



UNIVERSIDAD TECNICA  
FEDERICO SANTA MARIA



Magíster en Ciencias  
Mención **Química**



Departamento  
de **Química**

Universidad Técnica Federico Santa María

Programa de Magister en Ciencias, mención Química

Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo  
22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colanos, benzoilados en  
C-23 y sus efectos frente al crecimiento y desarrollo  
vegetal.

**Sebastián Nicolás Jorquera Hernández**

Valparaíso, Chile  
2024



## CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

### 1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

**Tipo de monografía (marcar una opción):**  Memoria o trabajo de título  Tesis de Postgrado

**Título del trabajo:** Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colanos, benzoiados en C-23 y sus efectos frente al crecimiento y desarrollo vegetal.

**Nombre del candidato(a):** Sebastián Nicolás Jorquera Hernández.

**Carrera / Grado:** Magíster en Ciencias mención Química.

**Campus:** Casa Central. **Departamento:** Departamento de Química.

### 2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Luis Javier Espinoza Catalán, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

### 3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

6 meses  12 meses  2 años  3 años  5 años  10 años

**Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):**

---

---

---

### 4.- FIRMAS

**Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:**

Fecha: 30-05-2026 Firma: \_\_\_\_\_

**Estudiante o Candidato(a):**

Fecha: 30-05-2026 Firma: \_\_\_\_\_

*Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.*



Universidad Técnica Federico Santa María

Programa de Magister en Ciencias, mención Química

Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colanos, benzoiados en C-23 y sus efectos frente al crecimiento y desarrollo vegetal.

Tesis de grado presentada por

**Sebastián Nicolás Jorquera Hernández**

Como requisito parcial para optar al grado de  
Magister en Ciencias, mención Química.

Director(a) de Tesis

**Dr. Luis Espinoza Catalán**

Codirector de tesis

**Dr. Lautaro Taborga Morales**

Codirectora de tesis

**Dra. Katy Díaz Peralta**

Valparaíso, Chile

2024





UNIVERSIDAD TÉCNICA  
FEDERICO SANTA MARÍA



Magíster en Ciencias  
Mención **Química**



Departamento  
de **Química**

## Universidad Técnica Federico Santa María

### Programa de Magister en Ciencias, mención Química

Título de la Tesis:

SINTESIS DE NUEVOS ANALOGOS DE BRASINOESTEROIDES DEL TIPO 22(S)-  
HIDROXI-3,6-DIOXO-24-NOR-5 $\alpha$ -COLANOS, BENZOILADOS EN C-23 Y SUS  
EFECTOS FRENTE AL CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETAL

Autor:

**Sebastián Nicolás Jorquera Hernández**

Trabajo de Tesis, presentado en cumplimiento parcial de los requisitos para  
el Grado de Magister en Ciencias, mención Química de la Universidad  
Técnica Federico Santa María.

Dra. Waleska Vera

.....

Dra. Paulina Dreyse

.....

Dr. Mauricio Osorio

.....

Valparaíso, Chile 2024

## *Agradecimientos*

En estas próximas líneas me gustaría agradecer a todas las personas involucradas de alguna u otra manera en la realización y finalización de este trabajo de tesis, desde mi total sinceridad y honestidad.

En primer lugar, a mis padres, Vicky y Fabián, por su apoyo y amor incondicional desde que tengo memoria, por todos los valores que me inculcaron y apoyo emocional para emprender el camino universitario lejos de mi hogar, proceso que me marcó de por vida y sin duda nunca lo olvidaré como también la hermosa infancia y formación que me dieron.

En segundo lugar, a mi hermana Fernanda y abuelos Raúl y Silvia, por todo el amor y fe que tienen en mí de lograr mis sueños y ser feliz, además de todo el apoyo que siempre me han brindado.

En tercer lugar, agradecer al Dr. Luis Espinoza por su constante apoyo, paciencia y dedicación desde el comienzo de mi recorrido por el área de la química orgánica y su motivación entregada para llegar a este punto. También al Dr. Lautaro Taborga y a la Dra. Katy Díaz, por sus apoyo y colaboraciones tanto en experimentos como en conocimientos fundamentales y avanzados en el rubro que me permitieron realizar un trabajo pertinente al de un postgrado. Al equipo del Laboratorio de Síntesis Orgánica de la UTFSM por brindarme todos los elementos y conocimientos necesarios para desarrollar mi trabajo de manera óptima, en específico a César Gonzáles, María Núñez, Dres. Mauricio Soto y Osorio, Ernesto Valdés y Karen Catalán.

A todos mis amigos que me han acompañado durante todo este camino desde Rancagua, Valparaíso y todo Chile que he conocido durante mi periodo universitario, sin duda son una componente muy importante en mi estadía aquí en Valparaíso, mi segunda familia.

Por último, agradezco al Programa Conjunto de Magíster en Ciencias mención Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, a la Dirección de Postgrado y Programas (DGIP-USM N° 13.15.83) por las becas del Programa de Incentivos a la Iniciación Científica USM (PIIC 056/021) y al Proyecto Fondecyt N° 1231502. Muchas gracias.

## Resumen

### **Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colanos, benzoilados en C-23 y sus efectos frente al crecimiento y desarrollo vegetal.**

*Palabras Claves: Brasinoesteroides, síntesis, actividad biológica, fitohormonas, diseño racional*

El sector agrícola chileno se enfrenta a uno de los desafíos más grandes que ha existido, debido a la adaptación al cambio climático, destacándose la disponibilidad de los recursos hídricos presentes que se irán limitando gradualmente con el tiempo. Una alternativa eficaz para afrontar este problema es la aplicación de hormonas vegetales en cultivos de interés comercial, puesto que en bajas cantidades fomentan el crecimiento y desarrollo vegetal incluyendo tolerancia frente a diversos tipos de estrés presentados por el ecosistema, mejorando tanto la calidad como el rendimiento de las hortalizas. Dentro de las familias de hormonas vegetales conocidas en la actualidad se encuentran los Brasinoesteroides (BRs).

Enfocado en este tipo de fitohormonas, en el presente trabajo se sintetizaron seis nuevos análogos de brasinoesteroides a partir de ácido hiodeoxicólico (**9**) como precursor. Los nuevos compuestos fueron evaluados con el fin de medir su impacto a nivel hormonal a través de dos ensayos biológicos: Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) y Segundo Internudo de Frijol (SEF). El análogo bromado **39f** presentó una actividad estimulante similar a la del control positivo (**1**) en ambos bioensayos a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  [M]. El estudio predictivo *in silico* de acoplamiento molecular entre el complejo proteico propio de los BRs y los ligandos sintetizados **39a-39f** presentaron una afinidad por el sitio activo de unión tomando como referencia al compuesto nativo (**1**) incluido en la estructura cristalina de la proteína, revelando que el compuesto **39f** obtuvo los mejores valores en cuanto a energía de unión y afinidad en parte a las múltiples interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno; lo cual indica una consistencia entre los resultados predictivos con los obtenidos en forma experimental.

Por lo tanto, este nuevo tipo de análogos de BRs proponen una nueva alternativa de requisitos estructurales para la obtención de moléculas promotoras de crecimiento y desarrollo vegetal para su aplicación en la agricultura de manera sustentable y efectiva.

## Abstract

### **Synthesis of new brassinosteroid analogs of 22(S)-hydroxy-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -cholestane side chain type, benzoylated at C-23 and their effects in growth and vegetative development**

*Keywords: brassinosteroids, synthesis, biological activity, phytohormones, rational design*

The Chilean agricultural sector is facing one of the greatest challenges ever, due to the adaptation to climate change, highlighting the availability of water resources that will be gradually limited over time. An effective alternative to face this problem is the application of plant hormones in crops of commercial interest, since they promote plant growth and development in low concentrations including tolerance to many types of stress presented by the ecosystem, improving both quality and yield of vegetables. Among the families of plant hormones currently known, the Brassinosteroids (BRs) are one of them.

Based in this type of phytohormones, six new BRs analogues were synthesized from hyodeoxycolic acid (**9**) in the present work. All the evaluated compounds of the new series have shown an interesting biological activity in the biological tests applied: Rice Lamina Inclination Test (RLIT) and Bean Second Internode Bioassay (BSIB). The brominated analogue **39f** performed a stimulatory activity similar to the positive control (**1**) in both bioassays at  $1 \times 10^{-8}$  [M]. The “*in silico*” predictive studies of molecular docking between the BRs receptor complex and the synthesized analogues (**39a-39f**) as ligands presented a good affinity for the active binding site, with reference of the native compound included in the crystalline structure (**1**), revealing that **39f** reached the best features in terms of binding energy and stability due to the multiple hydrophobic interactions and hydrogen bonds; which indicates a consistency between the predictive studies with the experimental results.

Consequently, this new type of BRs analogues proposes a new alternative of structural requirements for obtaining plant growth and development promoting molecules for their application in agricultural activities in a sustainable and effective manner.

# Contenido

1	Introducción .....	1
2	Marco Teórico .....	2
2.1	Fitohormonas .....	2
2.1.1	Definición y principal función.....	2
2.2	Brasinoesteroides.....	3
2.2.1	Definición .....	3
2.2.2	Origen .....	4
2.2.3	Estructura química .....	6
2.2.4	Ubicación de BRs en plantas .....	7
2.3	Efectos fisiológicos de los BRs.....	9
2.3.1	Rol en las plantas.....	9
2.4	Mecanismo de acción.....	10
2.4.1	Percepción de BRs por la célula .....	10
2.4.2	Mutantes de BRs .....	11
2.4.3	Vía de señalización de BRs en la célula vegetal.....	12
2.5	Usos agrícolas prácticos de los BRs .....	14
2.6	Medición de la actividad biológica de los BRs.....	16
2.6.1	Bioensayo de Segundo Entrenado de Frijol (SEF) .....	16
2.6.2	Bioensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA).....	16
2.7	Relación estructura actividad de los BRs .....	17
2.7.1	Farmacóforo .....	17
2.7.2	Relación Estructura Actividad (SAR <i>Structure-Activity Relationship</i> ) .....	18
2.8	Síntesis de BRs.....	22
2.8.1	Sustratos naturales utilizados como material de partida en la síntesis de BRs .....	23

2.9	Modificaciones estructurales de BRs .....	24
2.9.1	Modificaciones estructurales en análogos de BRs .....	24
3	Planteamiento del Problema .....	31
4	Hipótesis.....	33
5	Objetivos .....	34
5.1	Objetivo general.....	34
5.2	Objetivos específicos.....	34
6	Metodologías .....	35
6.1	Síntesis química .....	35
6.1.1	Esquema general de síntesis .....	35
6.1.2	Rutas sintéticas desarrolladas para la obtención de nuevos análogos de BRs propuestos .....	35
6.2	Evaluaciones biológicas.....	38
6.2.1	Ensayo biológico de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) .....	38
6.2.2	Ensayo biológico de Segundo Entrenado de Frijol (SEF) .....	38
6.3	Estudios iniciales de <i>docking</i> molecular .....	39
7	Experimental .....	40
7.1	Materiales y equipos generales .....	40
7.1.1	Solventes .....	40
7.1.2	Insumos .....	40
7.1.3	Reactivos .....	41
7.1.4	Cromatografía en capa fina .....	41
7.1.5	Cromatografía en columna.....	41
7.2	Instrumentos y equipos.....	42
7.3	Materiales y equipos biológicos.....	42
7.4	Abreviaturas y siglas.....	43

7.4.1	Síntesis química .....	43
7.4.2	Espectroscopía infrarroja .....	44
7.4.3	Espectrometría de masas .....	44
7.4.4	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.....	44
7.4.5	Acoplamiento molecular .....	45
7.5	Síntesis Química .....	45
7.5.1	Síntesis de ácido 3,6-dioxo-5 $\beta$ -colan-24-oico (40).....	45
7.5.2	Síntesis de 24-nor-5 $\beta$ -colan-22-en-3,6-diona (41).....	46
7.5.3	Síntesis de 24-nor-5 $\alpha$ -colan-22-en-3,6-diona (42).....	47
7.5.4	Síntesis de la mezcla epimérica 22( <i>R/S</i> ),23-dihidroxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (43ab).....	48
7.5.5	Síntesis de 23-benzoato de 22( <i>S</i> )-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39a) .....	49
7.5.6	Síntesis de 23-(4-metil) benzoato de 22( <i>S</i> )-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39b).....	50
7.5.7	Síntesis de 23-(4-metoxi) benzoato de 22( <i>S</i> )-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39c).....	51
7.5.8	Síntesis de 23-(4-fluoro) benzoato de 22( <i>S</i> )-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39d).....	53
7.5.9	Síntesis de 23-(4-cloro) benzoato de 22( <i>S</i> )-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39e).....	54
7.5.10	Síntesis de 23-(4-bromo) benzoato de 22( <i>S</i> )-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39f).....	55
7.5.11	Síntesis de 22( <i>S</i> ),23-dihidroxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (43a) desde 39a .....	56
7.6	Evaluaciones biológicas.....	57
7.6.1	Ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA).....	57
7.6.2	Ensayo del Segundo Entrenado de Frijol (SEF).....	59
7.7	Estudios de Acoplamiento Molecular .....	62

8	Resultados y Discusiones.....	64
8.1	Síntesis químicas .....	64
8.2	Evaluaciones biológicas.....	74
8.2.1	Resultados del ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) .....	74
	Resultados del ensayo de Segundo Entrenado de Frijol (SEF) .....	77
8.3	Estudios “ <i>In Silico</i> ” .....	79
9	Conclusiones.....	83
	Referencias.....	85
	Anexo 1.....	95
	Anexo 2.....	152

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de algunas fitohormonas principales. ....	3
<b>Figura 2.</b> Numeración del esqueleto del Brasinólido (1).....	5
<b>Figura 3.</b> Sustituyentes diferentes en los anillos A, B y cadena lateral de BRs de origen natural. ....	7
<b>Figura 4.</b> Brasinoesteroides de origen natural más comunes (2-7). ....	8
<b>Figura 5.</b> Modos de acción de hormonas esteroides en animales y vegetales. Las hormonas esteroides animales se desplazan de sus sitios de síntesis en un complejo con proteínas transportadoras, lo que permite el transporte de estos compuestos hidrófobos a través del sistema circulatorio. Una vez que alcanzan la célula diana, las hormonas esteroides se disocian de los portadores y se difunden a través de la membrana plasmática al citoplasma, donde se unen a los receptores solubles. Los complejos hormona-receptor se mueven al núcleo y alteran la expresión de genes. Alternativamente, las hormonas esteroideas pueden unirse a los receptores localizados en la membrana plasmática y mediar respuestas no transcripcionales. En plantas, las hormonas esteroides libres (BRs) alcanzan el apoplasto donde se unen a la parte extracelular del receptor localizado en la membrana plasmática (BRI1). Este evento activa una cadena de reacciones de fosforilación/desfosforilación, que finalmente conduce al movimiento de los factores de transcripción desfosforilados (BES1/BZR1) al núcleo y modificaciones en la expresión génica [29]. .....	14
<b>Figura 6.</b> Núcleo común farmacóforo para BRs de origen natural [44]. ....	18
<b>Figura 7.</b> Variación de la actividad según el anillo A [41]. ....	19
<b>Figura 8.</b> Variación de la actividad según anillo B [42]. ....	20
<b>Figura 9.</b> Diferentes conformaciones del núcleo esteroideal, fusiones de anillo A/B trans, cis y variación de actividad [42]. ....	20
<b>Figura 10.</b> Variación de la actividad según la cadena lateral [42]. ....	21
<b>Figura 11.</b> Estructuras de esteroides de origen natural empleados en la síntesis de BRs. ....	24
<b>Figura 12.</b> Análogos espiroestánicos y furoestánicos de BRs. ....	25
<b>Figura 13.</b> Análogos 22,23-epoxibrasinostetroides 2,3-diacetatos. ....	25
<b>Figura 14.</b> BRs con grupos fenil p-sustituidos en la cadena lateral.....	27
<b>Figura 15.</b> Nuevos análogos de BRs con función azida o amina en C-3. ....	28
<b>Figura 16.</b> Análogos de BRs sustituidos en C-3. ....	29

<b>Figura 17.</b> Estructuras de análogos de BRs del tipo 24-norcolanos con ésteres de benzoilo en C-23. .....	30
<b>Figura 18.</b> Estructura de los análogos de BRs propuestos en esta investigación obtenidos a partir de ácido hiodeoxicólico ( <b>9</b> ). .....	32
<b>Figura 19.</b> Estructuras de cloruros de ácido empleados ( <b>44a-44f</b> ) para la síntesis de BRs con núcleos aromáticos en forma de ésteres en la posición C-23. ....	37
<b>Figura 20.</b> Reacción de oxidación de Jones del ácido hiodeoxicólico ( <b>9</b> ). ....	45
<b>Figura 21.</b> Reacción de descarboxilación oxidativa de <b>40</b> con $Pb(OAc)_4$ . ....	46
<b>Figura 22.</b> Isomerización por tratamiento ácido del compuesto <b>41</b> . ....	47
<b>Figura 23.</b> Obtención de los compuestos <b>43a</b> y <b>43b</b> a través de la dihidroxilación de Upjohn de <b>42</b> . .....	48
<b>Figura 24.</b> Obtención del compuesto <b>39a</b> a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica <b>43ab</b> . ....	49
<b>Figura 25.</b> Obtención del compuesto <b>39b</b> a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica <b>43</b> . ....	50
<b>Figura 26.</b> Obtención del compuesto <b>39c</b> a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica <b>43ab</b> . ....	51
<b>Figura 27.</b> Obtención del compuesto <b>39d</b> a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica <b>43a/43b</b> . ....	53
<b>Figura 28.</b> Obtención del compuesto <b>39e</b> a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica <b>43a/43b</b> . ....	54
<b>Figura 29.</b> Obtención del compuesto <b>39f</b> a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica <b>43a/43b</b> . ....	55
<b>Figura 30.</b> Obtención del diastereoisómero <b>43a</b> a través de hidrólisis alcalina. ....	56
<b>Figura 31.</b> Estructura del compuesto <b>40</b> y principales correlaciones 2D HMBC que confirman las posiciones de los grupos carbonilo en C-3 y C-6. ....	65
<b>Figura 32.</b> Reacción de isomerización del compuesto <b>41</b> catalizada por HCl, para obtener el compuesto <b>42</b> . Se observa el cambio experimentado por las conformaciones al pasar de una fusión cis de anillos A/B a fusión trans. ....	66
<b>Figura 33.</b> Principales diferencias espectrales observadas de $^1H$ y $^{13}C$ RMN entre los isómeros <b>41</b> y <b>42</b> , para el cambio conformacional al pasar de una fusión cis de anillos A/B a fusión trans. ....	67

<b>Figura 34.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN y estructura de la mezcla de epímeros <b>43a</b> y <b>43b</b> , que indica los valores de integración para las señales de los hidrógenos H-21a y H-21b y razón de ambos diastereoisómeros en la mezcla.....	68
<b>Figura 35.</b> a) Espectro de $^1\text{H}$ RMN del análogo de BRs <b>39a</b> , que muestra la presencia de las señales aromáticas H-2'/H-6', H-4' y H-3'/H-5'. b) Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN que muestra la presencia de las señales aromáticas para los carbonos C-4', C-1', C-2'/C-6' y C-3'/C-5', además de la señal del grupo éster (Ar-CO <sub>2</sub> ) y los carbonos carbinólicos C-22 y C-23.....	70
<b>Figura 36.</b> Espectro parcial de 2D HSQC ed., con proyección de $^{13}\text{C}$ DEPT-135 donde se muestran las correlaciones heteronucleares a $^1\text{J}_{\text{HC}}$ para los hidrógenos H-2'/H-6', H-4', H-3'/H-5', H-22a, H-22b y H-23 con sus correspondientes señales de $^{13}\text{C}$ RMN para el análogo <b>39a</b> .....	71
<b>Figura 37.</b> Espectro parcial 2D HMBC para el compuesto <b>39a</b> y su estructura, que muestran las principales correlaciones heteronucleares a $^2\text{J}_{\text{HC}}$ (flechas segmentadas color azul) y $^3\text{J}_{\text{HC}}$ (flechas segmentadas color rojo). En esta última se destaca la conectividad de los hidrógenos H-23ab con carbono carbonílico del éster aromático (Ar-CO <sub>2</sub> ).....	72
<b>Figura 38.</b> Comparación entre los espectros de $^1\text{H}$ RMN entre la mezcla de epímeros <b>43a/43b</b> a) y el epímero puro <b>43a</b> b) Las principales diferencias se observan entre las señales de los hidrógenos carbinólicos H-22, H-23ab y CH <sub>3</sub> -21. ....	73
<b>Figura 39.</b> Efecto de los sustituyentes dadores de electrones en C-4' de los nuevos análogos de BRs sobre el incremento de actividad promotora de crecimiento vegetal en test ILA. ....	76
<b>Figura 40.</b> Efecto de los sustituyentes atrectores de electrones en C-4' de los nuevos análogos de BRs sobre el incremento de actividad promotora de crecimiento vegetal en test ILA. ....	76
<b>Figura 41.</b> Efecto de los análogos <b>39f</b> (10,8 [mm]) y <b>43a</b> (11,2 [mm]) en cuanto a la elongación del segundo entrenudo a concentración de 10 [nM]. ....	78
<b>Figura 42.</b> Interacciones intermoleculares entre el análogo <b>39f</b> y la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (PDB 4M7E). ....	81
<b>Figura 43.</b> Modo predictivo de unión en 3D entre el análogo <b>39f</b> y la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (PDB 4M7E).....	82

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Efecto de los análogos de BRs <b>39a-39f</b> , mezcla <b>43a/43b</b> y <b>43a</b> en la apertura del ángulo (°) en el ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA).....	58
<b>Tabla 2.</b> Efecto de los análogos de BRs <b>39a-39f</b> , mezcla <b>43a/43b</b> y <b>43a</b> en la elongación del segundo entrenudo en el ensayo del Segundo Entrenudo de Frijol (SEF).....	60
<b>Tabla 3.</b> Valores de energía mínima (afinidad de unión) entre los nuevos análogos de BRs, brasinólido ( <b>1</b> ) y el complejo receptor BRI1 junto con el complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1. ....	63
<b>Tabla 4.</b> Ángulo promedio (°) de inclinación ( $\pm$ desviación estándar) obtenido en bioensayo de ILA para los análogos <b>39a-39c</b> y el control positivo (brasinólido ( <b>1</b> )), producto de seis réplicas independientes a diferentes concentraciones.....	75
<b>Tabla 5.</b> Ángulo promedio (°) de inclinación ( $\pm$ desviación estándar) obtenido en bioensayo de ILA para los análogos <b>39d</b> , <b>39e</b> y <b>39f</b> y el control positivo (brasinólido ( <b>1</b> )) producto de seis réplicas independientes a diferentes concentraciones.....	75
<b>Tabla 6.</b> Ángulo promedio (°) de inclinación ( $\pm$ desviación estándar) obtenido en bioensayo de ILA para la mezcla epimérica <b>43ab</b> , epímero <b>43a</b> y el control positivo (brasinólido ( <b>1</b> )) producto de seis réplicas independientes a diferentes concentraciones. ....	75
<b>Tabla 7.</b> Actividades obtenidas en el bioensayo del Segundo Entrenudo de Frijol (SEF) por parte de los nuevos análogos de BRs sintetizados. ....	78
<b>Tabla 8.</b> Valores de energía mínima en orden creciente del complejo formado entre los nuevos análogos de BRs, brasinólido ( <b>1</b> ) y el complejo receptor BR1.....	80
<b>Tabla 9.</b> Valores de energía mínima en orden creciente del complejo formado entre los nuevos análogos de BRs, brasinólido ( <b>1</b> ) y el complejo receptor BR1-BAK1.....	80

## Lista de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Preparación BR4848: (a) Boc-D,L-valina, DCC, DMAP/benceno. (b) OsO <sub>4</sub> , NMMO/THF, acetona.....	26
<b>Esquema 2.</b> Secuencia de síntesis para la obtención de nuevos análogos de BRs. Condiciones: <b>a.</b> oxidación de Jones (CrO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O), 2h.; <b>b.</b> Pb(OAc) <sub>4</sub> /Cu(OAc) <sub>2</sub> /C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N/C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> , 200°C, refl.; <b>c.</b> HCl 2.5%, CH <sub>3</sub> OH; <b>d.</b> dihidroxilación de Upjohn (OsO <sub>4</sub> /NMMO/C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O), 24h.; <b>e.</b> 4-R-PhCOCl/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N/DMAP, 0-5°C, 6h., separación por C.C y posterior cristalización.....	35
<b>Esquema 3.</b> Obtención del diastereoisómero <b>43a</b> desde el producto final <b>39a</b> . Condiciones: <b>f.</b> 1) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> OH, 180 [°C], refl., 2) HCl 2,5% y posterior cristalización.....	37
<b>Esquema 4.</b> Secuencia de síntesis para la obtención de nuevos análogos de BRs. Condiciones: <b>a.</b> oxidación de Jones (CrO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O), 2h.; <b>b.</b> Pb(OAc) <sub>4</sub> /Cu(OAc) <sub>2</sub> /C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N/C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> , 200°C, refl.; <b>c.</b> HCl 2.5%, CH <sub>3</sub> OH; <b>d.</b> dihidroxilación de Upjohn (OsO <sub>4</sub> /NMMO/C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O), 24h.; <b>e.</b> 4-R-PhCOCl/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N/DMAP, 0-5°C, 6h., separación por C.C y posterior cristalización.....	64
<b>Esquema 5.</b> Reacción de saponificación del análogo <b>39a</b> para la obtención del glicol <b>43a</b> . .....	72

# 1 Introducción

---

Cinco tipos o familias de fitohormonas reguladoras fueron consideradas como las únicas responsables de procesos de crecimiento y desarrollo vegetativo hasta la década del 70: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico [1]. Inicialmente los brasinoesteroides (BRs) fueron subestimados con respecto a los otros reguladores vegetales hasta que se evidenció su importancia en el proceso de crecimiento con el descubrimiento de mutantes aislados de *Arabidopsis* deficientes de BRs que presentaron enanismo y otras alteraciones fisiológicas [2].

Actualmente los BRs corresponden a una de las ocho familias conocidas de fitohormonas vegetales que exhiben un amplio espectro de efectos biorreguladores (mitosis celular, biosíntesis de etileno, producción de frutos, fotomorfogénesis, etc.) y antiestrés (alta salinidad, sequía, gradientes de temperatura, hongos, plagas, etc.) [3], con amplias perspectivas de aplicación en procesos relacionados con el área de la agricultura y biotecnología [4]. Estas hormonas vegetales son del tipo esteroidal e incluyen más de 80 compuestos naturales relacionados estructural y funcionalmente. Cabe destacar que ejercen su acción fisiológica a concentraciones muy bajas en comparación con otros metabolitos y/o reguladores de crecimiento.

Atendiendo a que los BRs son potentes reguladores del crecimiento vegetal pueden ser considerados buenos candidatos para mejorar el rendimiento de los cultivos, superar estrés ambiental, daños por herbicidas, agroquímicos, metales pesados, controlar enfermedades patogénicas, incrementar la producción de frutos y la calidad de la cosecha, a partir de dosis muy reducidas, características que los hacen compatibles con las tendencias actuales dirigidas a prácticas sustentables y ecológicas de intensificación de la producción. Por ende, la obtención de cantidades considerables de estos compuestos a través de síntesis orgánica resulta una alternativa viable para su estudio biológico y potente aplicación dentro del sector agricultor.

## 2 Marco Teórico

---

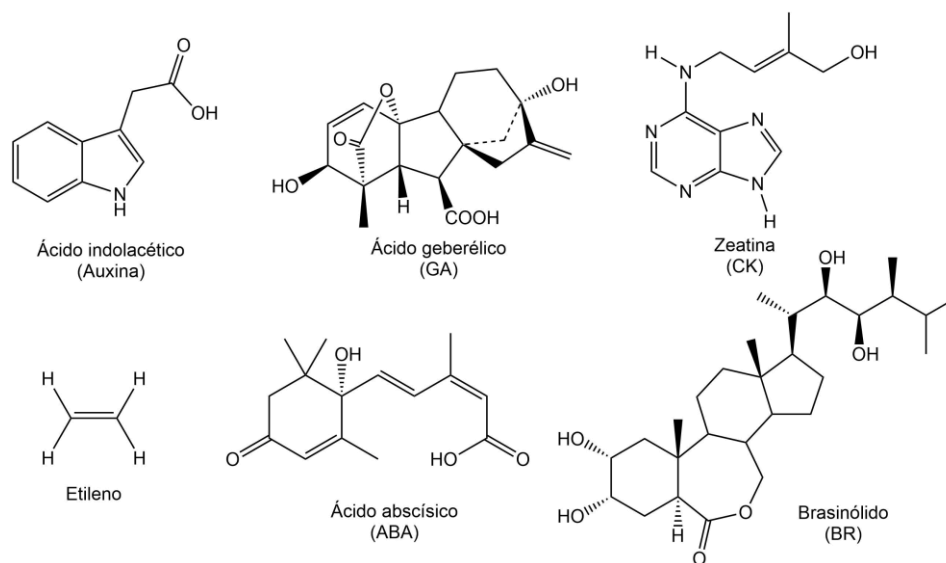
### 2.1 Fitohormonas

#### 2.1.1 Definición y principal función

Las hormonas vegetales son producidas a nivel celular en ciertas partes de la planta (zonas con diferentes concentraciones) para posteriormente ejercer su acción fisiológica a nivel local y a bajas concentraciones en comparación con nutrientes y vitaminas, a concentraciones alrededor de  $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M [5]. Los análogos de origen sintético que producen efectos fisiológicos similares a las fitohormonas naturales se denominan “reguladores de crecimiento vegetal”.

Estos metabolitos son los principales reguladores en las etapas de crecimiento y desarrollo de la planta a través de diversos procesos a lo largo del ciclo de vida como la diferenciación celular, metabolismo, morfogénesis y senescencia. También son responsables de mediar las respuestas frente a estímulos o factores abióticos. Su rol compromete a una amplia variedad de procesos fisiológicos. Gracias a los bioensayos realizados con aplicación exógena de BRs se ha adquirido un amplio conocimiento al respecto de los efectos de esta familia de hormonas vegetales en específico [5].

Las fitohormonas se pueden clasificar en base a su estructura y función fisiológica, incluyendo entre los principales tipos a las auxinas (AU), citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), etileno, jasmonatos (JA), giberelinas (GA), ácido salicílico (SA) y brasinoesteroides (BRs) (Figura 1).



*Figura 1. Estructura de algunas fitohormonas principales.*

Se ha comprobado el efecto que ejercen las auxinas en diversos procesos fisiológicos de las plantas tales como floración, dominancia apical, elongación de celdas y crecimiento de meristemas. Las giberelinas participan en el proceso de germinación de semillas e inducen la formación de flores y frutos. Por su parte, las citoquininas retardan la caída de la hoja y envejecimiento además de inducir la diferenciación celular y formación de nuevos tejidos. Respecto al ácido abscísico, este metabolito es el responsable del cierre de estomas cuando existe un déficit hídrico, y de modo general, inhibe el proceso de crecimiento vegetal frente a estímulos de estrés de tipo biótico (hongos, plagas, bacterias, etc.). Por último, el etileno por su parte acelera el proceso de maduración de frutos, degradación de la clorofila y posterior caída de las hojas [6].

## 2.2 Brasinoesteroides

### 2.2.1 Definición

Los brasinoesteroides (de ahora en adelante BRs) son hormonas endógenas promotoras del crecimiento vegetal, biosintetizadas a partir de esteroides. Estructuralmente, son similares a los derivados de colesterol (ecdisteroides y progesteronas) por lo que se les clasifica como hormonas del tipo polihidroxiladas. Desde el descubrimiento del brasinólido (BL) (1), 81 BRs de origen natural han sido caracterizados, incluyendo 5 conjugados y más de 137 análogos sintéticos [7,8].

La familia de los BRs se constituye por polihidroxi-esteroides que componen a los tejidos vegetales. Los BRs fueron formalmente reconocidos como la sexta clase de hormonas vegetales en el 16<sup>a</sup> encuentro de la Asociación Internacional de Sustancias del Crecimiento Vegetal en 1988 [8,9].

### 2.2.2 Origen

En el año 1968 comenzaron las primeras investigaciones de BRs en Japón [10] y dos años más tarde en USA [11]. Durante la década de los 60 algunos investigadores tenían la hipótesis de que el crecimiento de los granos de polen y la germinación acelerada estaban asociados con la presencia de promotores de crecimiento vegetal a nivel hormonal, los cuales actualmente se les atribuyen a los denominados BRs.

En 1968, Marumo y colaboradores descubrieron a partir de un extracto metanólico de la especie conocida en Japón como “isunoki” (*Distylium racemosum*) tres fracciones identificadas como A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y B, las cuales al ser probadas en el ensayo biológico de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) presentaron una inusual pero sugerente actividad promotora del crecimiento vegetal, superando a la actividad del ácido indolacético (IAA). Además, antes de evaluar su actividad biológica fueron llevadas a cabo purificaciones a través de cromatografía líquida, determinando los valores de RF (factor de retención) de cada fracción destacando a que tales valores diferían del resto de fitohormonas conocidas hasta ese entonces.

Dos años después en USA, Mitchell y colaboradores reportaron un extracto derivado del polen de colza (*Brassica napus L.*), el cual fue aislado y caracterizado como un compuesto lipofílico con actividad hormonal. El extracto fue estudiado dentro del bioensayo de Segundo Entrenado de Frijol (SEF) determinando un atenuado efecto de elongación del segundo entrenado [11]. El extracto de polen fue entonces denominado “brassinos”, derivado del nombre de la especie del cual fue identificado. Los investigadores atribuyeron el estatus de hormona vegetal a los “brassinos” ya que eran compuestos orgánicos aislados de forma natural de las plantas y que habían inducido crecimiento cuando eran aplicados en cantidades ínfimas en otras plantas.

La naturaleza química de los “brassinos” no fue descubierta sino hasta después del esfuerzo coordinado en diferentes laboratorios de USA con la finalidad de iniciar un programa especial para el procesamiento de 227 [kg] de polen de colza coleccionado de abejas, obteniendo un buen financiamiento dado a su alto potencial agronómico a futuro. En 1979, Groove y sus colaboradores aislaron el polen de colza (*Brassica napus L.*) un nuevo esteroide promotor de crecimiento en las

plantas, obteniéndose 4 [mg] del compuesto con actividad llamado Brasinólido (1) [(22R,23R,24S-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahidroxi-24-metil-homo-7-oxa-5 $\alpha$ -coleston-6-ona] (Figura 2) a partir de 40 [kg] de polen de colza [12]. La estructura del brasinólido (1) fue caracterizada por técnicas espectroscópicas y cristalografía de rayos X, el compuesto mostró tener similitudes con la hormona responsable de la muda en artrópodos correspondiente a las ecdisonas. Actualmente se conoce como el primer brasinoesteroide natural aislado, acontecimiento de suma importancia desde el descubrimiento del ácido giberélico.

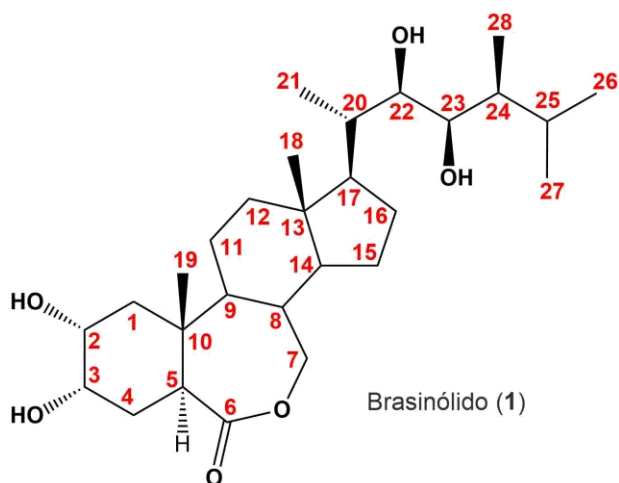


Figura 2. Numeración del esqueleto del Brasinólido (1).

Grove y colaboradores probaron la actividad del BL por el bioensayo del segundo entrenudo de frijol (SEF) y fue encontrado que a bajas concentraciones hubo un incremento aproximadamente de 200% en la longitud del entrenudo, comprobando su actividad promotora al incremento de la elongación de celdas y división celular [12].

En 1980 fue reportada la primera síntesis de brasinólido (1), eliminando así la necesidad de una obtención masiva de extractos a partir de plantas [13].

El término de brasinoesteroides fue asignado en 1988 por Mandava clasificando como esteroides que promovían el crecimiento vegetal en el bioensayo SEF [14].

Las actividades fisiológicas inicialmente estudiadas de los BRs no eran distinguibles de las de otras hormonas vegetales como para clasificarlos como hormonas vegetales. No fue sino hasta 1996 cuando Clouse y colaboradores encontraron pruebas contundentes de que los BRs estaban involucrados y eran indispensables para el crecimiento y desarrollo de las plantas, con el descubrimiento de mutantes insensibles y deficientes de BRs [2]. Las mutantes presentaban

enanismo y otras alteraciones fisiológicas que en algunos casos pudieron ser revertidas con la adición de los brasinoesteroides. Con estas evidencias tanto genéticas como bioquímicas se confirmó a los BRs como una nueva clase de hormonas vegetales.

### 2.2.3 Estructura química

Los BRs son derivados hidroxilados del esqueleto  $5\alpha$ -colestano y sus variaciones estructurales comprenden un patrón de sustitución en los anillos A, B y su cadena lateral (en el átomo de carbono C-17), variando tanto el tipo como la posición de las funcionalidades (Figura 3). Pueden ser clasificados mediante la cantidad de átomos de carbonos que poseen ( $C_{27}$ ,  $C_{28}$  y  $C_{29}$ ), dependiendo del patrón de sustitución por parte del grupo alquilo [7].

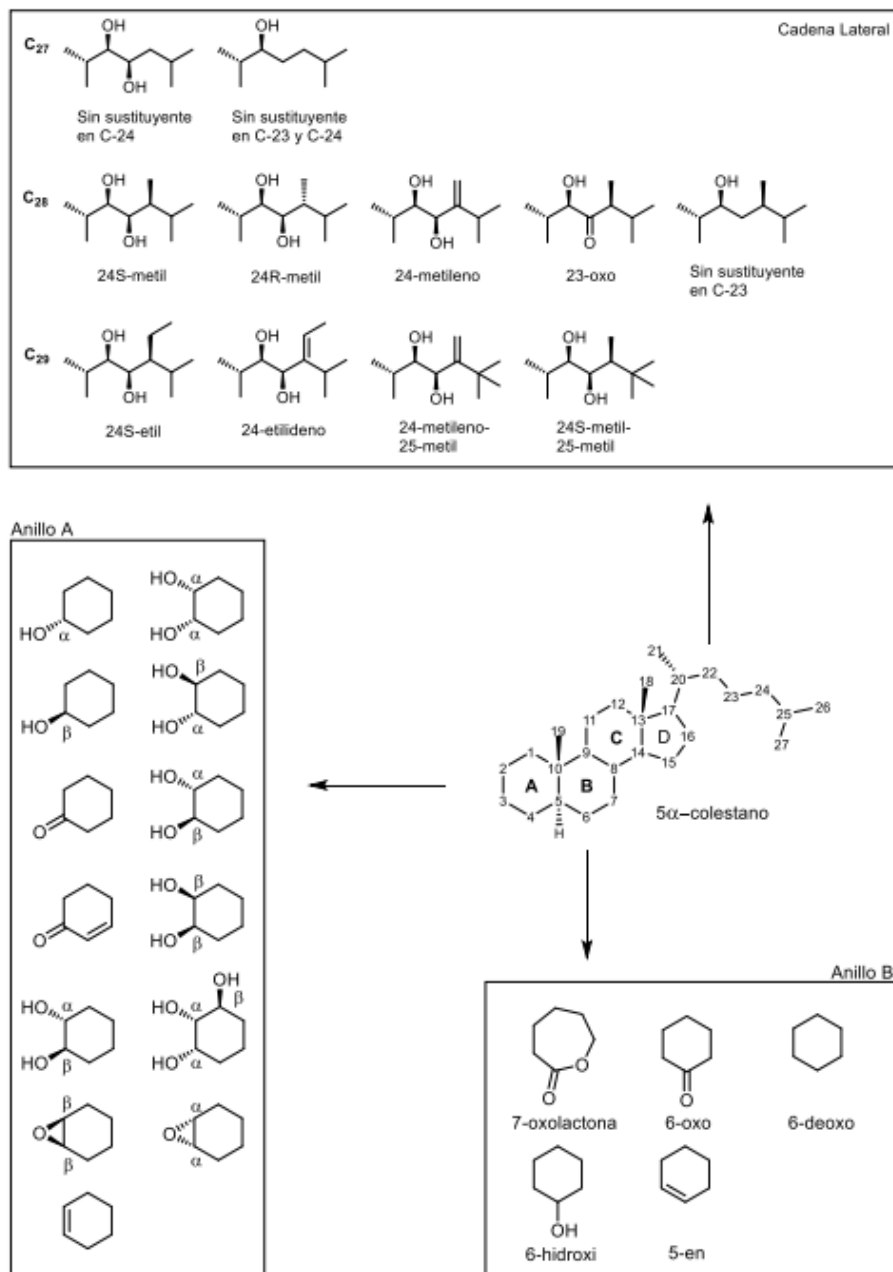


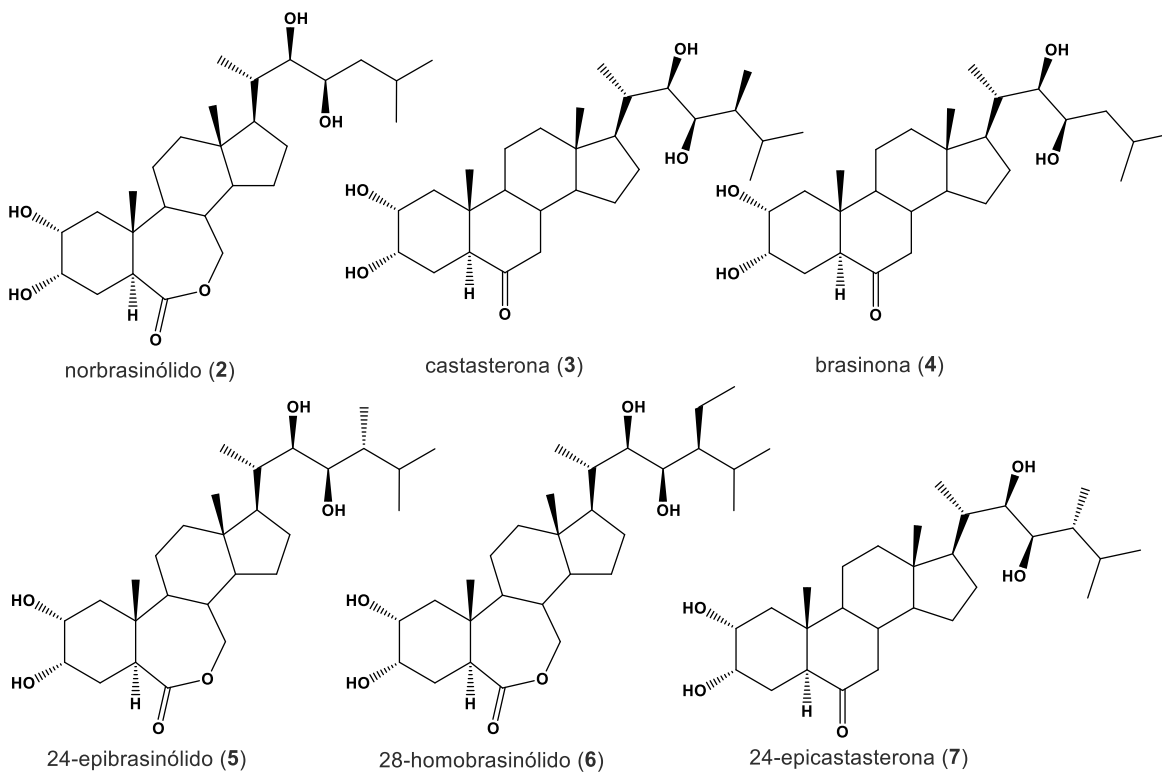
Figura 3. Sustituyentes diferentes en los anillos A, B y cadena lateral de BRs de origen natural.

#### 2.2.4 Ubicación de BRs en plantas

Los BRs han sido encontrados en un amplio rango de especies de plantas, incluyendo a plantas superiores e inferiores, también han sido detectadas en varias partes de plantas tales como polen, semillas, hojas, tallos, raíces, flores, frutos y bilis de insectos. Entre los BRs de origen natural más comunes (Figura 4), brasinólido (1) y castasterona (4) son los más importantes por su amplia distribución, así como su potente actividad biológica [7]. Análisis de tejidos procedentes de

diferentes especies de plantas revelaron que no todas contienen a todos los BRs, en donde la castasterona (**4**) es la más distribuida entre especies, mientras que el brasinólido (**1**) resulta ser el más activo biológicamente, no obstante, se encuentra con una concentración mucho menor [3].

Se ha demostrado que tejidos jóvenes en crecimiento contienen más altos niveles de BRs que tejidos maduros. El polen y semillas inmaduras suelen ser las fuentes más ricas en BRs incluyendo rangos de 1-100 [mg/g] en peso fresco, mientras que en los brotes y hojas usualmente suelen ser más bajas las cantidades rondando entre 0,01-0,1 [ng/g] en peso fresco [15]. La concentración de BRs en tejidos vegetales es muy baja comparada con aquellas de otras hormonas vegetales, esto a raíz de su producción endógena a niveles muy bajos [7]. Así, aunque son encontrados en un incrementado número de especies de plantas, su más alta concentración en la naturaleza es de 0,1 [ppm] dentro del polen de *Brassica napus* [16]. Debido a la baja concentración encontrada en plantas y a la dificultad de aislar el brasinólido (**1**) de matrices vegetales, la síntesis química aparece como la única fuente de obtención a una mayor escala de estas fitohormonas.



**Figura 4.** Brasinoesteroides de origen natural más comunes (2-7).

## 2.3 Efectos fisiológicos de los BRs

### 2.3.1 Rol en las plantas

Las plantas poseen la inherente habilidad para sentir y responder a la estimulación de su entorno, lo cual es crucial para su supervivencia ya que dependen de la adaptación de las señales del medio para un óptimo crecimiento y desarrollo. Dicha adaptación provoca muchos mecanismos, incluida la alteración de los niveles de hormonas endógenas. Por su parte, los BRs ejercen su rol a concentraciones extremadamente bajas, siendo un rango mucho más pequeño al ser comparado con el de otros reguladores de crecimiento vegetal.

La flexión de la hoja causada por extractos de *Dystilium racemosum* en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz [10] fue uno de los primeros informes del efecto fisiológico de los BRs en plantas. En este ensayo, los BRs causaron hinchazón dependiente de la dosis en las plántulas etioladas de arroz. El ángulo de la curvatura de la hoja causado por la inflamación se utiliza como un bioensayo sensible durante el aislamiento de BRs y los procedimientos de cuantificación [17].

Un informe preliminar en la actividad promotora de crecimiento por parte de BRs en donde se aisló el brasinólido (**1**), se basó en la estimulación mediada de la elongación del segundo y tercer internodo de frijol, con las más altas concentraciones causando la división del tallo [11,12]. Experimentos iniciales usando brassinos/BRs en plantas de frijol joven, *Phaseolus vulgaris L.*, resultaron en dos tipos diferentes de respuestas de crecimiento, una respuesta temprana fue el crecimiento internodal incrementado en el tratamiento, seguido por un realce general del crecimiento vegetal [18].

El brasinólido (**1**) y sus análogos sintéticos se utilizaron posteriormente en diversos bioensayos, indicando que los BRs controlan importantes funciones de desarrollo, además del aumento en la expansión celular, crecimiento del tubo polínico y producción de frutos, también muestran respuestas de estrés incluidas la termotolerancia y la senescencia, así como la diferenciación vascular y la reorientación de los microtúbulos [17].

Así, los BRs muestran una marcada actividad fisiológica en las plantas con su aplicación, induciendo un amplio rango de respuestas, entre las que se destaca el incremento en la expansión celular de las hojas, aumento de la elongación del tallo, crecimiento del tubo polínico, germinación de las semillas, desenrollamiento de las hojas, reorientación de las microfibrillas de celulosa, induce la formación de tejido conductor, influyen en la fotomorfogénesis, en la división celular, fertilidad

participan en la inducción de la biosíntesis de etileno y en la polarización de la membrana, además son sustancias que influyen positivamente contra el estrés biótico y abiótico, incrementando la tolerancia al estrés de temperatura, salino e hídrico, actúan como agentes protectores contra pesticidas e incrementan la producción de las cosechas de muchas especies [19-21].

Se hace evidente que la estimulación del crecimiento longitudinal de los tejidos jóvenes vía elongación y división celular son el mayor efecto biológico de los BRs [2]. En general, los cambios que se inducen en el crecimiento y desarrollo de la planta por aplicación de BRs son el resultado de una cascada de eventos químicos [7].

Observaciones claves en la interacción de BRs con otras hormonas del metabolismo vegetal incluyen el efecto sinérgico resultado del trabajo cooperativo con auxinas en cuanto a la estimulación de la proliferación celular y acumulación endógena de nutrientes en algas. Sin embargo, los BRs inhiben la elongación de la raíz que puede ser la consecuencia de la síntesis de etileno inducida por BRs [17].

Las propiedades fisiológicas anteriormente mencionadas, permiten considerar a los BRs como sustancias naturales y altamente promisorias, apropiadas para su uso hacia la protección de plantas y aumento en la producción agrícola, siendo un tipo de hormonas no tóxicas y ambientalmente adaptables [22].

## 2.4 Mecanismo de acción

### 2.4.1 Percepción de BRs por la célula

La naturaleza sésil de las plantas requiere mecanismos regulatorios distintivos para satisfacer las demandas de desarrollo y los desafíos ambientales. Las plantas poseen estrategias complejas para lograr su supervivencia en un medio ambiente dinámico. De esta forma, sobreviven a la adversidad mediante la integración de respuestas de crecimiento a las diversas señales de su entorno.

A excepción de la luz, los mecanismos de percepción de la planta ante los cambios del medio no se han esclarecido por completo, la naturaleza de estos mecanismos sigue siendo desconocida. Por ende, son un objeto de estudio permanente las vías de señalización que involucran una o varias hormonas [23]. Por lo tanto, aunque se conocen los procesos bioquímicos y fisiológicos controlados por hormonas, no se han aclarado los efectos hormonales que desencadenan estos procesos.

Para conseguir que un compuesto produzca un efecto fisiológico, es necesario que este sea percibido por la célula blanco. Las plantas perciben a los esteroides a través de un receptor localizado en la membrana que rodea a la célula. La primera evidencia de la existencia de un receptor para los BRs surgió de la identificación de mutantes insensibles de *Arabidopsis thaliana* que con la adición exógena de BRs, no mostraban cambios en su fenotipo. Se encontró que estos mutantes tenían defectos en su receptor [2].

#### 2.4.2 Mutantes de BRs

Las actividades biológicas que fueron estudiadas inicialmente en BRs en orden a clasificarlos como hormonas vegetales eran insuficientemente distinguibles de las otras fitohormonas conocidas hasta la fecha. Sin embargo, el descubrimiento de mutantes defectuosos ya sea en la biosíntesis o percepción de BRs permitió la confirmación de estos compuestos como fitohormonas. Varios mutantes deficientes en BRs fueron aislados y se encontró que poseían defectos en la biosíntesis de BRs o esteroides, demostrando que la síntesis de brasinólido (**1**) y sus precursores incurre en un prerequisite para las etapas de crecimiento y desarrollo de la planta [24].

Una de las típicas alteraciones fenotípicas de los mutantes deficientes debido a la pérdida de varias actividades biosintéticas es el enanismo. Los mutantes insensibles a BRs a menudo exhiben rasgos fenotípicos similares a los de mutantes afectados en la biosíntesis de BRs, tal como enanismo extremo, morfología alterada de las hojas, alteración en el desarrollo vascular, entre otros. Sin embargo, a diferencia de los mutantes deficientes en BRs, los fenotipos de los mutantes insensibles no pueden ser rescatados al tipo silvestre por la aplicación exógena de BRs, sugiriendo que los genes mutados juegan un rol en la señalización de estas fitohormonas. Las diferencias fenotípicas de mutantes de BRs han sido validadas por la identificación de brasinazol (Brz), el primer inhibidor de la biosíntesis de BRs descubierto por los científicos Asami y Yoshida, llevando a la aceptación del rol esencial de BRs en el crecimiento y desarrollo vegetal [25]. El Brz es un derivado de triazol que inhibe el crecimiento vegetal y que puede generar enanismo fenotípicamente similar al mutante relacionado a brasinólido (**1**), cuyo efecto puede ser revertido por la aplicación de una mezcla de brasinólido (**1**) y Brz.

Muchos avances en la investigación de BRs y sus mutantes han sido llevados a cabo en *Arabidopsis*. Los mutantes de *Arabidopsis* insensibles a BRs fueron identificados basados en la habilidad de elongación de las raíces en medio con brasinólido (**1**) presente. El mutante enano insensible 1 (bri1-1) fue caracterizado por Clouse y colaboradores, el cual tenía la capacidad de

alargar las raíces de plantas mutantes de *Arabidopsis* en presencia de concentraciones inhibitorias de BRs a diferencia de los mutantes biosintéticos [2]. La caracterización de este mutante permitió el clonaje del gen *bri1* y posteriormente se corroboró que la proteína BRI1 es el receptor de los BRs en plantas [26], el cual presenta dominio citoplasmático con actividad quinasa, indispensable para transmitir la señal hacia el medio intracelular [27].

BRI1 (*Brassinosteroid insensitive-1*) fue aislado e interesantemente no fue un receptor esteroide nuclear como había sido especulado previamente sino un receptor quinasa de repetición rica en leucina. La proteína posee un péptido señal, un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que posee actividad quinasa. Aunque existen homólogos BRI1 con alta secuencia similar en el genoma de *Arabidopsis*, BRI1 parece ser el mayor receptor de BRs [17].

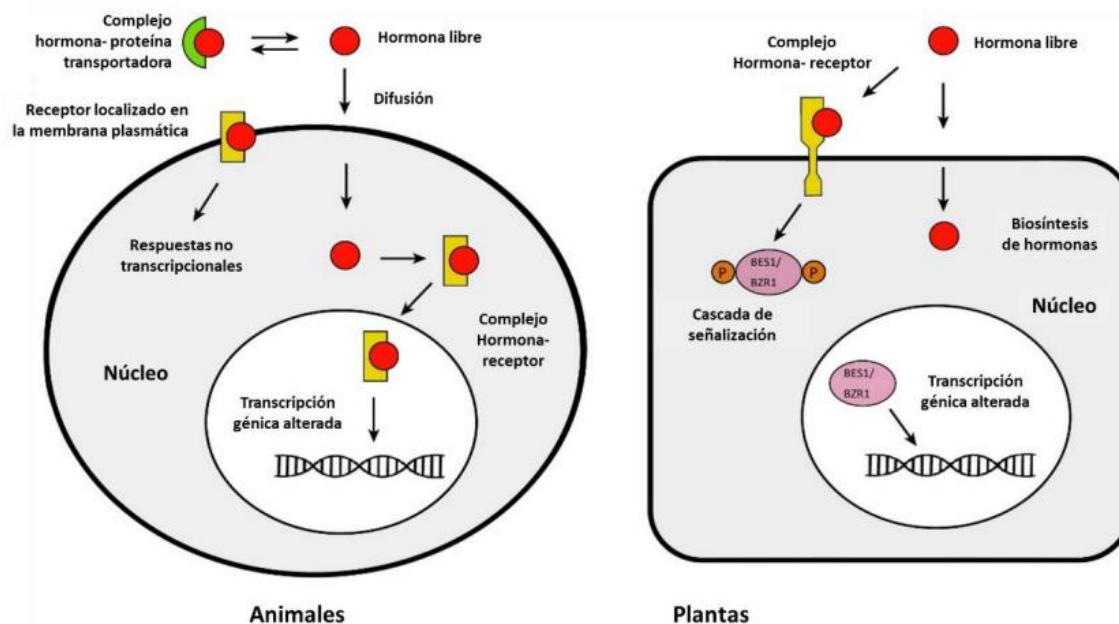
#### 2.4.3 Vía de señalización de BRs en la célula vegetal

La regulación de la expresión génica de los BRs es un aspecto fundamental en su mecanismo de acción. Las primeras investigaciones sobre los genes que regulan los BRs se realizaron en la década del 90 [28]. La cascada de señalización de BRs es quizás una de las vías de señalización mejor caracterizada en plantas como resultado del interés atraído por la investigación de BRs durante las dos últimas décadas [29].

La cadena de señalización por BRs y las respuestas genómicas resultantes se inician por la unión directa de una molécula de BR al dominio extracelular del receptor quinasa de repetición rica en leucina localizado en la membrana plasmática BRASSINOSTEROID INSENSITIVE (BRI1), sus homólogos cercanos BRI1-LIKE1 (BRL1) y BRL3 junto con el correceptor BRI1-ASSOCIATED KINASE1 (BAK1), contenidos en la membrana plasmática, y posterior a la percepción se inicia una cascada de señales [29,30]. Cuando el receptor BRI1 percibe a la molécula de BR los eventos de transfosforilación se producen entre los dominios quinasa de BRI1 y BAK1. Etapas adicionales de fosforilación/desfosforilación conducen a la inactivación del inhibidor clave de la cascada de señalización, específicamente, BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 (BIN2), un regulador citoplasmático negativo. Una vez inactivado BIN2, los factores de transcripción BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1) y BR-INSENSITIVE EMS SUPPRESSOR1 (BES1) son desfosforilados y se acumulan en el núcleo para desencadenar o reprimir a miles de genes específicos como resultado final de la respuesta de BR. En ausencia del BR, BIN2 fosforila el complejo BES/BZR1, resultando en su degradación y prevención de su acumulación en el núcleo [29].

Las hormonas esteroides animales actúan de manera endocrina y una vez que son sintetizadas en las glándulas, se transportan en la circulación en gran parte unida a proteínas portadoras de plasma. Cuando alcanzan la célula diana, los esteroides se disocian de las proteínas transportadoras y se difunden libremente hacia el citoplasma, donde se unen los receptores intracelulares. Juntos, se trasladan al núcleo y alteran la expresión genética. Alternativamente, las hormonas esteroides pueden unirse a los receptores localizados en la membrana plasmática y activar respuestas no transcripcionales a través de diferentes cascadas de señalización.

En las plantas, debido a que la cascada de señalización de BR comienza en la matriz extracelular, en la superficie celular, los BRs deben abandonar el interior de la célula donde son sintetizadas y alcanzan el apoplasto para el inicio de la señalización (Figura 5). Lo más probable es que los BRs no se sometan a transporte a larga distancia y no han sido encontrados homólogos de las proteínas portadoras de esteroides apoplásticos animales en las plantas. Sin embargo, debido a que actúan en el espacio extracelular, los BRs que se sintetizaron en una célula, posiblemente podrían recorrer distancias cortas para activar la señalización en la célula vecina [29].



**Figura 5.** Modos de acción de hormonas esteroides en animales y vegetales. Las hormonas esteroides animales se desplazan de sus sitios de síntesis en un complejo con proteínas transportadoras, lo que permite el transporte de estos compuestos hidrófobos a través del sistema circulatorio. Una vez que alcanzan la célula diana, las hormonas esteroides se disocian de los portadores y se difunden a través de la membrana plasmática al citoplasma, donde se unen a los receptores solubles. Los complejos hormona-receptor se mueven al núcleo y alteran la expresión de genes. Alternativamente, las hormonas esteroideas pueden unirse a los receptores localizados en la membrana plasmática y mediar respuestas no transcripcionales. En plantas, las hormonas esteroides libres (BRs) alcanzan el apoplasto donde se unen a la parte extracelular del receptor localizado en la membrana plasmática (BRI1). Este evento activa una cadena de reacciones de fosforilación/desfosforilación, que finalmente conduce al movimiento de los factores de transcripción desfosforilados (BES1/BZR1) al núcleo y modificaciones en la expresión génica [29].

La estructura del dominio de unión ligando-BRI1 ha sido recientemente determinada por difracción de rayos X en *Arabidopsis thaliana*, la cual reveló el mecanismo molecular fundamental de reconocimiento de BRs. Tanto la cadena lateral alquílica de la hormona y los anillos C y D encajan en una cavidad formada por residuos hidrofóbicos, pocas interacciones polares con el resto C-22 y C-23 del brasinólido (**1**) son establecidas con el residuo tirosina en el dominio de unión y son mediados por moléculas de agua. Interesantemente, los restos 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -diol, los cuales son conocidos por su importante rol en la actividad biológica, están expuestos al solvente. Por otro lado, el anillo A y B poseen un contacto hidrofóbico con una superficie cóncava del receptor [31-33].

