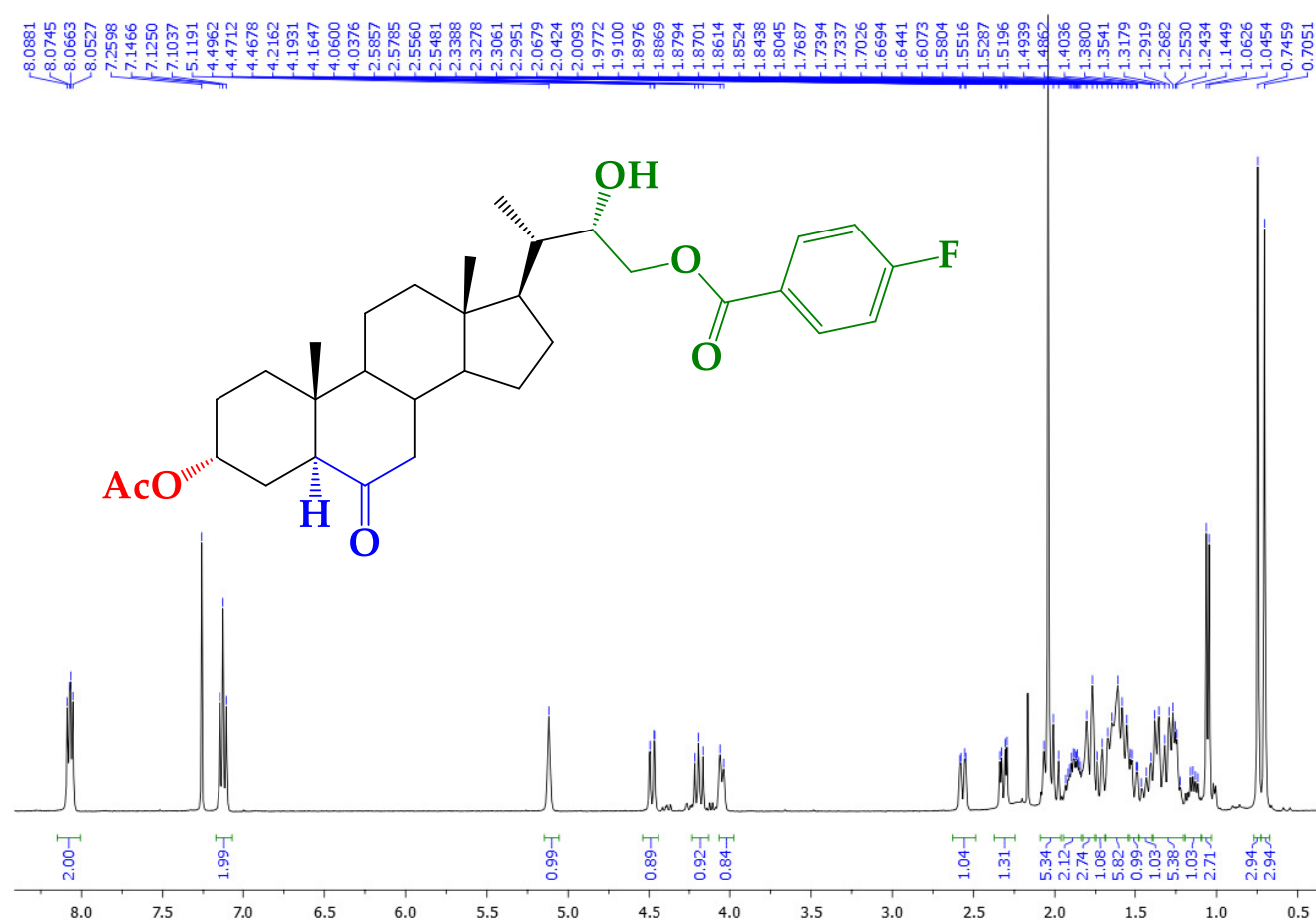


Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC

