

## **UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA**

PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS,  
MENCIÓN QUÍMICA

# **SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS DE BRASINOESTEROIDES CON CADENA LATERAL DEL TIPO 22, 23-BISNORCOLÁNICOS, Y SUS EFECTOS EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CRECIMIENTO VEGETAL.**

**Franco Andreas Cimino Prado**

Magíster en Ciencias mención Química

Julio de 2023

## UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS,  
MENCIÓN QUÍMICA

# SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS DE BRASINOESTEROIDES CON CADENA LATERAL DEL TIPO 22, 23-BISNORCOLÁNICOS, Y SUS EFECTOS EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CRECIMIENTO VEGETAL.

Tesis de Grado presentada por

**Franco Andreas Cimino Prado**

Como requisito parcial para optar al grado de

**Magíster en Ciencias, mención Química.**

Profesor Director de Tesis  
Dr. Luis Espinoza Catalán  
Profesor Codirector de Tesis  
Dr. Ángel Amesty Arrieta

Julio de 2023

PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS,  
MENCIÓN QUÍMICA

TITULO DE LA TESIS:

**Síntesis de Nuevos Análogos de Brasinoesteroides con Cadena Lateral del tipo 22, 23-bisnorcolánicos, y sus Efectos en la Actividad Biológica de Crecimiento Vegetal.**

AUTOR:

**Franco Andreas Cimino Prado**

TRABAJO DE TESIS, presentado en cumplimiento parcial de los requisitos para el Grado de Magíster en Ciencias, mención Química de la Universidad Técnica Federico Santa María.

Dra. Katy Díaz Peralta. ....

Dr. Hernán Pessoa Mahanna. ....

Dr. Lautaro Taborga Morales. ....

Dr. Ángel Amesty Arrieta. ....

Dr. Luis Espinoza Catalán. ....

Valparaíso, Chile. Julio de 2023

## **Agradecimientos...**

En este trabajo de tesis quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Luis Espinoza Catalán por su constante apoyo, guía y paciencia durante todo este proceso de investigación, y ser uno de los pilares fundamentales en mi formación desde el pregrado. A la Dra. Katy Díaz Peralta por su colaboración con los experimentos de pruebas biológicas. Al Dr. Martin Iglesias-Arteaga y todo su equipo por recibirme en su laboratorio durante la síntesis realizada en la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a Martha Mayorkin, Manuel Ramos y Anielka Rosado Abón. Al Dr. Ángel Amesty Arrieta por sus tutorías y entrenamiento en los experimentos de docking molecular. Al Dr. Lautaro Taborga por las correcciones finales y consejos durante mi formación. A mi compañera de posgrado María Nuñez por su colaboración en la síntesis. A todo el equipo del Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Universidad Técnica Federico Santa María, en especial a Ernesto Valdés y César Gonzáles, por su gran compañía, apoyo y amistad. Al Departamento de Química, a la Dirección General de Posgrado y al Programa de Incentivo a la Iniciación Científica de la de la Universidad Técnica Federico Santa María.

A mis padres Luciana y César, por su apoyo durante todos estos años, por su amor y confianza en mi constante búsqueda de la felicidad.

Y a Carmen, por acompañarme durante todo este proceso, en los buenos y los malos momentos, en los aciertos y los errores, en las dudas y en las certezas, por brindarme tu amor incondicional.

A cada persona que me brindó un consejo o una palabra de ánimo, muchas gracias a todos.

## CONTENIDO

<b>Indice de Figuras .....</b>	<b>5</b>
<b>Indice de Tablas.....</b>	<b>6</b>
<b>Indice de Esquemas.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN        7</b>	
<b>SUMMARY        8</b>	
<b>CAPITULO 1 - INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1.1 Antecedentes generales sobre hormonas reguladoras de crecimiento vegetal... 9	
1.2 Brasinoesteroides .....	11
1.2.1 Relación Estructura-Actividad relativa de los brasinoesteroides. ....	13
1.2.2 Relación estructura-actividad basada en modificaciones del anillo A. ....	14
1.2.3 Relación estructura-actividad basada en las modificaciones del anillo B.....	15
1.2.4 Relación estructura-actividad relativa en la fusión de los anillos A/B.....	16
1.2.5 Relación estructura-actividad basada en la funcionalización y longitud de la cadena lateral. ....	16
1.2.5 Síntesis de Brasinoesteroides y sus análogos.....	17
1.3 Análogos sintéticos de brasinoesteroides con modificación en la cadena lateral. .....	19
1.4 Análogos sintéticos de brasinoesteroides con funciones 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo y diferentes cadenas laterales.....	23
1.5 Estudios “ <i>in-silico</i> ” de Relación Estructura Actividad (SAR).....	24
<b>CAPITULO 2 – OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>31</b>
HIPOTESIS .....	31
2.1 Objetivos Generales.....	31
2.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>CAPÍTULO 3 - METODOLOGÍAS.....</b>	<b>33</b>
3.1 Metodología síntesis químicas.....	33
3.2 Metodología evaluaciones biológicas .....	34
3.2.1 Ensayo biológico de Inclinação de la Lámina de Arroz (ILA) .....	34
3.3 Metodología de estudios <i>in-silico</i> de relación estructura-actividad por docking moleculares e induced-fit docking .....	35
3.3.1 Acoplamiento moleculares (docking).....	35
<b>CAPITULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>36</b>
4.1 Materiales y equipos generales .....	36

4.1.1 Solventes .....	36
4.1.2 Insumos .....	36
4.1.3 Reactivos .....	37
4.1.4 Cromatografía en capa fina.....	37
4.1.5 Cromatografía en columna .....	37
4.2 Instrumentos y Equipos .....	38
4.3 Materiales y equipos: biológicos.....	39
4.4 Abreviaturas y Siglas .....	39
4.4.1 Abreviaturas en resonancia magnética nuclear .....	40
4.4.2 Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo.....	41
4.4.3 Abreviaturas en espectrometría de masas .....	41
4.4.4 Abreviaturas en Dinámica y Acoplamiento Molecular.....	41
4.5 Síntesis de compuestos.....	42
4.6 Evaluaciones biológicas.....	50
4.7 Estudios <i>in-silico</i> .....	52
<b>CAPITULO 5 - RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>53</b>
5.1 Síntesis químicas .....	53
5.2 Evaluaciones biológicas.....	63
5.3 Estudios " <i>In-Silico</i> " .....	66
<b>CAPITULO 6 - CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>102</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.2.1</b> Estructuras de algunos brasinoesteroides naturales.....	12
<b>Figura 1.2.2</b> Diferentes patrones de sustituyentes en los anillos A, B y la cadena lateral de brasinoesteroides de origen natural.....	13
<b>Figura 1.2.1</b> Estructuras de 2-deoxi-3 $\beta$ -28-homobrasinólido ( <b>9</b> ) y 28-homotifasterol ( <b>10</b> ).....	14
<b>Figura 1.2.3</b> Efecto en la actividad biológica de la funcionalización relativa en el anillo B.....	15
<b>Figura 1.2.4</b> Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5 $\alpha$ -colestano y 5 $\beta$ -colestano con fusión de los anillos A/B tipo trans (izquierda) y con fusión de los anillos A/B tipo cis (derecha). .....	16
<b>Figura 1.2.5</b> Estructura de 22,23-diepi-28-homobrasinólido ( <b>15</b> ) y efecto en la actividad biológica de los sustituyentes en la cadena lateral.....	17
<b>Figura 1.2.6</b> Estructuras de los esteroides principales <b>16-23</b> utilizados como sustancias de partida para la síntesis de brasinoesteroides naturales y sus análogos. ....	18
<b>Figura 1.3.1</b> Estructuras de análogos de brasinoesteroides con modificaciones importantes en la cadena lateral.....	19
<b>Figura 1.3.2</b> Análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales del tipo 23,24-dinorpregnanos, funcionalizadas en forma de éteres, ésteres y ácidos carboxílicos.....	20
<b>Figura 1.3.3</b> Análogos de brasinoesteroides con sustituyentes aromáticos en la cadena lateral (arilbrasinoesteroides).....	21
<b>Figura 1.3.4</b> Análogos de brasinoesteroides del tipo 24-Nor colanos, con funciones benzoato en la posición C-23 de la cadena lateral.....	22
<b>Figura 1.4.1</b> Análogos de brasinoesteroides con función 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo y modificaciones estructurales en la cadena lateral.....	23
<b>Figura 1.5.1</b> Complejo BRI1-BAK1 cocrystalizado con Brasinólido ( <b>1</b> ) (código PDB: 4M7E).....	26
<b>Figura 1.5.2</b> A. Vista lateral del receptor BRI1 sin unirse al brasinólido ( <b>1</b> ) B. Vista superior del receptor BRI1 sin unirse al brasinólido ( <b>1</b> ). C. Interacción del dominio de inserción con la superficie cóncava. ....	27
<b>Figura 1.5.3</b> Estructuras de análogos de brasinoesteroides monohidroxilados obtenidos desde ácido 3 $\alpha$ -acetoxi-23,24-bisnorcolénico ( <b>23</b> ).....	28
<b>Figura 1.5.4</b> Superposición del análogo de BRs monosustituido <b>86</b> con la pose del cristal de brasinólido.....	29
<b>Figura 1.5.5</b> Estructuras de los nuevos análogos de BRs propuestos para el estudio de esta Tesis, que serán obtenidos desde ácido 3 $\beta$ -acetil-23,24-bisnor-5-colénico ( <b>23</b> ).....	30
<b>Figura 2.2.1</b> Compuestos <b>95 - 99</b> a los que se realizará pruebas de actividad biológica mediante el ensayo de la Lámina de Arroz (ILA).....	32
<b>Figura 5.1.1</b> a) Esquema de reducción de la 3,6-diona <b>95</b> , para producir el 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -diol <b>96</b> . b) Representación 3D de los compuestos <b>95</b> y <b>96</b> .....	55

<b>Figura 5.1.2</b> Espectro 2D NOESY parcial del 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -diol <b>96</b> .....	56
<b>Figura 5.1.3</b> Espectro 2D HSQC parcial con traza <sup>13</sup> C DEPT-135, del compuesto <b>97</b> .....	57
<b>Figura 5.1.4</b> Superior: espectro 2D HMBC completo del compuesto <b>97</b> . Inferior: espectro 2D HMBC parcial del compuesto <b>97</b> .....	58
<b>Figura 5.1.5</b> Superior: espectro 2D HMBC completo del compuesto <b>98</b> . Inferior: espectro 2D HMBC ampliado del compuesto <b>98</b> .....	60
<b>Figura 5.1.6</b> Estructura parcial y espectro 2D NOESY del compuesto <b>98</b> .....	61
<b>Figura 5.2.1</b> Efecto de incremento en la actividad biológica para análogos de BRs mono oxigenados en el anillo A, fusión de anillos A/B de tipo “ <i>trans</i> ” y función oxigena en anillo B.....	64
<b>Figura 5.3.1</b> Modos de unión predichos en 3D y 2D del compuesto <b>97</b> en la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (PDB 4M7E).....	68

## INDICE DE TABLAS

---

<b>TABLA 1.1</b> ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE HORMONAS VEGETALES NATURALES.....	10
<b>TABLA 4.6.1</b> EFECTO DE LOS ANÁLOGOS DE BRASINOESTEROIDES <b>95-99</b> EN LA APERTURA DEL ÁNGULO (°) EN EL ENSAYO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (ILA).....	51
<b>TABLA 5.2.1</b> ÁNGULO PROMEDIO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (GRADOS $\pm$ DS) PARA LA SERIE <b>95-97</b> .....	64
<b>TABLA 5.2.2</b> ÁNGULO PROMEDIO DE INCLINACIÓN DE LA LÁMINA DE ARROZ (GRADOS $\pm$ DS) PARA LA SERIE <b>98-99</b> .....	64

## INDICE DE ESQUEMAS

---

<b>ESQUEMA 1</b> RUTA DE SÍNTESIS PROPUESTA PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ANÁLOGOS <b>95-99</b> . .	33
--	----

## RESUMEN

---

Durante este trabajo de tesis se sintetizaron 5 nuevos análogos de brasinoesteroides desde ácido  $3\beta$ -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**23**). Dos de los compuestos obtenidos presentaron una actividad biológica significativa en la prueba de inclinación de la lámina de arroz (ILA). En estas pruebas se probó que el efecto del metil éster del ácido  $3\beta$ -hidroxi-6-oxo-23,24-bisnor-22-oico (**97**) a concentraciones de  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M fue mayor que aquel producido por el brasinólido. Junto a las pruebas biológicas se llevaron a cabo estudios de simulaciones *in silico* de Docking Molecular e Induced Fit (IFD) para los compuestos que presentaron los mejores resultados de actividad en crecimiento vegetal para investigar los modos de unión en el surco de acoplamiento al brasinólido, el cual reveló que el compuesto **97** poseía una alta energía de unión y buena afinidad, consistente con los resultados *in vivo*.

## SUMMARY

---

During this thesis five new brassinosteroid analogues were synthesized from 3 $\beta$ -acetoxy-23,24-dinorchol-4-en-22-oic acid (**23**). Two of the obtained compound showed significant activity in the Rice Lamina Inclination Test (RLIT). During these tests the effects of the methyl ester of 3 $\beta$ -hydroxy-6-oxo-23,24-dinorcholan-22-oic acid (**97**) at concentrations of  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-6}$  M proved to be higher than those produced by brassinolide. In silico Molecular Docking and Induced fit docking (IFD) simulations for the compounds with the highest biological activity data were carried out to investigate the binding mode interactions into the brassinolide-binding groove which revealed that the compound **97** had high binding energy values and a good affinity, consistent with the *in vivo* results.

## CAPITULO 1 - INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Antecedentes generales sobre hormonas reguladoras de crecimiento vegetal.

---

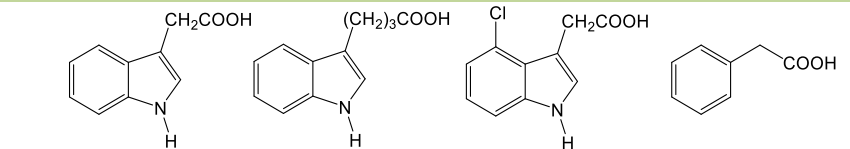
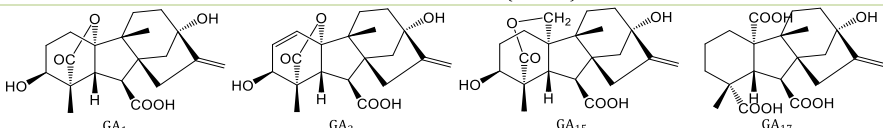
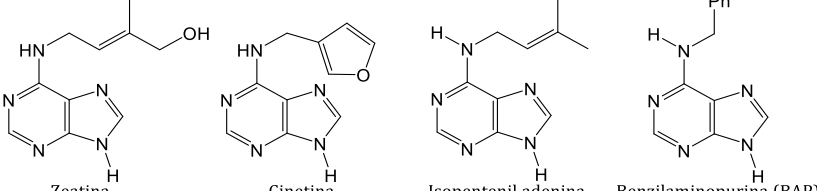
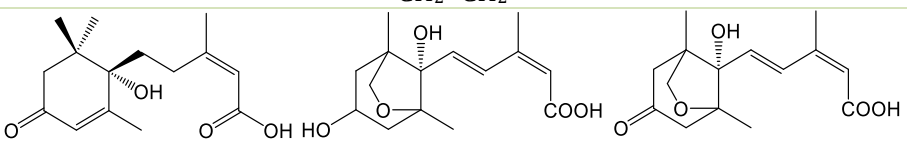
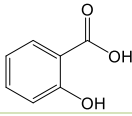
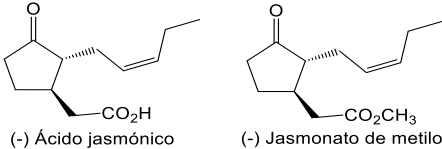
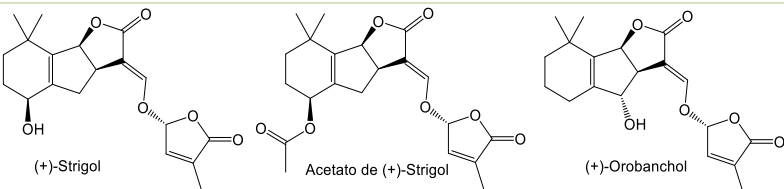
Los organismos superiores cumplen sus funciones normales a través de una alta coordinación entre las diferentes actividades realizadas por células, tejidos y órganos. Asimismo, el organismo debe poder percibir y responder a los cambios de su entorno. Entre los distintos mecanismos de regulación el más conocido es el sistema mediado por mensajeros químicos, el cual corresponde a un conjunto de moléculas esenciales que permiten la comunicación entre células distantes para coordinar sus actividades. Estos compuestos son importantes reguladores del crecimiento y desarrollo en las plantas y median respuestas a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. En los animales hay una enorme variedad de hormonas químicas, cada una de las cuales se dirige a un número limitado de células, provocando una respuesta altamente específica, siendo además sintetizados en tejidos especializados. Por el contrario, en las plantas las hormonas (o fitohormonas) son menores en número, por lo tanto, afectan a la mayoría de las células provocando diversas respuestas, siendo además sintetizadas en todas las células y no sólo en tejidos específicos. Por otro lado, la acumulación y efectos de cada una de las fitohormonas son moduladas por influencias ambientales, de desarrollo, así como por las actividades de otras fitohormonas.

Durante los últimos años se han producido grandes avances tendientes a la comprensión del mecanismo de acción de las fitohormonas, incluidos nuevos descubrimientos en las áreas de biosíntesis, transporte, percepción y respuesta. Los receptores específicos de muchas de las principales hormonas ya han sido identificados. Estudios confirman que las vías de señalización de las hormonas interactúan en múltiples niveles durante el crecimiento y desarrollo de la planta [1,2].

Julius von Sachs y Charles Darwin postularon durante el siglo XIX que diversos procesos de crecimiento de las plantas están regulados por "sustancias" que se mueven de una parte de la planta hacia otra [3,4]. Un siglo más tarde se supo que las sustancias en cuestión son pequeñas moléculas derivadas de diversas rutas metabólicas esenciales. En general, estos compuestos están presentes en concentraciones muy bajas y actúan de forma local, en o cerca del sitio donde se biosintetizan (actividad paracrina), o en tejidos distantes (actividad endocrina). Durante los últimos años, el número de compuestos con

función hormonal ha ido aumentando y ahora se incluyen (pero no se limitan a) auxinas (IAA), giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), Citoquininas, etileno, ácido jasmónico (JA), ácido salicílico y los brasinoesteroides (BRs). Colectivamente estos compuestos regulan todos los aspectos de la vida de las plantas, desde la formación de patrones durante el desarrollo a las respuestas frente a estrés biótico y abiótico [5,6]. En la Tabla 1.1 se muestran algunas de las estructuras químicas de estas hormonas.

**Tabla 1.1** Estructuras químicas de hormonas vegetales naturales.

Hormonas	Estructuras
<b>Auxinas</b>	 <p> <chem>CC(=O)Oc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>CCCC(=O)Oc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>CC(=O)Oc1c[nH]c2ccccc12Cl</chem>    <chem>OC(=O)Cc1ccccc1</chem>            ácido indol acético (IAA)    ácido 3-indol butírico (IBA)    ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA)    ácido 2-fenil acético (PAA)         </p>
<b>Giberelinas</b>	 <p> <chem>CC12C(C)C(C)C(C)C1C(C)C2C(=O)O</chem>    <chem>CC12C(C)C(C)C(C)C1C(C)C2C(=O)O</chem>    <chem>CC12C(C)C(C)C(C)C1C(C)C2C(=O)O</chem>    <chem>CC12C(C)C(C)C(C)C1C(C)C2C(=O)O</chem>            GA<sub>1</sub>    GA<sub>3</sub>    GA<sub>15</sub>    GA<sub>17</sub> </p>
<b>Citoquininas</b>	 <p> <chem>CC(C)=CCNc1ncnc2n(cnc12)C</chem>    <chem>CC(C)=CCNc1ncnc2n(cnc12)C</chem>    <chem>CC(C)=CCNc1ncnc2n(cnc12)C</chem>    <chem>CC(C)=CCNc1ncnc2n(cnc12)C</chem>            Zeatina    Cinetina    Isopentenil adenina    Benzilaminopurina (BAP)         </p>
<b>Etileno</b>	$\text{CH}_2=\text{CH}_2$
<b>Ácido abscísico</b>	 <p> <chem>CC1=C(C)C(=O)C(C)C1C(=O)O</chem>    <chem>CC1=C(C)C(=O)C(C)C1C(=O)O</chem>    <chem>CC1=C(C)C(=O)C(C)C1C(=O)O</chem>            Ácido abscísico (S-cis-ABA)    Ácido 4'-dihidrofaseico    Ácido Faseico         </p>
<b>Ácido Salicílico</b>	 <p> <chem>OC(=O)c1ccccc1O</chem> </p>
<b>Jasmonatos</b>	 <p> <chem>CCCC=CC(=O)C1CCC1C(=O)O</chem>    <chem>CCCC=CC(=O)C1CCC1C(=O)OC</chem>            (-) Ácido jasmónico    (-) Jasmonato de metilo         </p>
<b>Estrigolactonas</b>	 <p> <chem>CC12C(C)C(C)C(C)C1C(C)C2C(=O)O</chem>    <chem>CC12C(C)C(C)C(C)C1C(C)C2C(=O)OC</chem>    <chem>CC12C(C)C(C)C(C)C1C(C)C2C(=O)O</chem>            (+)-Strigol    Acetato de (+)-Strigol    (+)-Orobanchol         </p>

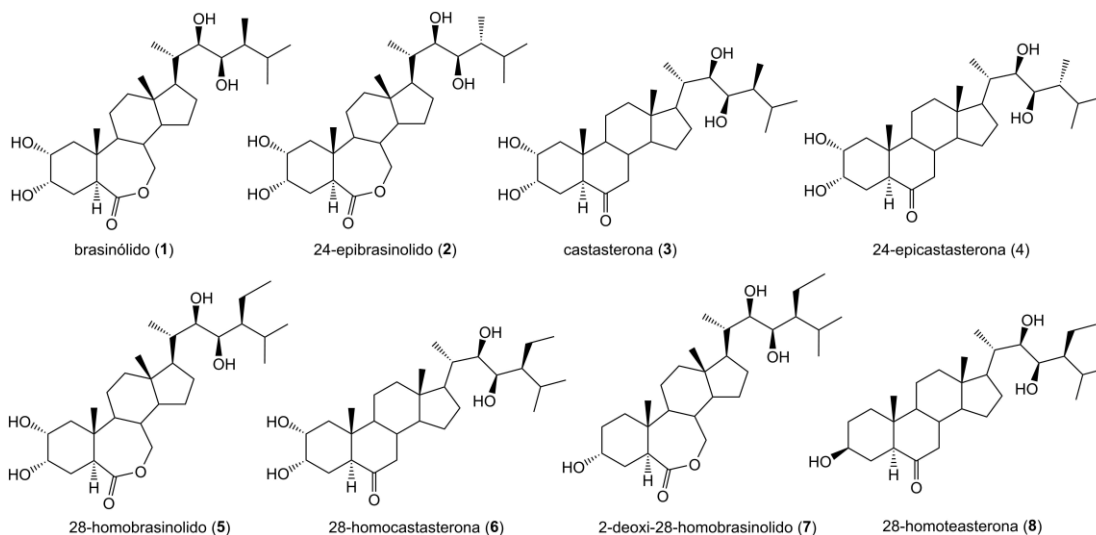
## 1.2 Brasinoesteroides

---

Dentro de la gran variedad de esteroides sintetizados por las plantas, se reportó en 1970 que los extractos de Colza (*Brassica napus* L.) producían un efecto de elongación en el tallo de frijol. A las sustancias que tienen este efecto de crecimiento se les denominó “brassinós” [7]. Sin embargo, en 1979 se reportó un regulador potente de crecimiento vegetal llamado brasinólido (**1**) (Figura 1.2.0), el cual promueve la división celular y crecimiento de las plantas [8]. La evaluación práctica del uso del brasinólido (**1**) mostró que un efecto importante consistía en acelerar la resistencia a varios tipos de estrés, tales como temperaturas extremas, infecciones por hongos, además de los daños ejercidos por herbicidas y salinidad del suelo [9].

Una vez confirmadas las propiedades de los brasinoesteroides (BRs), el interés en investigar aplicaciones prácticas junto con obtener una mayor comprensión de los BRs fue cada vez más creciente [10-12].

Los BRs son hormonas de tipo polihidroxi-esteroidal de reducido peso molecular que se encuentran dentro de las 7 familias de hormonas vegetales o fitohormonas [13], junto con las auxinas, citoquininas, giberelinas, el ácido abscísico, el etileno, el ácido jasmónico [14] y donde principalmente se encuentran es en las gimnospermas, en planta monocotiledóneas, dicotiledóneas y en algas [12, 15-18]. Algunos ejemplos de estructuras de Brasinoesteroides naturales más comunes presentes en las plantas se muestran en la Figura 1.2.0. Los BRs se encuentran en mayor concentración en las estructuras reproductivas y tejidos en crecimiento (polen, semillas no maduras y brotes), de esta forma esta fitohormona controla la expresión de varios genes, realizando un rol fundamental en el crecimiento de las plantas, morfogénesis y confiriendo resistencia al estrés biótico y abiótico [8, 12, 19-22].

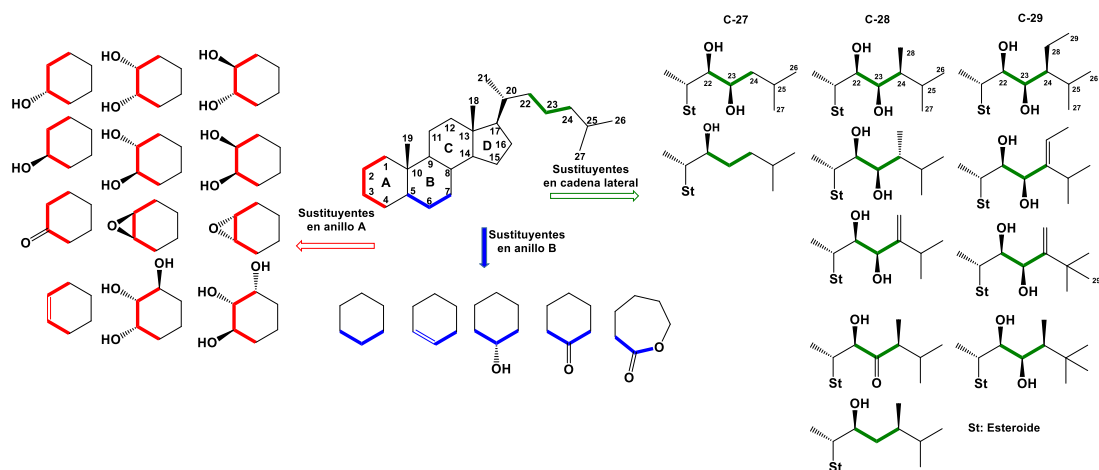


**Figura 1.2.1** Estructuras de algunos brasinoesteroides naturales.

Los BRs tienen cualidades promotoras de crecimiento y diferenciación, influyendo en distintos procesos como son la germinación, crecimiento radicular, elongación del tallo, fotomorfogénesis en plántulas, diferenciación vascular, floración, fertilidad y senescencia, como también resistencia al estrés biótico y abiótico [22]. A partir del descubrimiento del brasinólido (1) (Figura 1.2.0), se han identificado más de 70 análogos en plantas superiores, algas y hongos [23]. Estos compuestos se han aislado de todos los órganos de las plantas (tallos, raíces, hojas, semillas, anteras, flores, flores y polen), son secretados de forma endógena en muy bajas cantidades y se acumulan a muy bajas concentraciones; siendo las semillas de polen inmaduras las estructuras con más altos niveles de BRs, encontrándose en un rango de 1-100 ng/g de peso fresco, entretanto los brotes y hojas suelen poseer una menor concentración: 0,01-0,1 ng/g [24].

Los BRs poseen un esqueleto base del tipo  $5\alpha$ -colestano (Figura 1.2.1), y se pueden clasificar como BRs de 27, 28 o 29 átomos de carbono, dependiendo de la funcionalización del grupo alquilo en el carbono C-24 de la cadena lateral (Figura 1.2.1). Las variaciones estructurales se pueden observar en la cadena lateral, el tipo y orientación de los sustituyentes oxigenados en los anillos A y B, y el tipo de fusión entre estos (A/B cis o A/B trans). Aquellos BRs naturales con actividad biológica comparable al brasinólido (1) presentan funciones oxigenadas en las posiciones C-2 y C-3 del anillo A (preferentemente de tipo  $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi), posición C-6 en anillo B preferentemente

funcionalizado como cetona o lactona (6-oxo o 7-oxolacona), posiciones C-22 y C-23 oxigenadas (preferentemente como 22*R*,23*R*-dihidroxilo), fusión trans entre anillos A/B y sustitución alquilo en C-24 (Figura 1.2.1). Sin embargo, se han encontrado BRs con cadenas laterales diferentes a aquellos con C-28 encontrados en la naturaleza, como pueden ser el 28-homobrasinólido (**5**) y 28-homocasterona (**6**) (Figura 1.2.0), los cuales poseen una estructura tipo 5 $\alpha$ -estigmastano y son los que presentan una mayor actividad biológica en la serie C-29 [24,25].



**Figura 1.2.2** Diferentes patrones de sustituyentes en los anillos A, B y la cadena lateral de brasinoesteroides de origen natural.

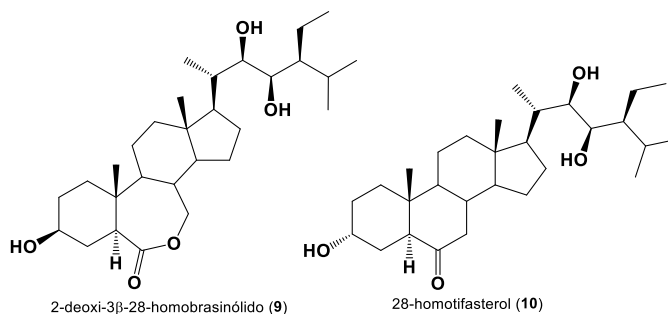
### 1.2.1 Relación Estructura-Actividad relativa de los brasinoesteroides.

Existen distintos tipos de bioensayos para evaluar la actividad biológica de los BRs, pero sus resultados pueden diferir entre sí. El ensayo más comúnmente utilizado es el ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) (*Oryza sativa*), sin embargo, este ha sido adaptado por distintos grupos a partir del protocolo básico de ILA, incluso llegando a variar los cultivares de arroz, lo que da una alta variabilidad en los resultados [26]. En cuanto al límite de detección en el ILA, este es de 0,5 ppb para el brasinólido (**1**) y de 5 ppb para el 28-homobrasinólido (**5**), mientras que, para el ácido indolacético, otras fitohormonas, es de 50 ppm [26-29]. El análisis de datos de actividad biológica se ve dificultado por la falta de normalización entre los distintos bioensayos, que a su vez se les debe sumar las distintas combinaciones de tipos de sustituyentes presentes en los BRs.

Por ejemplo, al comparar la actividad de 7-oxa-lactona con 6-cetona se observa una disminución en la actividad relativa del 100% al 50% en la mezcla brasinólido (1)/castasterona (3) [30]. A su vez se ha observado que la 24-epicastasterona (4) es casi 3 veces más activa que la castasterona (3) [31]. Independientemente de estas variaciones, la relación estructura-actividad se puede generalizar como se describe en las siguientes secciones.

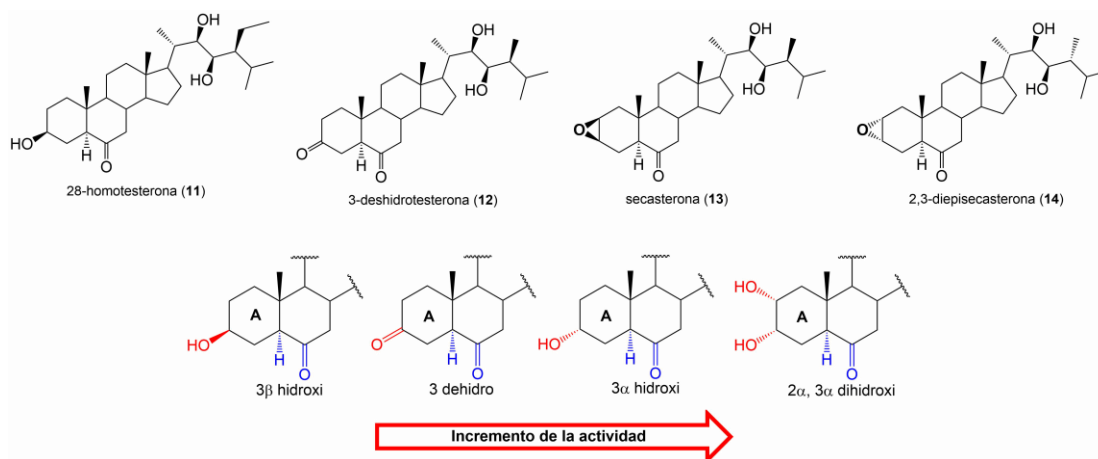
### 1.2.2 Relación estructura-actividad basada en modificaciones del anillo A.

La funcionalización del anillo A y sus efectos en la actividad biológica de plantas fue estudiada en cierta medida en la serie de BRs 28-homo [32], la cual presentó una ligera baja en la bioactividad en ILA (*Oryza sativa* cultivar Arborio) al cambiar las posiciones de los grupos hidroxilos  $2\alpha$ ,  $3\alpha$  (5) a  $2\alpha$ ,  $3\beta$  en 28-homobrasinólido (5). También se reportó que el 28-homobrasinólido (5) es diez veces más activo que sus derivados 2-desoxi-28-homobrasinólido (7) y su epímero  $3\beta$  (9) (Figura 1.2.1), mientras que el 28-homotifasterol (10) (Figura 1.2.1) es aproximadamente diez veces menos activo que la 28-homocastasterona (6) en el mismo tipo de ensayo, por lo que se concluye que la sustitución  $2\alpha$  no es indispensable para que un BR presente actividad biológica.



**Figura 1.2.1** Estructuras de 2-deoxi-3β-28-homobrasinólido (9) y 28-homotifasterol (10).

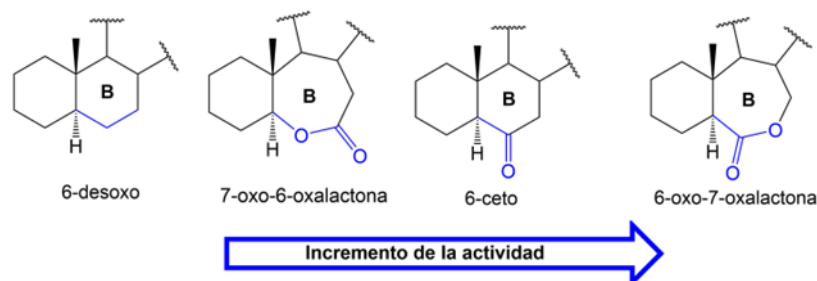
En cuanto a los isómeros  $3\beta$ , como la 28-homotesterona (11), se encontraron que fueron 10 veces menos activos que el 28-homobrasinólido (5) y la 28-homocastasterona (6). Por otro lado, los compuestos 3-desihotesterona (12), secasterona (13) y 2,3-diepiscasterona (14) muestran, respectivamente, 74%, 59% y 89% de la actividad relativa de la 24-epicastasterona (4) en el ensayo ILA [33, 34] (Figura 1.2.2), por lo que la posición  $3\alpha$  sería preferible a la  $3\beta$ .



**Figura 1.2.2** Estructuras de algunos brasinólidos y relación estructura-actividad relativa en el anillo A.

### 1.2.3 Relación estructura-actividad basada en las modificaciones del anillo B.

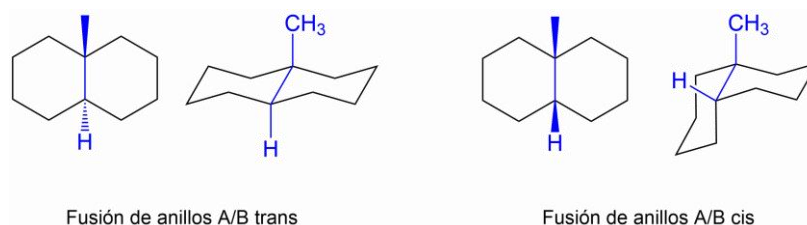
Los brasinoesteroides que presentan una mayor actividad biológica son aquellos con función 6-oxo-7-oxalactona, seguidos en actividad relativa por los BRs con función 6-ceto. En la literatura se ha reportado que la ausencia de una función de oxígeno en las posiciones C6 - C7 en el anillo B afecta negativamente la actividad relativa de BRs, como es el caso de la 6-deoxocasterona que muestra sólo el 1% de la actividad relativa de la castasterona (3) [35], llegando a resultados en donde los BRs 6-desoxo son prácticamente inactivos [36]. Por otro lado, la transformación de la 6-oxo-7-oxalactona a 6-oxa-7-oxolactona reduce drásticamente su actividad relativa (Figura 1.2.3) [37-39].



**Figura 1.2.3** Efecto en la actividad biológica de la funcionalización relativa en el anillo B.

### 1.2.4 Relación estructura-actividad relativa en la fusión de los anillos A/B

Los estudios que ahondaron en la relación estructura-actividad se llevaron a cabo por Brosa et al. (1996) [40], donde se utilizaron los análogos de Brasinoesteroides para las evaluaciones. Los grupos hidroxilos y la fusión de anillos A/B cis o trans fueron cruciales en la actividad biológica encontrada. Algunos de los resultados más importantes se presentaron en las pruebas de ILA con BRs no naturales con fusión de anillo A/B cis [41]. No obstante, se ha encontrado que la fusión de anillo A/B trans (Figura 1.2.4) obtiene una buena actividad relativa medida a través de ILA [42-43].