## 2.5 Usos agrícolas prácticos de los BRs

Debido a su importancia para el desarrollo de las plantas y su posible uso como herramienta en la mejora del rendimiento de cultivos incluso bajo condiciones inadecuadas, se considera a los BRs como compuestos promisorios en cuanto a su aplicación en la agricultura. Su conveniente uso

potencial agronómico esta dado por su fuerte influencia en el crecimiento vegetal al exhibir varios tipos de actividades hormonales reguladoras, su papel en la superación del estrés ambiental y de ser productos naturales no tóxicos, no genotóxicos, bioseguros y amigables con el medioambiente, por lo que pueden ser utilizados para mejorar y promover el crecimiento, rendimiento, calidad y tolerancia de varias plantas al estrés biótico y abiótico [32,33]. Los BRs pueden ser fácilmente aplicados a plantas y semillas, se ha mostrado la aplicación práctica con óptimos resultados bajo condiciones de laboratorio y de campo, en diferentes tipos de cultivos como arroz, trigo, cebada, maíz, lechuga, soya, algodón, tabaco, papa, mostaza, betabel, melón, cacahuate, arándano, entre otros.

Aunque la actividad del brasinólido (1) ha mostrado ser la más alta, la mayoría de los resultados en ensayos de campo han sido obtenidos utilizando a los BRs de origen natural como 24-epibrasinólido (2) y el 28-homobrasinólido (3), no solo porque son de síntesis más simple y económico en comparación al brasinólido (1), sino que también presentan una estabilidad alta bajo condiciones de campo. En Rusia y Bielorrusia, el 24-epibrasinólido (2) es utilizado como ingrediente activo en promotores de crecimiento siendo oficialmente registrado desde 1992 y recomendados para el tratamiento de plantas agrícolas como tomate, papa, pepino, pimienta y cebada [34].

Las condiciones medioambientales y el método de aplicación en las plantas tienen efectos significativos sobre los resultados con BRs. Fue propuesto que el brasinólido (1) podría ser llamado “hormona del estrés”, ya que se observaba crecimiento de los cultivos aun en condiciones de total estrés [35]. Las plantas responden a muy pequeñas dosis de BRs (5-50 [mg/ha]), cantidades comparables a las que producen naturalmente [32], incrementando la productividad del cultivo, protegiendo a las plantas contra enfermedades e infecciones, reduciendo o sustituyendo el uso de pesticidas tradicionales que a menudo resultan ser nocivos y tóxicos tanto para el entorno como para la planta en sí. El imidacloprid es el insecticida de mayor venta en el mundo y se usa comúnmente contra el saltapuntas marrón. El estrés inducido por los pesticidas ha revelado que los BRs alivian los efectos citotóxicos por la aceleración del metabolismo de varios pesticidas, y en consecuencia reduce la acción residual. Por lo tanto, pueden prevenir los residuos de pesticidas en la agricultura, los cuales amenazan constantemente la seguridad de los alimentos a consumir [8].

## 2.6 Medición de la actividad biológica de los BRs

El desarrollo de bioensayos altamente sensibles y específicos ha jugado un rol importante dentro del estudio de BRs, tanto para ser aislados y purificados a partir de tejidos vegetales, dada la baja concentración fisiológica que poseen las hormonas [15]. La respuesta de los tejidos vegetales a la aplicación de BRs varía con la concentración del BR. En la mayoría de los casos, la baja concentración induce a elongación y curvatura como un resultado de división y elongación celular. La mayoría de los bioensayos son basados en este efecto [36].

Los bioensayos son parte del procedimiento para evaluar la relación estructura-actividad (SAR). Pueden ser divididos en dos prácticos, uno corresponde al bioensayo de Segundo Entrenado de Frijol (SEF) y el otro al bioensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA). El ensayo SEF mide la prolongación del segundo entrenado de la plántula mientras que el ILA determina el ángulo de inclinación de la lámina de la hoja respecto a la vaina de la planta.

### 2.6.1 Bioensayo de Segundo Entrenado de Frijol (SEF)

El ensayo del 2<sup>do</sup> entrenado de frijol se desarrolló originalmente para giberelinas y fue designado sensible también para BRs y sus análogos (fue utilizado para aislar el brasinólido (**1**)) [11].

Černý y colaboradores [37] consideran que el ensayo del segundo entrenado de frijol es más adecuado para probar la actividad del brasinólido (**1**) por su alta sensibilidad y especificidad. La actividad total de los BRs en este bioensayo se basa en una única respuesta biológica resultante, dependiente de la concentración: elongación, hinchazón, torsión y finalmente división del segundo entrenado [38]. A modo de ejemplo, la hinchazón y el aumento de la curvatura solo se observan después del tratamiento con al menos 0,01 [mg] de brasinólido (**1**) por planta [15].

Grove y colaboradores probaron la actividad del brasinólido (**1**) usando el bioensayo SEF concluyendo que a bajas concentraciones (10 [ng]) se produce un incremento del aproximadamente un 200% en la longitud del segundo entrenado en comparación a las plantas control, causando la respuesta única característica del bioensayo [12].

### 2.6.2 Bioensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA)

Originalmente desarrollado para la detección de actividad biológica potenciada por giberelinas (GA) y ácido indolacético (IAA). Se ha dilucidado que concentraciones más elevadas de GA y IAA poseen débiles efectos de inclinación de la lámina, mientras que concentraciones bajas de brasinólido (**1**) provocaron hinchazón en las células de la lámina unida a la vaina, concluyendo que

el bioensayo era más sensible y adecuado para la evaluación de BRs [39]. Desde entonces el ensayo ILA ha sido ampliamente utilizado para el aislamiento y purificación de BRs a partir de varias fuentes vegetales puesto a su simplicidad, alta sensibilidad y especificidad para BRs.

Dentro de este bioensayo se mide el ángulo entre la lámina y la vaina después del tratamiento de extirpaciones a partir de plántulas etioladas de arroz en soluciones de concentraciones variables, teniendo un valor estándar de ángulo entre la lámina de la hoja entre 160-170° (casi paralelo), y disminuye en respuesta a BRs activos, alcanzando valores de 60° o menos con dosis relativamente altas de brasinólido (**1**) o de la mayoría de los análogos potentes [40].

Mientras el ensayo ILA posee un límite de detección de 50 [ppm] para el IAA, 0.5 [ppb] para brasinólido (**1**) y 5 [ppb] para 25-homobrasinólido (**3**) [41].

La respuesta de la unión de la lámina a BRs pareció ser diferente a la de SEF. Por ende, el ensayo de ILA fue altamente sensible a los BRs tipo 6-ceto y 7-lactona., mientras que el bioensayo SEF solo fue susceptible a BRs tipo 7-lactona en tiempo limitado del bioensayo [42].

## 2.7 Relación estructura actividad de los BRs

La comprensión sobre la relación que sostiene la estructura de los BRs con su respectiva actividad biológica proporciona una idea por parte del mecanismo del receptor específico para BRs percibe la molécula ligando en el sitio de reconocimiento. Hasta la fecha, esta información ha sido proporcionada principalmente por los datos de actividad biológica a partir del ensayo ILA puesto a las ventajas que posee este último como alta sensibilidad y reproducibilidad sobre otros bioensayos [43].

Las leves diferencias que presentan los BRs de origen natural en su esqueleto inducen en considerables variaciones en la actividad de estimulación de crecimiento en la planta, llevando al establecimiento de requerimientos estructurales generalmente aceptados para una potente actividad estimulante de crecimiento vegetal.

### 2.7.1 Farmacóforo

La mayoría de los BRs presentan un esqueleto carbonado derivado de 5 $\alpha$ -colestano con las siguientes características estructurales [41]:

- I. Anillo A: presenta de uno a tres grupos oxigenados (principalmente hidroxilos), siempre oxigenado en C-3.
- II. Anillo B: presenta un grupo 6-oxo-7-oxalactona, 6-ceto o el anillo puede estar completamente saturado.
- III. Fusión de anillos A-D: tipo *trans*.
- IV. Cadena lateral: grupos 22,23-dihidroxi; grupos 24-metil o 24-etil (estos últimos llamados serie 28-homo); algunas ocasiones un grupo metilo en C-25 y un enlace insaturado entre C-24 y C-28.

Se puede representar la fórmula estructural general para BRs naturales en la Figura 6, presentando todas las variaciones que se encuentran en estos compuestos totalmente caracterizados hasta la fecha. Se puede evidenciar que el único fragmento estructural distintivo es la cadena lateral del (20*S*, 22*R*, 23*R*)-colestano-22,23-diol con un átomo de oxígeno en C-3. Los BRs naturales con este núcleo en común son compuestos lipofílicos, caracterizados por un esqueleto 5 $\alpha$ -colestano oxigenado al menos en C-3, C-22 y C-23 [44].

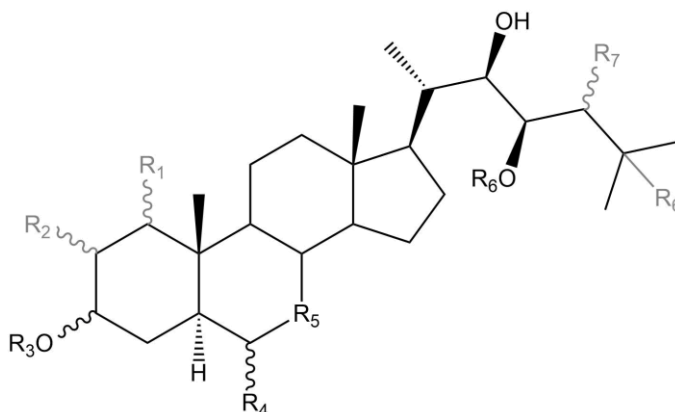


Figura 6. Núcleo común farmacóforo para BRs de origen natural [44].

### 2.7.2 Relación Estructura Actividad (SAR *Structure-Activity Relationship*)

La actividad biológica de los BRs es evaluada mediante distintos bioensayos cuyos resultados no son equivalentes entre sí. El ensayo de ILA es el más usado para comprobar el potencial hormonal de los BRs, no obstante, algunos grupos han realizado modificaciones en el protocolo básico de ILA, así como la utilización de diferentes cultivares de arroz [45,46]. Puesto que no se ha establecido un sistema para evaluar la bioactividad de los BRs, cada grupo de investigadores adopta una relación

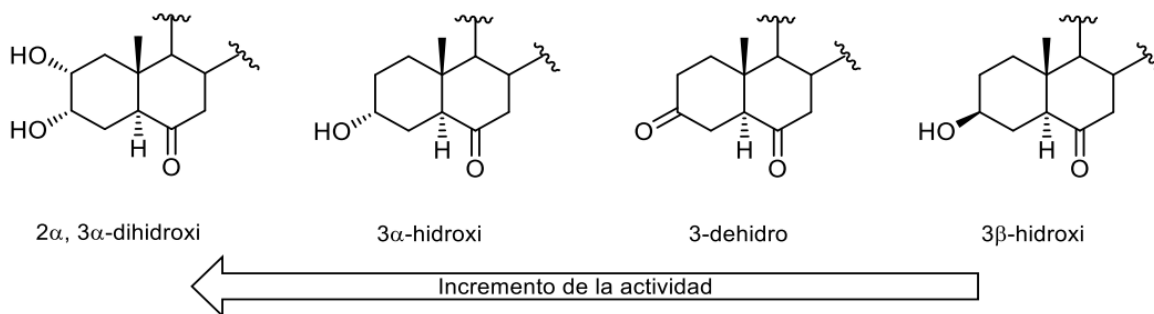
entre la estructura de la molécula y los resultados de actividad biológica según sus datos obtenidos a través de estándares específicos, cultivares y protocolos de bioensayos. No obstante, debería notarse que la actividad relativa de los BRs varía con el tipo de bioensayo utilizado [47].

Dado a que los BRs pueden producir varias respuestas en diferentes tipos de bioensayos, la comparación directa de los datos derivados debe realizarse con precaución. Similarmente, la actividad relativa de los compuestos no se mantiene constante en todo el intervalo de dosis dentro de un bioensayo. Por ende, los datos medidos en un intervalo de dosis más amplio proporcionan una mayor información que una dosis única o estandarizada [40].

A raíz de la carencia de homogeneización de los bioensayos, el análisis de datos cruzados resulta complejo por la combinación de sustituyentes (su naturaleza) y su bioactividad respectiva; se tiene como ejemplo en el anillo B una lactona al pasar a 6-cetona la actividad biológica decrece en un 50% en el par brasinólido (1) /castasterona (4) en el ensayo ILA [48], mientras que 24-epicastasterona (5) es 3 veces más activo que castasterona (4) en el ensayo SEF [49].

En base a los ensayos biológicos reportados, se ha aceptado la siguiente perspectiva cualitativa sobre la relación estructura-actividad:

- I. Anillo A:  $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi >  $3\alpha$ -hidroxi  $\approx$  3-dehidro >  $3\beta$ -hidroxi



*Figura 7. Variación de la actividad según el anillo A [41].*

Acorde a lo reportado por Bajguz y Tretyn con respecto al anillo A, los BRs poseen grupos hidroxilos vecinales en C-2 y C-3 [7]. Los dos grupos hidroxilos vecinales  $2\alpha,3\alpha$  en el anillo A representan una característica estructural general de los BRs más activos, como brasinólido (1) y castasterona (4). El orden creciente de la bioactividad es:  $2\alpha,3\alpha > 2\alpha,3\beta > 2\beta,3\alpha > 2\beta,3\beta$ .

II. Anillo B: 6-oxo-7-oxalactona > 6-ceto >> 7-oxo-6-oxalactona ≈ 6-deoxo

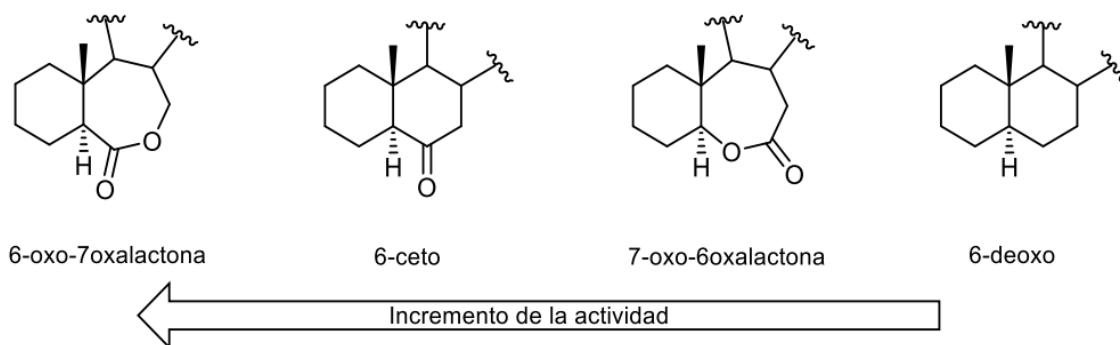


Figura 8. Variación de la actividad según anillo B [42].

Con respecto a la oxidación del anillo B, los BRs se dividen en los tipos 7-oxalactona, 6-oxo y 6-deoxo. Como un cuarto tipo, hay solo un BR de origen natural con un grupo hidroxilo en C-6. En general, los BRs de tipo 7-oxalactona tienen una mayor actividad biológica que los del tipo 6-oxo. Sin embargo, en algunos casos los BRs del tipo 6-oxo poseen una actividad biológica similar a los del tipo 7-oxalactona, pero los BRs no oxidados revelan no tener efecto relevante en la actividad del bioensayo SEF y muy débil en el ensayo ILA [7].

III. Fusión de anillos: A/B trans > A/B cis

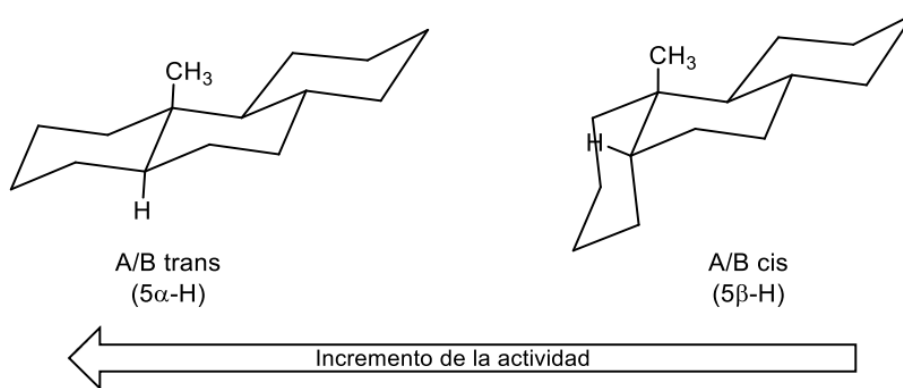


Figura 9. Diferentes conformaciones del núcleo esteroidal, fusiones de anillo A/B trans, cis y variación de actividad [42].

En la estructura casi rígida del núcleo esteroidal de BRs de la serie 5 $\alpha$ , el anillo A y B asumen conformación de silla. Este tipo de conformación también ha sido confirmada para el anillo B de 6-ceto BRs, mientras que en 6-oxo-7-oxalactonas el anillo B tiende a la posición en el mismo plano como los anillos C y D [12,50]. En los BRs de la serie 5 $\beta$ , el anillo A también asume conformación de silla, pero está situada casi perpendicular al plano formado por los anillos B, C y D (Figura 9).

Aunque los BRs con configuración  $5\beta$  no han sido aislados de fuentes naturales, algunos análogos han sido sintetizados [51].

IV. Cadena lateral: 22(*R*),23(*R*)-dihidroxi >> 22(*S*),23(*S*)-dihidroxi > monohidroxi; 24(*S*)-metil > 24(*R*)-metil  $\approx$  28-etil

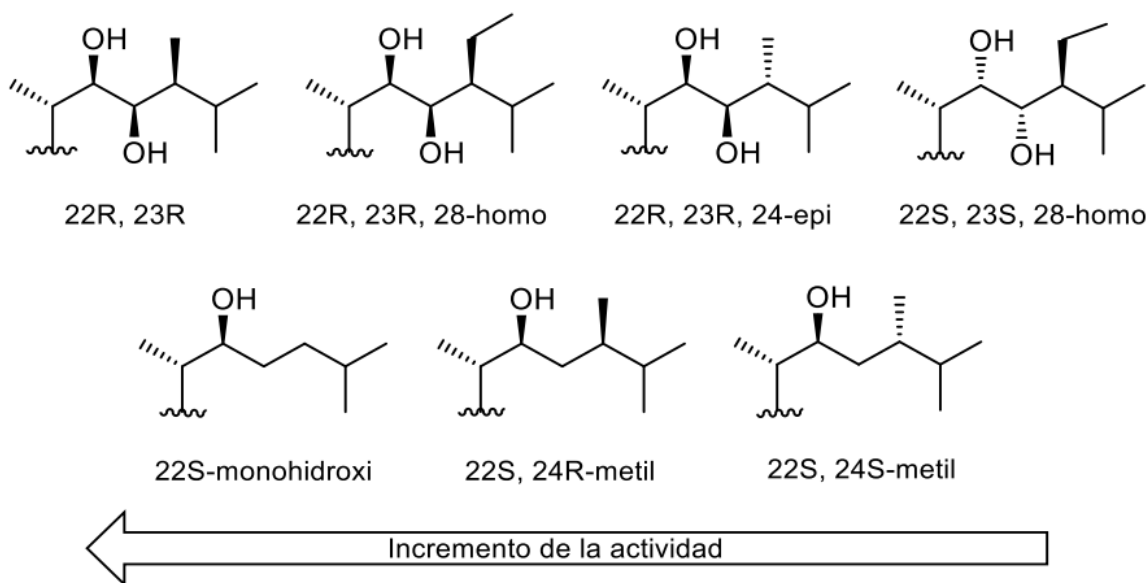


Figura 10. Variación de la actividad según la cadena lateral [42].

Con respecto a la cadena lateral, la relación estructura-actividad parece estar controlada por más factores complejos. A modo de ejemplo, la ausencia de la cadena lateral reduce casi al 100% la bioactividad, pero el acortamiento de la cadena por dos carbonos terminales no tiene efectos adversos [52].

De acuerdo con la cadena lateral colestano, los BRs se dividen en 11 tipos según los sustituyentes de C-23, C-24 y C-25 los cuales son: 23-oxo, 24(*S*)-metil, 24(*R*)-metil, 24-metileno, 24(*S*)-etil, 24-etilideno, 24-metileno-25-metil, 24-metil-25-metil, sin sustituyentes en C-23, sin sustituyentes en C-24 y sin sustituyentes en C-25.

Además, los BRs se pueden clasificar como compuestos C-27, C-28 y C-29 dependiendo del patrón de sustitución alquílica de la cadena lateral.

La presencia de un grupo alquil saturado (grupo metil o etil) en posición C-24 y un grupo metil en C-25 generan BRs más activos. La mayoría de los BRs naturales llevan un grupo alquil con

orientación S en C-24. No obstante, existen excepciones entre los BRs que tienen configuración R del grupo alquil, como el 24-epibrasinólido (**5**) o 24-epicastasterona (**7**) [7].

## 2.8 Síntesis de BRs

Debido a la baja concentración que poseen los BRs en las plantas, su aislación a partir de las fuentes naturales resulta un proceso complejo y poco práctico. Es en este punto donde la síntesis química resulta ser una alternativa más viable y práctica, con la cual se han producido BRs no existentes en la naturaleza, con potenciales similares o mayores que sus análogos de origen natural.

El potencial uso del brasinólido (**1**) como un nuevo esteroide regulador de crecimiento en la agricultura inspiró la síntesis química debido a las importantes propiedades biológicas de este, induciendo a varios grupos de investigadores a la síntesis de BRs y análogos nuevos para la adquisición de información valiosa sobre la relación estructura-actividad y así promover la búsqueda de análogos sintéticos más activos.

Después de más de 30 años de investigación, se han hecho evidentes dos principales tareas en la síntesis de BRs [53]:

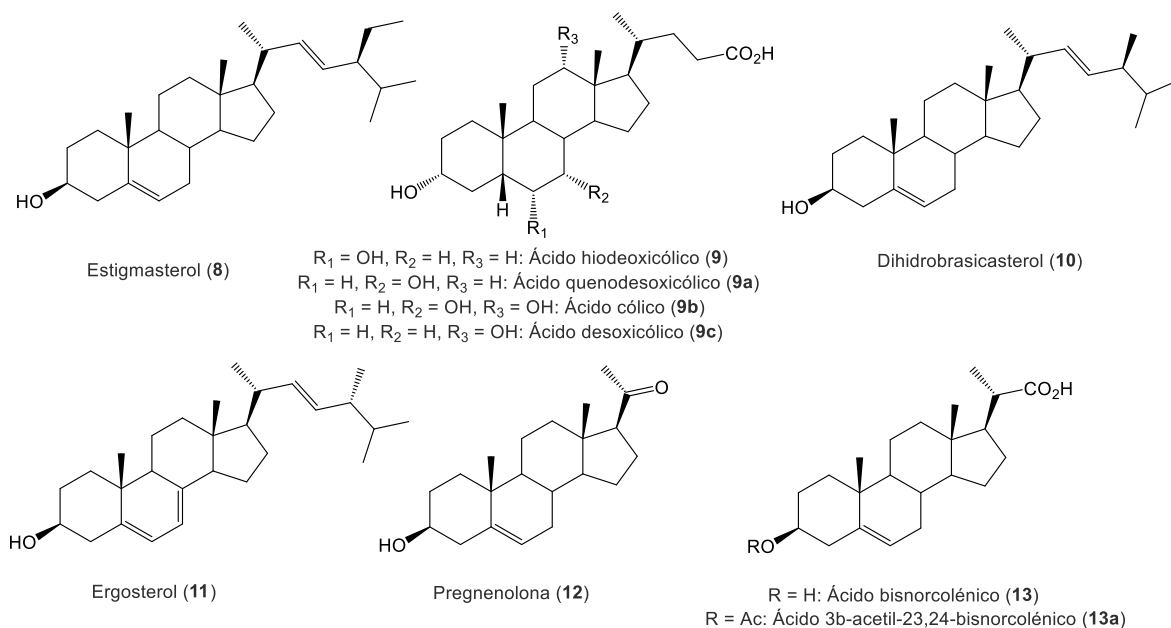
- 1) Síntesis de BRs de origen natural y análogos altamente activos. Orientada a los estudios sobre la relación estructura-actividad y modos de acción. Los compuestos formulados para esta tarea evidencian el efecto que poseen las modificaciones estructurales sobre las funciones bioactivas conocidas.
- 2) Búsqueda de candidatos promisorios para la aplicación masiva en la agricultura. En este contexto, estas actividades requieren de una búsqueda mucho más amplia, que debería incluir compuestos simples y/o conocidos con modificaciones estructurales que simplifiquen el procedimiento de síntesis y cuya actividad estimulante de crecimiento vegetal no haya sido estudiada. Esto no induce a generar sistemas de ensayo error, sino una búsqueda abierta que combine la experiencia acumulada y audacia. Adicionalmente, el resultado sería una tarea de retroalimentación que puede tratar de explicar por qué algunos compuestos con importantes modificaciones estructurales muestran una significativa actividad estimulante de crecimiento vegetal.

### 2.8.1 Sustratos naturales utilizados como material de partida en la síntesis de BRs

Los ácidos biliares disponibles en la naturaleza como el hiodeoxicólico (**9**), quenodesoxicólico (**9a**), cólico (**9b**) y desoxicólico (**9c**) son derivados de ácidos cólicos (Figura 10) que muestran por ventaja elevada disponibilidad comercial y costo relativamente bajo, siendo su uso principal la producción de hormonas esteroideas tanto animales [54,55] como vegetales [37,56-58].

El ácido hiodeoxicólico (**9**) fue aislado por primera vez a partir de la bilis de cerdo que en primera instancia fue presentado como un ácido 3,6-dihidroxicolánico [59]. A pesar de ser un subproducto de la industria empacadora de productos cárnicos no recibió mucha atención dado a la complejidad de su extracción a partir del crudo de la bilis animal. Sin embargo, con el desarrollo del proceso de extracción adecuado se pudo aislar el ácido hiodeoxicólico (**9**), el cual posteriormente se catalogó como un material fácilmente accesible empleado para la preparación de esteroides fisiológicamente activos [54].

Específicamente, este ácido biliar (**9**) ha sido mayormente empleado como sustrato de partida natural ya que a parte de su abundancia presenta el esqueleto básico tipo cis 5 $\beta$ -colestano con las funciones orgánicas en posiciones adecuadas que permiten generar análogos con los requerimientos estructurales de los anillos A y B para una buena y promisorio actividad estimulante para el crecimiento y desarrollo vegetal. Se ha reportado la síntesis de brasinólido (**1**) [60] y de un gran número de análogos de BRs [37,57,58,61-66].



**Figura 11.** Estructuras de esteroides de origen natural empleados en la síntesis de BRs.

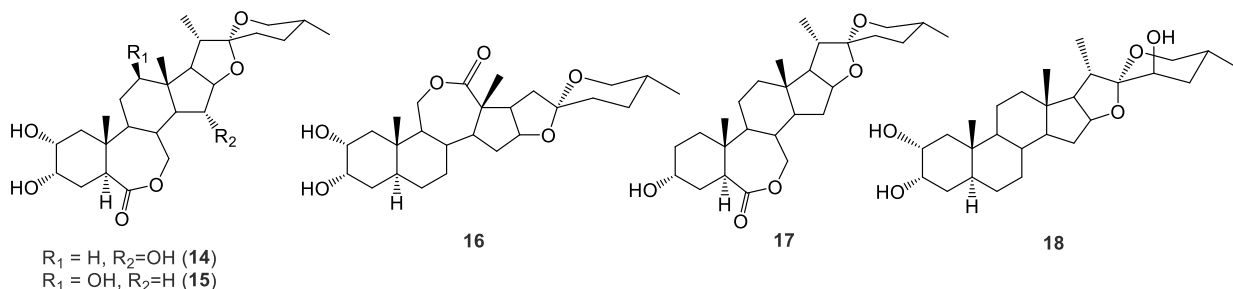
## 2.9 Modificaciones estructurales de BRs

Los esfuerzos de síntesis apuntan a la búsqueda de nuevos análogos de BRs, manteniendo los patrones comunes sobre las funciones orgánicas presentes en los anillos A/B y el tipo de fusiones entre estos, pero con cambios estructurales tanto en la cadena lateral, así como en la posición C-3 (en menor medida), presentando resultados de actividad biológica muy interesante. A continuación, se describen las estructuras y propiedades biológicas de los análogos más representativos con este tipo de modificaciones, algunos de los cuales han sido obtenidos a partir de matrices vegetales (tejidos).

### 2.9.1 Modificaciones estructurales en análogos de BRs

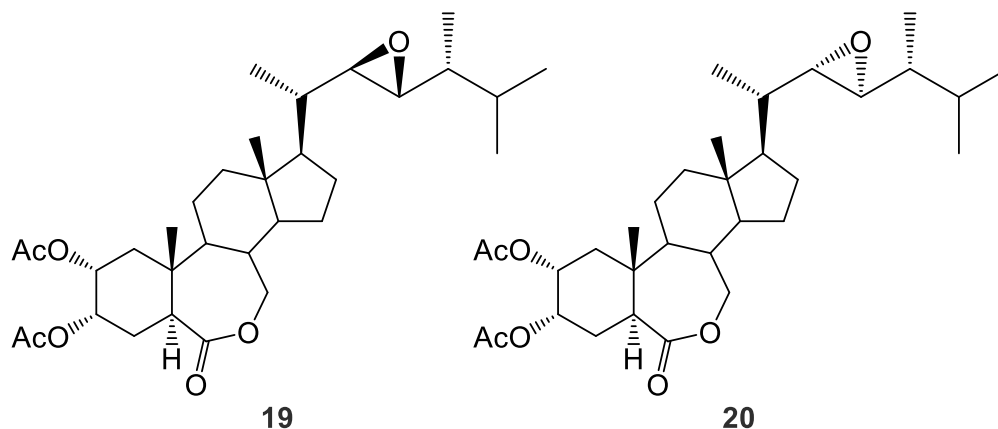
Pese a que muchos de los BRs bioactivos poseen una función estructural diol vecinal 22*R*,23*R* en la cadena lateral, Strnad y colaboradores concluyeron que la presencia de estos dos grupos en los carbonos C-22 y C-23, considerados como un requerimiento estructural clave, no son absolutamente necesarios para que un compuesto exhiba actividad típica de BRs [38]. De esta manera, incentivando a modificaciones en la cadena lateral típica, la mayoría de los trabajos recientes se concentran en la construcción de esta, siendo la tarea más interesante y desafiante en la preparación de BRs debido a la necesidad de posicionar a cuatro centros quirales contiguos.

Diferentes autores prepararon un gran número de análogos esteroídicos activos. Algunas de estas estructuras se muestran en la Figura 12. Los compuestos **14-18** son los ingredientes activos de importantes formulaciones comerciales, que actualmente son utilizados en la producción y protección agrícola [68-71].



*Figura 12. Análogos esteroídicos y furostéricos de BRs.*

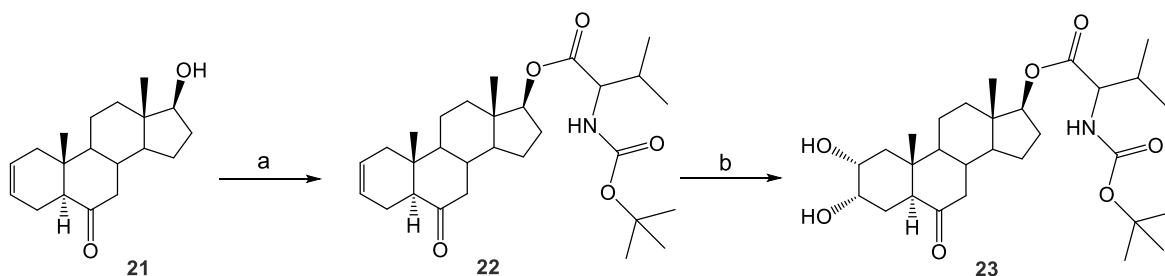
Por otra parte, los epoxi-brasinoesteroides **19** y **20** (Figura 13) fueron evaluados por tratamiento foliar de plantas jóvenes de frijol (SEF), resultando en que ambos compuestos elongaron su tejido de manera efectiva a una concentración de 1 y 10 [ppm], mientras que brasinólido (**1**) fue inhibitorio a altas concentraciones. Estos resultados evidenciaron que estos derivados poseen un efecto promotor de crecimiento tanto en el primer como segundo entrenudo y hasta más bioactivos que el control positivo (**1**) en altas concentraciones [72].



*Figura 13. Análogos 22,23-epoxibrasinostetroides 2,3-diacetatos.*

Recientemente Rárová y colaboradores reportaron la síntesis (Esquema 1) y la actividad biológica detallada del análogo sintético 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihidroxi-6-oxo-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -yl N-(*tert*-butoxicarbonil)-D,L-valinato **23** (BR4848), el nuevo análogo inhibe la angiogénesis en células

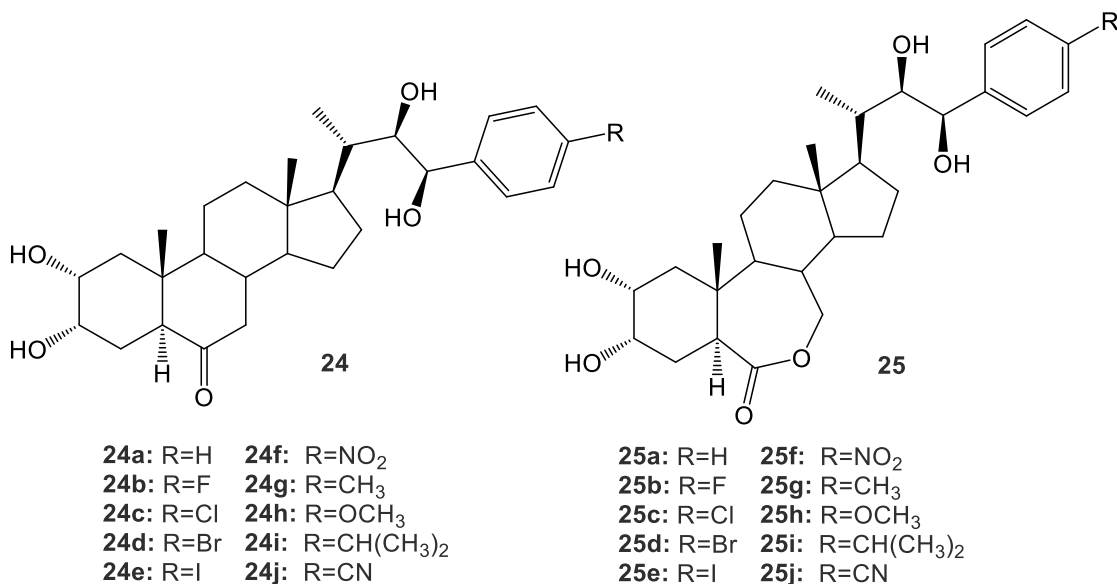
endoteliales humanas e induce apoptosis en células cancerosas humanas *in vitro*. Los efectos antiangiogénicos podrían aumentar el potencial antiproliferativo de este derivado [73].



**Esquema 1.** Preparación BR4848: (a) Boc-D,L-valina, DCC, DMAP/benceno. (b) OsO<sub>4</sub>, NMMO/THF, acetona.

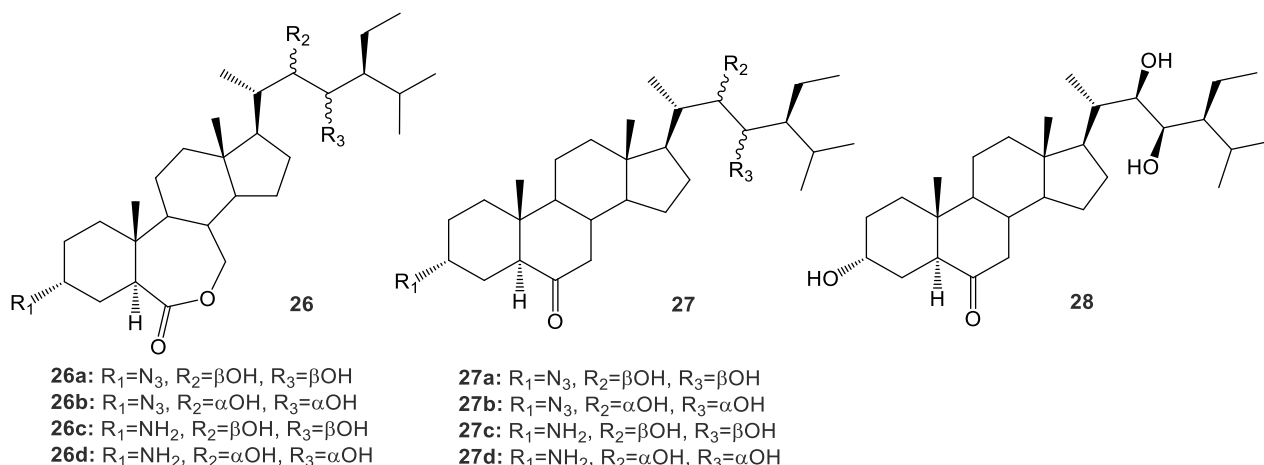
Otros análogos de brasinoesteroides con importantes cambios estructurales en la cadena lateral se muestran en la Figura 14. Los nuevos derivados de BRs con grupos fenil *p*-sustituidos en la cadena lateral fueron preparados por Kvasnica y colaboradores en base a estudios de docking molecular postulando nuevos candidatos para su aplicación en la agricultura y mejora del rendimiento e incremento de la resistencia de cultivos frente a varios tipos de estrés biótico y abiótico [36].

La actividad biológica de estos nuevos derivados preparados fue confirmada a través de ensayos en plantas (*Arabidopsis*). Para obtener la mejor comparación entre el acoplamiento molecular (docking molecular) y las actividades biológicas fueron sintetizados derivados de tipo 6-oxo y B-lactonas. La introducción de un grupo fenil con o sin pequeños sustituyentes no polares (flúor, cloro, metilo) dio lugar a nuevos análogos con prometedora actividad de crecimiento vegetal comparable a la de BRs de origen natural. Siendo los compuestos más activos la lactona **25a** y los derivados 6-oxo **24a** y **24b**, revelando ser comparables o incluso mejor en cuanto a potencial hormonal que su control positivo con brasinólido (**1**) [36].



*Figura 14. BRs con grupos fenil p-sustituídos en la cadena lateral.*

A fin de determinar si cada grupo hidroxilo presente en C-3 para un BR activo, actúa como aceptor o un donador en la interacción de enlace de hidrógeno del complejo receptor-BR para provocar una actividad, Brosa y colaboradores sintetizaron análogos de BRs con una función azida o amina en C-3 y sin ninguna función en C-2 (Figura 15) y evaluaron su bioactividad en el ensayo de ILA [74]. Considerando la buena actividad expuesta por los 3 $\alpha$ -N<sub>3</sub> derivados **26a** y **27a**, que actúan como aceptores de enlaces de hidrógeno, en contraste con la baja actividad provocada por los 3 $\alpha$ -NH<sub>2</sub> análogos **26c** y **27c** (actuando como donores de puentes de hidrógeno), comparados con el compuesto **28**, los autores sugieren que el grupo 3 $\alpha$ -OH presente en BRs podría funcionar como un aceptor de puentes de hidrógeno putativo con el(los) receptor(es). Esta hipótesis es respaldada por el hecho de que compuestos que poseen una función cetona, flúor o metoxi en C-3 también son bioactivos, incluso en otros bioensayos [40, 75-77].



**Figura 15.** Nuevos análogos de BRs con función azida o amina en C-3.

Varios análogos de BRs (**29-33**) fueron sintetizados reemplazando el grupo hidroxilo en C-3 por un átomo de flúor (Figura 16), mostrando sorprendentemente una alta actividad por parte de algunos análogos en el bioensayo SEF, lo que contradice la esencialidad generalmente aceptada del grupo  $3\alpha$ -hidroxilo. Con estos resultados, los autores demuestran la evidencia de que los grupos  $3\alpha$ -F y  $3\alpha$ -OH son similares en cuanto a potencial hormonal y que los derivados  $3\alpha$ -fluorados pueden conducir a productos útiles para su aplicación práctica (además de la estabilidad metabólica del enlace C-F) [77]. También se ha reportado la actividad del análogo conjugado **34** (Figura 16) junto a sus derivados 6-oxa y 7-oxalactonas, los cuales presentaron resultados positivos en el bioensayo SEF [78].

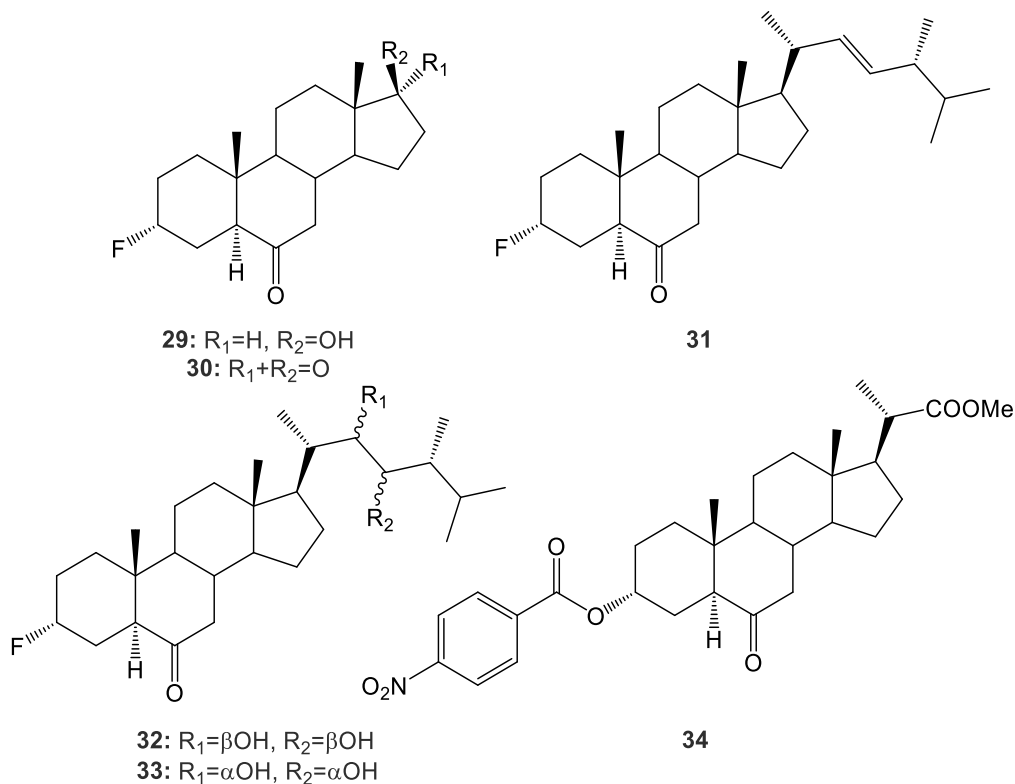
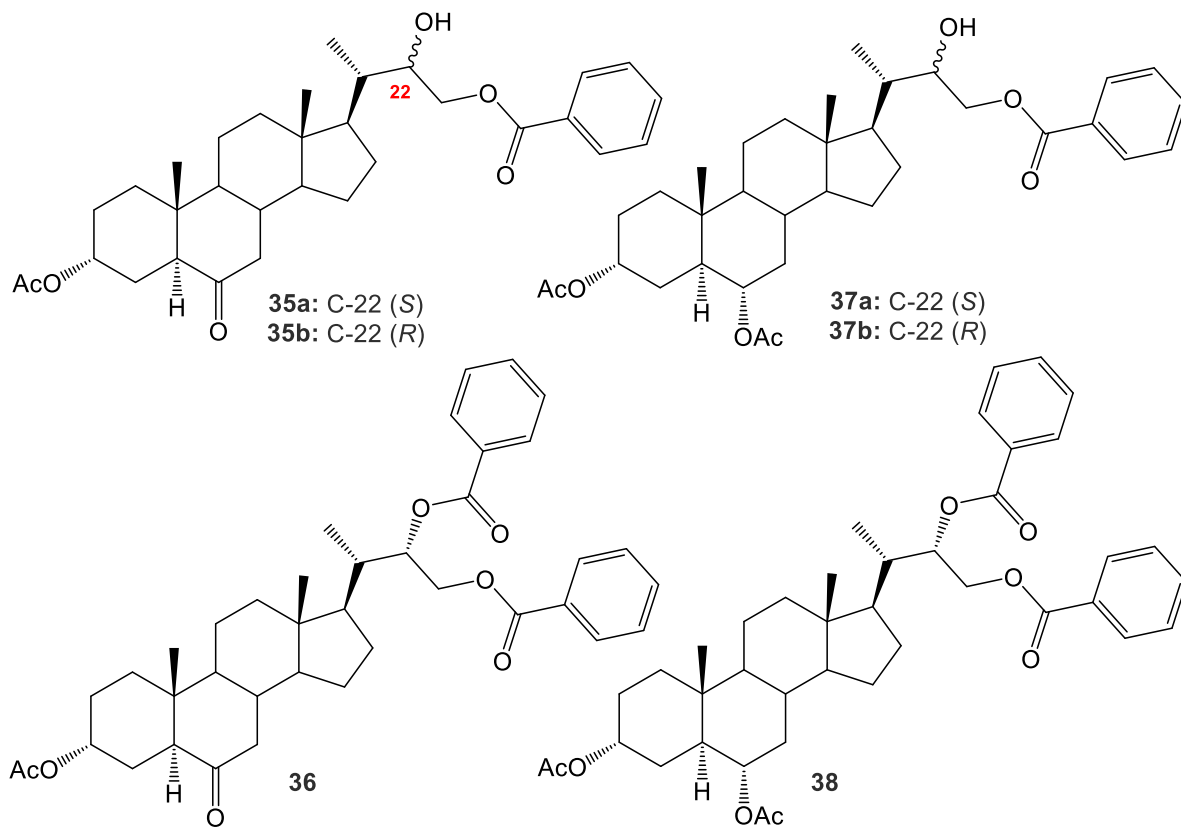


Figura 16. Análogos de BRs sustituidos en C-3.

Asimismo, otro trabajo reportado por Carvajal y colaboradores sobre la síntesis de nuevos análogos de BRs del tipo 24-norcolanos benzoilados en la cadena lateral (Figura 17), correspondientes a los congéneres **35a**, **35b** y **36** obtenidos a partir de ácido hiodeoxicólico (**9**), fueron evaluados mediante el bioensayo ILA exhibiendo una alta actividad biológica por parte de los compuestos **35a** y **35b** superando al control positivo (brasinólido (**1**)) [79,80]. Por otra parte, el análogo dibenzoilado **36** mostró una significativa disminución de la bioactividad en el mismo bioensayo [81]. Por otro lado, los compuestos **37** y **38** también fueron testeados en el mismo bioensayo, en donde los autores reportaron que la mezcla epimérica **37a/37b** (proporción 1,00/0,44) fue significativamente más bioactiva que brasinólido (**1**) a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M.



**Figura 17.** Estructuras de análogos de BRs del tipo 24-norcolanos con ésteres de benzoilo en C-23.

### 3 Planteamiento del Problema

---

Es sabido que los BRs poseen un rol crucial en cuanto al desarrollo y crecimiento durante el ciclo vital de las plantas, actuando en una amplia variedad de procesos fisiológicos al ser aplicados de manera exógena a concentraciones bajas. Aunque esta familia de fitohormonas presenta muchas ventajas, su contenido en las matrices vegetales es extremadamente bajo, por lo que su obtención a partir de la extracción de materia vegetal resulta un proceso costoso y con bajo rendimiento, lo cual constituye un factor limitante para su uso extendido.

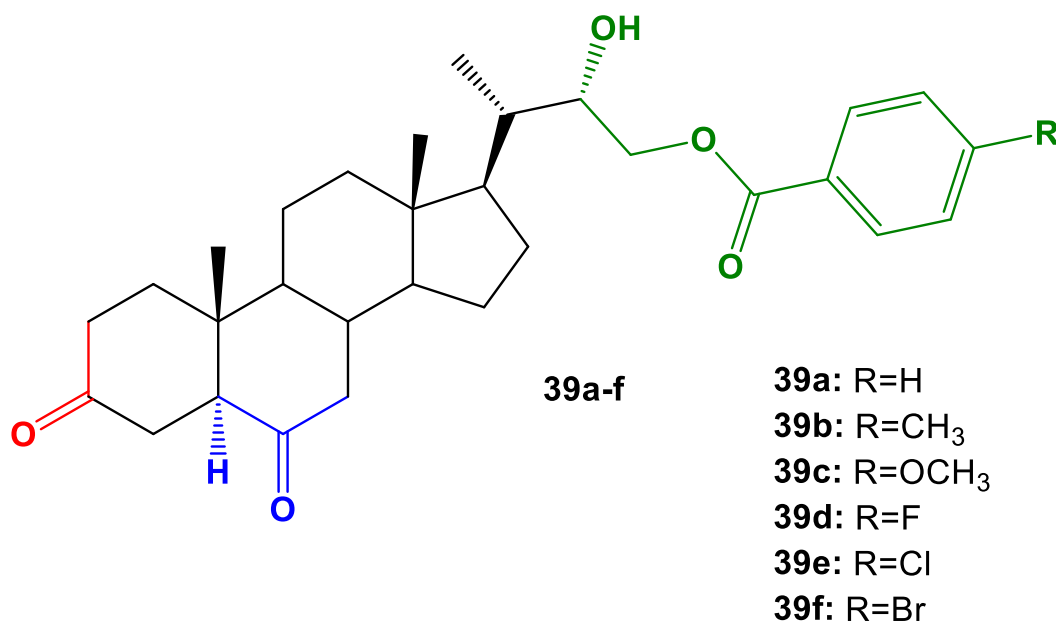
Por otra parte, la síntesis total de los BRs implica una tarea muy compleja y poco práctica a raíz de los aspectos estructurales y estereoquímicos que incluye el esqueleto base de esta familia de hormonas vegetales. En cambio, la síntesis parcial de BRs proporciona una alternativa más factible para la obtención de cantidades suficientes de estos compuestos, tanto para propósitos científicos como productivos a gran escala. Es por esta razón es que resulta interesante diseñar rutas de síntesis para la obtención de BRs minimizando la cantidad de pasos y reactivos empleados, incluyendo precursores esteroidales como material de partida altamente disponibles en el mercado actual, que contengan funciones orgánicas en posiciones adecuadas y modificables químicamente.

Considerando el trabajo de un número importante de investigaciones que reportan al brasinólido (**1**) como uno de los BRs naturales con mayor actividad hormonal, se han hecho intentos por sintetizar a este compuesto mediante rutas complejas y poco rentables, por lo que su reemplazo por análogos más accesibles como el 24-epibrasinólido (**5**) a partir de ergosterol (**11**); sin embargo, este último compuesto posee un elevado costo de venta (18 [USD/mg] [8]), lo que limita en gran parte su aplicación a pesar de su estabilidad en condiciones de campo abierto y una alta efectividad en cuanto a bioactividad. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos análogos de BRs con alto potencial biológico y bajo costo de síntesis se convierte en una tarea que podría resultar muy beneficiosa para la agroindustria.

Desde el punto de vista químico, los BRs poseen una estructura tridimensional determinada por sus centros quirales posicionados en diferentes zonas de la molécula junto a ciertos grupos funcionales oxigenados. Algunos compuestos sintéticos se han destacado por su gran potencial hormonal, como lo es el caso de algunas formulaciones comerciales en base a compuestos análogos espirostánicos de BRs, específicamente el BIOBRAS-16, utilizado en la agricultura cubana para estimular el crecimiento de las plantas [85]. Mientras que otros análogos de BRs con cadena lateral

del tipo 24-norcolanos han sido sintetizados y evaluados mediante ensayos de elongación de hipocótilos y expansión de cotiledones de rábanos [86,87].

Frente a esta problemática, se propone la síntesis de nuevos análogos de BRs con cadena lateral del tipo 24-norcolanos, con funciones oxo en C-3 y C-6, función 22(S)-hidroxi y funciones benzoatos en C-23 conteniendo sustituyentes aceptores y donadores de electrones en la posición 4 del anillo aromático (Figura 18) a partir del ácido hiodeoxicólico (9). Se realizaron estudios de acoplamiento molecular (*docking* molecular) a toda la serie propuesta utilizando como referencia al BRs natural brasinólido (1) y para la medición de la bioactividad se incluyeron los ensayos ILA y SEF, con la finalidad de validar la simulación ejecutada (*docking* molecular) con los resultados experimentales obtenidos.



**Figura 18.** Estructura de los análogos de BRs propuestos en esta investigación obtenidos a partir de ácido hiodeoxicólico (9).

## 4 Hipótesis

---

Nuevos análogos de BRs del tipo 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colanos con función benzoilo en C-23 incluyendo sustituyentes atractores/dadores de electrones en la posición 4 del anillo aromático, al ser aplicados de forma exógena estimulan o promueven el crecimiento vegetal.

## 5 Objetivos

---

### 5.1 Objetivo general

Obtener nuevos análogos de BRs con variaciones estructurales incluyendo las funciones oxo en C-3, C-6 y 22(S)-hidroxi en la cadena lateral acortada de tipo 24-norcolano, que estimulen o promuevan el crecimiento vegetal al ser aplicados de manera exógena.

### 5.2 Objetivos específicos

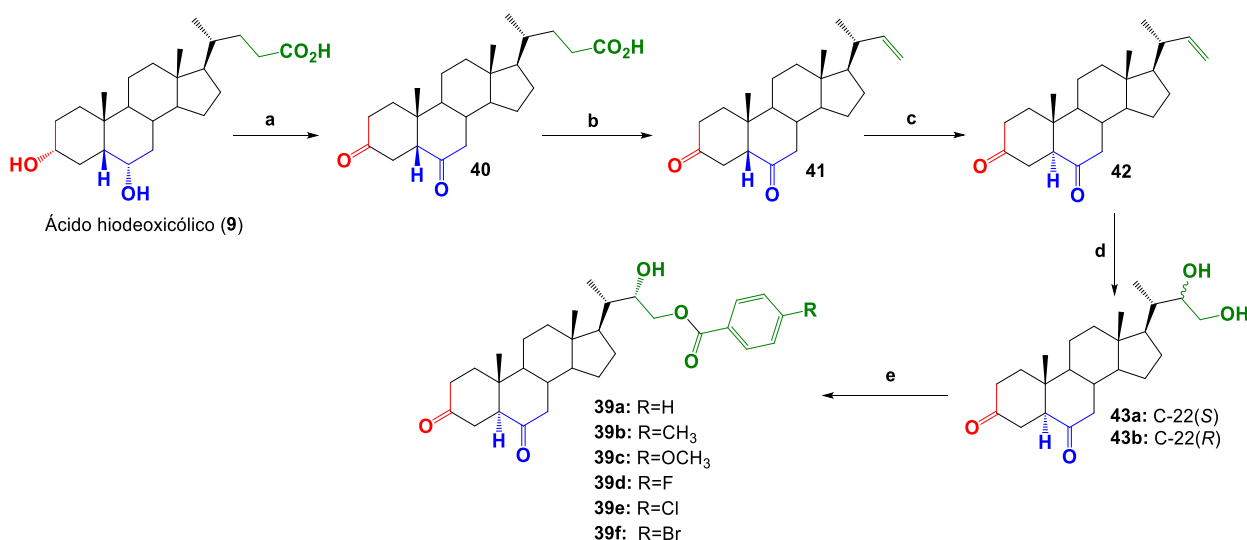
- 1) Sintetizar análogos de BRs con núcleos aromáticos *para*-sustituídos con grupos aceptores o dadores de electrones, en forma de ésteres de benzoilo ubicados en la posición C-23, funciones oxo en C-3 y C-6, cadena lateral del tipo 24-norcolano con función 22(S)-hidroxi, a partir de ácido hiodeoxicólico (**9**).
- 2) Caracterizar por medio de técnicas espectroscópicas (IR, EMAR y RMN) y mediciones de las propiedades físicas (punto de fusión) de cada uno de los intermediarios y compuestos finales.
- 3) Evaluar la actividad biológica de los análogos finales mediante el ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) y Segundo Entrenado de Frijol (SEF).
- 4) Realizar un estudio sobre acoplamiento molecular (*docking* molecular) con la serie de nuevos análogos propuestos (**39a-39f**) para predecir su afinidad de unión al receptor BRI1.
- 5) Validar y contrastar los resultados predictivos del acoplamiento molecular con los obtenidos experimentalmente en las actividades biológicas *in vitro*.

## 6 Metodologías

### 6.1 Síntesis química

#### 6.1.1 Esquema general de síntesis

En el Esquema 2 se presenta la estrategia general de síntesis empleada para la obtención de los derivados **40-43** y los nuevos análogos **39a-39f** a partir de ácido hiodeoxicólico (**9**). La síntesis química fue dirigida por el Dr. Luis Espinoza Catalán, encargado del Laboratorio de Síntesis Orgánica del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.



**Esquema 2.** Secuencia de síntesis para la obtención de nuevos análogos de BRs. Condiciones: **a.** oxidación de Jones ( $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), 2h.; **b.**  $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}/\text{C}_6\text{H}_6$ , 200°C, refl.; **c.** HCl 2.5%,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; **d.** dihidroxilación de Upjohn ( $\text{OsO}_4/\text{NMMO}/\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), 24h.; **e.** 4-R-PhCOCl/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}/\text{DMAP}$ , 0-5°C, 6h., separación por C.C y posterior cristalización.

#### 6.1.2 Rutas sintéticas desarrolladas para la obtención de nuevos análogos de BRs propuestos

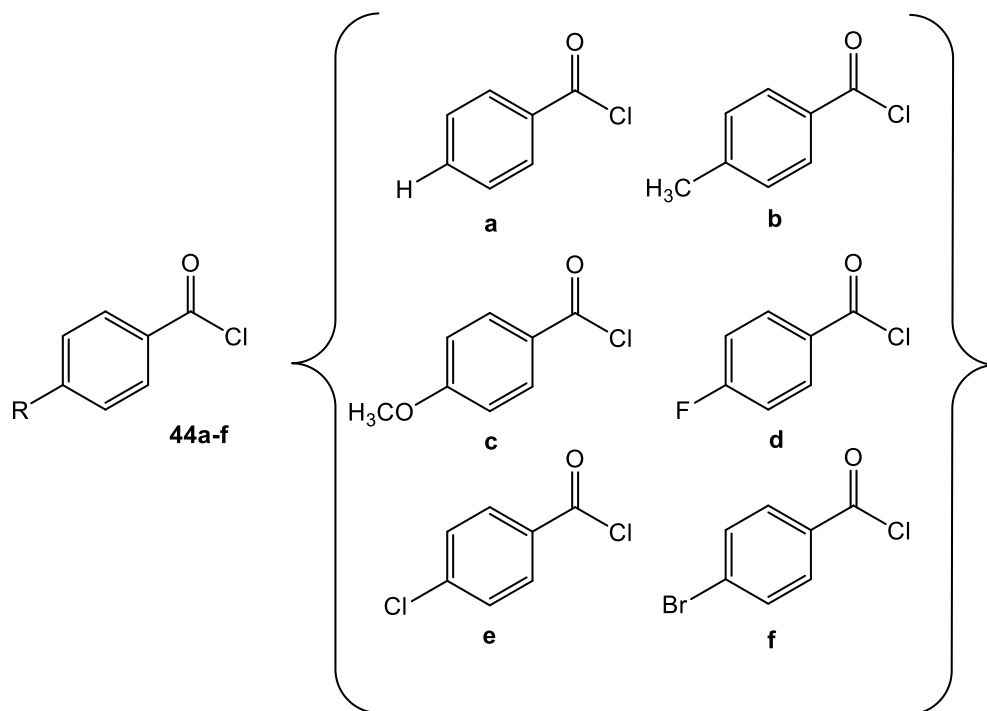
La estrategia sintética para la obtención de los nuevos análogos de brasinoesteroides empleó ácido hiodeoxicólico (**9**) como material de partida, dado a sus ventajas por su alta disponibilidad y bajo costo, además de contener las funciones orgánicas adecuadas para las siguientes transformaciones químicas que permiten alcanzar los análogos propuestos [61-66].

El primero paso involucró la oxidación de los grupos hidroxilos en C-3 y C-6 del ácido hiodeoxicólico (**9**) para incluir las funciones oxo produciendo el derivado dioxidado **40**, de acuerdo con la metodología reportada para la oxidación de ácidos biliares [67].