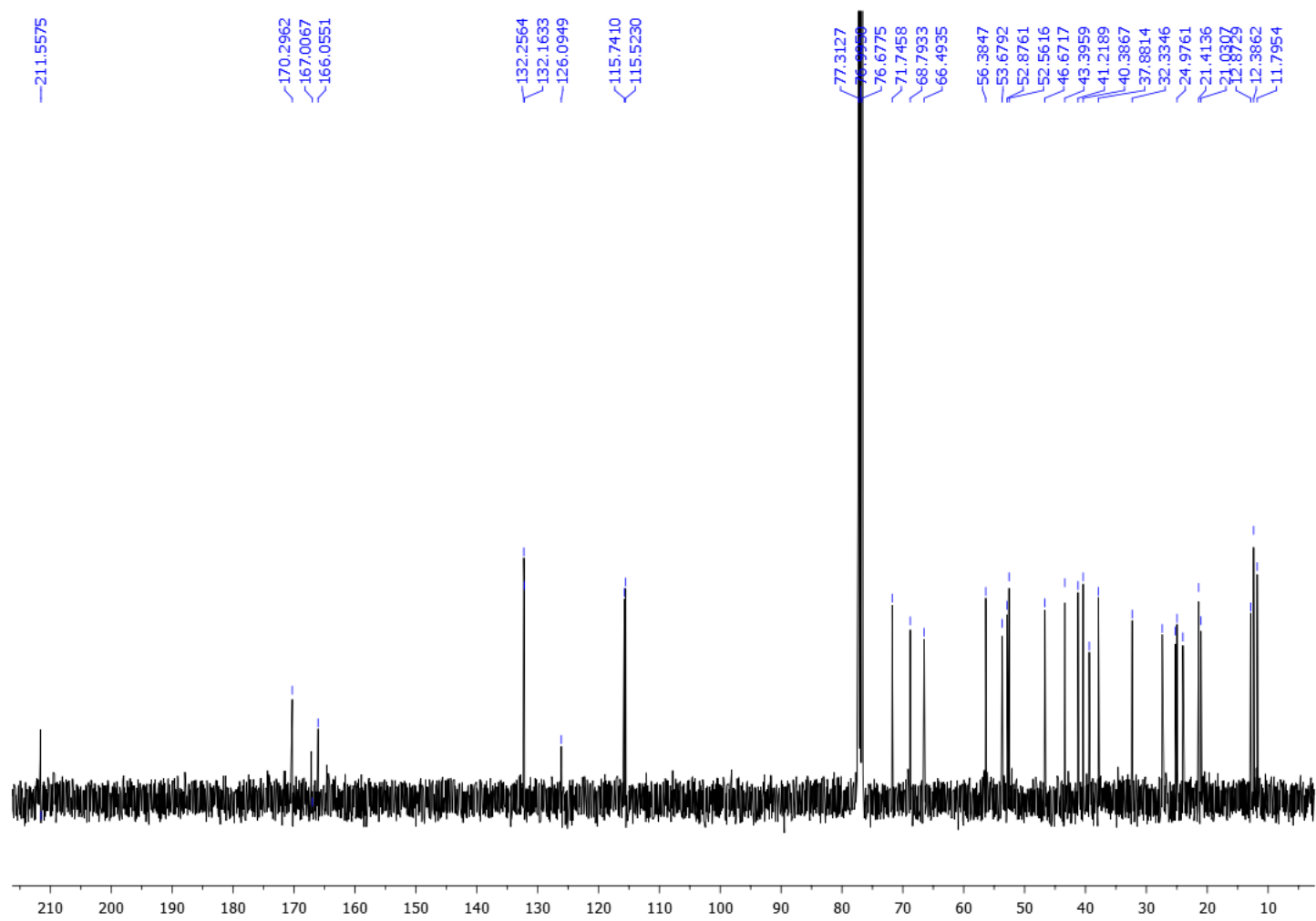


Anexo 1.K: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-fluoro) benzoato (45c).