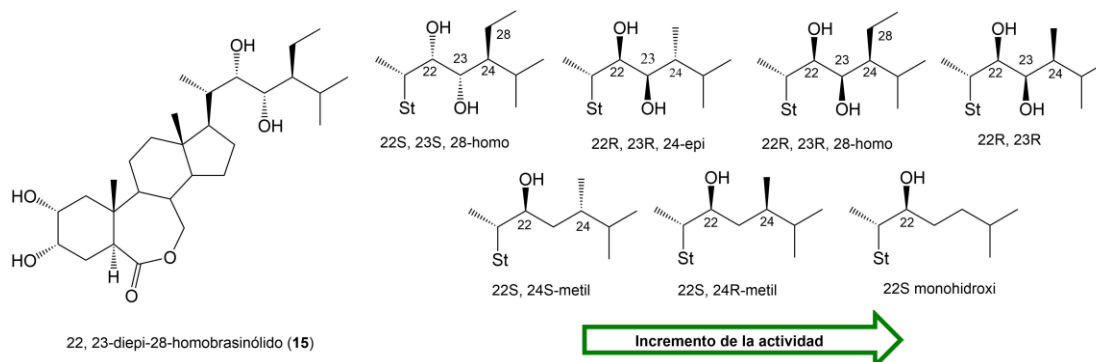
**Figura 1.2.4** Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de  $5\alpha$ -colestano y  $5\beta$ -colestano con fusión de los anillos A/B tipo trans (izquierda) y con fusión de los anillos A/B tipo cis (derecha).

### 1.2.5 Relación estructura-actividad basada en la funcionalización y longitud de la cadena lateral.

La diversificación de la cadena lateral y su importancia se reportó en el año 1980 con la síntesis de 22, 23 diepi-28-homobrasinólido (**15**) y su alta actividad biológica en ILA (*Oryza sativa* cultivar Kinmaze), la que obtuvo un ángulo de  $120^\circ$ , superando en  $97^\circ$  al control [44-45]. Los BRs 28-homobrasinólido (**5**) y 28-homocasterona (**6**) presentaron 100% y 87% de la actividad relativa comparada con el brasinólido (**1**) y castasterona (**3**) respectivamente, en ILA (Figura 1.2.5) [29, 46].

Distintas estructuras con cadena lateral corta han sido reportadas, obteniendo resultados en pruebas de actividad biológica similares a aquellas del 24-epibrasinólido (**24**) para algunos análogos [47-48]. Estas variantes no han sido particularmente

estudiadas por lo que aún no es claro su relación con la actividad promotora del crecimiento.



**Figura 1.2.5** Estructura de 22,23-diepi-28-homobrasinólido (**15**) y efecto en la actividad biológica de los sustituyentes en la cadena lateral.

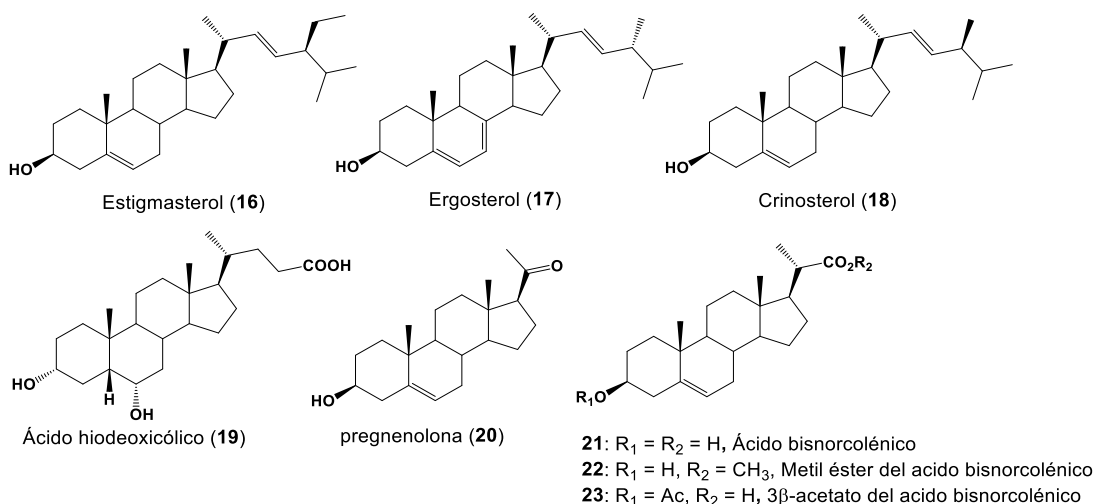
### 1.2.5 Síntesis de Brasiñoesteroides y sus análogos.

Como se mencionó anteriormente, los BRs pertenecen a un de fitohormonas que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas al producir una serie de cambios fisiológicos y provocar funciones muy importantes, como la regulación del crecimiento de las plantas y la división y diferenciación celular en tejidos jóvenes de plantas en crecimiento [7, 22, 49-51]. También juegan un rol importante en las respuestas al estrés abiótico, como sequía, salinidad, alta temperatura, baja temperatura y estrés por metales pesados, etc. [52, 53].

Sin embargo, la baja abundancia de BRs en fuentes naturales, su poderosa actividad biológica y sus interesantes estructuras han impulsado un esfuerzo considerable en el desarrollo de nuevos enfoques sintéticos para él y brasinólido (**1**) y BRs naturales estructuralmente relacionados. Desde un punto de vista químico, los BRs son compuestos estructuralmente bastante complejos con un número significativo de centros quirales y grupos funcionales. Aunque se han desarrollado varios intentos para la obtención de estos, su síntesis total parece difícil y poco práctica [54, 55]. Entonces las síntesis parciales usando otros esteroides abundantes como sustancias de partida, con funciones orgánicas en posiciones apropiadas (fáciles y convenientes de ser modificados

químicamente), es la única forma de obtener cantidades suficientes de estos compuestos, tanto para fines científicos como prácticos.

En función de lo anterior, en las últimas décadas, los esfuerzos se han centrado en la síntesis de nuevos análogos de BRs, manteniendo patrones comunes de funciones orgánicas en los anillos A/B y la fusión *cis-trans* entre ellos, como ocurre en algunas BRs naturales, pero con moderados cambios estructurales en la cadena lateral. Para la síntesis de BRs naturales y sus análogos, se han utilizado una serie de esteroides naturales disponibles en forma comercial y que son relativamente abundantes (Figura 1.2.6) [56-58].



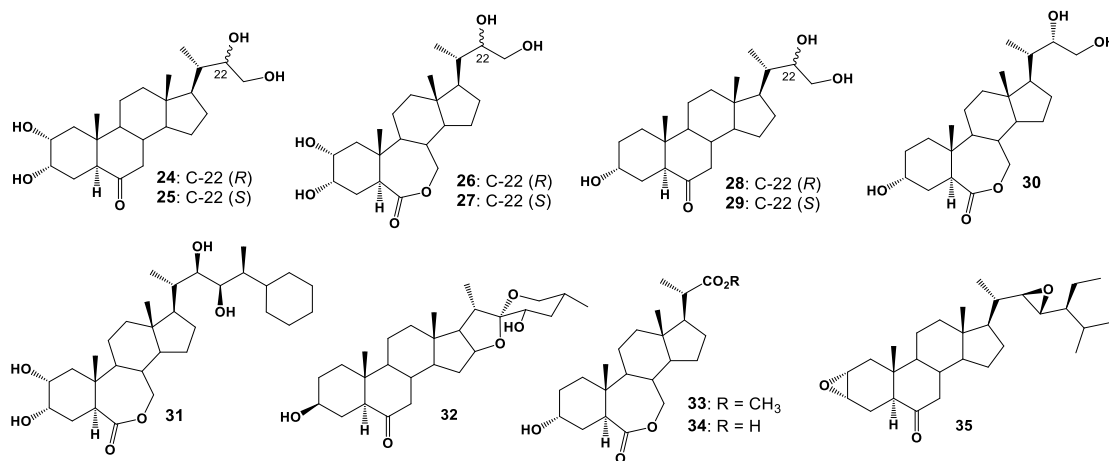
**Figura 1.2.6** Estructuras de los esteroides principales **16-23** utilizados como sustancias de partida para la síntesis de brasinoesteroides naturales y sus análogos.

Desde los estudios desarrollados en síntesis de Brs naturales y sus análogos, se obtuvieron interesantes resultados relacionados con la estructura y actividad biológica (SAR) de los que se llegaron a definir los requerimientos estructurales que deben poseer los BRs para presentar actividad biológica [24, 32, 59]:

1. Debe contener funciones: *cis* 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -glicol en el anillo A.
2. Función 6-ceto o 7-oxalactona en anillo B.
3. Fusión de anillos A/B de tipo *trans*.
4. En la cadena lateral se requiere de función glicol en los carbonos C-22 y C-23 preferentemente con configuraciones 22*R*, 23*R* y un grupo sustituyente de tipo metilo o etilo en el carbono C-24.

### 1.3 Análogos sintéticos de brasinoesteroides con modificación en la cadena lateral.

Algunos de los requisitos mencionados anteriormente no parecen estar del todo claros, especialmente el relacionado con la cadena lateral, dado que se han preparado un gran número de análogos de brasinoesteroides con importantes cambios estructurales en la cadena lateral como por ejemplo cadenas laterales más cortas, diferentes funciones oxigenadas, cadenas de tipo estirostánicas, cíclicas, cadenas laterales con funciones carboxílicas, ésteres, epóxidos, etc. (compuestos **24-35**) y donde algunos de estos han mostrado actividades biológicas en distintos ensayos [60-65]. Algunos ejemplos de estos análogos se muestran en la Figura 1.3.1.

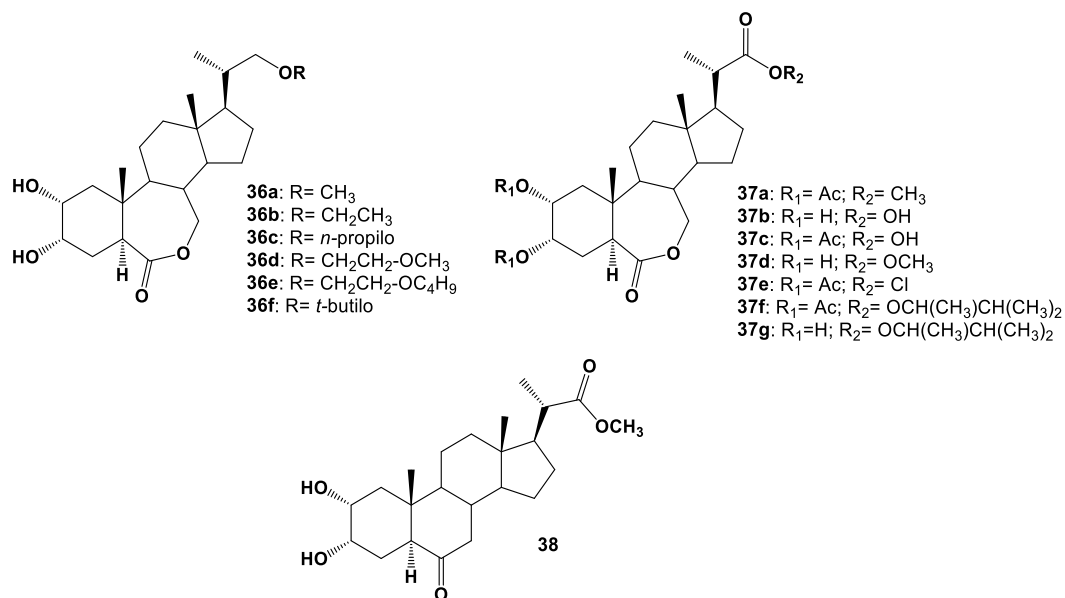


**Figura 1.3.1** Estructuras de análogos de brasinoesteroides con modificaciones importantes en la cadena lateral.

Otro grupo importante de análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales más cortas y funciones de ácidos carboxílicos, ésteres y éteres, se han sintetizado desde esqueletos del tipo pregnanos y 23,24-bisnorcolanos. Es el caso de los análogos mostrados en la Figura 1.3.2.

Los compuestos de la serie (**36a-36f**), fueron evaluados en el bioensayo de elongación del segundo entrenudo del frijol, donde el análogo **36b** mostró una destaca actividad biológica por sobre el resto de la serie [66]. Mientras que la serie de análogos **37a-37g** fue evaluada en los bioensayos de curvatura del primer entrenudo y elongación del segundo entrenudo del frijol, donde todos los compuestos evaluados mostraron

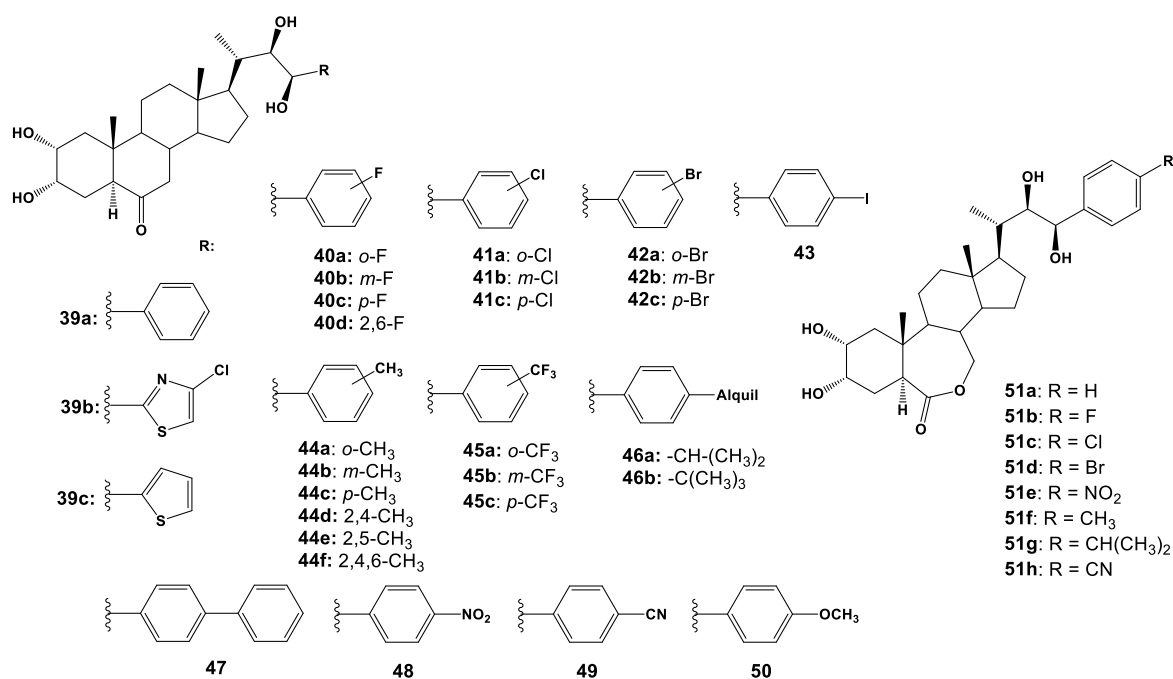
actividad biológica, destacando el análogo **37b**, con actividad comparable al 24-epibrasinólido (**2**), utilizado como control positivo [67]. Sí bien el análogo **33** fue preparado desde 23,24-bisnorcolanos, no se informaron datos de actividad biológica [68].



**Figura 1.3.2** Análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales del tipo 23,24-dinorpregnanos, funcionalizadas en forma de éteres, ésteres y ácidos carboxílicos.

Por otra parte, se han reportado interesantes trabajos relacionados con la síntesis de análogos de BRs, con incorporación de sistemas heterocíclicos aromáticos y aromáticos sustituidos. Todos ellos en la cadena lateral (arilbrasinoesteroides). Estos análogos fueron preparados por investigadores de varios grupos diferentes, correspondientes a los análogos **39-51** (Figura 1.3.3). Los análogos **39b** y **39c** lograron producir el alargamiento de hipocotilo en el ensayo *Arabidopsis det-2* [69] y, además, mostraron como resultado una actividad significativa en el ensayo de elongación del segundo entrenudo de frijol francés [70]. Mientras que los análogos **39a** y **40c** mostraron actividades comparables a los efectos inducidos por 24-epicastasterona (**4**). El correspondiente análogo de brasinoesteroide **51a** que posee un anillo lactona de 7 miembros, fue el compuesto más potente que se identificó, con una actividad cercana a la mostrada por el brasinólido (**1**) [71]. El análogo **51a** junto con **39a** y **40c** mostraron una potente actividad para inducir la producción de la hormona etileno en plántulas de guisantes y en el ensayo de sensibilidad de enraizamiento de *Arabidopsis thaliana* L.

mostrando actividad comparable a la del brasinólido (**1**) [71, 72]. De la serie de arilbrasinoesteroides halogenados, los análogos **40a**, **41b** y **42a**, (Figura 1.3.3) fueron los más activos en ambos ensayos biológicos, comparados con 24-epibrasinólido (**2**) [72]. Otro aspecto importante informado por los autores tiene relación con el tipo de sustitución con grupos voluminosos (compuestos **46b** y **47**) o más de un grupo (**45a** y **44e**) induce una gran disminución o pérdida completa de actividad. Este efecto se ha explicado en términos de las interacciones del grupo fenilo con el receptor, donde el grupo fenilo podría orientarse fuera de la cavidad del sitio por efecto de los grupos sustituyentes [72].

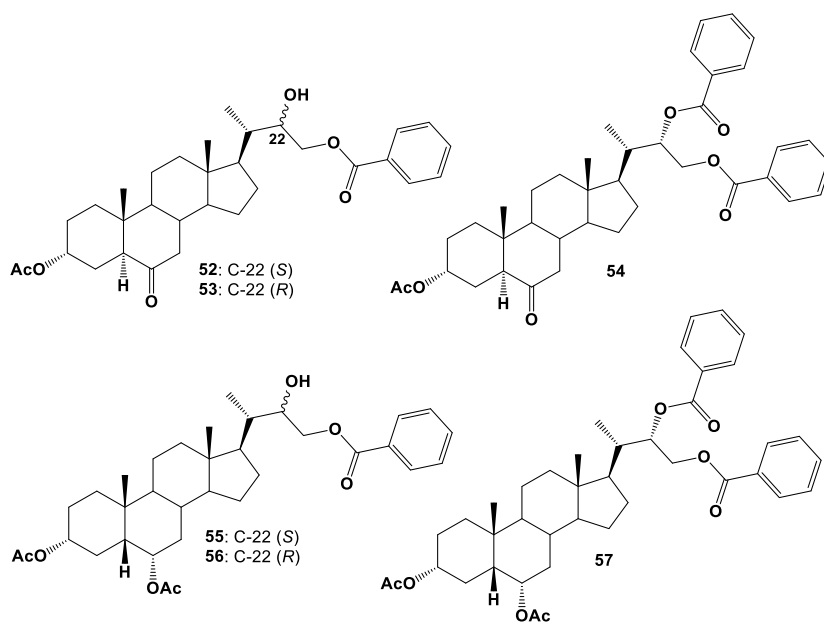


**Figura 1.3.3** Análogos de brasinoesteroides con sustituyentes aromáticos en la cadena lateral (arilbrasinoesteroides).

Por otra parte, el grupo de investigación del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, ha reportado la síntesis y evaluación biológica de nuevos análogos de BRs del tipo 24-Nor colanos, con funciones benzoato en la posición C-23 de la cadena lateral (Figura 1.3.4) obtenidos a partir del ácido hiodesoxicólico (**19**) [62, 74, 74]. De esta forma, se evaluó la actividad biológica de los compuestos **52-57** utilizando el Ensayo de Inclinación de Lámina de Arroz (ILA) y elongación de raíces en *Arabidopsis thaliana*. En estos ensayos, los compuestos **52** y **53** mostraron una actividad biológica similar entre ellos, a concentraciones de  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  M, siendo el

análogo **53** ligeramente más activo en ILA. Sin embargo, el compuesto **62** fue más activo que el brasinolido (**1**) en todas las concentraciones evaluadas. Mientras que el compuesto **54** fue considerablemente menos activo en el mismo ensayo, pero fue el más activo en el ensayo de *A. thaliana* [75]. Además, los resultados de un estudio de acoplamiento molecular (Docking molecular) para ILA sugieren que este comportamiento podría explicarse en términos de interacciones hidrofóbicas del ligando con el receptor BRI1-LRR y después de la formación del complejo BRI1-Ligando-BAK1 generando enlaces de hidrógeno del ligando con BAK1 [75].

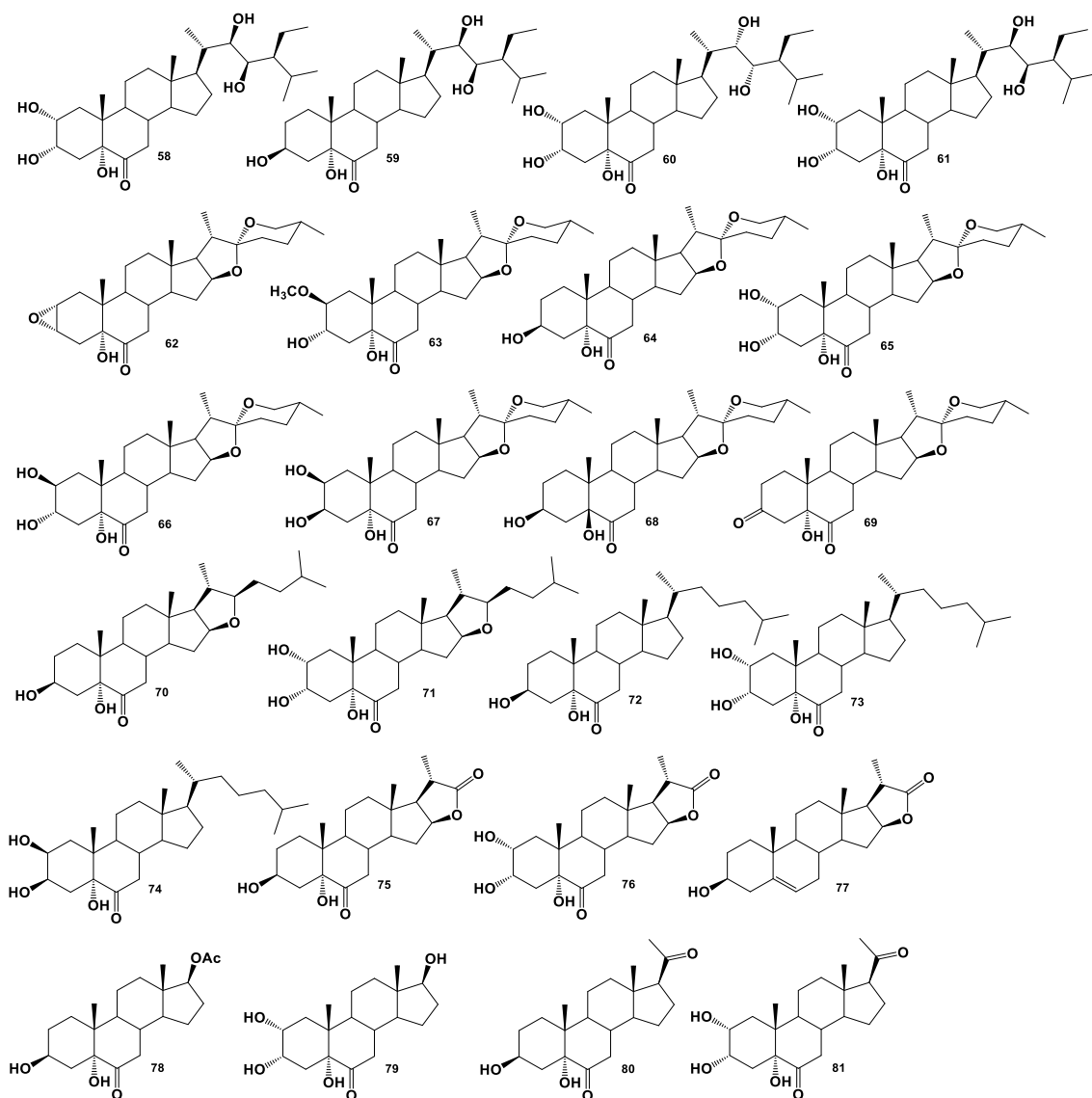
Además, los compuestos **55** y **56** también se evaluaron en ILA, sin embargo, la mezcla de diastereoisómeros **55/56** (proporción 1:0/0,44) fue significativamente más activa que el brasinólido (**1**) a la concentración  $1 \times 10^{-8}$  M. Mientras que el análogo **57** (dibenzoato) fue mucho menos activo en las tres concentraciones evaluadas [74]. Sin embargo, se sabe que los análogos de brasinoesteroides con fusión de anillos A/B *cis* son menos activos que aquellos que contienen la fusión de anillos A/B *trans* [43].



**Figura 1.3.4** Análogos de brasinoesteroides del tipo 24-Nor colanos, con funciones benzoato en la posición C-23 de la cadena lateral.

### 1.4 Análogos sintéticos de brasinoesteroides con funciones 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo y diferentes cadenas laterales.

Otra modificación interesante desde el punto de vista de la diversidad estructural y de la actividad biológica, guarda relación con análogos de brasinoesteroides que se han sintetizado y contienen una función 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo entre los anillos A/B, y diferentes cadenas laterales como los compuestos **58-81**, indicados en la Figura 1.4.1.



**Figura 1.4.1** Análogos de brasinoesteroides con función 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo y modificaciones estructurales en la cadena lateral.

De esta forma, el análogo **58** mostró un 66% de la actividad en el Ensayo de la Inclinación de la Lámina de Arroz a la concentración de 1µg/planta, comparada con el brasinólido (**1**) [29, 40, 57, 76-78], mientras que los análogos **62** y **63** fueron activos en el ensayo de elongación de hipocótilos y expansión de cotiledones de rábanos en el rango de concentraciones entre 10<sup>-4</sup>-10<sup>-7</sup> mg/mL [79-84]. El compuesto **64** es el ingrediente activo en la formulación de B-2000®, el cual es un potente biorregulador de crecimiento vegetal que contribuye a mejorar la calidad y condición de la fruta, aumentando el rendimiento de las cosechas [85]. Los análogos **70** y **71** fueron evaluados en el ensayo del segundo entrenudo del frijol, donde ambos compuestos produjeron una estimulación significativa a la dosis de 2,5 y 5,0 ng/planta [86]. Los compuestos **72-74**, que contienen la cadena lateral sin funciones oxigenadas (colestano), fueron evaluados en el ensayo de segundo entrenudo del frijol, donde los análogos **72** y **73** mostraron interesante actividad en el rango de 1 pg - 1 ng por planta, comparados contra 28-homobrasinólido (**5**) [87]. Por otra parte, las lactonas dinorcolánicas **75** y **76**, derivadas desde vestertilin (**77**), fueron evaluadas en el mismo ensayo del frijol donde presentaron mayor actividad que 28-homobrasinólido (**5**), pero vestertilin (**77**) fue la más activa de todas en el mismo rango de concentraciones de 1 pg - 1 ng por planta [88]. Mientras que la serie de compuestos de pregnanos (**78-81**) no mostraron una notable actividad promotora del crecimiento de las plantas en los bioensayos de elongación de hipocotilos y expansión de cotiledones de rábano [89, 90].

---

### 1.5 Estudios “*in-silico*” de Relación Estructura Actividad (SAR)

---

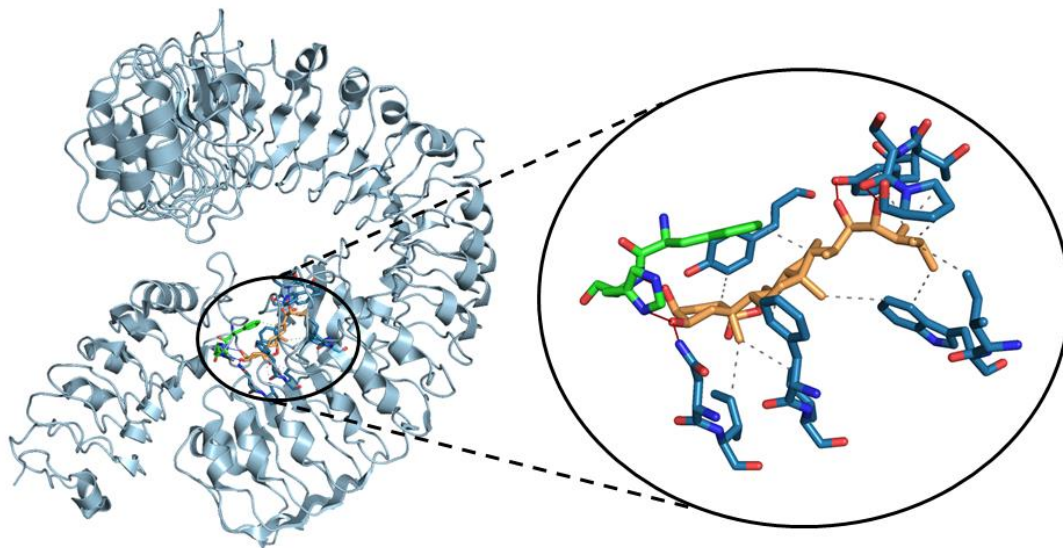
Debido a la baja abundancia de los BRs naturales, lo costoso, largo y difícil de las síntesis de estos compuestos y sus análogos, se ha incentivado la búsqueda de análogos bioactivos utilizando técnicas bioinformáticas para tener una herramienta de cribado que permita un diseño de síntesis más eficiente de nuevos análogos con buena actividad o determinar la naturaleza de las interacciones receptor-ligando. Estudios iniciales de SAR cualitativos [30, 31] permitieron determinar los requisitos estructurales que permitan mantener la actividad promotora del crecimiento en análogos de BRs los cuales fueron mencionados anteriormente (Sección 1.2.5) y recalcan la importancia del efecto que las

variaciones estructurales en los análogos de BRs pueden tener sobre su interacción con el sitio de unión al receptor de BRs [30, 31]. Más tarde, el desarrollo de estudios *in-silico* para la identificación de nuevos análogos de BRs potencialmente activos como acoplamiento molecular (docking) y SAR cuantitativo (QSAR), comenzaron a tener un importante rol en el diseño racional de nuevas moléculas más activas. Brosa et al. estudiaron 2D-QSAR, trabajando con análogos de BRs con las siguientes variaciones: distintos sustituyentes alquilo en C-24; distinta configuración de grupos hidroxilos C-22 y C-23 (RR o SS); distinta configuración de los grupos hidroxilos en C-2 y C-3 ( $\alpha\alpha$  o  $\beta\beta$ ); distinta fusión de anillos A/B (*trans* o *cis*); la presencia o ausencia del grupo lactona en el anillo B; y el reemplazó del átomo de H del C-5 por un grupo hidroxilo ( $\alpha$  o  $\beta$ ) [40, 78]. Brosa et al. mediante análisis de correlación lineal por el método de regresión múltiple de la actividad real versus la actividad calculada llegan a la conclusión de que los requisitos estructurales deben indicarse no como la presencia o ausencia de una funcionalidad sino como la distribución espacial de todas las funcionalidades presentes en ella y esta orientación espacial puede ser indicada como distancias o ángulos entre los átomos de oxígeno presentes en un BRs que permitirán una adecuada interacción con el receptor [40, 78].

Por otra parte, nuestro grupo de investigación informó recientemente de un estudio que emplea la técnica de diseño de fármacos basada en ligandos (LBDD), a través de un análisis comparativo de campo molecular (CoMFA) y un análisis comparativo de índices de similitud molecular (CoMSIA) [91], para determinar los factores claves para la actividad promotora de la acción hormonal de brasinoesteroides informados en la literatura, utilizando el ensayo del Segundo Entrenado del Frijol (SEF). Encontrando interesantes resultados con respecto a la cadena lateral que indican lo siguiente: grupos aceptores de puente de hidrógeno son desfavorables en el C-20; sin embargo, pueden explorarse grupos donadores de puente de hidrógeno; la presencia del grupo hidroxilo en C-22 es positivo para la actividad; el grupo hidroxilo sobre C-23 es menos prescindible que el grupo hidroxilo en C-22; en la cadena alquílica de C-24 a C-28 se debe tener precaución con los grupos voluminosos y el uso de grupos que restan densidad electrónica son positivos para la actividad.

Por otro lado, la obtención de la estructura cristalina del receptor BRI1 tanto en su forma libre como unido a brasinólido (**1**) mediante cristalografía de rayos X [92, 93], ha permitido generar la estructura terciaria de BRI1, elucidar que región y aminoácidos

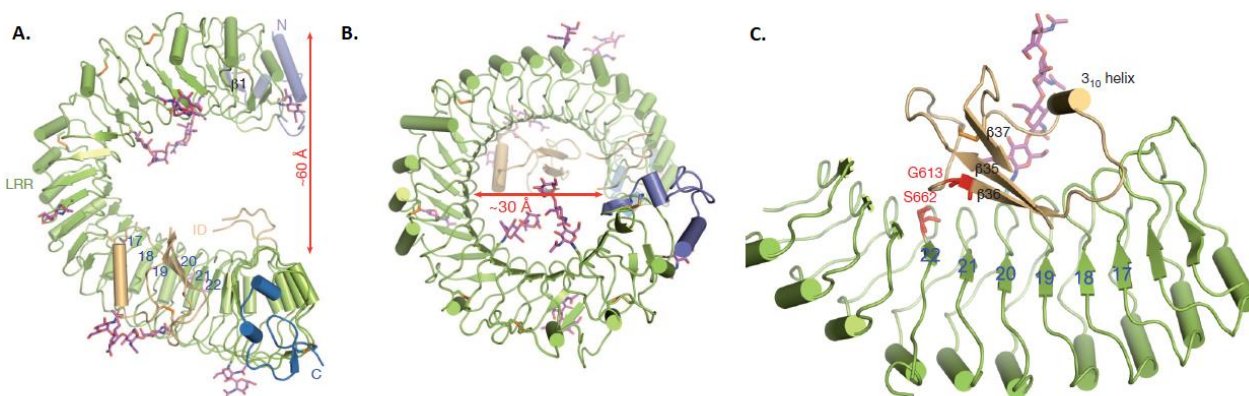
forman el sitio de unión de BRI1 y como interactúan con regiones específicas del brasinólido (**1**) (Figura 1.5.1), además, demostrar que la unión de brasinólido (**1**) facilita cambios conformacionales que permiten la asociación con BAK1 [92-94].



**Figura 1.5.1** Complejo BRI1-BAK1 cocristalizado con Brasinólido (**1**) (código PDB: 4M7E).

Las LRRs presentes en el dominio extracelular de BRI1 se pliegan dando una estructura terciaria tipo selenoide altamente curvada y que se distingue de otras proteínas con presencia de LRRs por adoptar una conformación curvada torcida en lugar de una conformación curvada en forma de herradura (ejemplo: TLRs, Toll like receptors). Esta hélice torcida da un giro completo y forma un diámetro interno de 30 Å y la distancia entre LRR1 y LRR25 es de 60 Å entre los extremos de la hélice (Figura 1.5.2 A). Este dominio extracelular presenta distintos tipos de motivos en su estructura secundaria como: hélice alfa, lámina beta, hélice 310 y lámina beta específica de plantas. Por otro lado, El extremo N-terminal (30-70) posee una lámina beta y dos hélices alfa y el extremo C-terminal (752-772) tiene dos hélices alfa [92, 93]. En la estructura tipo selenoide del receptor se puede apreciar la formación de un lado cóncavo y de otro lado convexo y desde la vista superior se aprecia por el perímetro externo de la circunferencia la presencia de motivos tipo hélice y por el perímetro interno motivo tipo lámina beta, y en el centro de este perímetro se ubica el dominio isla (596-643) importante para la unión del ligando. El dominio isla está compuesto por una hélice 310 y tres láminas beta orientadas de manera antiparalela ( $\beta$ 35,  $\beta$ 36 y  $\beta$ 37), como se aprecia en Figura 1.5.2 B y

Figura 1.5.2 C y dentro de la superhélice forma interacciones hidrofóbicas y polares con LRRs 13-25 y se estabiliza por un puente disulfuro entre Cys609 y Cys635 [92-93].



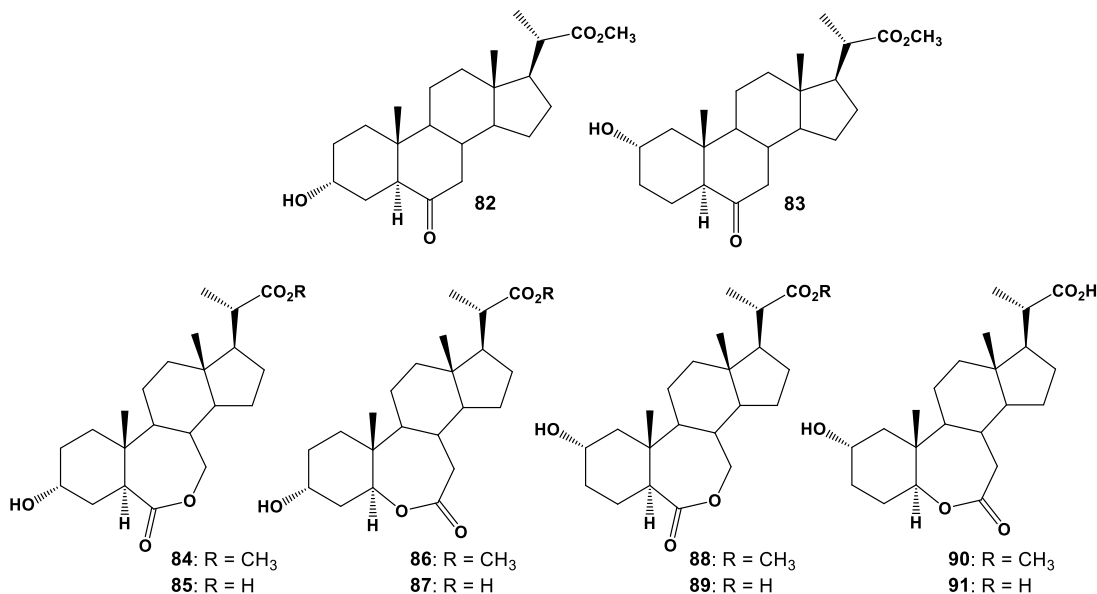
**Figura 1.5.2 A.** Vista lateral del receptor BRI1 sin unirse al brasinólido (**1**) en azul se muestra el extremo N-terminal y C-terminal y en amarillo se muestra el dominio isla **B.** Vista superior del receptor BRI1 sin unirse al brasinólido (**1**). **C.** Interacción del dominio de inserción con la superficie cóncava.