El paso posterior requiere de la degradación de la cadena lateral para su transformación en derivados del tipo 24-norcolanos, de tal forma que el alqueno **41** se obtuvo mediante reacción de descarboxilación oxidativa de **40** con el sistema  $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2$  o  $\text{PhI}(\text{OAc})_2/\text{CuSO}_4$  como se ha reportado para otros ácidos biliares con estructuras similares [62,64,88,89]. Posteriormente, el intermediario olefínico **41** fue isomerizado en C-5 por tratamiento ácido (HCl 2,5%, MeOH), que permitirá la obtención del alqueno isomerizado **42** [61].

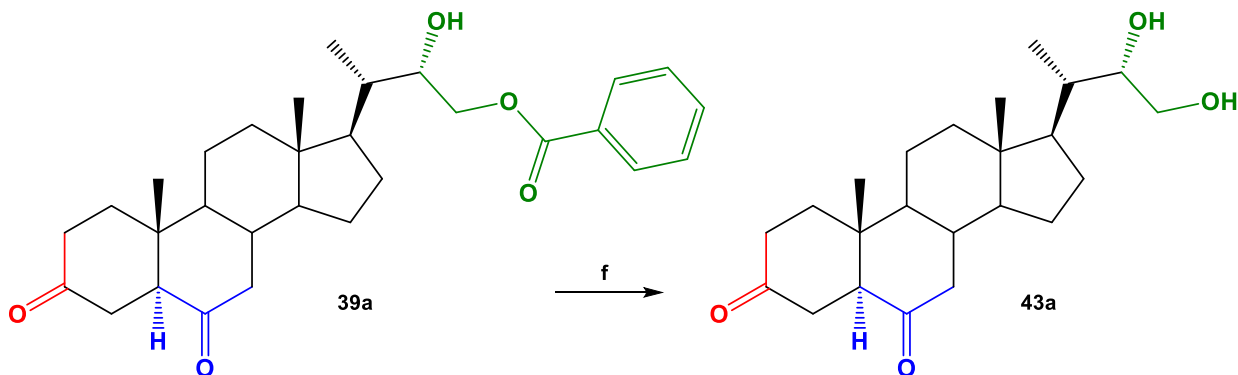
El siguiente paso consistió en la dihidroxilación de la olefina **42** mediante la reacción de dihidroxilación de Upjohn, empleando *NMMO* como agente reoxidante para generar la mezcla epimérica de dioles **43a/43b** con una proporción mayor en el epímero (**S**) sobre C-22 [86]. Debido a que no es posible la separación de la mezcla epimérica **43a/43b** utilizando métodos convencionales como cromatografía en columna, recristalización y/o HPLC [79,80], como estrategia sintética se procedió a separar los isómeros *R* y *S* por cromatografía en columna y/o recristalización, una vez culminado el próximo paso de síntesis.

Diferentes cloruros de ácidos *para*-sustituídos **44a-44f** (Figura 19) fueron empleados en función de sus características químicas (sustituyentes atractores y dadores de electrones) y estructurales (tamaños) para el acoplamiento del núcleo esteroideal de la mezcla de dioles **43a/43b** por medio de la reacción de benzoilación [86,90-92], dando como resultado a la familia de nuevos análogos de brasinoesteroides **39a-39f** con la función (*S*)-hidroxi en C-22 y benzoato en C-23.



**Figura 19.** Estructuras de cloruros de ácido empleados (**44a-44f**) para la síntesis de BRs con núcleos aromáticos en forma de ésteres en la posición C-23.

Para la obtención del glicol puro con configuración *S* en C-22, el análogo final **39a** fue sometido a una reacción de saponificación estándar en medio básico ( $K_2CO_3$ , MeOH) para dar el diol **43a** [86] (Esquema 3). Cabe destacar que para este último paso de síntesis se puede emplear como sustrato cualquier análogo de la serie **39a-39f**.



**Esquema 3.** Obtención del diastereoisómero **43a** desde el producto final **39a**. Condiciones: **f.** 1)  $K_2CO_3$ ,  $CH_3OH$ , 180 [°C], refl., 2) HCl 2,5% y posterior cristalización.

## 6.2 Evaluaciones biológicas

El estudio sobre los efectos de los nuevos análogos de brasinoesteroides en cuanto al crecimiento de plantas fue llevado a cabo con la colaboración de la Dra. Katy Díaz Peralta, perteneciente al Laboratorio de Pruebas Biológicas del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

### 6.2.1 Ensayo biológico de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA)

Para determinar la actividad sobre la elongación de la lámina de arroz de los análogos de BRs se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa*) variedad Zafiro que fueron facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Quilamapu-Chile). Las semillas fueron lavadas y remojadas en agua destilada estéril (ADE) durante 24 [h], luego se seleccionaron para sembrar en sustrato/perlita/vermiculita (3:1:1) a 22 [°C] en una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de luz (16 [h]) y oscuridad (8 [h]) [80,92].

Una vez que las plantas alcanzaron el tamaño ideal para obtener el segundo entrenudo de la lámina, se cortaron los segmentos de la hoja, que consiste en la segunda lámina foliar (5 [cm] de largo) y la segunda lámina conjunta con vaina (4 [cm] de largo), estos segmentos se incubaron en 60 [mL] de ADE y se probaron a distintas concentraciones de brasinólido (**1**) y los análogos de BRs ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M) disueltos en DMSO y agua destilada estéril (ADE). El control negativo solo llevó agua. El control positivo utilizado fue brasinólido (**1**). Después de incubar durante 48 [h] a 25[°C] en oscuridad, la magnitud de la apertura del ángulo se midió entre la hoja y la vaina [81,93] con un transportador. Las fotografías fueron tomadas con la Cámara Lupa Leica. Los datos se presentaron como el promedio por tratamiento  $\pm$  la desviación estándar (Versión modificada de Wada y colaboradores [46]), incorporando un análisis estadístico para destacar las diferencias significativas mediante una prueba de t de Student con un 95% de confiabilidad.

### 6.2.2 Ensayo biológico de Segundo Entrenudo de Frijol (SEF)

Se germinaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., var. Pinto) para luego ser traspasadas a macetas que contengan perlita/vermiculita y sustrato. Las macetas se colocaron en una cámara de cultivo o cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 [h] (claro/oscuro, respectivamente), con luz de intensidad de 48 [W/m<sup>2</sup>] y temperatura de 22 [°C]. Se trataron grupos de ocho plántulas de frijol de 10 días de edad con segundos entrenudos de 1-2 [mm] de largo, a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M (10 nM), disueltos en DMSO y agua, se aplicaron una vez retirada la bráctea de la base

del segundo entrenado. Al aplicar se agregaron 5 [μL] de TWEEN 20 (AMRESCO<sup>®</sup>) por cada 5 [μL] de solución con BRs para asegurar una buena adhesión a la matriz vegetal. Las plantas de control negativo se trataron solo con agua destilada estéril (ADE). Las medidas se realizaron después de 5 días. La diferencia entre la longitud del segundo entrenado de las plantas tratadas y de control se usaron como una medida de la actividad [94]. La medida se informó como el promedio del largo de la elongación ([mm]) en el tratamiento ± la desviación estándar, incorporando un análisis estadístico para destacar las diferencias significativas mediante una prueba de t de Student con un 95% de confiabilidad.

### 6.3 Estudios iniciales de *docking* molecular

Para evaluar la actividad potencial de los compuestos objetivo, se realizó un barrido virtual basado en las estructuras de los nuevos análogos de BRs. Las coordenadas de rayos X de las proteínas en complejo con sus ligandos se importaron desde el Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*). Las estructuras PDB se prepararon para el acoplamiento utilizando *Protein Preparation Workflow* (Maestro Schrödinger, LLC, NY, 2021). El receptor se optimizó usando campos de fuerza OPLS4 antes del estudio *Docking*. Los *grid* se generaron utilizando las proteínas preparadas, con las rejillas de acoplamiento en el centro de cada ligando ubicado en la proteína. Los ligandos se generaron primero en ChemDraw 3D para luego ser importados y preparados utilizando LigPrep implementado en Maestro 13.1. Los ligandos se acoplaron utilizando el protocolo de acoplamiento XP sin restricciones y un factor de escala de radio de 0,80 [vdW] (Van der Waals) y 0,15 de corte de carga parcial. Las posturas de ligando generadas se evaluaron con función de puntuación empírica. GlideScore, una versión mejorada de ChemScore, implementada en Glide [95] y utilizada para estimar la afinidad de unión y clasificar los ligandos. Glide emodel se utilizó para estimar la pose mejor acoplada para cada ligando, así como GlideScore se utiliza para estimar la afinidad de unión [96]. Los resultados del acoplamiento se ordenaron por GlideScore.

## 7 Experimental

---

### 7.1 Materiales y equipos generales

#### 7.1.1 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 anh. ( $\text{MgSO}_4$ ) o sulfato de sodio anh. ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

- Acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), Merck (EMSURE) (destilación a 77,1 [°C]).
- Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), Sigma-Aldrich (destilación a 56,5 [°C]).
- Benceno ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ), Merck (EMSURE) (destilación a 80,0 [°C]).
- Cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) 99,96% H-2, Sigma-Aldrich.
- Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), Merck (EMSURE) (destilación a 40,0 [°C]).
- Éter dietílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), Merck (EMSURE) (destilación a 34,6 [°C]).
- Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), Merck (EMSURE) (destilación a 68,8[°C]).
- Metanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ), Merck (EMSURE) (destilación a 64,9 [°C]).
- Metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 99,80% H-2, Sigma-Aldrich.

#### 7.1.2 Insumos

- Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), Merck (EMSURE).
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), Merck (EMSURE).
- Cromatoplacas de sílicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck.
- Papel filtro 125 [mm], Filtros Anovia S.A.
- Papel pH, Prolabo.
- Sílicagel para cromatografía en columna (0,040-0,063 [mm]), Merck.
- Sílicagel 60 para cromatografía en columna (0,063-0,200 [mm]), Merck.
- Sulfato de magnesio anh. ( $\text{MgSO}_4$ ), Merck (EMSURE).
- Sulfato de sodio anh. ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), Merck (EMSURE).
- Tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Merck (EMSURE).

### 7.1.3 Reactivos

- Acetato de plomo (IV) ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ), Sigma-Aldrich.
- Acetato de cobre (II) ( $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ), Sigma-Aldrich.
- Ácido clorhídrico (HCl), p.a, 37% (1,19 [g/mL]), Merck (EMSURE).
- Ácido hiodeoxicólico ( $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$ ), Alfa Aesar.
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 98% (1,84 [g/mL]), Merck (EMSURE).
- Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), Sigma-Aldrich.
- Carbonato de potasio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), Sigma-Aldrich.
- Cloruro de benzoílo ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{ClO}$ ), Sigma-Aldrich.
- Cloruro de *p*-bromobenzoílo ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{BrClO}$ ), Sigma-Aldrich.
- Cloruro de *p*-clorobenzoílo ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$ ), Sigma-Aldrich.
- Cloruro de *p*-fluorobenzoílo ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{ClFO}$ ), Sigma-Aldrich.
- Cloruro de *p*-metilbenzoílo ( $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClO}$ ), Sigma-Aldrich.
- Cloruro de *p*-metoxibenzoílo ( $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClO}_2$ ), Sigma-Aldrich.
- DMAP o 4-*N,N*-dimetilaminopiridina ( $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$ ), Alfa-Aesar.
- *N*-óxido de *N*-metilmorfolina ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ), Sigma-Aldrich.
- Piridina anh. ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ), 99,8%, Sigma-Aldrich.
- Óxido de cromo (VI) ( $\text{CrO}_3$ ), Sigma-Aldrich.
- Tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ), Sigma-Aldrich.

### 7.1.4 Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas cromatográficas de Sílicagel Merck 60F 254. Las placas fueron eluidas con mezclas de AcOEt y Hex en proporciones adecuadas para cada muestra. Los cromatogramas se revelaron en luz ultravioleta (365 [nm]) y por pulverizado de la placa con solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10% v/v, con posterior calcinación asistida por una pistola de calor.

### 7.1.5 Cromatografía en columna

Se realizaron con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) o Sílicagel 60 Merck (0,063-0,200 [mm]). Los eluyentes fueron mezclas de AcOEt y Hex aplicadas en diferentes gradientes de polaridad, indicados en cada caso.

## 7.2 Instrumentos y equipos

- **Puntos de Fusión (PF):** Los puntos de fusión fueron medidos utilizando el equipo StuartTM melting point apparatus SMP3, el cual posee un bloque de calefacción que acomoda 3 tubos capilares. Para el control de temperatura, el aparato cuenta con sensores Pt100. Incluye calefacción programable, con rampas de calentamiento rápido a 10 [°C/min] o bien razones de cambio menores hasta alcanzar el punto de fusión esperado.
- **Espectros de infrarrojo (IR):** Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro Thermo® Nicolet 6700, y se midieron en discos de KBr. Las frecuencias de absorción serán reportadas en número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).
- **Espectros de Masas de Alta Resolución (EMAR-ESI):** Se registraron en un espectrómetro Bruker Daltonik. El análisis de los productos de reacción se efectuó bajo las siguientes condiciones y parámetros: Temperatura seca de 180 [°C]; Nebulizador a 0,4 [bar]; Flujo de gas seco 4 [L/min]; Voltaje de pulverización de 4,5 [kV], modo positivo. Las mediciones de masas precisas se realizaron con un poder de resolución de 140.000 FWHM dentro del rango  $m/z$  igual a 50-1300.
- **Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN):** Los espectros ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC) fueron registrados en un espectrómetro digital Bruker Avance NEO 400. Las mediciones fueron llevadas a cabo utilizando como solvente cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) o metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), ambos deuterados y al 99,8%. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en partes por millón ([ppm]) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hertzios ([Hz]). Como referencia se utilizaron los valores de desplazamientos químicos de las señales residuales para los espectros de  $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3) = 7,26$  [ppm];  $\delta_1(\text{CD}_3\text{OD}) = 3,30$  [ppm] y  $\delta_2(\text{CD}_3\text{OD}) = 4,78$  [ppm]; y para los espectros de  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77,00$  [ppm] y  $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49,00$  [ppm].

## 7.3 Materiales y equipos biológicos

Los materiales y reactivos utilizados para realizar las evaluaciones biológicas de los análogos de BRs se detallan a continuación:

- Control positivo con brasinólido (**1**) ( $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_6$ ), Sigma-Aldrich.
- Los fungibles principales fueron materiales de plásticos como placas Petri, tubos Eppendorf, falcon y micropipetas P10, P200 y P1000.

- Para la siembra se utilizaron sustrato, perlita, vermiculita, macetas y bandejas.

Respecto a los equipos utilizados, se detallan a continuación:

- Cámara de crecimiento de plantas con control de temperatura, humedad y fotoperiodo marca BIOBASE®.
- Lupa estereoscópica con cámara fotográfica incluida marca Leica EZ4HD Stereo Microsystems, para el registro de los resultados cualitativos de los ángulos para el bioensayo ILA.
- Gabinete de bioseguridad tipo II para trabajar bajo condiciones estériles en los distintos bioensayos *in vitro* e *in vivo*.

## 7.4 Abreviaturas y siglas

### 7.4.1 Síntesis química

- Ac<sub>2</sub>O : Anhídrido acético
- AcOEt : Acetato de etilo
- AcOH : Ácido acético
- Anh. : Anhidro
- BRs : Brasinoesteroides
- CC : Cromatografía en columna
- CCF : Cromatografía en capa fina
- DCM : Diclorometano
- DMAP : 4-dimetilaminopiridina
- Et<sub>2</sub>O : Éter dietílico
- Hex : Hexano
- MeOH : Metanol
- N<sub>2</sub> : Nitrógeno
- Pi : Piridina
- T<sub>a</sub> : Temperatura ambiente
- 0,1:9,9 → 10:0,0 : Gradientes de polaridad en CC
- ADE : Agua destilada estéril
- ILA : Inclinación de la Lámina de Arroz

#### 7.4.2 Espectroscopía infrarroja

- IR : Espectro infrarrojo
- $\text{cm}^{-1}$  : Número de onda de banda de absorción

#### 7.4.3 Espectrometría de masas

- EMAR : Espectrómetro de Masas de Alta Resolución
- $[\text{M}]^+$  : Ion molecular
- $[\text{M}+\text{H}]^+$  : Ion molecular + 1

#### 7.4.4 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

- RMN : Resonancia Magnética Nuclear
- $\delta$  : Desplazamiento químico
- ppm : Partes por millón
- s : Singlete
- sa : Singlete ancho
- d : Doblete
- da : Doblete ancho
- dd : Doble doblete
- ddd : Doblete de doble doblete
- t : Triplete
- dt : Doble triplete
- c : Cuarteto
- dc : Doble cuarteto
- tc : Triple cuarteto
- m : Multiplete
- $J$  : Constante de acoplamiento
- ${}^2J_{\text{HC}}/{}^3J_{\text{HC}}$  : Acoplamiento escalar heteronuclear H-C a dos/tres enlaces
- ${}^1J_{\text{CF}}/{}^2J_{\text{CF}}/{}^3J_{\text{CF}}/{}^4J_{\text{CF}}$  : Acoplamiento escalar heteronuclear C-F a uno/dos/tres/cuatro enlaces
- DEPT : *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
- HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

- HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*
- NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
- 1D : Espectro monodimensional
- 2D : Espectro bidimensional
- \*H : Hidrógeno de asignación intercambiable
- \*C : Carbono de asignación intercambiable

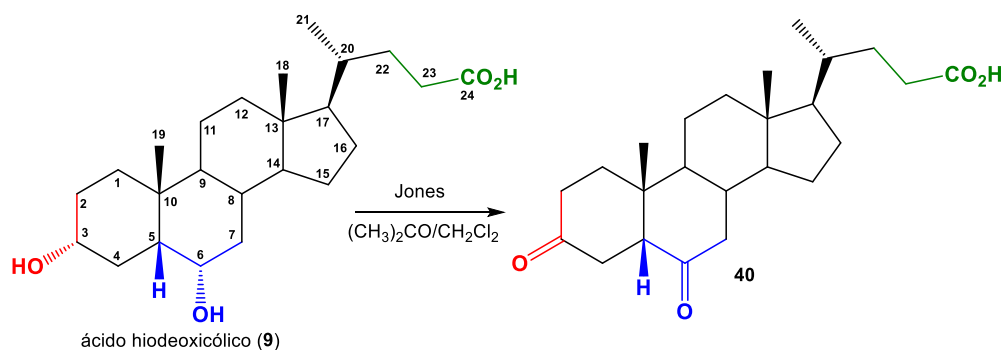
#### 7.4.5 Acoplamiento molecular

- OPLS4 : *Optimized Potentials for Liquid Simulations*
- IDF : *Induced fit-docking*

## 7.5 Síntesis Química

El trabajo sintético y de caracterización espectroscópica en búsqueda de la obtención de la nueva serie de análogos de BRs **39a-39f** se realizó bajo la supervisión del Dr. Luis Espinoza Catalán, encargado del Laboratorio de Síntesis Orgánica del Departamento de Química de la UTFSM.

### 7.5.1 Síntesis de ácido 3,6-dioxo-5 $\beta$ -colan-24-oico (40)



**Figura 20.** Reacción de oxidación de Jones del ácido hideoxicólico (9).

Ácido hideoxicólico (9) (10 [g], 25,47 [mmol]) fue disuelto en acetona (800 [mL]) a una temperatura bajo 10 [°C] en un baño de hielo-agua con agitación constante. Se agregaron por goteo 40 [mL] de reactivo de Jones (preparado con 6,5 [g] CrO<sub>3</sub>, 6 [mL] H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 18 [mL] H<sub>2</sub>O). El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF con un tiempo total de 4 [h].

Una vez finalizada la reacción, se agregaron 80 [mL] de CH<sub>3</sub>OH para destruir el exceso de agente oxidante en solución hasta alcanzar una tonalidad verde esmeralda. La solución resultante

fue evaporada y luego diluida con agua (400 [mL]) para ser extraída con DCM (300 [mL]). Cada extracción con DCM fue lavada con 100 [mL] de agua.

Posteriormente, la fase orgánica fue secada sobre  $\text{MgSO}_4$  anh., filtrada y posteriormente evaporada hasta sequedad. Se obtuvo un sólido blanco identificado como **40** (9,7 [g], 97%) P.f. = 164,4-164,7[°C] ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $\text{IR}_{\text{vmax}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3432-2650 (OH); 2964 y 287 (C-H); 1717 (C=O); 1466 ( $\text{CH}_2$ -); 1387 ( $\text{CH}_3$ -); 1245 y 1167 (C-O).  $^1\text{H}$  RMN (400,1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 2,64 (1H, dd,  $J = 14,3$  y 13,7 Hz, H-4 $\alpha$ ); 2,48 (1H, dd,  $J = 12,9$  y 4,7 Hz, H-5); 0,955 (3H, s, H-19); 0,945 (3H, d,  $J = 6,7$  Hz, H-21); 0,697 (3H, s, H-18).  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 210,92 (C-6); 208,76 (C-3); 179,44 (C-24); 59,69 (C-5); 56,76 (C-14); 55,77 (C-17); 43,08 (C-13); 42,13 (C-7); 40,89 (C-9); 39,87 (C-4); 39,47 (C-12); 38,28 (C-10); 36,67 (C-20); 36,47 (C-1); 35,74 (C-2); 35,19 (C-8); 30,84 (C-23); 30,60 (C-22); 27,93 (C-16); 23,89 (C-15); 22,45 (C-19); 21,28 (C-21); 11,98 (C-18).

#### 7.5.2 Síntesis de 24-nor-5 $\beta$ -colan-22-en-3,6-diona (**41**)

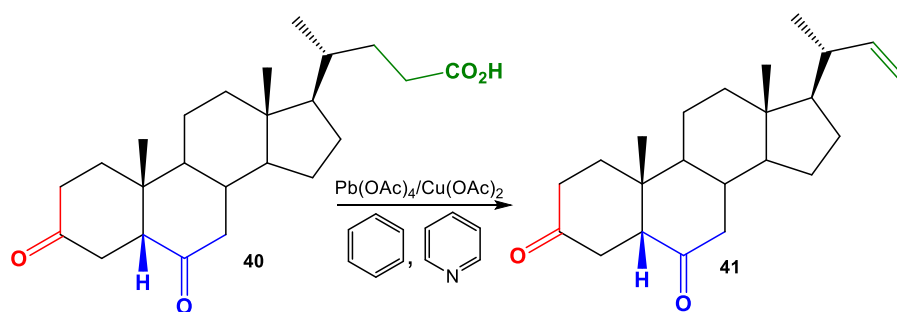


Figura 21. Reacción de descarboxilación oxidativa de **40** con  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ .

Se disolvieron 4 [g] (10,30 [mmol]) del compuesto dioxidado **40** en 120 [mL] de benceno seco, se agregaron 400 [mg] de  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 16 gotas de piridina. La mezcla de reacción se reflujo durante 2 [h] y se agregaron 11,2 [g] de  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  95% (12,63 [mmol]), en cuatro porciones a intervalos de 1 [h]. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, siendo el tiempo total de la reacción de 4 [h].

Una vez finalizada la reacción, la solución se dejó enfriar, se filtró con papel Whatman N°1, el solvente fue evaporado para luego extraer con AcOEt (60 [mL]), realizando lavados con agua destilada y saturada con NaCl (3 x 60 [mL]) hasta obtener un pH neutro.

La fase orgánica fue secada sobre  $\text{MgSO}_4$  anh., filtrada y posteriormente evaporada hasta sequedad. El crudo de la reacción se diluyó en 2 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con

polaridad creciente (1,00:0 → 0,78:0,12). Se separó un sólido blanco cristalino identificado como **41** (1,71[g], 42,7%). P.f. = 180,5-182,4 [°C]. IR<sub>vmax</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3073 (CH=CH<sub>2</sub>); 2964, 2947, 2873 y 2855 (C-H); 1716 (C=O); 1693 (C=O); 1632 (C=C); 1466 (CH<sub>2</sub>-); 1382 (CH<sub>3</sub>-); 1245 y 1216 (C-O); 908 (CH=CH<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 5,65 (1H, ddd, *J* = 17,2, 10,1 y 8,5 Hz, H-22); 4,91 (1H, dd, *J* = 17,2 y 1,9 Hz, H<sub>trans</sub>-23); 4,83 (1H, dd, *J* = 10,1 y 1,9 Hz, H<sub>cis</sub>-23); 2,64 (1H, dd, *J* = 14,7 y 13,2 Hz, H-4α); 2,47 (1H, dd, *J* = 12,5 y 4,9 Hz, H-5); 2,39 (1H, dd, *J* = 14,0 y 5,0 Hz, H-1α); 1,11 (1H, ddd, *J* = 12,1, 11,9 y 6,0 Hz, H-15); 1,04 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H-21); 0,954 (3H, s, H-19); 0,715 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 210,81 (C-6); 208,63 (C-3); 144,69 (C-22); 111,96 (C-23); 59,71 (C-5); 56,81 (C-14); 55,36 (C-17); 42,99 (C-13); 42,13 (C-7); 41,06 (C-20); 40,93 (C-9); 39,87 (C-4); 39,37 (C-12); 38,27 (C-10); 36,66 (C-8); 36,46 (C-1); 35,74 (C-2); 28,18 (C-16); 23,90 (C-15); 22,45 (C-19); 21,27 (C-11); 20,06 (C-21); 12,13 (C-18).

### 7.5.3 Síntesis de 24-nor-5α-colan-22-en-3,6-diona (**42**)

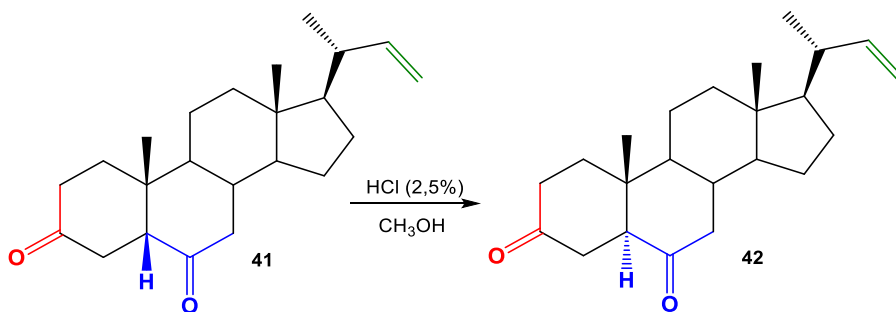


Figura 22. Isomerización por tratamiento ácido del compuesto **41**.

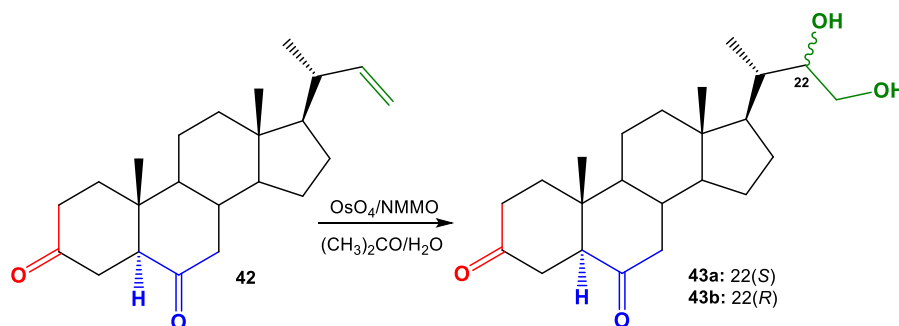
Se disolvieron 2,00 [g] (5,84 [mmol]) del compuesto **41** en 195 [mL] de CH<sub>3</sub>OH junto con 5 [mL] de HCl 2,5 % v/v, manteniendo la mezcla de reacción en agitación constante y con reflujo. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, tomando un tiempo total de 2 [h].

Una vez finalizada la reacción, la solución se dejó enfriar, el solvente fue evaporado para luego extraer con AcOEt (60 [mL]), realizando lavados con agua destilada y saturada con NaHCO<sub>3</sub> (3 x 60 [mL]) hasta obtener un pH neutro.

La fase orgánica fue secada sobre MgSO<sub>4</sub> anh., filtrada y posteriormente evaporada hasta sequedad. Se separó un sólido amarillo identificado **42** (1,88[g], 94,0%). P.f. = 148,9-149,7 [°C] (AcOEt/hex.). IR<sub>vmax</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3073 (CH=CH<sub>2</sub>); 2946, 2870 y 2866 (C-H); 1712 (C=O); 1638 (C=C); 1460 (CH<sub>2</sub>-); 1389 (CH<sub>3</sub>-); 1248 y 1216 (C-O); 906 (CH=CH<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 5,65 (1H, ddd, *J* = 17,2, 10,2 y 8,5 Hz, H-22); 4,91 (1H, dd, *J* = 17,2 y 1,8 Hz, H<sub>trans</sub>-23); 4,83 (1H, dd, *J*

= 10,2 y 1,8 Hz,  $H_{cis-23}$ ); 2,62-2,54 (2H, m, H-5 y H-2); 2,00 (1H, t,  $J = 13,0$  Hz, H-7 $\beta$ ); 1,86 (1H, ddd,  $J = 14,6, 10,3$  y  $4,2$  Hz, H-8); 1,43 (1H, ddd,  $J = 16,7, 12,7$  y  $3,7$  Hz, H-11 $\beta$ ); 1,10 (1H, ddd,  $J = 18,0, 11,7$  y  $5,9$  Hz, H-15); 1,03 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, H-21); 0,953 (3H, s, H-19); 0,712 (3H, s, H-18).  $^{13}C$  RMN (100,6 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 211,23 (C-3); 209,03 (C-6); 144,75 (C-22); 111,92 (C-23); 57,47 (C-5); 56,58 (C-14); 55,34 (C-9); 53,44 (C-17); 46,55 (C-7); 42,95 (C-13); 41,22 (C-10); 41,06 (C-20); 39,22 (C-12); 38,06 (C-1); 37,96 (C-8); 37,35 (C-2); 36,96 (C-4); 28,15 (C-16); 23,95 (C-15); 21,62 (C-11); 20,03 (C-21); 12,54 (C-19); 12,17 (C-18).

#### 7.5.4 Síntesis de la mezcla epimérica 22(*R/S*),23-dihidroxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (43ab)



**Figura 23.** Obtención de los compuestos **43a** y **43b** a través de la dihidroxilación de Upjohn de **42**.

A una solución del alqueno **42** (2,50 [g], 7,30 [mmol]) en acetona (150 [mL]) se agregó NMMO (0,45 [g]) manteniendo la mezcla de reacción en agitación constante y a temperatura ambiente. Luego de alcanzar una mezcla homogénea, se agregaron por goteo 2 [mL] de solución acuosa de  $OsO_4$  4% m/v. El término de la reacción fue monitoreado por CCF, tomando un tiempo total de 36 [h].

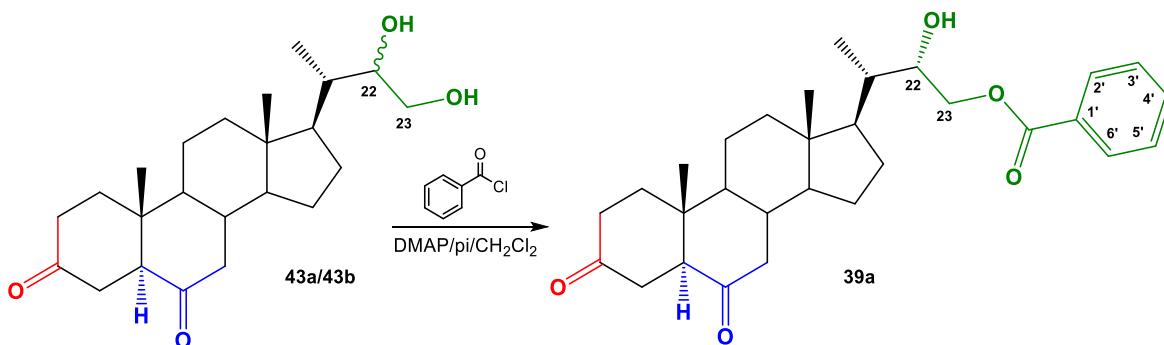
Una vez finalizada la reacción, la solución se dejó enfriar, el solvente fue evaporado para luego agregar 25 [mL] de una solución saturada de  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  para destruir el exceso de agente oxidante en solución. Posteriormente, se realizó una extracción con AcOEt (60 [mL]) realizando lavados con agua destilada y saturada con  $NaHCO_3$  (3 x 60 [mL]).

Posteriormente, la fase orgánica fue secada sobre  $MgSO_4$  anh., filtrada y posteriormente evaporada hasta sequedad. El crudo de la reacción se diluyó en 2 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con polaridad creciente (1,00:0  $\rightarrow$  0,45:0,55). Una mezcla de **43a/43b** = 4,0/1,0 fue obtenida (1,61 [g], 64,3%).  $IR_{vmax}$  (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3510 (O-H); 2968 ( $CH_3^-$ ); 2935 ( $CH_2^-$ ); 2865 ( $CH^-$ ); 1705 (C=O); 1428 ( $CH_2^-$ ); 1381 ( $CH_3^-$ ); 1264 y 1064 (C-O).

Isómero **43a** (22*S*):  $^1\text{H}$  RMN (400,1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3,82-3,78 (1H, m, H-22); 3,64-3,61 (1H, m, H-23a); 3,54-3,49 (1H, m, H-23b); 2,63-2,54 (2H, m, H-5 y H-2); 2,00 (1H, t,  $J = 12,4$  Hz, H-7 $\beta$ ); 0,962 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, H-21); 0,953 (3H, s, H-19); 0,705 (3H, s, H-18).  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 211,25 (C-3); 208,92 (C-6); 73,75 (C-22); 66,42 (C-23); 57,48 (C-5); 56,14 (C-14); 53,40 (C-9); 52,33 (C-17); 46,51 (C-7); 43,39 (C-13); 41,18 (C-10); 39,97 (C-20); 39,27 (C-12); 38,05 (C-1); 37,95 (C-8); 37,33 (C-2); 36,94 (C-4); 27,34 (C-16); 24,06 (C-15); 21,61 (C-11); 13,03 (C-21); 12,53 (C-19); 11,73 (C-18).

Isómero **43b** (22*R*):  $^1\text{H}$  RMN (400,1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3,82-3,78 (1H, m, H-22); 3,64-3,61 (1H, m, H-23a); 3,54-3,49 (1H, m, H-23b); 2,63-2,54 (2H, m, H-5 y H-2); 2,00 (1H, t,  $J = 12,4$  Hz, H-7 $\beta$ ); 0,923 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-21); 0,953 (3H, s, H-19); 0,705 (3H, s, H-18).  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 211,25 (C-3); 208,92 (C-6); 73,96 (C-22); 66,42 (C-23); 57,48 (C-5); 56,45 (C-14); 53,32 (C-9); 52,28 (C-17); 46,51 (C-7); 43,39 (C-13); 42,85 (C-10); 39,97 (C-20); 39,33 (C-12); 38,01 (C-1); 37,84 (C-8); 37,33 (C-2); 36,94 (C-4); 27,60 (C-16); 23,89 (C-15); 21,61 (C-11); 13,03 (C-21); 12,60 (C-19); 11,73 (C-18).

#### 7.5.5 Síntesis de 23-benzoato de 22(*S*)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (**39a**)



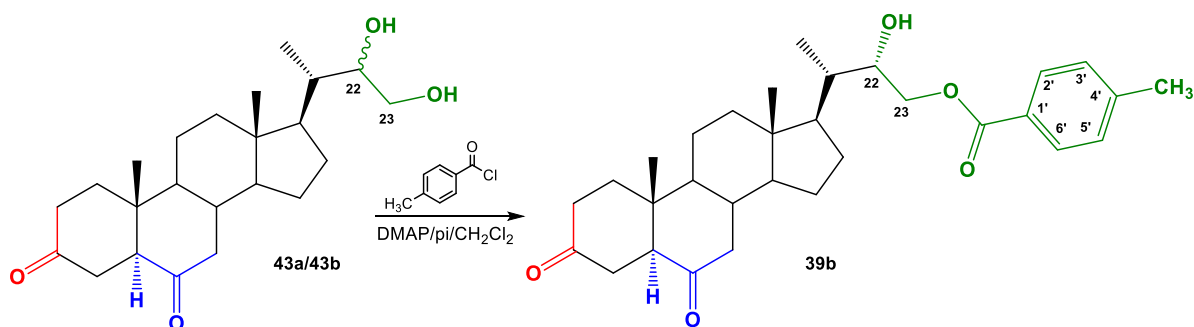
**Figura 24.** Obtención del compuesto **39a** a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica **43ab**.

Se disolvieron 324,0 [mg] (0,86 [mmol]) de la mezcla **43a/43b** y 40 [mg] de DMAP en 15 [mL] de piridina a una temperatura bajo 10 [°C] en un baño de hielo-agua con agitación constante. Se agregaron por goteo 392 [ $\mu\text{L}$ ] (2,79 [mmol], densidad: 1,21 [g/mL]) de cloruro de benzoilo (**44a**) manteniendo la reacción bajo las mismas condiciones. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, el tiempo total de la reacción fueron 3 [h].

Una vez finalizada la reacción, se agregaron 3 [mL] de agua caliente. Luego de 20 [min] adicionales de agitación la muestra fue extraída con AcOEt (50 [mL]). Las fases fueron separadas realizando lavados con agua destilada saturada en NaHCO<sub>3</sub> (40 [mL]) y agua (2 x 50 [mL]).

La fase orgánica fue secada sobre MgSO<sub>4</sub> anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto de reacción se diluyó en 2,0 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con polaridad creciente (1,00:0 → 0,60:0,40). Se separó un sólido incoloro identificado como **39a** (107 [mg], 25,9%). P.f. = 206,4-207,8 [°C]. IR<sub>vmax</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3446 (O-H); 2947 (CH<sub>3</sub>-); 2871 (CH<sub>2</sub>-); 1705 (C=O); 1454 (CH<sub>2</sub>-); 1274 y 1024 (C-O); 718 (Ar-H). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8,05 (2H, dd, *J* = 7,8 y 1,4 Hz, 2H, H-2' y H-6'); 7,58 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, H-4'); 7,46 (2H, t, *J* = 7,8 Hz, H-3' y H-5'); 4,49 (1H, dd, *J* = 11,5 y 1,9 Hz, H-23a); 4,20 (1H, dd, *J* = 11,5 y 9,1 Hz, H-23b); 4,06 (1H, ddd, *J* = 9,1, 3,6 y 1,9 Hz, H-22); 2,63-2,54 (2H, m, H-5 y H-2); 2,01 (1H, t, *J* = 12,6 Hz, H-7β); 1,18 (1H, ddd, *J* = 12,5, 12,0 y 6,0 Hz, H-15); 1,06 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-21); 0,959 (3H, s, H-19); 0,732 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 211,20 (C-3); 208,92 (C-6); 167,00 (Ar-CO<sub>2</sub>); 133,25 (C-4'); 129,80 (C-1'); 129,62 (C-2' y C-6'); 128,45 (C-3' y C-5'); 71,74 (C-22); 66,35 (C-23); 57,44 (C-5); 56,19 (C-14); 53,34 (C-9); 52,83 (C-17); 46,50 (C-7); 43,42 (C-13); 41,17 (C-10); 40,27 (C-20); 39,27 (C-12); 38,01 (C-1); 37,95 (C-8); 37,33 (C-2); 36,94 (C-4); 27,39 (C-16); 24,05 (C-15); 21,61 (C-11); 12,89 (C-21); 12,53 (C-19); 11,80 (C-18). EMAR-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>: 481,2949 [M + H]<sup>+</sup>; encontrado 481,2918 [M + H]<sup>+</sup>.

#### 7.5.6 Síntesis de 23-(4-metil) benzoato de 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5α-colano (**39b**)



**Figura 25.** Obtención del compuesto **39b** a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica **43**.

Se disolvieron 200,0 [mg] (0,53 [mmol]) de la mezcla **43a/43b** y 70,7 [mg] de DMAP en 10 [mL] de piridina a una temperatura bajo 10 [°C] en un baño de hielo-agua con agitación constante. Se agregaron por goteo 287 [μL] (0,68 [mmol], densidad: 1,17 [g/mL]) de cloruro de *p*-metilbenzoílo

(44b) manteniendo la reacción bajo las mismas condiciones. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, el tiempo total de la reacción fueron 3 [h].

Una vez finalizada la reacción, se agregaron 3 [mL] de agua caliente. Luego de 20 [min] adicionales de agitación la muestra fue extraída con AcOEt (50 [mL]). Las fases fueron separadas realizando lavados con agua destilada saturada en NaHCO<sub>3</sub> (30 [mL]) y agua (2 x 30 [mL]).

La fase orgánica fue secada sobre MgSO<sub>4</sub> anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto de reacción se diluyó en 2,0 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con polaridad creciente (1,00:0 → 0,65:0,35). Se separó un sólido incoloro identificado como **39b** (22,1 [mg], 8,4%). P.f. = 217,9-219,3 [°C]. IR<sub>vmax</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3446 (O-H); 2950 (CH<sub>3</sub>-); 2905 (CH<sub>2</sub>-); 2870 (CH-); 1720 (C=O); 1705 (C=O); 1609 (C=C); 1391 (CH<sub>3</sub>-); 1277 y 1095 (C-O); 757 (Ar-H). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7,95 (2H, d, J = 8,1 Hz, H-2' y H-6'); 7,27 (2H, d, J = 8,1 Hz, H-3' y H-5'); 4,49 (1H, dd, J = 11,5 y 1,7 Hz, H-23a); 4,20 (1H, dd, J = 11,5 y 9,1 Hz, H-23b); 4,08-4,05 (1H, m, H-22); 2,65-2,56 (2H, m, H-5 y H-2); 2,44 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Ar); 2,03 (1H, t, J = 12,8 Hz, H-7β); 1,19 (1H, ddd, J = 12,8, 11,7 y 5,7 Hz, H-15); 1,08 (3H, d, J = 6,8 Hz, H-21); 0,978 (3H, s, H-19); 0,750 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 211,18 (C-3); 208,90 (C-6); 166,06 (Ar-CO<sub>2</sub>); 143,97 (C-4'); 129,64 (C-3' y C-5'); 129,14 (C-2' y C-6'); 127,04 (C-1'); 71,72 (C-22); 66,17 (C-23); 57,42 (C-5); 56,18 (C-14); 53,34 (C-9); 52,81 (C-17); 46,48 (C-7); 43,40 (C-13); 41,15 (C-10); 40,23 (C-20); 39,25 (C-12); 37,99 (C-1); 37,94 (C-8); 37,31 (C-2); 36,92 (C-4); 27,37 (C-16); 24,04 (C-15); 21,65 (CH<sub>3</sub>-Ar); 21,60 (C-11); 12,88 (C-21); 12,52 (C-19); 11,79 (C-18). EMAR-ESI (modo positivo): m/z calculado para C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>: 495,3105 [M + H]<sup>+</sup>; encontrado 495,3119 [M + H]<sup>+</sup>.

#### 7.5.7 Síntesis de 23-(4-metoxi) benzoato de 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5α-colano (39c)

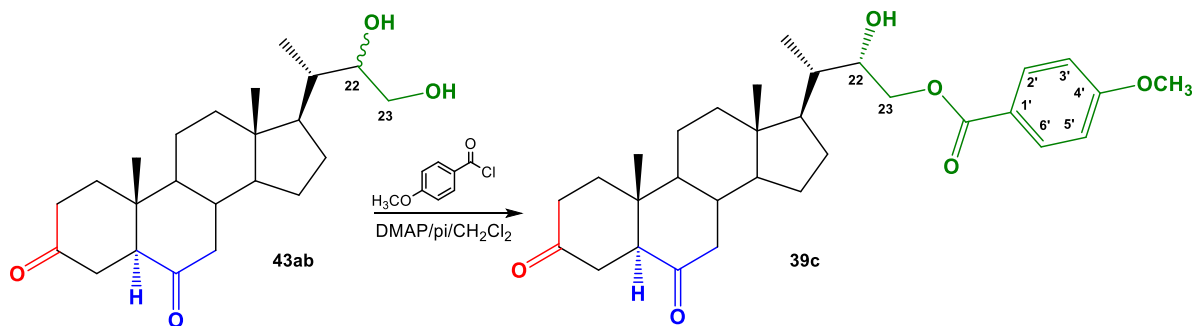


Figura 26. Obtención del compuesto **39c** a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica **43ab**.

Se disolvieron 211,3 [mg] (0,56 [mmol]) de la mezcla **43a/43b** con 45 [mg] de DMAP en 10 [mL] de piridina a una temperatura bajo 10 [°C] en un baño de hielo-agua con agitación constante. Se agregaron 373 [mg] (0,73 [mmol]) de cloruro de *p*-metoxibenzoílo (**44c**) manteniendo la reacción bajo las mismas condiciones. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, el tiempo total de la reacción fueron 3 [h].

Una vez finalizada la reacción, se agregaron 3 [mL] de agua caliente. Luego de 20 [min] adicionales de agitación la muestra fue extraída con AcOEt (50 [mL]). Las fases fueron separadas realizando lavados con agua destilada saturada en NaHCO<sub>3</sub> (30 [mL]) y agua (2 x 30 [mL]).

La fase orgánica fue secada sobre MgSO<sub>4</sub> anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto de reacción se diluyó en 2,0 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con polaridad creciente (1,00:0 → 0,70:0,30). Se separó un sólido incoloro identificado como **39c** (87,7 [mg], 30,6%). P.f. = 202,3-204,2 [°C]. IR<sub>vmax</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3490 (O-H); 2967 (CH<sub>3</sub>-); 2890 (CH<sub>2</sub>-); 1707 (C=O); 1607 (C=C); 1514 (C=C); 1425 (CH<sub>2</sub>-); 1257 y 1075 (C-O); 771 (Ar-H). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7,99 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-2' y H-6'); 6,91 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-3' y H-5'); 4,45 (1H, dd, *J* = 11,5 y 1,9 Hz, H-23a); 4,15 (1H, dd, *J* = 11,5 y 9,1 Hz, H-23b); 4,04-4,00 (1H, m, H-22); 3,85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 2,62-2,53 (2H, m, H-5 y H-2); 2,00 (1H, t, *J* = 13,1 Hz, H-7β); 1,16 (1H, ddd, *J* = 12,3, 11,5 y 5,7 Hz, H-15); 1,04 (3H, d, *J* = 6,9 Hz, H-21); 0,943 (3H, s, H-19); 0,715 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 211,19 (C-3); 208,91 (C-6); 166,73 (Ar-CO<sub>2</sub>); 163,53 (C-4'); 131,66 (C-2' y C-6'); 122,14 (C-1'); 113,65 (C-3' y C-5'); 71,74 (C-22); 66,05 (C-23); 57,39 (C-5); 56,15 (C-14); 55,42 (C-9); 53,31 (C-17); 52,79 (C-17); 46,46 (C-7); 43,38 (C-13); 41,14 (C-10); 40,23 (C-20); 39,23 (C-12); 37,97 (C-1); 37,92 (C-8); 37,29 (C-2); 36,90 (C-4); 27,36 (C-16); 24,03 (C-15); 21,58 (C-11); 12,87 (C-21); 12,50 (C-19); 11,77 (C-18). EMAR-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>: 511,3054 [M + H]<sup>+</sup>; encontrado 511,3071 [M + H]<sup>+</sup>.

### 7.5.8 Síntesis de 23-(4-fluoro) benzoato de 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39d)

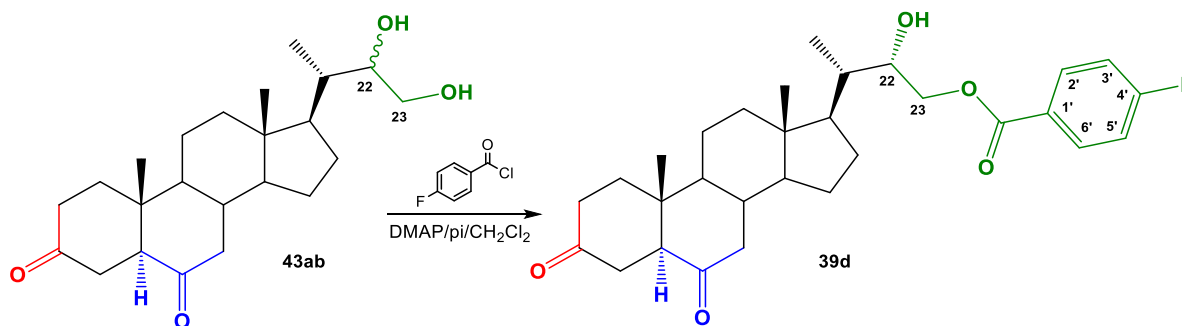


Figura 27. Obtención del compuesto **39d** a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica **43a/43b**.

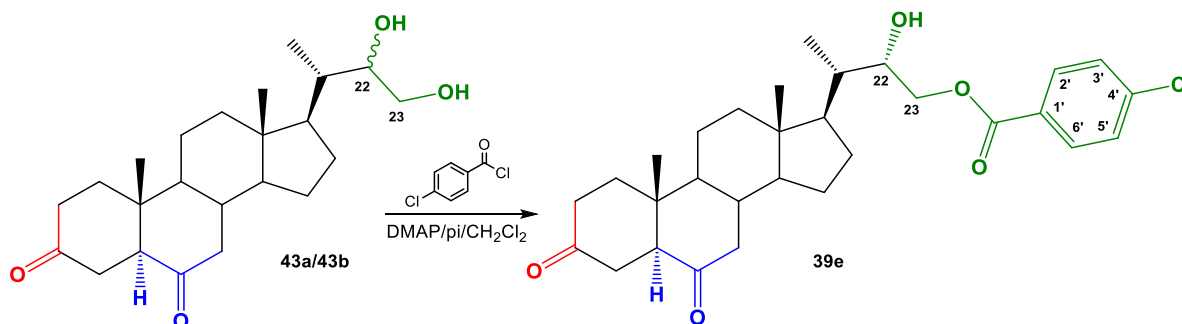
Se disolvieron 160,6 [mg] (0,43 [mmol]) de la mezcla **43a/43b** y 50 [mg] de DMAP en 10 [mL] de piridina a una temperatura bajo 10 [°C] en un baño de hielo-agua con agitación constante. Se agregaron por goteo 160 [ $\mu$ L] (1,35 [mmol], densidad: 1,34 [g/mL]) de cloruro de *p*-fluorobenzoílo (**44d**) manteniendo la reacción bajo las mismas condiciones. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, el tiempo total de la reacción fueron 4 [h].

Una vez finalizada la reacción, se agregaron 3 [mL] de agua caliente. Luego de 20 [min] adicionales de agitación la muestra fue extraída con AcOEt (50 [mL]). Las fases fueron separadas realizando lavados con agua destilada saturada en NaHCO<sub>3</sub> (30 [mL]) y agua (2 x 30 [mL]).

La fase orgánica fue secada sobre MgSO<sub>4</sub> anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto de reacción se diluyó en 2,0 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con polaridad creciente (1,00:0  $\rightarrow$  0,65:0,35). Se separó un sólido incoloro identificado como **39d** (49,6 [mg], 23,3%). P.f. = 189,3-190,1 [°C]. IR<sub>vmax</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3505 (O-H); 2967 (CH<sub>3</sub>-); 2867 (CH<sub>2</sub>-); 1716 (C=O); 1600 (C=C); 1508 (C=C); 1455 (CH<sub>2</sub>-); 1380 (CH<sub>3</sub>-); 1287 y 1071 (C-O); 768 (Ar-H). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8,06 (2H, dd, *J* = 8,7 y 5,4 Hz, H-2' y H-6'); 7,12 (2H, t, *J* = 8,7 Hz, H-3' y H-5'); 4,47 (1H, dd, *J* = 11,4 y 1,9 Hz, H-23a); 4,18 (1H, dd, *J* = 11,3 y 9,1 Hz, H-23b); 4,05-4,02 (1H, m, H-22); 2,62-2,53 (2H, m, H-5 y H-2); 2,00 (1H, t, *J* = 12,7 Hz, H-7 $\beta$ ); 1,17 (1H, ddd, *J* = 12,1, 11,5 y 5,8 Hz, H-15); 1,05 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, H-21); 0,951 (3H, s, H-19); 0,723 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 211,18 (C-3); 208,88 (C-6); 166,01 (Ar-CO<sub>2</sub>); 165,89 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 255,0 Hz, C-4'); 132,20 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 9,3 Hz, C-2' y C-6'); 126,05 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2,7 Hz, C-1'); 115,61 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 22,0 Hz, C-3' y C-5'); 71,69 (C-22); 66,45 (C-23); 57,2 (C-5); 56,17 (C-14); 53,33 (C-9); 52,82 (C-17); 46,47 (C-7); 43,41 (C-13); 41,15 (C-10); 40,35 (C-20); 39,25 (C-12); 37,99 (C-1); 37,93 (C-8); 37,31

(C-2); 36,91 (C-4); 27,37 (C-16); 24,04 (C-15); 21,60 (C-11); 12,87 (C-21); 12,52 (C-19); 11,79 (C-18). EMAR-ESI (modo positivo):  $m/z$  calculado para  $C_{30}H_{39}FO_5$ : 499,2854  $[M + H]^+$ ; encontrado 499,2839  $[M + H]^+$ .

#### 7.5.9 Síntesis de 23-(4-cloro) benzoato de 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39e)



**Figura 28.** Obtención del compuesto **39e** a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica **43a/43b**.

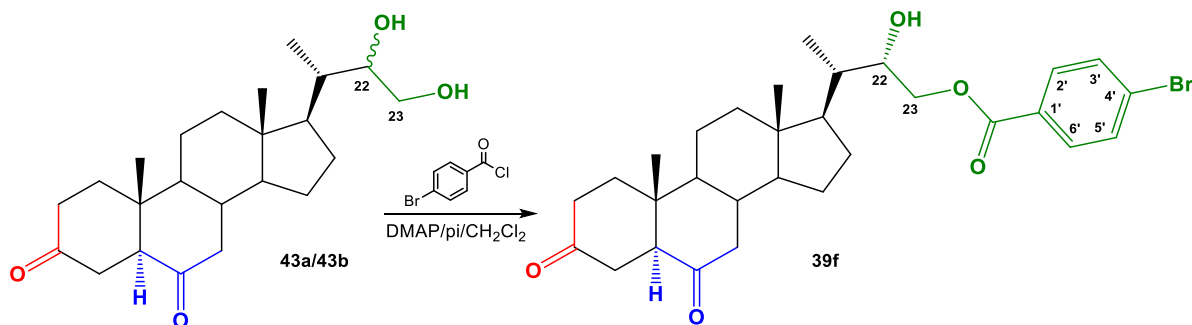
Se disolvieron 120,0 [mg] (0,32 [mmol]) de la mezcla **43a/43b** y 35 [mg] de DMAP en 10 [mL] de piridina a una temperatura bajo 10 [°C] en un baño de hielo-agua con agitación constante. Se agregaron por goteo 485 [ $\mu$ L] (1,28 [mmol], densidad: 1,36 [g/mL]) de cloruro de *p*-clorobenzoilo (**44e**) manteniendo la reacción bajo las mismas condiciones. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, el tiempo total de la reacción fueron 4 [h].

Una vez finalizada la reacción, se agregaron 3 [mL] de agua caliente. Luego de 20 [min] adicionales de agitación la muestra fue extraída con AcOEt (50 [mL]). Las fases fueron separadas realizando lavados con agua destilada saturada en  $NaHCO_3$  (30 [mL]) y agua (2 x 30 [mL]).

La fase orgánica fue secada sobre  $MgSO_4$  anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto de reacción se diluyó en 2,0 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con polaridad creciente (1,00:0  $\rightarrow$  0,65:0,35) Se separó un sólido incoloro identificado como **39d** (32,7 [mg], 19,9%). P.f. = 196,9-198,8 [°C].  $IR_{vmax}$  (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3466 (O-H); 2970 ( $CH_3$ -); 2869 ( $CH_2$ -); 1709 (C=O); 1596 (C=C); 1487 ( $CH_2$ -); 1281 y 1016 (C-O); 763 (Ar-H).  $^1H$  RMN (400,1 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 8,00 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz, H-2' y H-6'); 7,45 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz, H-3' y H-5'); 4,50 (1H, dd,  $J = 11,6$  y 2,1 Hz, H-23a); 4,20 (1H, dd,  $J = 11,6$  y 9,2 Hz, H-23b); 4,07 (1H, ddd,  $J = 9,1$ , 3,8 y 2,1 Hz, H-22); 2,68-2,57 (2H, m, H-5 y H-2); 2,04 (1H, t,  $J = 12,8$  Hz, H-7 $\beta$ ); 1,20 (1H, ddd,  $J = 12,5$ , 11,7 y 5,8 Hz, H-15); 1,08 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21); 0,985 (3H, s, H-19); 0,756 (3H, s, H-18).  $^{13}C$  RMN (100,6 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 211,19 (C-3); 208,88 (C-6); 166,12 (Ar-CO<sub>2</sub>); 139,70 (C-4'); 131,01

(C-2' y C-6'); 128,25 (C-3' y C-5'); 128,25 (C-1'); 71,66 (C-22); 66,55 (C-23); 57,43 (C-5); 56,18 (C-14); 53,34 (C-9); 52,83 (C-17); 46,48 (C-7); 43,41 (C-13); 41,16 (C-10); 40,38 (C-20); 39,26 (C-12); 38,00 (C-1); 37,93 (C-8); 37,31 (C-2); 36,92 (C-4); 27,38 (C-16); 24,04 (C-15); 21,60 (C-11); 12,87 (C-21); 12,52 (C-19); 11,80 (C-18). EMAR-ESI (modo positivo): m/z calculado para  $C_{30}H_{39}ClO_5$ : 515,2559 [M + H]<sup>+</sup>; encontrado 515,2538 [M + H]<sup>+</sup>.

#### 7.5.10 Síntesis de 23-(4-bromo) benzoato de 22(S)-hidroxi-3,6-dioxo-24-nor-5 $\alpha$ -colano (39f)



**Figura 29.** Obtención del compuesto **39f** a través de la reacción de benzoilación de la mezcla epimérica **43a/43b**.

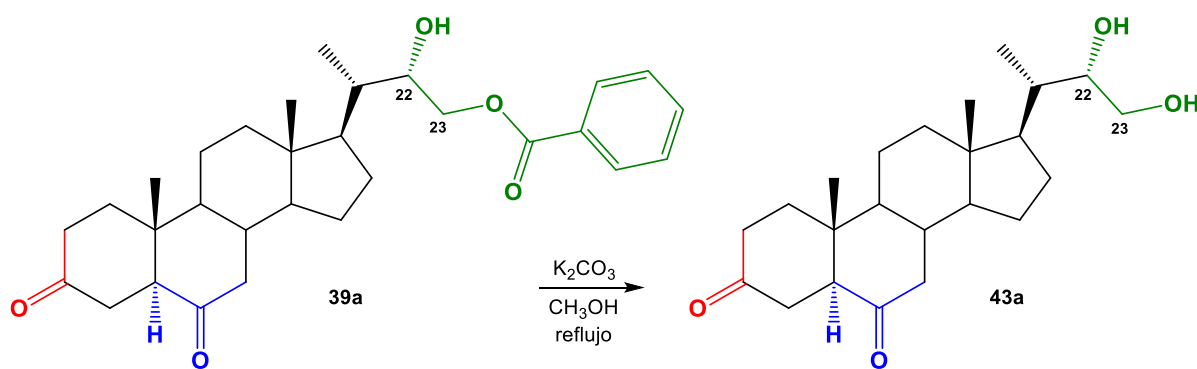
Se disolvieron 206,0 [mg] (0,55 [mmol]) de la mezcla **43ab** y 62,8 [mg] de DMAP en 10 [mL] de piridina a una temperatura bajo 10 [°C] en un baño de hielo-agua con agitación constante. Se agregaron por goteo 921 [mg] (1,65 [mmol]) de cloruro de *p*-bromobenzoilo (**44f**) manteniendo la reacción bajo las mismas condiciones. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, el tiempo total de la reacción fueron 3 [h].

Una vez finalizada la reacción, se agregaron 3 [mL] de agua caliente. Luego de 20 [min] adicionales de agitación la muestra fue extraída con AcOEt (50 [mL]). Las fases fueron separadas realizando lavados con agua destilada saturada en  $NaHCO_3$  (30 [mL]) y agua (2 x 30 [mL]).