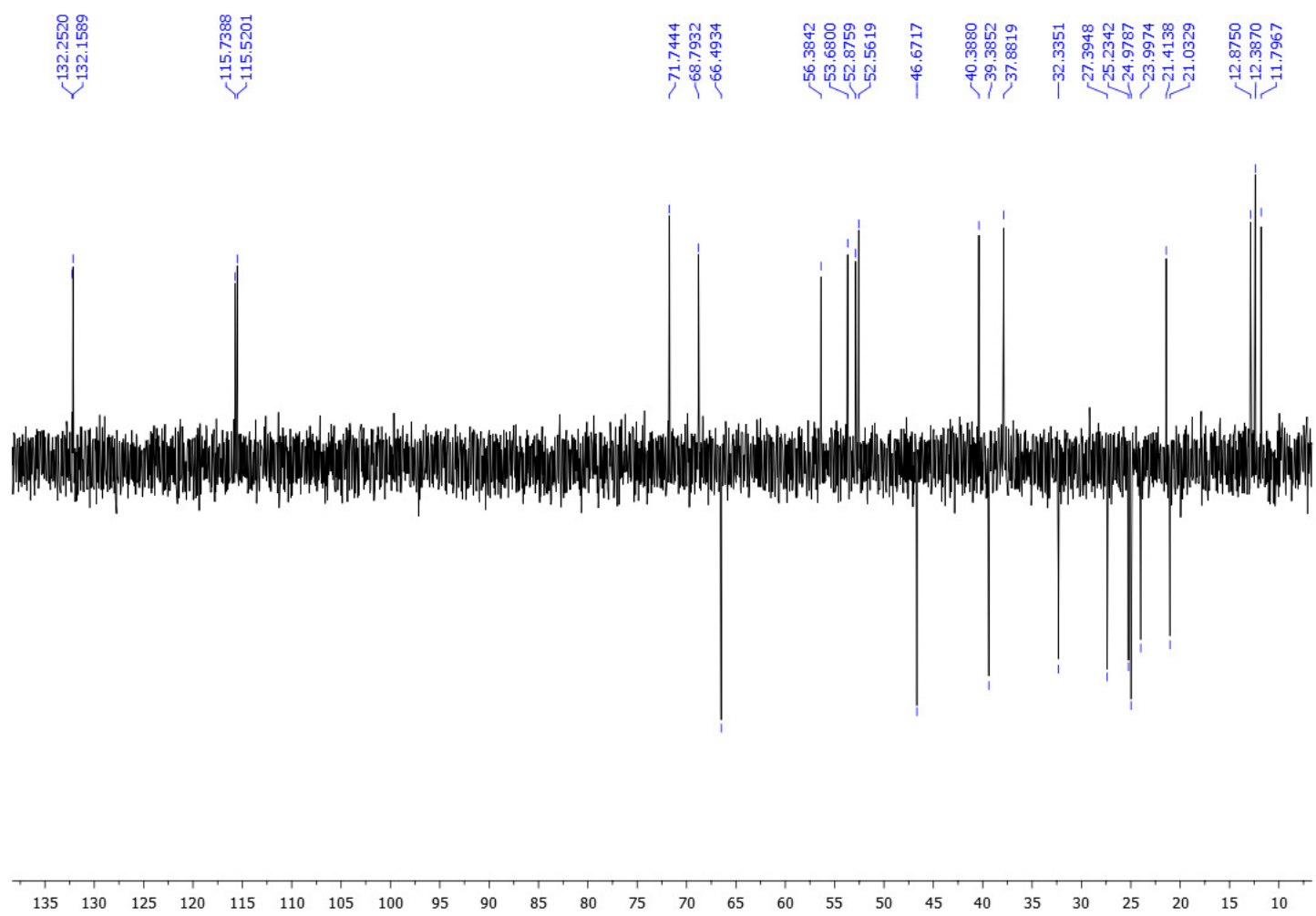
Espectro ^1H RMN



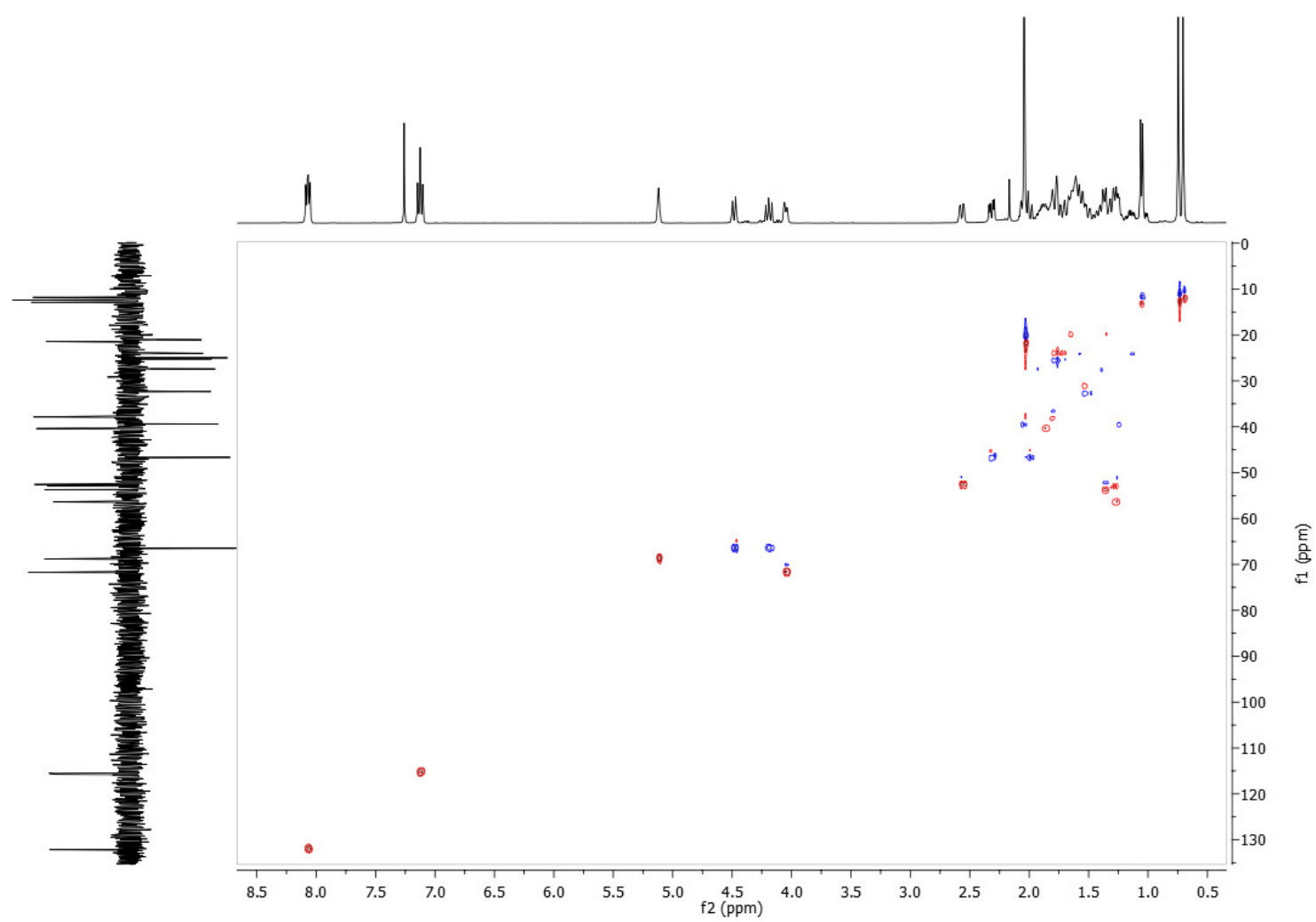
Espectro ¹³C RMN



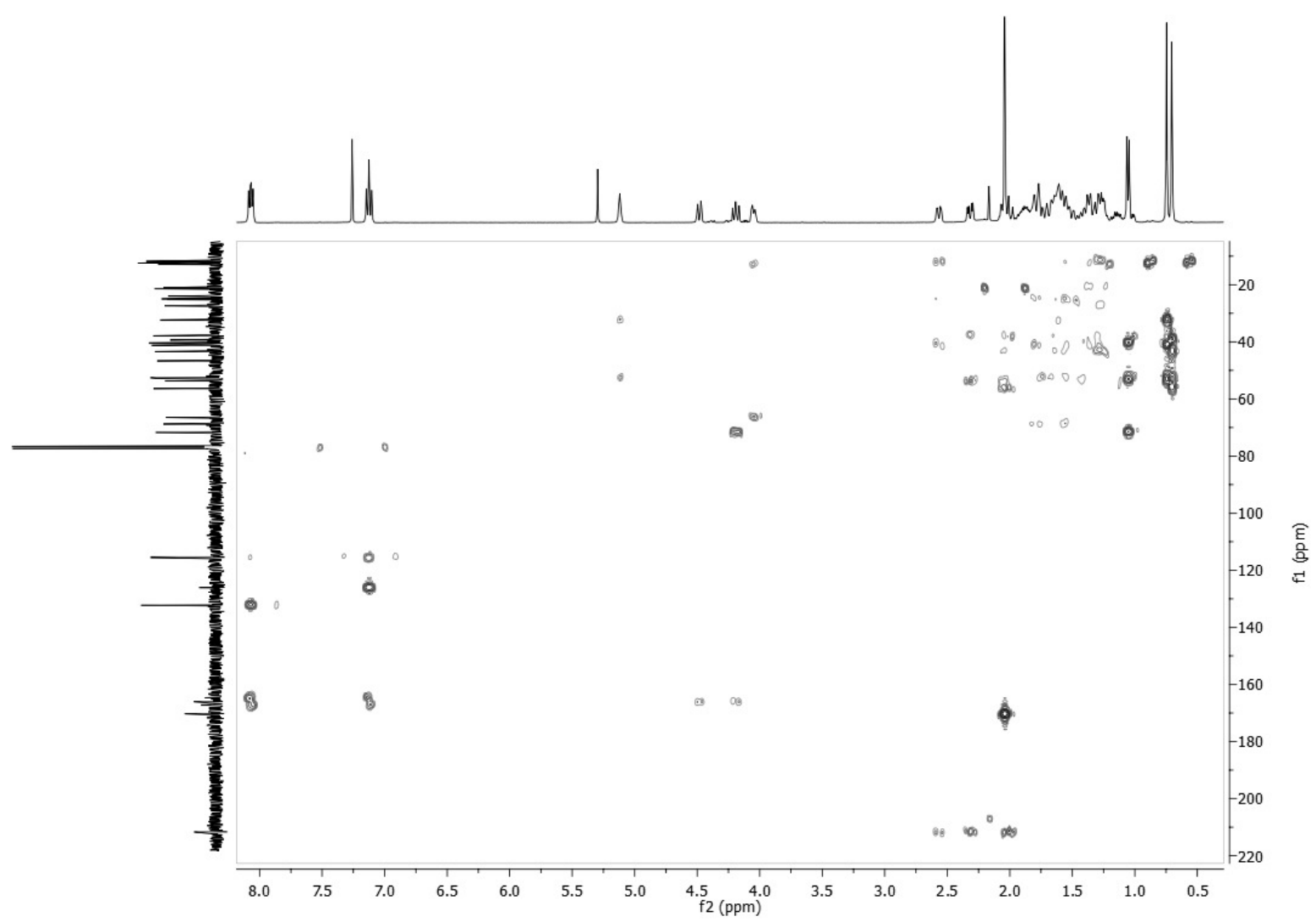
Espectro ¹³C-RMN DEPT-135



Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC

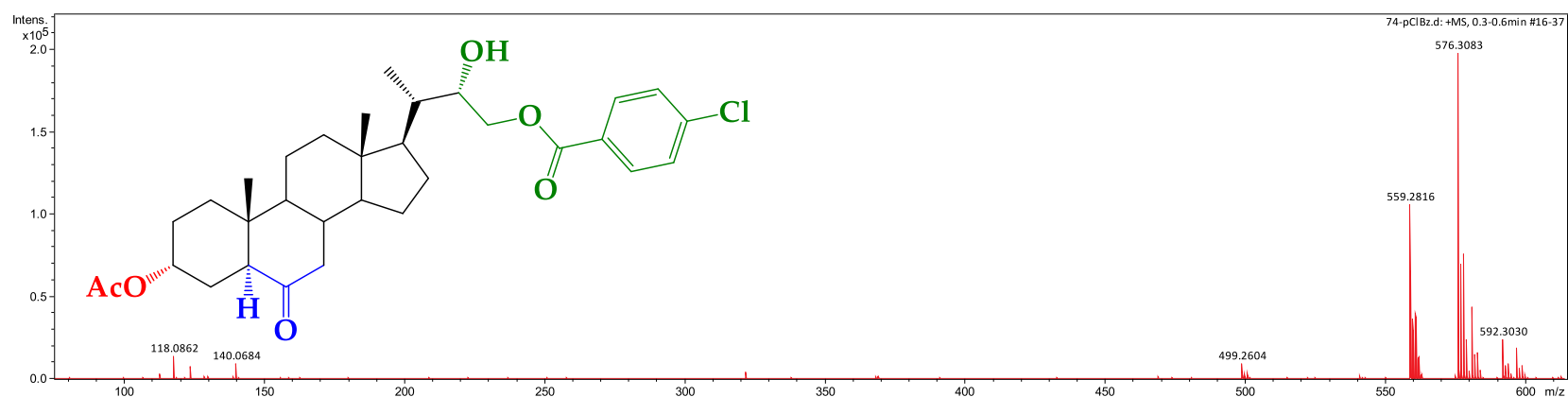


Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC

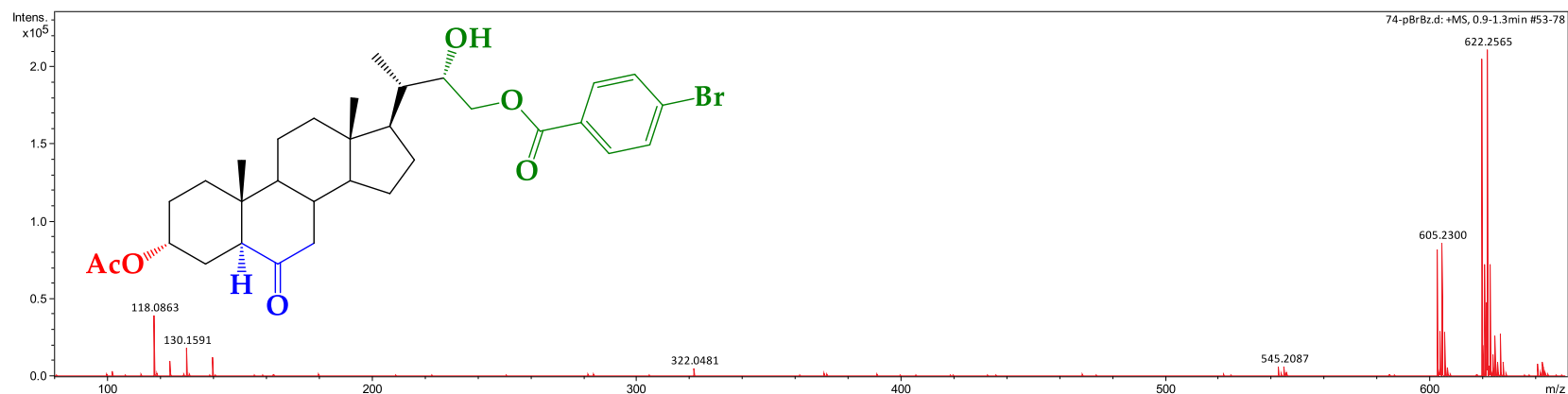


Anexo 2: Espectros de Masas de Alta Resolución.

Anexo 2.A: Espectro de masas compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-cloro) benzoato (45a).



Anexo 2.B: Espectro de masas compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-bromo) benzoato (45b).



Anexo 2.C: Espectros compuesto (22S)-22-hidroxi-6-oxo-24-nor-5 α -colan-3,23-diilo-3 α -acetato-23-(4-fluoro) benzoato (45c).