Una molécula de brasinólido (**1**) se une a un monómero de BRI1, en un bolsillo hidrofóbico que se encuentra entre en el dominio de unión y el lado cóncavo, donde tanto el dominio isla y parte de las LRRs de la superhélice contribuyen a la formación del sitio de unión. La interacción de brasinólido (**1**) en el sitio de unión puede ser analizada por partes: el anillo A tiene leve participación en la interacción; el anillo B interacciona de manera hidrofóbica con el aminoácido apolar Tyr642 y el átomo de oxígeno del carbonilo en C-6 es aceptor de puente de hidrogeno con una molécula de agua que también forma puente de hidrogeno con el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de Tyr599 ; los anillos C y D se intercalan entre dos aminoácidos apolares Phe681 y Tyr599; lo grupos metilos en el C-18 y C19 se acoplan a dos cavidades en la parte inferior del bolsillo de unión y la parte opuesta a estos dos grupo metilos es orientada hacia la parte circundante al solvente; la cadena lateral alquímica se encaja en un bolsillo hidrofóbico de tamaño pequeño (no permite grupos muy voluminosos) formado por los residuos de aminoácidos apolares (Ile563, Trp564, Met657 y Phe658) y los átomos de carbono presentes desde C-24 hasta C-28 son enterrados completamente en el surco hidrofóbico; la función cis-diol en C-22 y C-23, el grupo hidroxilo en C-23 forma puente de hidrógeno con Ser647; y la función cis- $\alpha$ -diol en C-2 y C-3 es expuesta al solvente. La parte de la molécula de brasinólido (**1**) que es expuesta al solvente es considerada importante para

participar en la interacción con el co-receptor BAK1, como se aprecia en la parte inferior izquierda de la Figura 1.5.1 [92, 93].

Al comparar la estructura cristalográfica terciaria del receptor BRI1 en su forma libre y en su forma unida a brasinólido (**1**), se logró determinar la unión del ligando induce un reordenamiento de un “loop” que se encuentra entre el dominio isla y LRR22 (LRR21 según [95]) [93]. Se ha llegado a la conclusión que este cambio conformacional inducido por la unión del brasinólido (**1**) es importante para la interacción proteína-proteína (BRI1-BAK1).

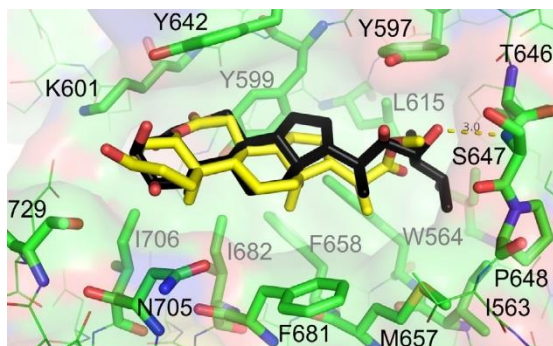
En otro estudio realizado por Kvasnica et al., se sintetizaron diez derivados monohidroxilados (compuestos **82-91**, Figura 1.5.3) del ácido 3 $\beta$ -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**23**), los cuales fueron evaluados en el ensayo del Segundo Entrenado del Frijol (SEF) utilizando 24-epibrasinólido (**2**) como control positivo, y luego se realizó el estudio de acoplamiento molecular (docking) de todos los compuestos evaluados [96].



**Figura 1.5.3** Estructuras de análogos de brasinoesteroides monohidroxilados obtenidos desde ácido 3 $\alpha$ -acetoxi-23,24-bisnorcolénico (**23**).

Los análogos de BRs monohidroxilados fueron débilmente activos en el bioensayo del Segundo Entrenado de Frijol (SEF), solamente la mejor actividad se observó en el compuesto **83** (+17,1 mm) y en el compuesto **84** (+14,5 mm), donde se aplicó una cantidad de 10<sup>-10</sup> mol y 10<sup>-11</sup> mol por planta respectivamente. La débil actividad

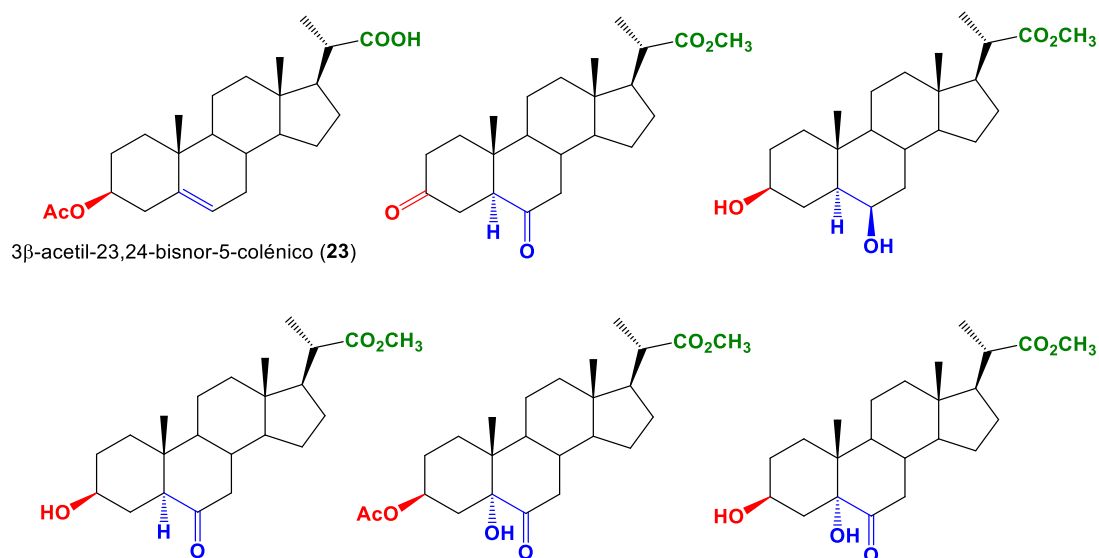
observada de los análogos, como es el caso del compuesto **86**, se analizó con un estudio más detallado mediante el uso del acoplamiento molecular (docking) de las estructuras en el dominio receptor de quinasa insensible a los brasinoesteroides 1 (BRI1) (Figura 1.5.4). En estas se logra observar que la baja afinidad del análogo **86** con el receptor BRI1, podría explicar la actividad biológica observada para este tipo de compuestos.



**Figura 1.5.4** Superposición del análogo de BRs monosustituido **86** (amarillo) con la pose del cristal de brasinólido (negro; PDB ID: 3RGZ).

A raíz de la información recopilada, y considerando las diversidades estructurales de los análogos de brasinoesteroides y sus efectos en la actividad biológica de crecimiento vegetal, como los compuestos indicados en las Figuras 1.3.2; 1.4.1 y 1.5.3, se propone la síntesis de nuevos análogos de BRs, que contengan las siguientes características estructurales: **1)** cadena lateral del tipo 23,24-bisnorcollanicos, **2)** funciones oxigenadas con grupo hidroxilo, cetona y acetato en el anillo A, **3)** fusión de anillos A/B del tipo *trans*, **4)** función hidroxilo o cetona en el anillo B y **5)** función 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo entre los anillos A/B. Estos nuevos análogos serán preparados desde ácido 3 $\beta$ -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**23**). Adicionalmente, serán evaluados en el ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA), y los resultados serán analizados por estudios de acoplamiento molecular (docking), a modo de establecer una Relación-Estructura-Actividad.

Los análogos que se pretenden obtener a partir de ácido 3 $\beta$ -acetoxi, 23, 24-bisnorcolénico (**23**), se indican en la Figura 1.5.5.



**Figura 1.5.5** Estructuras de los nuevos análogos de BRs propuestos para el estudio de esta Tesis, que serán obtenidos desde ácido 3 $\beta$ -acetil-23,24-bisnor-5-colénico (**23**).

Dados los antecedentes anteriores se pretenden obtener nuevos brs con actividad biológica.

## **CAPITULO 2 - OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN**

---

Como objetivo general de esta Tesis se propone la síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides, que contengan cadena lateral más corta, del tipo 23,24-bisnorcolánica, los cuales serán evaluados como promotores del crecimiento vegetal, aplicando el ensayo de la Inclinação de la Lámina de Arroz (ILA). Se realizarán estudios de docking molecular e indeous-fit con el fin de determinar la afinidad de estos compuestos con su receptor BRI1 y así poder explicar la actividad biológica observada en el bioensayo de crecimiento. Además, se espera que estos nuevos análogos se logren obtener por una vía sintética alternativa a las reportadas en la literatura, y así obtener análogos activos con una ruta de síntesis más cortas y eficiente.

### **HIPOTESIS**

---

Nuevos análogos de brasinoesteroides con una cadena lateral más corta, específicamente del tipo 23,24-bisnorcolánica, exhibirán actividad de crecimiento vegetal en el ensayo de Inclinação de la Lámina de Arroz. Además, se postula que esta actividad biológica estará respaldada por los estudios de acoplamiento molecular (docking), los cuales demostrarán la importancia de los requisitos estructurales específicos de estos análogos para su actividad biológica.

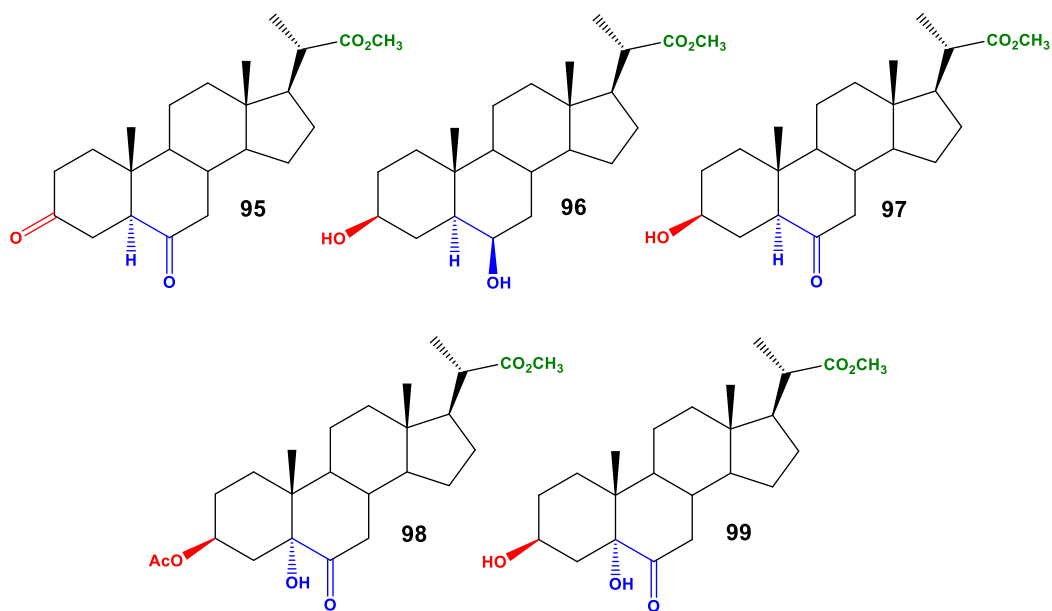
### **2.1 Objetivos Generales**

---

Sintetizar y evaluar la actividad biológica de crecimiento vegetal de cinco análogos nuevos de BRs los cuales tendrán los siguientes requerimientos estructurales: cadena lateral del tipo 23,24-bisnorcolánicos, funciones oxigenadas con grupo hidroxilo, cetona y acetato en el anillo A, fusión de anillos A/B del tipo trans, función hidroxilo o cetona en el anillo B y función 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo entre los anillos A/B. Estableciendo los requisitos estructurales importantes para la actividad biológica.

## 2.2 Objetivos Específicos

1. Desarrollar la ruta de síntesis del Esquema 1 para la obtención de los compuestos **92-99**, desde ácido 3 $\beta$ -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**23**).
2. Caracterizar todos los compuestos obtenidos en el Esquema 1 por métodos físicos y espectroscópicos para determinar la identidad estructural de los compuestos.
3. Realizar un estudio de actividad biológica de los compuestos **95-99** mediante el ensayo biológico de Inclinación de la Lámina de arroz (ILA), en la especie *Oryza sativa* (Variedad Zafiro) para determinar su influencia en el crecimiento vegetal.
4. Estudiar el acoplamiento molecular (docking / induced-fit docking.) de los compuestos **95-99**, con el Receptor de Brasiosteroides BRI1 para establecer los requisitos estructurales que determinan la actividad biológica.

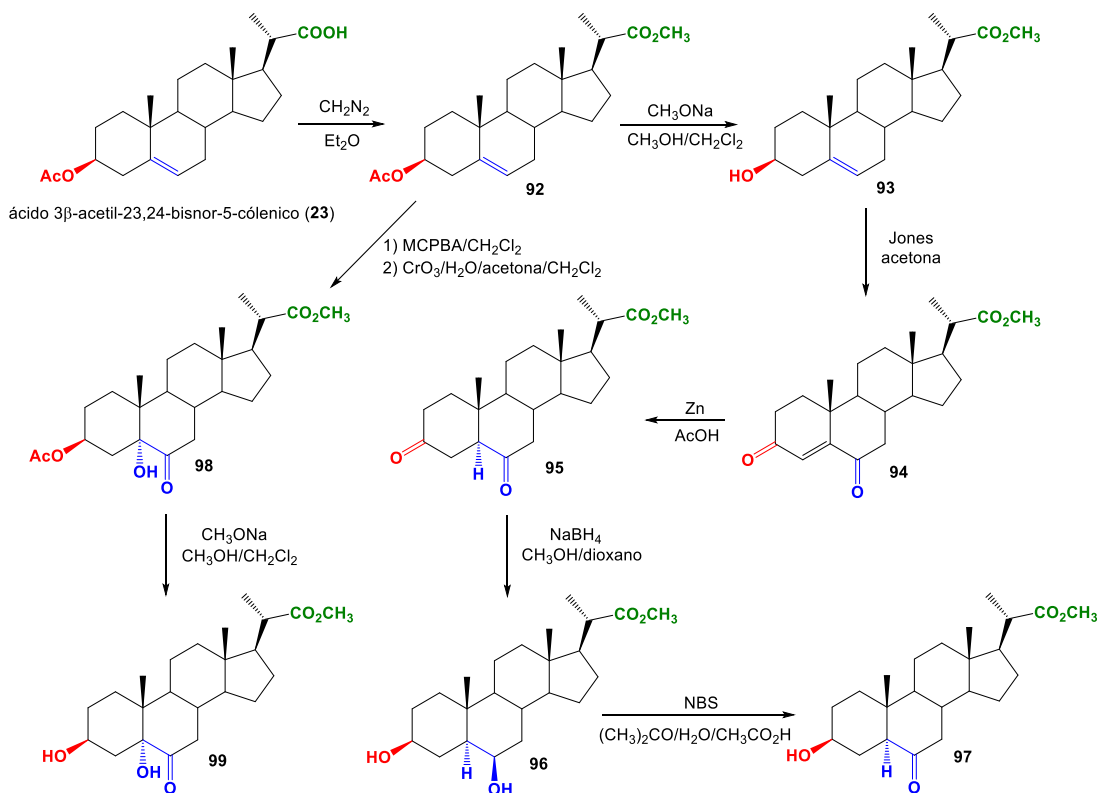


**Figura 2.2.1** Compuestos **95 – 99** a los que se realizará pruebas de actividad biológica mediante el ensayo de la Lámina de Arroz (ILA).

## CAPÍTULO 3 - METODOLOGIAS

### 3.1 Metodología síntesis químicas

Se utilizará el ácido 3 $\beta$ -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**23**) como material de partida. que está disponible en el mercado, no posee un costo relativamente alto, y tiene las funciones orgánicas en posiciones adecuadas para las transformaciones químicas necesarias que permitirá la obtención de estos nuevos análogos. Este es un producto se obtiene por ozonólisis de estigmasterol (**16**) [97]. La ruta de síntesis a utilizar se indica en el Esquema 1, donde el primer paso consistirá en la esterificación de **23** por medio de reacción de metilación con diazometano para obtener el derivado **92**, de acuerdo con procedimiento reportado [68]. A continuación, el derivado **92** será saponificado en forma selectiva del grupo acetato en posición C3, usando CH<sub>3</sub>ONa/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH para obtener el compuesto **93**, de acuerdo con metodología reportada [98].



**Esquema 1** Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los análogos **95-99**.

Posteriormente por oxidación de Jones/acetona sobre el compuesto **93**, debe producir la 4-en-3,6-diona **94**, según metodología reportada [99]. Reducción de la diona **94** con el sistema Zn/AcOH, producirá la dicetona **95**, de acuerdo con el procedimiento reportado para otros núcleos esteroidales [100]. Reducción de la dicetona **95** con el sistema NaBH<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>OH/dioxano producirá exclusivamente el 3β,6β-diol **96** [63]. Luego oxidación selectiva del grupo hidroxilo en C-6 del compuesto **96** con *N*-Bromosuccinimida (NBS) en (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO/H<sub>2</sub>O/AcOH, debe formar el compuesto monooxidado **97**, de acuerdo con la metodología descrita para otros compuestos esteroidales [63, 101]. Para la transformación de **92** en el compuesto **98** (5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo), se aplicará el tratamiento de **92** con AMCPB/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seguido de oxidación de Jones, que es una metodología ampliamente utilizada para la obtención de estas funciones orgánicas, desde esteroides con estructura 3β-acetoxi- $\Delta^5$  [78, 87, 88, 102]. Finalmente, saponificación selectiva de **98** bajo idénticas condiciones para obtener **93** (con el sistema CH<sub>3</sub>ONa/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), producirá el compuesto **99**.

### 3.2 Metodología evaluaciones biológicas

---

El estudio de los efectos de los nuevos análogos de brasinoesteroides sobre el crecimiento de plantas será llevado a cabo con la colaboración de la Dra. Katy Díaz Peralta, perteneciente al Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

#### 3.2.1 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 facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-La Platina. Las semillas se lavarán y se dejarán en remojo con agua destilada estéril durante 24 horas, luego se sembrarán en sustrato/perlita/vermiculita (3:1:1).

Una vez que las plantas alcancen el tamaño ideal para obtener el segundo entrenudo de la lámina, se cortarán los segmentos de la hoja, que consiste en la segunda

lámina foliar (5 cm de largo) y la segunda lámina conjunta y la vaina (4 cm de largo), estos segmentos se incubarán en 60 mL de agua destilada estéril y se probarán a distintas concentraciones de brasinólido (**1**) y análogos de BRs ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M) y control negativo solo llevará agua. Después de incubar durante 48 horas a 25°C en oscuridad, la magnitud de la apertura del ángulo se medirá entre la hoja y la vaina [75, 103]. (Versión modificada de Wada et al., 1984 [104]). El control positivo utilizado será brasinólido (**1**) (APE\*BIO).

### 3.3 Metodología de estudios *in-silico* de relación estructura-actividad por docking moleculares e induced-fit docking

---

Los estudios *in-silico* de los nuevos análogos de brasinoesteroides fueron llevados a cabo con la colaboración del Dr. Ángel Amesty Arrieta, investigador del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio Gonzales-IUBO, Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, España.

#### 3.3.1 Acoplamiento moleculares (docking)

---

Los cálculos de acoplamiento se realizaron utilizando el software Glide [105] presente en la suite de Schrodinger. El grid de cada receptor se generó utilizando las proteínas preparadas, centrando el grid en el centro de cada ligando unido para cada receptor, utilizando un factor de escala de radio de van der Waals (vdW) de 1,00 y un corte de carga parcial de 0,25. Las dimensiones del grid fueron de 20 Å<sup>3</sup> con parámetros predeterminados y sin restricciones. Las estructuras tridimensionales de los ligandos acoplados se generaron y prepararon usando el módulo LigPrep implementado en el software Maestro.

## CAPITULO 4 - PARTE EXPERIMENTAL

---

### 4.1 Materiales y equipos generales

---

#### 4.1.1 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 anhidro ( $\text{MgSO}_4$ ) o sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

- Acetato de etilo,  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ , Merck (EMSURE) (destilación a  $77^\circ\text{C}$ ).
- Acetona, Sigma-Aldrich
- Benceno,  $\text{C}_6\text{H}_6$ , Merck, (EMSURE).
- Cloroformo deuterado 99,96 atom % D,  $\text{CDCl}_3$ , Sigma-Aldrich.
- Cloroformo,  $\text{CHCl}_3$ , Merck (EMSURE).
- Diclorometano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Merck (EMSURE) (destilación a  $40^\circ\text{C}$ ).
- 1,4-Dioxano, ACS reagent,  $\geq 99.0\%$ , Merck.
- Éter dietílico,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ , Merck (EMSURE).
- Éter de petróleo, MTEDIA.
- Hexano,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ , Merck (EMSURE) (destilación entre  $60^\circ$  a  $80^\circ\text{C}$ ).
- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , Merck (EMSURE).
- Metanol deuterado 99,8 atom % D,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Sigma-Aldrich.

#### 4.1.2 Insumos

---

- Bicarbonato de sodio,  $\text{NaHCO}_3$ , Merck.
- 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 (0,063-0,200mm) Merck.
- Sulfato de magnesio anhidro,  $\text{MgSO}_4$ , Merck (EMSURE).
- Sulfato de sodio anhidro,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (Merk)

---

#### 4.1.3 Reactivos

---

- Ácido  $3\beta$ -23,24-bisnor-5-en-colénico, 85%, Steraloids Inc.
- Ácido meta cloro peroxibenzoico, >77%, Merk.
- Ácido sulfúrico, 98%, 1,84 g/mL,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Merck (EMSURE).
- Ácido clorhídrico, p.a, 37%, 1,19 g/mL, HCl, Merck (EMSURE).
- Anhídrido acético, 98,5%, 1,08g/mL,  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ , Merck (EMSURE).
- Bicarbonato de sodio,  $\text{NaHCO}_3$ , Sigma-Aldrich.
- Borohidruro de sodio ReagentPlus®, 99%, Sigma-Aldrich.
- Carbonato de potasio, 99%,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Sigma-Aldrich.
- Diazometano/éter (solución)
- Metóxido de sodio, reagent grade, 95%, poder, Sigma-Aldrich.
- Óxido de Cromo (VI),  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich.
- Piridina, anhidra 99,8%,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , Sigma-Aldrich.
- Solución reveladora  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% v/v.
- 4-(dimetilamino)piridina, (DMAP),  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$ , Alfa-Aesar.
- Zinc powder, <150  $\mu\text{m}$ , 99.995% trace metals basis, Sigma-Aldrich.

---

#### 4.1.4 Cromatografía en capa fina

---

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

---

#### 4.1.5 Cromatografía en columna

---

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

## 4.2 Instrumentos y Equipos

---

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

**Espectros de infrarrojo (IR):** Los espectros IR fueron registrados en un espectrómetro Thermo® Nicolet 6700 y se medirán en discos de bromuro de potasio (KBr). Las frecuencias de absorción serán expresadas en número de onda (cm<sup>-1</sup>).

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

**Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN):** Los espectros (<sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, DEPT-135, 2D-NOESY, 2D-HSQC y 2D-HMBC) fueron llevados a cabo en un espectrómetro Varian INOVA 400 y espectrómetro digital Bruker Avance Neo 400. Las mediciones se realizaron utilizando solventes deuterados, tales como cloroformo (CDCl<sub>3</sub>) o metanol (CD<sub>3</sub>OD) al 99,8%. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) serán expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento *J* en Hertz (Hz). Como referencia se utilizaron el desplazamiento químico de las señales residuales para los espectros de <sup>1</sup>H:  $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,24$  ppm,  $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}(1)} = 3,31$  ppm,  $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}(2)} = 4,78$  ppm; y las señales

residuales para los espectros de  $^{13}\text{C}$ :  $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,23$  ppm y  $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 49,2$  ppm, respectivamente [106].

---

### 4.3 Materiales y equipos: biológicos

---

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

- Como control positivo se utilizó el compuesto Brasinólido (**1**),  $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_6$ , adquirido desde Sigma-Aldrich.
- Los fungibles principales fueron materiales de plásticos como placas petri, tubos eppendorf y falcon y puntas de micropipeta P10, P200 y P1000.
- Los materiales utilizados para llevar a cabo la siembra de las plantas fueron sustrato, perlita, vermiculita, macetas y bandejas.

Los equipos utilizados fueron:

- Cámara de crecimiento de plantas, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo.
- Lupa estereoscópica Marca Leyca con cámara fotográfica incluida para el registro de los resultados cualitativos de los ángulos de inclinación en la lámina de arroz.

---

### 4.4 Abreviaturas y Siglas

---

- $\text{Ac}_2\text{O}$  : Anhídrido acético.
- $\text{AcOEt}$  : Acetato de etilo.
- $\text{AcOH}$  : Ácido acético.
- anh. : Anhidro.
- BRs : Brasinoesteroides.
- CC : Cromatografía en columna.
- CCF : Cromatografía en capa fina.
- DCM : Diclorometano.
- DMAP : 4-dimetil amino piridina.
- $\text{Et}_2\text{O}$  : Éter dietílico.
- Hex. : Hexano.
- MeOH : Metanol.

- N<sub>2</sub> : Nitrógeno.
- Pi : Piridina.
- T°amb. : Temperatura ambiente.
- 0,2:9,8 → 10:0,0 : Gradientes de polaridad en C.C.
- ADE : Agua destilada estéril.
- ILA : Inclinación de la Lámina de Arroz.

#### 4.4.1 Abreviaturas en resonancia magnética nuclear

---

- RMN : Resonancia Magnética Nuclear.
- $\delta$  : desplazamiento químico.
- ppm : partes por millón.
- s : singlete.
- sa : singlete ancho.
- d : doblete.
- da : doblete ancho
- t : triplete.
- dd : doble doblete.
- dc : doble cuarteto.
- dt : doble triplete.
- ddd : doblete de doble doblete.
- m : multiplete.
- tc : triple cuarteto.
- $J$  : constante de acoplamiento.
- $^2J$  y  $^3J$  : acoplamiento escalar heteronuclear a dos y tres enlaces, respectivamente.
- DEPT : *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*.
- HSQC ed : *Heteronuclear Single Quantum Correlation editado*
- HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Connectivities*.
- NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*.
- 1D : Espectro mono-dimensional.
- 2D : Espectro bidimensional.
- \*H : Asignación intercambiable con otro hidrógeno marcado con

- asterisco.
- \*C : Asignación intercambiable con otro carbono marcado con asterisco.

#### 4.4.2 Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo

---

- IR : Espectro Infrarrojo.
- $\text{cm}^{-1}$  : Frecuencia en centímetros a la inversa.

#### 4.4.3 Abreviaturas en espectrometría de masas

---

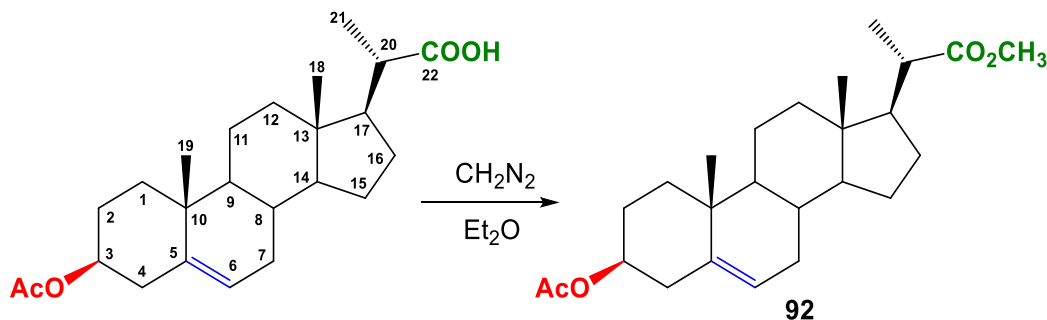
- EMAR: Espectrometría de Masas de Alta Resolución.
- $[\text{M}]^+$  : Ion molecular.
- $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  : Ion molecular + masa gas  $\text{NH}_3 + 1$ .

#### 4.4.4 Abreviaturas en Dinámica y Acoplamiento Molecular

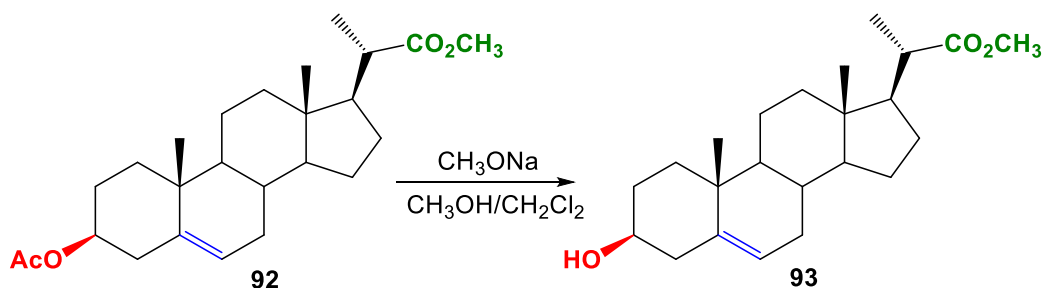
---

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

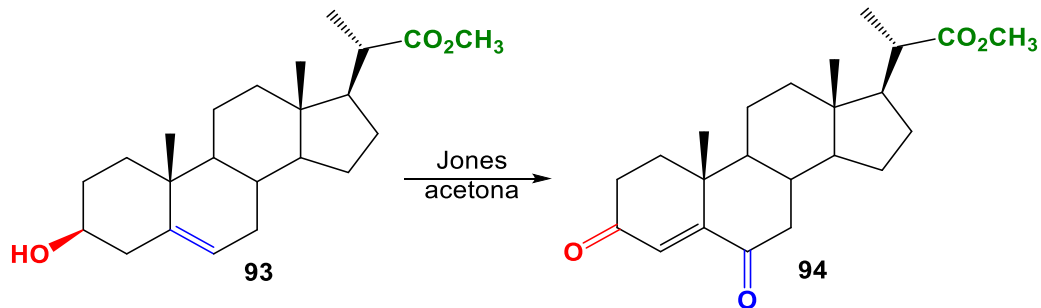
## 4.5 Síntesis de compuestos

4.5.1. Síntesis de (20*S*)-3β-acetoxipregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (**92**).ácido 3β-acetil-23,24-bisnor-5-colénico (**23**)

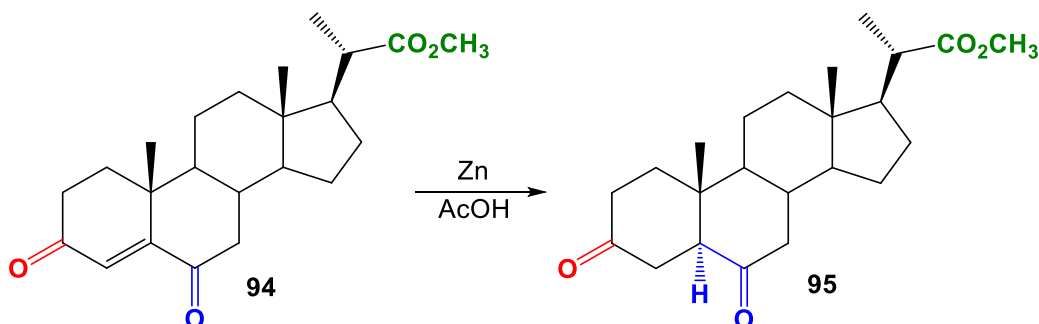
Ácido 3β-acetil-23,24-bisnor-5-colénico (**23**) (1,0 g, 2,57 mmol) fue disuelto en dietil éter (20 mL), y se le agregaron 30 mL de solución de diazometano mediante goteo a temperatura ambiente y con agitación suave, hasta que la solución tomó un color amarillo pálido. La solución de diazometano fue preparada por tratamiento de *N*-metil-*N*-nitrosoamida, con una disolución acuosa concentrada de hidróxido de potasio (KOH) en éter. El diazometano se disuelve en el éter a medida que se va formando. La reacción de metilación fue seguida mediante CCF hasta que todo el material de partida desapareció (6 h). Para neutralizar el exceso de diazometano se agregaron 2 mL de ácido acético hasta que el color amarillo de la solución desapareció. La solución resultante fue evaporada hasta sequedad. Se obtuvieron 1,03 g del compuesto **92** (100% de rendimiento). El compuesto **92** se obtuvo como un sólido incoloro (p.f. = 144,9-146,8 °C [68]). IR<sub>vmax</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3060 (C=C-H); 2938 (CH<sub>3</sub>-); 2898 (CH<sub>2</sub>-); 2848 (CH<sub>2</sub>-); 1734 (C=O); 1715 (C=O); 1466 (CH<sub>2</sub>-); 1386 (CH<sub>3</sub>-); 1262 y 1065 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5,36 (1H, da, *J* = 5,1 Hz, H-6); 4,63-4,55 (1H, m, H-3); 3,64 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 2,42 (1H, dc, *J* = 10,8 y 6,9 Hz, H-20); 2,02 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); 1,19 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H-21); 1,01 (3H, s, H-19); 0,68 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 177,30 (C-22); 170,51 (CH<sub>3</sub>CO); 139,62 (C-5); 122,47 (C-6); 73,90 (C-3); 56,22 (C-14); 51,31 (OCH<sub>3</sub>); 52,84 (C-17); 49,93 (C-9); 42,46 (C-13); 42,38 (C-20); 39,47 (C-12); 38,08 (C-4); 36,96 (C-1); 36,56 (C-10); 31,84 (C-7); 31,79 (C-8); 27,73 (C-2); 27,12 (C-16); 24,31 (C-15); 21,42 (CH<sub>3</sub>CO); 20,93 (C-11); 19,29 (C-19); 17,11 (C-21); 12,00 (C-18). Los datos espectroscópicos de IR y <sup>1</sup>H RMN fueron consistentes con los reportados [68].

4.5.2. Síntesis de (20*S*)-3β-hidroxipregnen-5-eno-20-carboxilato de metilo (**93**)

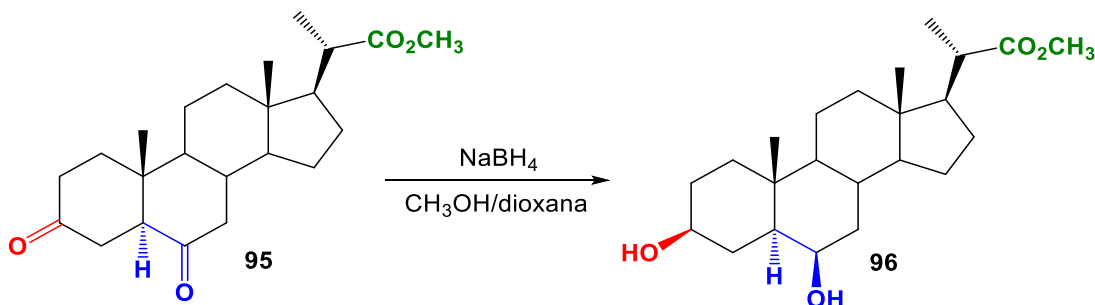
A una solución del compuesto **92** (420 mg, 1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 7/3 (10 mL), se agregaron 270,1 mg (5,0 mmol) de CH<sub>3</sub>ONa. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción finalizó (1,5 h), la cual fue verificada por CCF. La mezcla de reacción fue diluida con 30 mL de acetato de etilo y posteriormente fue lavada con agua (5 x 10 mL), secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh., se filtra y posteriormente concentrada. Se obtuvieron 368,6 mg (98% de rendimiento) del compuesto **93**. El compuesto **93** se obtuvo como un sólido incoloro (p.f. = 142,3-144,1 °C) (141-142 °C [68]). IR<sub>vmax</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3497 (H-O); 2938 (CH<sub>3</sub>-); 2896 (CH<sub>2</sub>-); 2849 (CH<sub>2</sub>-); 1735 (C=O); 1458 (CH<sub>2</sub>-); 1383 (CH<sub>3</sub>-); 1274 y 1054 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5,32 (1H, sa, H-6); 3,62 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 3,53-3,46 (1H, m, H-3); 2,39 (1H, dc, *J* = 10,5 y 8,0 Hz, H-20); 2,25-2,22 (2H, m, H-4); 1,83-1,79 (1H, m, H-12); 1,58-1,54 (1H, m, H-17) 1,25-1,23 (1H, m, H-12'); 1,17 (3H, d, *J* = 8,0 Hz, H-21); 0,99 (3H, s, H-19); 0,68 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 177,39 (C-22); 140,70 (C-5); 121,49 (C-6); 71,67 (C-3); 56,25 (C-14); 52,77 (C-17); 51,40 (OCH<sub>3</sub>); 49,98 (C-9); 42,43 (C-13); 42,34 (C-20); 42,16 (C-4); 39,49 (C-12); 37,17 (C-1); 36,42 (C-10); 31,82 (C-8); 31,74 (C-7); 31,52 (C-2); 27,09 (C-16); 24,27 (C-15); 20,95 (C-11); 19,37 (C-19); 17,11 (C-21); 12,01 (C-18). Los datos espectroscópicos de IR y <sup>1</sup>H RMN fueron consistentes con los reportados [68].