La fase orgánica fue secada sobre  $MgSO_4$  anh., se filtró y el solvente se evaporó completamente en rotavapor. El producto de reacción se diluyó en 2,0 [mL] de DCM y fue mezclado con Sílicagel Merck 60 (0,032-0,063 [mm]) para luego ser separado por C.C. utilizando una mezcla de Hexano:AcOEt con polaridad creciente (1,00:0  $\rightarrow$  0,62:0,38). Se separó un sólido incoloro identificado como **39f** (45,5 [mg], 14,9%). P.f. = 206,1-208,0 [°C].  $IR_{vmax}$  (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3482 (O-H); 2957 ( $CH_3$ -); 2890 ( $CH_2$ -); 1722 (C=O); 1690 (C=O); 1591 (C=C); 1462 ( $CH_2$ -); 1398 ( $CH_3$ -); 1272 y 1071 (C-O); 760 (Ar-H).  $^1H$  RMN (400,1 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7,91 (2H, d,  $J$  = 8,5 Hz, H-2' y H-6'); 7,59 (2H, d,  $J$  = 8,5 Hz, H-3' y H-5'); 4,48 (1H, dd,  $J$  = 11,7 y 1,9 Hz, H-23a); 4,19 (1H, dd,  $J$  = 11,7 y 9,1 Hz, H-23b); 4,04 (1H, ddd,  $J$  = 8,9, 3,4 y 2,5 Hz, H-22); 2,63-2,55 (2H, m, H-5 y H-2); 2,01 (1H, t,  $J$  = 12,5 Hz, H-7 $\beta$ );

1,18 (1H, ddd,  $J = 12,1, 11,6$  y  $5,8$  Hz, H-15); 1,05 (3H, d,  $J = 6,9$  Hz, H-21); 0,959 (3H, s, H-19); 0,730 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 211,19 (C-3); 208,88 (C-6); 166,28 (Ar-CO<sub>2</sub>); 131,81 (C-2' y C-6'); 131,14 (C-3' y C-5'); 128,71 (C-1'); 128,41 (C-4'); 71,68 (C-22); 66,58 (C-23); 57,44 (C-5); 56,19 (C-14); 53,36 (C-9); 52,84 (C-17); 46,49 (C-7); 43,43 (C-13); 41,17 (C-10); 40,39 (C-20); 39,27 (C-12); 38,02 (C-1); 37,94 (C-8); 37,32 (C-2); 36,93 (C-4); 27,39 (C-16); 24,04 (C-15); 21,61 (C-11); 12,88 (C-21); 12,54 (C-19); 11,81 (C-18). EMAR-ESI (modo positivo):  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{BrO}_5$ : 561,2038  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; encontrado 561,1994  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

#### 7.5.11 Síntesis de 22(S),23-dihidroxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (43a) desde 39a



**Figura 30.** Obtención del diastereoisómero **43a** a través de hidrólisis alcalina.

A una solución de **39a** (60 [mg], 0,13 [mmol]) con una mezcla de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (20 [mL]) y agua (10 [mL]) se agregó  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (63,2 [mg], 0,46 [mmol]) y se llevó a temperatura de reflujo asistida de agitación constante. El avance y término de la reacción se monitoreó por CCF, con un tiempo total de 3 [h].

Una vez finalizada la reacción se evaporó el solvente, luego se le adicionó una solución de HCl (5%, 50 [mL]) hasta la formación de un sólido blanco en suspensión el cual se extrajo con AcOEt (2 x 60 [mL]). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 [mL]), se secó con  $\text{MgSO}_4$  anh. y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. Dado a la presencia de Ph-COOH, el crudo obtenido se mezcló con una mezcla AcOEt:Hexano (7:3) asistido con temperatura para promover la saturación de una de las fases en solución, posteriormente se evaporó parte de los solventes presentes y luego se traspasó el remanente a otro balón de 100 [mL] con embudo y algodón, separando el glicol de las impurezas o productos secundarios presentes. Finalmente, el sólido retenido en el embudo se disolvió con DCM (3 x 10 [mL]) en otro balón de 100 [mL] para luego ser evaporado hasta sequedad. Se obtuvo

el compuesto **43a** (17 [mg]), 36,2%) como un sólido incoloro P.f. = 226,3-227,2[°C] (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR<sub>vmax</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3510 (O-H); 2968 (CH<sub>3</sub>-); 2935 (CH<sub>2</sub>-); 2865 (CH-); 1705 (C=O); 1428 (CH<sub>2</sub>-); 1381 (CH<sub>3</sub>-); 1264 y 1064 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 3,81 (1H, dt, *J* = 9,6 y 3,1 Hz, H-22); 3,65 (1H, dd, *J* = 11,3 y 2,3 Hz, H-23a); 3,54 (1H, dd, *J* = 11,3 y 9,6 Hz, H-23b); 2,63-2,54 (2H, m, H-5 y H-2); 2,00 (1H, t, *J* = 12,4 Hz, H-7β); 0,965 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-21); 0,956 (3H, s, H-19); 0,706 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 211,24 (C-3); 208,92 (C-6); 73,82 (C-22); 66,48 (C-23); 57,55 (C-5); 56,20 (C-14); 53,43 (C-9); 52,81 (C-17); 46,58 (C-7); 43,44 (C-13); 41,22 (C-10); 40,01 (C-20); 39,31 (C-12); 38,10 (C-1); 38,00 (C-8); 37,37 (C-2); 36,99 (C-4); 27,39 (C-16); 24,11 (C-15); 21,67 (C-11); 13,09 (C-21); 12,58 (C-19); 11,78 (C-18). EMAR-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>: 377,2686 [M + H]<sup>+</sup>; encontrado 377,2672 [M + H]<sup>+</sup>.

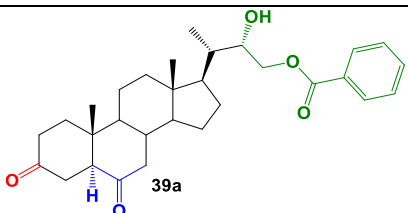



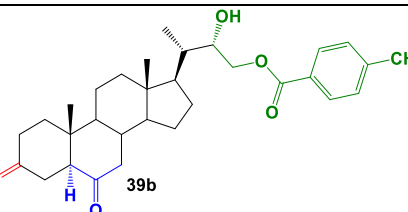



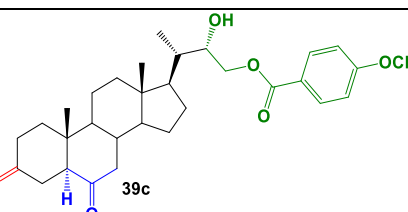
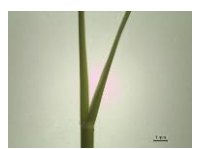
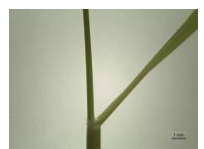
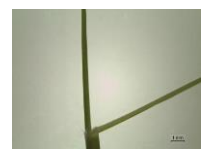
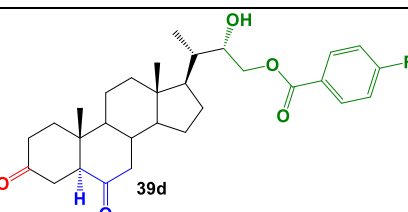



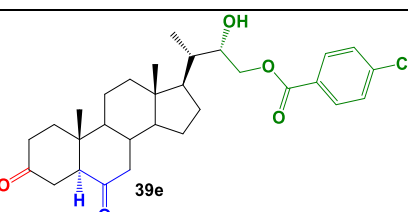



## 7.6 Evaluaciones biológicas

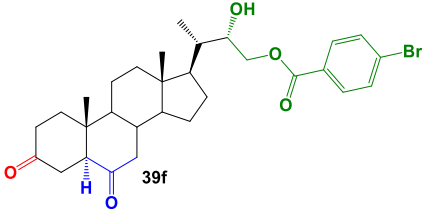
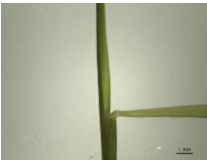
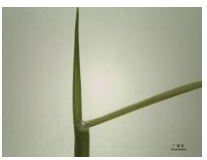
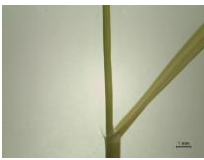
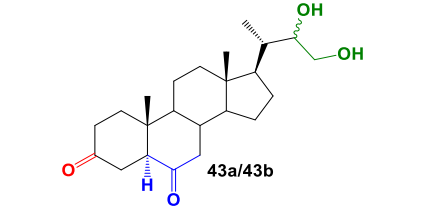
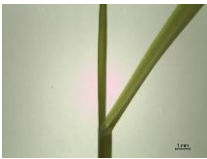


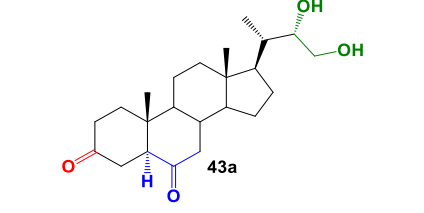

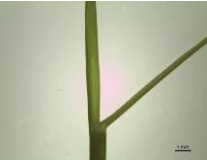
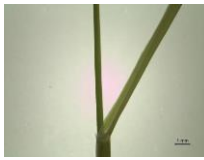
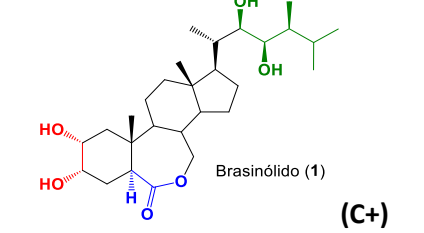

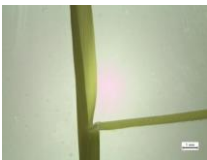


Como se indicó en la parte de Metodología, la actividad promotora del crecimiento por parte de los compuestos sintetizados se evaluó utilizando dos bioensayos: Inclínación de la Lámina de Arroz (ILA) [46] y el Segundo Entrenado de Frijol [93].

### 7.6.1 Ensayo de Inclínación de la Lámina de Arroz (ILA)

Para el bioensayo ILA, después de remojar las semillas de arroz (*Oryza sativa*) en ADE durante 48 [h], las semillas fueron esterilizadas y cultivadas a 22 [°C] en una cámara de cultivo de plantas bajo un fotoperiodo de 16/8 [h] de claro/oscuras, respectivamente, en macetas con tierra y abundante agua. Las plántulas de arroz se cultivaron hasta el momento en que su crecimiento fuera homogéneo y presentaron el segundo entrenado en la lámina principal. Se cortaron 5 [cm] de segmento para posteriormente incubar seis segmentos por tratamiento con placa de Petri con 60 [mL] de ADE y una cantidad determinada ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M) de los análogos de BRs en una solución con agua y DMSO. Después de 2 días, se realizó un registro fotográfico con una cámara digital y se registró la medición del ángulo entre la lámina y la vaina del segundo entrenado con un transportador. Los resultados presentados en la Tabla 1 corresponden al ángulo promedio de apertura  $\pm$  desviación estándar, producto de seis réplicas independientes para las concentraciones estudiadas ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M).

**Tabla 1.** Efecto de los análogos de BRs **39a-39f**, mezcla **43a/43b** y **43a** en la apertura del ángulo (°) en el ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA). Letras representan el nivel de significancia a partir de la prueba t de Student ( $p < 0.05$ )

<b>Apertura del ángulo (°) ILA</b>			
<b>Compuesto</b>	<b>1x10<sup>-8</sup> M</b>	<b>1x10<sup>-7</sup> M</b>	<b>1x10<sup>-6</sup> M</b>
 <p><b>39a</b></p>	 $19 \pm 4,8^e$	 -	 -
 <p><b>39b</b></p>	 $19 \pm 3,2^e$	 -	 $32 \pm 4,2^c$
 <p><b>39c</b></p>	 -	 $28 \pm 2,6^e$	 $54 \pm 8,4^b$
 <p><b>39d</b></p>	 $38 \pm 2,6^c$	 $34 \pm 2,7^d$	 -
 <p><b>39e</b></p>	 $32 \pm 4,2^d$	 $31 \pm 8,2^{de}$	 -

 <p>39f</p>			
$75 \pm 2,0^b$	$49 \pm 4,5^b$	$33 \pm 2,6^c$	
 <p>43a/43b</p>			
$17 \pm 2,7^e$	$42 \pm 2,5^c$	-	
 <p>43a</p>			
$26 \pm 4,1^d$	$38 \pm 4,9^c$	$13 \pm 4,1^d$	
 <p>Brasinólido (1)</p> <p>(C+)</p>			
$81 \pm 7,1^a$	$88 \pm 4,8^a$	$90 \pm 7,5^a$	
<p>H<sub>2</sub>O (C-)</p>			
$16 \pm 2,0$			

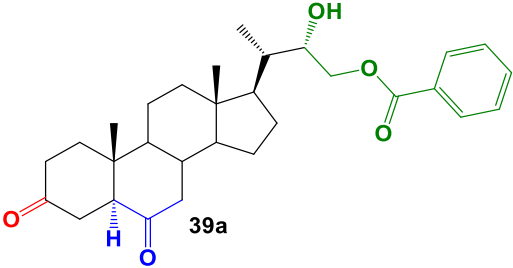

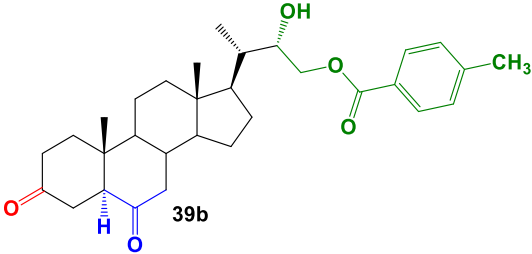

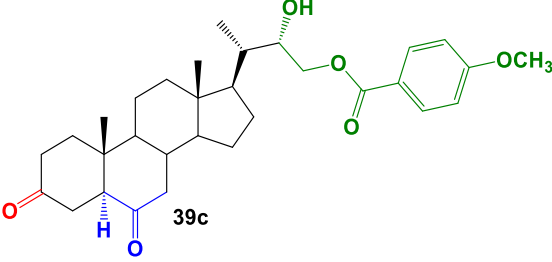

(-): no presenta actividad.

### 7.6.2 Ensayo del Segundo Entrenado de Frijol (SEF)

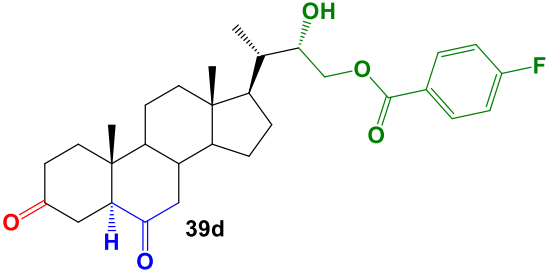

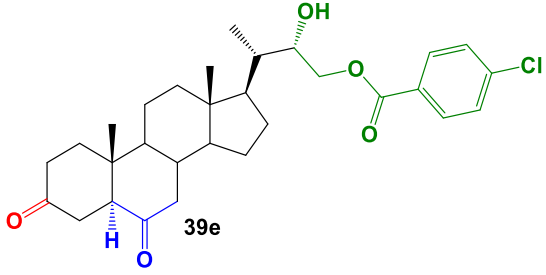

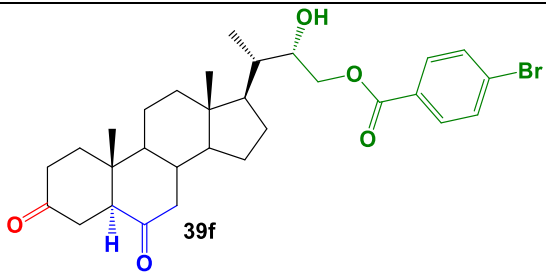

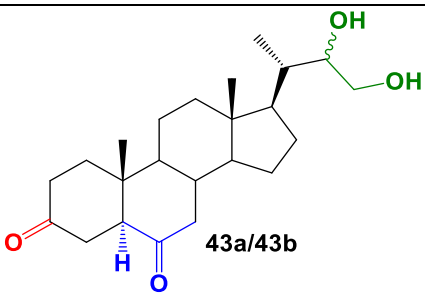

Para el bioensayo SEF, se germinaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., var. Pinto) y fueron traspasadas a macetas con perlita/vermiculita y sustrato. Las macetas se pusieron en una cámara de cultivo o cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 [h] (claro/oscuras, respectivamente), con luz de intensidad de 48 [W/m<sup>2</sup>] y temperatura de 22 [°C]. Fueron tratadas grupos de ocho plántulas de frijol de 10 días de edad con segundos entrenados de 1-2 [mm] de largo, a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M (0,01 μM), disueltos en DMSO y agua, se aplicaron una vez retirada la bráctea de la base del segundo entrenado. Al momento de aplicar, se agregaron 5 [μL]

de TWEEN 20 (AMRESKO<sup>®</sup>) por cada 5 [μL] de solución con BRs para asegurar una buena adhesión a la matriz vegetal. Las plantas de control negativo se trataron solo con agua destilada estéril (ADE). Las medidas se realizaron después de 5 días. La diferencia entre la longitud del segundo entrenudo de las plantas tratadas y de control fue usada como una medida de la actividad biológica [94,103]. La medida fue informada como el promedio de la prolongación exhibida (en [mm]) ± la desviación estándar. A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el bioensayo SEF (Tabla 2).

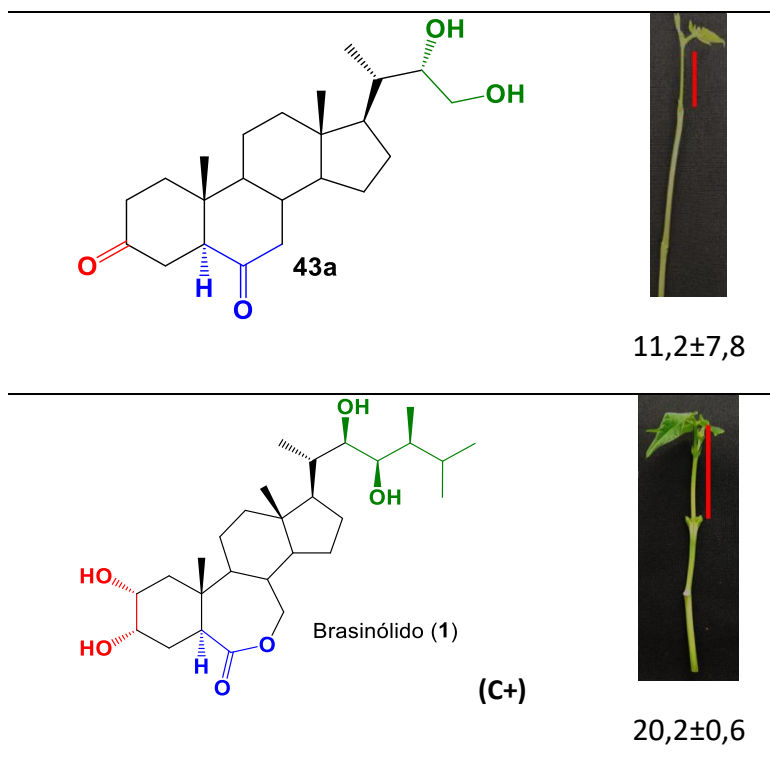
**Tabla 2.** Efecto de los análogos de BRs **39a-39f**, mezcla **43a/43b** y **43a** en la elongación del segundo entrenudo en el ensayo del Segundo Entrenudo de Frijol (SEF).

Compuesto	Elongación ([mm]) ± DS
 <p><b>39a</b></p>	 4,4±1,9
 <p><b>39b</b></p>	 2,9±1,9
 <p><b>39c</b></p>	 9,8±1,8

---

 <p>39d</p>	
	5,5±1,8
 <p>39e</p>	
	8,5±2,8
 <p>39f</p>	
	10,8±2,7
 <p>43a/43b</p>	
	9,6±6,8

---



## 7.7 Estudios de Acoplamiento Molecular

Para proponer un modo de acción y explicar los datos de actividad biológica obtenidos, se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular de la activación inducida por brasinólido (**1**) sobre una estructura cristalina del complejo BRI1-BAK1 (PDB 4M7E) mediante el uso del software Glide. El acoplamiento proteína-ligando es un método eficaz utilizado habitualmente para predecir la forma y afinidad de acoplamiento de un ligando en un sitio de unión a una proteína [96].

Por lo tanto, se acoplaron todos los derivados de brasinólido (**1**) en el bolsillo hidrofóbico de la superficie de unión a brasinólido (**1**) para determinar el patrón de unión probable, las interacciones clave dentro del sitio activo, así como la aproximación de la energía libre de unión de cada uno de ellos. Para validar el procedimiento de acoplamiento, se retiró manualmente el inhibidor cristalizado y se volvió a acoplar en el sitio activo utilizando el mismo protocolo, incluidos los parámetros de cuadrícula que no fueron modificados durante el proceso de simulación. Esto se hizo con la finalidad de asegurar que el inhibidor se une exactamente a la hendidura del sitio activo. A continuación, el complejo reacomodado se superpuso al co-cristalizado de referencia y se calculó la desviación cuadrática media (RMSD), obteniéndose un valor medio de todas las conformaciones obtenidas de 0,42 [Å]. Posteriormente, se seleccionaron un número de poses a partir de un conjunto

generado por el docking basándose tanto en los valores de RMSD y los valores de puntuación de poses del propio docking. El RMSD del ligando indica que tan estable es el ligando respecto a la proteína y su bolsillo de unión, por lo que se seleccionó como criterio para evaluar la estabilidad de los sistemas unidos al ligando.

**Tabla 3.** Valores de energía mínima (afinidad de unión) entre los nuevos análogos de BRs, brasinólido (**1**) y el complejo receptor BRI1 junto con el complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1.

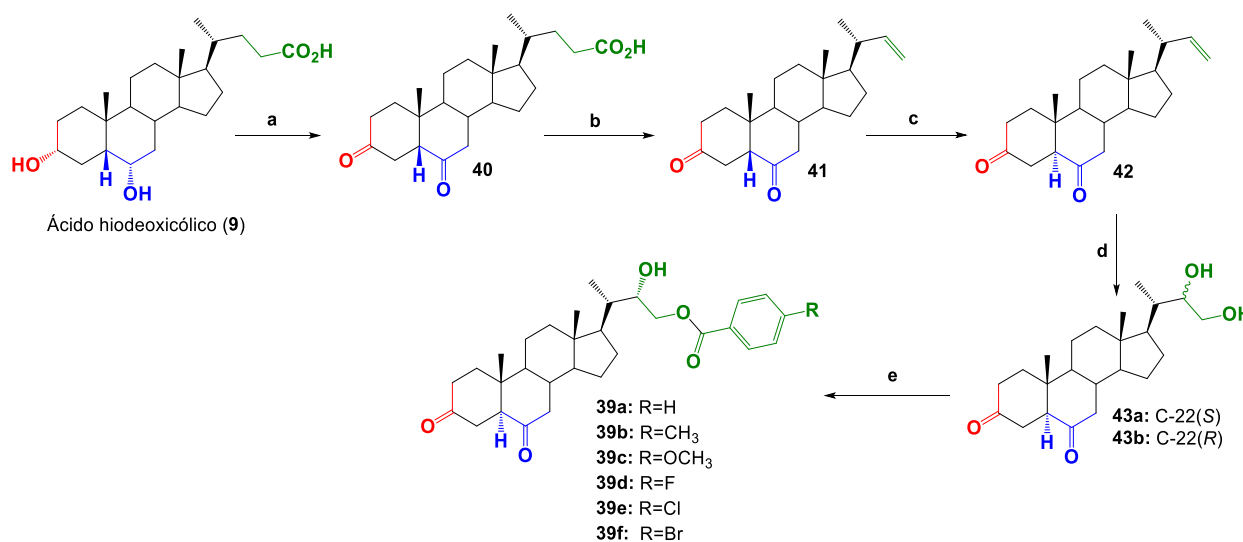
Ligando	$\Delta G$ BRI1 [kcal·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G$ BRI1-BAK1 [kcal·mol <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	-10,7	-16,1
<b>39a</b>	-10,2	-12,5
<b>39b</b>	-8,7	-12,5
<b>39c</b>	-7,9	-12,4
<b>39d</b>	-10	-13,1
<b>39e</b>	-10,7	-12,7
<b>39f</b>	-10,6	-13,2
<b>43a</b>	-8,4	-12,1

## 8 Resultados y Discusiones

A continuación, se describen en tres apartados los resultados y discusiones sobre la síntesis química, evaluación biológica y estudios *“in-silico”* sobre los intermediarios y análogos **39-43**.

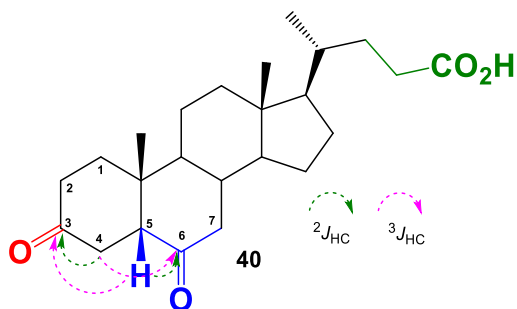
### 8.1 Síntesis químicas

La síntesis de los nuevos análogos de brasinoesteroides **39a-39f**, se llevó a cabo siguiendo la ruta indicada en el Esquema 4.



**Esquema 4.** Secuencia de síntesis para la obtención de nuevos análogos de BRs. Condiciones: **a.** oxidación de Jones ( $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), 2h.; **b.**  $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}/\text{C}_6\text{H}_6$ , 200°C, refl.; **c.** HCl 2.5%,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; **d.** dihidroxilación de Upjohn ( $\text{OsO}_4/\text{NMMO}/\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), 24h.; **e.** 4-R-PhCOCl/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}/\text{DMAP}$ , 0-5°C, 6h., separación por C.C y posterior cristalización.

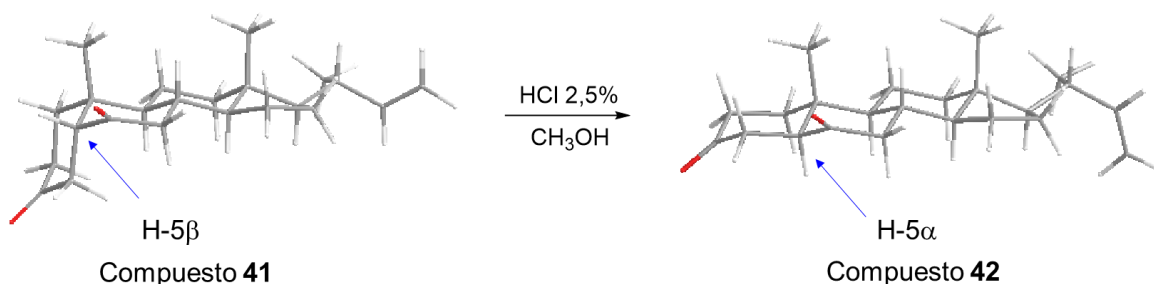
De esta forma el ácido hiodeoxicólico (**9**) fue oxidado por el reactivo de Jones, según procedimiento descrito para otros ácidos biliares [67], obteniéndose el derivado dioxidado **40** con un 97% de rendimiento. La presencia de ambos grupos carbonilos fue determinada desde el espectro  $^{13}\text{C}$  RMN, donde se observaron señales a  $\delta_{\text{C}} = 210,92$  y  $208,79$  [ppm]. La asignación de estas señales fue establecida principalmente por técnicas espectroscópicas combinadas de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D HSQC y 2D HMBC. De esta forma la señal observada a  $\delta_{\text{H}} = 2,64$  [ppm] (1H, dd,  $J = 14,3$  y  $13,7$  [Hz]) en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN que fue asignada al hidrógeno  $4\alpha$ , mostró correlaciones heteronucleares a  $^2J_{\text{HC}}$  con el C-6 y  $^3J_{\text{HC}}$  con el carbono C-3 (Figura 31). Otras correlaciones heteronucleares pueden encontrarse en el Anexo 1.



**Figura 31.** Estructura del compuesto **40** y principales correlaciones 2D HMBC que confirman las posiciones de los grupos carbonilo en C-3 y C-6.

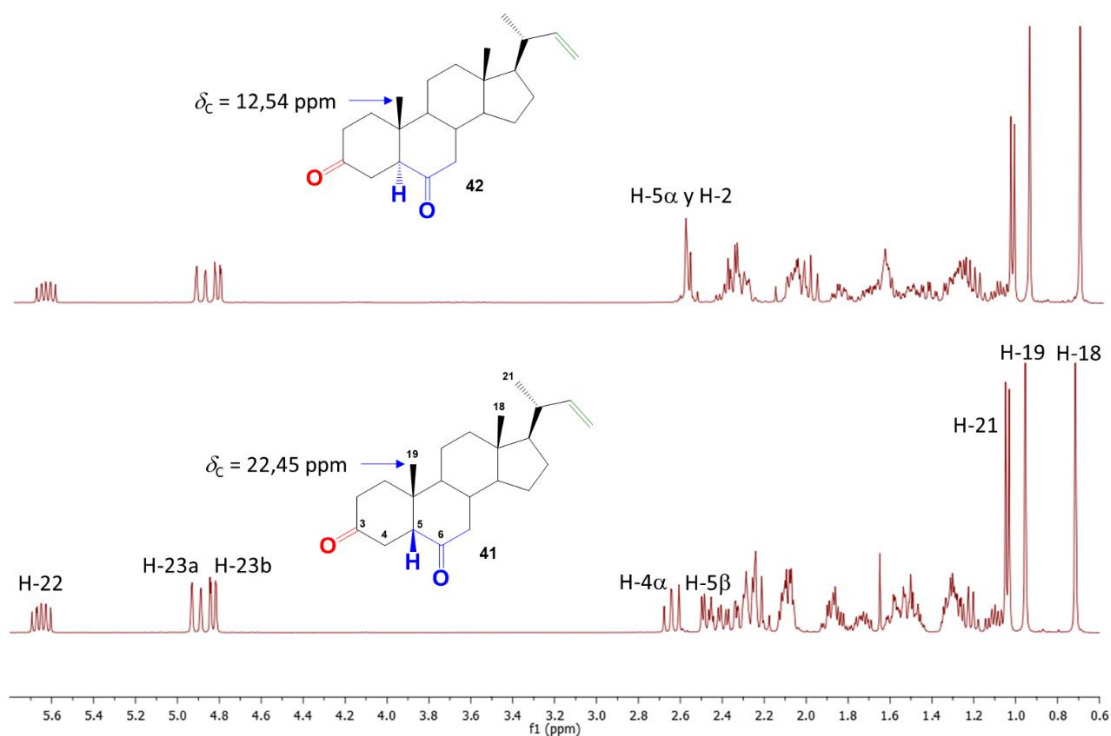
Posteriormente, la reacción de descarboxilación del ácido **40** con el sistema  $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2/\text{C}_6\text{H}_6$  bajo condiciones de reflujo [62,64,88,89], produjo el alqueno **41** con un 42,7% de rendimiento. La confirmación de la estructura fue establecida por la observación de las señales vinílicas en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN a  $\delta_{\text{H}} = 5,65$  [ppm] (1H, ddd,  $J = 17,2; 10,1$  y  $8,5$  [Hz]);  $4,91$  [ppm] (1H, dd,  $J = 17,2$  y  $1,9$  [Hz]) y  $4,83$  [ppm] (1H, dd,  $J = 10,1$  y  $1,9$  [Hz]), las cuales fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23a y H-23b respectivamente. Adicionalmente, la presencia de las señales a  $\delta_{\text{C}} = 144,69$  y  $111,96$  [ppm] en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, fueron asignadas a los carbonos C-22 y C-23, respectivamente. Las propiedades físicas y datos espectroscópicos de IR y RMN fueron consistentes con los reportados para este compuesto [58,64,98].

El siguiente paso correspondió a uno de los más importantes desde el punto de vista estructural y conformacional. Este consistió en la reacción de isomerización del compuesto **41**, catalizada por el sistema  $\text{HCl}/\text{MeOH}$  al 2,5% [58,64,67,98] para formar el compuesto **42** (Figura 32). Esta isomerización es obligatoria para todos los nuevos análogos formados, debido a que el brasinólido (**1**) y la mayoría de sus análogos estructurales naturales presentan fusión de tipo “*trans*” entre los anillos A y B (esteroides de la serie  $5\alpha$ ). Esta conformación se ve reflejada en una mayor actividad biológica asociada a la promoción del crecimiento en plantas [99,100]. La reacción de epimerización en la posición C-5 desde una orientación espacial  $5\beta$  hacia  $5\alpha$  se favorece debido a que las fusiones de anillos *trans* son, por lo general, más estables que las fusiones de anillos tipo *cis*. El análisis conformacional para esta reacción de epimerización se muestra en la Figura 32.



**Figura 32.** Reacción de isomerización del compuesto **41** catalizada por HCl, para obtener el compuesto **42**. Se observa el cambio experimentado por las conformaciones al pasar de una fusión *cis* de anillos A/B a fusión *trans*.

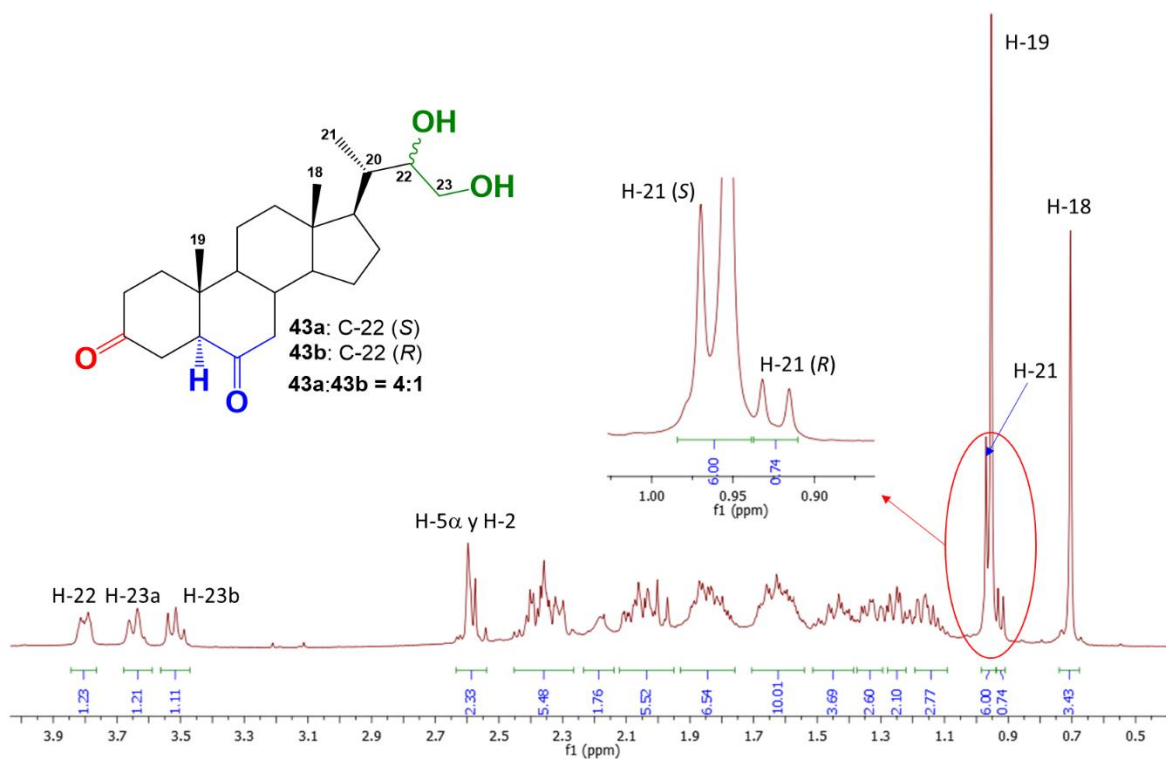
Por medio de esta reacción se obtuvo el compuesto **42** con un 94,0% de rendimiento. El cambio estructural al pasar del compuesto **41** al **42** fue evidenciado principalmente por espectroscopía de RMN. De esta forma, desde el espectro  $^1\text{H}$  RMN se observan diferencias importantes, las cuales son evidenciadas en las señales observadas a  $\delta_{\text{H}} = 2,64$  [ppm] (1H, dd,  $J = 14,7$  y  $13,2$  [Hz]) y  $\delta_{\text{H}} = 2,47$  [ppm] (1H, dd,  $J = 12,5$  y  $4,9$  [Hz]), asignadas a los hidrógenos H-4 $\alpha$  y H-5 $\beta$  respectivamente, para el compuesto **41** (Figura 33). Mientras que para el isómero **42** se observó una señal a  $\delta_{\text{H}} = 2,62$ - $2,54$  [ppm] (2H, m) asignada a los hidrógenos H-5 $\alpha$  y H-2 (Figura 33). Otro cambio importante fue evidenciado desde los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN entre ambos isómeros. De esta forma para el compuesto **41**, la señal observada a  $\delta_{\text{C}} = 22,45$  [ppm] 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* en el compuesto **42**, se ve evidenciado por un cambio significativo en el desplazamiento químico hacia campo alto con un  $\delta_{\text{C}} = 12,54$  [ppm], como se muestra en la Figura 33. Adicionalmente, la determinación estructural completa de ambos isómeros fue confirmada principalmente por los espectros de correlación 2D-HSQC y 2D-HMBC (Anexo 1).



**Figura 33.** Principales diferencias espectrales observadas de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN entre los isómeros **41** y **42**, para el cambio conformacional al pasar de una fusión cis de anillos A/B a fusión trans.

Posteriormente, la dihidroxilación del alqueno **42** por el método de Upjohn con  $\text{OsO}_4/\text{NMMO}$  produjo una mezcla de glicoles epiméricos **43a/43b** (C-22 *S/R*) con 64,3% de rendimiento. La obtención de la mezcla epimérica es un resultado esperado, dado a que esto fue observado cuando otros núcleos esteroidales con enlace doble en la posición C22-C23 (24-nor-colánicos-22-eno) fueron dihidroxilados con el mismo procedimiento [101]. Esta reacción es estereoselectiva, debido a que el epímero C-22(*S*) fue obtenido como el derivado mayoritario al igual que otros análogos con estructuras similares, los cuales fueron informados previamente [86,87,102]. Más recientemente se ha reportado la obtención de mezclas epiméricas de glicoles obtenidos por el método de hidroxilación de Upjohn® para esteroides de estructura similar, donde la reacción mantiene un patrón de estereoselectividad generando el epímero C-22(*S*), como el mayoritario [79,80,98]. La confirmación de la estructura se determinó desde la evidencia espectroscópica de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN. Donde en el espectro  $^1\text{H}$  RMN se observaron señales carbinólicas a  $\delta_{\text{H}} = 3,82\text{-}3,78$  [ppm] (1H, m) y 3,54-3,49 [ppm] (1H, m), que fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23a y H-23b, respectivamente. Mientras que desde el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, se observaron señales a  $\delta_{\text{C}} = 73,75$  y 66,42 [ppm], que fueron asignadas a los carbonos carbinólicos C-22 y C-23, respectivamente. La

confirmación de estas asignaciones se realizó desde los espectros combinados de  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT-135, 2D HSQC y 2D HMBC (Anexo 1). La proporción de los epímeros **43a/43b** (22S/22R) presentes en la mezcla fue determinada utilizando los datos espectroscópicos desde el espectro de  $^1\text{H}$  RMN considerando las señales dobletes observadas a  $\delta_{\text{H}} = 0,962$  [ppm] (3H, d,  $J = 6,6$  [Hz]) y  $0,923$  [ppm] (3H, d,  $J = 6,5$  [Hz]) asignadas a los hidrógenos de los grupos metilo de H-21 (epímero en C-22S) y H-21 (epímero C-22R), respectivamente (Figura 34). La razón de las integrales se calculó como **43a:43b** = 1,0:0,26 para estos hidrógenos, lo que indica que el componente mayoritario fue el epímero **43a** (22S) en una proporción aproximada de 4:1, como se indica en la Figura 34.



**Figura 34.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN y estructura de la mezcla de epímeros **43a** y **43b**, que indica los valores de integración para las señales de los hidrógenos H-21a y H-21b y razón de ambos diastereoisómeros en la mezcla.

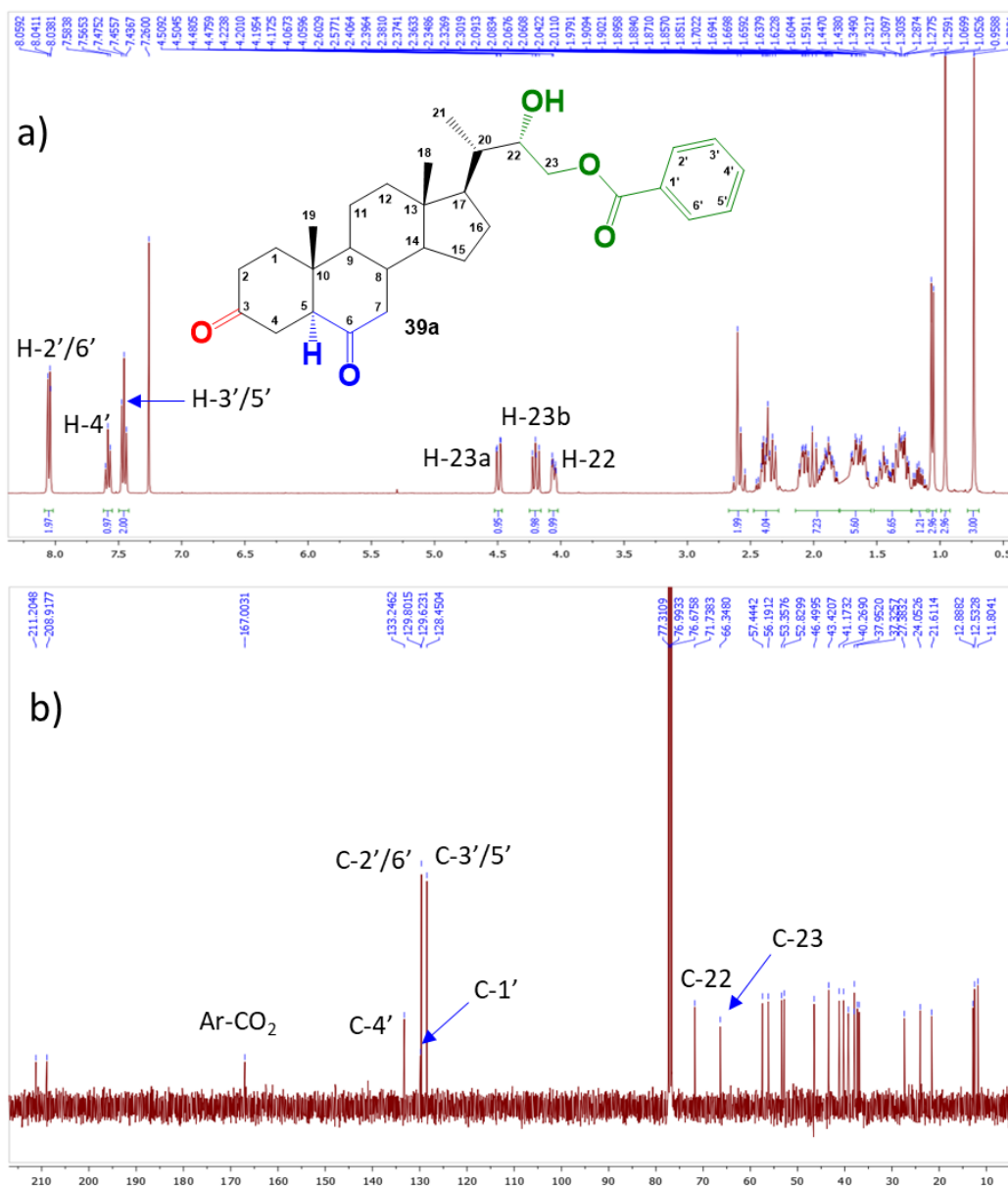
Luego, se intentó separar la mezcla **43a/43b** por C.C., posteriormente re-cristalización y finalmente HPLC, pero no fue posible, con lo cual se tomó la decisión de trabajar con la mezcla. Siendo así, el paso siguiente consistió en la reacción de benzoilación selectiva en la posición C-23 de la mezcla **43a/43b** con los correspondientes cloruros de benzoilos, de acuerdo con el procedimiento reportado [79,80]. De esta forma, los nuevos análogos de brasinoesteroides **39a-39f** (Esquema 4) se obtuvieron con rendimientos de 25,9%, 8,4%, 30,6%, 23,3%, 19,9% y 14,9% respectivamente. Las determinaciones estructurales para todos los nuevos análogos de BRs **39a-39f** se realizó

principalmente utilizando técnicas espectroscópicas combinadas de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN, 2D HSQC y 2D HMBC. A modo de ejemplo, se discutirá la determinación estructural para el análogo de BRs **39a**.

La principal evidencia espectroscópica de la incorporación de la función benzoato provino desde los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto **39a**, donde las señales observadas a  $\delta_{\text{H}} = 8,05$  [ppm] (2H, dd,  $J = 7,8$  y  $1,4$  [Hz]);  $7,58$  [ppm] (1H, t,  $J = 7,4$  [Hz]) y  $7,46$  [ppm] (2H, t,  $J = 7,8$  [Hz]), fueron asignadas a los hidrógenos aromáticos H-2'/H-6', H-4' y H-3'/H-5', respectivamente (Figura 35a). Mientras que desde el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, las señales observadas a  $\delta_{\text{C}} = 133,25$ ;  $129,80$ ;  $129,62$  y  $128,45$  [ppm], fueron asignados a los carbonos C-4', C-1', C-2'/C-6' y C-3'/C-5', respectivamente. Además de la señal observada a  $\delta_{\text{C}} = 167,00$  [ppm] asignada al grupo carbonilo del éster de benzoato (Ar-CO<sub>2</sub>) (Figura 35b).

La benzoilación en la posición C-23 fue establecida por varios factores, los que se describen a continuación:

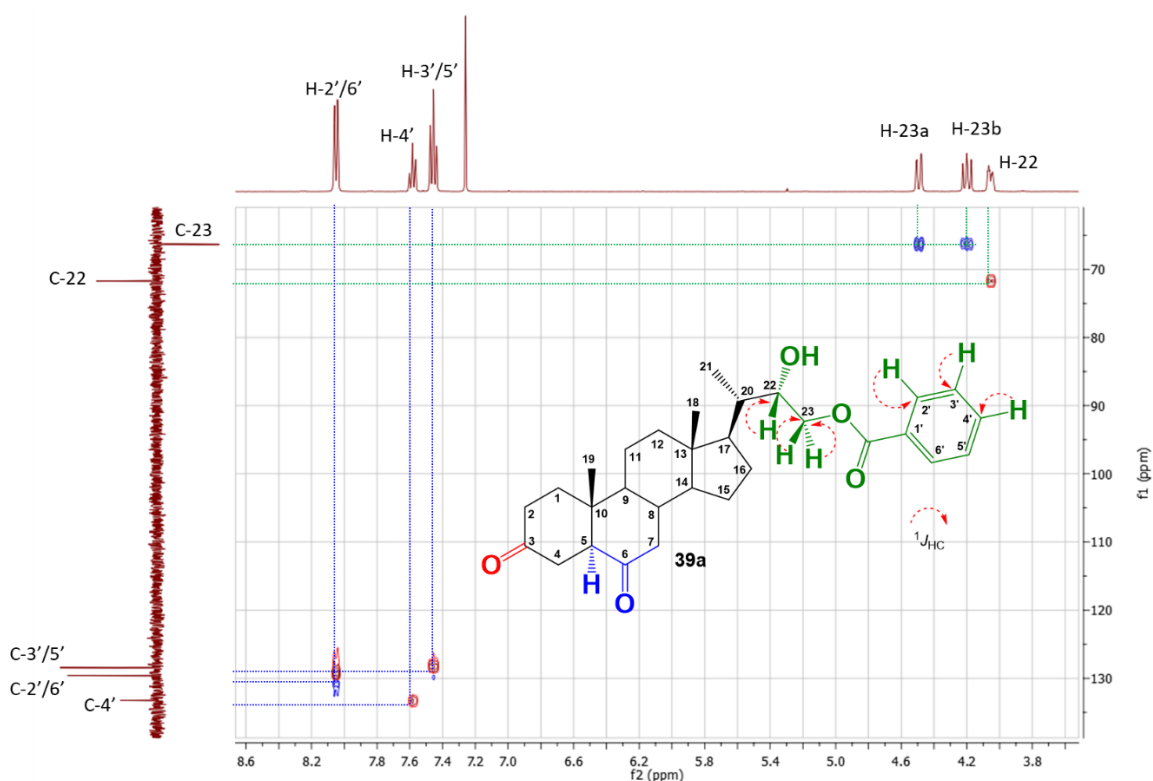
1. La diferencia de reactividad entre un alcohol secundario y uno primario, dado a la nucleofilia resultante por un menor efecto estérico para el alcohol primario. Este factor se reportó anteriormente para reacciones de benzoilaciones de esteroides con estructuras similares [79,80].
2. Se observa un desplazamiento químico a campo bajo de las señales asignadas a los hidrógenos H-23ab y H-22, donde en el compuesto **39a** fueron observadas a  $\delta_{\text{H}} = 4,49$  [ppm] (1H, dd,  $J = 11,5$  y  $1,9$  [Hz], H-23a);  $4,20$  [ppm] (1H, dd,  $J = 11,5$  y  $9,1$  [Hz], H-23b) y  $4,06$  [ppm] (1H, ddd,  $J = 9,1$ ;  $3,6$  y  $1,9$  [Hz], H-22), comparadas con el precursor (mezcla de glicoles **43a/43b**) donde estas señales fueron observadas a  $\delta_{\text{H}} = 3,82$ - $3,78$  [ppm] (1H, m, H-22);  $3,64$ - $3,61$  [ppm] (1H, m, H-23a) y  $3,54$ - $3,49$  [ppm] (1H, m, H-23b).
3. La confirmación de la selectividad en la posición C-23 fue establecida por técnicas combinadas de experimentos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT-135, 2D HSQC y 2D HMBC RMN.



**Figura 35.** a) Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del análogo de BRs **39a**, que muestra la presencia de las señales aromáticas H-2'/H-6', H-4' y H-3'/H-5'. b) Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN que muestra la presencia de las señales aromáticas para los carbonos C-4', C-1', C-2'/C-6' y C-3'/C-5', además de la señal del grupo éster (Ar-CO<sub>2</sub>) y los carbonos carbinólicos C-22 y C-23.

En cuanto a este último punto, y como se mencionó anteriormente, para el compuesto **39a** las señales observadas a  $\delta_{\text{H}} = 8,05$  [ppm] (2H, dd,  $J = 7,8$  y  $1,4$  [Hz]);  $7,58$  [ppm] (1H, t,  $J = 7,4$  [Hz]) y  $7,46$  [ppm] (2H, t,  $J = 7,8$  [Hz]), fueron asignadas a los hidrógenos aromáticos H-2'/H-6', H-4' y H-3'/H-5', respectivamente. Mientras que desde el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, las señales observadas a  $\delta_{\text{C}} = 133,25$ ;  $129,80$ ;  $129,62$  y  $128,45$  [ppm], fueron asignados a los carbonos C-4', C-1', C-2'/C-6' y C-3'/C-5', respectivamente.

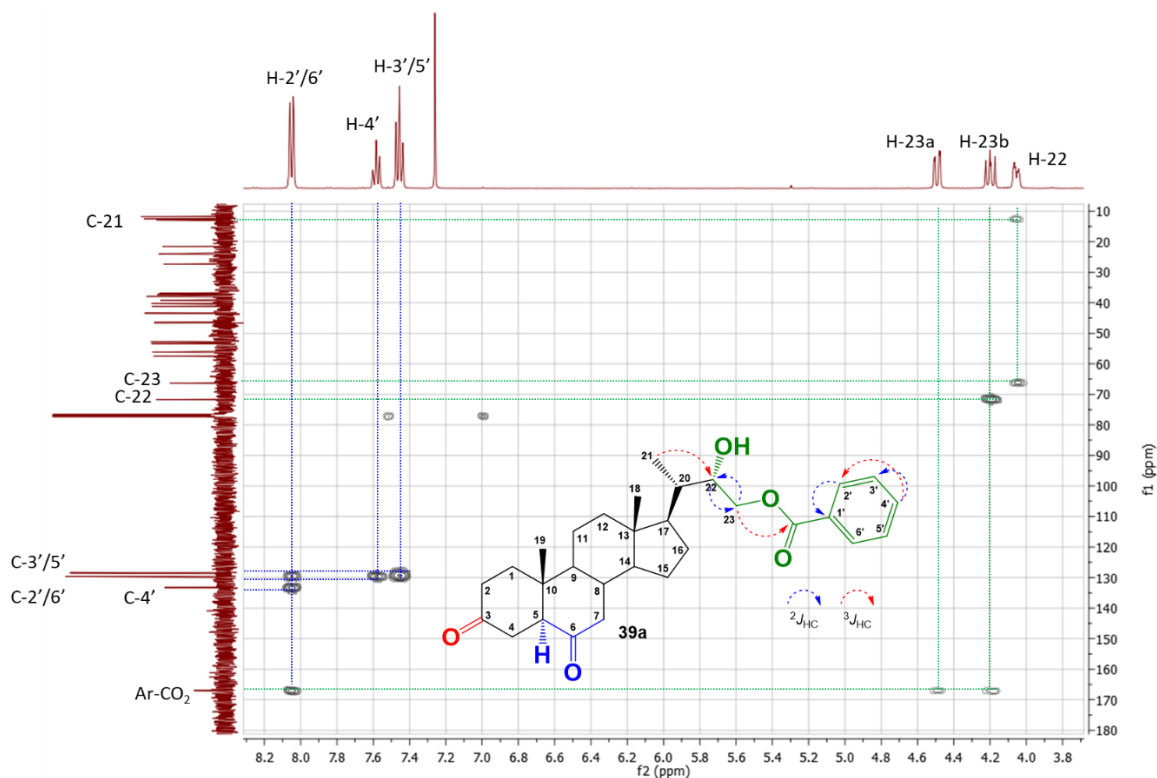
Estas señales carbinólicas y aromáticas observadas en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, fueron correlacionadas a  $^1J_{\text{HC}}$  desde el espectro 2D HSQC, de acuerdo con lo indicado en la Figura 36.



*Figura 36.* Espectro parcial de 2D HSQC ed., con proyección de  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 donde se muestran las correlaciones heteronucleares a  $^1J_{\text{HC}}$  para los hidrógenos H-2'/H-6', H-4', H-3'/H-5', H-22a, H-22b y H-23 con sus correspondientes señales de  $^{13}\text{C}$  RMN para el análogo **39a**.

La confirmación inequívoca de la función benzoato en el C-23, provino desde la información obtenida del espectro 2D HMBC. En este se observan las correlaciones heteronucleares a  $^3J_{\text{HC}}$  detectadas entre los hidrógenos H-23ab a  $\delta_{\text{H}} = 4,49$  [ppm] (1H, dd,  $J = 11,5$  y  $1,9$  [Hz], H-23a) y  $4,20$  [ppm] (1H, dd,  $J = 11,5$  y  $9,1$  [Hz], H-23b) con el carbono a  $\delta_{\text{C}} = 167,00$  [ppm] del grupo carbonílico del éster aromático (Ar-CO<sub>2</sub>), tal como se indica en la Figura 37. Adicionalmente, en la Figura 37 se muestran otras correlaciones heteronucleares detectadas en la cadena lateral y la parte aromática.

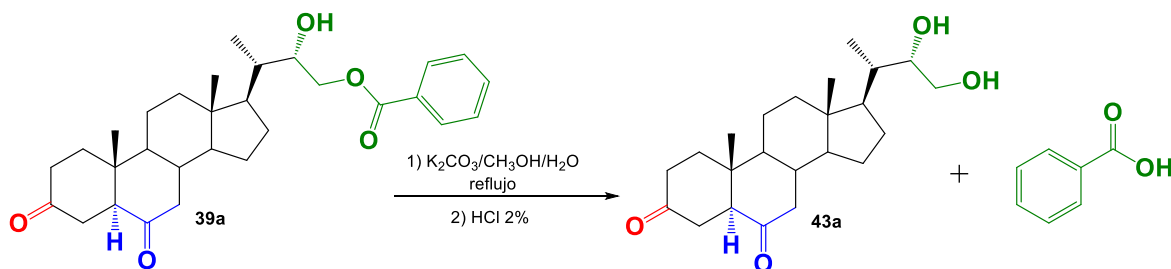
La determinación estructural inequívoca del resto de los análogos de la nueva serie (**39b-39f**) se efectuó de esta misma manera. Todos los espectros completos se encuentran en el Anexo 1.



**Figura 37.** Espectro parcial 2D HMBC para el compuesto **39a** y su estructura, que muestran las principales correlaciones heteronucleares a  $^2J_{HC}$  (flechas segmentadas color azul) y  $^3J_{HC}$  (flechas segmentadas color rojo). En esta última se destaca la conectividad de los hidrógenos H-23ab con carbono carbonílico del éster aromático (Ar-CO<sub>2</sub>).

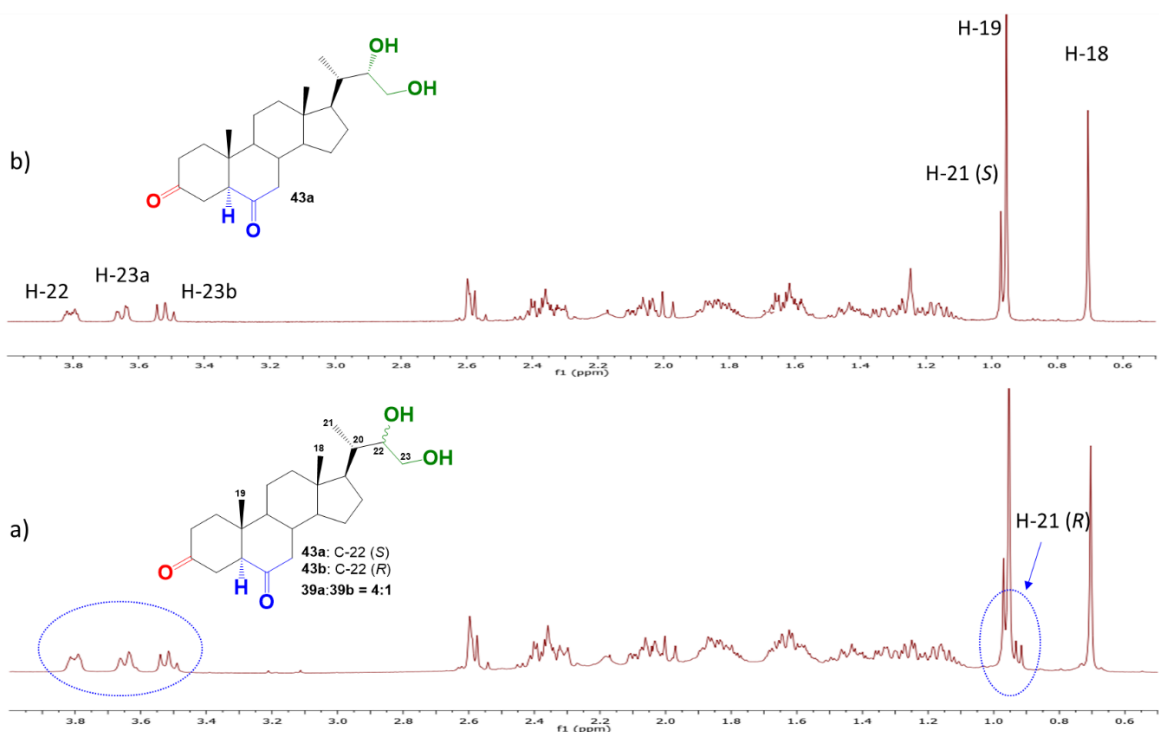
Finalmente, se procedió con la reacción de saponificación del análogo **39a** para efectos de caracterización estructural y evaluaciones biológicas, del epímero mayoritario **43a** (configuración C-22 (S)). La reacción de saponificación se muestra en el Esquema 5.

La reacción de saponificación se realizó utilizando el sistema K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O en condiciones de reflujo y posterior acidificación, según lo reportado [79,80]. Esto permitió obtener el glicol **43a** en forma pura con un rendimiento de 36,2%.



**Esquema 5.** Reacción de saponificación del análogo **39a** para la obtención del glicol **43a**.

La determinación estructural del glicol **43a** se realizó principalmente por  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN en forma comparativa con la mezcla de epímeros **43a/43b**. Donde las principales diferencias se observan en las multiplicidades de los hidrógenos carbinólicos H-22 y H-23ab y en la ausencia de la señal del grupo  $\text{CH}_3$ -21 correspondiente al epímero **43b**, según se muestra en la Figura 38.



**Figura 38.** Comparación entre los espectros de  $^1\text{H}$  RMN entre la mezcla de epímeros **43a/43b** a) y el epímero puro **43a** b) Las principales diferencias se observan entre las señales de los hidrógenos carbinólicos H-22, H-23ab y  $\text{CH}_3$ -21.