4.5.3. Síntesis de (20*S*)-3,6-dioxopregn-4-eno-20-carboxilato de metilo (**94**)

El compuesto **93** (724,63 mg, 2 mmol) fue disuelto en acetona (90 mL) y la solución fue enfriada a 0 °C en un baño de agua-hielo. Se agregaron 5,0 mL del reactivo de Jones por goteo hasta obtener un color naranja persistente. La mezcla de reacción se agitó hasta que se consumió todo el reactivo y se confirmó por CCF a los 40 minutos de reacción (presencia del producto conjugado deseado fue confirmada adicionalmente por CCF y revelado bajo luz UV, 254 nm). Se dejó que el sistema llegara a temperatura ambiente y luego el exceso de reactivo de Jones fue destruido por adición de 10 mL alcohol isopropílico, produciendo una solución color verde oscuro. Posteriormente el solvente fue removido por destilación a presión reducida. El residuo fue extraído con acetato de etilo (75 mL) y lavado con agua (2 x 15 mL), la mezcla fue agitada hasta que todo el sólido fue disuelto. La fase orgánica fue nuevamente lavada con agua (3 x 30 mL), secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y concentrada en rotavapor. El crudo fue re-disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3,0 mL) y purificado por CC en sílica gel, eluido con mezcla de n-hexano/acetato de etilo con polaridad creciente (19,8:0,2 -> 12,8:7,2). Se obtuvieron 618,3 mg (82,2%) del compuesto **94**. El compuesto **94** se obtuvo como un sólido incoloro (p.f. = 170,8-175,5 °C. IR<sub>vmax</sub> (cm<sup>-1</sup>): 2945 (CH<sub>3</sub>-); 2902 (CH<sub>2</sub>-); 2872 (CH<sub>2</sub>-); 1733 (C=O); 1690 (C=O); 1459 (CH<sub>2</sub>-); 1380 (CH<sub>3</sub>-); 1245 y 1220 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 6,16 (1H, d, *J* = 0,8 Hz, H-4); 3,60 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 2,66 (1H, dd, *J* = 16,0 y 4,0 Hz, H-7 $\alpha$ ); 2,54-2,40 (3H, m, H-2 y H-20); 2,13-2,12 (1H, m, H-1); 2,07-2,00 (2H, m, H-7 $\beta$  y H-12); 1,94-1,89 (2H, m, H-8 y H-1); 1,75-1,61 (4H, m, H-16, H-11, H-15 y H-17); 1,49-1,35 (4H, m, H-11, H-16, H-12 y H-9); 1,21 (3H, d, *J* = 8,0 Hz, H-21); 1,16 (3H, s, H-19); 0,73 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 201,91 (C-6); 199,31 (C-3); 176,96 (C-22); 160,73 (C-5); 125,54 (C-4); 56,07 (C-14); 52,62 (C-17); 51,40 (OCH<sub>3</sub>); 50,80 (C-9); 46,59 (C-7); 42,53 (C-13); 42,27 (C-20); 39,70 (C-10); 38,85 (C-12); 35,47 (C-1); 34,10 (C-8); 33,90 (C-2); 26,91 (C-16); 23,95 (C-15); 20,78 (C-11); 17,49 (C-19); 17,05 (C-21); 12,02 (C-18).

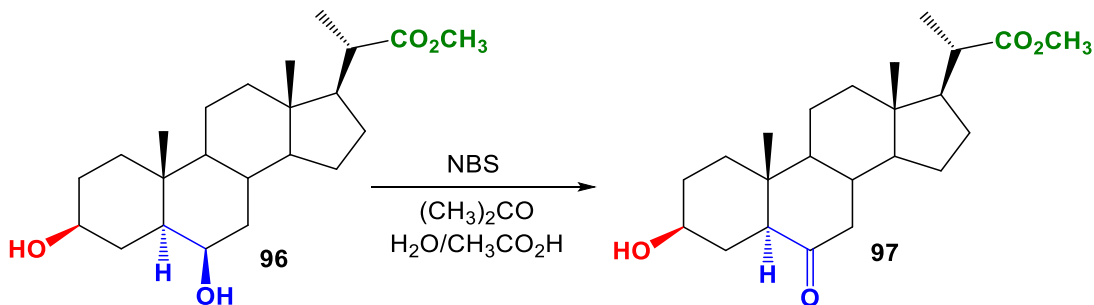
4.5.4. Síntesis de (20S)-3,6-dioxo-5 $\alpha$ -pregnano-20-carboxilato de metilo (**95**)

El compuesto **94** (618,3 mg, 1,65 mmol) fue disuelto en 30 mL de ácido acético glacial. A la solución resultante se le adicionaron 3 mL de agua y 620 mg (9,48 mmol) de zinc en polvo. La mezcla de reacción fue agitada bajo reflujo por 2,5 horas. Posteriormente se agregaron 90 mL de acetato de etilo y la fase orgánica fue lavada con agua (2 x 30 mL) y posteriormente lavada con una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 5% (4 x 30 mL), agua (2 x 15 mL) y finalmente lavada con una solución saturada de NaCl (2 x 15 mL), secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y concentrada en vacío (rotavapor). Se obtuvieron 603 mg (97,0% de rendimiento) del compuesto **95**. El compuesto **95** se obtuvo como un sólido incoloro (p.f. = 202,3-205,2 °C. IR<sub>vmax</sub> (cm<sup>-1</sup>): 2948 (CH<sub>3</sub>-); 2871 (CH<sub>2</sub>-); 1732 (C=O); 1714 (C=O); 1458 (CH<sub>2</sub>-); 1384 (CH<sub>3</sub>-); 1240 y 1052 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,63 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 2,58-2,54 (2H, m, H-4 y H-5); 2,42-2,35 (2H, m, H-20 y H-7); 2,29-2,27 (1H, m, H-4'); 1,99-1,97 (1H, m, H-7'); 1,85-1,82 (1H, m, H-8); 1,18 (3H, d, *J* = 8,0 Hz, H-21); 0,94 (3H, s, H-19); 0,69 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 211,14 (C-3); 208,79 (C-6); 177,04 (C-22); 57,32 (C-5); 56,11 (C-14); 53,31 (C-9); 52,73 (C-17); 51,37 (OCH<sub>3</sub>); 46,36 (C-7); 43,01 (C-13); 42,21 (C-20); 41,15 (C-10); 39,07 (C-12); 37,98 (C-1); 37,87 (C-8); 37,28 (C-2); 36,85 (C-4); 26,92 (C-16); 23,98 (C-15); 21,55 (C-11); 17,01 (C-21); 12,46 (C-19); 12,09 (C-18). EMAR (modo positivo): C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> (calculado: 374,2457), [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calculado: 392,2795), Encontrado: 392,2800.

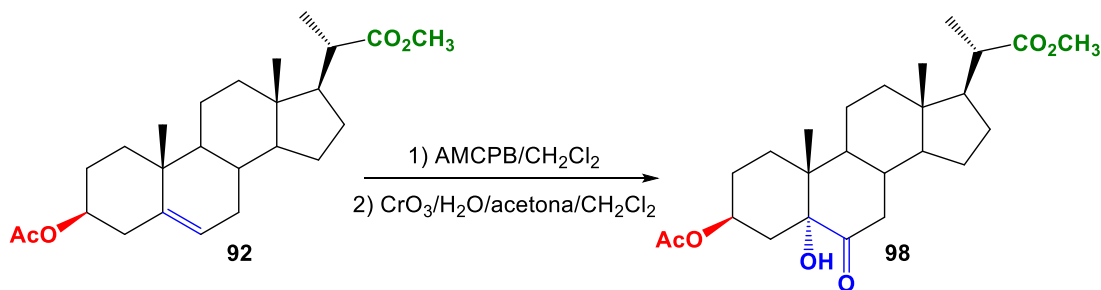
4.5.5. Síntesis de (20S)-3 $\beta$ ,6 $\beta$ -dihidroxi-5 $\alpha$ -pregnano-20-carboxilato de metilo (**96**)

Se preparó una solución del compuesto **95** (187 mg, 0,5 mmol) en una mezcla de metanol (5 mL) y 1,4-dioxano (2 mL), y se enfrió a 0°C en un baño de agua-hielo. Posteriormente se agregó NaBH<sub>4</sub> (76 mg, 2mmol) en forma gradual y con agitación lenta. La mezcla fue agitada hasta que el material de partida se consumió completamente, lo cual fue verificado por CCF (x min). Para destruir el exceso del agente reductor se agregó 1,0 mL de acetona seguido de 20 mL de acetato de etilo. Posteriormente la solución fue lavada con agua (2 x 5 mL), secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y concentrada en vacío

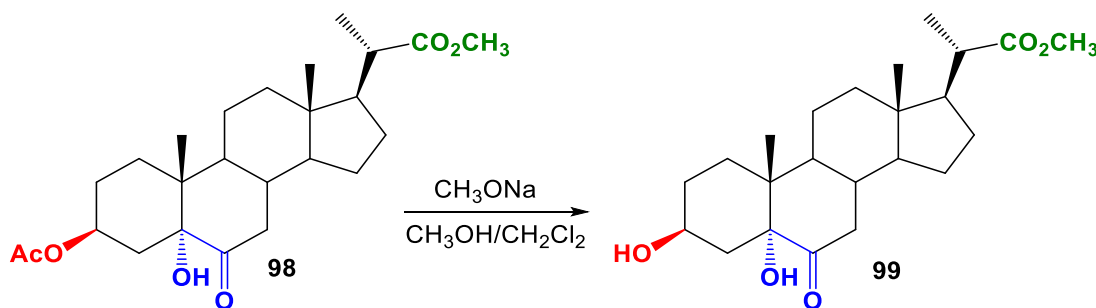
(rotavapor) para obtener 157,1 mg (84,0%) del compuesto **96**. El compuesto **96** se obtuvo como un sólido blanco (p.f. = 221,2-224,8 °C). IR<sub>vmax</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3404 (H-O); 2933 (CH<sub>3</sub>-); 2869 (CH<sub>2</sub>-); 2849 (CH<sub>2</sub>-); 1735 (C=O); 1458 (CH<sub>2</sub>-); 1382 (CH<sub>3</sub>-); 1257 y 1041 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,80 (1H, da, J = 2,6 Hz, H-6); 3,64-3,56 (1H, m, H-3); 3,61 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 2,46-2,39 (1H, m, H-20); 1,92 (1H, dt, J = 12,3 y 3,0 Hz, H-12a); 1,18 (3H, d, J = 6,9 Hz, H-21); 1,11-1,09 (1H, m, H-5); 1,03 (3H, s, H-19); 0,705 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 177,36 (C-22); 71,83 (C-6); 71,56 (C-3); 55,73 (C-14); 54,13 (C-9); 52,94 (C-17); 51,33 (OCH<sub>3</sub>); 47,32 (C-5); 42,70 (C-13); 42,39 (C-20); 39,64 (C-12); 39,47 (C-7); 38,43 (C-1); 35,35 (C-10); 35,28 (C-4); 31,40 (C-2); 30,37 (C-8); 27,08 (C-16); 24,22 (C-15); 20,95 (C-11); 17,06 (C-21); 15,72 (C-19); 12,22 (C-18). EMAR (modo positivo): C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> (calculado: 378,2770), [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calculado: 396,3108), Encontrado: 396,3109.

4.5.6. Síntesis de (20S)-3β-hidroxi-6-oxo-5α-pregnano-20-carboxilato de metilo (**97**)

A una solución del compuesto **96** (378 mg, 1,0 mmol) en una mezcla de acetona (43 mL), agua (2,2 mL) y ácido acético (0,34 mL), se agregaron (431 mg, 2,42 mmol) de NBS. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se vertió sobre una solución saturada de NaCl, y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron consecutivamente con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) y solución saturada de NaCl (2 x 10 mL). La fase orgánica fue secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh., y el solvente fue removido en rotavapor para obtener 302 mg (79,9% de rendimiento) del compuesto **97**. El compuesto **97** fue obtenido como un polvo incoloro (p.f. = 169,2-170,0 °C). IR<sub>vmax</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3504-3393 (O-H); 2943 (CH<sub>3</sub>-); 2848 (CH<sub>2</sub>-); 1733 (C=O); 1710 (C=O); 1446 (CH<sub>2</sub>-); 1358 (CH<sub>3</sub>-); 1259 y 1037 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,63 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 3,59-3,52 (1H, m, H-3); 2,45-2,37 (1H, m, H-20); 2,29 (1H, dd, *J* = 13,2 y 4,5 Hz, H-7a); 2,19 (1H, da, *J* = 10,9 Hz, H-5); 1,17 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-21); 0,73 (3H, s, H-19); 0,66 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 210,64 (C-6); 177,15 (C-22); 70,53 (C-3); 56,69 (C-5); 56,24 (C-14); 53,76 (C-9); 52,72 (C-17); 51,35 (OCH<sub>3</sub>); 46,53 (C-7); 42,96 (C-13); 42,28 (C-20); 40,85 (C-10); 39,18 (C12); 37,76 (C-8); 36,58 (C-1); 30,58 (C-16); 29,92 (C-4); 26,92 (C-15); 23,95 (C-2); 21,38 (C-11); 17,02 (C-21); 13,08 (C-19); 12,12 (C-18). EMAR (modo positivo): C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> (calculado: 376,2614), [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calculado 394,2952), Encontrado: 394,2952.

4.5.7. Síntesis de (20*S*)-3β-acetoxi-6-oxo-5α-hidroxy-pregnano-20-carboxilato de metilo (**98**)

A una disolución del compuesto **92** (805,14 mg, 2,0 mmol) en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se le adicionaron AMCPB (484 mg, 2,805 mmol) y la mezcla fue agitada hasta desaparición de la materia prima, verificado por CCF (2 h y 40 min). Posteriormente se adicionaron 10 mL de acetona y la mezcla se enfría a 0 °C (baño de agua-hielo). Posteriormente se adiciona por goteo lento una disolución de  $\text{CrO}_3$  (0,715 g, 7,15 mmol) en agua (2,15 mL). El baño de hielo es removido y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente se vuelve a enfriar a 0 °C y luego se adicionan nuevamente la disolución de  $\text{CrO}_3$  (355 mg, 3,55 mmol) en agua (1,1 mL). Se retiró el baño de agua-hielo y la mezcla de reacción se agitó durante 50 min. Posteriormente se adicionan 25 mL de agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 mL). La fase orgánica con agua (9 x 25 mL), luego con disolución de  $\text{NaHCO}_3$  10% m/m (5 x 25 mL), agua (2 x 25 mL) y finalmente lavada con disolución saturada de  $\text{NaCl}$  (1 x 25 mL). La fase orgánica fue secada sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh. y se concentró en rotavapor. Se obtuvieron 740,73 mg (92% de rendimiento) del cetol **98**. El compuesto **98** fue obtenido como un polvo blanco (p.f. = 232,3-233,9 °C).  $\text{IR}_{\text{vmax}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3419 (O-H); 2944 ( $\text{CH}_3$ -); 2871 ( $\text{CH}_2$ -); 1735 (C=O); 1714 (C=O); 1460 ( $\text{CH}_2$ -); 1383 ( $\text{CH}_3$ -); 1240 y 1040 (C-O).  $^1\text{H}$  RMN (400,1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 5,02 (1H, tc,  $J$  = 10,3 y 5,1 Hz, H-3); 3,62 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); 3,31-3,28 (1H, m, OH); 2,75 (1H, dd,  $J$  = 12,6 y 12,6 Hz, H-7a); 2,40 (1H, dc,  $J$  = 10,2 y 6,8 Hz, H-20); 2,06 (1H, dd,  $J$  = 12,6 y 4,6 Hz, H-7b); 1,98 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 1,17 (3H, d,  $J$  = 6,8 Hz, H-21); 0,79 (3H, s, H-19); 0,64 (3H, s, H-18).  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 212,30 (C-6); 177,21 (C-22); 171,05 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 80,13 (C-5); 70,69 (C-3); 55,82 (C-9); 52,73 (C-17); 51,34 ( $\text{OCH}_3$ ); 44,16 (C-14); 43,13 (C-13); 42,46 (C-10); 42,32 (C-20); 41,60 (C-7); 39,27 (C-12); 37,24 (C-8); 32,26 (C-4); 29,47 (C-1); 26,94 (C-16); 26,22 (C-2); 23,92 (C-15); 21,23 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 21,25 (C-11); 16,99 (C-21); 13,80 (C-19); 12,10 (C-18). EMAR (modo positivo):  $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$  (calculado: 434,2668),  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  (calculado 452,3007), Encontrado: 452,3011.

4.5.8. Síntesis de (20S)-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihidroxy-6-oxo-pregnano-20-carboxilato de metilo (**99**)

Se preparó una disolución del compuesto **98** (869.14 mg, 2,0 mmol) en una mezcla de MeOH/1,4-dioxano (68,7/5,21 mL). A esta mezcla se le adicionó CH<sub>3</sub>ONa (276 mg, 0,511 mmol) disueltos en 17,5 mL de MeOH. La mezcla de reacción se agito a temperatura ambiente durante toda la noche. El término de la reacción fue verificado por CCF. Posteriormente, la mezcla se enfría a 0 °C en un baño de hielo-agua y se adicionó HCl 5% m/v por goteo lento hasta obtener pH = 5. Posteriormente la mezcla se diluyó con 57 mL de agua y se adicionaron 300 mL de AcOEt. La fase orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O (6 x 100 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 100 mL). Luego la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró en rotavapor. Se purificó por CC utilizando el sistema de disolvente hexano: acetato de etilo 1:2 y se obtuvieron 673.58 mg (77,5% de rendimiento) del compuesto **99**. El compuesto **99** fue obtenido como un polvo incoloro (p.f. = 226,8-228,4 °C). IR<sub>vmax</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3421 (O-H); 2944 (CH<sub>3</sub>-); 2871 (CH<sub>2</sub>-); 1734 (C=O); 1713 (C=O); 1458 (CH<sub>2</sub>-); 1384 (CH<sub>3</sub>-); 1257 y 1052 (C-O). <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 4,03-3,95 (1H, m, H-3); 3,64 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 3,09 (1H, sa, OH); 2,75 (1H, dd, J = 12,8 y 12,8 Hz, H-7a); 2,42 (1H, dc, J = 10,2 y 6,9 Hz, H-20); 2,08 (1H, dd, J = 12,8 y 4,9 Hz, H-7b); 1,38 (3H, d, J = 6,9 Hz, H-21); 0,788 (3H, s, H-19); 0,659 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 212,30 (C-6); 176,10 (C-22); 79,08 (C-5); 65,18 (C-3); 55,49 (C-14); 52,47 (C-17); 51,10 (OCH<sub>3</sub>); 43,74 (C-9); 42,67 (C-13); 41,93 (C-10); 41,68 (C-20); 41,23 (C-7); 38,92 (C12); 36,78 (C-8); 35,72 (C-4); 30,42 (C-2); 29,55 (C-1); 26,59 (C-16); 23,46 (C-15); 20,93 (C-11); 16,82 (C-21); 13,51 (C-19); 11,83 (C-18). EMAR (modo positivo): C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> (calculado: 392,2563), [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calculado 410,2901), Encontrado: 410,2900.

#### 4.6 Evaluaciones biológicas

---

Como se indicó en la Metodología, la actividad promotora del crecimiento de los compuestos sintetizados se evaluó utilizando el ensayo de *Inclinación de la Lámina de Arroz* (ILA) [104] y siguiendo un procedimiento descrito anteriormente [103, 104, 107-108]. Después de remojar las semillas de arroz (*Oryza sativa*) en agua destilada estéril durante 48 horas, las semillas se esterilizaron y cultivaron a 22 °C en una cámara de cultivo de plantas bajo fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, en macetas con tierra y abundante agua. Las plántulas de arroz se cultivaron hasta el momento en que su crecimiento fuera homogéneo y presentaran el segundo internudo en la lámina principal. Se cortaron segmentos de 5 cm de largo, para posteriormente incubar seis segmentos por tratamiento en una placa de Petri que contiene 60 mL de agua destilada y una cantidad finita (0 M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M) de los análogos de brasinoesteroides en solución acuosa. Después de 2 días, se realizó el registro fotográfico con una cámara digital y se registró la medición del ángulo entre la lámina y la vaina del segundo internudo con un transportador.

De esta forma se registraron los resultados para los análogos de brasinoesteroides evaluados en el ensayo de ILA, los cuales se muestran en la Tabla 4.6.1.



#### 4.7 Estudios *in-silico*

---

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 sobre la estructura cristalina del complejo BRI1-BAK1 (PDB 4M7E) utilizando el software Glide. El acoplamiento proteína-ligando es un método eficaz utilizado habitualmente para predecir la forma de acoplamiento y la afinidad de un ligando en un sitio de unión a una proteína [105].

Por lo tanto, se acoplaron todos los derivados de brasinólido 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 se modificaron en el proceso. Esto se hizo para 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. A continuación, se llevó a cabo una agrupación de poses a partir del docking basándose en los valores de RMSD y los valores de puntuación de docking de cada una de las poses obtenidas. 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.

## CAPITULO 5 - RESULTADOS Y DISCUSIONES

---

A continuación, se describen en tres apartados los resultados y discusiones de las componentes de síntesis químicas de los compuestos **92-99**, ensayos biológicos de los análogos **95-99**, y los estudios “*in-silico*” de estos últimos.

### 5.1 Síntesis químicas

---

De acuerdo con la ruta de síntesis indicada en el Esquema 1, la reacción de esterificación con diazometano ( $\text{CH}_2\text{N}_2/\text{éter}$ ) del ácido  $3\beta$ -acetoxi-23,24-dinorcol-5-en-22-colénico (**23**), permitió modificar químicamente este compuesto para disminuir su polaridad, produciendo el derivado metilado **92** con 100% de rendimiento, acorde a lo reportado por Kohout et al. [68]. El compuesto **92** fue caracterizado por técnicas espectroscópicas combinadas de IR y RMN. En el espectro IR de **92** no fue observada la señal entre  $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ , asignada al enlace O-H propio de las funciones de los ácidos carboxílicos (precursor **23**). Mientras que la función  $\text{R-CO}_2\text{CH}_3$  fue evidenciada por la observación en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la señal a  $\delta_{\text{H}} = 3,64\text{ ppm}$  (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ). Adicionalmente desde el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, las señales observadas a  $\delta_{\text{C}} = 177,30$  y  $51,31\text{ ppm}$ , fueron asignadas al C-22 y grupo  $\text{OCH}_3$  respectivamente. Los datos de IR y  $^1\text{H}$  RMN fueron consistentes con los reportados para este compuesto [68]. Sin embargo, es importante mencionar que sí bien el compuesto fue informado previamente, los autores no reportaron los datos y asignaciones de las señales de  $^{13}\text{C}$  RMN, como tampoco los estudios bidimensionales respectivos.

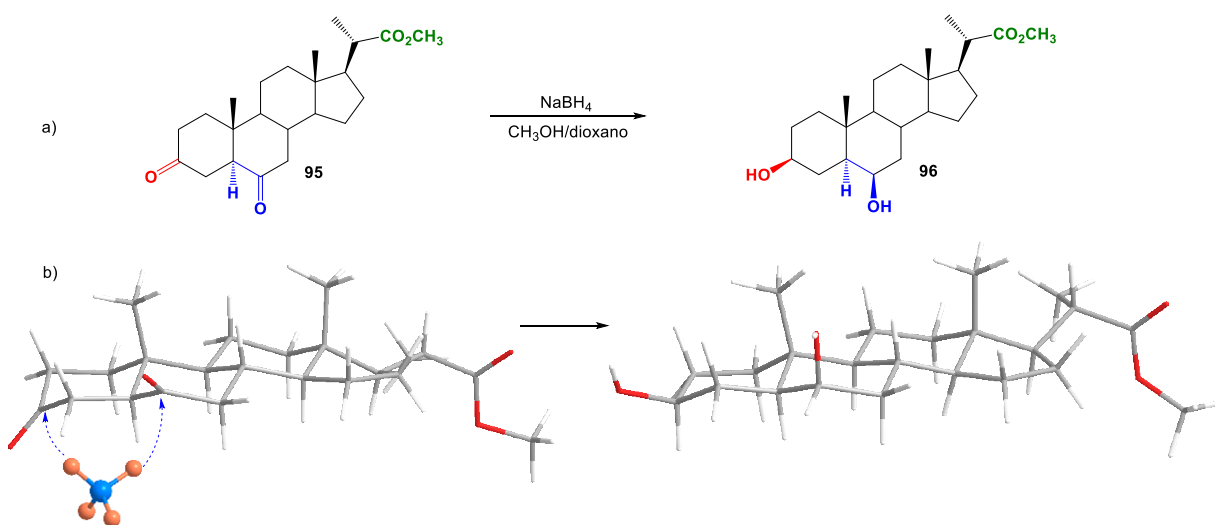
El paso siguiente consistió en la obtención del compuesto hidroxilado **93**, el cual se logró por saponificación selectiva del grupo acetilo en posición C-3 a partir del compuesto **92**, obteniéndose un rendimiento de 98%, con el sistema  $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , según se reportó para núcleos esteroidales similares [98]. Evidencia espectroscópica de IR muestra una banda a  $\nu = 3497\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuye a la presencia del grupo OH. Mientras que en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN, se observó el

desplazamiento químico de la señal H-3 a campo alto ( $\delta_H = 3,53-3,46$  ppm, m, 1H) así como la desaparición de la señal observada a  $\delta_H = 2,02$  ppm atribuida a la señal del grupo acetato (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ , 3H). Además, desde el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, no se observaron las señales a  $\delta_C = 170,51$  y  $21,42$  ppm, atribuidas al grupo  $\text{CH}_3\text{CO}$ . Mientras que los datos de IR y  $^1\text{H}$  RMN fueron consistentes con los reportados para este compuesto [68]. Hay que mencionar además que los autores no informaron los datos de  $^{13}\text{C}$  RMN como tampoco los datos bidimensionales correspondientes.

Posteriormente reacción de oxidación de Jones de **93** produjo la 4-en-3,6 diona **94** con 82,2% de rendimiento. Este procedimiento fue descrito para una serie de sistemas esteroidales con la función  $3\beta$ -hidroxi-5-en, donde los resultados mostraron que en todos los casos fue la obtención del sistema 4-en-3,6-diona [99]. Adicionalmente, desde el espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **94**, mostró un desplazamiento químico a bajo campo de la señal H-4 ( $\delta_H = 6,16$  ppm, 1H, d,  $J = 0,8$  Hz) producto de la conjugación del grupo  $\text{C}=\text{O}$  en C-6, junto con la desaparición de la señal a  $\delta_H = 3,53-3,46$  ppm, asignada al H-3 en el compuesto **93**. Mientras que en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, se observaron dos señales de grupos  $\text{C}=\text{O}$  de cetonas a  $\delta_C = 201,91$  y  $199,31$  ppm, que fueron asignadas a los C-6 y C-3 respectivamente. Estas asignaciones fueron confirmadas mediante experimentos de acoplamiento héteronuclear HMBC a  $^3J_{\text{HC}}$  de la señal de H-4 con C-6 (ver anexos).

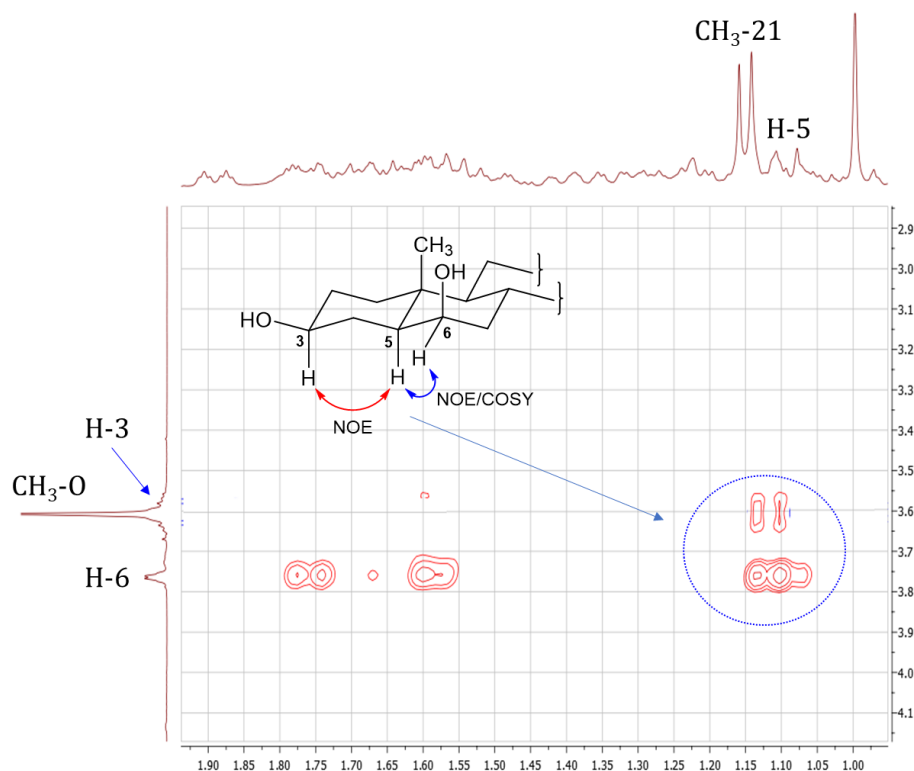
Reducción del enlace doble en C-5 del compuesto **94** en presencia de Zn en medio ácido ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) de acuerdo con metodología reportada [100] produjo la 3,6-diona **95** con 97% de rendimiento. Confirmación de la reducción del enlace doble en C-5 fue evidencia desde el espectro  $^1\text{H}$  RMN, donde no fue observada la señal de H-4 a  $\delta_H = 6,16$  ppm. Mientras que en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, se observaron los desplazamientos químicos a campo alto de los carbonos C-3 y C-9 a  $\delta_C = 211,14$  y  $208,79$  ppm, respectivamente. Esta información espectroscópica de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN fue consistente con los datos reportados para el compuesto **95** [109]. Posteriormente la reducción selectiva de **95** con el sistema  $\text{NaBH}_4/\text{CH}_3\text{OH}/\text{dioxano}$  ( $T = 0$  °C), produjo el diol **96** con 84,0% de rendimiento. Esta reacción se realizó de acuerdo con el protocolo reportado para otro núcleo esteroideal con similitud estructural entre los anillos A/B [63]. La confirmación de la presencia de los grupos hidroxilos fue evidenciada por la observación de la señal en el espectro IR a  $\nu = 3404$   $\text{cm}^{-1}$ . Mientras que en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN fueron observadas las señales a  $\delta_H = 3,80$  ppm (1H, da,  $J = 2,6$  Hz) y a  $\delta_H = 3,64-3,56$  ppm (1H, m) fueron

asignadas a los hidrógenos carbinólicos H-6 y H-3 respectivamente. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, no se observaron la presencia de grupos  $\text{C}=\text{O}$  de cetonas (ver anexos). Respecto de las orientaciones espaciales indicadas como  $3\beta,6\beta$ -dihidroxi, se asignaron en función a lo reportado para estructuras similares que fueron reducidas con este sistema [63]. Esto es razonable considerando un análisis 3D de la 3,6-diona precursora (**95**) y la aproximación por la cara inferior de la molécula por parte del agente reductor ( $\text{NaBH}_4$ ), lo cual podría estar inducido por el grupo  $\text{CH}_3$ -19, según se indica en la Figura 5.1.1.



**Figura 5.1.1** a) Esquema de reducción de la 3,6-diona **95**, para producir el  $3\beta,6\beta$ -diol **96**. b) Representación 3D de los compuestos **95** y **96**, donde se indica la aproximación del agente reductor ( $\text{NaBH}_4$ ), por la cara inferior del plano de **95**, lo que permite la obtención de los grupos hidroxilos con orientación “ $\beta$ ” en C-3 y C-6.

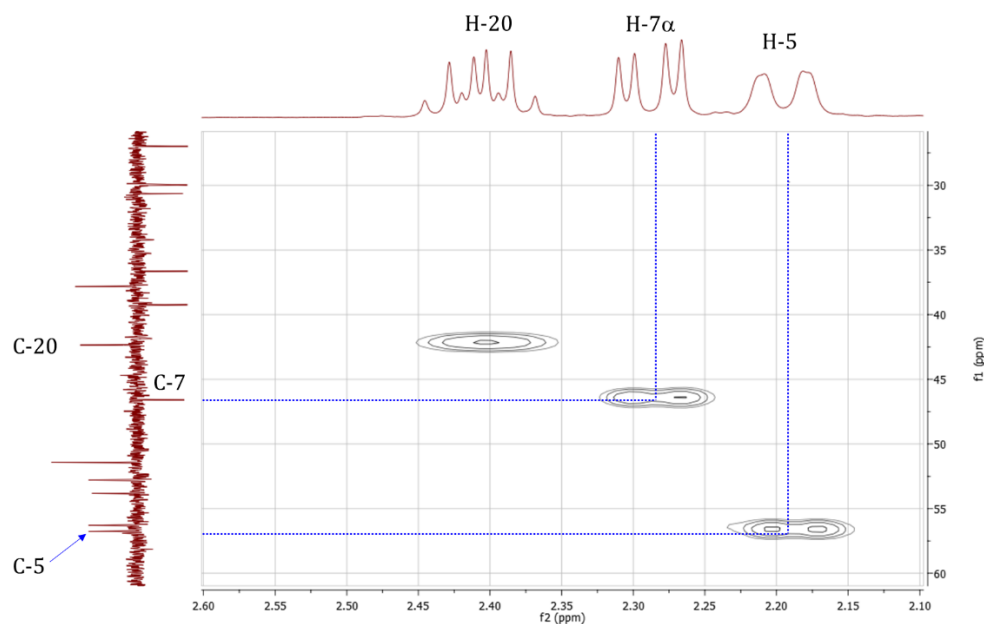
Adicionalmente, desde datos espectroscópicos combinados de experimentos 2D COSY, 2D NOESY y 2D HSQC (ver anexos), se confirmaron las orientaciones espaciales como “ $\alpha$ ” de los hidrógenos carbinólicos en H-3 y H-6, lo que implica que los grupos hidroxilos en C-3 y C-6 deben tener orientación “ $\beta$ ”, según se indican en la Figura 5.1.2, donde se muestran las principales interacciones espaciales de tipo NOE, entre los hidrógenos H-3, H-5 y H-6 ( $J_{\text{H-C}}$ :  $\delta_{\text{H}} = 3,64\text{-}3,56$  con  $\delta_{\text{C}} = 71,56$  ppm;  $\delta_{\text{H}} = 1,11\text{-}1,09$  con  $\delta_{\text{C}} = 47,32$  ppm y  $\delta_{\text{H}} = 3,80\text{-}3,56$  con  $\delta_{\text{C}} = 71,83$  ppm, respectivamente)



**Figura 5.1.2** Espectro 2D NOESY parcial ( $F_2$ : 0,5-1,95 ppm;  $F_1$ : 2,85-4,15 ppm), del 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -diol **96**, donde se muestran las principales interacciones espaciales de tipo NOE, entre los hidrógenos H-3, H-5 y H-6.

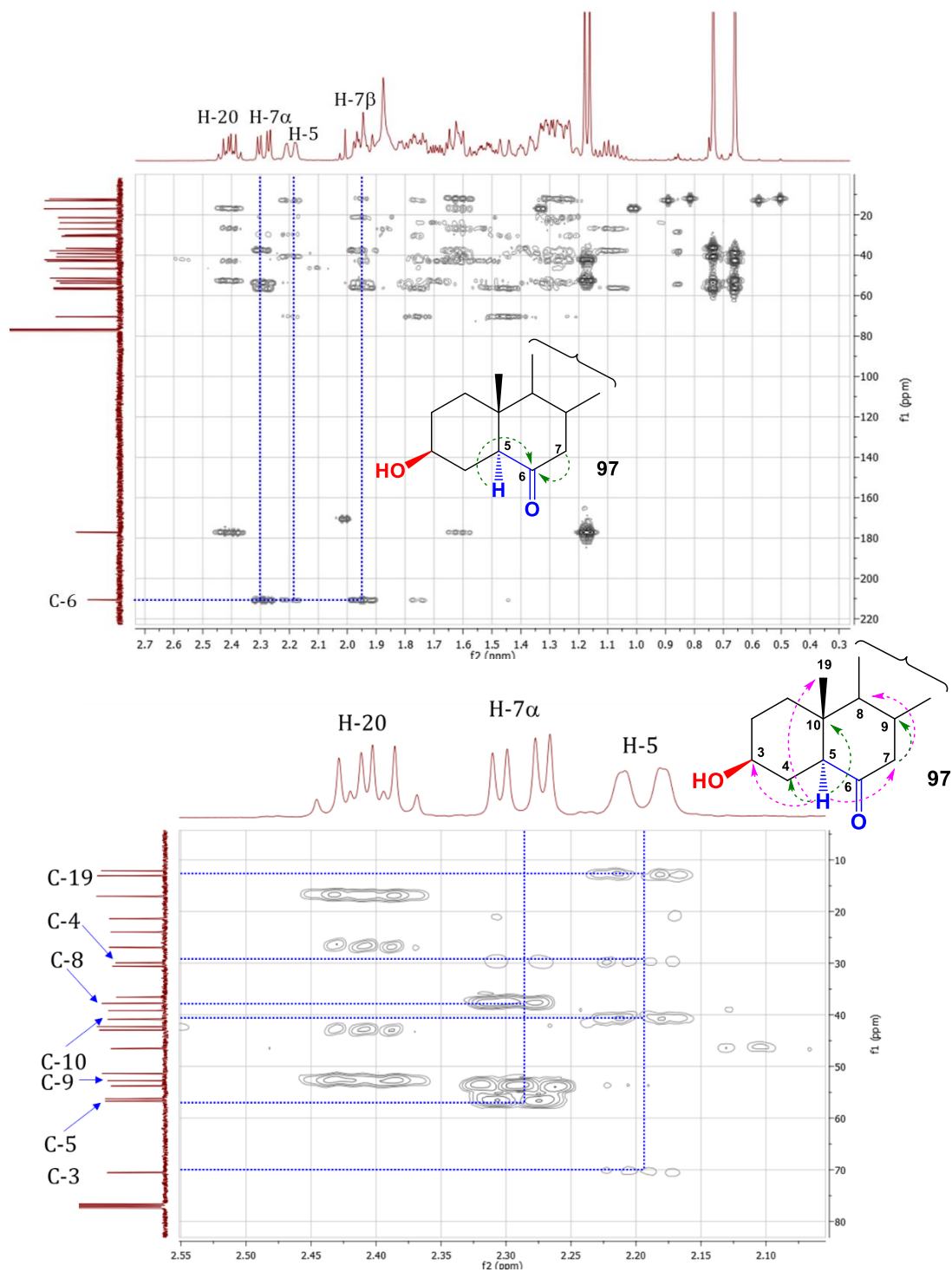
Posteriormente, oxidación selectiva en C-6 del compuesto **96** con el sistema NBS/CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H/H<sub>2</sub>O reportado para otros núcleos esteroidales [63, 101], produjo el derivado mono oxidado **97** con 79,9% de rendimiento. La confirmación de las modificaciones estructurales fue establecida en base a lo informado por otros autores [63, 101], y principalmente por evidencia espectroscópica de IR y RMN. De esta forma el compuesto **97** mostró señales principales a  $\nu = 3504-3393$  y  $1710\text{ cm}^{-1}$ , asignadas a los grupos OH de alcoholes y C=O de cetonas. Mientras que en el espectro de <sup>1</sup>H RMN, se observó la señal a  $\delta_{\text{H}} = 3,59-3,52$  ppm (1H, m) asignada al hidrógeno carbinólico H-3, mientras que no se observó la señal  $\delta_{\text{H}} = 3,80$  ppm (1H, da,  $J = 2,6$  Hz), presente en el precursor **96**. En el espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto **97** se observaron las señales a  $\delta_{\text{C}} = 210,64$  y  $70,53$  ppm asignadas a los carbonos C-6 y C-3 respectivamente. Adicionalmente la posición oxidada en C-6, fue establecida por técnicas

combinadas de experimentos 2D HSQC y 2D HMBC, en donde desde el espectro 2D HSQC se observaron las correlaciones a  $^1J_{\text{HC}}$  entre los hidrógenos a  $\delta_{\text{H}} = 2,29$  ppm (1H, dd,  $J = 13,2$  y  $4,5$  Hz) con el carbono a  $\delta_{\text{C}} = 46,53$  ppm, señales asignadas a H-7 $\alpha$  y C-7 respectivamente. Mientras que la señal observada a  $\delta_{\text{H}} = 2.19$  ppm (1H, da,  $J = 10,9$  Hz) fue correlacionada con el carbono a  $\delta_{\text{C}} = 56,69$  ppm, señales asignadas a H-5 y C-5. Estas correlaciones se muestran en la Figura 5.1.3.