## 8.2 Evaluaciones biológicas

### 8.2.1 Resultados del ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA)

A partir de uno de los objetivos específicos planteados para este trabajo de tesis, se efectuó la evaluación de la actividad biológica de los análogos **39a-39f**, **43a** y la mezcla **43a/43b** por medio del ensayo biológico de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA), utilizando la especie *Oryza sativa* (variedad Zafiro) junto con el procedimiento descrito en la metodología [81,93] (Versión modificada de Wada y colaboradores [46]). Se empleó como control positivo el compuesto brasinólido (**1**), y como control negativo solo agua destilada estéril (ADE).

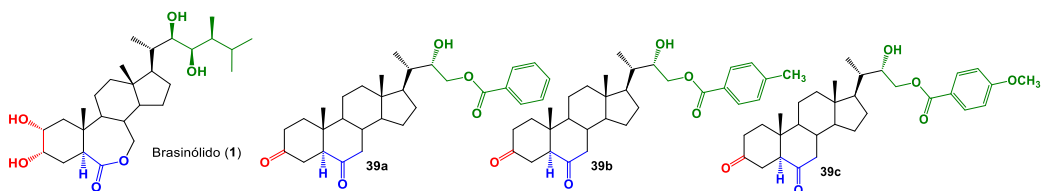
En cuanto a los requisitos estructurales que requieren los análogos de BRs para generar una actividad estimulante dentro de los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta, se señalan ciertas características sobre grupos funcionales y orientaciones espaciales de estos, específicamente en la zona de la cadena lateral, se ha establecido la presencia de una función glicol en los carbonos C-22 y C-23, ambos con una configuración *R* (22*R*,23*R*-dihidroxi) y un sustituyente alquílico en C-24 como un grupo etilo o metilo. No obstante, se han reportado otros análogos de BRs con cadena lateral acortada exhibiendo resultados positivos en ensayos biológicos, rebatiendo la exclusividad de los requisitos enunciados anteriormente en el esqueleto de los nuevos análogos sintéticos [36,42,56,58,63,64,79-81].

A partir del análisis de los resultados arrojados por parte del bioensayo ILA para los nuevos análogos con cadena lateral del tipo 24-nor-5 $\alpha$ -colanos **39a-39f**, **43a** y **43ab**, se tiene que la mayoría de los análogos evaluados presentaron un comportamiento inverso al obtenido aplicando brasinólido (**1**), en donde el incremento de la concentración empleada se traduce en una disminución del grado de inclinación de la lámina de arroz (compuestos **39d**, **39e** y **39f**), traducido en una menor actividad biológica. Solo el análogo **43a** presentó un valor de actividad menor al obtenido con el control negativo (ADE), lo que induce a que este análogo podría estar provocando un efecto desestimulante en cuanto a potencial biológico. Algunos análogos que no presentaron actividad biológica (con sus respectivas concentraciones ensayadas) se reportan a continuación: **39c** ( $1 \times 10^{-8}$  M), **39a**, **39b** ( $1 \times 10^{-7}$  M) y los análogos **39a**, **39d**, **39e** y **43ab** ( $1 \times 10^{-6}$  M) (Tablas 3 y 4).

De todos los compuestos evaluados, el análogo **39f** presentó una mayor actividad a concentraciones de  $1 \times 10^{-8}$  y  $1 \times 10^{-7}$  M, con valores obtenidos similares a los que arrojó el control

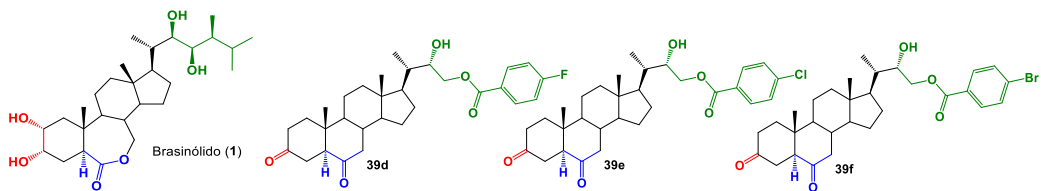
positivo (brasinólido (1)), mientras que a la concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M el análogo más activo resultó ser el **39c**, con un valor inferior al del control positivo (Tablas 3 y 4).

**Tabla 4.** Ángulo promedio ( $^{\circ}$ ) de inclinación ( $\pm$  desviación estándar) obtenido en bioensayo de ILA para los análogos **39a-39c** y el control positivo (brasinólido (1)), producto de seis réplicas independientes a diferentes concentraciones.



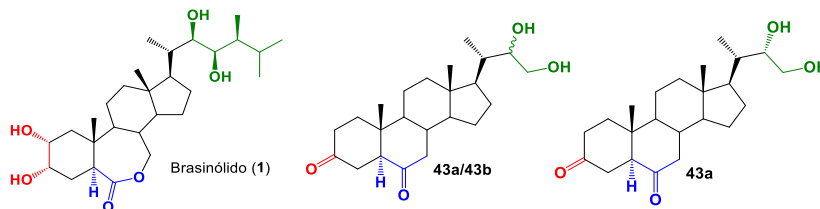
Concentración [M]	Ángulo [ $^{\circ}$ ] $\pm \sigma$			
$1 \times 10^{-8}$	$81 \pm 7,1$	$19 \pm 4,8$	$19 \pm 3,2$	-
$1 \times 10^{-7}$	$88 \pm 4,8$	-	-	$28 \pm 2,6$
$1 \times 10^{-6}$	$90 \pm 7,5$	-	$32 \pm 4,2$	$54 \pm 8,4$

**Tabla 5.** Ángulo promedio ( $^{\circ}$ ) de inclinación ( $\pm$  desviación estándar) obtenido en bioensayo de ILA para los análogos **39d, 39e y 39f** y el control positivo (brasinólido (1)) producto de seis réplicas independientes a diferentes concentraciones.



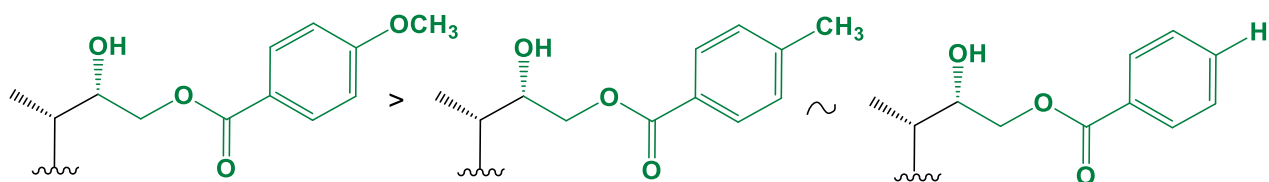
Concentración [M]	Ángulo [ $^{\circ}$ ] $\pm \sigma$			
$1 \times 10^{-8}$	$81 \pm 7,1$	$38 \pm 2,6$	$32 \pm 4,2$	$75 \pm 2,0$
$1 \times 10^{-7}$	$88 \pm 4,8$	$34 \pm 2,7$	$31 \pm 8,2$	$49 \pm 4,5$
$1 \times 10^{-6}$	$90 \pm 7,5$	-	-	$33 \pm 2,6$

**Tabla 6.** Ángulo promedio ( $^{\circ}$ ) de inclinación ( $\pm$  desviación estándar) obtenido en bioensayo de ILA para la mezcla epimérica **43ab**, epímero **43a** y el control positivo (brasinólido (1)) producto de seis réplicas independientes a diferentes concentraciones.



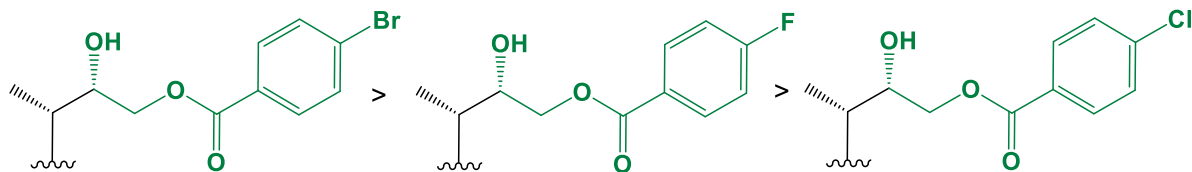
Concentración [M]	Ángulo [ $^{\circ}$ ] $\pm \sigma$		
$1 \times 10^{-8}$	$81 \pm 7,1$	$17 \pm 2,7$	$26 \pm 4,1$
$1 \times 10^{-7}$	$88 \pm 4,8$	$42 \pm 2,5$	$38 \pm 4,9$
$1 \times 10^{-6}$	$90 \pm 7,5$	-	$13 \pm 4,1$

A raíz de los valores obtenidos sobre actividad biológica a través del bioensayo ILA junto con la estructura de cada uno de los compuestos ensayados es posible dilucidar ciertas relaciones entre estas dos variables. Para simplificar este análisis de los datos obtenidos, solo se considerarán los valores reportados a la concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M. Para el conjunto de los nuevos análogos de BRs benzoilados en C-23, correspondientes a **39a-39f**, el efecto promotor de crecimiento provocado por el sustituyente en C-4' del anillo aromático afecta de manera positiva para los grupos atractores de electrones (halógenos), lo que se traduce en un mayor ángulo de medido, en comparación con sustituyentes dadores de electrones ( $-\text{CH}_3$  y  $-\text{OCH}_3$ ) o sin sustituyente ( $-\text{H}$ ) cuyos valores de actividad fueron inferiores o considerados no activos. Para el caso de los análogos sin sustituyente (**39a**) y con sustituyente metilo (**39b**) no fueron activos, excepto el análogo **39a** a la concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M, superando levemente al control negativo (19%). Dentro de los sustituyentes dadores de electrones, el análogo con el grupo metoxi (**39c**) resultó ser el más activo de la serie.



**Figura 39.** Efecto de los sustituyentes dadores de electrones en C-4' de los nuevos análogos de BRs sobre el incremento de actividad promotora de crecimiento vegetal en test ILA.

Dentro de la serie de sustituyentes atractores de electrones, el más activo fue el sustituyente bromado (**39f**), seguido por el sustituyente con un átomo de flúor (**39d**) y el sustituyente con un átomo de cloro (**39e**). Conviene enfatizar que el análogo bromado **39f** obtuvo uno de los valores más altos de actividad biológica a la concentración más baja ( $1 \times 10^{-8}$  M), logrando ser solo un 8% menos activo que el control positivo (**1**).



**Figura 40.** Efecto de los sustituyentes atractores de electrones en C-4' de los nuevos análogos de BRs sobre el incremento de actividad promotora de crecimiento vegetal en test ILA.

Por otra parte, para el conjunto de dioles **43a** y **43a/43b** (4:1) se puede observar que el epímero 22S (**43a**) resultó ser un 11% menos activo que la mezcla epimérica 22R/22S (**43ab**) (Tabla 5). Esta relación se invierte a baja concentración ( $1 \times 10^{-8}$  M), puesto que el epímero **43a** resultó ser

un 53% más activo que su mezcla epimérica respectiva (**43a/43b**). Por último, a la concentración más alta ( $1 \times 10^{-6}$  M) testeada el glicol 22S (**43a**) provocó un efecto adverso en cuanto al ángulo de apertura, siendo la única molécula que reportó un valor inferior al control negativo (H<sub>2</sub>O). Puesto que no se ensayó con el epímero puro 22R (**43b**) no es factible señalar el efecto de la contribución de cada epímero independientemente ni la influencia de la orientación del grupo hidroxilo en C-22, como se ha reportado en trabajos anteriores para análogos de BRs del mismo tipo de cadena lateral [81].

#### Resultados del ensayo de Segundo Entrenado de Frijol (SEF)

Complementando la información acerca del potencial hormonal de los nuevos análogos de BRs sintetizados en este trabajo se realizó la prueba biológica del Segundo Entrenado de Frijol, utilizando semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., var. Pinto) con el procedimiento anteriormente mencionado en metodología [94,103] con algunas modificaciones. Se empleó como control positivo el compuesto brasinólido (**1**), y como control negativo solo agua destilada estéril (ADE).

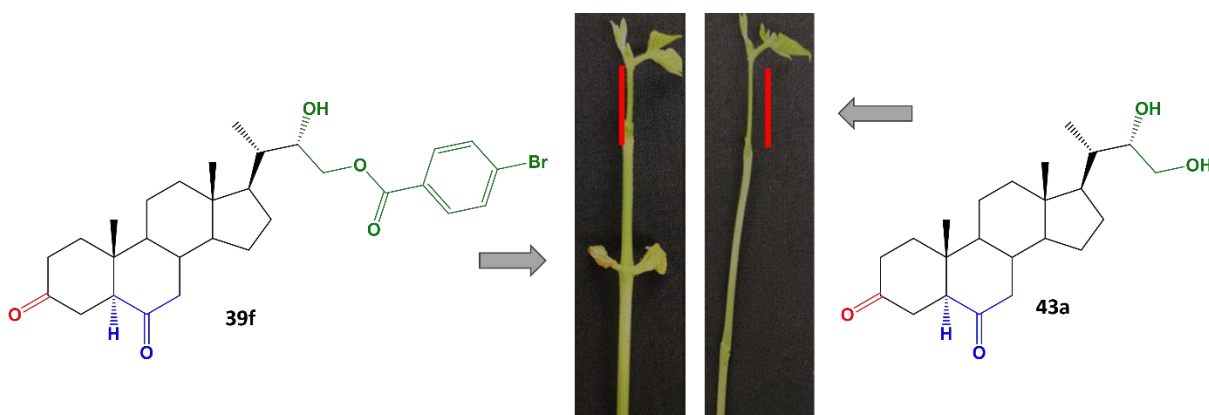
Los compuestos que causaron una elongación efectiva sobre la muestra (> 9,8 [mm]) fueron considerados biológicamente activos. Dichos análogos correspondientes a **39c**, **39f** y **43a** lograron exhibir una actividad promotora de elongación considerable, tomando en cuenta al control positivo (**1**) con un valor de 20,2 [mm] (ver Tabla 6). Los resultados anteriores sustentan la hipótesis sobre la promoción del crecimiento vegetal por parte de los nuevos análogos de BRs del tipo 24-nor-5 $\alpha$ -colanos benzoilados en C-23 con grupos donores y atractores de electrones en la posición 4 del anillo aromático. Por parte de los glicoles estudiados, al igual que dentro de los resultados obtenidos en el bioensayo ILA, se tiene que el epímero 22S (**43a**) resulta ser un 16,7% más activo que la mezcla epimérica **43ab**, corroborando la diferencia que existe en cuanto a potencial promotor por parte de la orientación del grupo hidroxilo en C-22.

**Tabla 7.** Actividades obtenidas en el bioensayo del Segundo Entrenado de Frijol (SEF) por parte de los nuevos análogos de BRs sintetizados.

Compuesto	Respuesta <sup>1</sup>	$\sigma$
<b>1</b>	20,2 <sup>a</sup>	0,6
<b>39a</b>	4,4 <sup>d</sup>	1,9
<b>39b</b>	2,9 <sup>e</sup>	1,9
<b>39c</b>	9,8 <sup>b</sup>	1,8
<b>39d</b>	5,5 <sup>d</sup>	1,8
<b>39e</b>	8,5 <sup>bc</sup>	2,8
<b>39f</b>	10,8 <sup>d</sup>	2,7
<b>43a</b>	11,2 <sup>b</sup>	7,8
<b>43ab</b>	9,6 <sup>b</sup>	6,8

<sup>1</sup>Máxima prolongación del segundo entrenado en [mm] por la aplicación de solución con BRs a concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M (n° de réplicas = 6). Superíndices (letras) indican el nivel de significancia de acuerdo con el test aplicado de t-student ( $p < 0.05$ ).

En consecuencia, y de acuerdo con los resultados obtenidos en el bioensayo ILA, se obtiene que nuevamente dentro de los análogos benzoilados el más activo resultó ser el análogo bromado (**39f**) con un 53% de elongación efectiva, y por su parte el glicol **43a** con un 55% de actividad (medidas respecto al control positivo).



Esto sugiere una concordancia en cuanto a los resultados de ambos bioensayos, dejando la variable concentración fija. No obstante, se debe tener en cuenta que no hay equivalencia entre los resultados experimentales de ambos ensayos biológicos, esto debido a los múltiples efectos fisiológicos que poseen los BRs dentro del metabolismo vegetal y por ende sus distintas expresiones en cada prueba biológica (que a su vez evalúan diferentes factores). Por esta razón es importante

interpretar de manera parcelada los datos arrojados de actividad biológica de cada bioensayo y así analizar la relación existente con la estructura del(los) análogo(s) seleccionados.

### 8.3 Estudios “*In Silico*”

En cuanto a los resultados obtenidos por el estudio de acoplamiento molecular para los nuevos análogos de BRs **39a-39f** sintetizados para el presente trabajo, los resultados indicaron que todos los productos finales **39a-39f** efectuaron un modo de unión con los complejos receptores específicos de BRs (PDB 4m7e), con puntajes entregados por Docking Score dentro del rango de -7,85 a -10,67 [kcal·mol<sup>-1</sup>].

Por su parte, la proteína cristalizada posee residuos que recubren el surco superficial de naturaleza hidrófoba, presentando múltiples interacciones hidrofóbicas con los distintos ligandos con algunos residuos aminoacídicos en común como Arg 640, Asn 705, Ile 682-706, Lys 601, Met 657, Phe 681, Trp 564, Tyr 599/597/642, entre otros, los cuales juegan un rol importante al momento de unirse a la molécula ligando destacando que la mayoría de su esqueleto (Anillos A, B, C y D) ocupa la mayor parte del arco superficial.

De modo general, se presentaron múltiples interacciones entre los ligandos **39a-39f** y los complejos receptor-correceptor, donde se encuentran enlaces de hidrógeno participando como aceptores por parte de la función benzoílo y la función 3-oxo, así como también aportó esta misma interacción el átomo de oxígeno unido a este mismo carbonilo (cadena lateral). En todos los compuestos de la lista simulada también se presencié una interacción por puentes de hidrógeno por parte del residuo aminoacídico His 61 con el grupo 3-oxo por parte del anillo A, mientras que el anillo B interactúa estrechamente con los aminoácidos Tyr 643 y Tyr 599; por último, los anillos C y D son estabilizados gracias al apilamiento con los residuos Phe 60-681. En algunos casos particulares (compuestos **39d** y **39f**) se apreciaron interacciones de apilamiento por parte de los sistemas bencílicos de los ligandos con el residuo Phe 60.

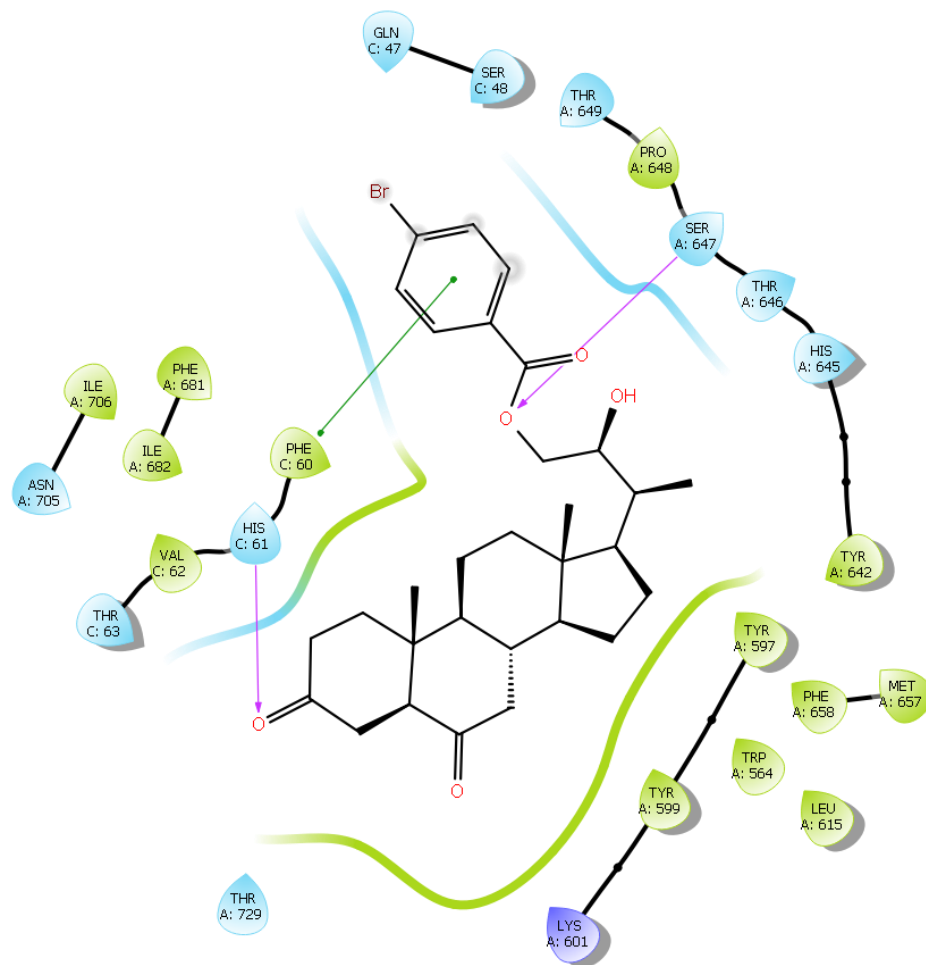
**Tabla 8.** Valores de energía mínima en orden creciente del complejo formado entre los nuevos análogos de BRs, brasinólido (**1**) y el complejo receptor BR1.

Ligando	$\Delta G$ BRI1 [kcal·mol <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	-10,7
<b>39e</b>	-10,7
<b>39f</b>	-10,6
<b>39a</b>	-10,2
<b>39d</b>	-10
<b>39b</b>	-8,7
<b>43a</b>	-8,4
<b>39c</b>	-7,9

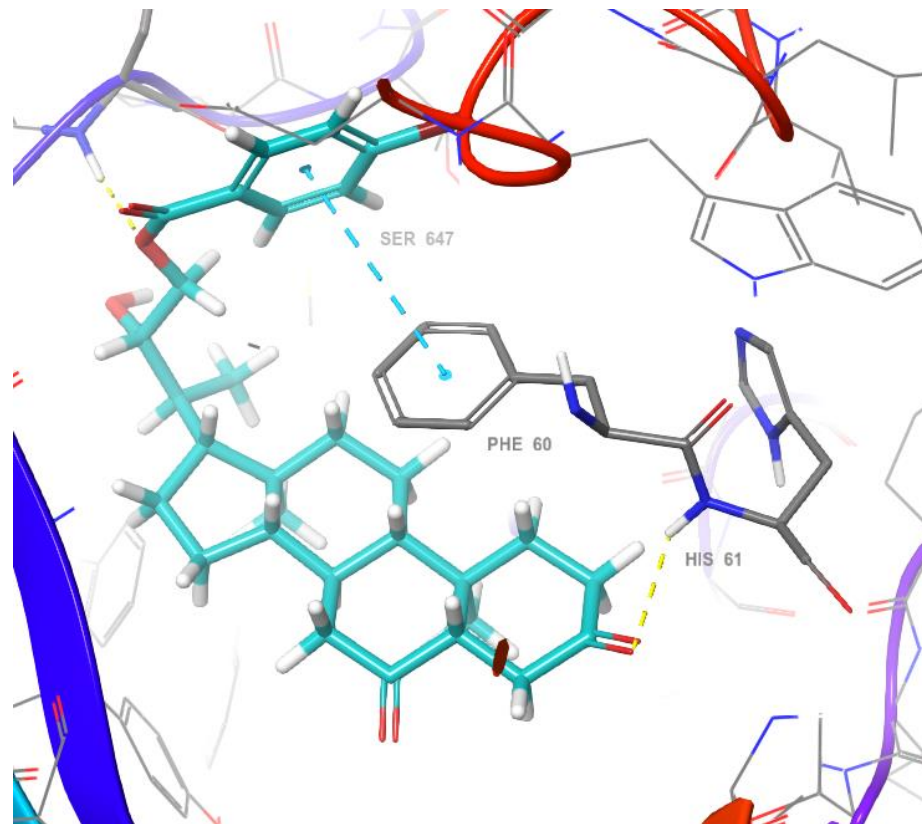
**Tabla 9.** Valores de energía mínima en orden creciente del complejo formado entre los nuevos análogos de BRs, brasinólido (**1**) y el complejo receptor BR1-BAK1.

Ligando	$\Delta G$ BRI1- BAK1 [kcal·mol <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	-16,1
<b>39f</b>	-13,2
<b>39d</b>	-13,1
<b>39e</b>	-12,7
<b>39a</b>	-12,5
<b>39b</b>	-12,5
<b>39c</b>	-12,4
<b>43a</b>	-12,1

El compuesto **39f** que presentó una mayor afinidad tanto con el complejo proteico BRI1 (-10,7 [kcal·mol<sup>-1</sup>]) y con el complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 (-13,2 [kcal·mol<sup>-1</sup>]) con puntuaciones cercanas a los valores obtenidos con brasinólido (**1**) entregadas por Docking Score, como se puede apreciar en las Tabla 3 y Tabla 4. Dentro de las interacciones obtenidas para el análogo **39f** se encuentran enlaces de hidrógenos como aceptores por parte del átomo de oxígeno del grupo benzoílo conectado a C-23 con el residuo Ser-647 y el átomo de oxígeno carbonílico en C-3 con el aminoácido His-61; en cuanto a interacciones hidrofóbicas se detectó una entre el anillo aromático de la cadena lateral junto con el residuo Phe-60 de tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking* (Figura 42).



**Figura 42.** Interacciones intermoleculares (*pi*-stacking en verde y enlaces de hidrógeno en violeta) entre el análogo **39f** y la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (PDB 4M7E).



**Figura 43.** Modo predictivo de unión en 3D entre el análogo **39f** y la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (**1**) (PDB 4M7E).

El modo predictivo y sus interacciones (tanto hidrofílicas como hidrofóbicas) entre el complejo BRI1-BAK1 y el resto de los análogos e intermediarios se muestran en el Anexo 2.

## 9 Conclusiones

---

En este trabajo fueron sintetizados y caracterizados exitosamente seis análogos de brasinoesteroides del tipo 24-nor-5 $\alpha$ -colanos con cadena lateral funcionalizada con ésteres de grupos benzoílo *para*-sustituídos en la posición C-23 desde ácido hiodeoxicólico (**9**).

A partir de los ensayos biológicos aplicados para determinar y cuantificar el efecto promotor de crecimiento vegetal de los nuevos análogos mediante el test de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) se obtuvo que el compuesto **39f** resultó ser solo un 8% menos activo que el BRs natural aplicado (brasinólido (**1**)) a la concentración de  $1 \times 10^{-8}$  [M], destacando entre la serie de los nuevos análogos obtenidos. En cambio, los resultados observados en el bioensayo SEF, arrojaron actividades biológicas significativas alcanzando aproximadamente un 48,5%, 53,5% y 55,4% de la elongación obtenida con el control positivo (brasinólido (**1**)) a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  [M], para los análogos **39c**, **39f** y el glicol **43a**, respectivamente. Cabe destacar que no necesariamente se repiten los compuestos más activos en cada bioensayo dado a los múltiples estímulos promovidos por los BRs y diferentes condiciones experimentales a las que son expuestos, lo que se resume en que no existe una equivalencia directa entre ensayos biológicos.

Los estudios predictivos de acoplamiento molecular (*docking*) arrojaron valores de alta afinidad entre los ligandos seleccionados (serie de análogos) y complejos receptor/receptor-correceptor, esto en parte a las múltiples interacciones hidrofóbicas y polares estabilizadoras en la conformación del sitio activo de la proteína. Se destacó al análogo **39f** como el ligando con mayor afinidad de unión al complejo proteico BRI1 (-10,7 [kcal·mol<sup>-1</sup>]) y al complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 (-13,2 [kcal·mol<sup>-1</sup>]). Como se verificó de forma experimental por los bioensayos aplicados para evidenciar actividad promotora de crecimiento, el análogo **39f** demostró ser el mejor candidato en ambos estudios. Una explicación factible a lo anterior podría atribuirse al volumen del sustituyente junto con una alta densidad de carga negativa, induciendo un efecto estabilizante y alta afinidad de unión con los residuos aminoácidos de la proteína receptora.

De esta forma, los resultados obtenidos respaldan la hipótesis planteada sobre la actividad estimulante de crecimiento vegetal por parte de la nueva serie de análogos de brasinoesteroides con cadena lateral más corta (tipo 24-nor-5 $\alpha$ -colano), con funciones oxo en C-3, C-6 y benzoilados en C-23 con variedad de grupos donores y atractores de electrones presentes en el sistema aromático, resultados contrastados con los estudios de acoplamiento molecular, que se

complementan de forma positiva con los estudios biológicos. En conjunto, estos resultados sugieren una nueva alternativa sobre requisitos estructurales para promover el crecimiento y desarrollo vegetal, además de explorar opciones de nuevas rutas sintéticas eficientes y viables para las aplicaciones de estos compuestos en cultivos de interés económico-comercial.

## Referencias

---

1. Adam, G.; Marquardt, V. Brassinosteroids. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1787-1799.
2. Clouse, S.D.; Langford, M.; McMorris, T.C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana*, exhibits multiple defects in grow and development. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 671-678.
3. Tarkowská, D.; Strnad, M. Protocol for Extraction and Isolation of Brassinosteroids from Plant Tissues. *Methods in molecular biology.* **2017**, *1564*, 1-7.
4. Fujioka, S.; Sakurai, A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol. Plant.* **1997**, *100*, 710-715.
5. Izumi, Y.; Okazawa, A.; Bamba, T.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E. Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *648*, 215-225.
6. McSteen, P.; Zhao, Y. Plant Hormones and Signaling: Common Themes and New Developments. *Dev. Cell* **2008**, *14*, 467-473.
7. Bajguz, A.; Tretyn, A. The Chemical Structures and Occurrence of Brassinosteroids in Plants. In Brassinosteroids; Hayat, S.; Ahmad, A., Eds.; *Springer Netherlands: Dordrecht* **2003**; pp. 1-44 ISBN 978-90-481-6464-6, 978-94-017-0948-4.
8. Liu, J.; Zhang, D.; Sun, X.; Ding, T.; Lei, B.; Zhang, C. Structure-activity relationship of brassinosteroids and their agricultural practical usages. *Steroids* **2017**, *124*, 1-17.
9. Yokota, T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 137-143.
10. Marumo, S.; Hattori, H.; Abe, H.; Nonoyama, Y.; Manukata, K. The Presence of Novel Plant Growth Regulators in Leaves of *Distylium racemosum* Sied et Zucc. *Agric. Biol. Chem.* **1968**, *32*, 528-529.
11. Mitchell, J.W.; Mandava, N.; Worley, J.F.; Plimmer, J.R.; Smith, M.V. Brassins-a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature* **1970**, *225*, 1065-1066.
12. Grove, M.D.; Spencer, G.F.; Rohwedder, W.K.; Mandava, N.; Worley, J.F.; Warthen, J.D.; Steffens, G.L.; Flippen-Anderson, J.L.; Cook, J.C. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **1979**, *281*, 216-217.

13. Fung, S.; Siddall, J.B. Stereoselective synthesis of brassinolide: a plant growth promoting steroidal lactone. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6580– 6581.
14. Mandava, N.B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1988**, *39*, 23–52.
15. Oklestkova, J.; Rárová, L.; Strnad, M. Brassinosteroids and their biological activities. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 3851–3871 ISBN 9783642221446.
16. Šíša, M.; Vilaplana-Polo, M.; Ballesteros, C.B.; Kohout, L. Brassinolide activities of 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -diols versus 3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ -diols in the bean second internode bioassay: Explanation by molecular modeling methods. *Steroids* **2007**, *72*, 740–750.
17. Bishop, G.J.; Koncz, C. Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling. *Plant Cell* **2002**, *14*, S97–S110.
18. Mitchell, J.W.; Gregory, L.E. Enhancement of Overall Plant Growth, a New Response to Brassins. *Nature* **1972**, *239*, 253–254.
19. Hu, Y.; Bao, F.; Li, J. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. *Plant J.* **2000**, *24*, 693–701.
20. Nemhauser, J.L.; Chory, J. BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 265–270.
21. Singh, I.; Shono, M. Physiological and Molecular Effects of 24-Epibrassinolide, a Brassinosteroid on Thermotolerance of Tomato. *Plant Growth Regul.* **2005**, *47*, 111–119.
22. Kang, Y.Y.; Guo, S.R. Role of brassinosteroids on horticultural crops. In *Plant Growth Regulation*; Hayat, S., Ahmad, A., Eds.; Springer Netherlands, **2011**, *13*, 269–288 ISBN 978-94-007-0188-5 978-94-007-0189-2.
23. Achard, P.; Cheng, H.; De Grauwe, L.; Decat, J.; Schoutteten, H.; Moritz, T.; Van Der Straeten, D.; Peng, J.; Harberd, N.P. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **2006**, *311*, 91– 94.
24. Kim, T.W.; Chang, S.C.; Choo, J.; Watanabe, T.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Lee, J.S.; Kim, S.Y.; Kim, S.K. Brassinolide and [26, 28-2H6]brassinolide are differently demethylated by loss of C-26 and C-28, respectively, in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* **2000**, *41*, 1171–1174.

25. Asami, T.; Yoshida, S. Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 348–353.
26. Friedrichsen, D.M.; Joazeiro, C. a; Li, J.; Hunter, T.; Chory, J. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 1247–1256.
27. Li, J.; Chory, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **1997**, *90*, 929–938.
28. Zurek, D.M.; Clouse, S.D. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 161–170.
29. Vukašinović, N.; Russinova, E. BRexit: Possible Brassinosteroid Export and Transport Routes. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 285–292.
30. Fellner, M. Recent Progress in Brassinosteroid Research: Hormone Perception and Signal Transduction. In; Hayat, S., Ahmad, A., Eds.; Springer Netherlands, **2003**; pp. 69–86 ISBN 978-90-481-6464-6, 978-94-017-0948- 4.
31. Hothorn, M.; Belkhadir, Y.; Dreux, M.; Dabi, T.; Noel, J.P.; Wilson, I. a; Chory, J. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* **2011**, *474*, 467–471.
32. She, J.; Han, Z.; Kim, T.-W.; Wang, J.; Cheng, W.; Chang, J.; Shi, S.; Wang, 193 J.; Yang, M.; Wang, Z.-Y.; et al. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* **2011**, *474*, 472–476.
33. Acebedo, S.L.; Alonso, F.; Ramírez, J. a.; Galagovsky, L.R. Synthesis of aromatic stigmastanes: Application to the synthesis of aromatic analogs of brassinosteroids. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3685–3691.
34. Khripach, V.; Zhabinskii, V.; de Groot, A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Ann. Bot.* **2000**, *86*, 441-447
35. Castle, J.; Montoya, T.; Bishop, G.J. Selected Physiological Responses of Brassinosteroids: A Historical Approach. In; Hayat, S., Ahmad, A., Eds.; Springer Netherlands, **2003**; pp. 45-68 ISBN 978-90-481-6464-6, 978-94-017-0948-4.
36. Kvasnica, M.; Oklestkova, J.; Bazgier, V.; Rárová, L.; Korinkova, P.; Mikulík, J.; Budesinsky, M.; Béres, T.; Berka, K.; Lu, Q.; et al. Design, synthesis and biological activities of new

- brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8691–8701.
37. Černý, V.; Strnad, M.; Kamínek, M. Preparation of 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23,24-dinor-B-homo-5 $\alpha$ -cholanic acid, its esters and amides as brassinolide analogues. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1986**, *51*, 687–697.
38. Strnad, M.; Kohout, L. A simple brassinolide analogue 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-17 $\beta$ -(3-methylbutyryloxy)-7-oxa-B-homo-5 $\alpha$ -androstan-6-one which induces bean second internode splitting. *Plant Growth Regul.* **2003**, *40*, 39–47.
39. Wada, K.; Marumo, S.; Ikekawa, N.; Morisaki, M.; Mori, K. Brassinolide and Homobrassinolide Promotion of Lamina Inclination of Rice Seedlings. *Plant Cell Physiol.* **1981**, *22*, 323–325.
40. Back, T.G.; Pharis, R.P. Structure-Activity Studies of Brassinosteroids and the Search for Novel Analogues and Mimetics with Improved Bioactivity. *J. Plant Growth Regul.* **2003**, *22*, 350–361
41. Pereira-Netto, A.B.; Schaefer, S.; Galagovsky, L.R.; Ramirez, J.A. Brassinosteroid-Driven Modulation of Stem Elongation and Apical Dominance: Applications in Micropropagation. In: Hayat, S., Ahmad, A., Eds.; Springer Netherlands, **2003**; pp. 129–157 ISBN 978-90-481-6464-6, 978-94-017-0948-4.
42. Wada, K.; Marumo, S.; Mori, K.; Takatsuto, S.; Morisaki, M.; Ikekawa, N. The Rice Lamina Inclinationpromoting Activity of Synthetic Brassinolide Analogues with a Modified Side Chain. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 1139–1141.
43. Seto, H.; Hiranuma, S.; Fujioka, S.; Koshino, H.; Suenaga, T.; Yoshida, S. Preparation, conformational analysis, and biological evaluation of 6acarbabrassinolide and related compounds. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9741–9749.
44. Zullo, M.A.T.; Kohout, L.; Azevedo, M. de B.M. de Some notes on the terminology of brassinosteroids. *Plant Growth Regul.* **2003**, *39*, 1–11.
45. Zeferino-Diaz, R.; Hilario-Martinez, J.C.; Rodriguez-Acosta, M.; SandovalRamirez, J.; Fernandez-Herrera, M. a. 22-Oxocholestanes as plant growth promoters. *Steroids* **2015**, *98*, 126–131.
46. Wada, K.; Marumo, S.; Abe, H.; Morishita, T.; Nakamura, K.; Uchiyama, M.; Mori, M. A Rice Lamina Inclination Test—A Micro-quantitative Bioassay for Brassinosteroids. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 719–726.

47. Baron, D.L.; Luo, W.; Janzen, L.; Pharis, R.P.; Back, T.G. Structure-activity studies of brassinolide B-ring analogues. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1849–1858.
48. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Abe, H. Synthesis of (24R)-28-homobrassinolide analogues and structure-activity relationships of brassinosteroids in the rice-lamina inclination test. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1393–1397.
49. Thompson, M.J.; Meudt, W.J.; Mandava, N.B.; Dutky, S.R.; Lusby, W.R.; Spaulding, D.W. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids* **1982**, *39*, 89–105.
50. Thompson, M.J.; Mandava, N.; Flippen-Anderson, J.L.; Worley, J.F.; Dutky, S.R.; Robbins, W.E.; Lusby, W. Synthesis of brassinosteroids: new plantgrowth-promoting steroids. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 5002–5004.
51. Brosa, C.; Capdevila, J.M.; Zamora, I. Brassinosteroids: A new way to define the structural requirements. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2435–2448.
52. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N. Synthesis and biological activity of brassinolide analogues, 26,27-bisnorbrassinolide and its 6-oxo analogue. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 525–528.
53. Rosado-Abón, A.; Dios-Bravo, G.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis and plant growth promoting activity of polyhydroxylated ketones bearing the 5 $\alpha$ -hydroxy-6-oxo moiety and cholestane side chain. *Steroids* **2012**, *77*, 461–466.
54. Bharucha, K.R.; Buckley, G.C.; Cross, C.K.; Rubin, L.J.; Zlegler, P. THE CONVERSION OF HYODESOXYCHOLIC ACID TO PROGESTERONE. *Can. J. Chem.* **1956**, *34*, 982–990.
55. Bharucha, K.R. Testosterone and methyltestosterone from hyodesoxycholic acid. *Experientia* **1958**, *14*, 5–7.
56. Herrera, H.; Carvajal, R.; Olea, A.; Espinoza, L. Structural Modifications of Deoxycholic Acid to Obtain Three Known Brassinosteroid Analogues and Full NMR Spectroscopic Characterization. *Molecules* **2016**, *21*, 1139.
57. Zhou, W.-S.; Huang, L.-F. Studies on Steroidal Plant-growth Regulator 25. Concise Stereoselective Construction of Side Chain of Brassinosteroid from the intact Side Chain of hyodeoxycholic acid: Formal Syntheses of Brassinolide, 25-methylbrassinolide, 26, 27-Bisnorbrassinolide and their related compounds. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1837–1852.

58. Zhou, W.-S.; Huang, L.-F. 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. *J. Chem. Soc.* **1994**, *1*, 3579-3585.
59. Windaus, A.; Bohne, A. Über Hyo-glyko-desoxy-cholsäure und über Hyodesoxy-cholsäure. *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **1923**, *433*, 278–287.
60. Wei-Shan, Z.; Jiang, B.; Pan, X. A novel synthesis of brassinolide and related compounds. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 612–614.
61. Zhou, W.-S.; Tian, W.-S. The Synthesis of Steroids Containing Structural unit of A, B ring of Brassinolide and Ecdysone from hyodesoxycholic acid. *Acta Chim. Sin.* **1984**, *42*, 1173–1177.
62. Zhou, W.-S.; Tian, W.-S. Studies on Steroidal Plant-growth Hormones II: Stereoselective Synthesis of (22S,23S)-typhasterol from Hyodeoxycholic acid. *Acta Chim. Sin.* **1985**, *43*, 1060–1067.
63. Zhou, W.-S.; Jiang, L.-Z.; Tian, W.-S.; Zhao, X.-Y.; Zheng, X. Studies on Steroidal Plant-growth Regulator: VII. Synthesis of 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa6-oxo-23, 24-dinor-B-homo-5 $\alpha$ -cholanic acid and 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa-6- oxo-24-nor-B-homo-5 $\alpha$ -cholanic acid. *Acta Chim. Sin.* **1988**, *6*, 332–340.
64. Tian, W.-S.; Zhou, W.-S. Studies on Steroidal Plant-Growth Regulator IX. The Preparation of 22R-and 22S-24,25,26,27,28-Penta-Nor-Brassinolides. *Acta Chim. Sin.* **1989**, *47*, 1017–1021.
65. Zhou, W.-S. The Synthesis of Brassinosteroid. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 431–434.
66. Zhou, W.-S.; Jiang, B.; Pan, X.-F. Stereoselective Synthesis of the Brassinolide side chain; Novel Syntheses of Brassinolide and Related Compounds. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3173–3188.
67. Leppik, R.A. Improved synthesis of 3-keto, 4-ene-3-keto, and 4,6-diene-3-keto bile acids. *Steroids* **1983**, *41*, 475-484.
68. Weisheng, T. Study on the rational utilization of steroidal sapogenin I: Synthesis of sapogenin with the A/B ring structure unit of brassinolide. *Acta Chim. Sin.* **1992**, *50*, 72–77.
69. Coll, F.; Alonso, E.; Iglesias, M.; Marquardt, V.; Adam, G. Synthesis of spirostanic analogs of brassinosteroids. II. (25/R)-5 $\alpha$ -spirostan-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -diol. *Rev. Cuba. Quim.* **1992**, *6*, 7–12.
70. Iglesias, A.M.A.; Perez, G.R.; Coll, M.F. Natural brassinosteroids and their synthetic analogs. *Rev. CENIC, Cienc. Quim.* **1996**, *27*, 3–12.

71. Iglesias, A.M.A.; Lara, V.L.; Martínez, C.P.; Manchado, F.C. Síntesis de espirobrasinoesteroides análogos de la 6-desoxocastasterona. *Quim. Nov.* **1997**, *20*, 361–364.
72. Takatsuto, S.; Futatsuya, F.; Kobayashi, K.; Satoh, H. Synthesis and Biological Activity of 22, 23-Epoxybrassinosteroid 2, 3-Diacetates. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 263–265.
73. Rárová, L.; Sedlák, D.; Oklestkova, J.; Steigerová, J.; Liebl, J.; Zahler, S.; Bartůněk, P.; Kolář, Z.; Kohout, L.; Kvasnica, M.; et al. The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *178*, 263–271.
74. Brosa, C.; Amorós, M.; Molist, M.; Hernández, X. New brassinosteroid analogs having nitrogenated functionalities at C3 to provide more information about the brassinosteroid–receptor interaction. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8529–8534.
75. Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Abe, H. Structure-activity relationship of brassinosteroids with respect to the A/B-ring functional groups. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1987**, *35*, 211–216.
76. Galagovsky, L.R.; Gros, E.G.; Ramírez, J.A. Synthesis and bioactivity of natural and C-3 fluorinated biosynthetic precursors of 28-homobrassinolide. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 973–980.
77. Slavikova, B.; Kohout, L.; Budesinsky, M.; Swaczynova, J.; Kasal, A. Brassinosteroids: Synthesis and Activity of Some Fluoro Analogues. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3979–3984.
78. Kvasnica, M.; Oklestkova, J.; Bazgier, V.; Rarova, L.; Berka, K.; Strnad, M. Biological activities of new monohydroxylated brassinosteroid analogues with a carboxylic group in the side chain. *Steroids* **2014**, *85*, 58–64.
79. Carvajal, R.; González, C.; Olea, A. F.; Fuentealba, M.; and Espinoza, L. Synthesis of 2-Deoxybrassinosteroids Analogs with 24-nor, 22(S)-23-Dihydroxy-Type Side Chains from Hyodeoxycholic Acid. *Molecules*, **2018**, *23*, 1306.
80. Oyarce, J.; Aitken, V.; González, C.; Ferrer, K.; Olea, A. F.; Parella, T.; and Espinoza Catalán, L. Synthesis and Structural Determination of New Brassinosteroid 24-Nor5 $\alpha$ -Cholane Type Analogs. *Molecules*, **2019**, *24*, 4612.
81. Díaz, K.; Espinoza, L.; Carvajal, R.; Conde-González, M.; Niebla, V.; Olea, A. F.; and Coll, Y. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24- Norcholane Type Analogs *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1832.

82. Khripach, V.A.; Zhabinskii, V.N.; Ermolovich, Y. V. Chapter 6 – Synthetic Aspects of Brassinosteroids. In *Studies in Natural Products Chemistry*; **2015**; Vol. 44, pp. 309–352 ISBN 9780444634603.
83. Bajguz, A. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, *45*, 95–107.
84. Khripach, V.A.; Zhabinskii, V.N.; Tsavlovskii, D. V Synthesis of fatty acyl derivatives of 24-epibrassinolide. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *137*, 345–54.
85. Núñez, M.; Reyes, Y.; Rosabal, L.; Martínez, L. Spirostane analogs of brassinosteroids and their use potentialities in agriculture. *Cultiv. Trop.* **2014**, *35*, 34– 42.
86. Espinoza, L.; Cortes, M. Synthesis and biological activities of two new brassinosteroids functionalized in ring C. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **2002**, *47*, 335–347.
87. Espinoza, L.; Cortes, M. Synthesis and biological activity of brassinosteroids analogues. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **2002**, *47*, 511–516.
88. Yang, Y.X.; Zheng, L.T.; Shi, J.J.; Gao, B.; Chen, Y.K.; Yang, H.C.; Chen, H.L.; Li, Y.C.; Zhen, X.C. Synthesis of 5 $\alpha$ -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: Discovery of a novel neuroinflammation inhibitor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1222–1227.
89. Yang, Y.-X.; Zheng, L.-T.; Shi, J.-J.; Gao, B.; Chen, Y.-K.; Yang, H.-C.; Chen, H.-L.; Li, Y.-C.; Zhen, X.-C. 5 $\alpha$ -6-ketone-cholestane analogue and applications thereof. **2013**, [CN 103333216 A].
90. Huang, B.; Du, D.; Zhang, R.; Wu, X.; Xing, Z.; He, Y.; Huang, W. Synthesis, characterization and biological studies of diosgenyl analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7330–7334.
91. Jones, S.R.; Selinsky, B.S.; Rao, M.N.; Zhang Xuehai; Kinney, W.A.; Tham, F.S. Efficient Route to 7 $\alpha$ -(Benzoyloxy)-3-dioxolane Cholestan-24(R)-ol, a Key Intermediate in the Synthesis of Squalamine. *J. Org. Chem* **1998**, *63*, 3786–3789.
92. Igarashi, Y.; Sekine, A.; Fukazawa, H.; Uehara, Y.; Yamaguchi, K.; Endo, Y.; Okuda, T.; Furumai, T.; Oki, T. Anicequol, a Novel Inhibitor for Anchorageindependent Growth of Tumor Cells from *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx TP-F0213. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2002**, *55*, 371–376.

93. Duran, M. I.; González, C.; Acosta, A.; Olea, A.F.; Díaz, K.; Espinoza, L. Synthesis of Five Known Brassinosteroid Analogs from Hyodeoxycholic Acid and Their Activities as Plant-Growth Regulators. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 516.
94. Kohout, L.; Chodounská, H.; Tomáš, M.; Strnad, M. Synthesis of (20S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Dihydroxy-6-oxo-7-oxa-7a-homo-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxylic Acid as a Brassinosteroid Part of Ligands for Binding to Affinity Chromatography Carriers. **2000**, *65*, 1754–1761, doi:10.1135/cccc20001754.
95. Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G. V.; Mee, R.P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, *11*, 425–445, doi:10.1023/A:1007996124545.
96. Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749, doi:10.1021/jm0306430.
97. Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P.C.; Mainz, D.T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177-6196.
98. Ferrer, K.; Díaz, K.; Kvasnica, M.; Olea, A.F.; Cuellar, M.; Espinoza, L. Synthesis of New Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs Conjugated in C-3 with Benzoate Groups. *Molecules* **2021**, *26*, 1173.
99. Seto, H.; Fujioka, S.; Koshino, H.; Suenaga, T.; Yoshida, S.; Watanabe, T. & Takatsuto, S. Epimerization at C-5 of brassinolide with sodium methoxide and the biological activity of 5-epi-brassinolide in the rice lamina inclination test. *J. Chem. Soc., no. Perkin Transactions 1*, **1998**, 3355-3358.
100. Wang, Y. Biological activity of brassinosteroids and relationship of structure plant growth promoting effects. *Chinese Sci. Bull.*, **1994**, *39*, 1573-1577.
101. Ishiguro, M. and Ikekawa, N. Stereochemistry of Electrophilic reactions at the steroidal C-22 double bond. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 2860-2866.

102. Espinoza, L. Synthesis of Four New Brassinosteroids Analogues 11-Oxo-Functionalized on C Ring, with 24-Nor Side Chain and Containing 5 $\beta$ -Cholanic Acid Skeleton. *Org. Chem. Curr. Res.* **2016**, *4*, 156-161.

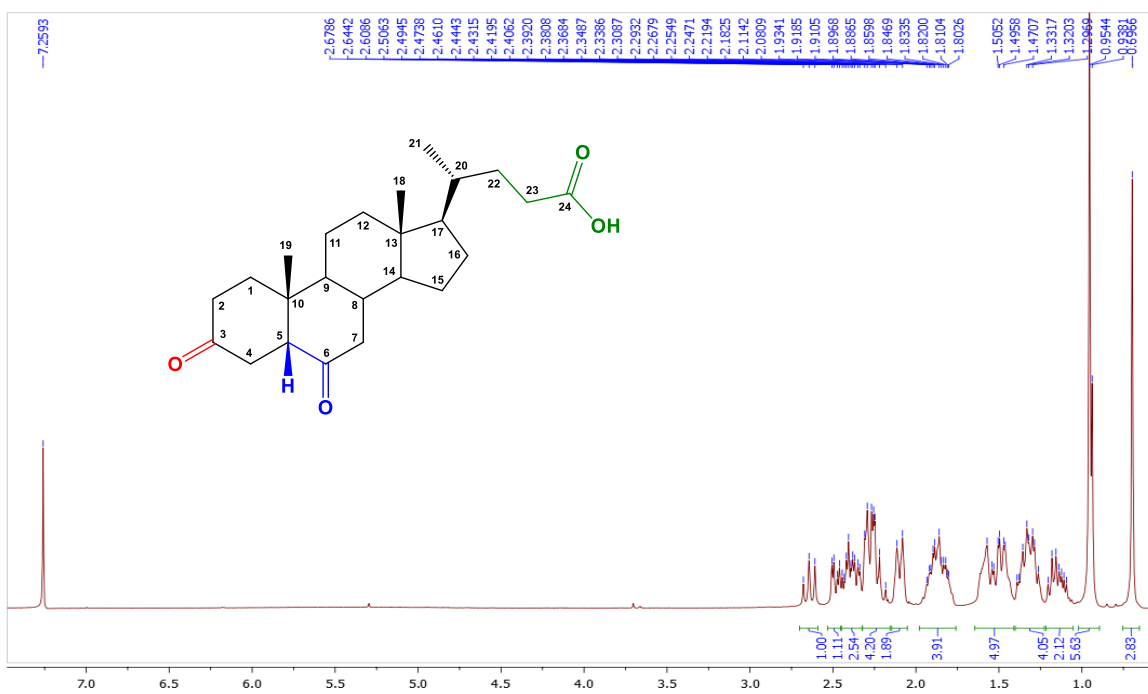
103. Slavikova, B.; Kohout, L.; Budesinsky, M.; Swaczynova, J.; Kasal, A. Brassinosteroids. Synthesis and activity of some fluoro analogues. *J. Med. Chem.* 2008, *51*, 3979-3984, doi:10.1021/jm800085p.

## Anexo 1

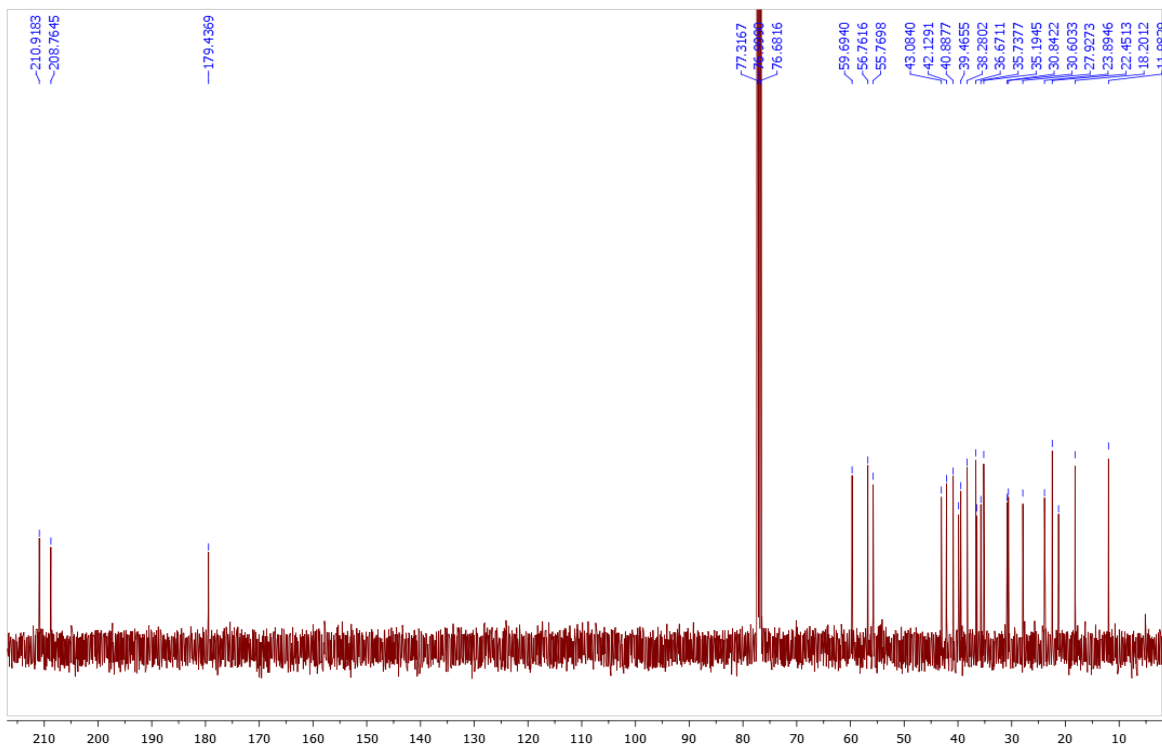
Espectros de RMN ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$  DEPT-135, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) para los compuestos 39-43.

### Ácido 3,6-dioxo-5 $\beta$ -colan-24-oico (40)

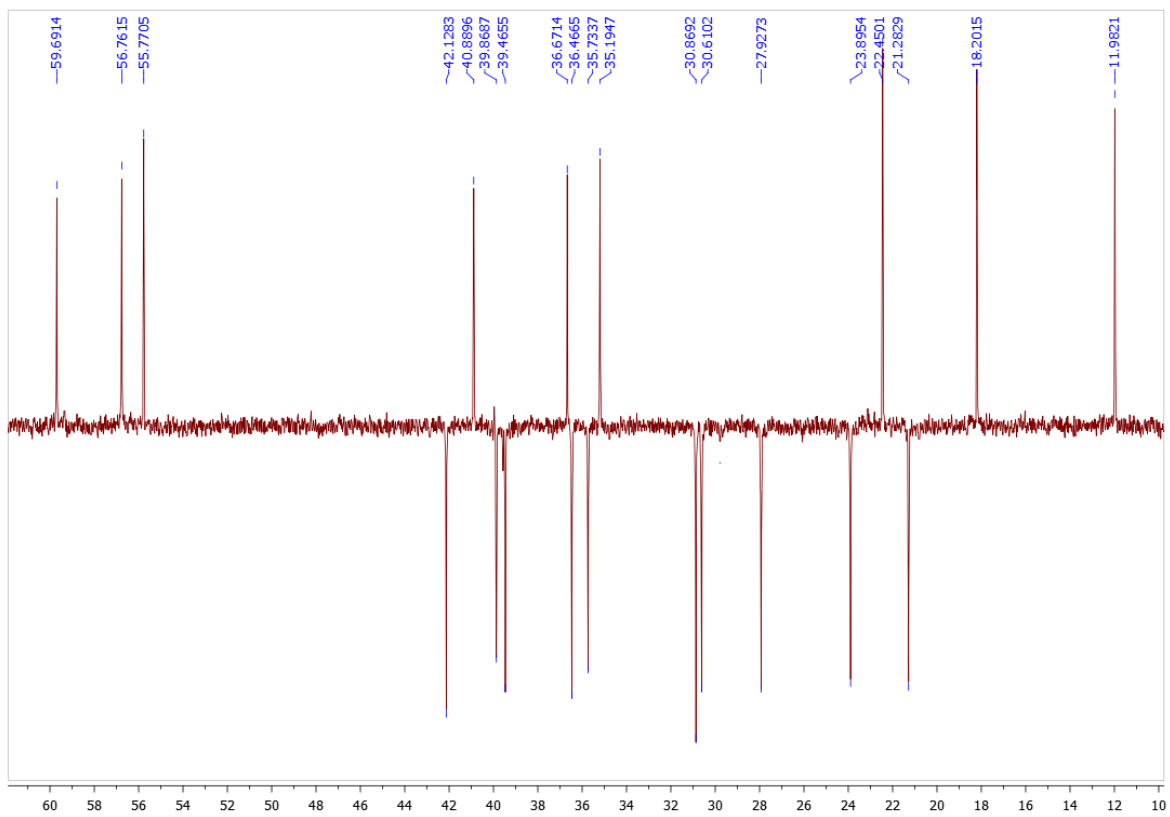
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



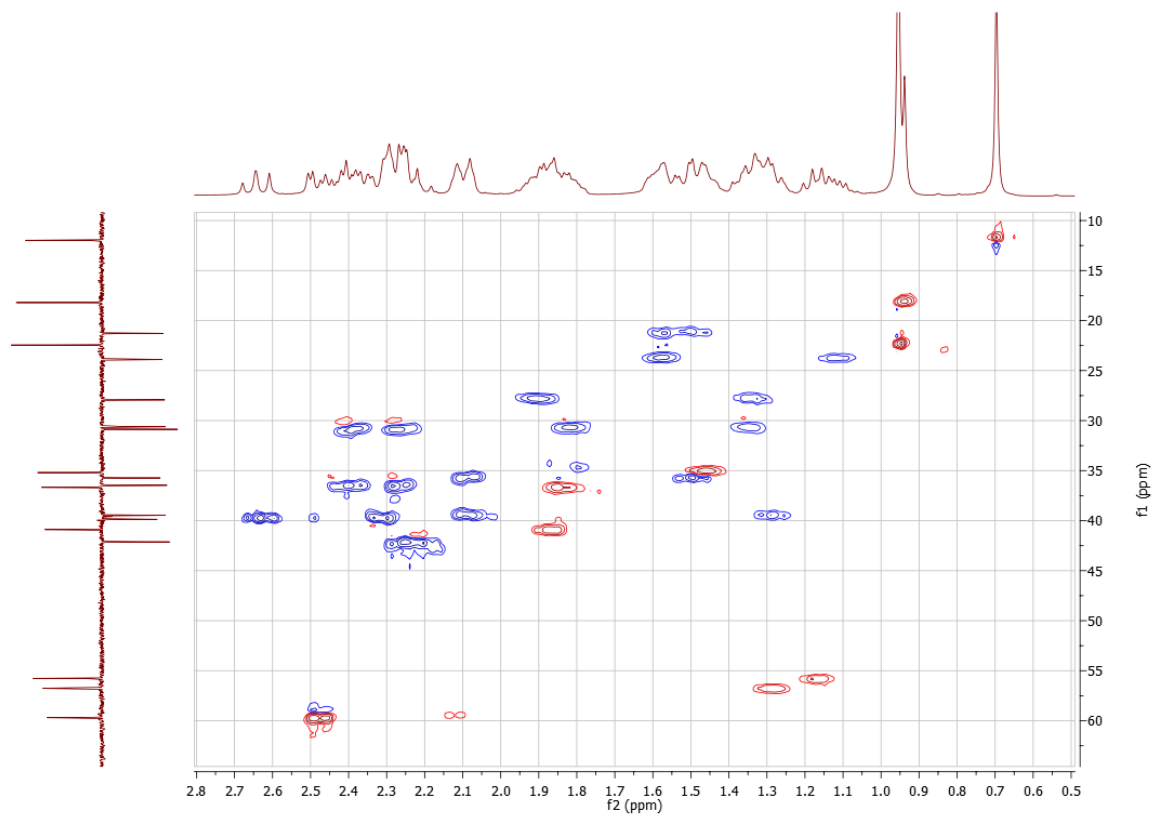
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



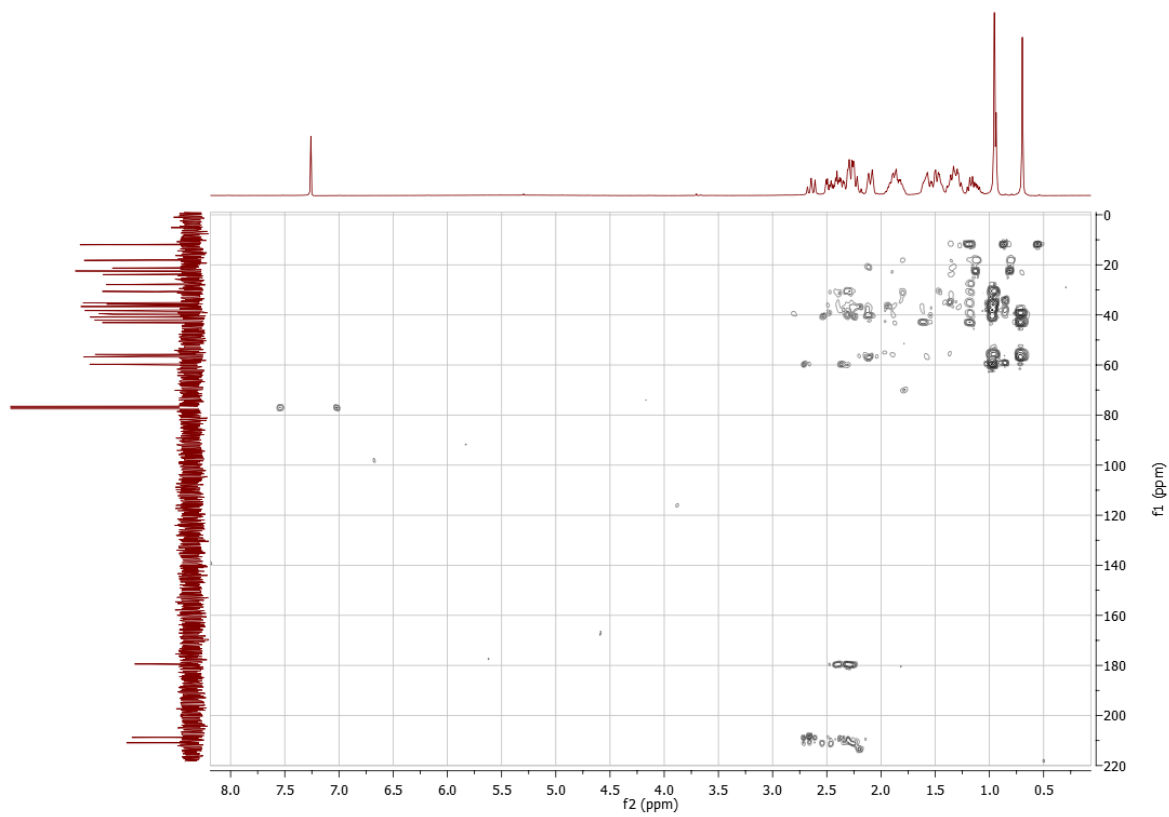
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

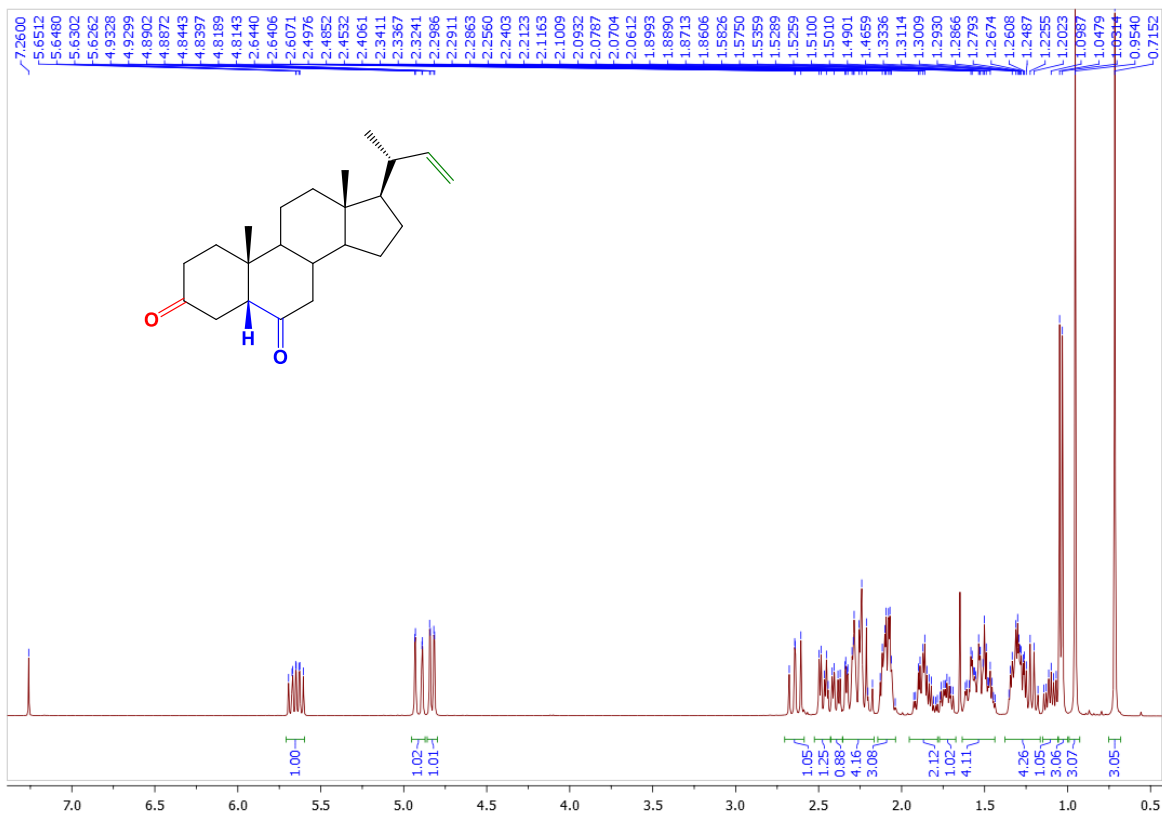


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

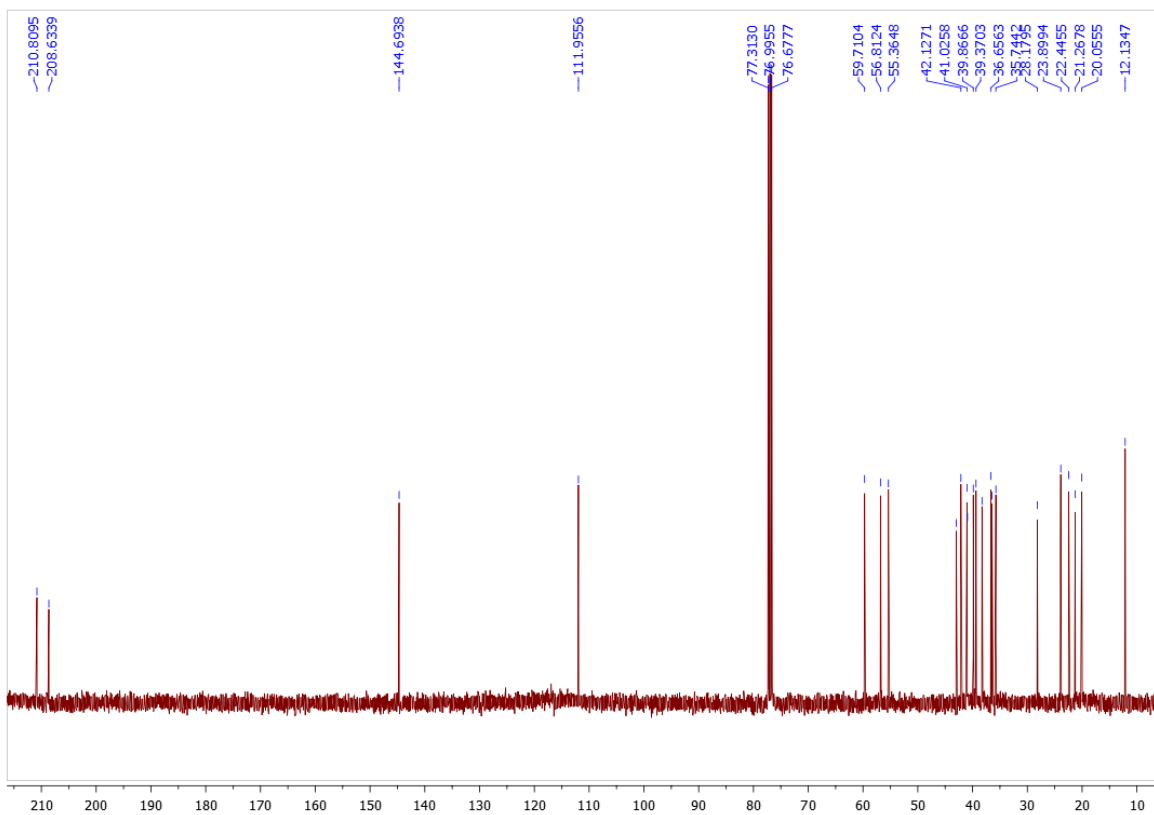


**24-nor-5 $\beta$ -colan-22-en-3,6-diona (41)**

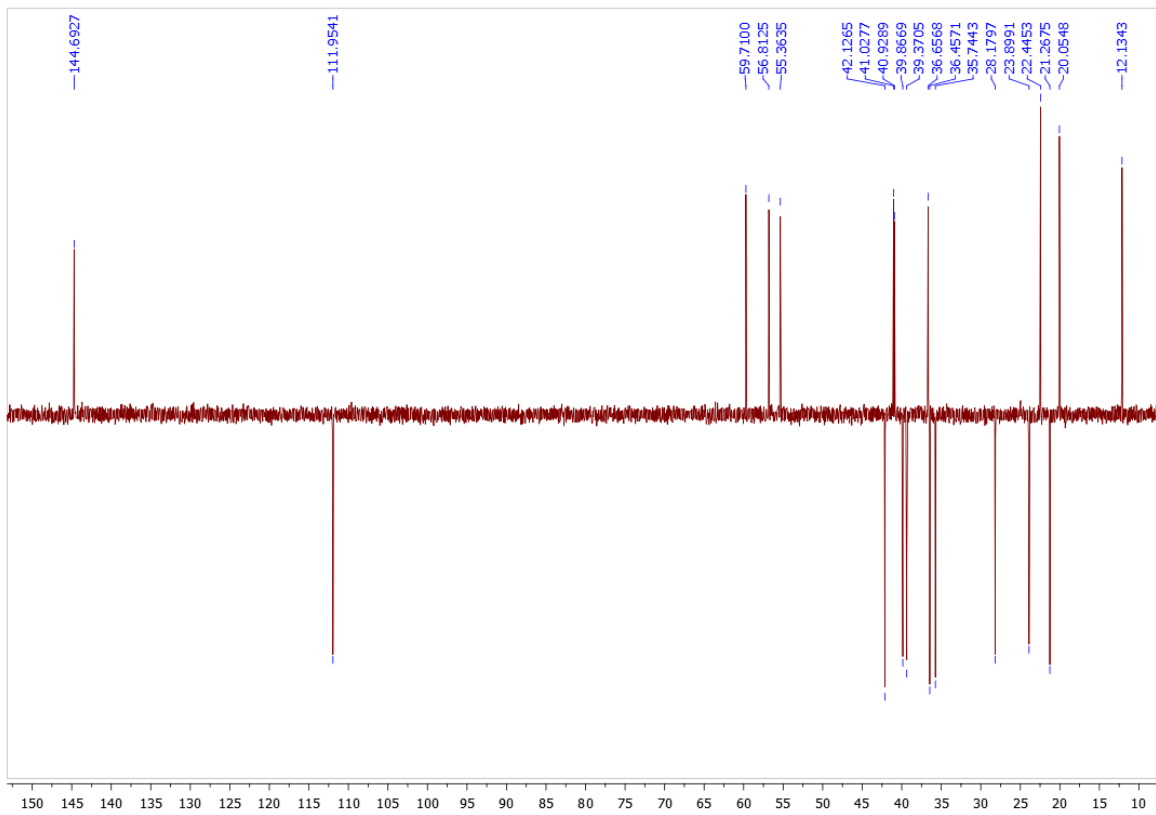
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



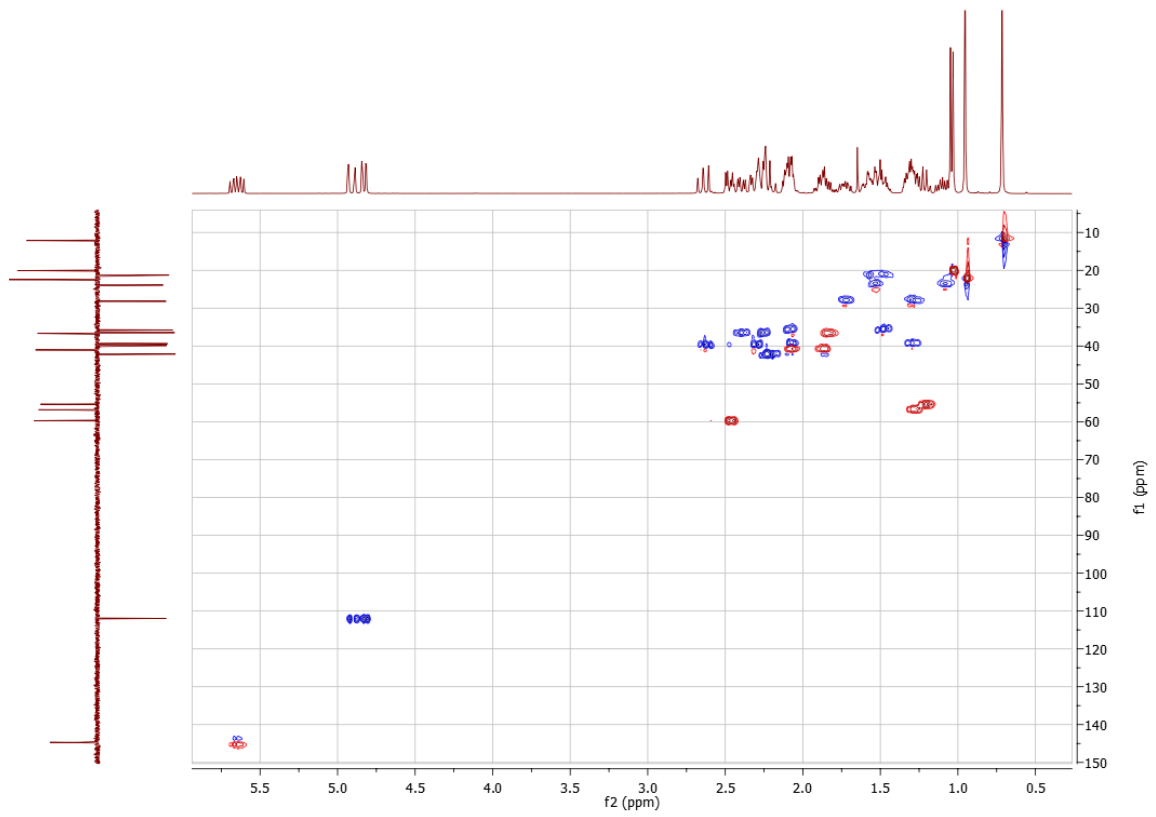
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



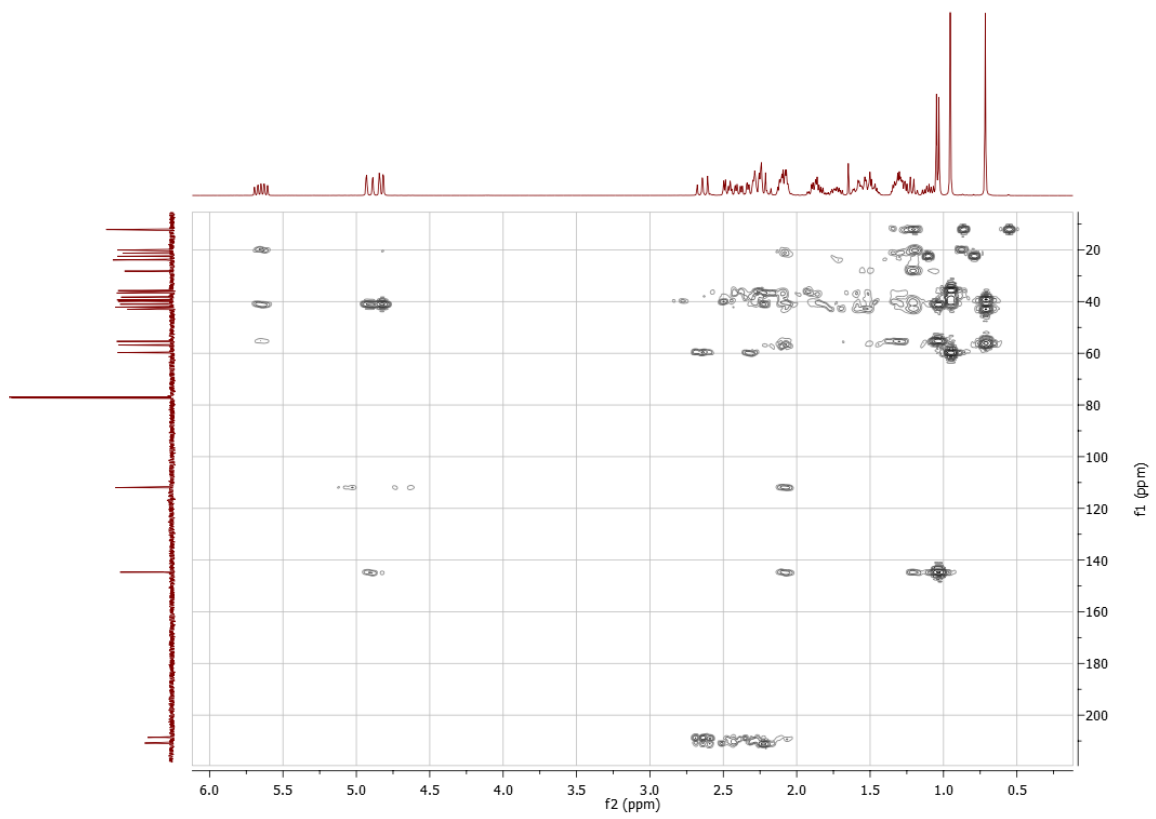
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

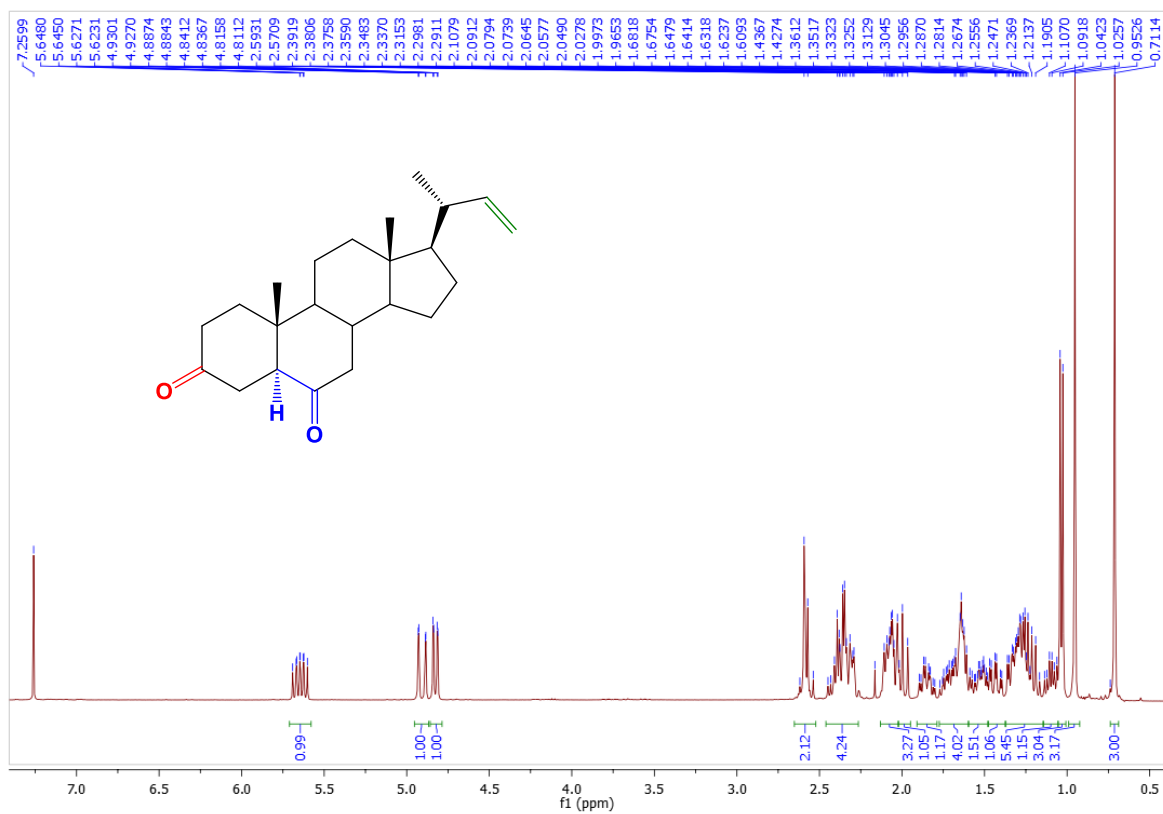


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

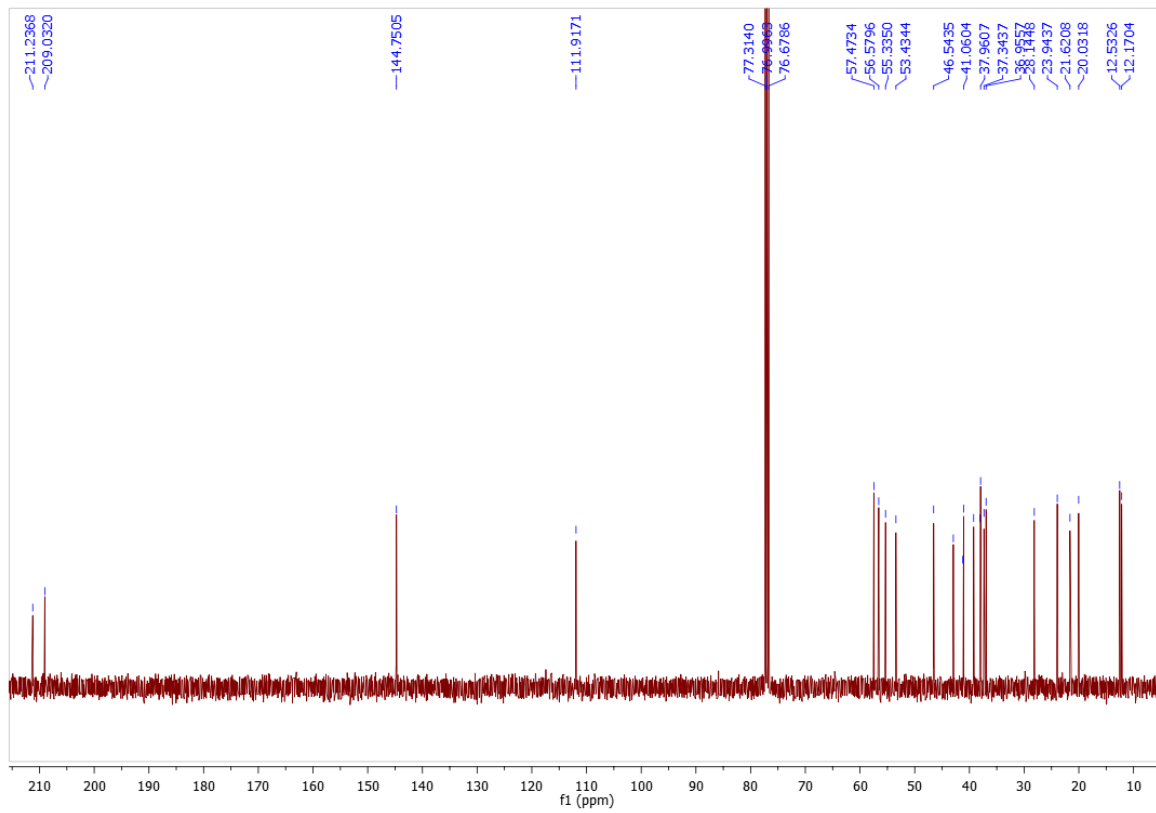


### 24-nor-5 $\alpha$ -colan-22-en-3,6-diona (42)

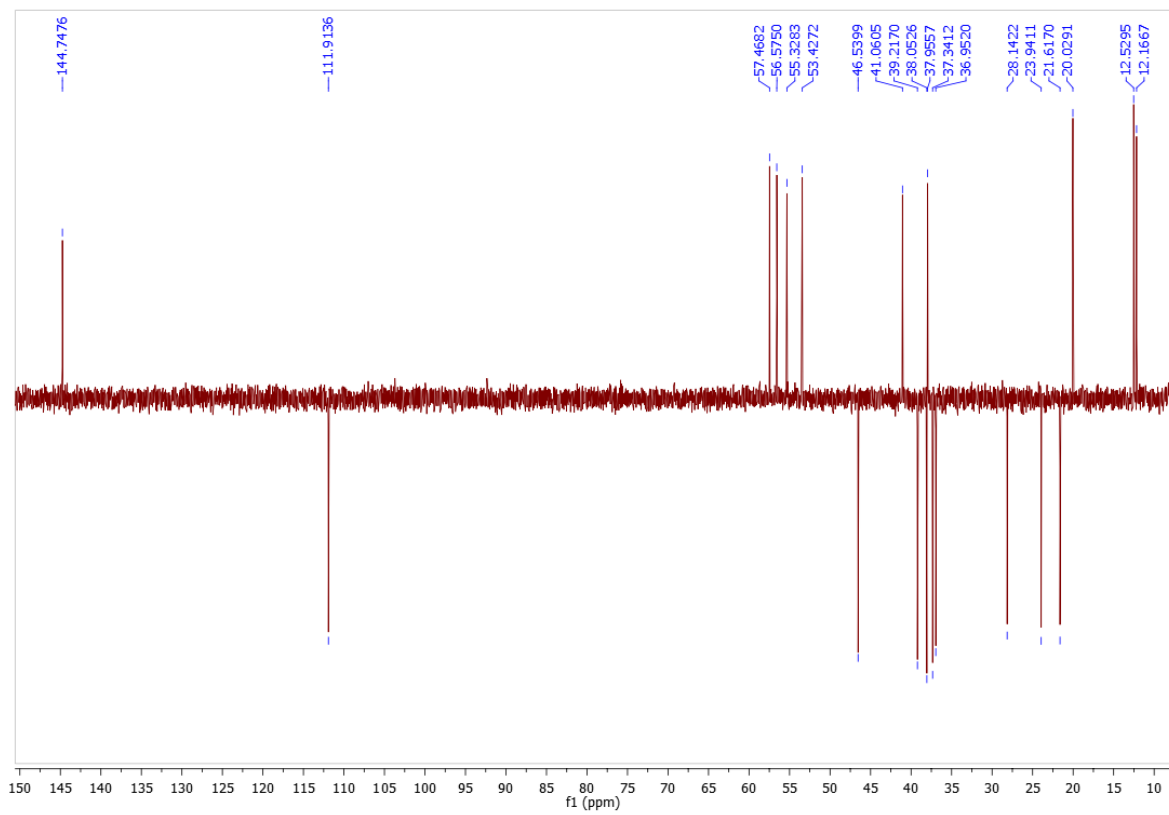
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



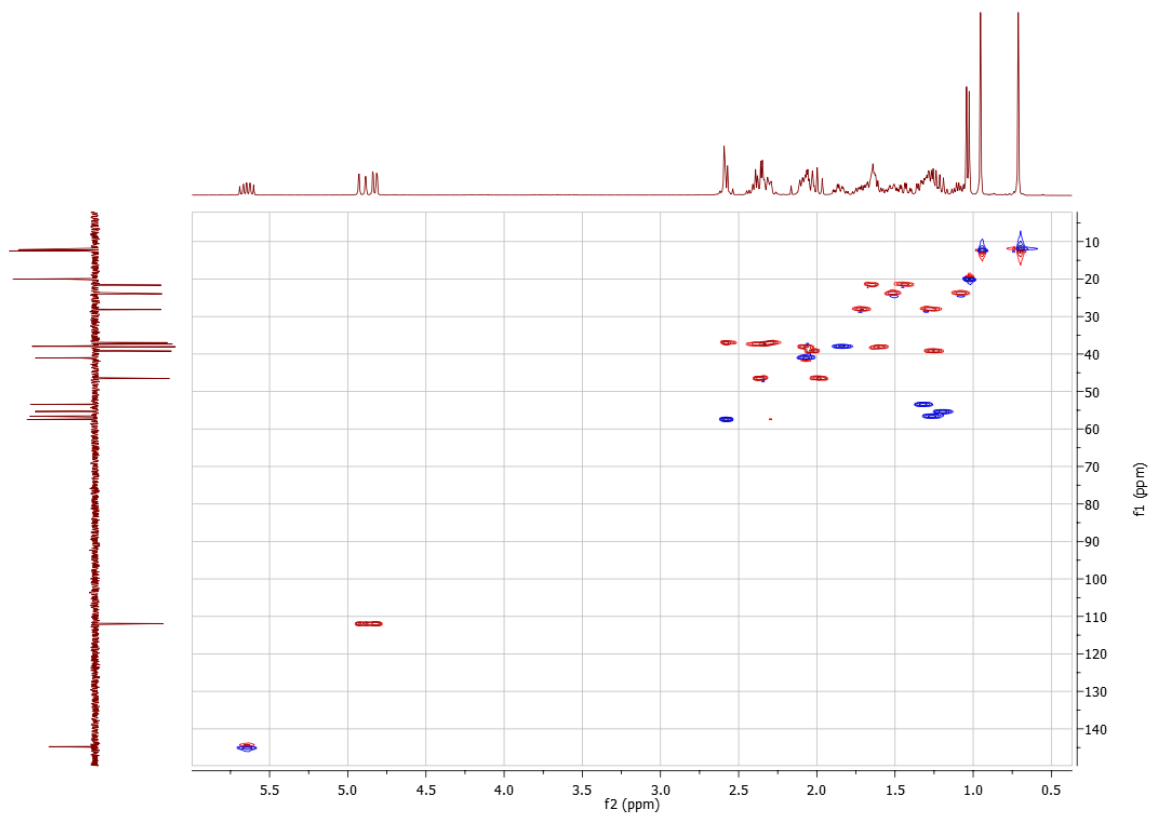
◇ Espectro <sup>13</sup>C-RMN



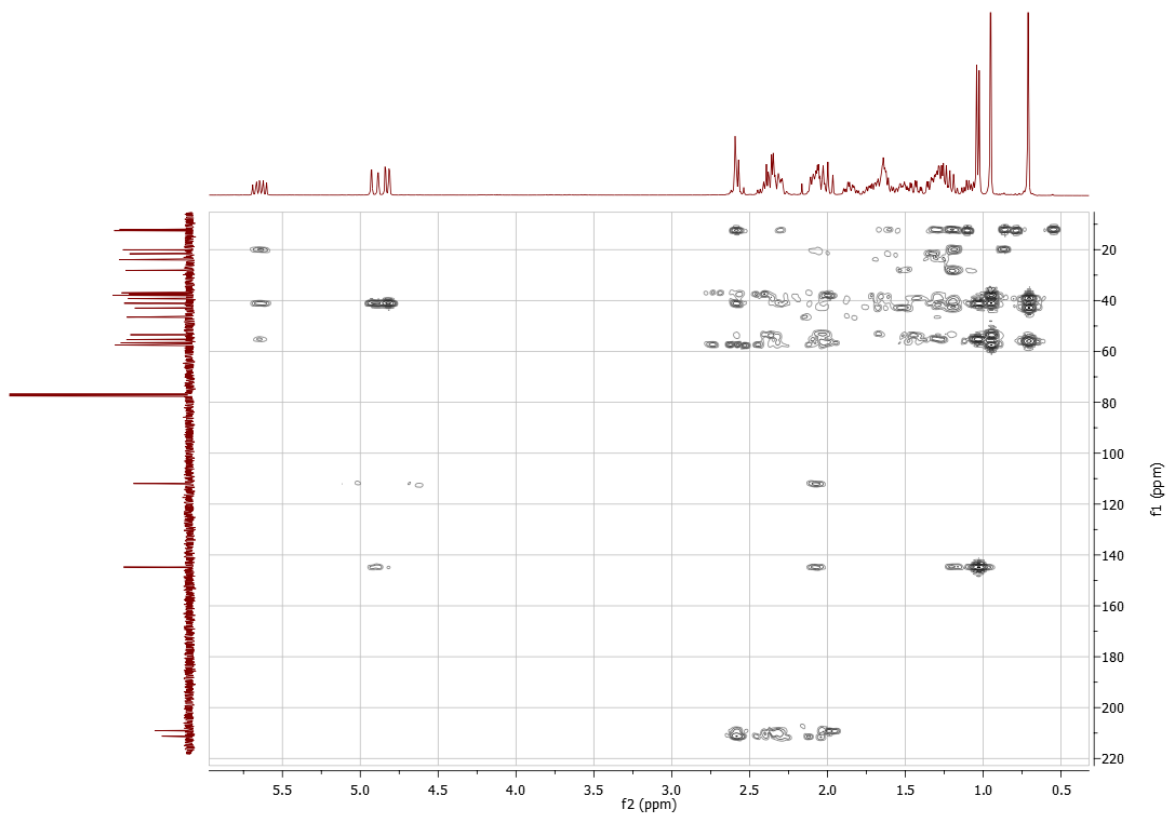
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

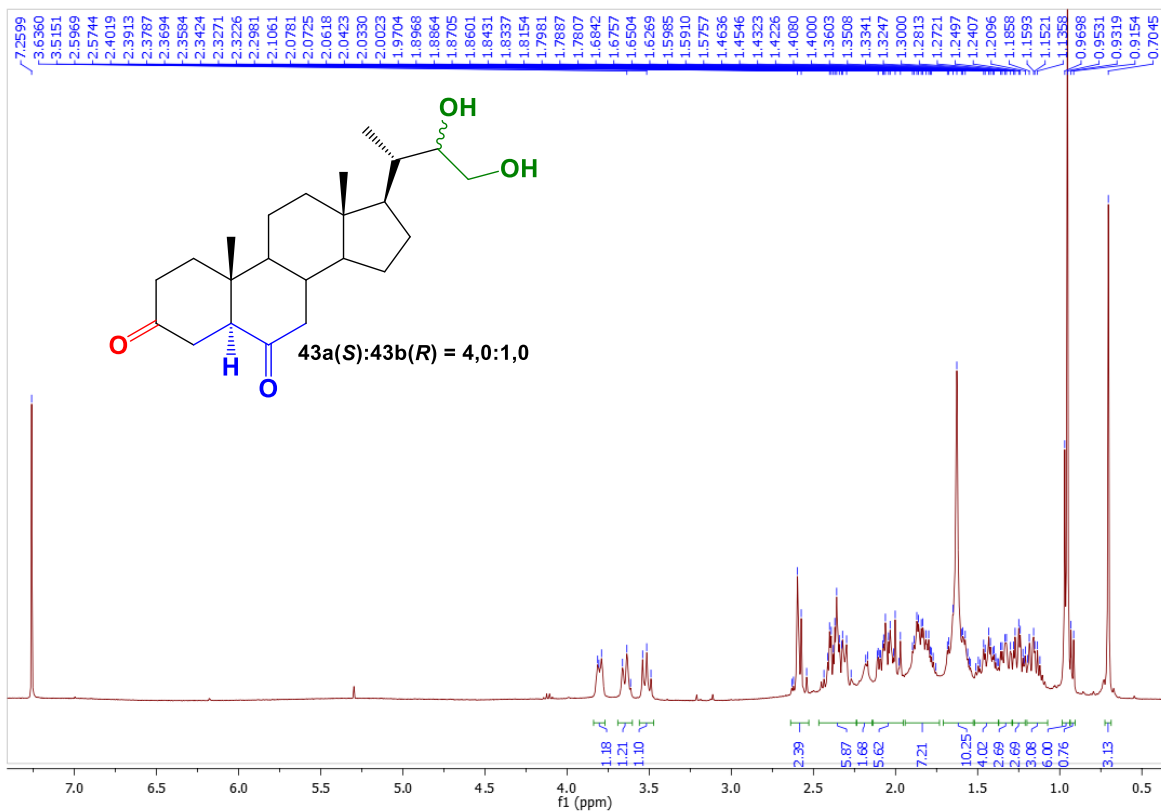


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

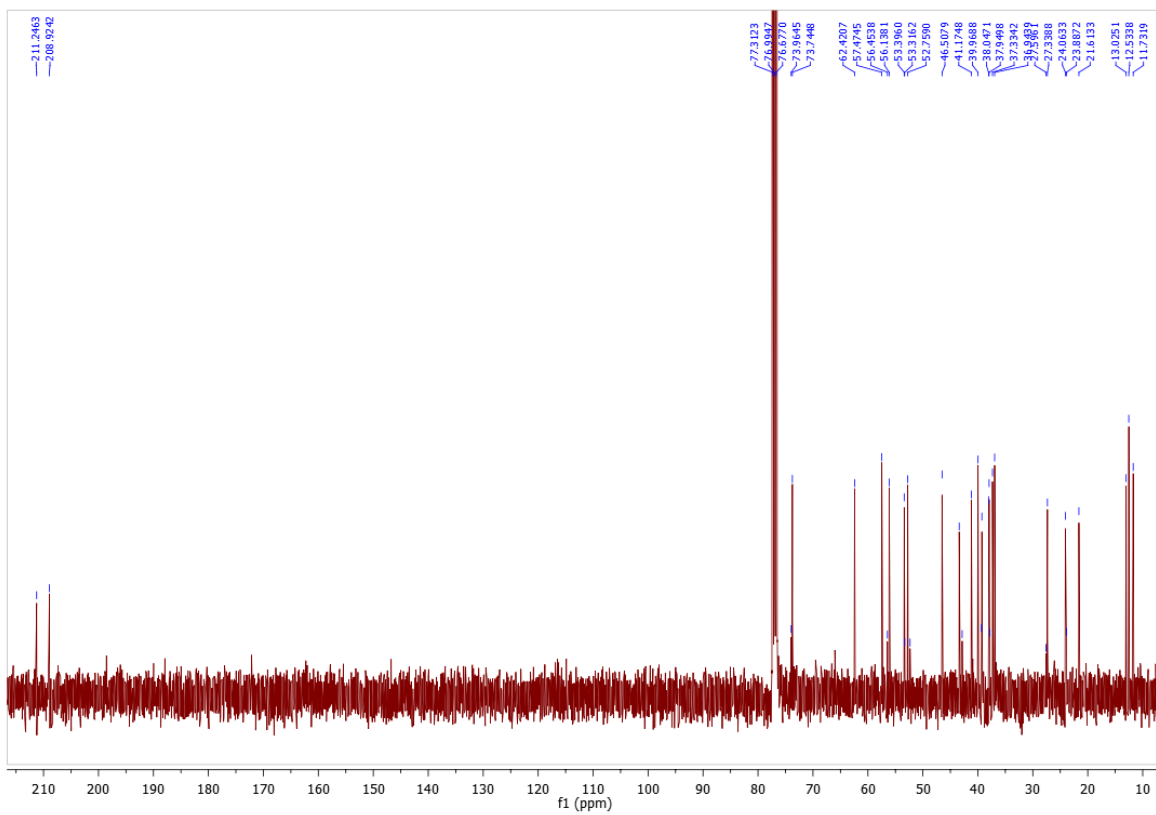


**22(R/S)-23-dihidroxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (43)**

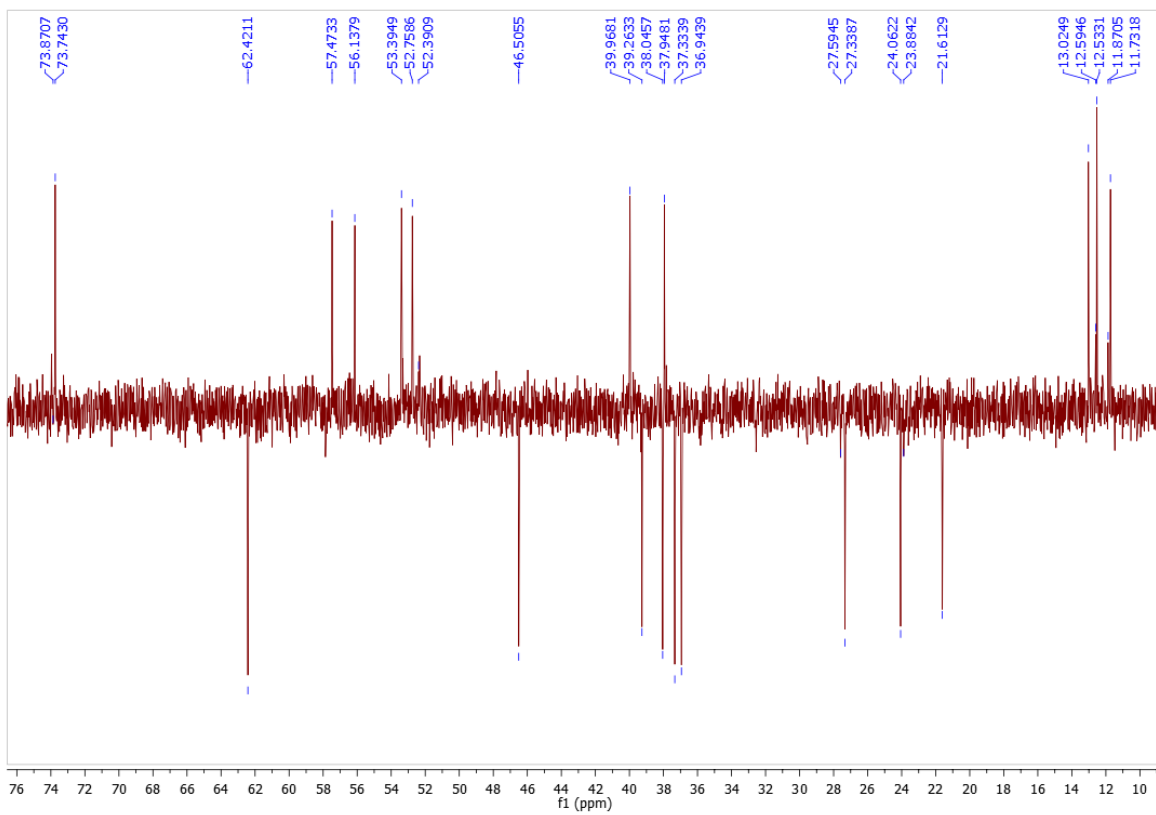
◇ Espectro  $^1\text{H-RMN}$



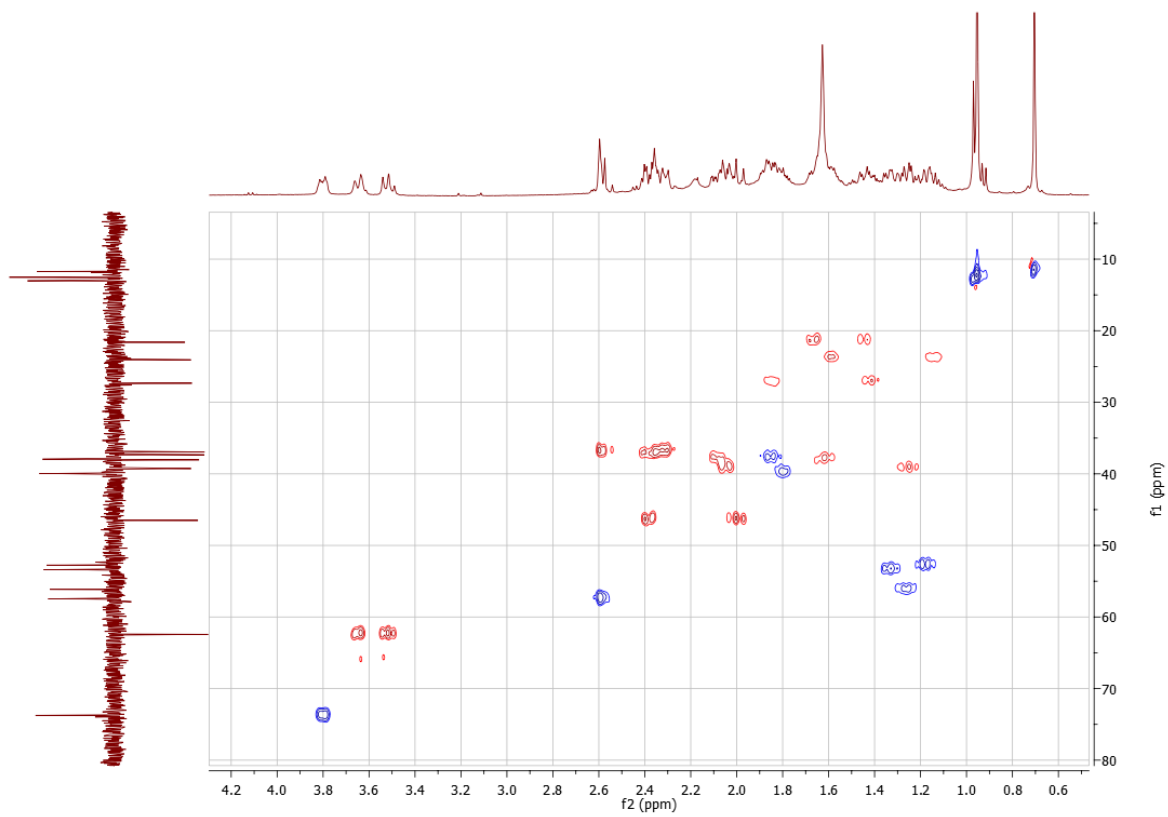
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



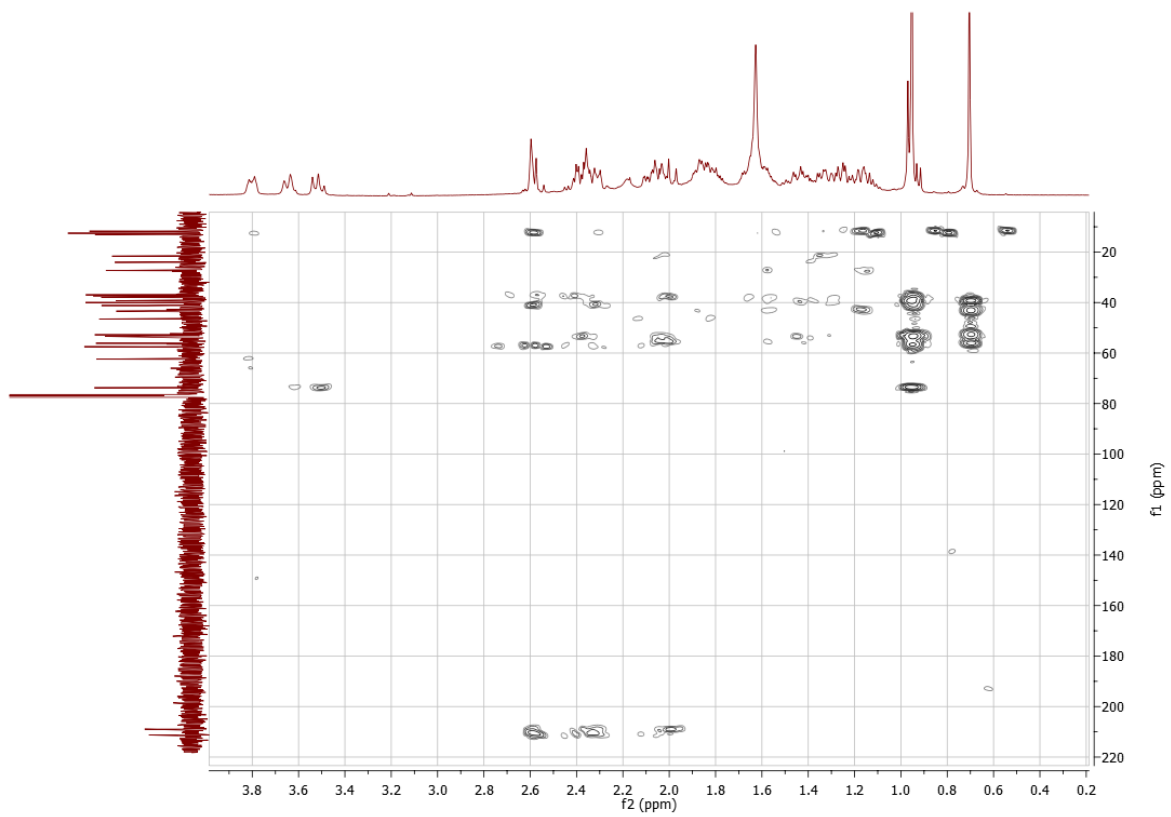
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

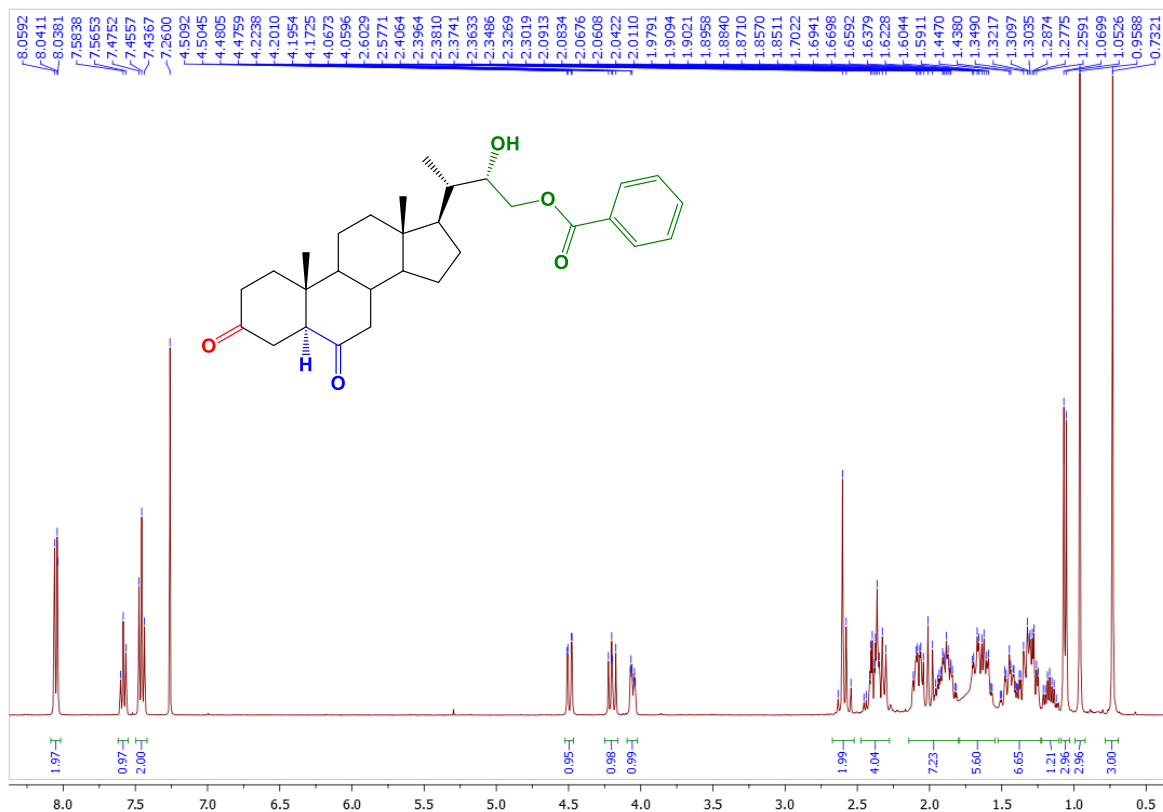


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

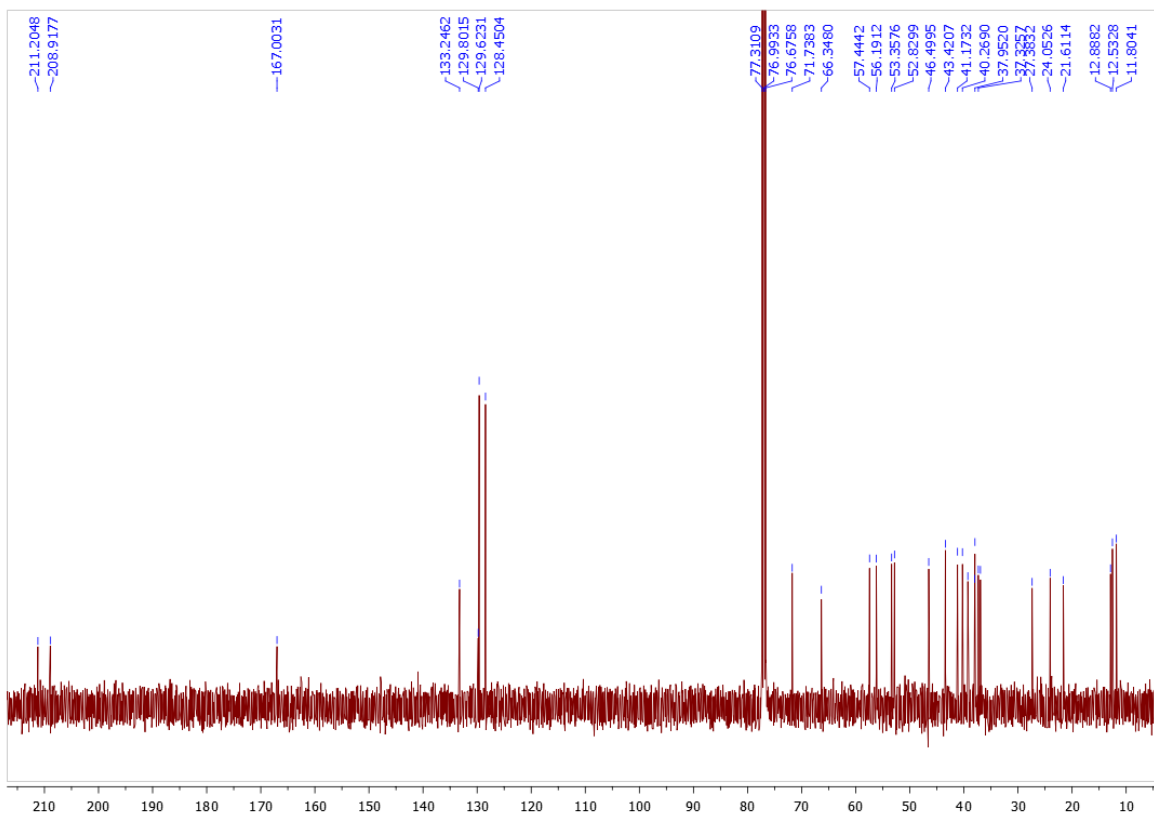


### 22(S)-hidroxi-23-benzoiloxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39a)

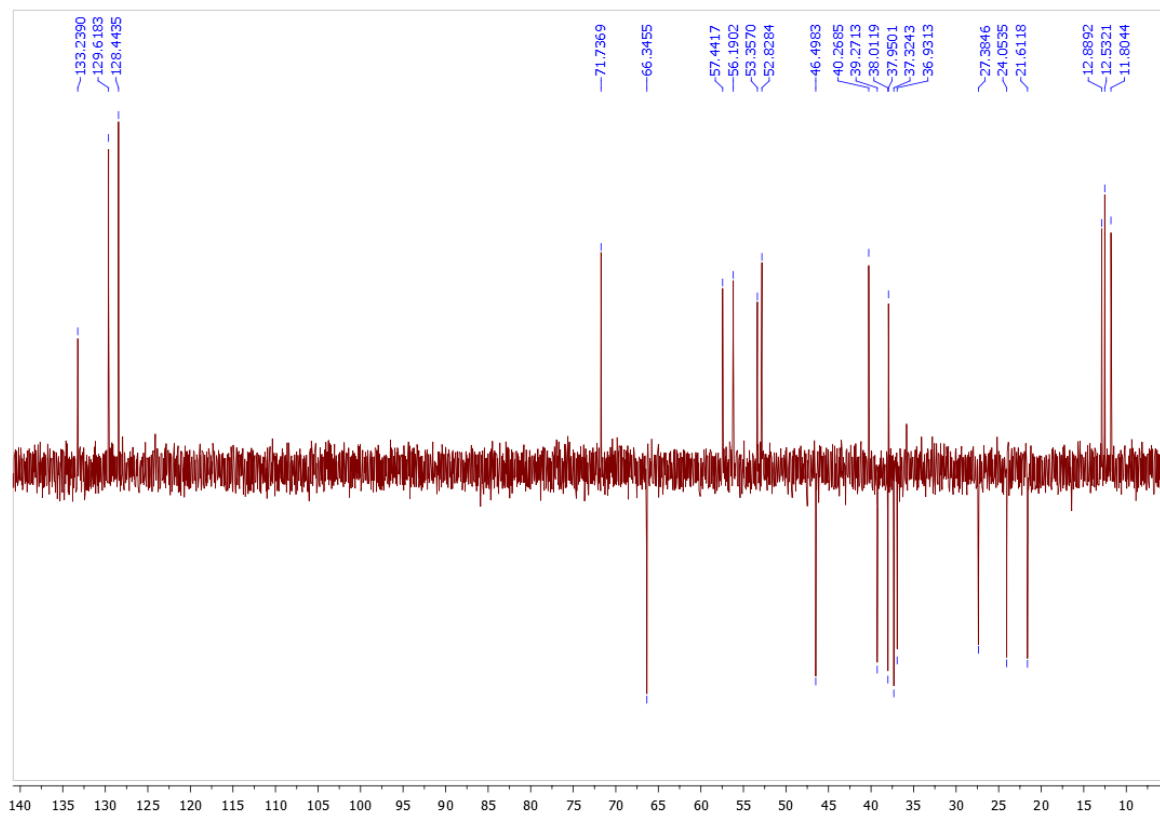
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