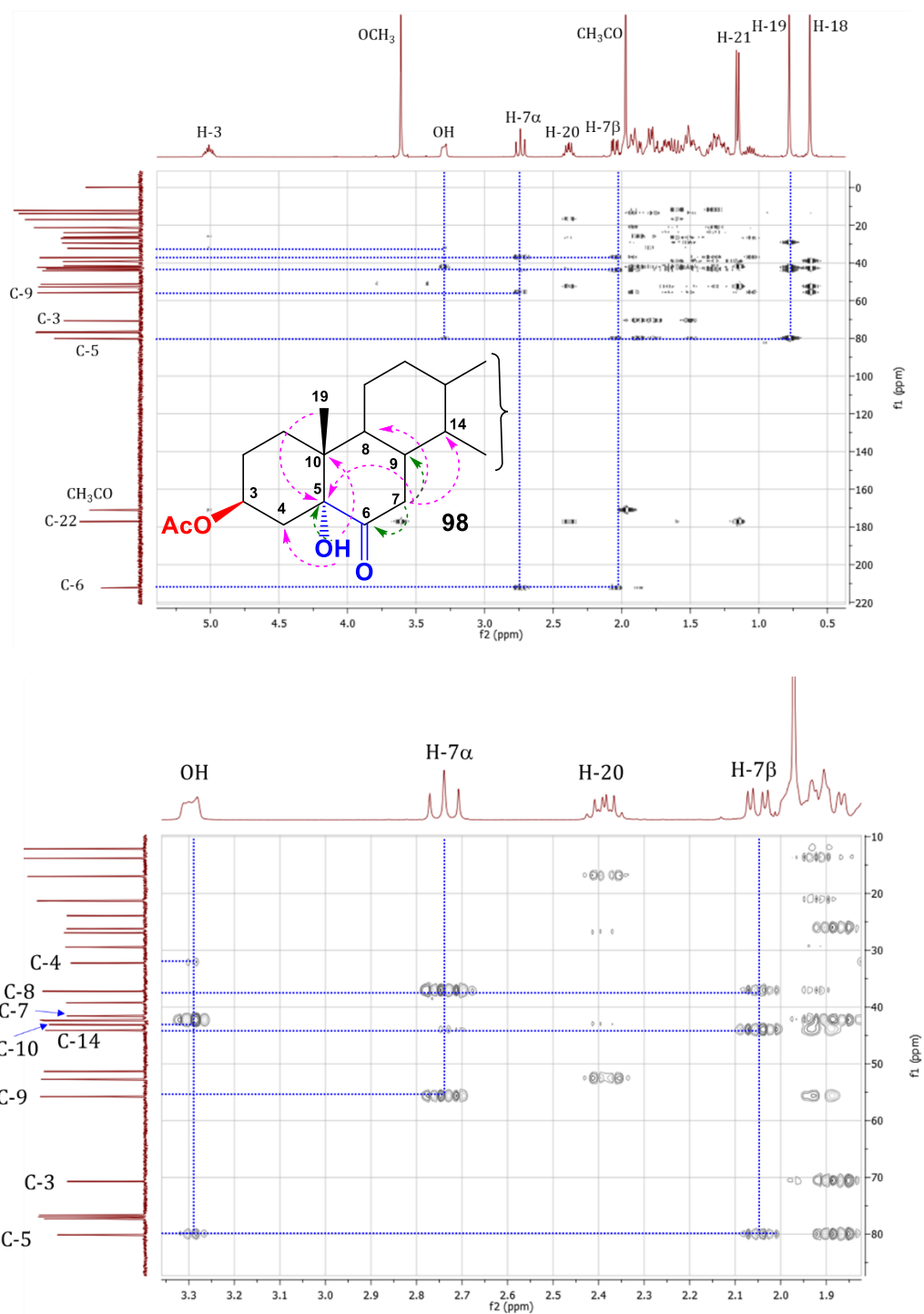
**Figura 5.1.3** Espectro 2D HSQC parcial con traza  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 ( $F_2$ : 1,60-2,10 ppm;  $F_1$ : 20,20-60,20 ppm), del compuesto **97**, donde se muestran las principales correlaciones  $^1J_{\text{HC}}$  entre los hidrógenos H-5, y H-7 $\alpha$ , con sus correspondientes C-5 y C-7.

Por otra parte, desde el espectro 2D HMBC, se confirmó la posición del grupo carbonilo en C-6, en base a las correlaciones heteronucleares a  $^2J_{\text{HC}}$  y  $^3J_{\text{HC}}$ , observadas para los hidrógenos H-5 y H-7 con los carbonos C-3, C-4, C-6, C-7, C-8 C-10 y C-19. De esta forma H-5, H-7 $\alpha$  y H-7 $\beta$  mostraron correlación a  $^2J_{\text{HC}}$  con el C-6 ( $\delta_{\text{C}} = 210,64$  ppm), según se indica en la Figura 5.1.4. Adicionalmente, en la Figura 5.1.4 se muestra una ampliación del espectro 2D HMBC, indicando las principales correlaciones a  $^2J_{\text{HC}}$  y  $^3J_{\text{HC}}$ , detectadas entre los hidrógenos H-5, H-7 $\alpha$  y H-7 $\beta$  con los carbonos C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8 C-10 y C-19, que finalmente confirman la posición de C-6 como grupo C=O, en el derivado **97**.



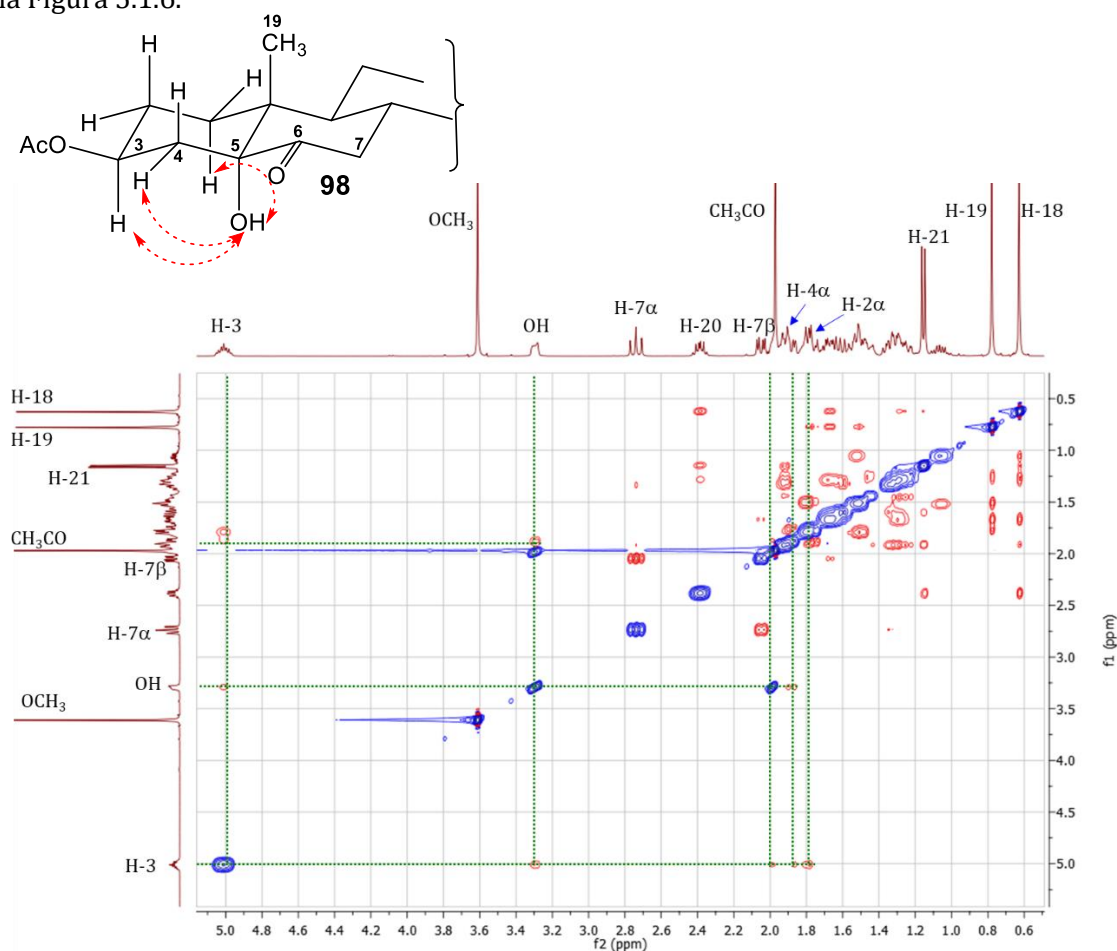
**Figura 5.1.4** Superior: espectro 2D HMBC completo del compuesto **97**, donde se destacan principalmente las correlaciones heteronucleares a  $^2J_{HC}$  para los hidrógenos H-5 y H-7 con el carbono C-6. Inferior: espectro 2D HMBC parcial del compuesto **97**, donde se muestran las principales correlaciones indicando las principales correlaciones a  $^2J_{HC}$  (en verde) y  $^3J_{HC}$  (en calipso), detectadas entre los hidrógenos H-5, H-7 con los carbonos C-3-C10 y C-19.

Posteriormente, para la transformación de **92** en el compuesto **98** (5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo), se aplicó el tratamiento de **92** con AMCPB/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seguido de oxidación de Jones, que es una metodología ampliamente utilizada para la obtención de estas funciones orgánicas, desde esteroides con estructura 3 $\beta$ -acetoxi- $\Delta^5$  [78, 87, 88, 102]. Este procedimiento permitió la obtención del compuesto **98** con un 92% de rendimiento. De todas formas, la confirmación de la estructura 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo en **98** se estableció desde los datos espectroscópicos de IR y RMN. De esta forma el compuesto **98** mostró señales principales en IR a  $\nu = 3419, 1735$  y  $1714 \text{ cm}^{-1}$ , asignada al grupo OH de alcoholes y C=O de ésteres y cetonas respectivamente. Mientras que en el espectro de <sup>1</sup>H RMN se observó la señal a  $\delta_{\text{H}} = 3,31\text{-}3,28 \text{ ppm}$  (1H, m) asignada al hidrógeno del grupo OH, y la señal a  $\delta_{\text{H}} = 2,75 \text{ ppm}$  (1H, dd,  $J = 12,6$  y  $12,6 \text{ Hz}$ ) asignada al H-7 $\alpha$ , característico de hidrógenos en posición alfa de grupos carbonilos. Adicionalmente desde el espectro de <sup>13</sup>C RMN, se observaron las señales a  $\delta_{\text{C}} = 212,30$  y  $80,13 \text{ ppm}$ , que fueron asignadas a los carbonos C-5 y C-6, respectivamente. Estos datos espectroscópicos en conjunto (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN) son característicos de la presencia de funciones 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo [78, 87, 88, 102]. Adicionalmente información espectroscópica combinada de experimentos 2D HSQC y HMBC confirmaron la presencia de la función 5 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo, donde las principales correlaciones heteronucleares a <sup>2</sup>J<sub>HC</sub> y <sup>3</sup>J<sub>HC</sub>, fueron detectadas entre el hidrógeno OH ( $\delta_{\text{H}} = 3,31\text{-}3,28 \text{ ppm}$ , m) con las señales a  $\delta_{\text{C}} = 80,13; 42,46$  y  $32,26 \text{ ppm}$ , asignados a los carbonos C-5, C-10 y C-4 respectivamente. Mientras que el hidrógeno H-7 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}} = 2,75 \text{ ppm}$ , dd,  $J = 12,6$  y  $12,6 \text{ Hz}$ ) mostró correlaciones con las señales a  $\delta_{\text{C}} = 212,30; 55,82; 44,16$  y  $37,24 \text{ ppm}$ , asignadas a los carbonos C-6, C-9, C-14 y C-8 respectivamente. De forma similar el hidrógeno H-7 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}} = 2,06 \text{ ppm}$ , dd,  $J = 12,6$  y  $4,6 \text{ Hz}$ ) mostró correlaciones con las señales a  $\delta_{\text{C}} = 212,30; 80,13; 44,16$  y  $37,24 \text{ ppm}$ , asignadas a los carbonos C-6, C-5, C-14 y C-8 respectivamente. Estas correlaciones y algunas otras se muestran en la Figura 5.1.5.



**Figura 5.1.5** Superior: espectro 2D HMBC completo del compuesto **98**, donde se destacan principalmente las correlaciones heteronucleares a  $^2J_{\text{HC}}$  (en verde) y  $^3J_{\text{HC}}$  (en calipso) para los hidrógenos OH, H-7 $\alpha$  y H-7 $\beta$  con los correspondientes carbonos. Inferior: espectro 2D HMBC ampliado del compuesto **98**.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, la orientación espacial del grupo OH en el carbono C-5 para esta reacción se indica como  $5\alpha$ -OH, esta fue confirmada desde los datos espectroscópicos observados en experimentos 2D NOESY. De esta forma la señal del hidrógeno del grupo OH ( $\delta_H = 3,31$ - $3,28$  ppm, m), mostró interacciones espaciales con los hidrógenos a  $\delta_H = 5,02$  ppm (tc,  $J = 10,3$  y  $5,1$  Hz);  $1,93$ - $1,89$  ppm (m) y  $1,80$ - $1,77$  ppm (m), asignados a los hidrógenos H-3, H-4 $\alpha$  y H-2 $\alpha$ , respectivamente. Estas correlaciones junto con la estructura de **98** se muestran en la Figura 5.1.6.



**Figura 5.1.6** Estructura parcial y espectro 2D NOESY del compuesto **98**, donde se destacan las principales correlaciones espaciales entre los hidrógenos OH, H-3, H-4 $\alpha$  y H-2 $\alpha$ .

Finalmente, por medio de saponificación selectiva del grupo acetato presente en el compuesto **98** con el sistema CH<sub>3</sub>ONa/CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [98] produjo el derivado **99** con un 77,5% de rendimiento. Las principales evidencias espectroscópicas para confirmar el producto de reacción se observaron desde los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN. De esta forma

en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN, se observó un desplazamiento químico a campo alto de la señal a  $\delta_{\text{H}} = 4,03\text{-}3,95$  ppm (1H, m), asignada al hidrógeno H-3, que en el compuesto **98**, esta señal se observó a  $\delta_{\text{H}} = 5,02$  ppm. Adicionalmente no se observó la señal a  $\delta_{\text{H}} = 1,98$  ppm, características de las señales de grupos  $\text{CH}_3\text{CO}$ . Mientras que en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, se observó un desplazamiento químico a campo alto de la señal a  $\delta_{\text{C}} = 65,18$  ppm, asignada al carbono C-3, que en el compuesto **98**, esta señal se observó a  $\delta_{\text{C}} = 70,69$  ppm. Además, no se observaron las señales correspondientes al grupo acetato ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), presentes en el compuesto **98** a  $\delta_{\text{C}} = 171,05$  (C=O) y 21,23 ( $\text{CH}_3\text{-}$ ). Esta información confirma que la reacción de saponificación ocurrió en forma selectiva sobre el grupo  $\text{CH}_3\text{CO}$  en C-3.

## 5.2 Evaluaciones biológicas

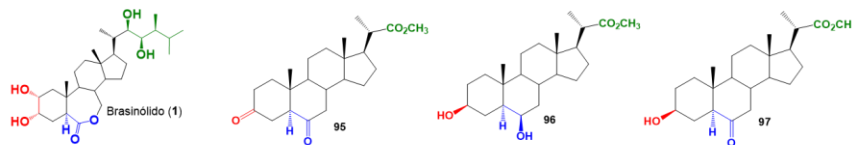
---

De acuerdo con el objetivo específico N°3 planteado en esta tesis, se procedió a evaluar la actividad biológica de los análogos **95-99** por medio del ensayo biológico de inclinación de la lámina de arroz (ILA), en la especie *Oryza sativa*, variedad Zafiro [107, 108] y siguiendo un procedimiento modificado descrito en la metodología, utilizando como control positivo, el brasinólido (**1**) y agua como control negativo [75, 103, 107, 108].

Como se indicó en la introducción y referente a los requerimientos estructurales que deben poseer los brasinoesteroides naturales y sus análogos sintéticos en la cadena lateral, se ha establecido que se debe tener una función glicol en los carbonos C-22 y C-23, preferentemente con configuraciones *22R*, *23R* y un grupo sustituyente de tipo metilo o etilo en el carbono C-24. Sin embargo, claramente este requisito estructural no está del todo claro, y es así como se ha reportado que análogos de brasinoesteroides con cadena lateral más corta y con distinta naturaleza estructural han demostrado ser activos en varios ensayos biológicos de estimulación del crecimiento vegetal [40, 67, 68, 75, 78, 96].

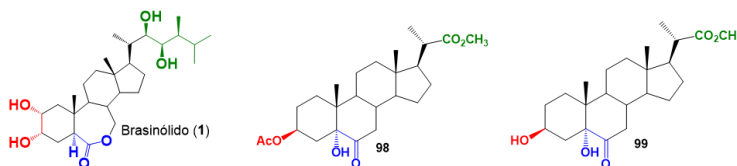
Analizando los resultados obtenidos, se observa que los análogos sintéticos de BRs evaluados (con cadena lateral del tipo 23,24-bisnorcolanos) presentaron una dependencia directa de la concentración en los efectos de ILA. En primer lugar, todos los análogos ensayados (**95-99**) fueron más activos que el control negativo (agua). Otra observación importante en términos generales fue que el análogo **97** presentó la mayor actividad a las concentraciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M, superando incluso al control positivo (brasinólido (**1**), ver Tablas 5.2.1 y 5.2.2). Mientras que a la concentración  $10^{-8}$  mostró una actividad comparable al brasinólido (**1**).

**Tabla 5.2.1** Ángulo promedio de inclinación de la lámina de arroz (grados  $\pm$  DS) para la serie **95-97** (cadena lateral del tipo 23,24-bisnorcolánica) a concentraciones  $1 \times 10^{-8}$ M,  $1 \times 10^{-7}$ M y  $1 \times 10^{-6}$ M.



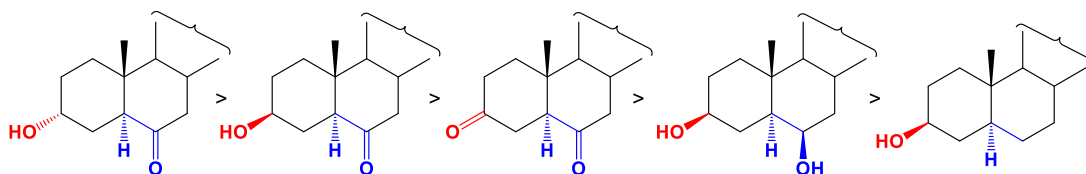
Concentración	Ángulo (°)	Ángulo (°)	Ángulo (°)	Ángulo (°)
$10^{-8}$	$38 \pm 7,5$	$33 \pm 5,8$	$50 \pm 0,0$	$36 \pm 6,0$
$10^{-7}$	$46 \pm 8,0$	$54 \pm 6,6$	$40 \pm 2,0$	$85 \pm 0,0$
$10^{-6}$	$89 \pm 4,9$	$60 \pm 0,0$	$53 \pm 2,7$	$132 \pm 1,00$

**Tabla 5.2.2** Ángulo promedio de inclinación de la lámina de arroz (grados  $\pm$  DS) para la serie **98-99** (cadena lateral del tipo 23,24-bisnorcolánica) a concentraciones  $1 \times 10^{-8}$ M,  $1 \times 10^{-7}$ M y  $1 \times 10^{-6}$ M.



Concentración	Ángulo (°)	Ángulo (°)	Ángulo (°)
$10^{-8}$	$38 \pm 7,5$	$45 \pm 10$	$35 \pm 4,8$
$10^{-7}$	$46 \pm 8,0$	$43 \pm 5,2$	$38 \pm 4,1$
$10^{-6}$	$89 \pm 4,9$	$35 \pm 5,5$	$54 \pm 6,6$

Considerando las estructuras y los valores de actividades biológicas obtenidos entre los análogos **95-97** (Tabla 5.2.1) se puede observar la dependencia de la estructura con la actividad; es decir que la combinación de funciones orgánicas  $3\beta$ -hidroxi-6-oxo parece ser la más activa para la serie **95-97**, lo que se condice con los estudios de relación estructura-actividad para la presencia de estas funciones orgánicas entre los anillos A/B (Figura 5.2.1 [24]).



**Figura 5.2.1** Efecto de incremento en la actividad biológica para análogos de BRs mono oxigenados en el anillo A, fusión de anillos A/B de tipo "trans" y función oxigena en anillo B.

Para el caso de los análogos **98** y **99** (Tabla 5.2.2), sólo **99**, mostró una leve actividad a la concentración de  $10^{-6}$  M, comparable con el análogo **96**. Respecto de la estructura parcial con función  $5\alpha$ -hidroxi-6-oxo, no existe una tendencia clara respecto de este requisito estructural, y aparentemente el análisis se debe realizar considerando otros aspectos estructurales para este tipo de análogos, dado que la diversificación es amplia en lo que respecta al anillo A, y cadena lateral (ver Figura 1.4.1, [76-90]).

### 5.3 Estudios “*In-Silico*”

---

Según los resultados de acoplamiento de los tres principales derivados de tipo brasinoesteroide **95**, **97** y **99** que poseen los datos de actividad biológica más elevados, se observó que las mejores posturas de acoplamiento para estos compuestos comparten un modo de unión común en un surco hidrofóbico pronunciado que se encuentra entre el dominio de inserción y el lado cóncavo del solenoide y, según el modo de unión predicho, las mejores puntuaciones de acoplamiento se encontraron en el intervalo de -9,52 a -12,23 kcal mol<sup>-1</sup>, lo que sugiere que estas interacciones son tan eficaces que proporcionan un efecto estabilizador en la conformación del sitio activo. No obstante, el valor de la distancia cuadrática media (RMSD) obtenido entre estos resultados de docking mejor clasificados y la estructura cristalina fue superior a 2 Å.

Como consecuencia de esto, se incorporó a los estudios de docking la flexibilidad de la proteína, lo cual es ampliamente aceptado ya que la incorporación de este factor a los estudios de docking juega un papel importante en el proceso de reconocimiento proteína-ligando. En este sentido, los modos de unión de todos los compuestos se generaron mediante acoplamiento de ajuste inducido (IFD).

Se dio énfasis al análisis del modo de unión predicho por IFD para los compuestos más activos, que mostraron una red optimizada de interacciones proteína-ligando en comparación con los resultados del docking realizado anteriormente. Recalculando el valor RMSD a los resultados obtenidos del docking IFD y la estructura cristalina, fue posible alcanzar poses clasificadas con valores inferiores a 2 Å para los compuestos **95** (RMSD= 1,89 Å) y **97** (RMSD= 1,87 Å). En consecuencia, el aumento significativo de los valores GlideScores tras el cálculo de IFD de todos los compuestos activos (de -9,91 a -13,10 kcal-mol<sup>-1</sup>) sugiere que la afinidad de unión a la conformación activa es bastante alta.

La mayoría de los residuos que recubren el surco superficial son hidrófobos y están muy conservados. Por lo tanto, los resultados obtenidos del IFD revelan que los compuestos presentan múltiples interacciones hidrofóbicas que implican residuos tales como Lys 601, Arg 640, Thr 729, Asn 705, Ile 706, Ile 682, Phe 681, Met 657, Trp 564, Tyr 599, Tyr 597 y Tyr 642, que probablemente desempeñan un papel predominante en las interacciones proteína-ligando, ya que el núcleo central del esqueleto de anillos fusionados ocupa la mayor parte del surco superficial. Curiosamente, los modos de unión para la mayoría de los compuestos, así como para los compuestos **95** y **97** revelaron la

presencia de otras interacciones hidrofóbicas que tienen lugar con los residuos Thr 63 y Phe 60, producidas por la asociación estable de BRI1-BAK1 que es consecuencia de la activación inicial de BRI1. Por lo tanto, también es posible que los compuestos acoplados participen en la interacción con BAK1 (LRR), y desencadenen así la fosforilación de BKI1 por BRI1, formando un complejo BRI1-BAK1 más estable de la misma manera que lo hace el ligando activo. Los estudios de acoplamiento para el resto de los análogos se muestran en el Anexo 2.

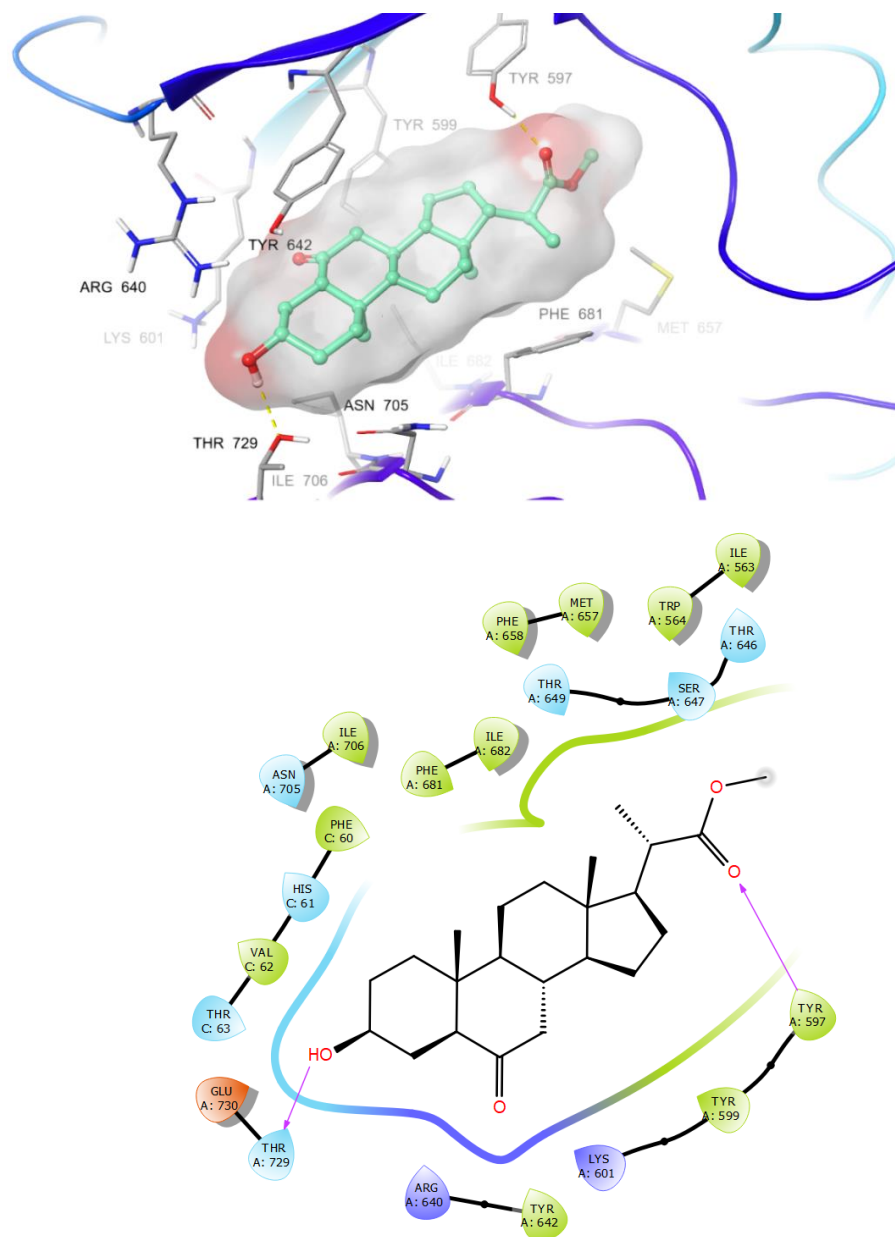
Un análisis más detallado de los resultados del IFD-docking para el compuesto más activo **97** reveló que es capaz de establecer dos interacciones estables de enlaces de hidrógeno, una de ellas entre el grupo hidroxilo presente en el anillo A y el residuo Thr 729, además otra entre el grupo metoxicarbonilo y el residuo Tyr 597 reforzando las interacciones alrededor de la zona de contacto (Figura 5.3.1). Los resultados obtenidos del IFD también revelaron que el compuesto **95** es capaz de formar dos interacciones de enlace de hidrógeno, una de ellas formada por el grupo carbonilo del anillo A que estaba orientado principalmente hacia el residuo His 61 y un segundo enlace de hidrógeno formado por el grupo metoxicarbonilo con un residuo Ser 647 que también refuerzan aún más las interacciones alrededor de la interfaz de contacto.

Por otro lado, tanto para el compuesto **95** como para el compuesto **97** el anillo A presentan interacciones hidrofóbicas sin importancia con la superficie cóncava, mientras que el anillo B interactúa estrechamente con el residuo Tyr 642 y con el residuo Tyr 599 de la misma manera que lo hace el anillo D desde el lado lateral. Los dos anillos C y D se apilan estrechamente a los residuos de Ph 681 y Ph 60.

Además, también se observa que la cadena lateral del anillo D se estabiliza por interacciones con los residuos Trp 564 y Tyr 597. Por último, los grupos metilo forman interacciones estéricas hidrofóbicas que se alojan en dos cavidades en el fondo del surco hidrofóbico.

De acuerdo con lo anterior, estos resultados mostraron un aumento en el valor de Docking Score de  $-13,10 \text{ kcal mol}^{-1}$  para la conformación más estable del compuesto **97**. Estos resultados sugirieron que las interacciones de puente de hidrógeno observadas para este compuesto, así como la nueva orientación del ligando, proporcionaron un efecto estabilizador mayor sobre la superficie del bolsillo de unión al brasinólido que el producido por el compuesto **95**, lo que explicaría la diferencia de actividad biológica observada para ambos compuestos.

Finalmente, los estudios de docking de ajuste inducido nos han permitido conferir flexibilidad a las cadenas laterales de la proteína permitiendo al ligando ajustar y optimizar las interacciones de unión dentro del sitio activo, revelando que el compuesto más activo presentaba energías de unión apreciables y una buena afinidad por el BRI1.



**Figura 5.3.1** Modos de unión predichos en 3D y 2D del compuesto **97** en la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (PDB 4M7E). Los estudios de docking de ajuste inducido revelaron que el compuesto más activo posee energías libres de unión apreciables y afinidad de unión con BRI1.

## CAPITULO 6 - CONCLUSIONES

---

Cinco análogos de brasinoesteroides funcionalizados como éster carboxílico en la posición C-22 fueron sintetizados eficientemente desde el ácido 3 $\beta$ -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**23**) con rendimientos entre el 77,5% y 98% en cada paso de síntesis. Los resultados de las pruebas de Inclinación de la Lámina de Arroz indicaron que los compuestos **95**, **97** y **99** aumentaron la respuesta de crecimiento vegetal consistentemente a medida que las concentraciones aplicadas aumentaban, mientras que los compuestos **96** y **98** mostraron un decaimiento en este efecto. El compuesto **97** con subestructura ácido 3 $\beta$ -hidroxi-6-oxo fue el más activo a concentraciones de 1x10<sup>-7</sup> M y 1x10<sup>-6</sup> M, incluso más activo que el brasinólido (**1**), el cual es el compuesto más activo entre los brasinoesteroides de origen natural.

Los estudios de simulaciones de docking molecular combinados con induced fit (IFD) sugieren un modo de acoplamiento apropiado donde el compuesto adopta una conformación favorablemente bien ajustada con el sitio de unión con el receptor BRI1, formando interacciones polares e hidrofóbicas que revelaron que el compuesto más activo poseía un alto valor de energía de unión y una buena afinidad, particularmente por interacciones del tipo puente de hidrógeno de las funciones  $\beta$ -hidroxi en C3 del anillo A y con el oxígeno de la cetona de la cadena lateral, lo cual explica la actividad biológica de crecimiento vegetal observada para este compuesto.

Los resultados observados demuestran que la hipótesis planteada en este estudio se cumplió parcialmente dado que dos nuevos análogos de brasinoesteroides con cadena lateral más corta, del tipo 23,24-bisnorcolánica presentaron actividad de crecimiento vegetal en el ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz, la cual fue contrastada con los estudios de acoplamiento molecular (docking) indicando que ésta característica estructural puede considerarse como alternativa para la actividad biológica, y de esta forma se podrían obtener nuevos análogos con una ruta de síntesis más corta y eficiente.

En base a los resultados obtenidos en este estudio y considerando la literatura existente, se evidencia una escasez de compuestos sintetizados en comparación con aquellos que presentan una cadena lateral larga. Esta brecha en la investigación sugiere un amplio campo de oportunidades para sintetizar una mayor diversidad de compuestos y evaluar su actividad biológica. Con relación a

esto, se espera que futuras investigaciones se centren en ampliar la diversidad de compuestos sintetizados, explorando diferentes modificaciones en la cadena lateral y evaluando su impacto en la actividad biológica. Esto permitiría obtener un mayor conocimiento sobre la relación estructura-actividad y potencialmente descubrir compuestos más efectivos y selectivos para aplicaciones en el crecimiento vegetal.

Adicionalmente, se destaca el rol prometedor de las pruebas *in silico*, como los estudios de acoplamiento molecular (docking), en la guía de posibles nuevas rutas de síntesis. Estas herramientas computacionales pueden ofrecer información invaluable para optimizar la síntesis de compuestos y predecir su actividad biológica antes de realizar los experimentos *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, se espera que en el futuro se aproveche aún más el potencial de las pruebas *in silico* en la investigación de brasinoesteroides y en la búsqueda de compuestos con propiedades biológicas mejoradas.

## REFERENCIAS

---

- [1] The Plant Cell, June 2011, www.plantcell.org, © 2011 American Society of Plant Biologists. Mary E. Williams mwilliams@aspb.org Features Editor, The Plant Cell American Society of Plant Biologists c/o Plant Science Research Group, University of Glasgow.
- [2] Santner, A.; Calderon-Villalobos, L. I. A. & Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* **2009**, 5, 301-307.
- [3] Sachs, J. Stoff und Form der Pflanzenorgane. Arb. Bot. Inst. *Würzburg* **1880**, 2, 452-488.
- [4] Darwin, C. The Power of Movement in Plants, Ed. Cambridge University Press, 2009, ISBN 1108003605.
- [5] Jun, J. H.; Fiume, E. & Fletcher, J. C. The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 743-755.
- [6] Fukuda, H. and Higashiyama, T. Diverse Functions of Plant Peptides: Entering a New Phase. *Plant Cell Physiol.* **2011**, 52, 1-4.
- [7] Mitchell, J. W.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Plimmer, J. R.; Smith, M. V. Brassins-a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature* **1970**, 225, 1065-1066.
- [8] Grove, M. D.; Spencer, F. G.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N. B.; Worley, J. F.; Warthen Jr.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Cook Jr.; J. C. Brassinolide, a plant growth promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. *Nature* **1979**, 281, 216-217.
- [9] Hamada, K. Brassinolide in crop production. In: Maegregor. Plant growth regulators in agriculture Food Fertl Technol Cent Asia. *Pac Reg, Taiwan.* **1986**, 190-196.
- [10] Abe, H. Advances in brassinosteroid research and prospects for its agricultural application. *Japan Pesticide Info.* **1989**, 55, 10-14.
- [11] Takematsu, T. (1986). Brassinolides for diminution of salt or herbicide damage to crops. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63 66,104 [88 66,104] [C. A. 109, 224716].
- [12] Sasse J.M.; Griffiths P.G.; Gaff D.F.; Yokota T.; Cameron D.W. (1998). Brassinosteroids of a resurrection grass. In: Abstracts of the 16th International Conference on Plant Growth Substances. Chiba, Japan. 131.
- [13] Khripach, V.A.; Zhabinskii, V.N.; de Groot, A.E. (1999) Brassinosteroids. A new class of plant hormones. Academic Press, San Diego, 219.
- [14] Gray W.M. Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *PLoS Biol*, **2004**, 2, e311.
- [15] Fujioka, S.; Noguchi T.; Yokota T.; Takatsuto S.; Yoshida S. Brassinosteroids in Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* **1998**, 48, 595-599.