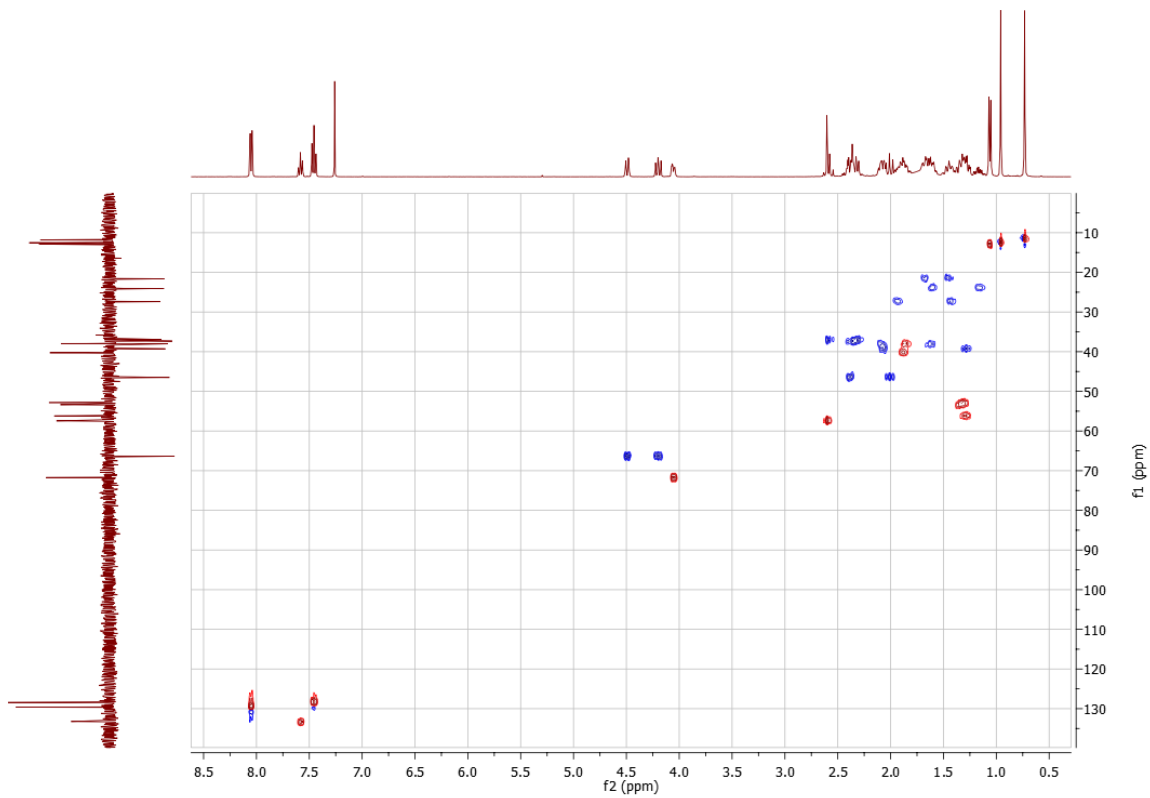
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



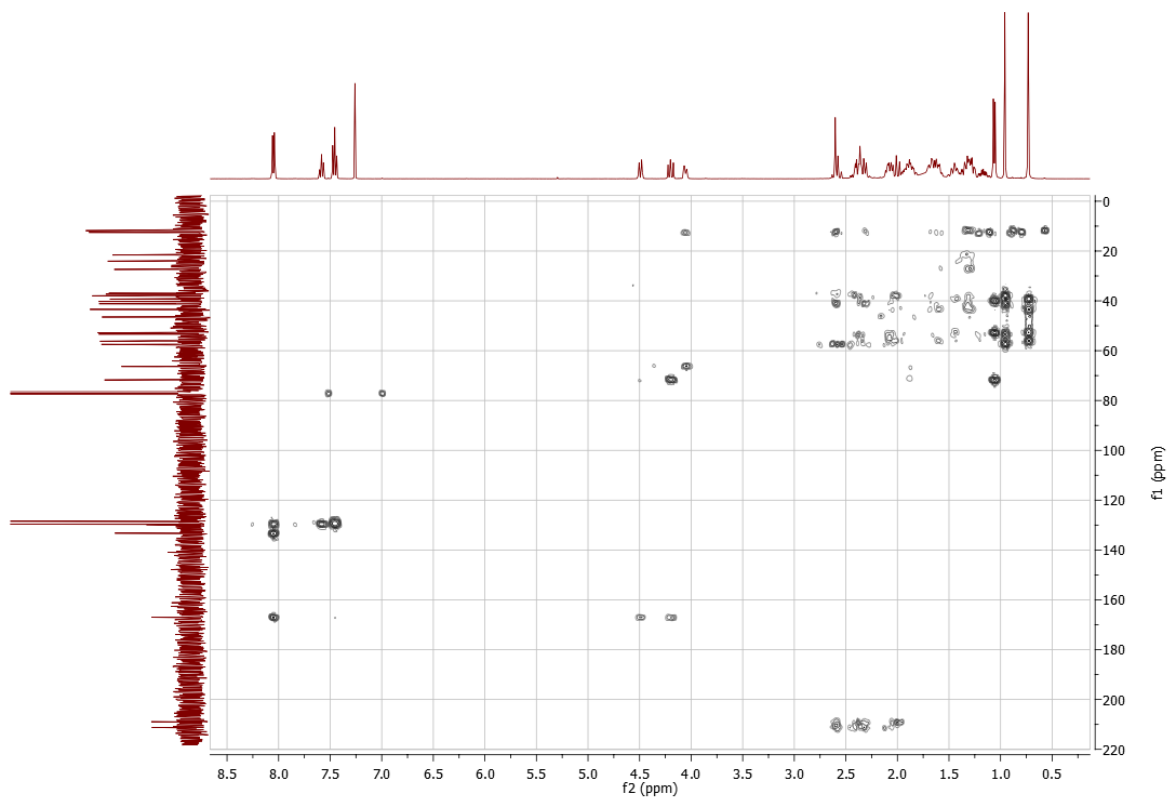
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

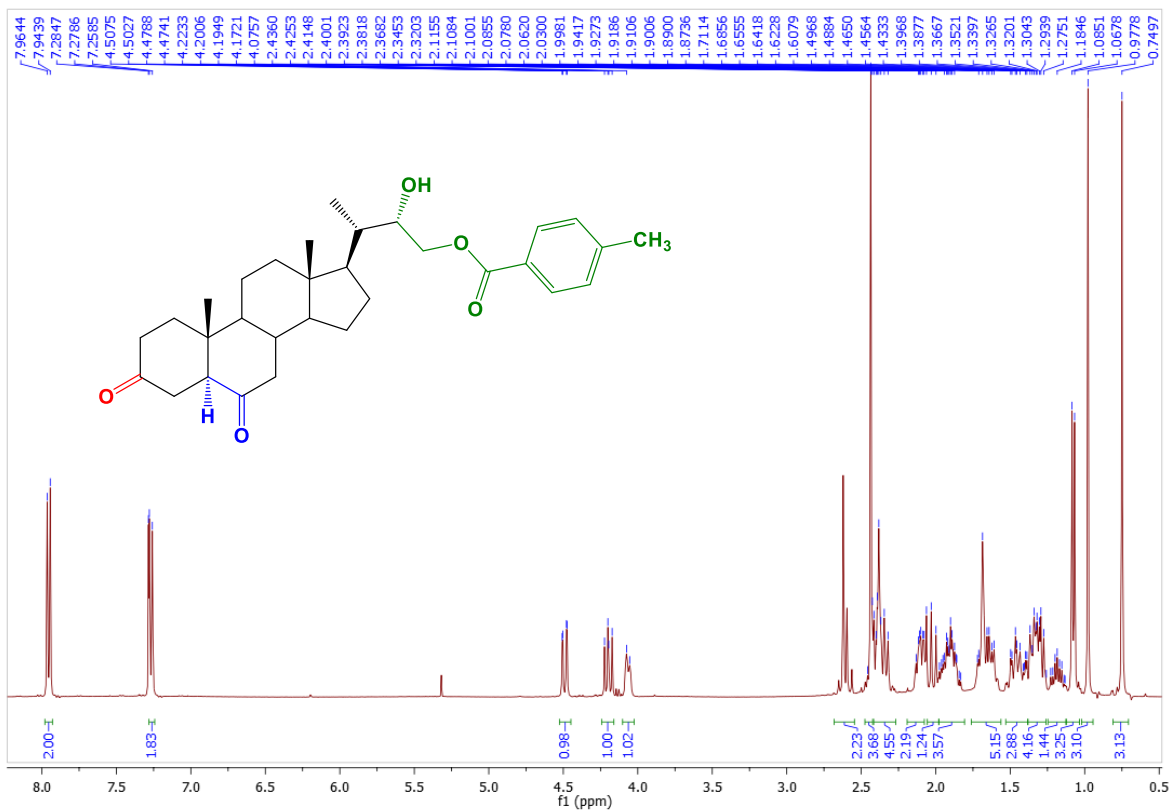


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

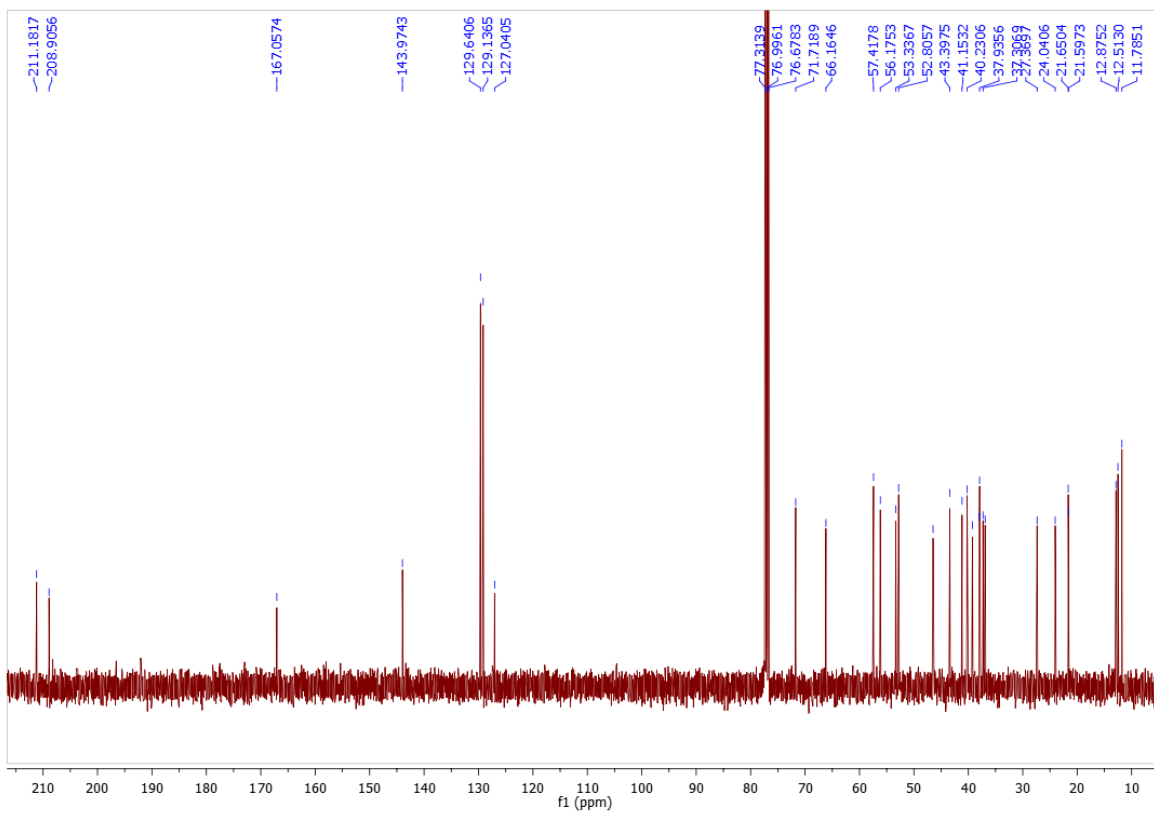


**22(S)-hidroxi-23-(4-metil-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39b)**

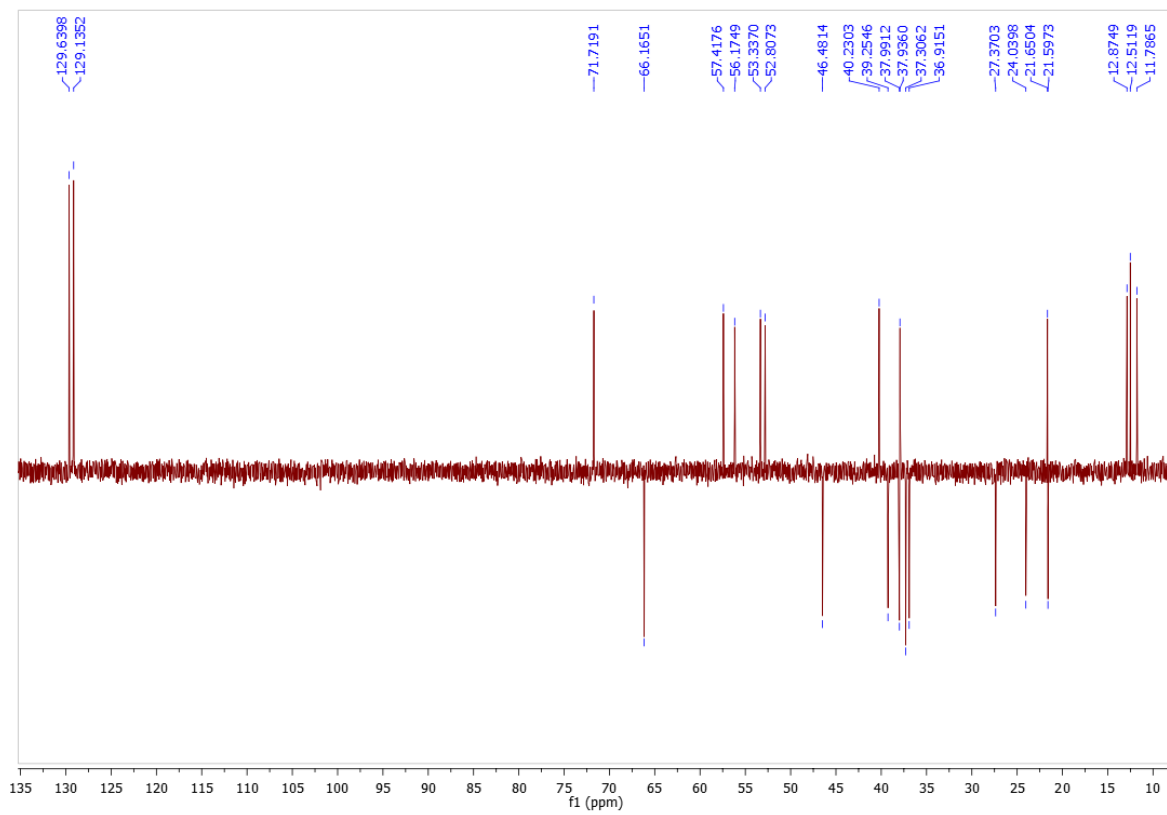
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



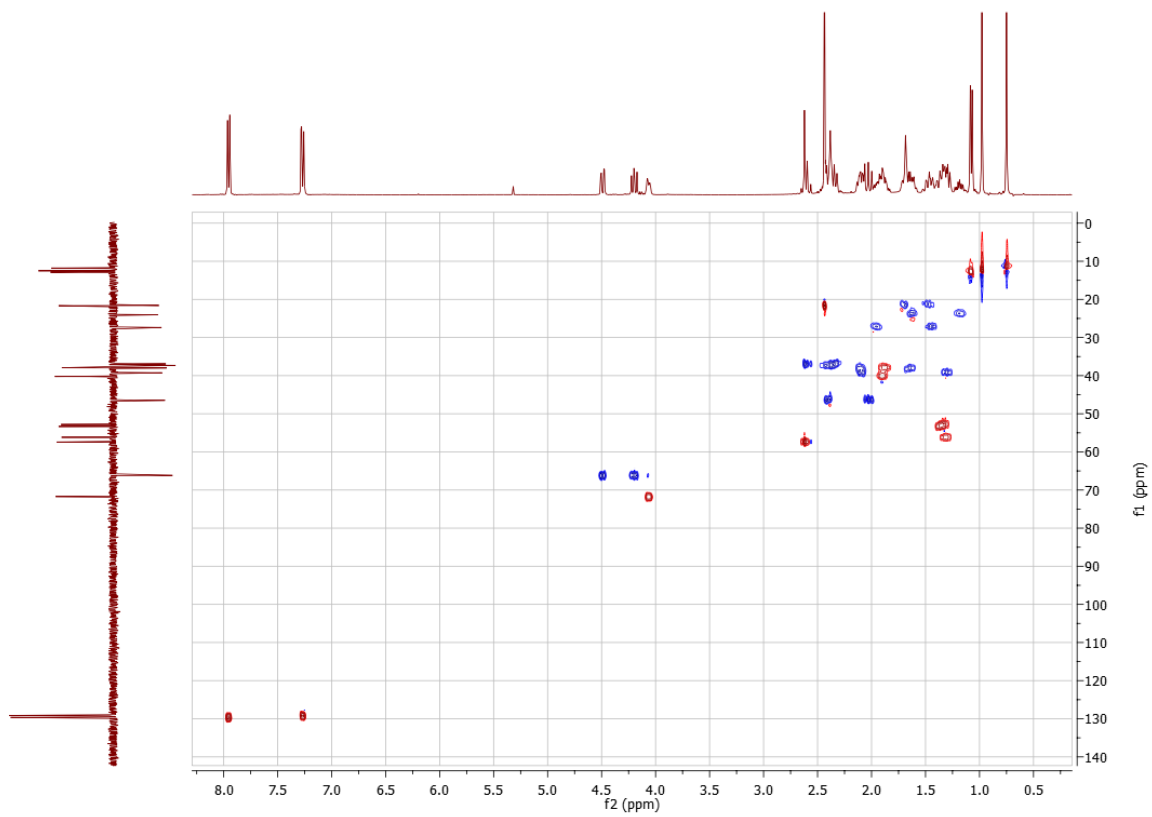
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



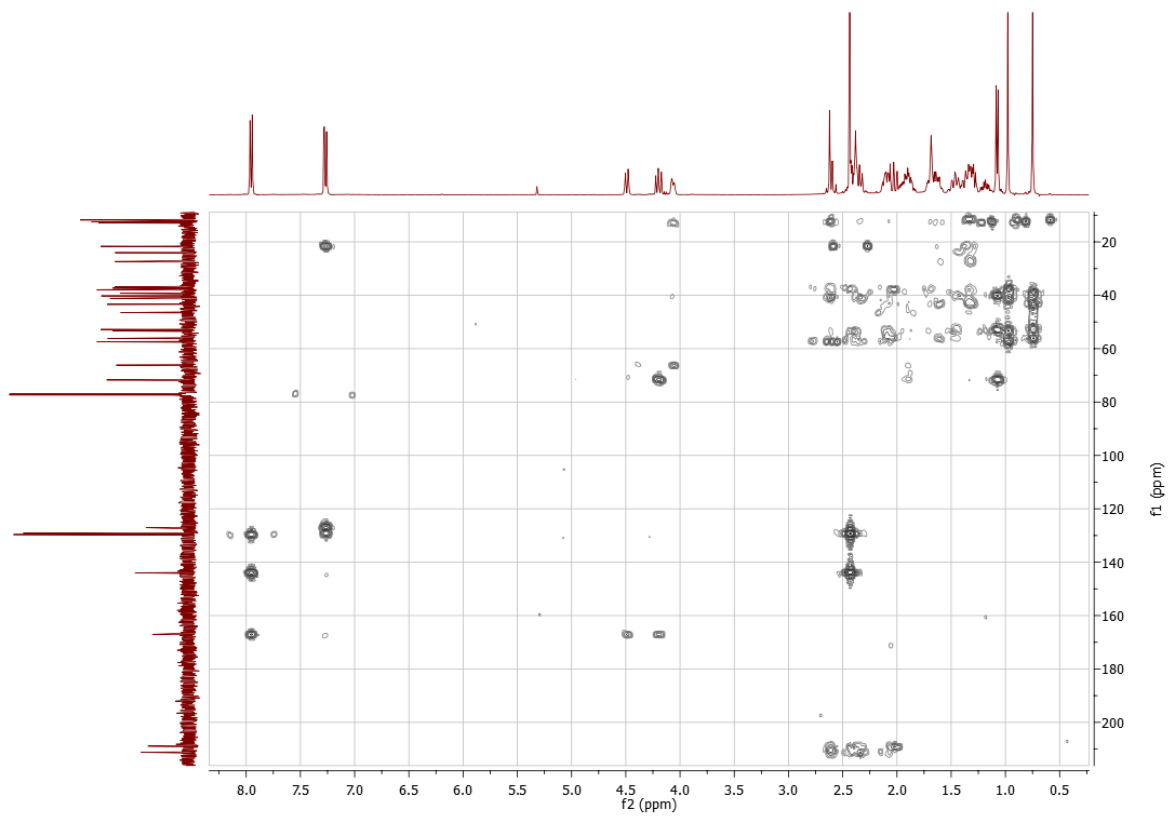
◇ Espectro <sup>13</sup>C/DEPT-135



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

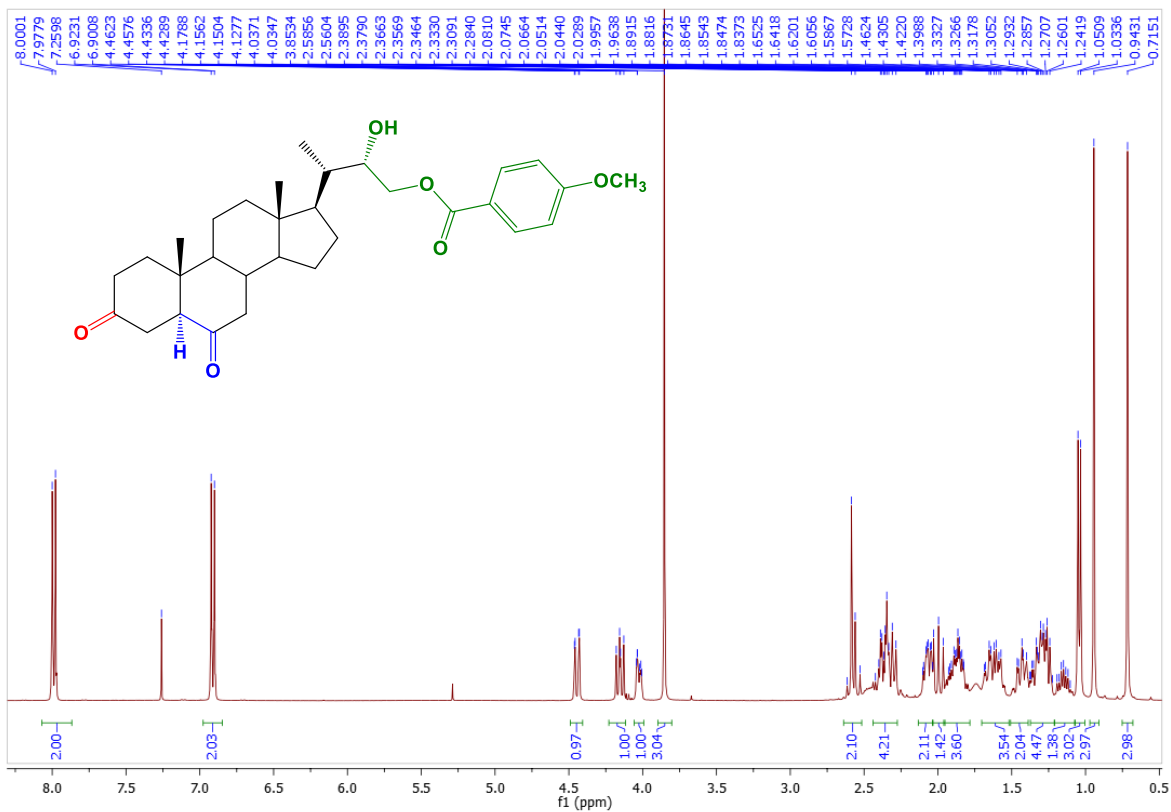


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

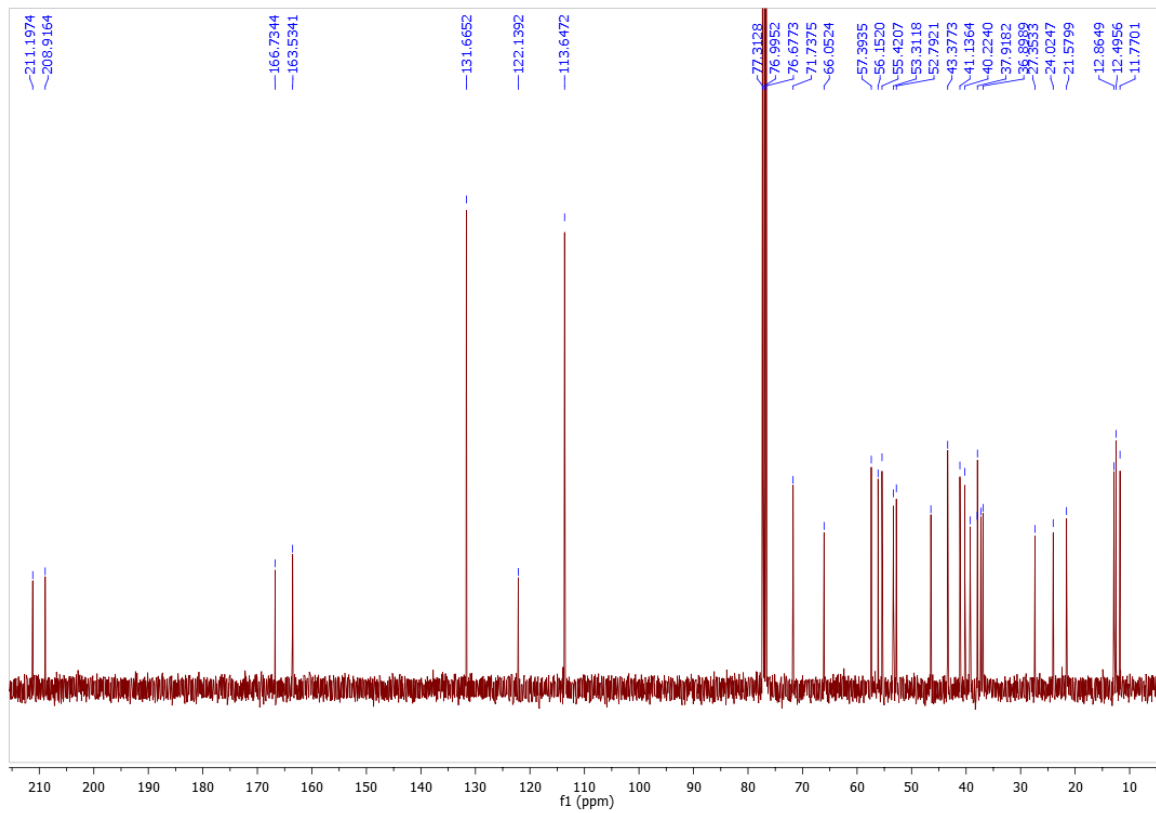


### 22(S)-hidroxi-23-(4-metoxi-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39c)

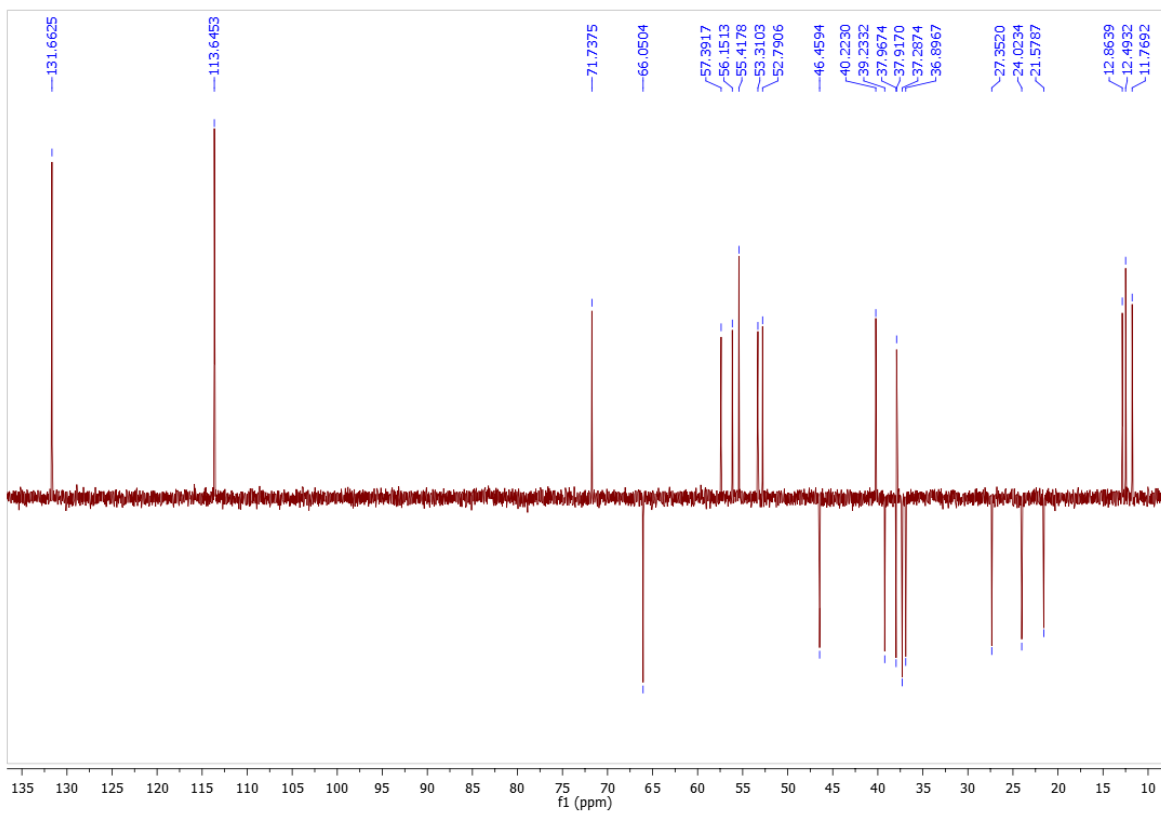
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



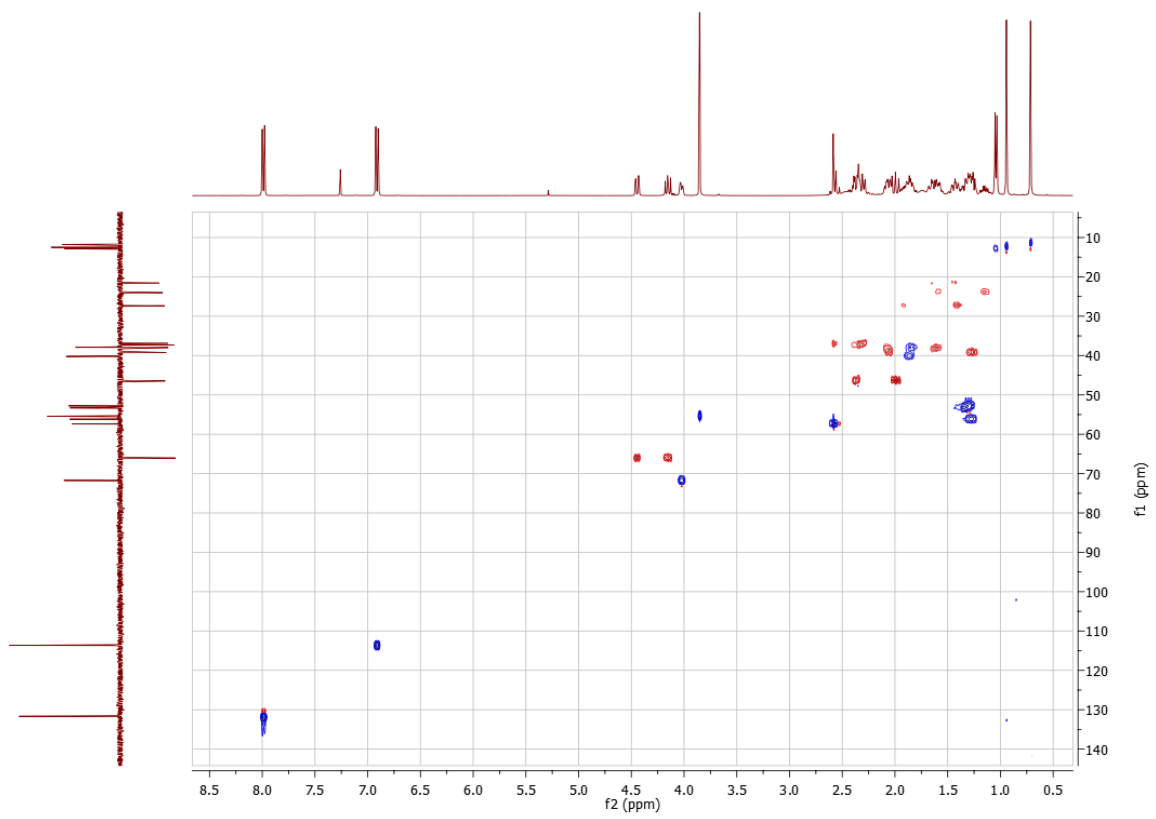
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



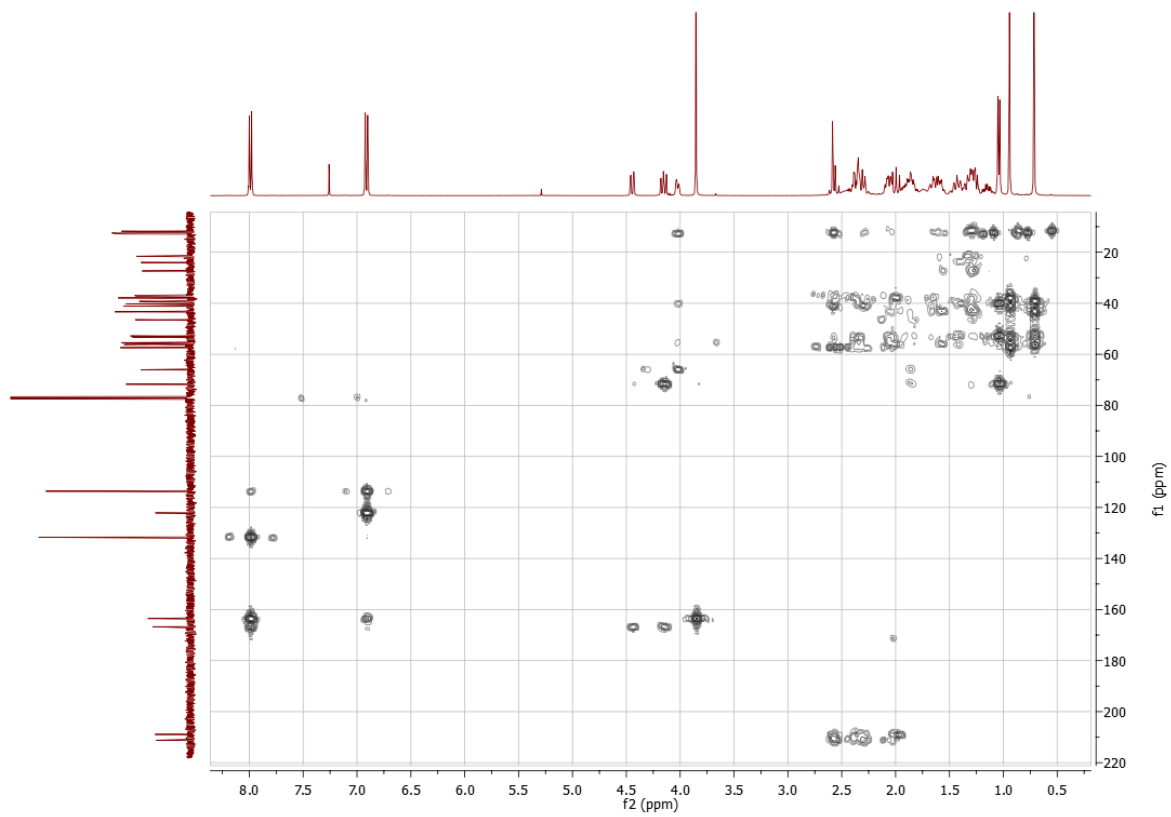
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

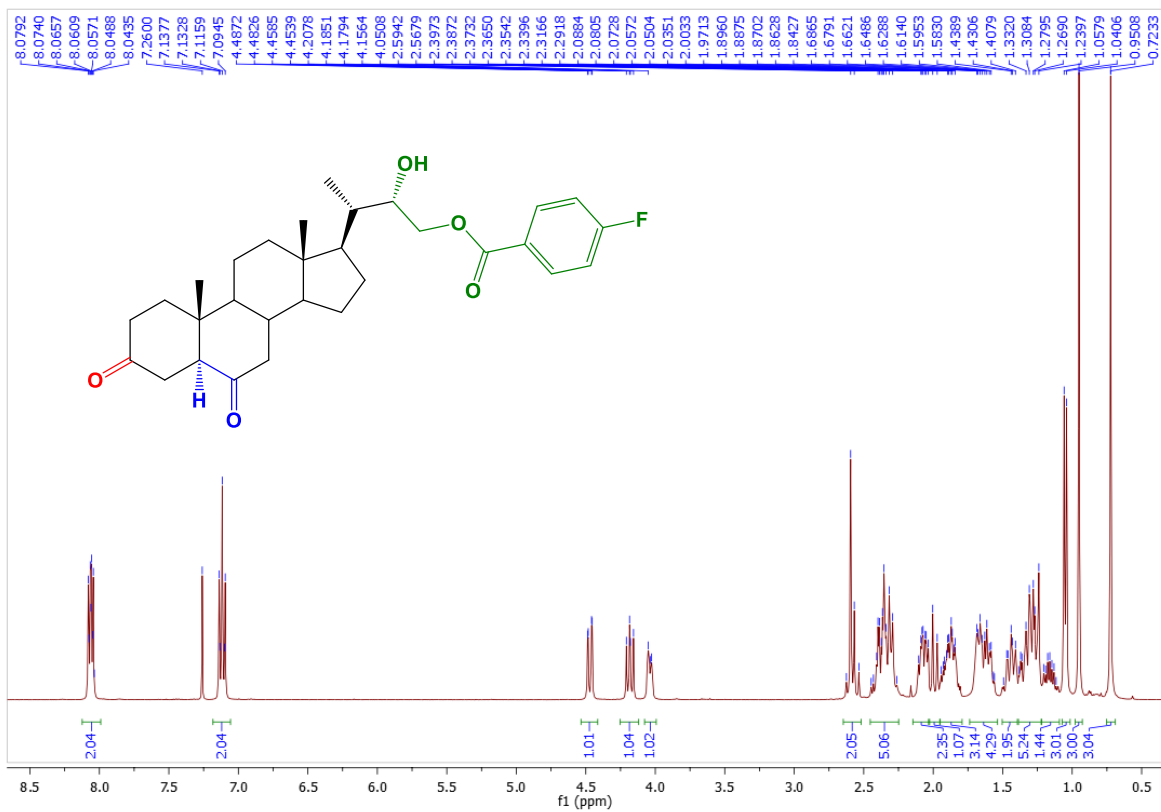


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

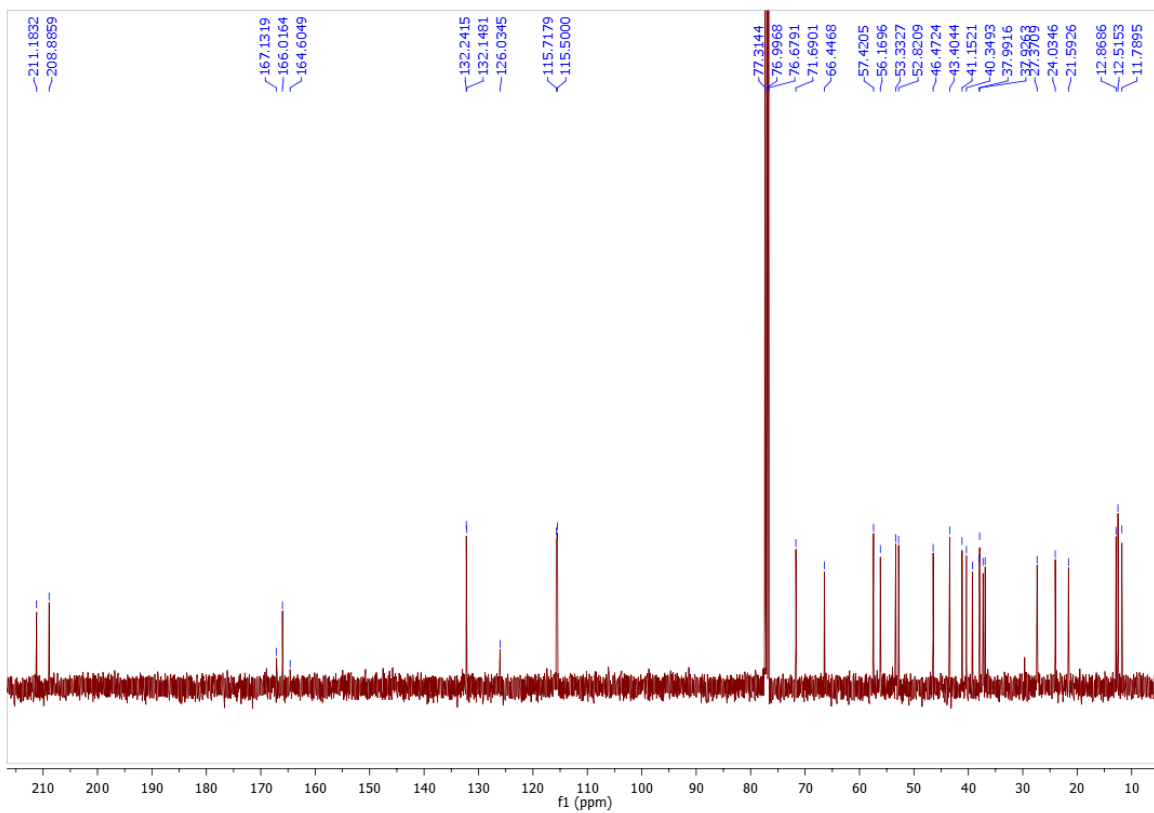


**22(S)-hidroxi-23-(4-fluoro-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39d)**

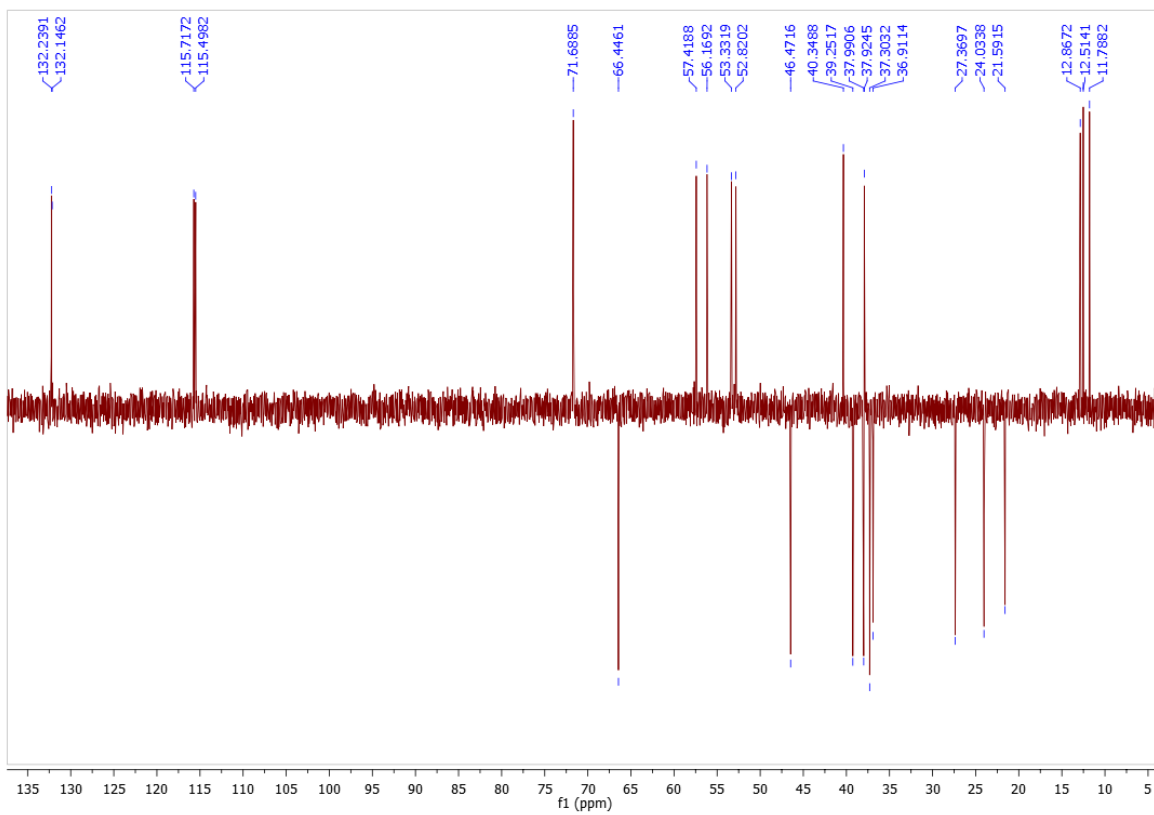
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



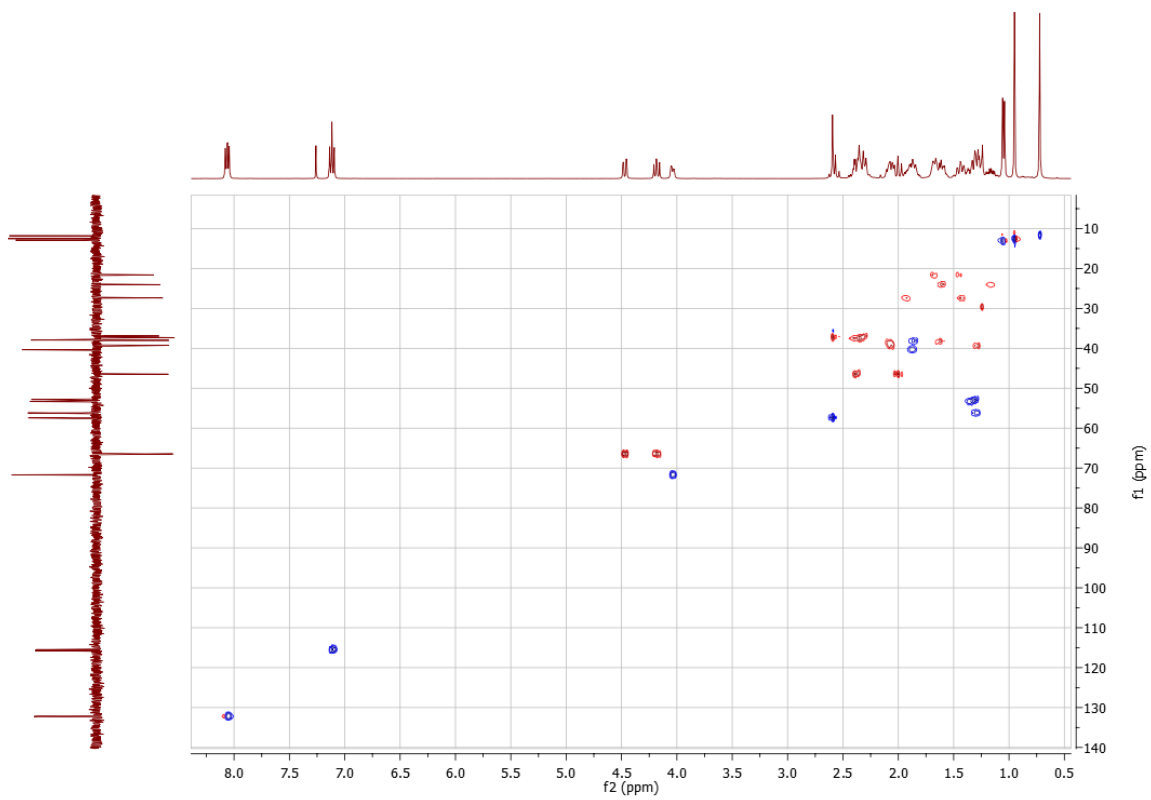
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



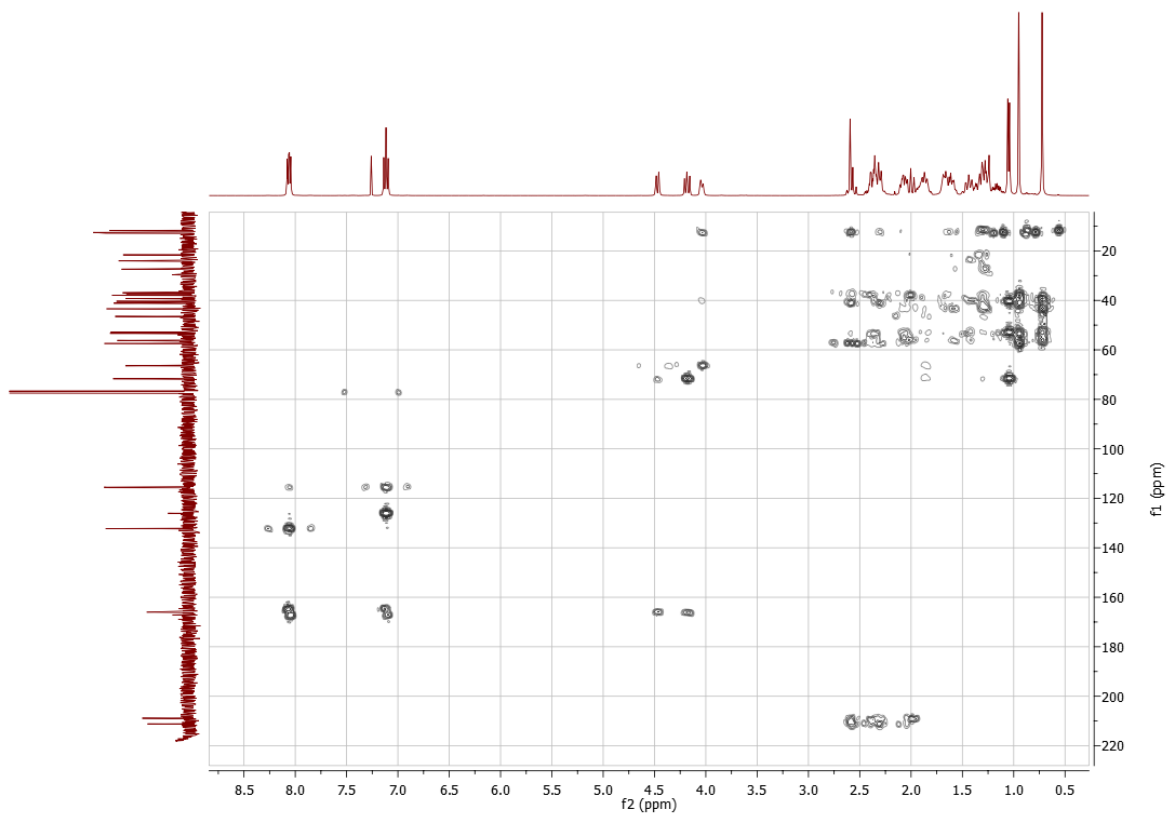
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

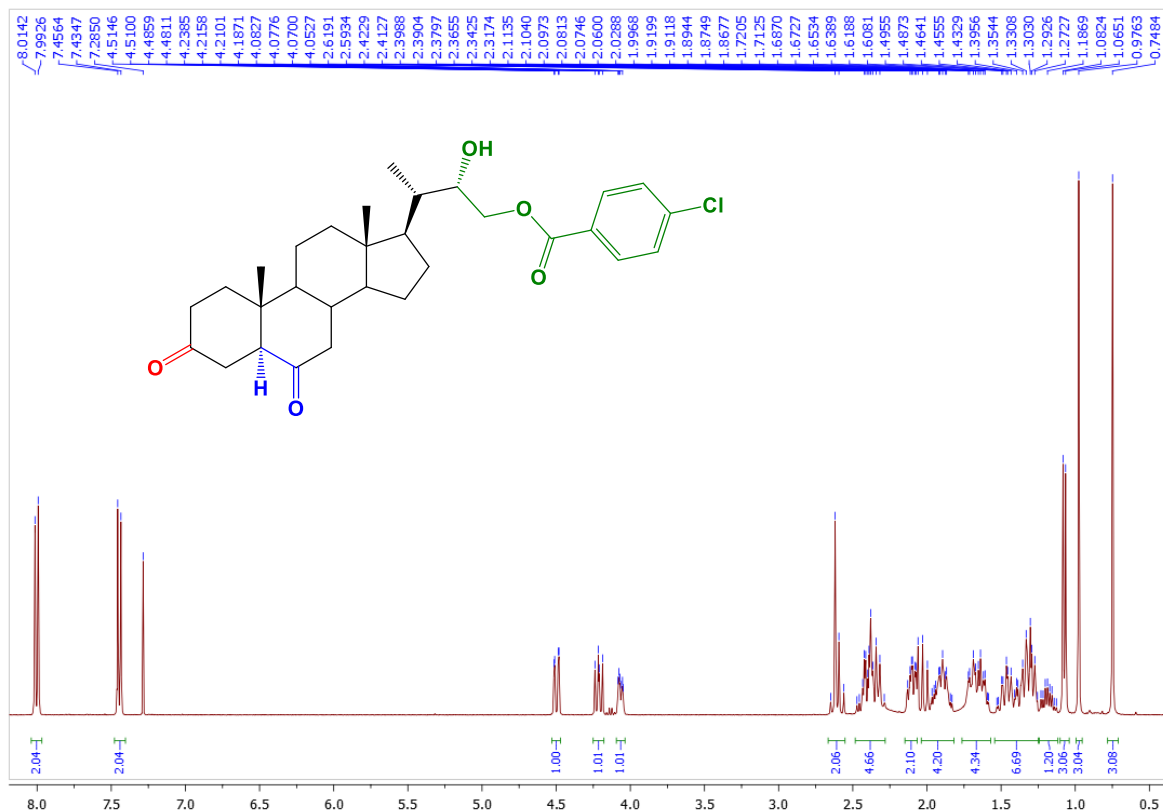


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

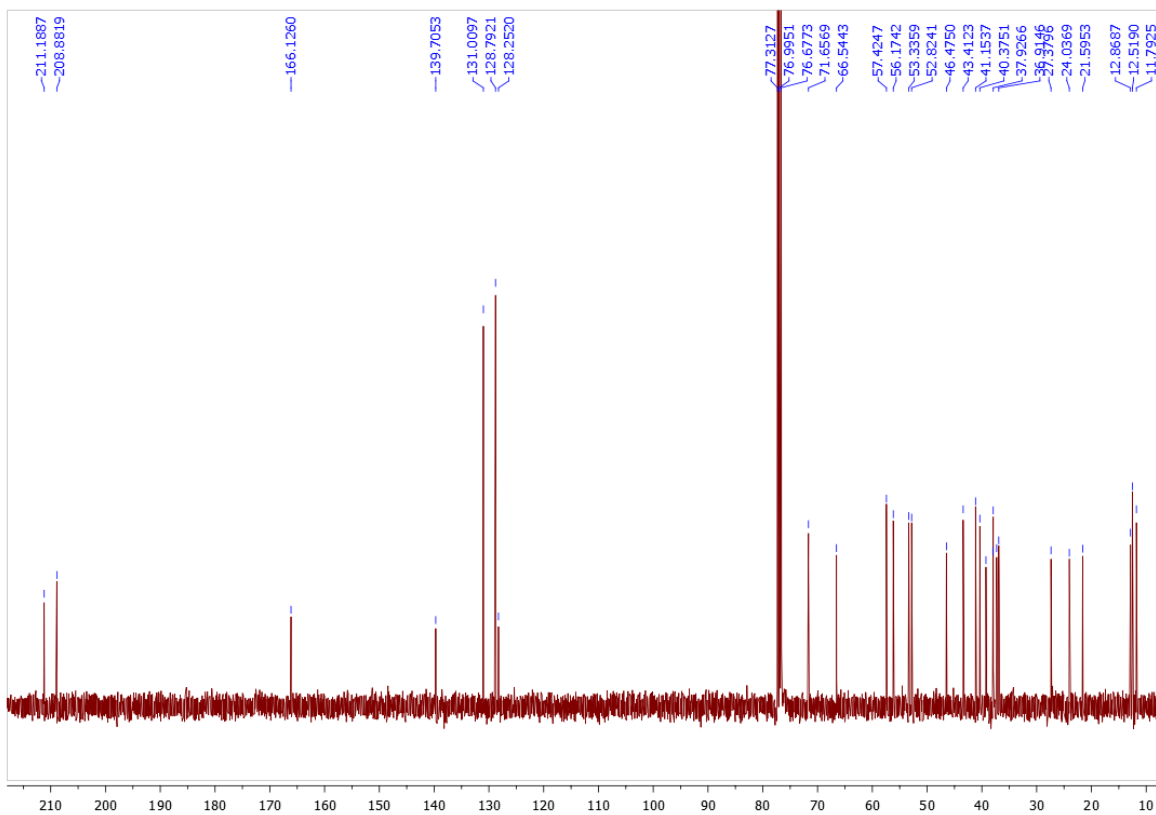


### 22(S)-hidroxi-23-(4-cloro-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39e)

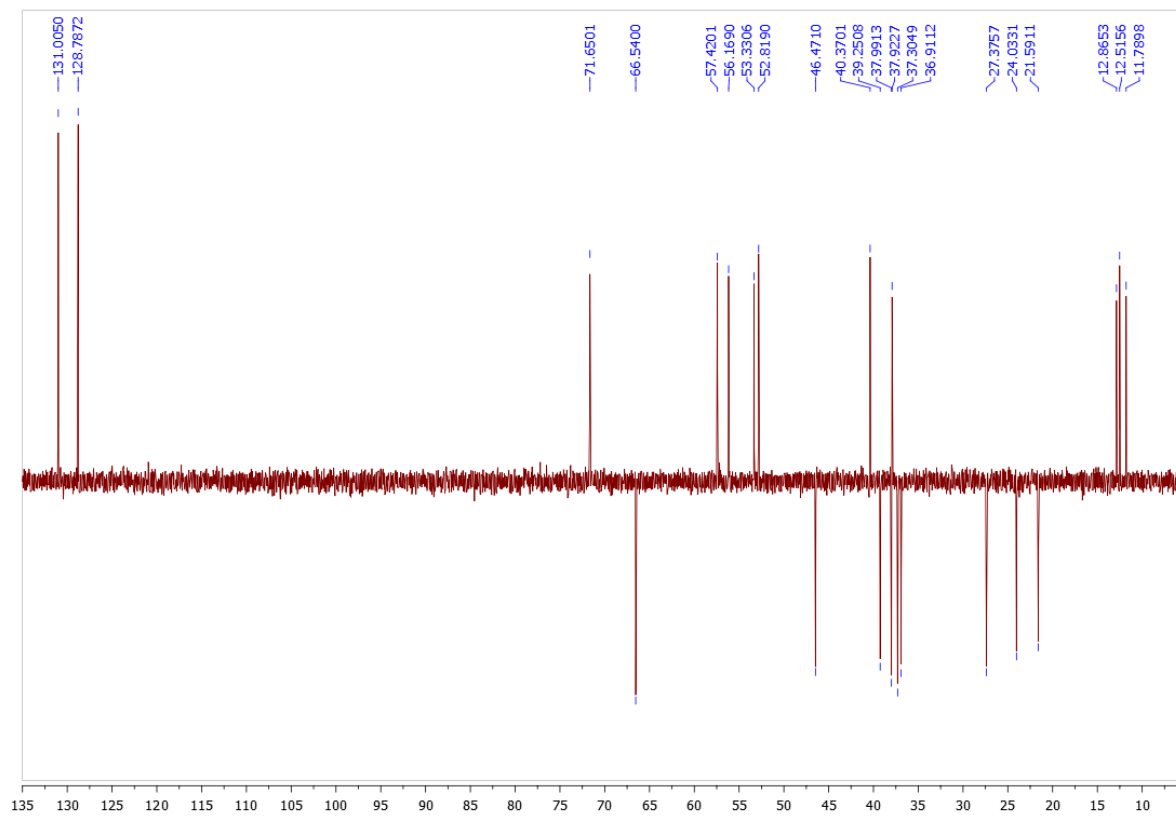
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



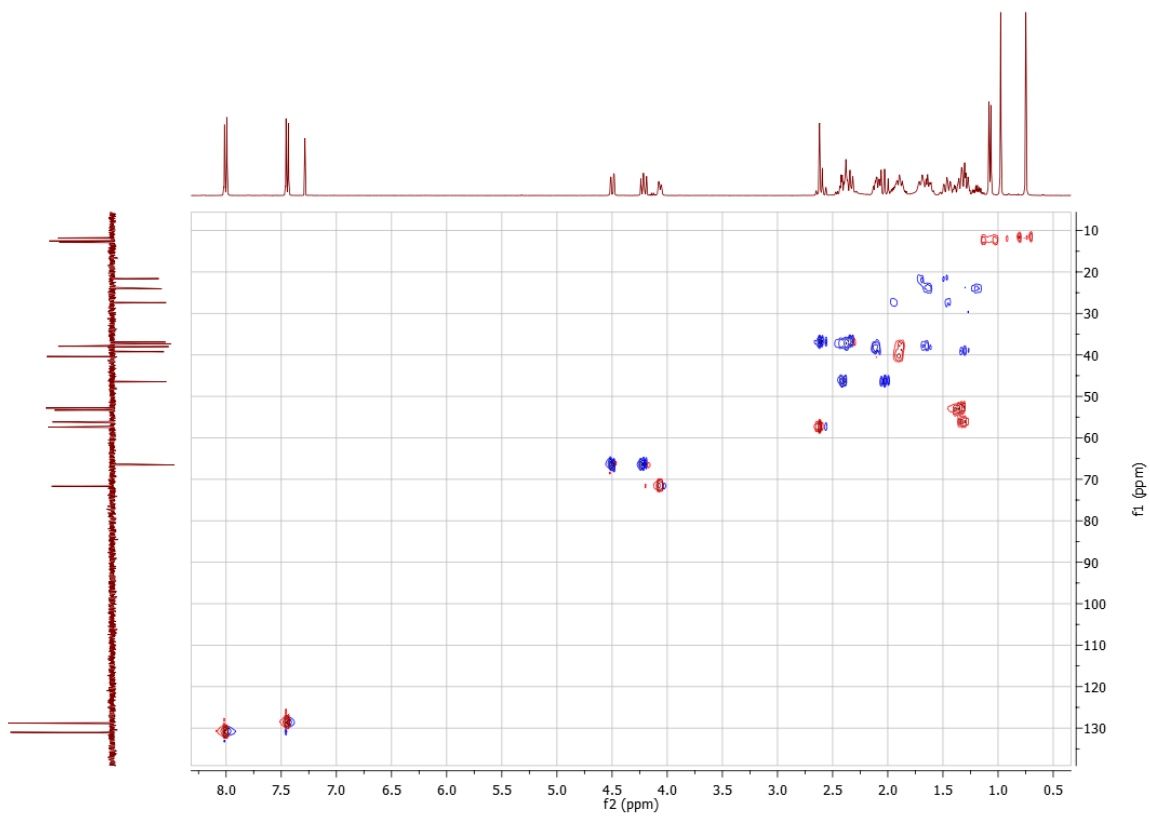
◇ Espectro <sup>13</sup>C-RMN



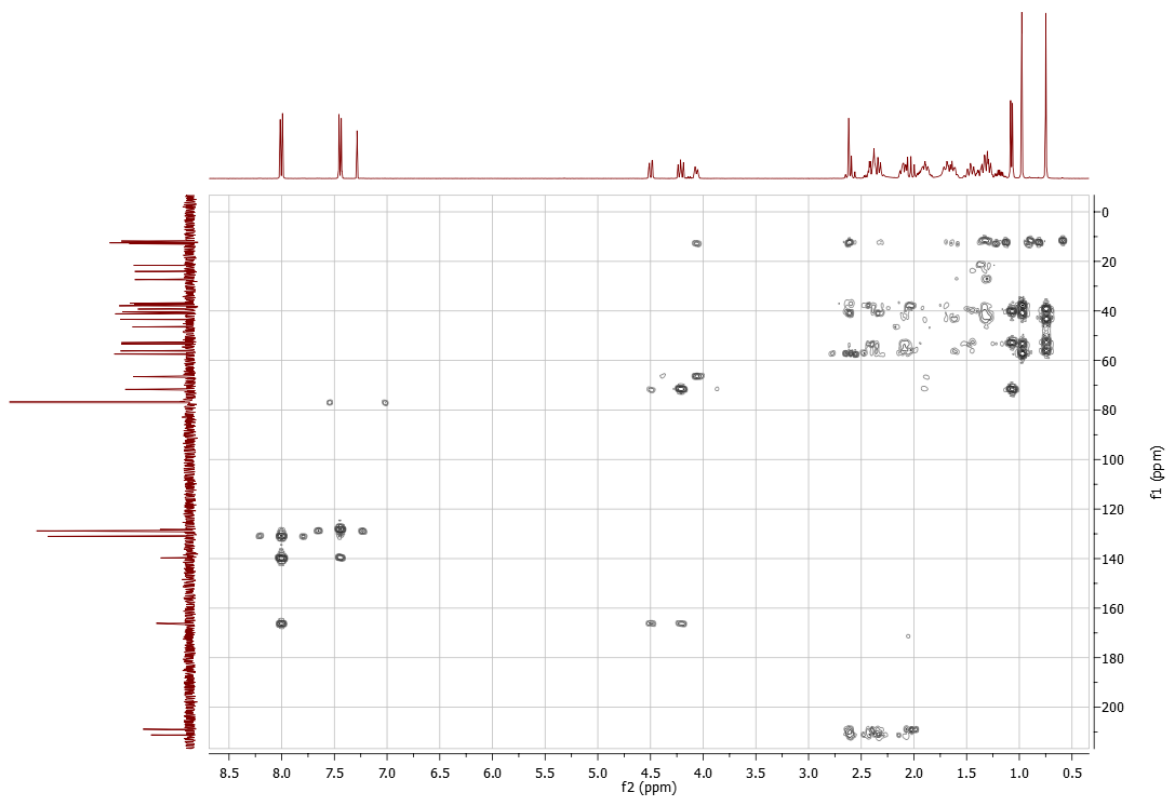
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

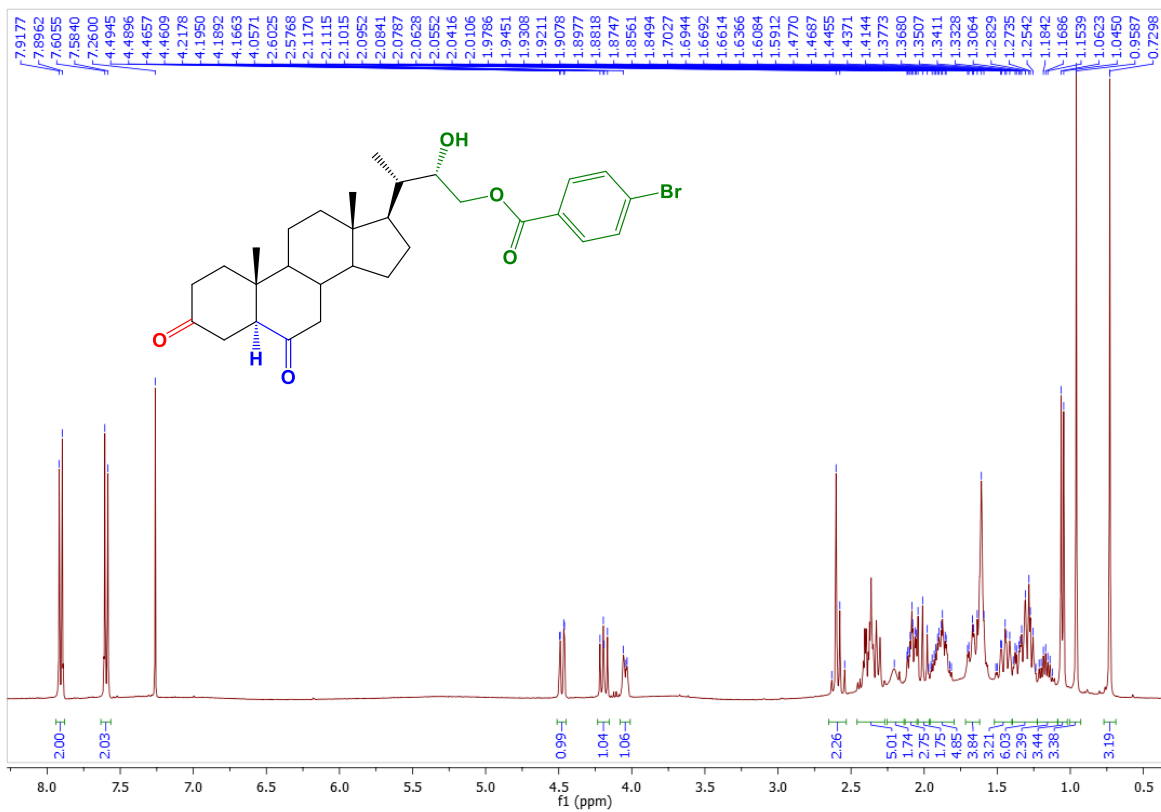


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

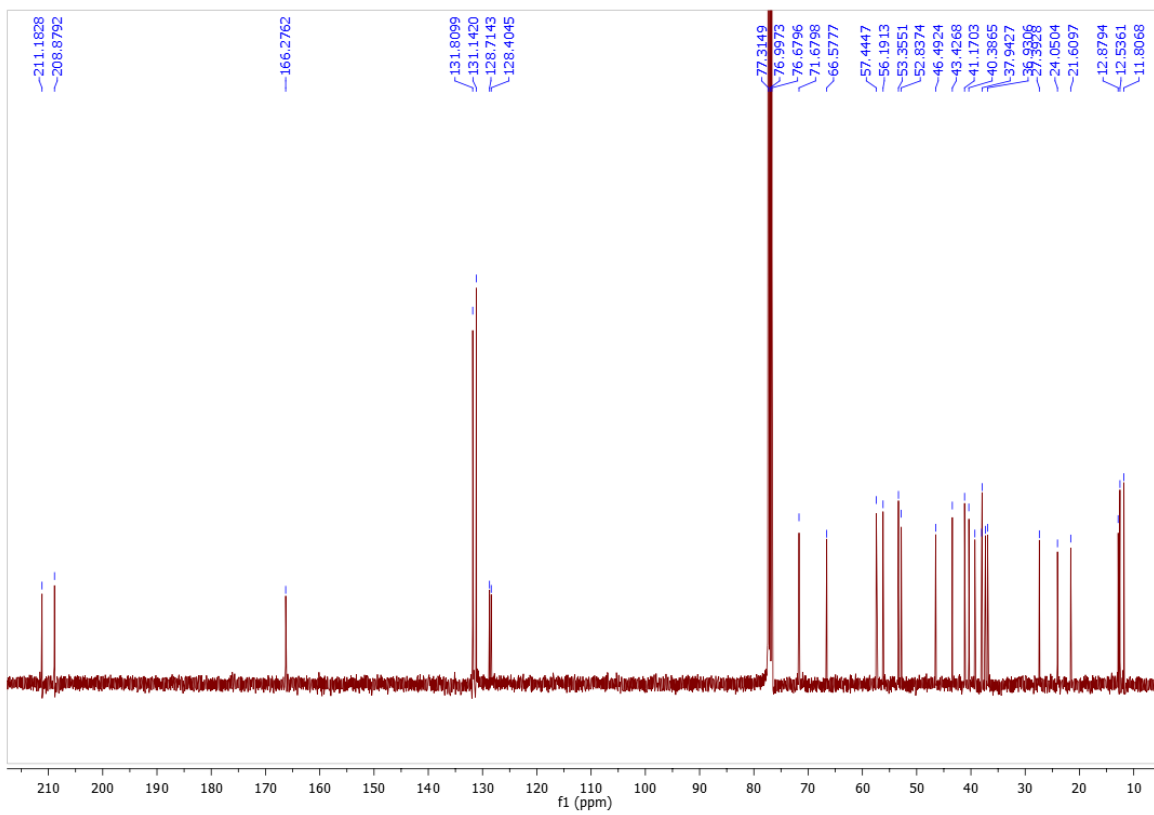


**22(S)-hidroxi-23-(4-bromo-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39f)**

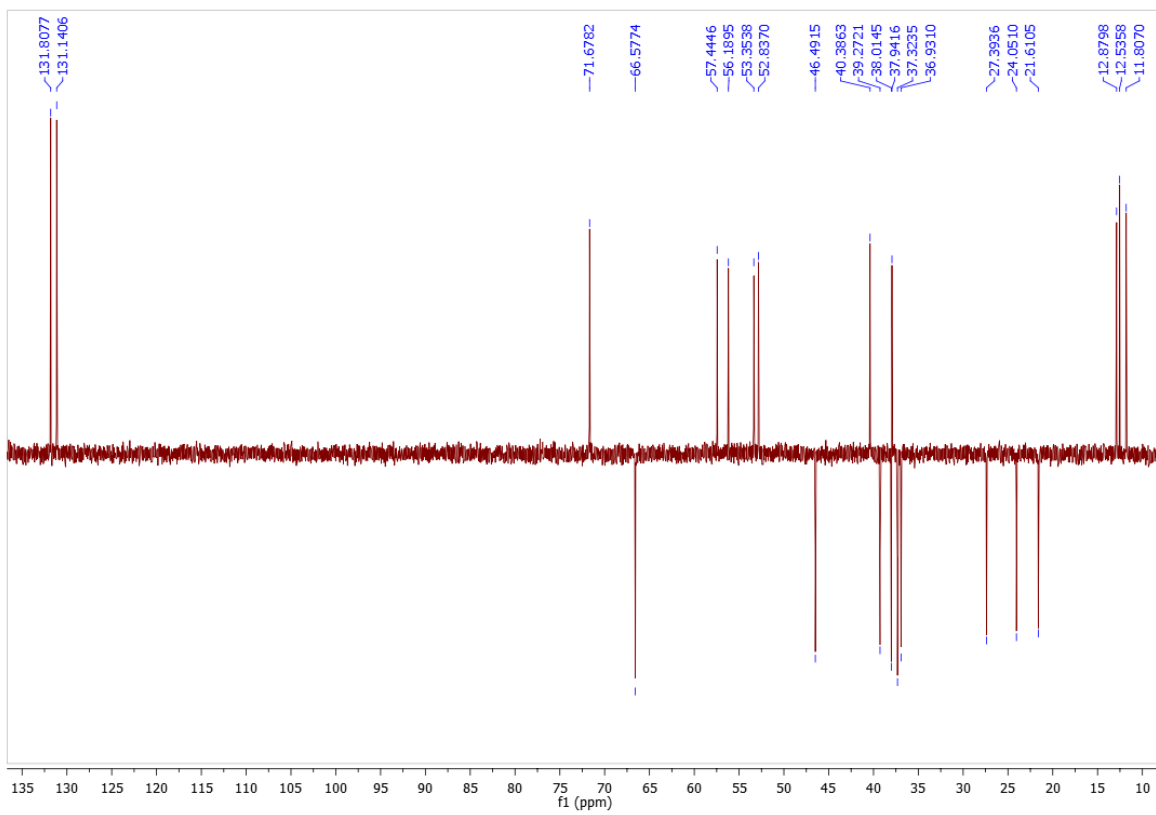
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



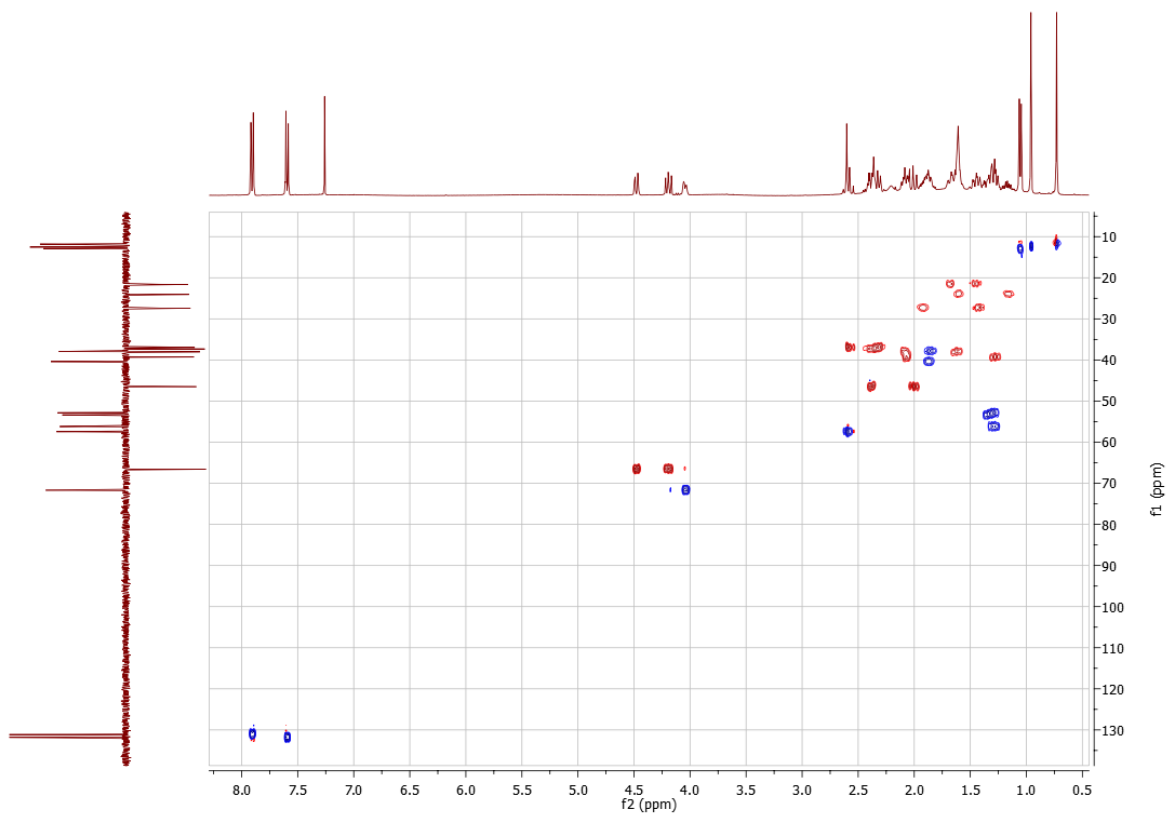
◇ Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN



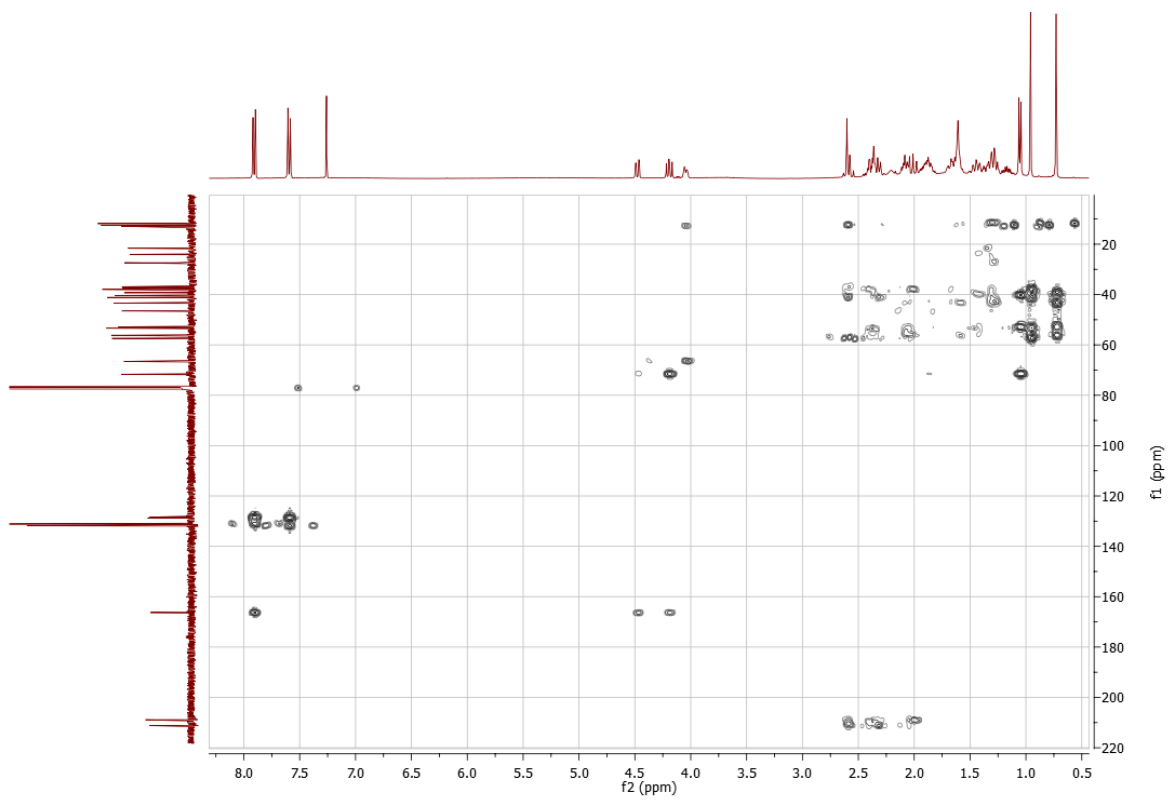
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

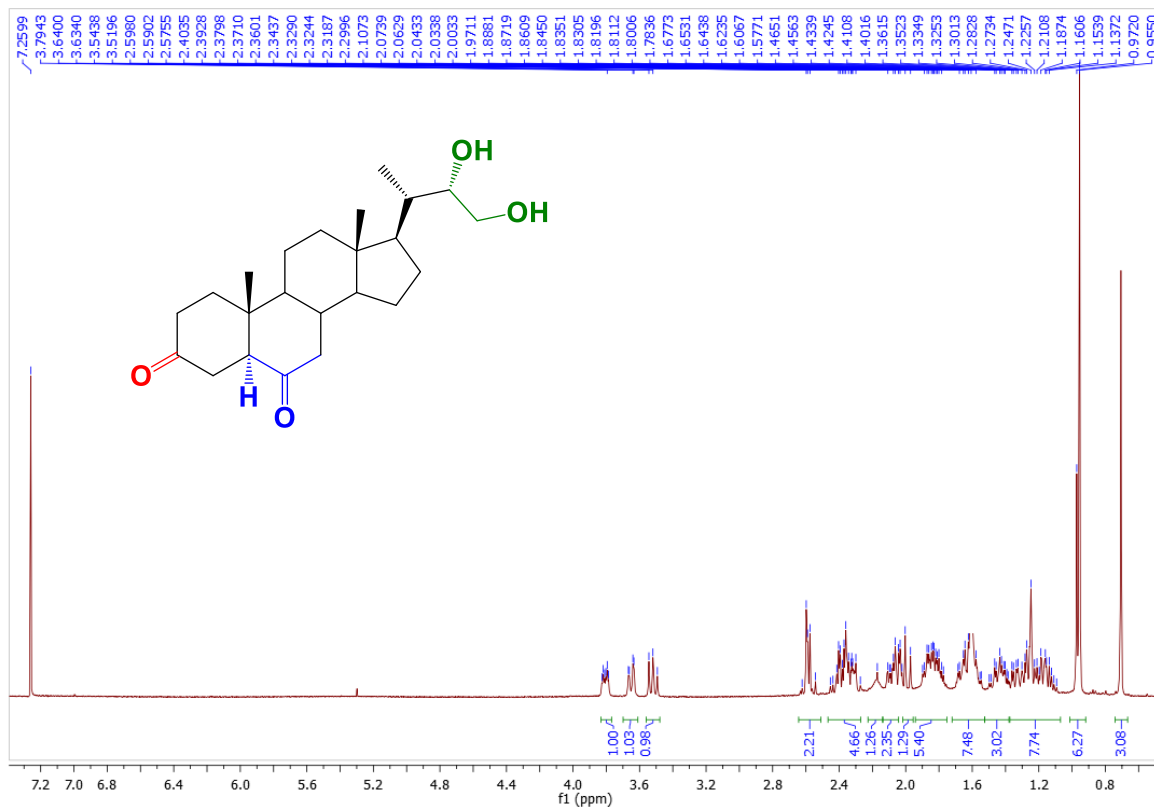


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

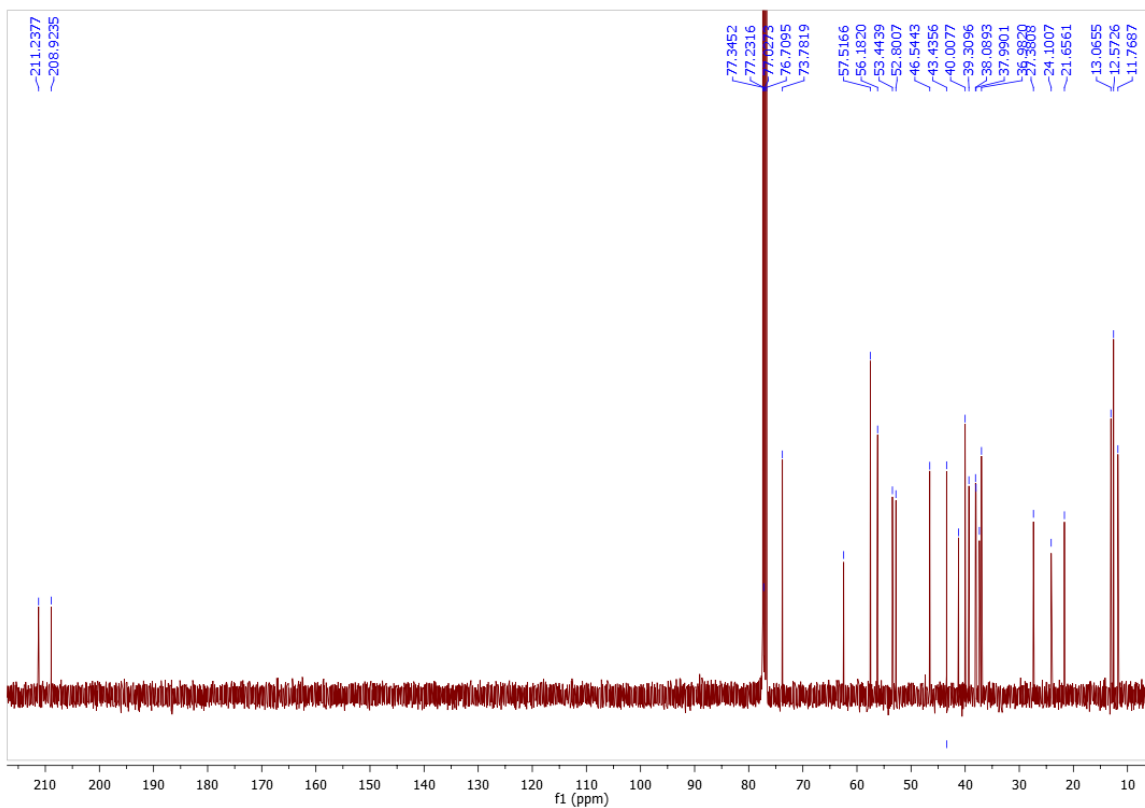


### 22(S)-23-dihidroxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (43a)

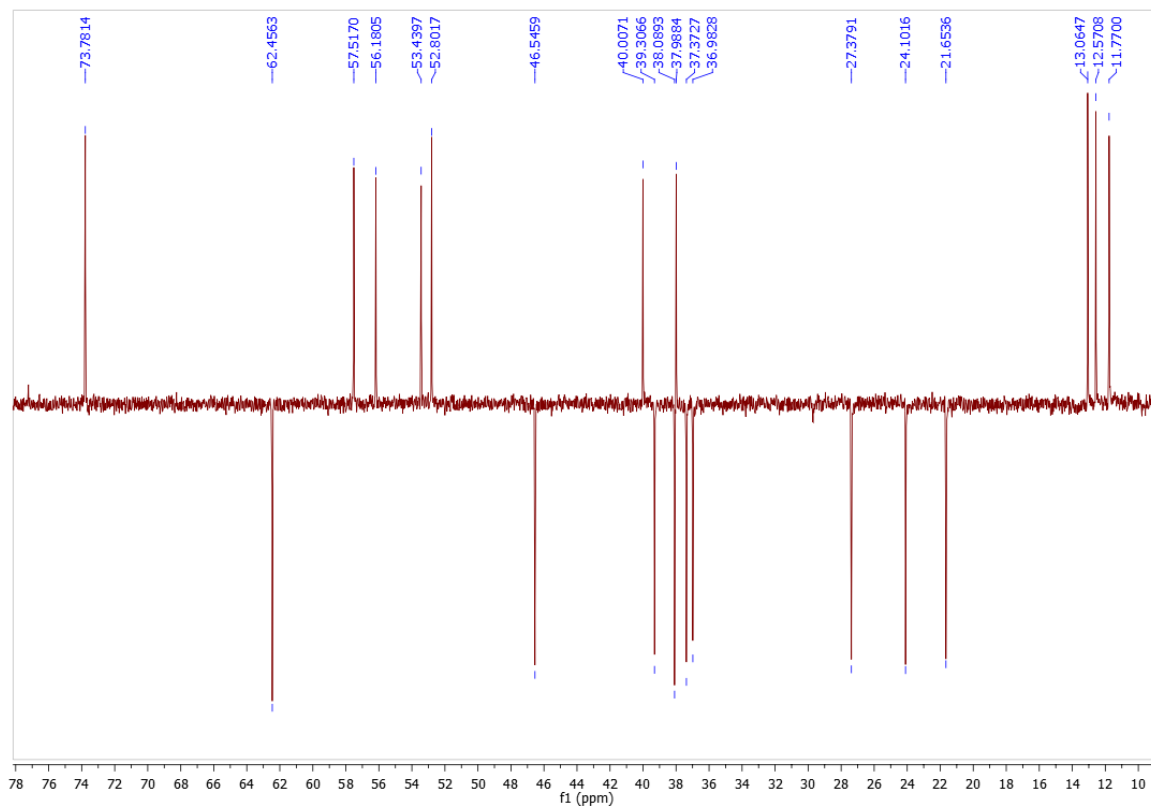
◇ Espectro  $^1\text{H}$ -RMN



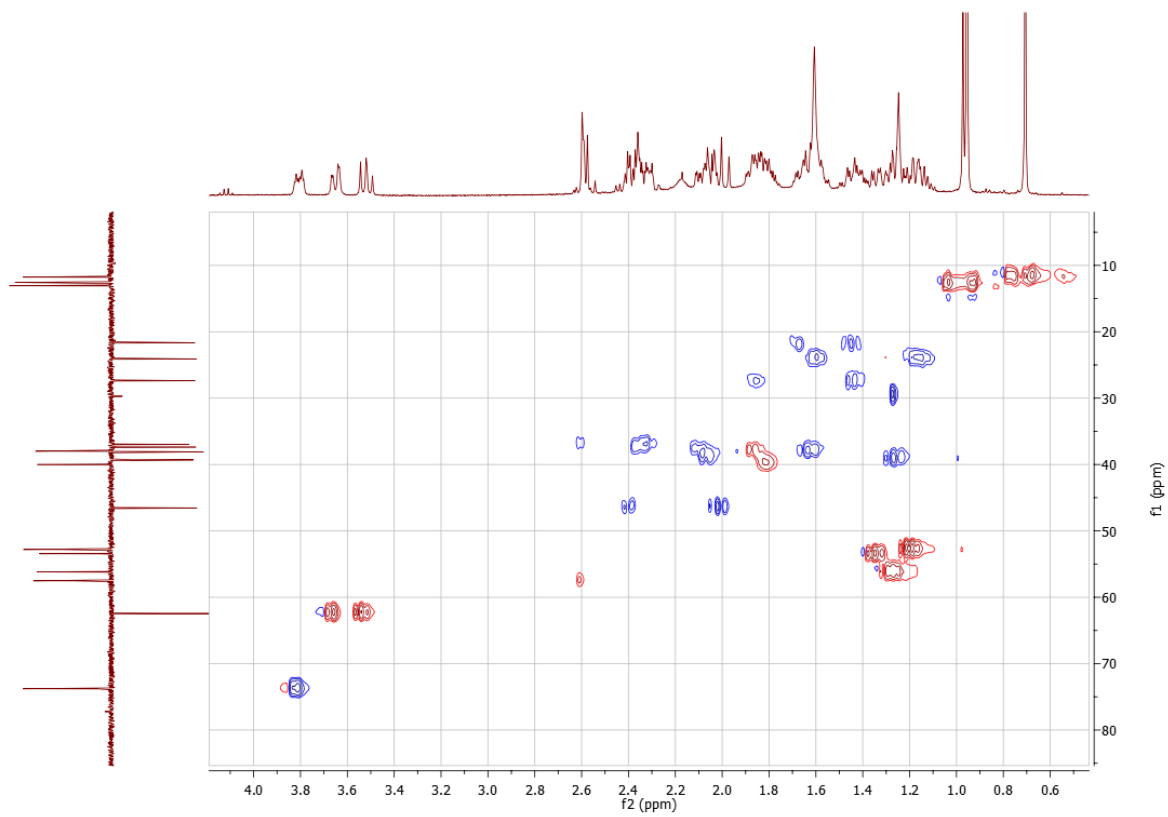
◇ Espectro <sup>13</sup>C-RMN



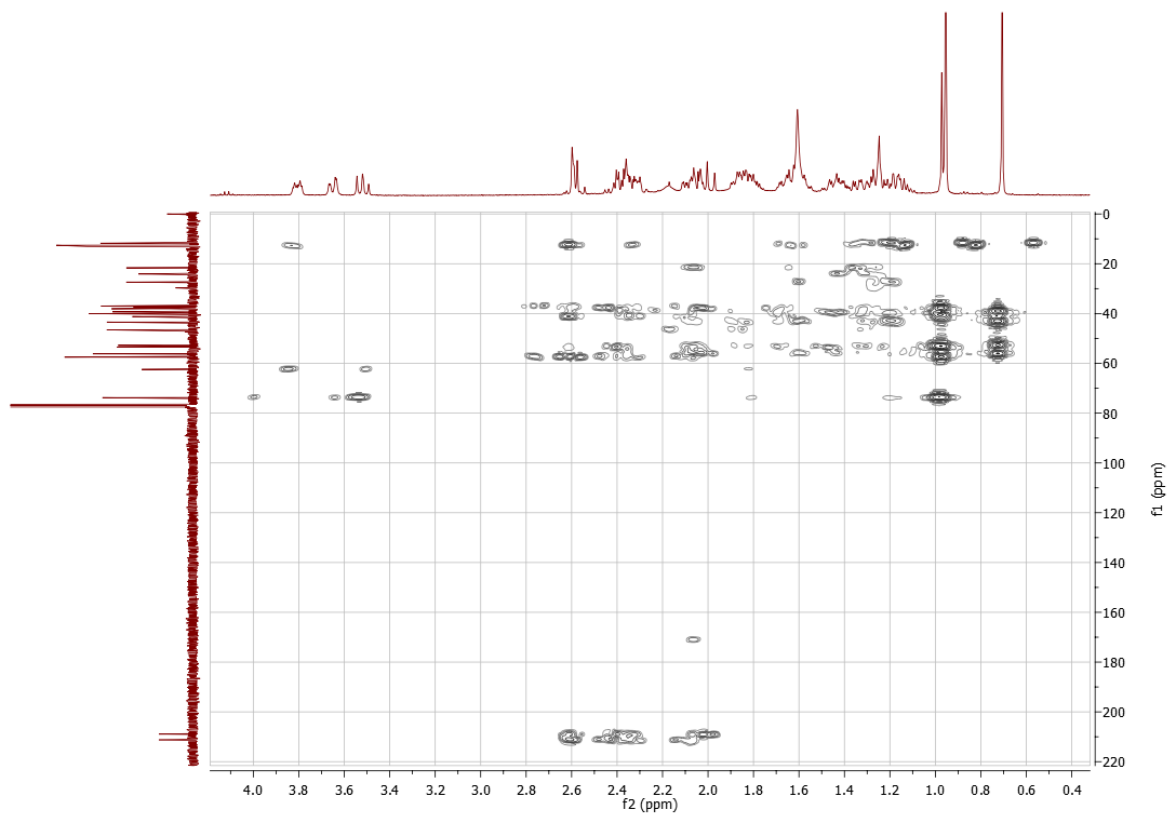
◇ Espectro  $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$



◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

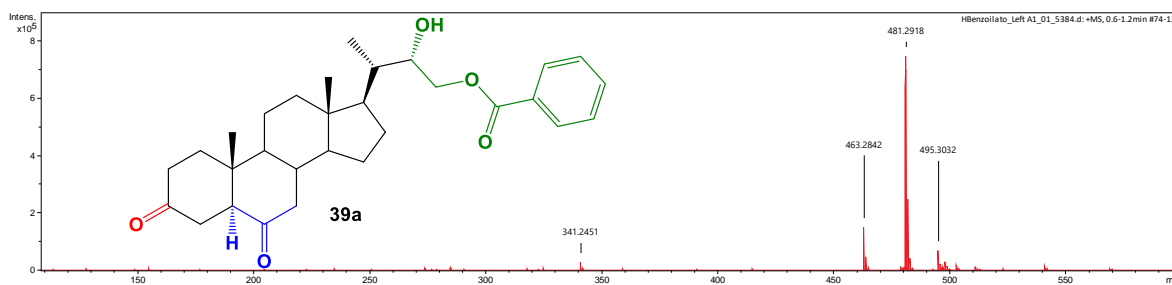


◇ Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

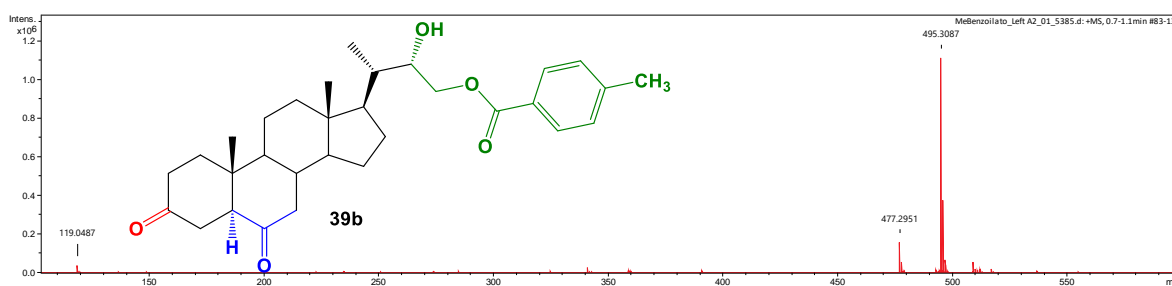


Espectros de EMAR (M+H) para los compuestos 39a-39f.

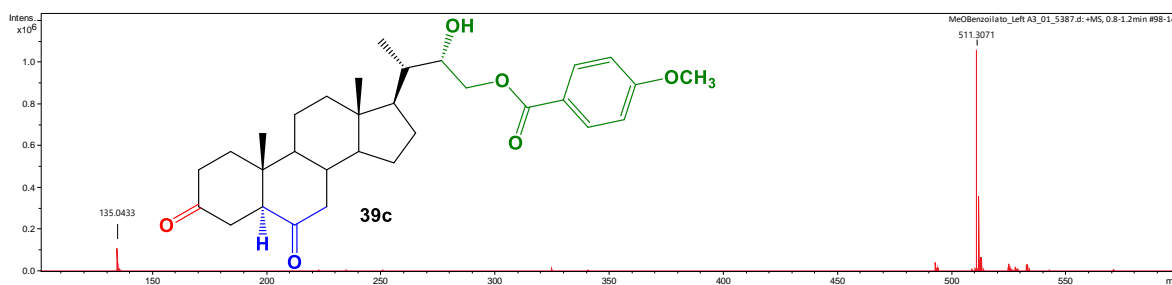
**22(S)-hidroxi-23-benzoiloxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39a)**



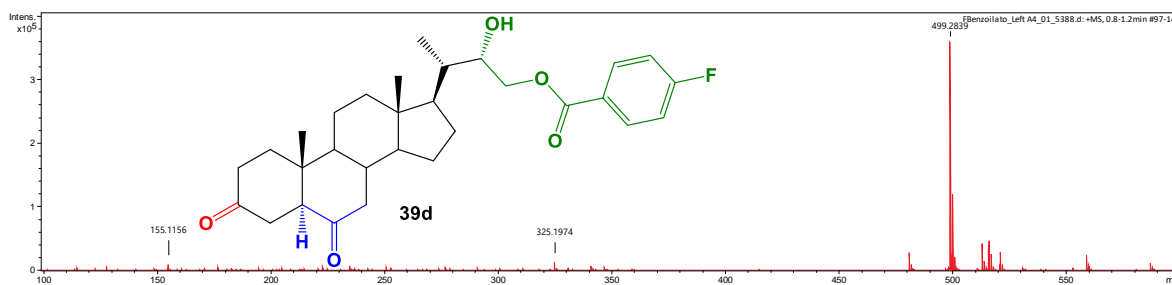
**22(S)-hidroxi-23-(4-metil-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39b)**



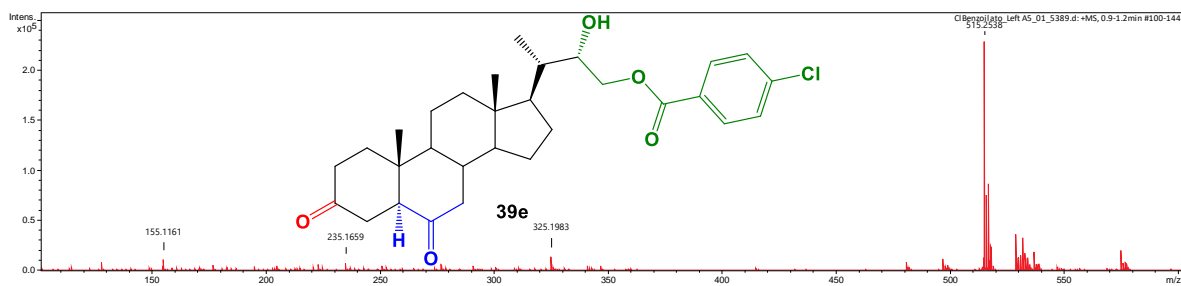
**22(S)-hidroxi-23-(4-metoxi-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39c)**



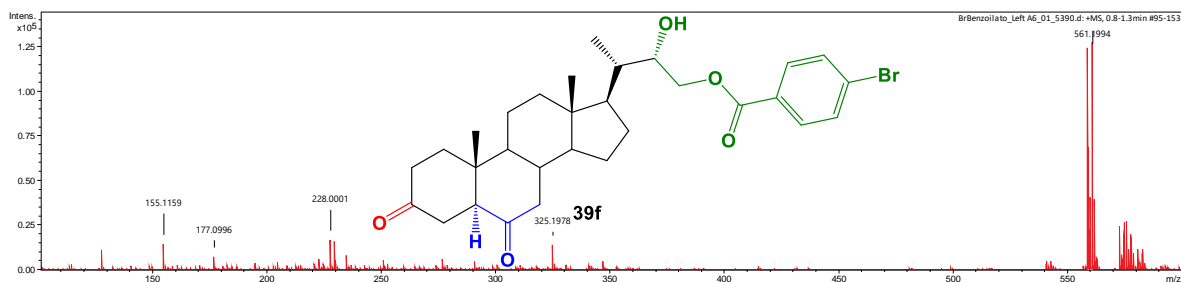
**22(S)-hidroxi-23-(4-fluoro-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39d)**



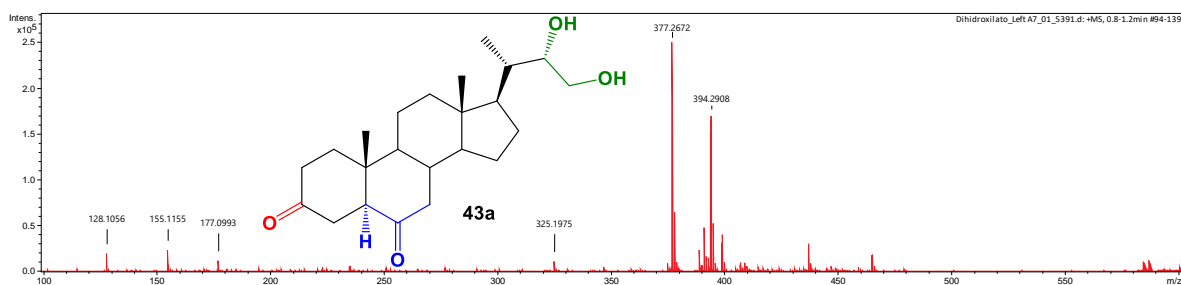
### 22(S)-hidroxi-23-(4-cloro-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39e)



### 22(S)-hidroxi-23-(4-bromo-benzoiloxi)-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (39f)



### 22(S)-23-dihidroxi-24-nor-5 $\alpha$ -colan-3,6-diona (43a)

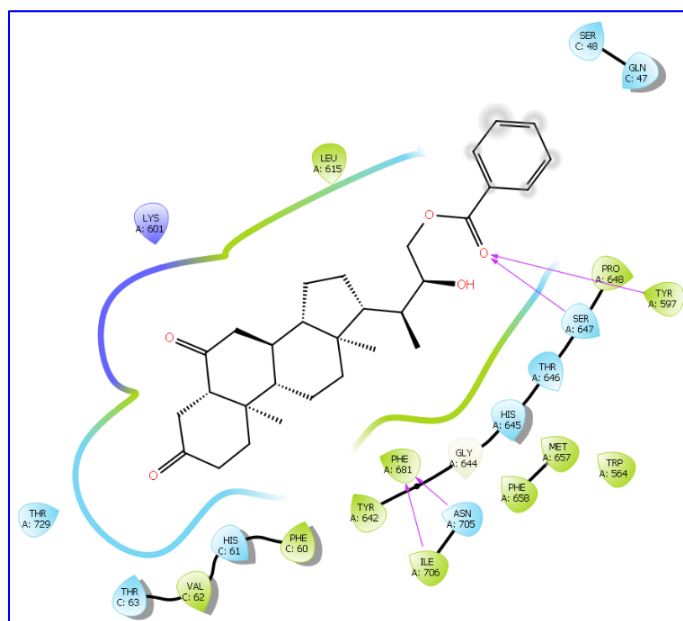


## Anexo 2

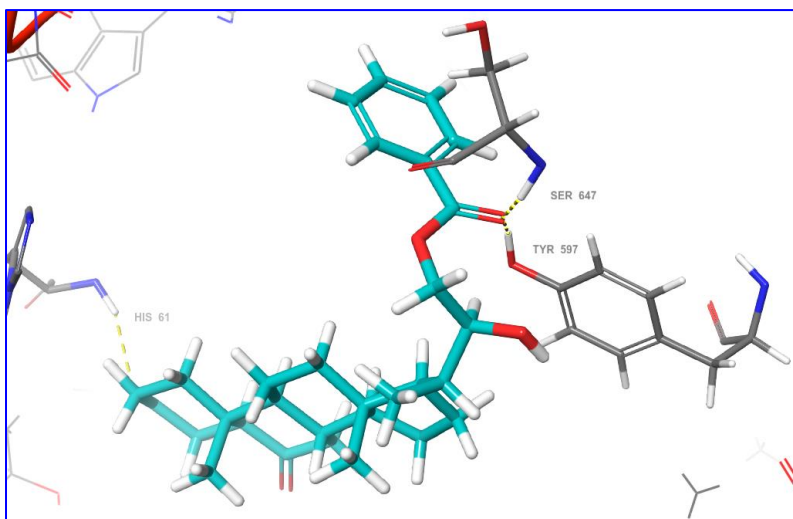
Modos de unión simulados predictivamente para los compuestos **39-43** en la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (**1**) (PDB 4M7E) como también sus diagramas de interacción proteína-ligando.

Ligando	$\Delta G$ BRI1 [kcal/mol]	$\Delta G$ BRI1-BAK1 [kcal/mol]
<b>39a</b>	-10,2	-12,5
<b>39b</b>	-8,7	-12,5
<b>39c</b>	-7,9	-12,4
<b>39d</b>	-10	-13,1
<b>39e</b>	-10,7	-12,7
<b>39f</b>	-10,6	-13,2
<b>40</b>	-8,3	-10,4
<b>41</b>	-7,9	-10,3
<b>42</b>	-9,2	-10,3
<b>43a</b>	-8,4	-12,1
<b>1</b>	-9,4	-12,9

◇ **Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor  
BRI1-BAK1 y el análogo 39a**

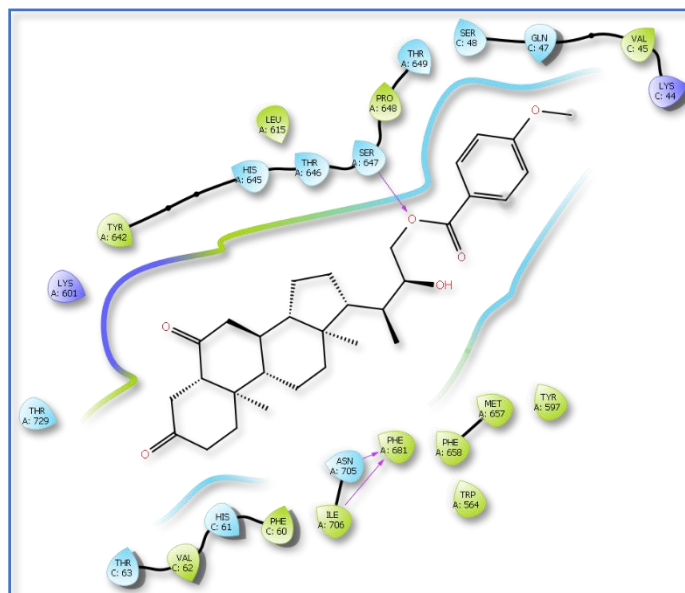


◇ **Modo predictivo de unión de 39a en el sitio de unión de BR1-BAK1 (PDB 4M7E)**

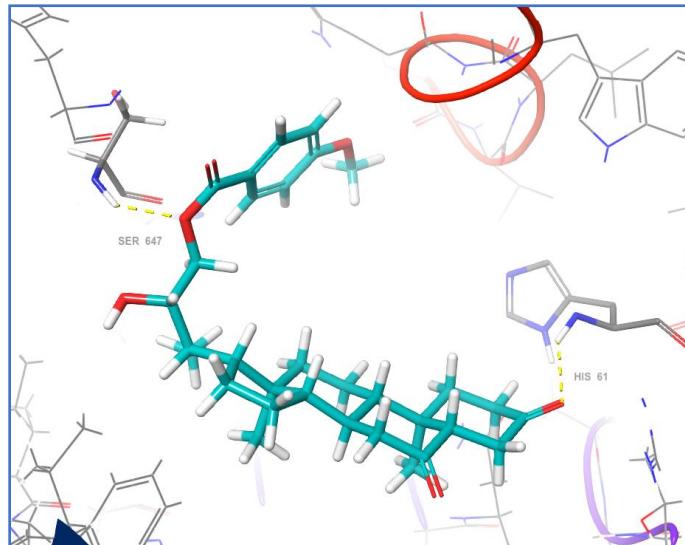




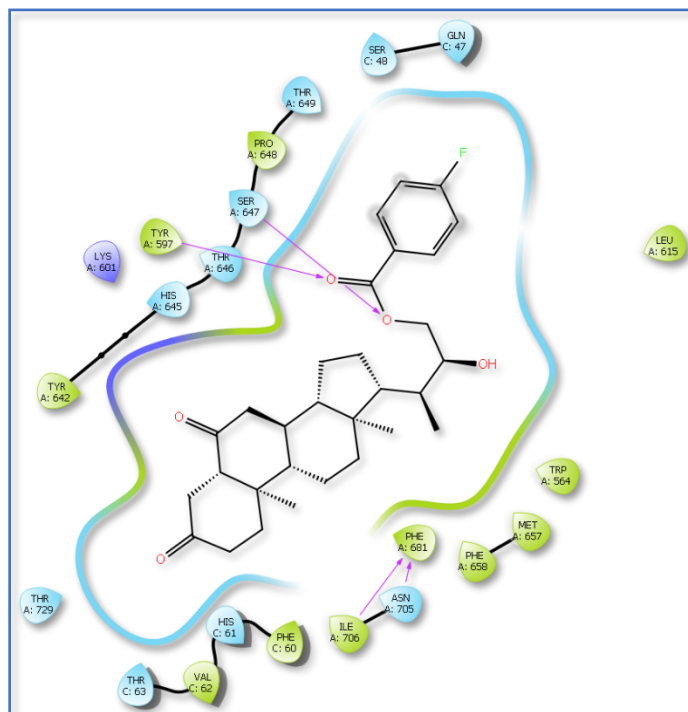
- ◇ **Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y el análogo 39c**



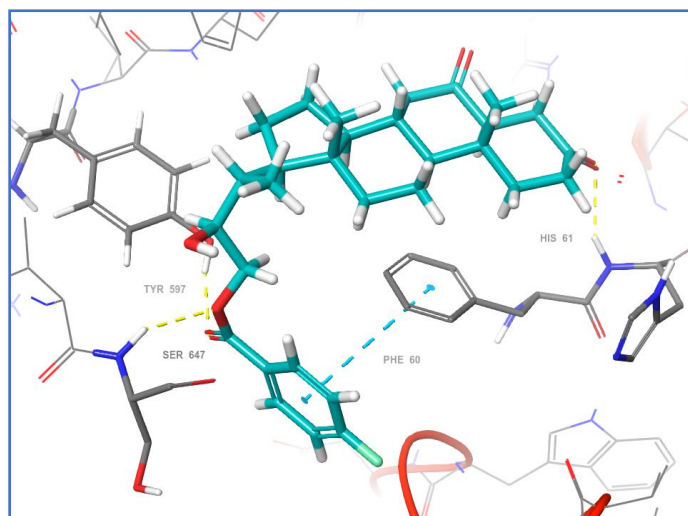
- ◇ **Modo predictivo de unión de 39c en el sitio de unión de BR1-BAK1 (PDB 4M7E)**



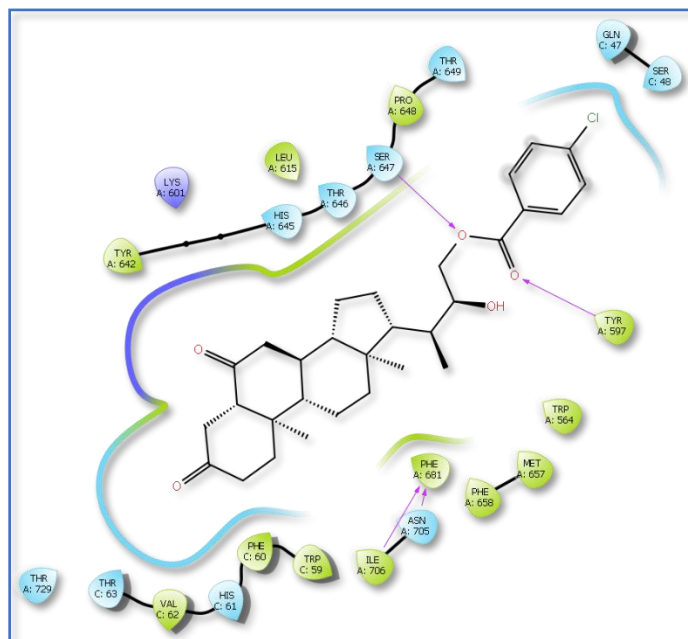
- ◇ Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y el análogo 39d



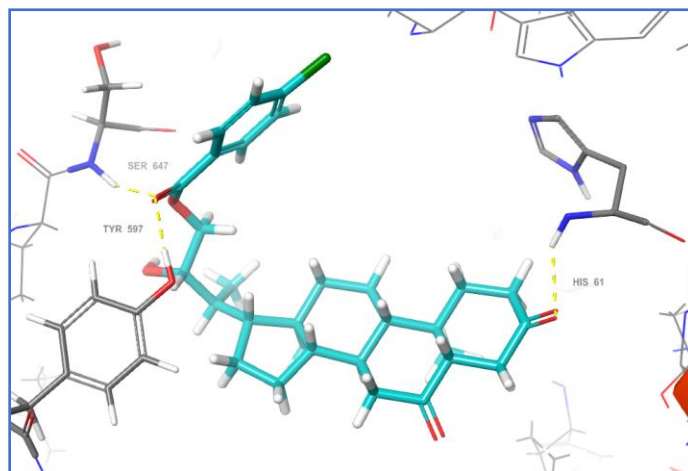
- ◇ Modo predictivo de unión de 39d en el sitio de unión de BR1-BAK1 (PDB 4M7E)



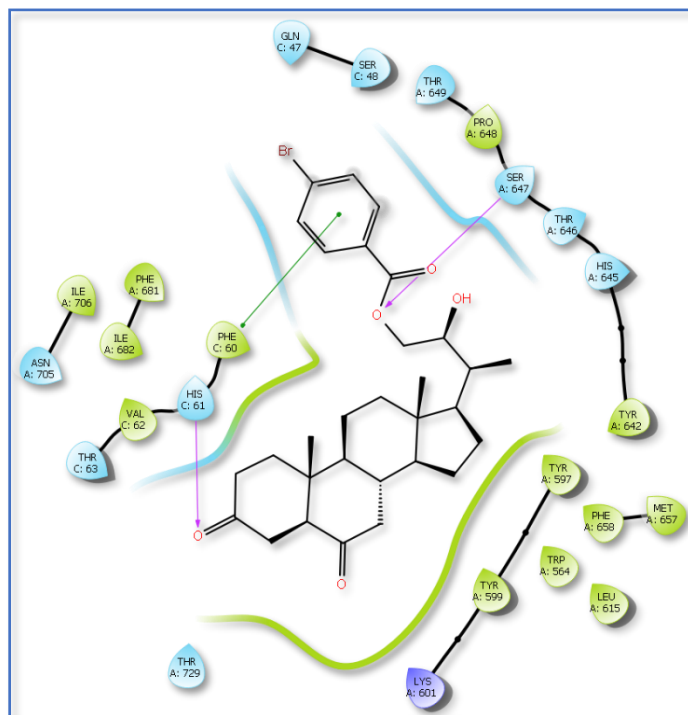
◇ **Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor  
BRI1-BAK1 y el análogo 39e**



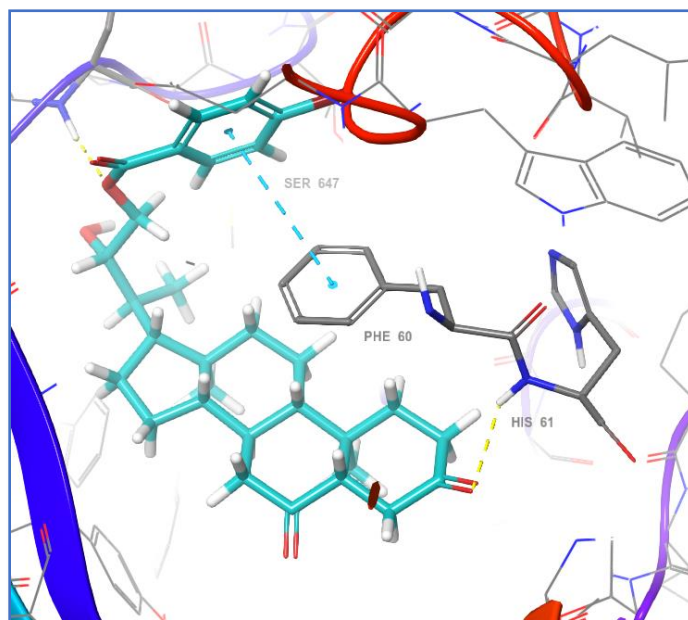
◇ **Modo predictivo de unión de 39e en el sitio de unión de BR1-BAK1 (PDB 4M7E)**



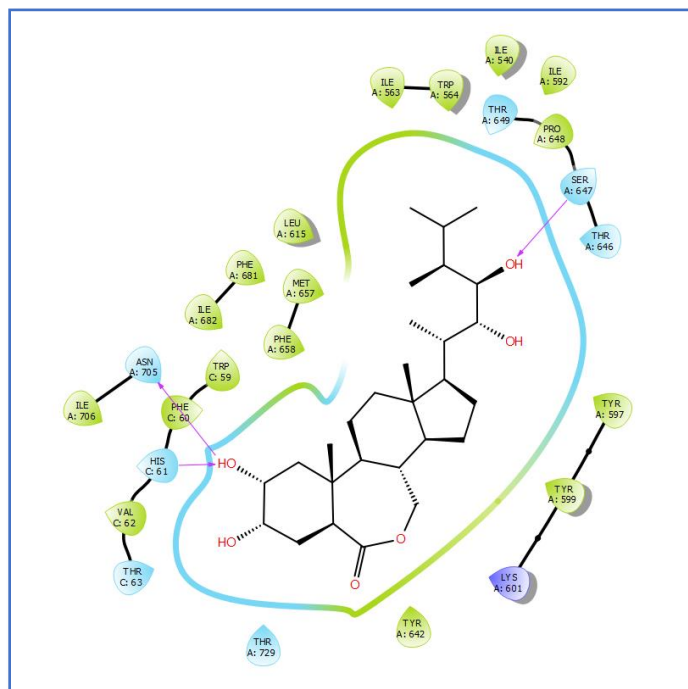
- ◇ Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y el análogo 39f



- ◇ Modo predictivo de unión de 39f en el sitio de unión de BR1-BAK1 (PDB 4M7E)



- ◇ **Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y el compuesto nativo (1)**



- ◇ **Modo predictivo de unión del compuesto nativo (1) en el sitio de unión de BR1-BAK1 (PDB 4M7E)**