- [16] Schmidt, J.; Porzel A.; Adam G. Brassinosteroids and a pregnane glucoside from *Daucus carota*. *Phytochem Analysis* **1998**, 9, 14-20.
- [17] Shim, J. H.; Kim I.S.; Lee K.B.; Suh Y.T.; Morgan E.D. Determination of brassinolide in rice (*Oriza sativa* L.) by HPLC equipped with a Fluorescence detector. *Agric. Chem. Biotech.* **1998**, 39, 84-88.
- [18] Yokota, T.; Higuchi K.; Takahashi N.; Kamuro Y.; Watanabe T.; Takatsuto S. Identification of brassinosteroids with epimerized substituents and/or the 23-oxo group in pollen and anthers of Japanese cedar. *Bioscience, Biotech and Biochem.* **1998**, 62, 526-531.
- [19] Clouse, S.D., Brassinosteroid signaling: novel downstream components emerge. *Curr. Biol.* **2002**, 12, 485-487.
- [20] Li, J.M. and Chory, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **1997**, 90, 929-938.
- [21] Yokota, T. The structure biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 137-143.
- [22] Clouse, S.D.; Sasse, J.M. Brassinosteroid: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu. Plant. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 427-451.
- [23] Fujioka, S.; Yokota, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, 54, 137-164.
- [24] Bajguz, A.; Tretyn, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **2003**, 62, 1027-1046.
- [25] Yokota, T. 1999. Brassinosteroids. In PJJ Hooykaas, MA Hall, KR Libbenga (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science, London, pp. 277-293.
- [26] Khripach, V.; Zhabinskii, V. and Ae de Groot, 1999. Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones. San Diego: Academic Press: p. 456.
- [27] Takeno, K. & Pharis, R. P. Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf rice seedlings: an auxin-mediated phenomenon. *Plant and Cell Physiology* **1982**, 23, 1275-1281.
- [28] Kim, S. K.; Abe, H.; Little, C. A. & Pharis, R. P. Identification of two brassinosteroids from the cambial region of Scots pine (*Pinus silverstris*) by gas chromatography-mass spectrometry, after detection using a dwarf rice lamina inclination bioassay. *Plant physiology* **1990**, 94, 1709-1713.
- [29] Ramírez, J. A.; Teme Centurión, O. M.; Gros, E. G. & Galagovsky, L. R. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. *Steroids* **2000**, 65, 329-337.
- [30] Takatsuto, S.; Yazawa, N. Y.; Ikekawa, N.; Takematsu, T.; Takeuchi, Y.; Koguchi, M. Structure-activity relationships of brassinosteroids. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2437-2441.

- [31] 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 effect. *Steroids* **1982**, 39, 89-105.
- [32] Takatsuto, S.; Yazawa, N. Y.; Ikekawa, N.; Takematsu, T.; Takeuchi, Y.; Koguchi, M. Structure-activity relationships of brassinosteroids. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2437-2441.
- [33] 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.
- [34] Voigt, B.; Porzel, A.; Golsch, D.; Adam, W. & Adam, G. Regioselective oxyfunctionalization of brassinosteroids by methyl (trifluoromethyl) dioxirane: Synthesis of 25-hydroxy-brassinolide and 25-hydroxy-24-epibrassinolide by direct CH insertion. *Tetrahedron* **1996**, 52, 10653-10658.
- [35] Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Abe H. Structure-activity relationship of brassinosteroids with respect to the A/B-ring functional groups. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1987**, 35, 211-216.
- [36] Yokota, T.; Kim, S. K.; Fukui, Y.; Takahashi, N.; Takeuchi, Y. & Takematsu, T. Brassinosteroids and sterols from a green alga "Hydrodictyon reticulatum": Configuration at C-24. *Phytochemistry* **1987**, 26, 503-506.
- [37] Mandava, N. B. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **1988**, 39, 23-52.
- [38] Okada, K., Mori, K. Stereoselective synthesis of dolicholide, a plant growth-promoting steroid. *Agricultural Biological Chemistry* **1983**, 47, 925-926.
- [39] Kishi, T.; Wada, K.; Marumo, S.; Mori, K. Synthesis of brassinolide analogs with a modified ring B and their plant growth-promoting activity. *Agricultural and Biological Chemistry* **1986**, 50, 1821-1830.
- [40] Brosa, C.; Capdevila, J. M. and Zamora, I. Brassinosteroids: A New Way to Define the Structural Requirements. *Tetrahedron* **1996**, 52, 2435-2448.
- [41] Thompson, M.J.; Mandava, N.; Flippen-Anderson, J.L.; Worley, J.F.; Dutky, S.R.; Robbins, W.E.; Lusby, W. Synthesis of brassinosteroids: new plant-growth-promoting steroids. *Journal of Organic Chemistry* **1979**, 44, 5002-5004.
- [42] Richter, K. & Koolman, J. 1991. Antiecdysteroid effects of brassinosteroids in insects. In *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. ACS Symp. Ser, Washington, DC (Vol. 474), pp. 231-245.
- [43] Seto, H.; Fujioka, S.; Koshino, H.; Suenaga, T.; Yoshida, S.; Watanabe, S.; Takatsuto, S. Epimerization at C-5 of brassinolide with sodium methoxide and the biological activity of 5-epibrassinolide in the rice lamina inclination assay. *Journal of Chemistry Society, Perkin translations 1* **1998**, 3355-3358.

- [44] Zhou, W.S.; Tian, W-S. Studies on Steroidal Plant-Growth Hormones. II. Stereoselective Synthesis of (22S, 23S)-Typhasterol from Hyodeoxycholic Acid. *Acta Chimica Sinica* **1985**, 43, 1060-1067 (Chinese Edition).
- [45] Zhou, W.S. and Tian, W-S. Study on the Synthesis of Brassinolide and Related Compounds III. Stereoselective Synthesis of Typhasterol from Hyodeoxycholic Acid. *Tetrahedron* **1987**, 43, 3705-3712.
- [46] Aburatani, M.; Takeuchi, T. and Mori, K. Facile Synthesis of Brassinosteroids: Brassinolide, Castasterone, Teasterone and Typhasterol. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51, 1909-1913.
- [47] Kohout, L.; Strand, M. Brassinosteroids with ester function with five carbon atoms at the 20 position. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* **1992**, 57, 1731-1738.
- [48] Kohout, L.; Velgová, H.; Strnad, M. and Kamínek, M. Brassino Steroids with Androstane and Pregnane Skeleton. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* **1987**, 52, 476-486.
- [49] Bajguz, A. Brassinosteroids-Occurrence and Chemical Structures in Plants. In *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*; Hayat, S., Ahmad, A., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2016.
- [50] Oklestkova, J.; Rarova, L.; Kvasnica, M.; Strnad, M. Brassinosteroids: Synthesis and biological activities. *Phytochem. Rev.* **2015**, 14, 1053-1072.
- [51] Clouse, S. D. A History of Brassinosteroid Research from 1970 through 2005: Thirty-Five Years of Phytochemistry, Physiology, Genes, and Mutants. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, 34, 828-844.
- [52] Nolan, T. M.; Vukašinović, N.; Liu, D.; Russinova, E.; Yin, Y. Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Plant Cell* **2020**, 32, 295.
- [53] Simin, L.; Hongxiang, Z.; Lin, L.; Fang, W.; Na, S. Roles of brassinosteroids in plant growth and abiotic stress response. *Plant Growth Regulation* **2021**, 93, 29-38.
- [54] Temmem, O.; Uguen, D.; Cian, A. De.; Gruber, N. Toward a total synthesis of brassinosteroids; structure assessment of the Ireland–Claisen products of geranyl and neryl esters. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3169-3173.
- [55] Temmem, O.; Zoller, T.; Uguen, D. Toward a total synthesis of brassinosteroids; stereoselective generation of the hydrindane ring system. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3181-3184.
- [56] Khripach, V.; Zhabinskii, V.; and Ermolovich, Y. Synthetic aspects of brassinosteroids, *Studies in Natural Products Chemistry*, **2015**, 44, 309-352.
- [57] Kovganko, N.; and Ananich, S. *Advances in the chemical synthesis of brassinosteroids, Chemistry of Natural Compounds* **1997**, 33, 389–416.

- [58] Back, T. Stereoselective synthesis of brassinosteroids, *Studies in natural products chemistry*, **1995**, 16, 321-364.
- [59] Yokota, T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* **1997**, 2, 137-143.
- [60] Back, T.; and Pharis, R. Structure-activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity. *Journal of Plant Growth Regulation* **2003**, 22, 350-361.
- [61] Brosa, C.; and Miró, X. Synthesis of new brassinosteroids with epoxy functions: The effect on the regioselectivity of the Baeyer-Villiger Reaction. *Tetrahedron* **1997**, 53, 11347-11354.
- [62] Carvajal, C.; González, C.; Olea, A.; 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.
- [63] Iglesias-arteaga, M.; Pérez-Gil, R.; Pérez-Martínez, C.; and Coll-manchado, F. Spirostanic analogues of teasterone. Synthesis, characterisation and biological activity of laxogenin, (23*S*)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin). *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*. **2001**, 261-266.
- [64] Oklestkova, J.; Kvasnica, M.; Bazgier, V.; Rarova, L.; Berka, K.; and Strnad, M. Biological activities of new monohydroxylated brassinosteroid analogues with a carboxylic group in the side chain. *Steroids* **2014**, 85, 58-64.
- [65] Zhou, W-S.; and Tian, W-S. Studies on Steroidal Plant-Growth Hormones IX. The Preparation of 22*R*-and 22*S*-24, 25, 26, 27, 28-Penta-Nor-Brassinolides. *Acta Chimica Sinica* **1989**, 47, 1017-1021.
- [66] Cerny, V.; Zajíceka, J.; and Strnad, M. 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Dihydroxy-7-oxa-6-oxo-B-homo-5 $\alpha$ -pregnan-21-oic acid and its derivatives as brassinolide analogues, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, **1987**, 52, 215-222.
- [67] Cerny, V.; Strnad, M.; and Kamínek, M. Preparation of 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23,24-dinor-b-homo-5 $\alpha$ -cholanolic acid, its esters and amides as brassinolide analogues, *Collect. Czechoslov. Chem*, **1986**, 51, 687-697.
- [68] Kohout, L.; Chodoundká, H.; Macek, T.; and Strnad, M. Synthesis of (20*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-7-oxa-7 $\alpha$ -homo-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxylic acid as a brassinosteroid part of ligand for binding to affinity, *Collect. Czech. Chem. Commun*, **2000**, 65, 1754-1761.
- [69] Wendeborn, S.; Lachia, M.; Jung, P.; Leipner, J.; Brocklehurst, D.; Mesmaeker, A.; and Mondiere, R. Biological activity of Brassinosteroids-direct comparison of known and new analogs in planta. *Helvetica Chimica Acta* **2017**, 100, 1-42.
- [70] Zhou W-S.; and 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. *Journal Chemical Society* **1994**, 1, 3579-3585.

- [71] Kvasnica, M.; Oklestkova, J.; Bazgier, V.; Rárová, L.; Korinkova, P.; Mikulík, J.; Budesinsky, M.; Béres, T.; Berka, K.; Lu, Q.; Russinova, E.; and Strnad, M. Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2016**, 14, 8691-8701.
- [72] Kvasnica, M.; Korinkova, P.; Bazgier, V.; Oklestkova, J.; Rarova, L.; and Strnad, M. Synthesis of novel aryl brassinosteroids through alkene cross-metathesis and preliminary biological study. *Steroids* **2017**, 127, 46-55.
- [73] Oyarce, J.; Aitken, V.; González, C.; Ferrer, K.; Olea, F. A.; Parella, T.; Espinoza Catalán, L. Synthesis and Structural Determination of New Brassinosteroid 24-Nor-5-Cholane Type Analogs. *Molecules* **2019**, 24, 4612.
- [74] Soto, N.; Ferrer, K.; Díaz, K.; González, C.; Taborga, L.; Olea, F.A.; Carrasco, H.; and Espinoza, L. Synthesis and Biological Activity of New Brassinosteroid Analogs of Type 24-Nor-5 $\beta$ -Cholane and 23-Benzoate Function in the Side Chain. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 4808.
- [75] Díaz, K.; Espinoza, L.; Carvajal, R.; Conde-González, M.; Niebla, V.; Olea, F. A.; Yamilet Coll, Y. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1832.
- [76] Ramírez, J.; Gros, G.; Galagovsky, L. Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom substituents on synthetic 28-homobrassinosteroid analogs. *Tetrahedron* **2000**, 56, 6171-6180.
- [77] Brosa, C.; Soca, L.; Terricabras, E.; Zamora, I. Brassinosteroids: looking for a practical solution. Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America 1996, 23, 21-26.
- [78] Brosa, C.; Soca, L.; Terricabras, E.; Ferrer, J.C.; Alsina, A. New synthetic brassinosteroids: a 5 $\alpha$ -hydroxy-6-ketone analog with strong plant growth promoting activity. *Tetrahedron* **1998**, 54, 12337-12348.
- [79] Rodríguez, C. R.; Villalobos, Y. I.; Becerra, E. A.; Coll Manchado, F.; Coll Herrera, D. and Zullo, M. A. T. Synthesis and Biological Activity of Three New 5 $\alpha$ -Hydroxy Spirostanic Brassinosteroid Analogues. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 466-469.
- [80] Coll, F.; Jomarrón, I.; Robaina, C.; Alonso, E.; Cabrera, M. T. (1995). Polyhydroxyspirostanones as plant growth regulators. PCT Int. Appl. W09713, 780.
- [81] Dago, A.; Pomés, R.; Coll, F.; Hechavarría, M.; Punte, G.; Echevarría, G. (25 R)-5 $\beta$ -hydroxyspirost-2-en-6-one. *Acta Crystallographica* **1997**, 53, 1705-1706.
- [82] Hechavarría, M. (1998). Synthesis, characterization and biological activity of steroidal trihydroxyketones. M. Sc. Thesis, University of Havana, Havana, 62 pp.
- [83] Jomarrón, I. (1995). Synthesis of bioactive spirostanones and spirostanlactones. Ph. D. Thesis. University of Havana, Havana, 120 pp.
- [84] Robaina, C.; Izquierdo, Y.; Alonso, E.; Coll, F. 1999. Síntesis, caracterización y actividad biológica de análogos espiroestánicos de brasinoesteroides 5 $\alpha$ -hidroxilados.

Resúmenes 2do Taller de Química de los Productos Naturales, Centro de Química Farmacéutica, Ciudad de la Habana, pp 3.

[85] <https://ionachile.cl/products/b-2000-regulador-de-crecimiento-vegetal-uva-calidad-rendimiento>

[86] Romero-Ávila, M.; de Dios-Bravo, G.; Mendez-Stivalet, J. M.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M. A. Synthesis and biological activity of furostanic analogues of brassinosteroids bearing the 5 $\beta$ -hydroxy-6-oxo moiety. *Steroids* **2007**, 72, 955-959.

[87] Rosado-Abón, A.; de 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.

[88] Rosado-Abón, A.; de Dios-Bravo, G.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga M. A. Synthesis and plant growth promoting activity of dinorcholanic lactones bearing the 5 $\alpha$ -hydroxy-6-oxo moiety. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **2013**, 134, 45-50.

[89] Rivera, D. G.; Coll, F.; León, F. Synthesis of pregnane ketols as metabolic precursors of analogues of plant growth regulators. *Journal of Chemical Research* **2004**, 284-285.

[90] Rivera, D. G.; Coll, F.; Synthesis and preliminary bioactivity evaluation of new pregnane brassinosteroid-like compounds. *Canadian Journal of Chemistry* **2005**, 83, 1084-1092.

[91] Ferrer-Pertuz, K.; Espinoza, L.; and Mella, J. Insights into the Structural Requirements of Potent Brassinosteroids as Vegetable Growth Promoters Using Second-Internode Elongation as Biological Activity: CoMFA and CoMSIA Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2734.

[92] 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.

[93] She, J.; Han, Z.; Kim, T.-W.; Wang, J.; Cheng, W.; Chang, J.; Shi, S.; Wang, J.; Yang, M.; Wang, Z.-Y.; et al. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* **2011**, 474, 472-476.

[94] Sun, Y.; Han, Z.; Tang, J., Hu, Z.; Chai, C., Zhou, B.; and Chai, J. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell Research* **2013**, 23, 1326-1329.

[95] Vert, G.; Nemhauser, J. L.; Geldner, N.; Hong, F. & Chory, J. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, 21, 177-201.

[96] 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.

[97] Fernholz, E. *Liebigs Ann. Cherm.* Über die Konstitution des Stigmasterins **1933**, 507, 128-138.

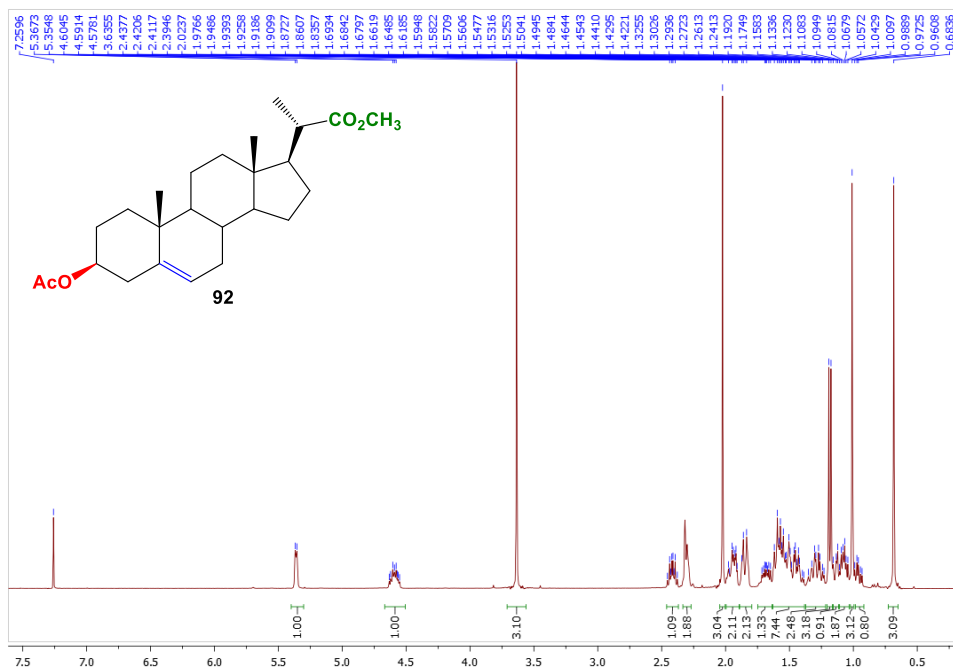
- [98] Ramos-Enríquez, M. A.; Rárová, L.; Iglesias-Arteaga, M. A. Synthesis of dimeric spirostanols linked through a 1,4-dimethylidenebenzene moiety by double  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -catalyzed aldol condensation of steroid sapogenins and terephthalaldehyde. *Steroids* **2018**, 140, 58-61.
- [99] Hunter, A. C.; Priest, S-M. An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3,6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3 $\beta$ -ols using a modified Jones oxidation methodology. *Steroids* **2006**, 71, 30-31.
- [100] Marker, R. E.; Jones, E. M.; Turner, D. L. Sterols. CII. Chlorogenin. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2537-2540.
- [101] Fernández Pacheco, D.; González Ceballos, L.; Zaldo Castro, A.; Conde González, M. R.; González de la Torre, L.; Pérez Rostgaard, L.; Espinoza, L.; Díaz, K.; Olea, A. F.; 4 and Coll García, Y. Synthesis of New Steroidal Carbamates with Plant-Growth-Promoting Activity: Theoretical and Experimental Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 2330.
- [102] Rosado-Abón, A.; Romero-Ávila, M.; Iglesias-Arteaga, M. A. A rapid and simple one-pot procedure for the synthesis of 3 $\beta$ -acetoxy-5 $\alpha$ -hydroxy-6-oxo steroids. *Arkivoc* **2010** (x) 110-115.
- [103] 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.
- [104] Wada, K.; Marumo, S.; Abe, H.; Morishita, T.; Nakamura, K.; Uchiyama, M.; Mori, M. A Rice Lamina Inclination Test A Microquantitative Bioassay for Brassinosteroids. *Agricultural and Biological Chemistry* **1984**, 48, 719-726.
- [105] Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrín, 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.
- [106] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg; NMR Chemical Shift of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, 29, 9, 2176-2179.
- [107] li, H.-Y.; Wang, H.-M.; Jang, S. Rice Lamina Joint Inclination Assay, *Bio-protocol*, **2017**, 7, (14).
- [108] 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.
- [109] Antonchick, A. P.; Schneider, B.; Zhabinskii, V. N.; Khripach, V. A. Synthesis of [26,27- $^2\text{H}_6$ ]brassinosteroids from 23,24-bisnorcholenic acid methyl ester. *Steroids* **2004**, 69, 617-628.

## ANEXO 1

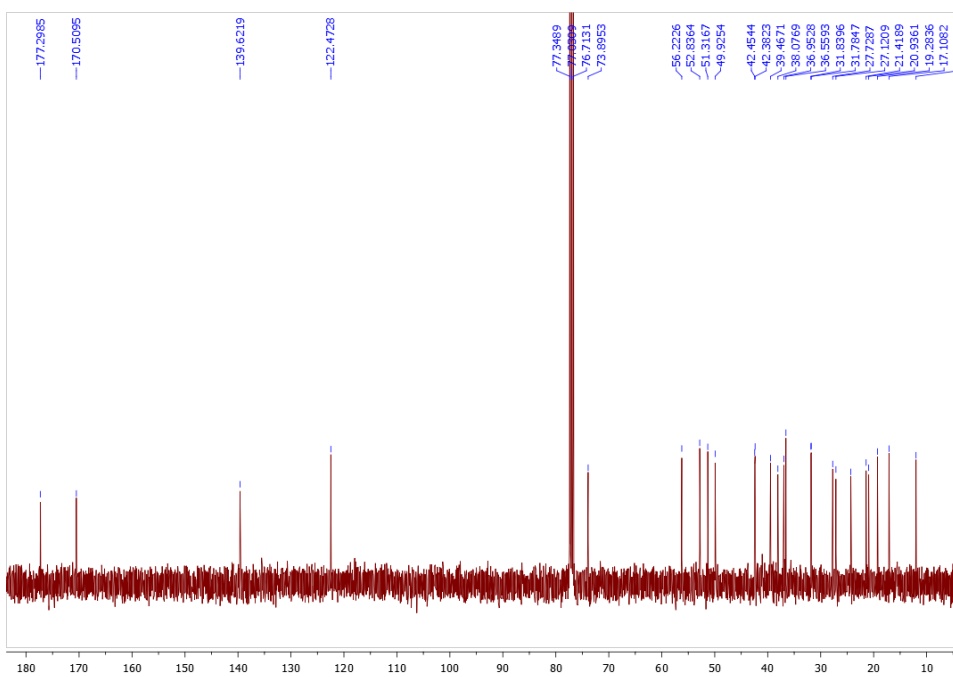
Espectros de RMN para los compuestos **92-99**.

(20*S*)-3β-acetoxipregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (**92**).

Espectro de <sup>1</sup>H RMN

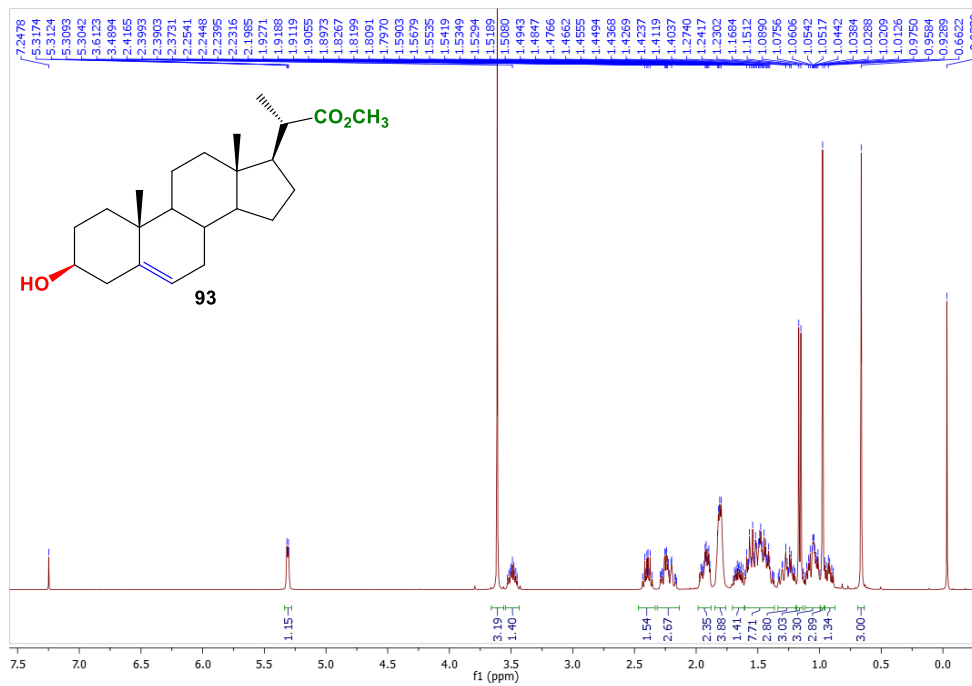


Espectro de <sup>13</sup>C RMN

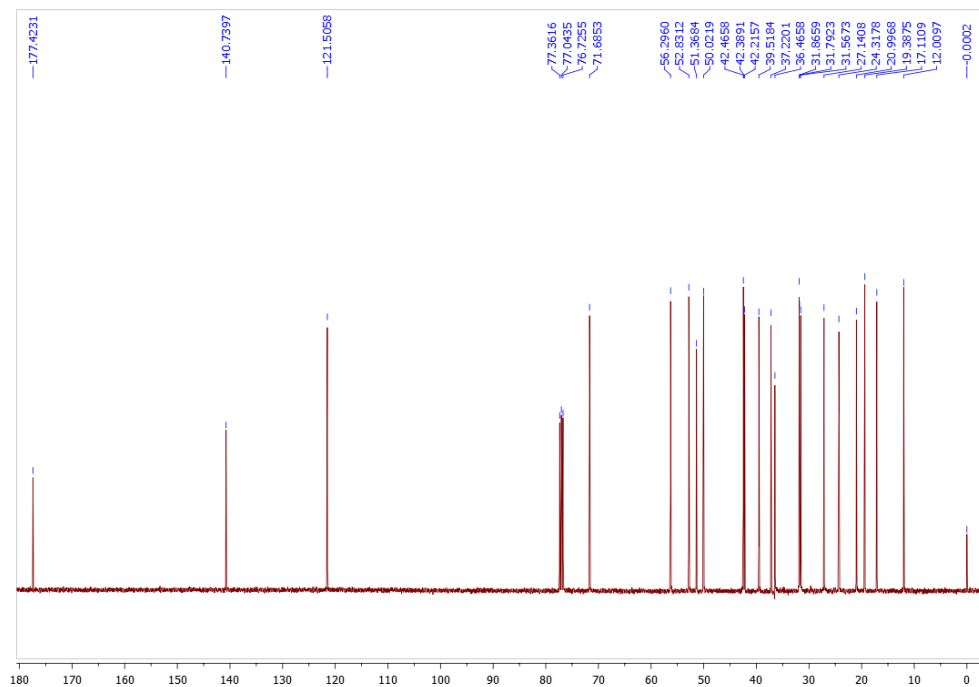


(2*S*)-3β-hidroxipregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (**93**)

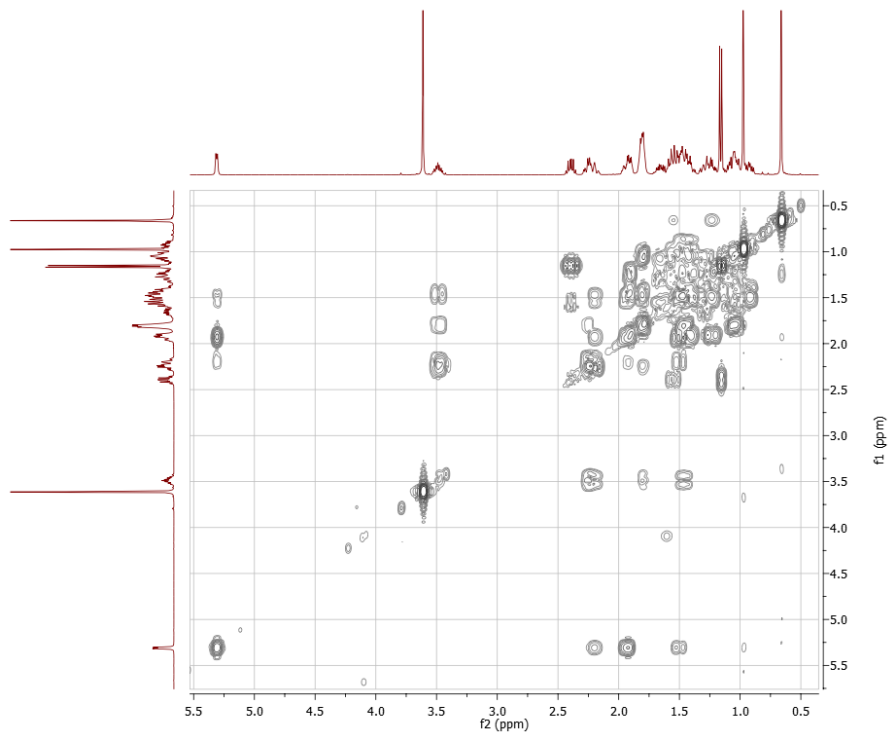
Espectro de <sup>1</sup>H RMN



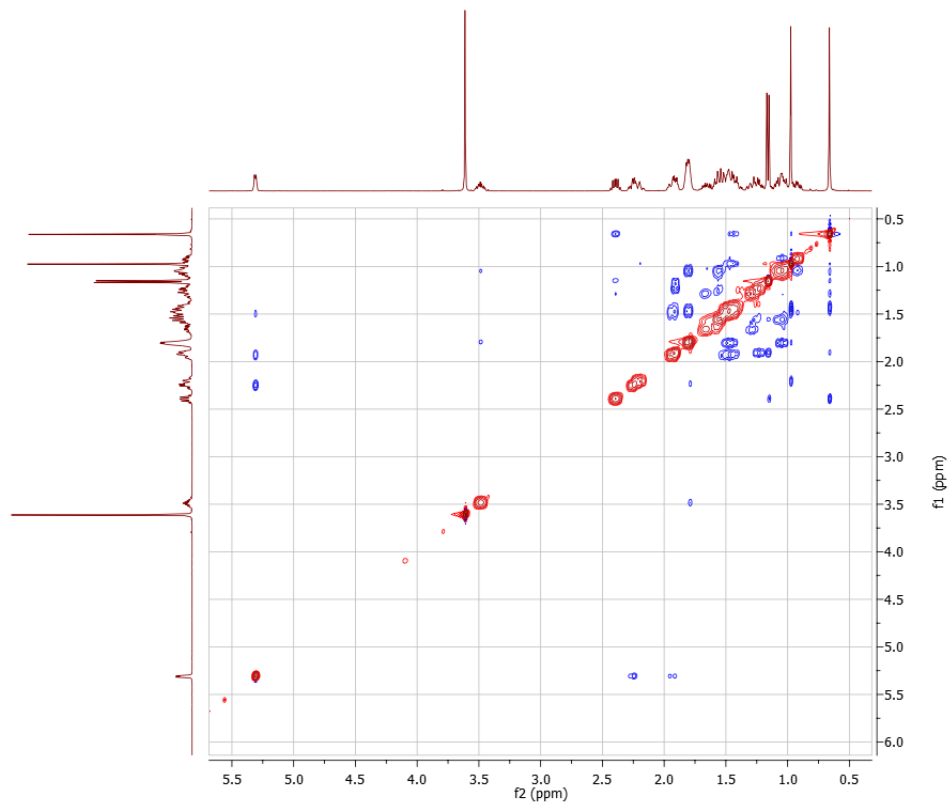
Espectro de <sup>13</sup>C RMN



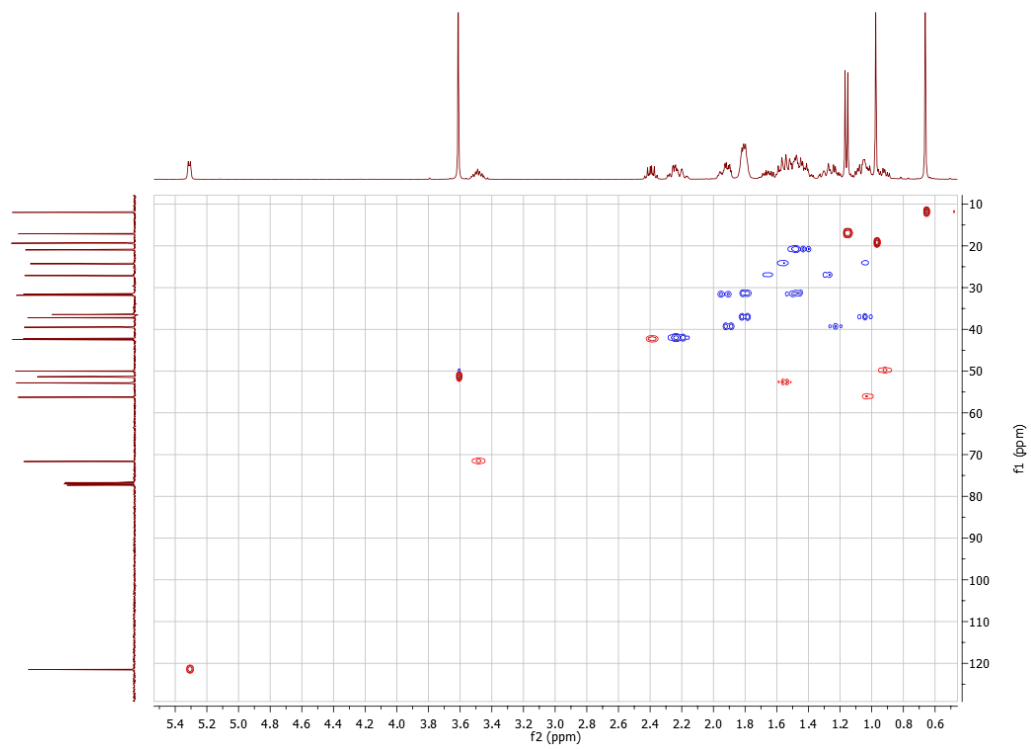
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY



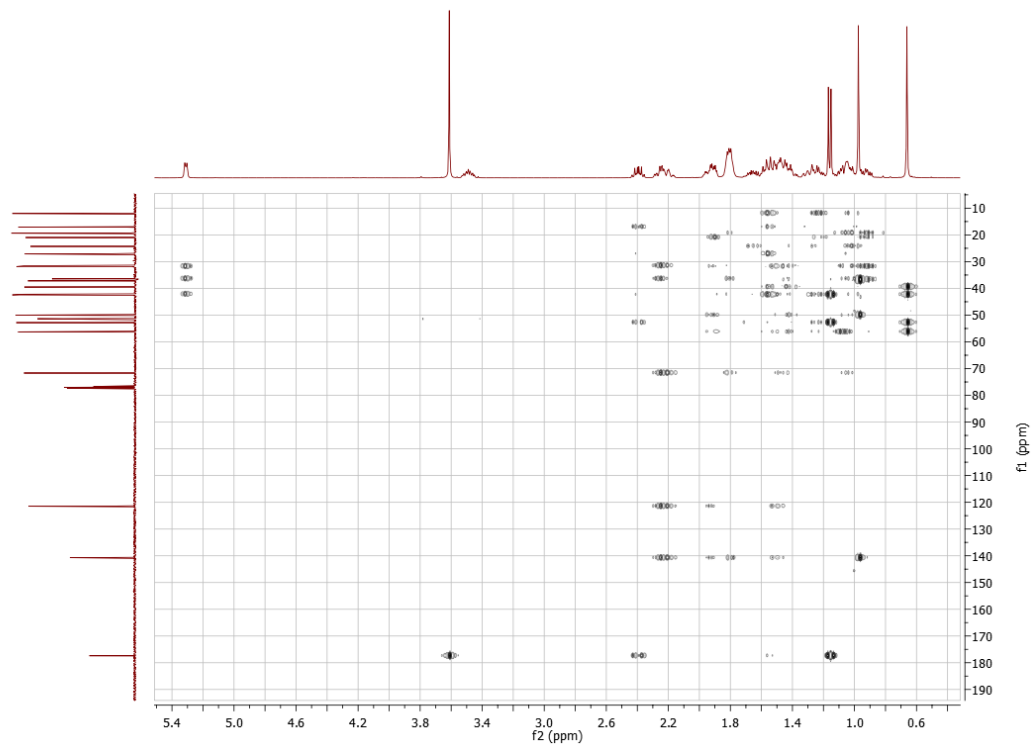
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY



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

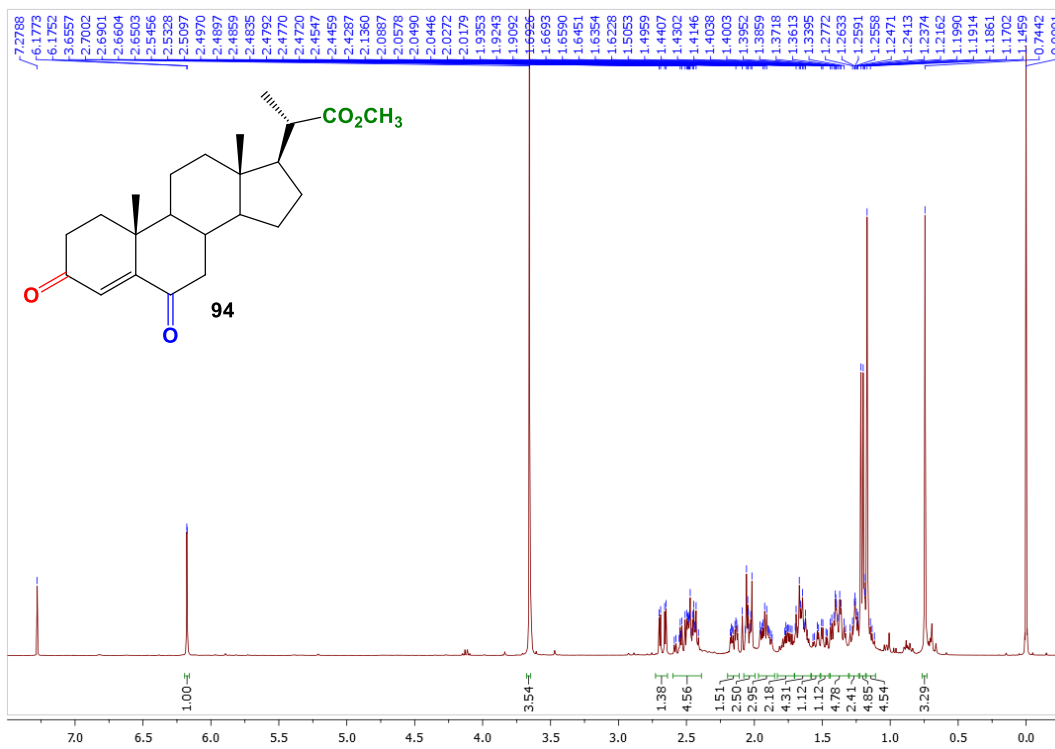


Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

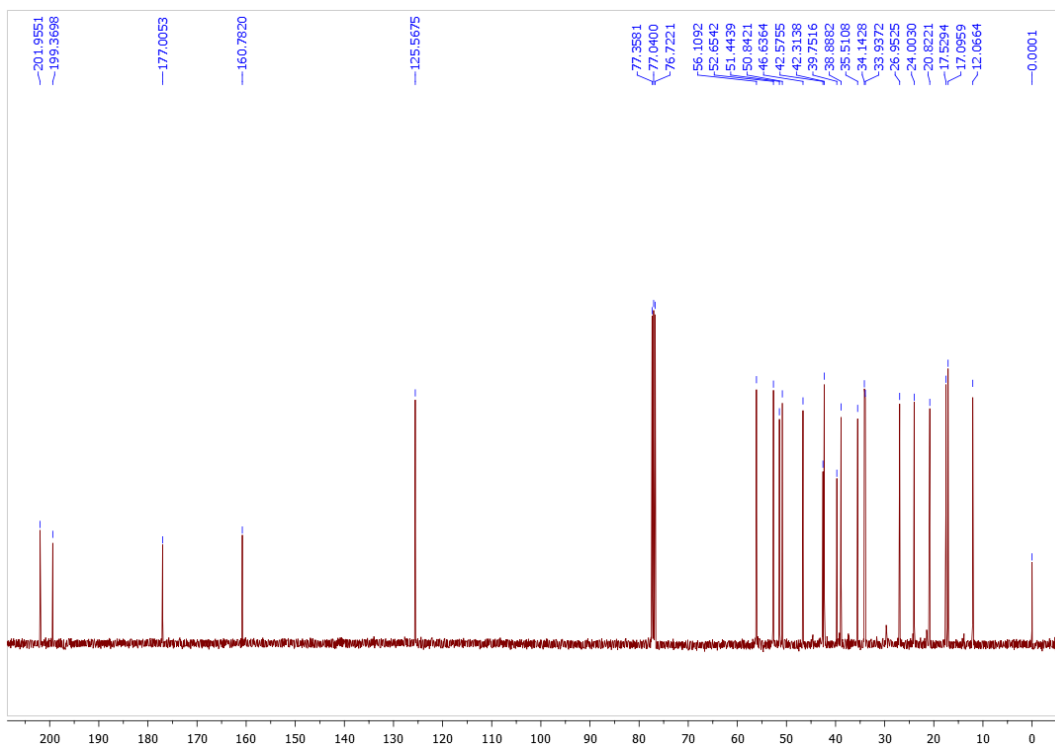


(20S)-3,6-dioxopregn-4-eno-20-carboxilato de metilo (**94**)

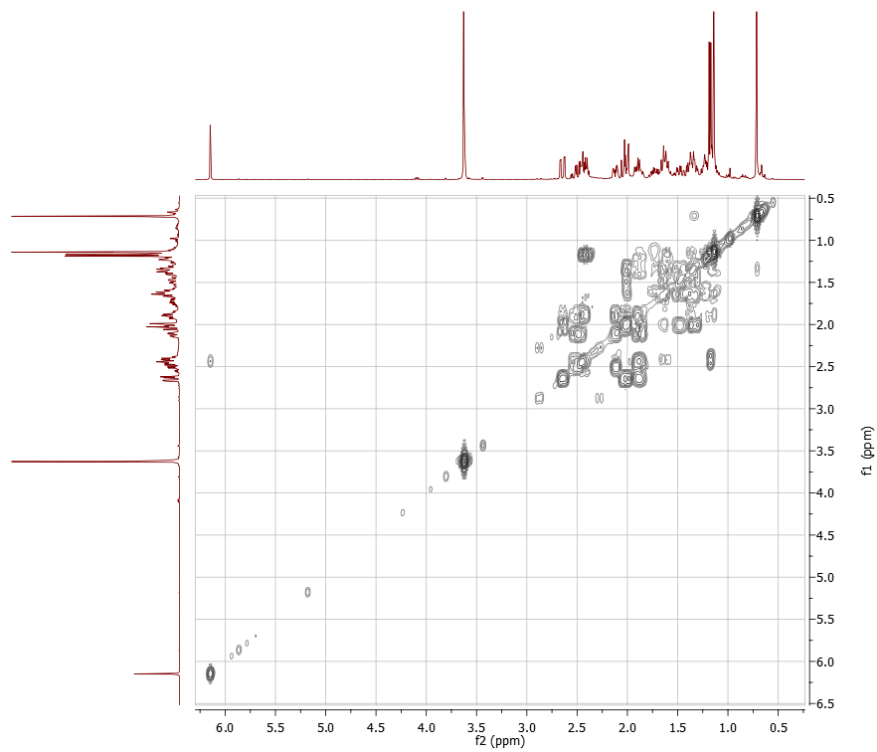
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN



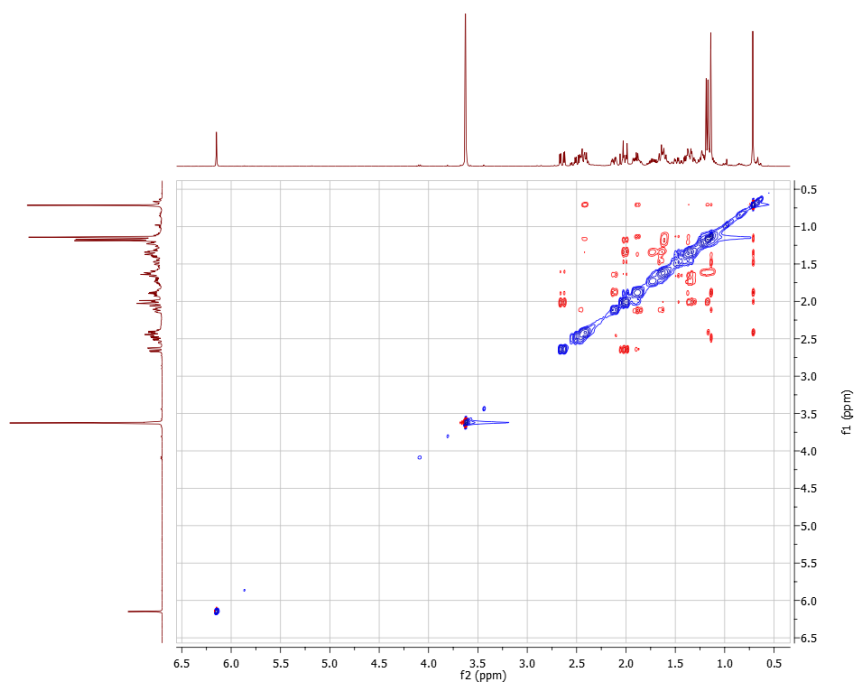
Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN



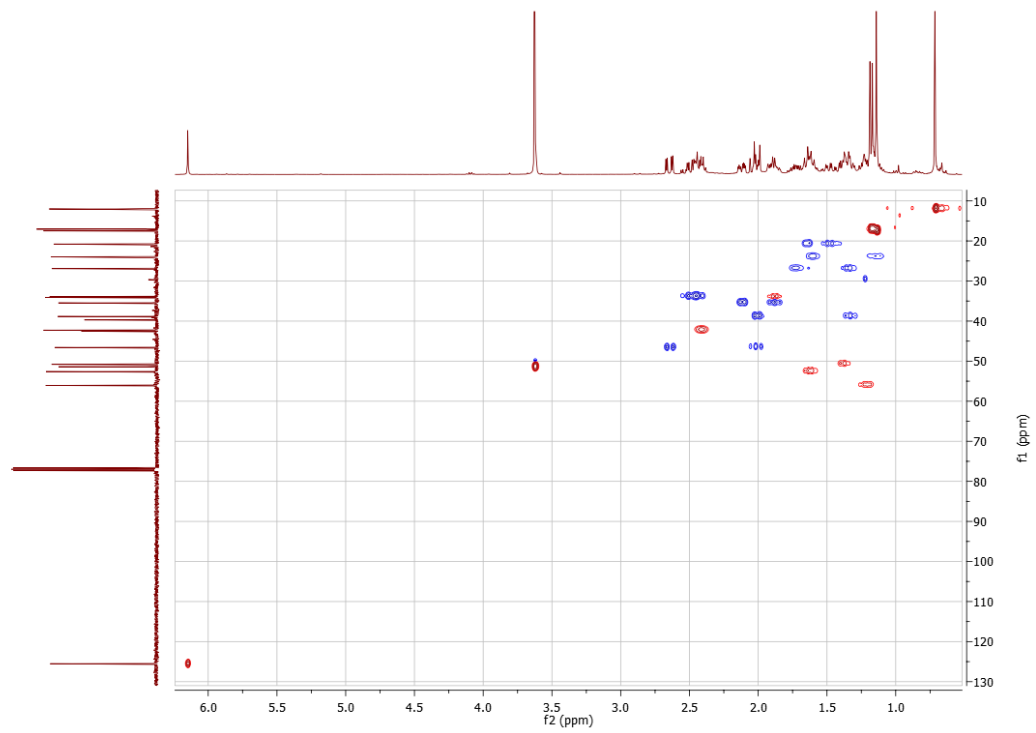
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY



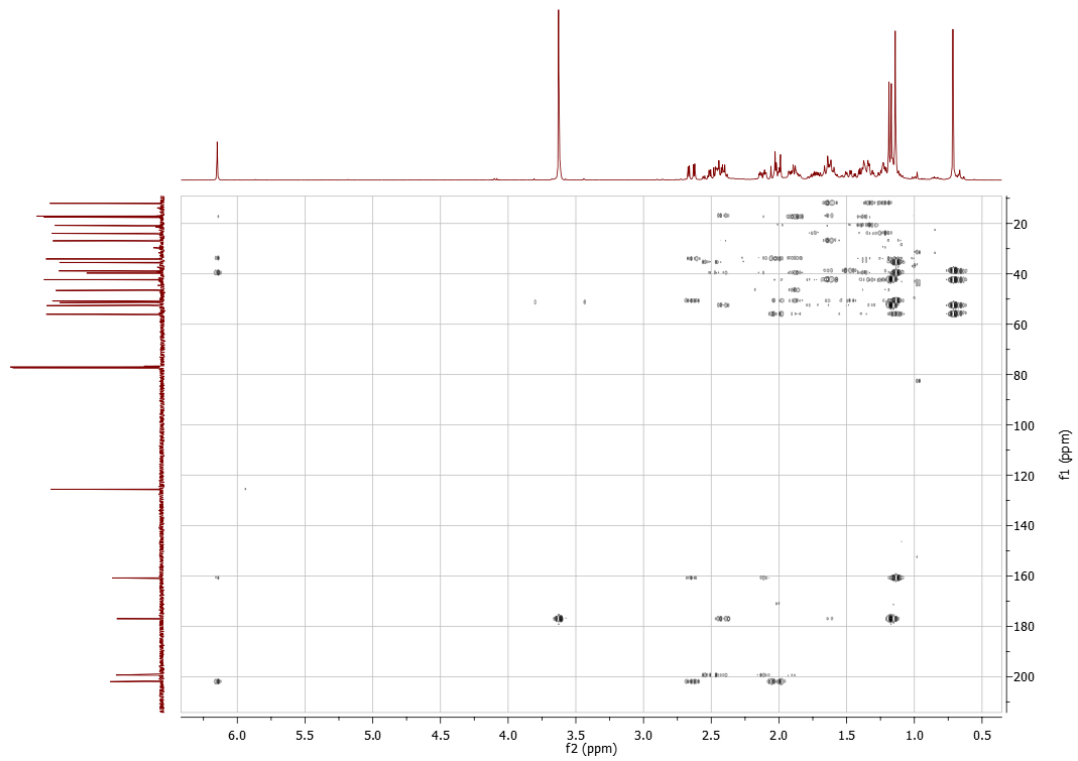
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY



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

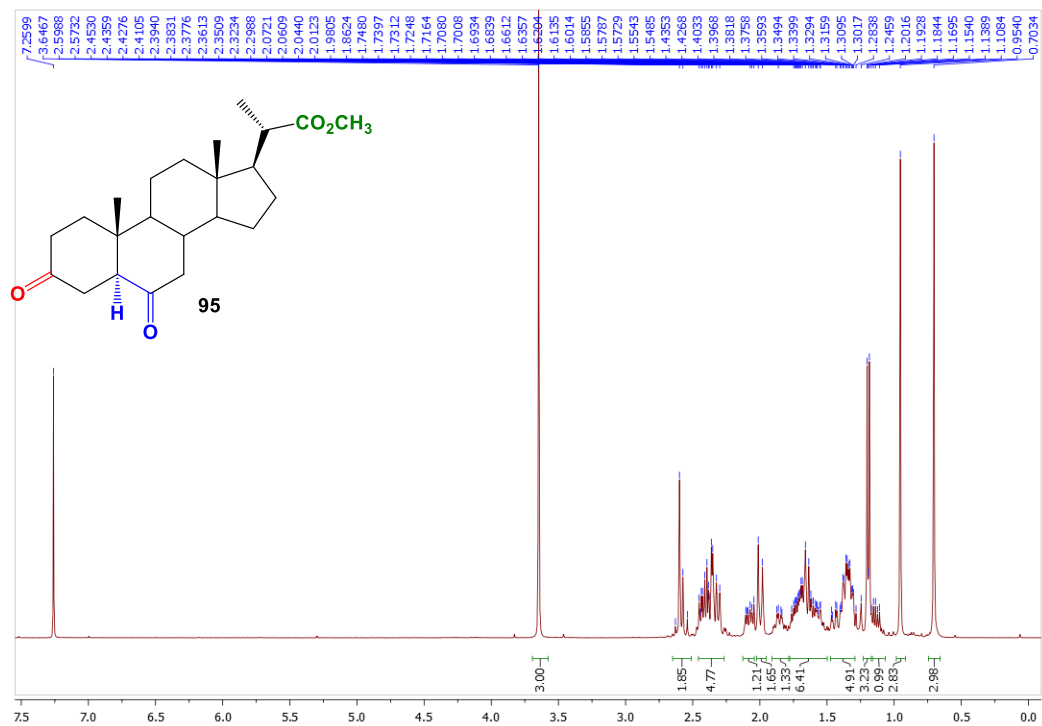


Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

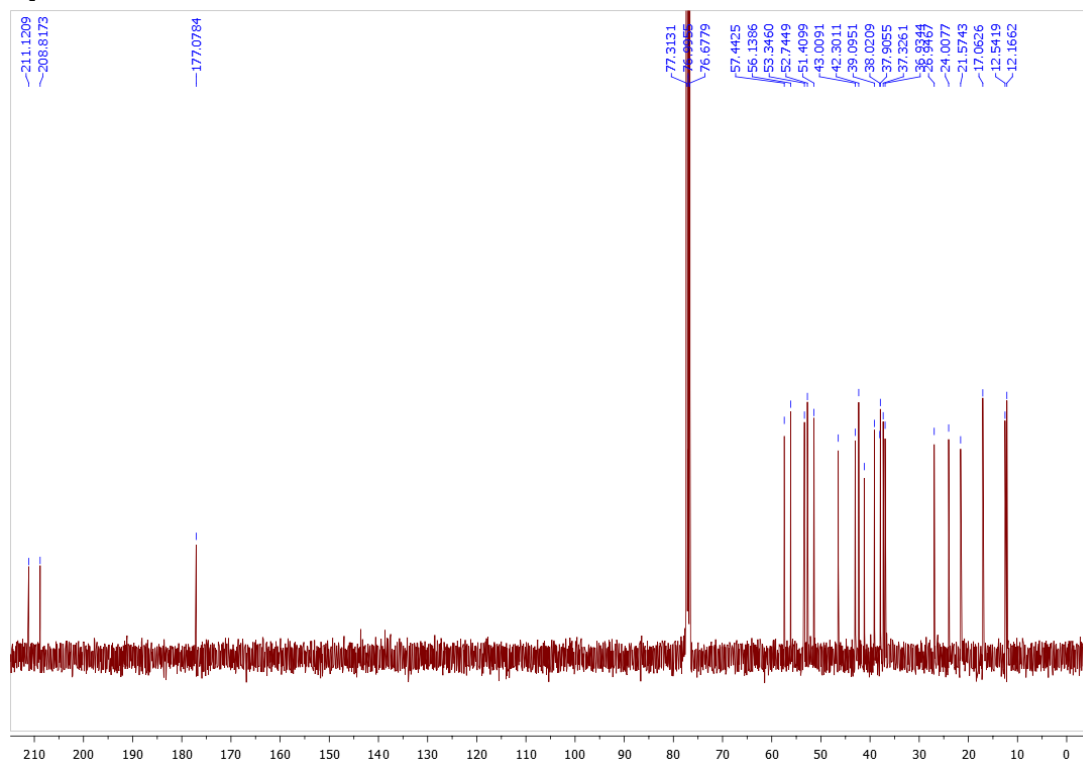


(20S)-3,6-dioxo-5 $\alpha$ -pregnano-20-carboxilato de metilo (**95**)

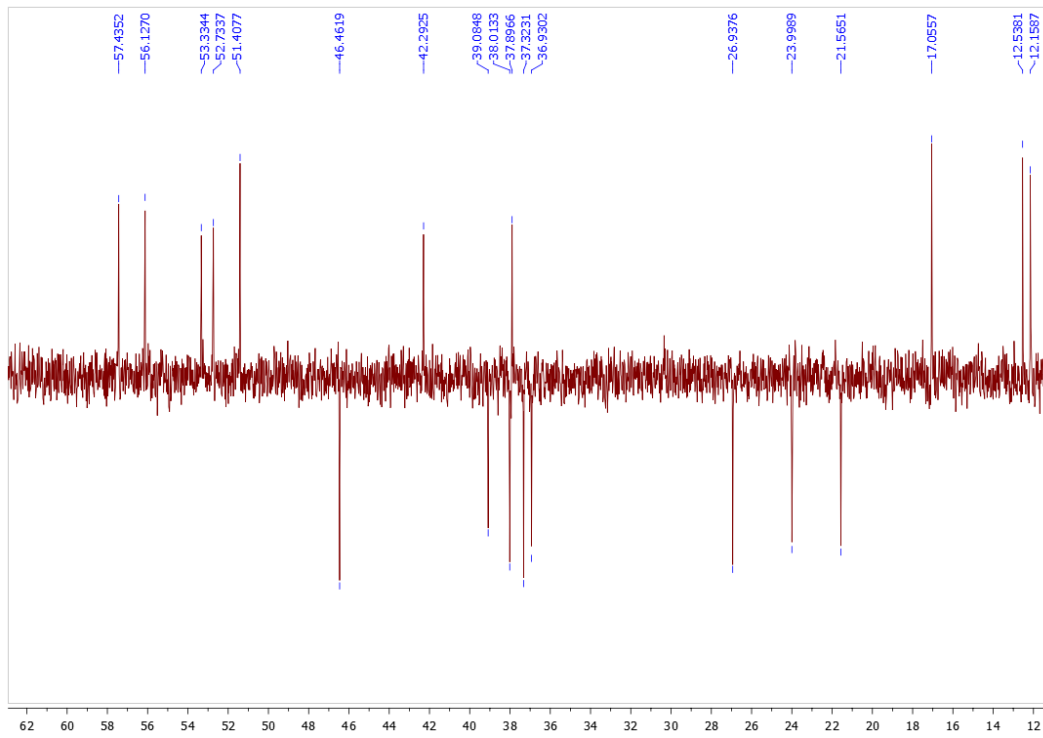
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN



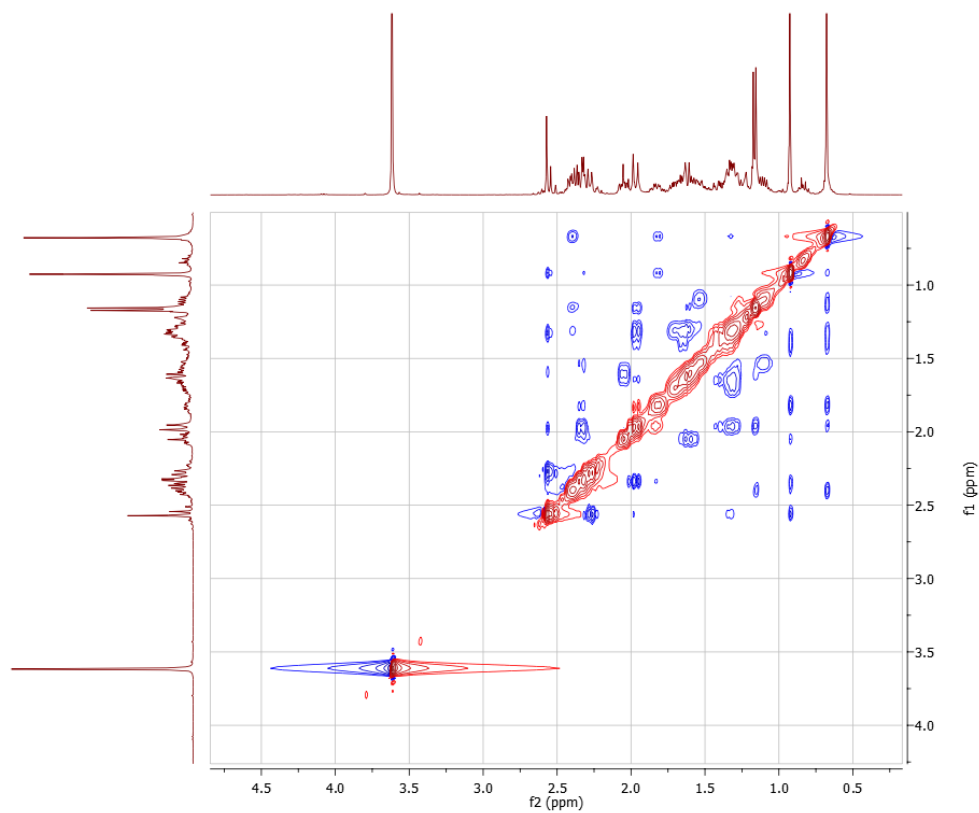
Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN



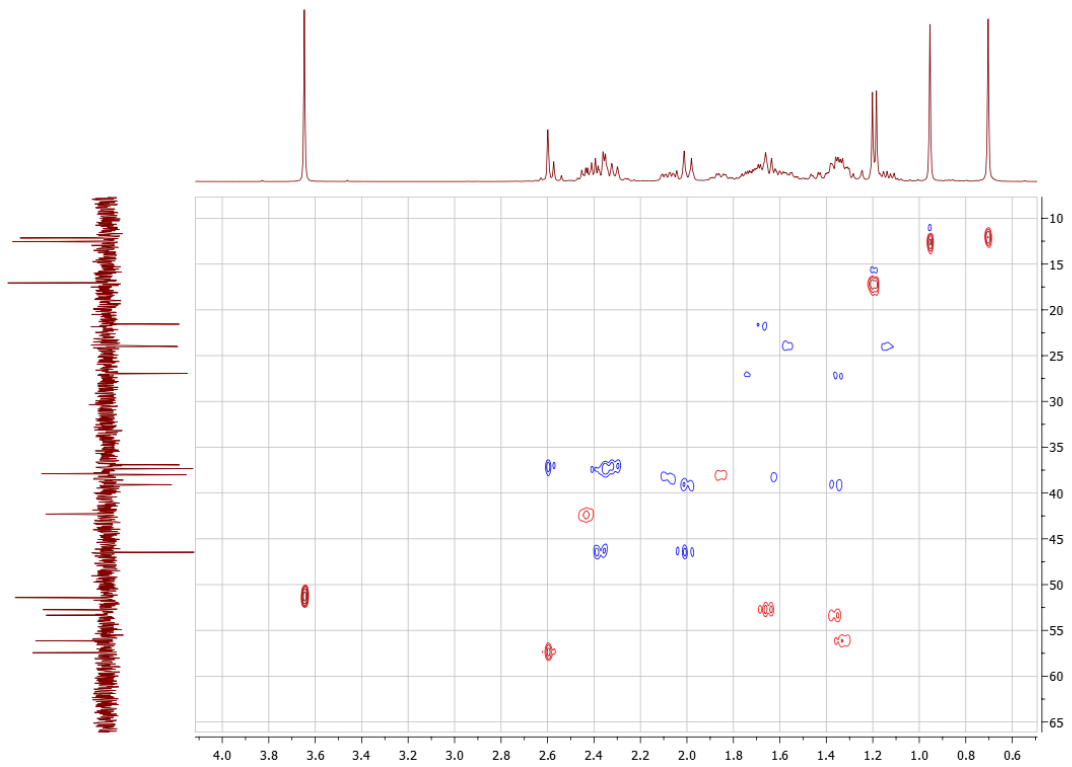
Espectro  $^{13}\text{C}$  DEPT-135



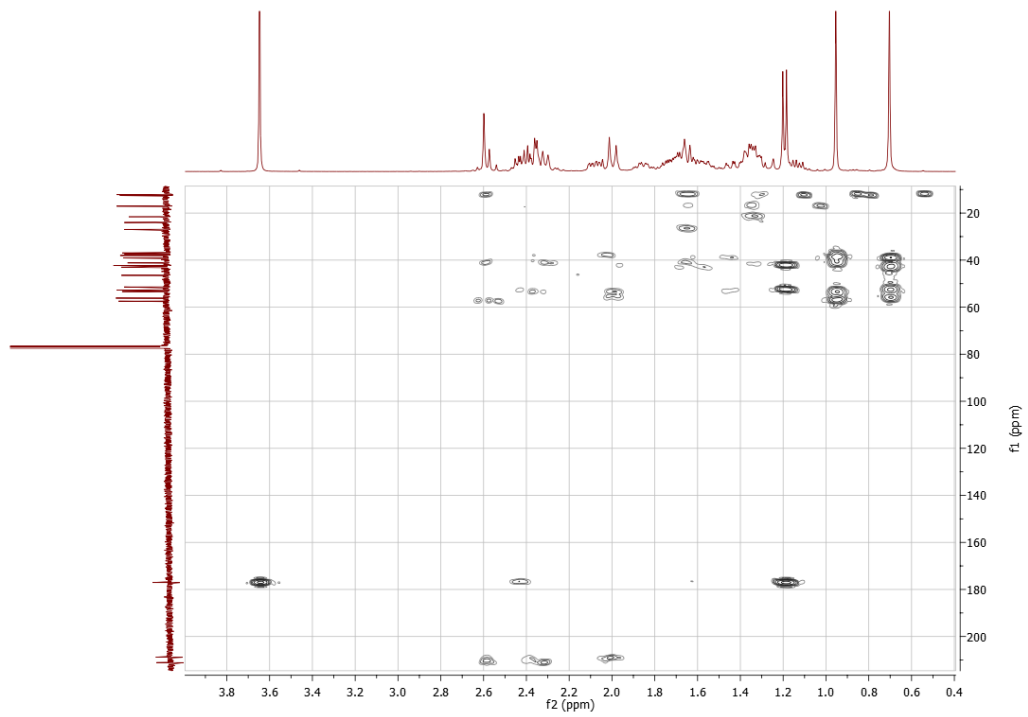
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY



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

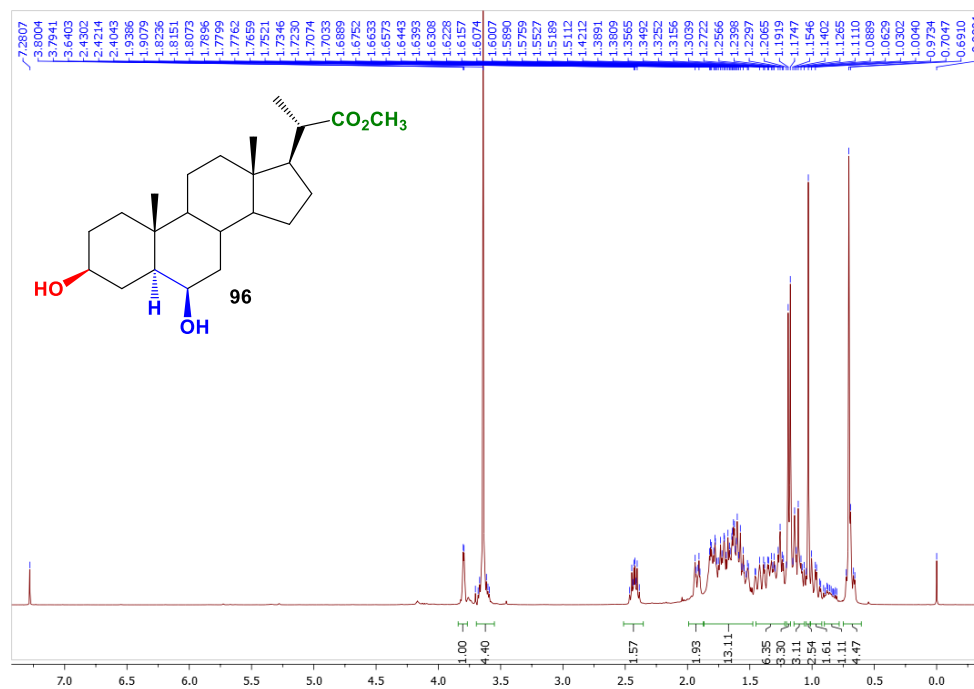


Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

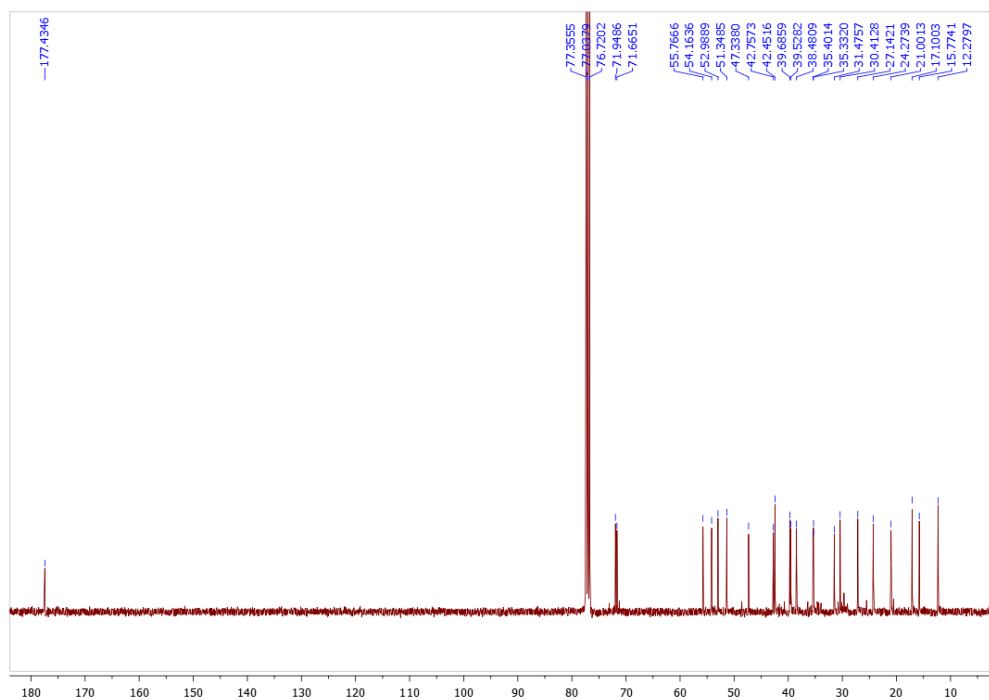


(20*S*)-3β,6β-dihidroxi-5α-pregnano-20-carboxilato de metilo (**96**)

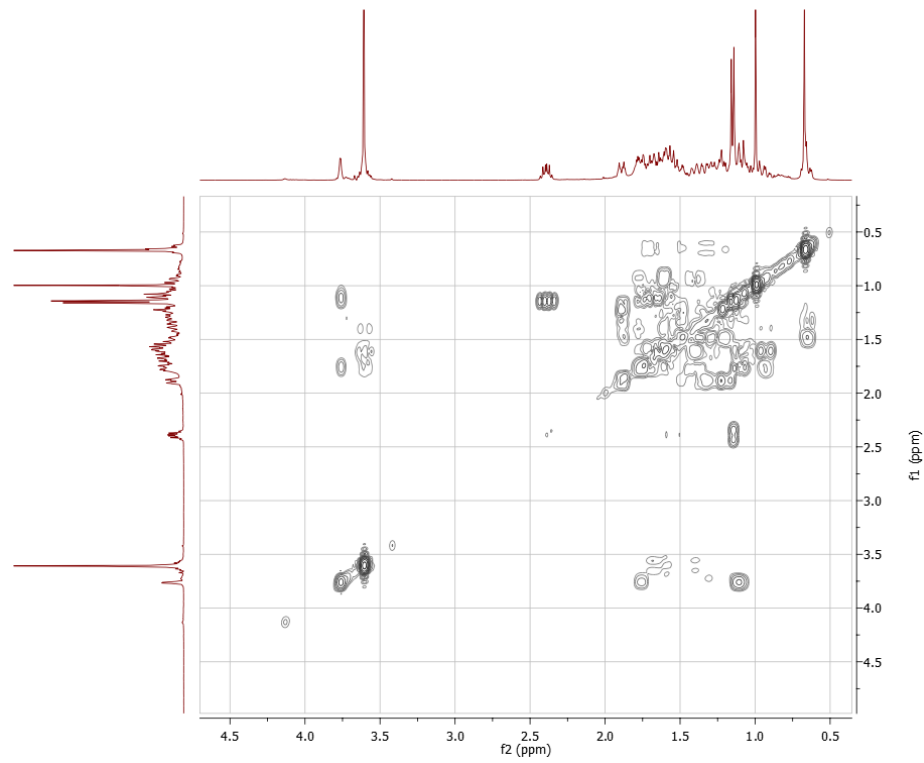
Espectro de <sup>1</sup>H RMN



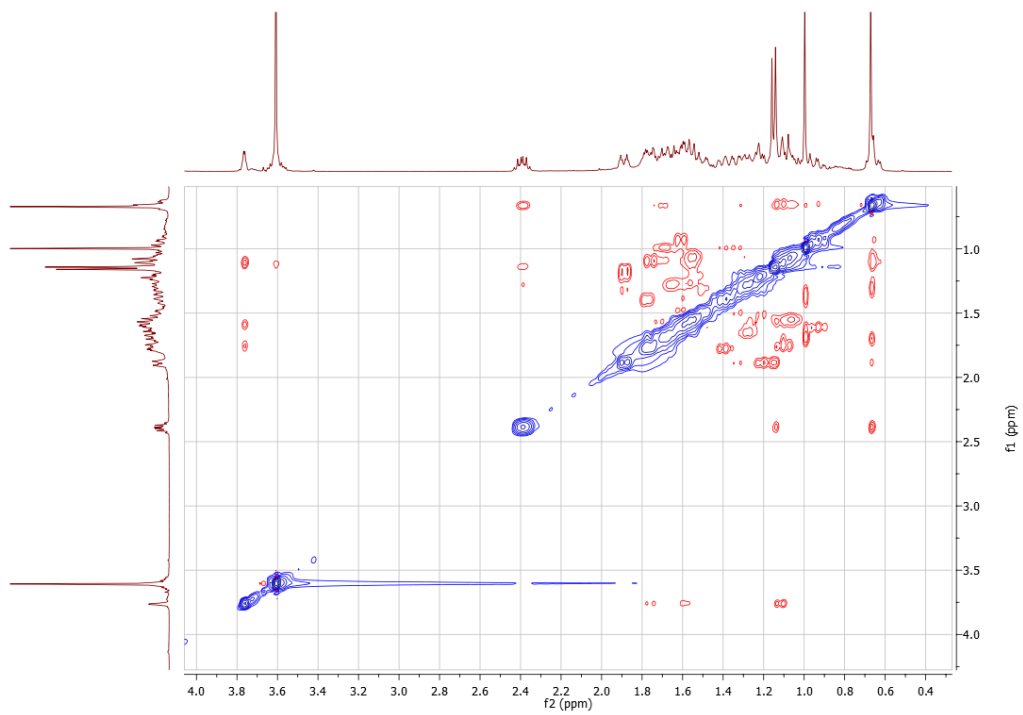
Espectro de <sup>13</sup>C RMN



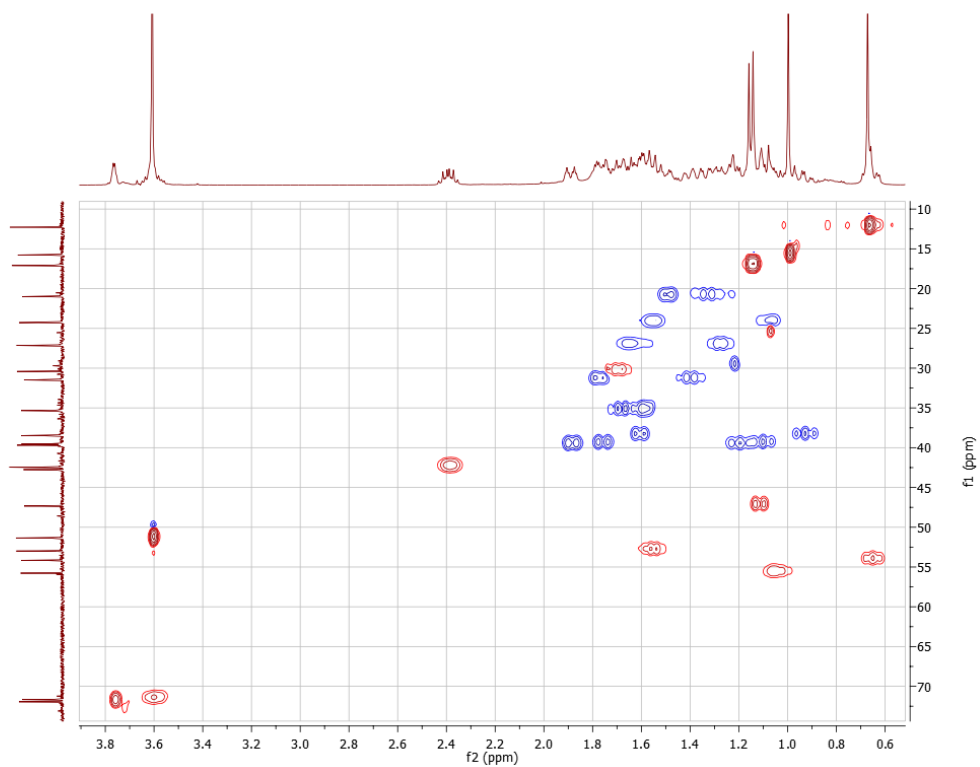
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY



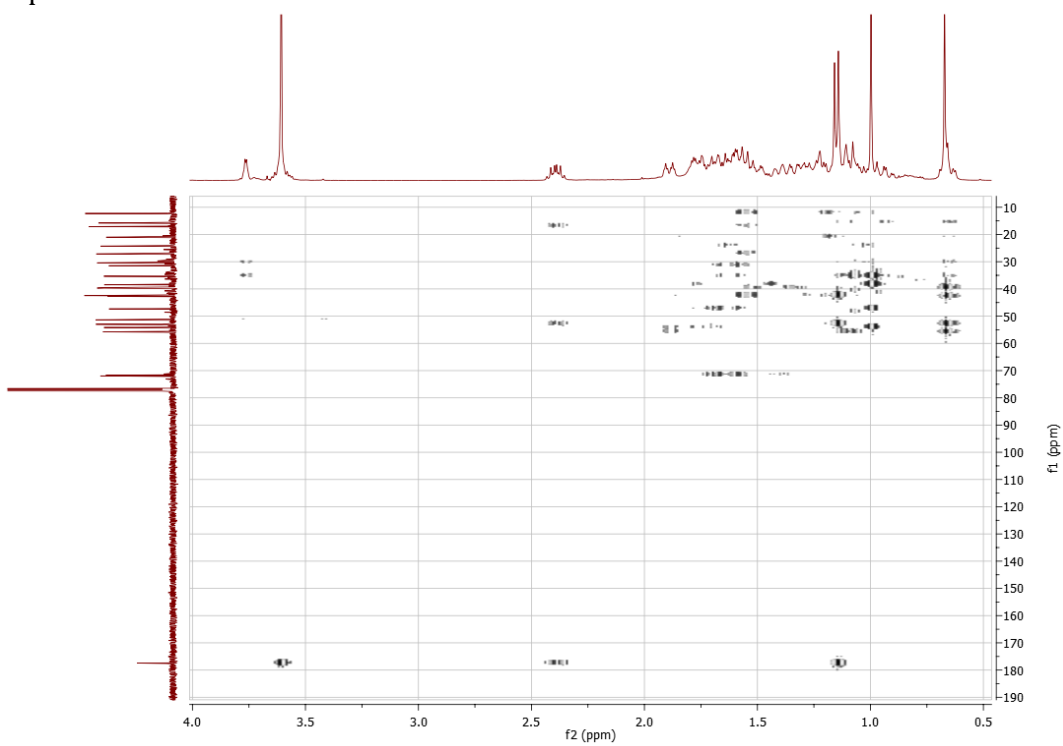
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY



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

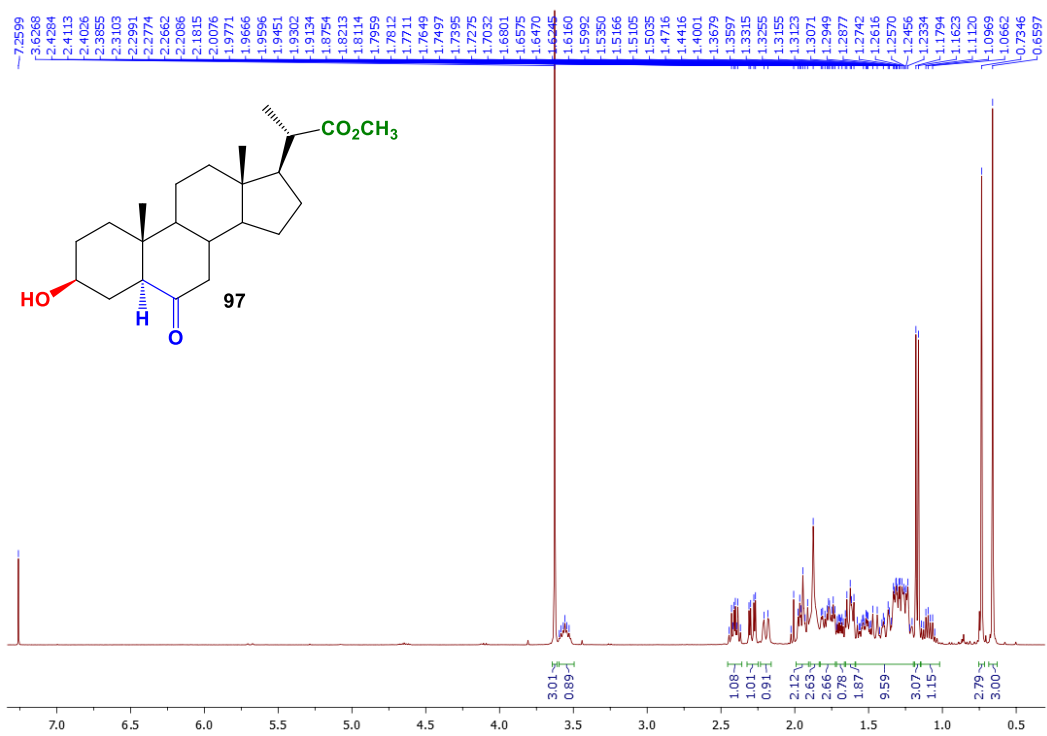


Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

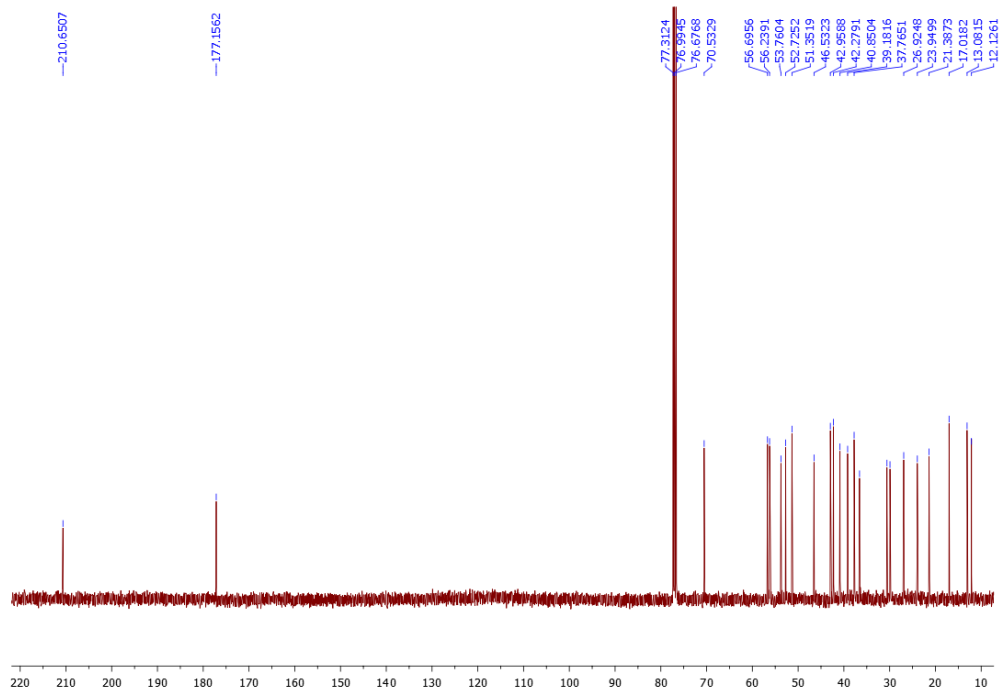


(20S)-3β-hidroxi-6-oxo-5α-pregnano-20-carboxilato de metilo (**97**)

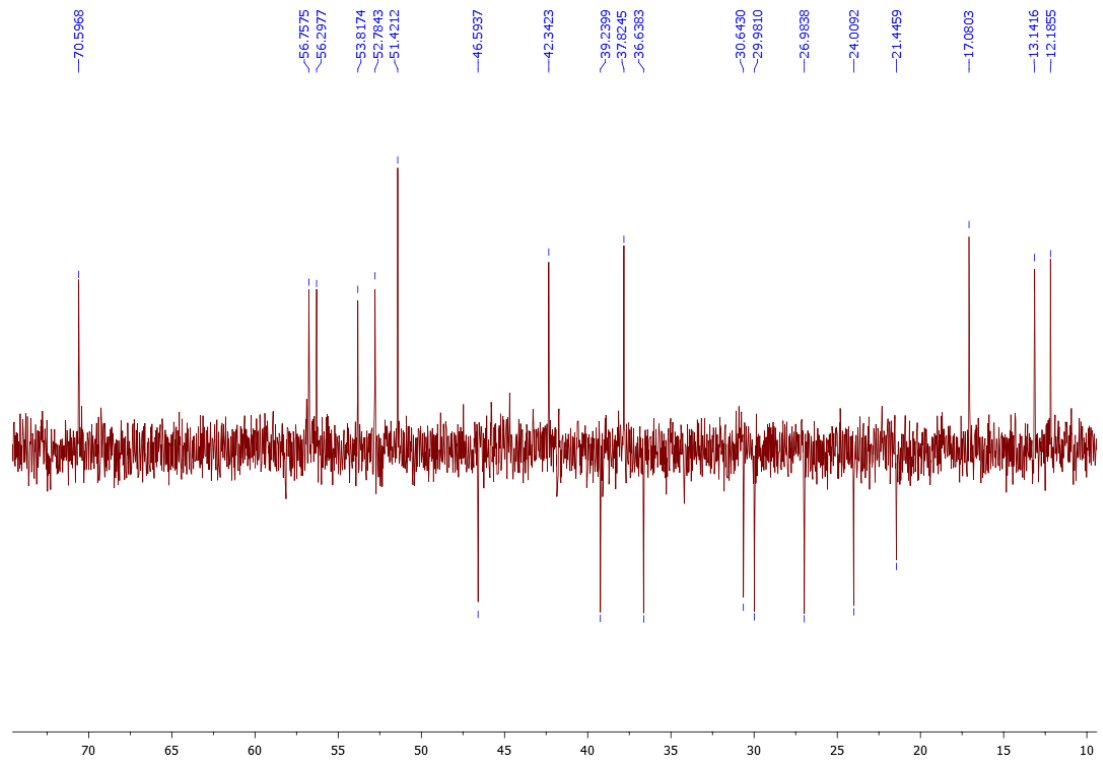
Espectro de <sup>1</sup>H RMN



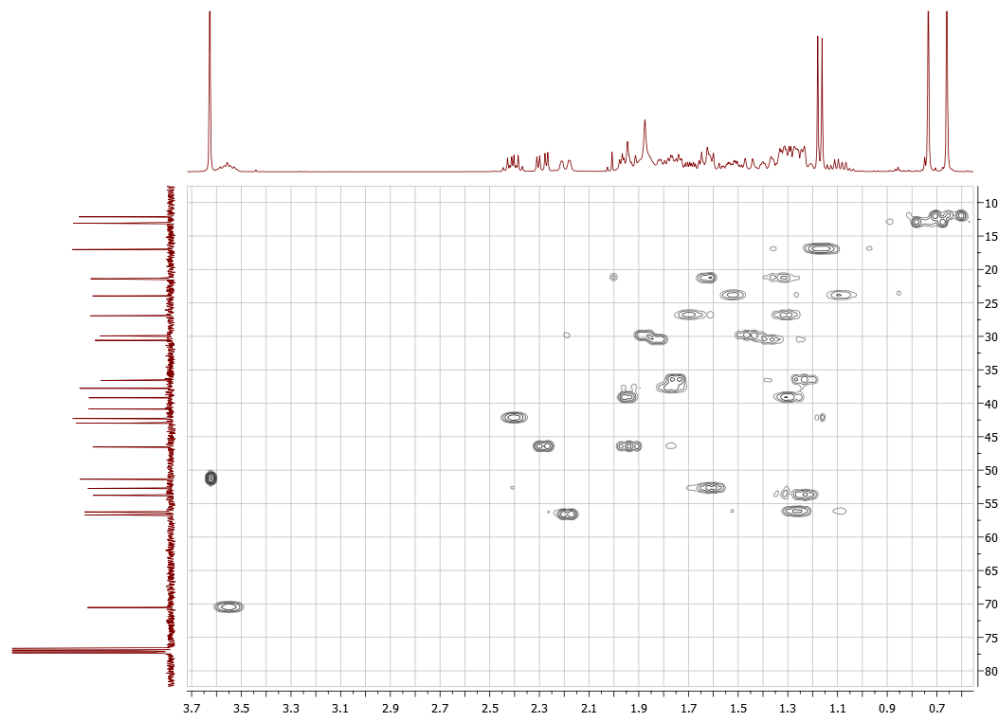
Espectro de <sup>13</sup>C RMN



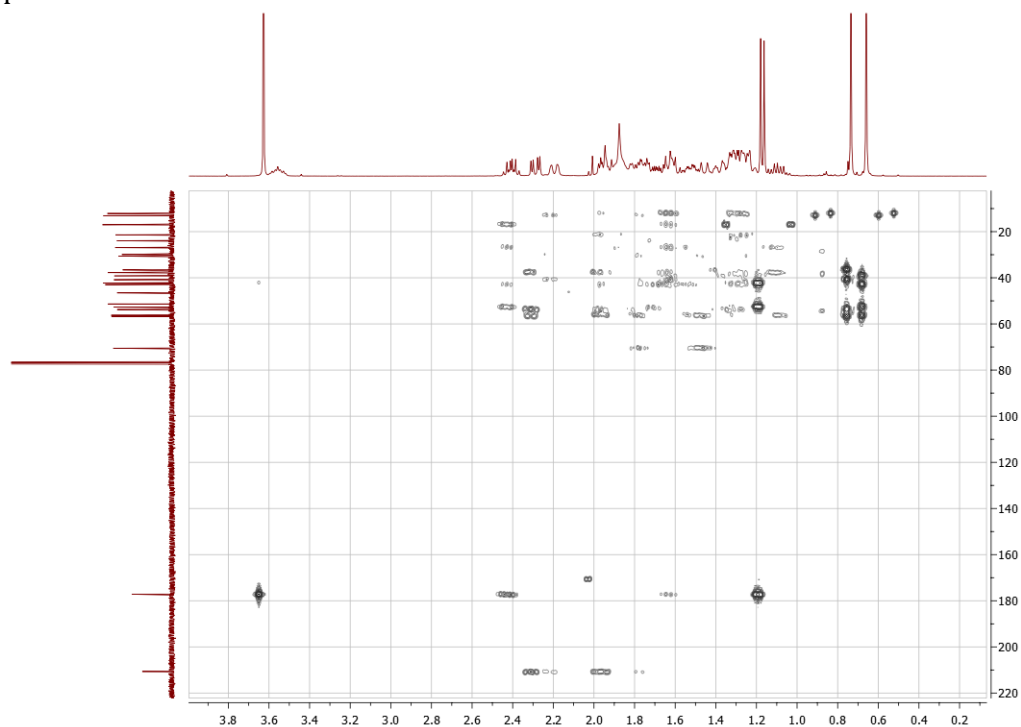
Espectro  $^{13}\text{C}$ -DEPT-135



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

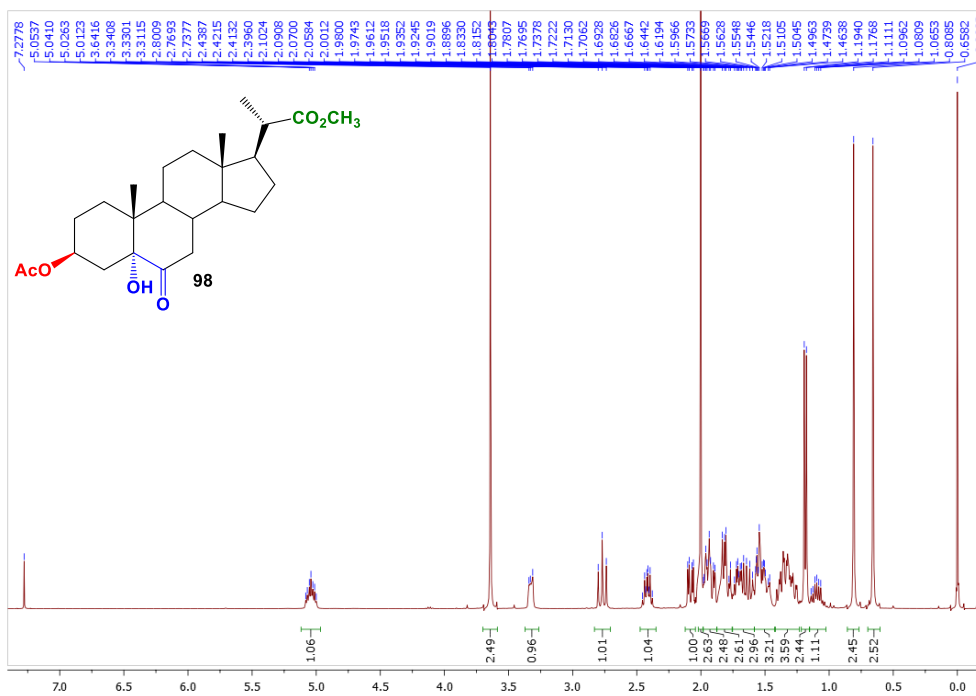


Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

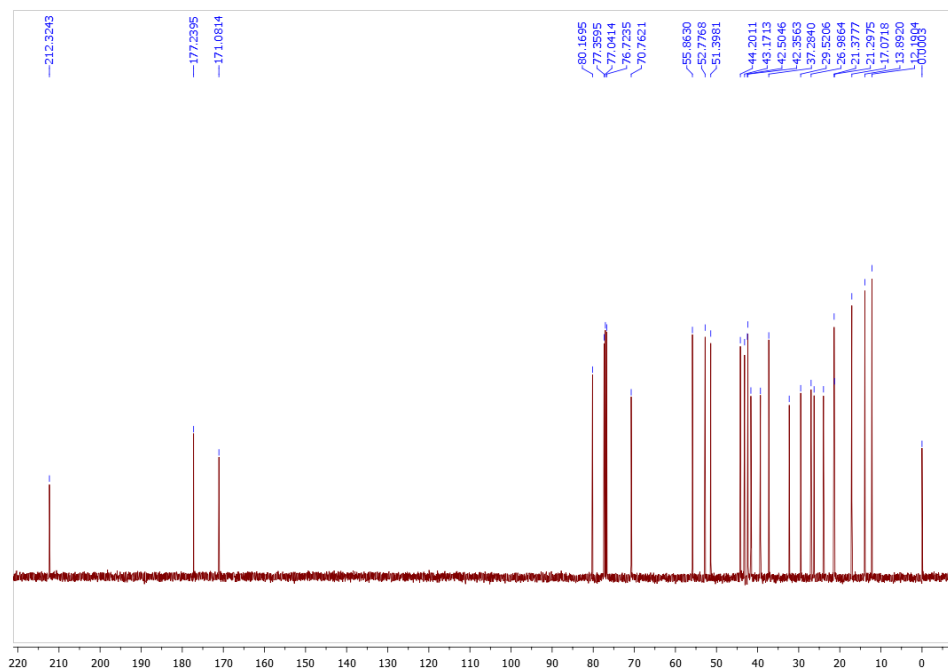


(20S)-3 $\beta$ -acetoxi-6-oxo-5 $\alpha$ -hidroxy-pregnano-20-carboxilato de metilo (**98**)

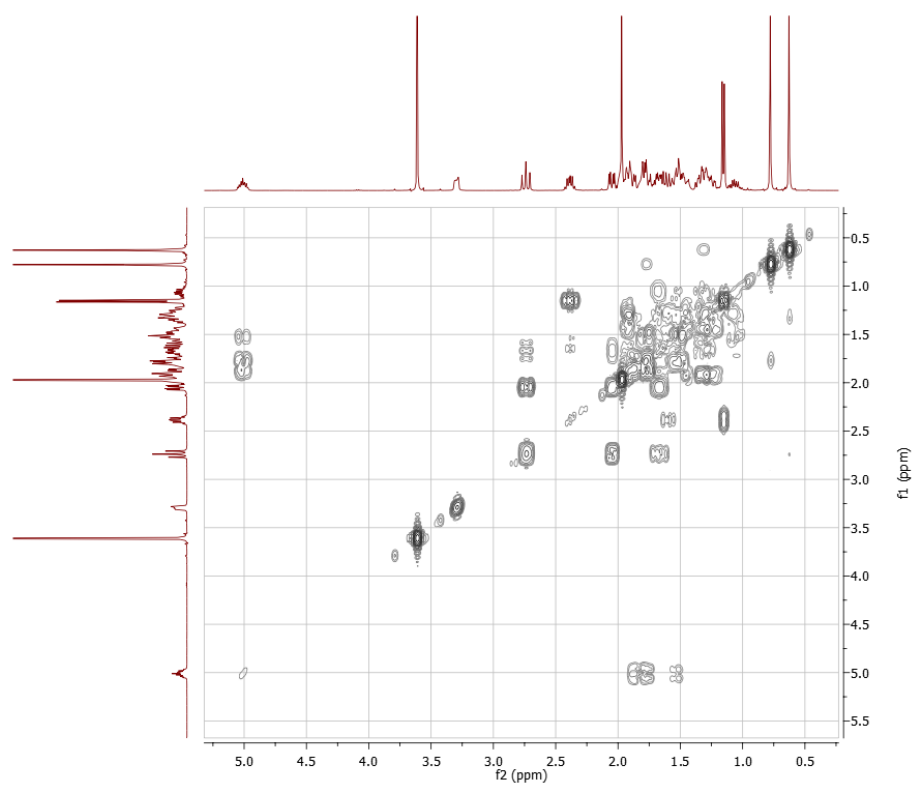
$^1\text{H}$  RMN



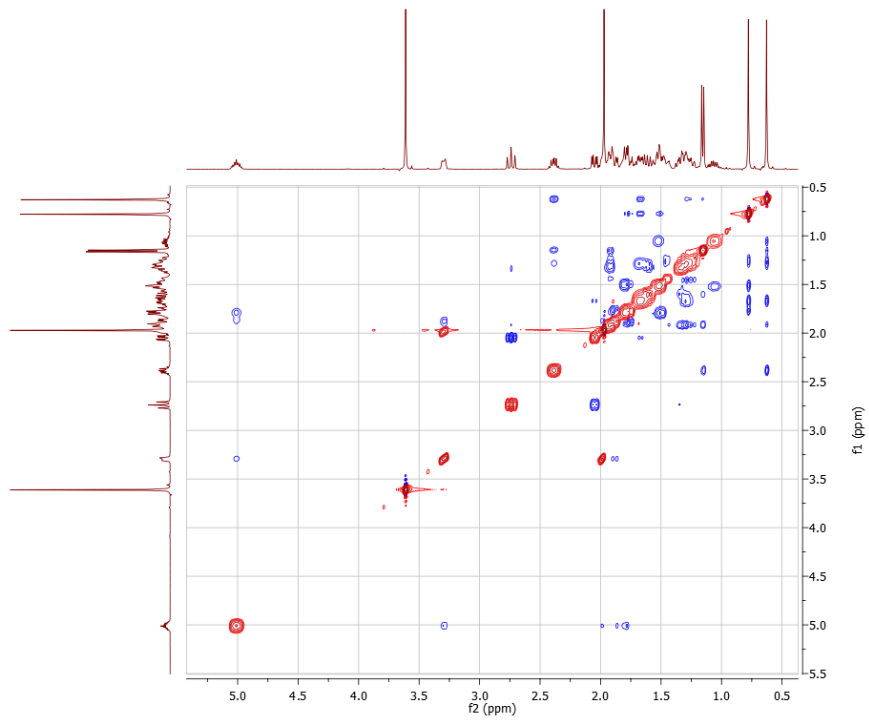
Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN



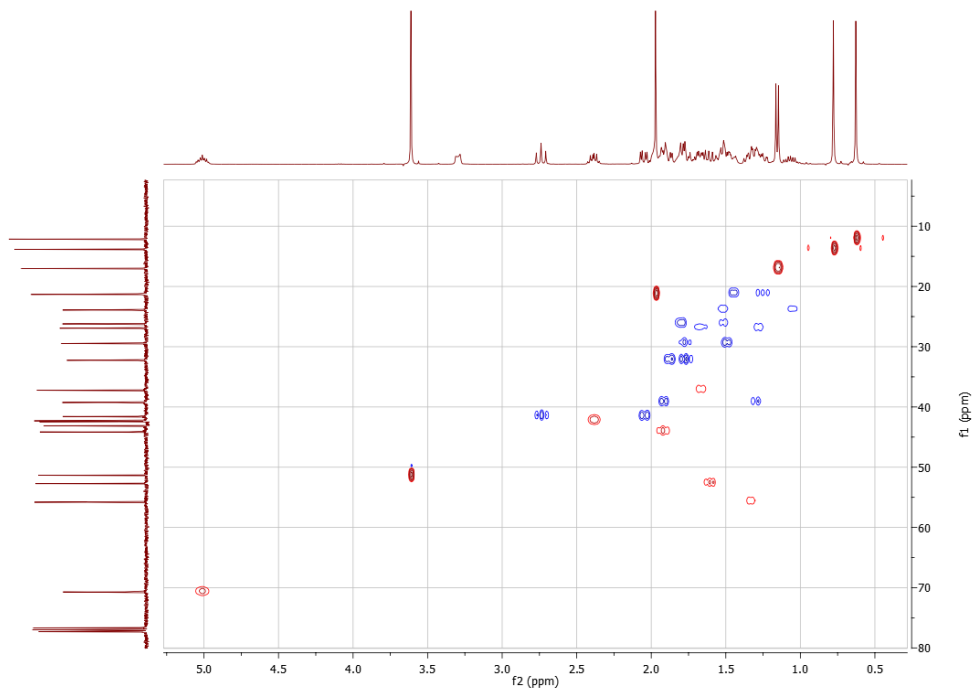
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY



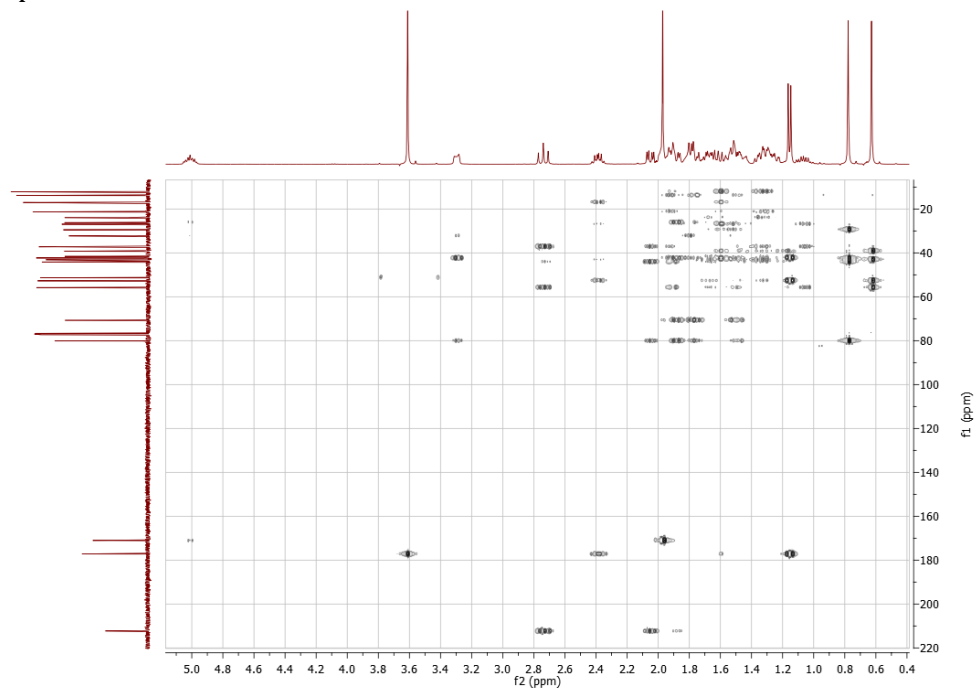
Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY



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

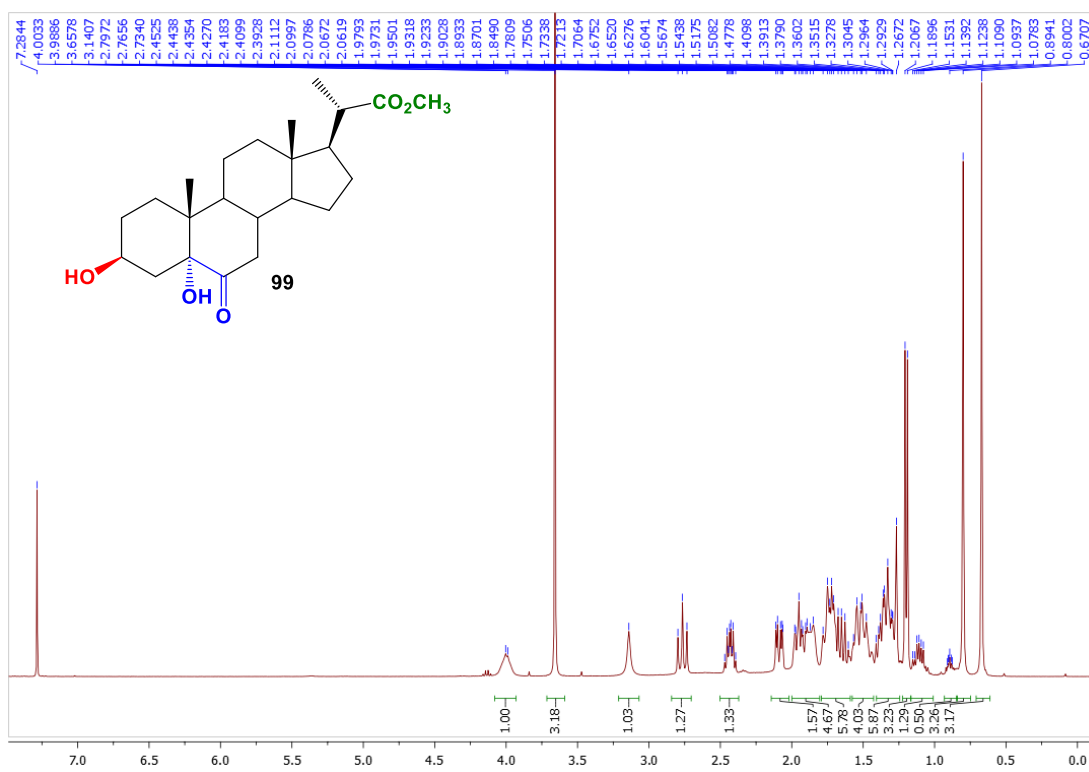


Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

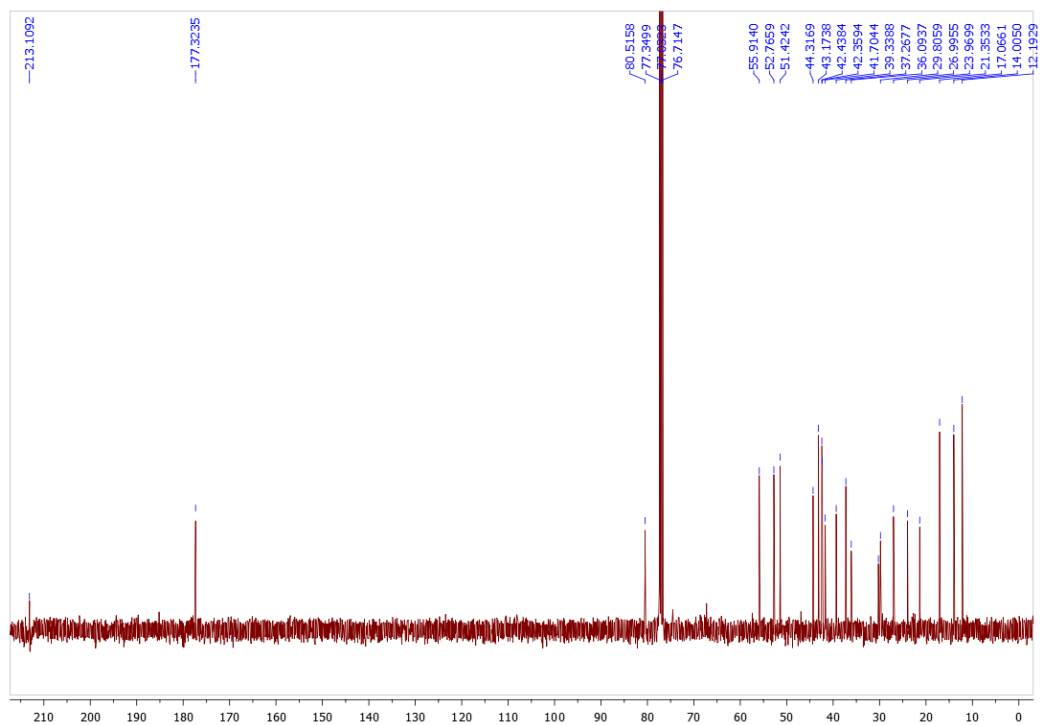


(20*S*)-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihidroxy-6-oxo-pregnano-20-carboxilato de metilo (**99**)

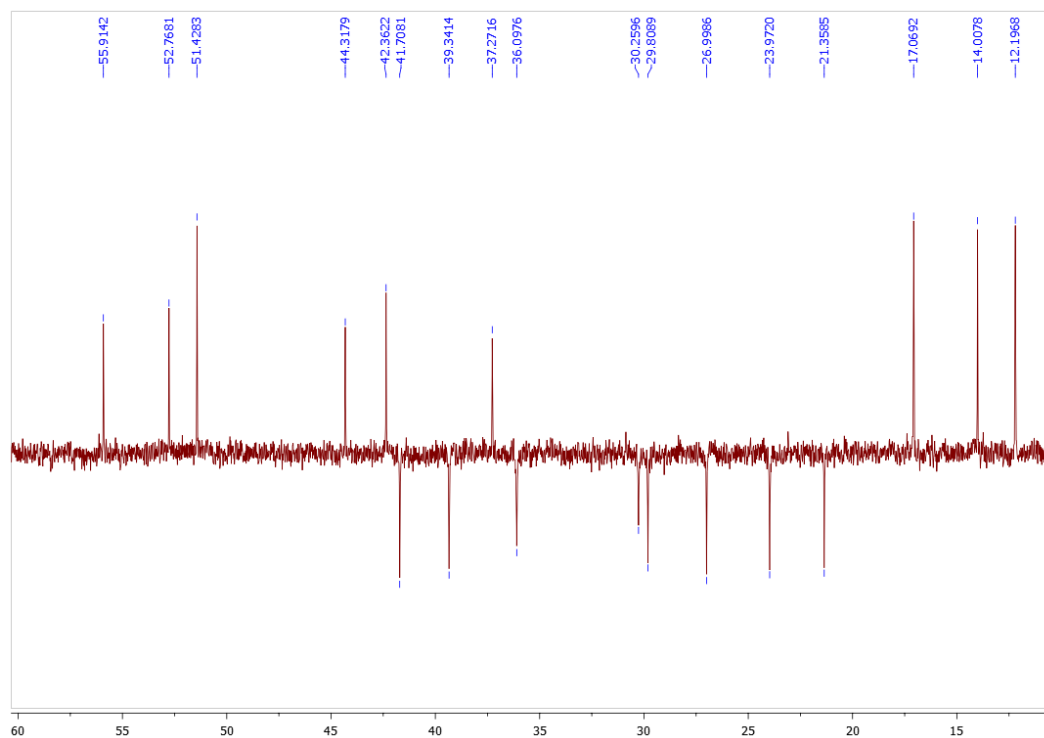
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN



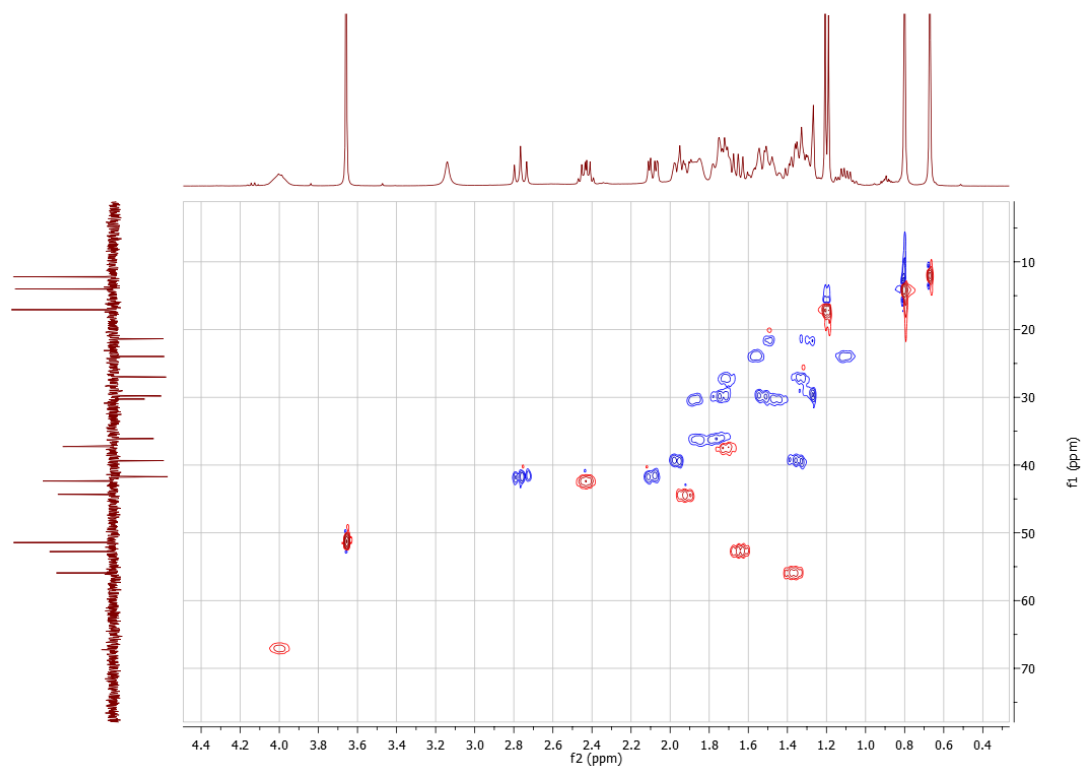
Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN



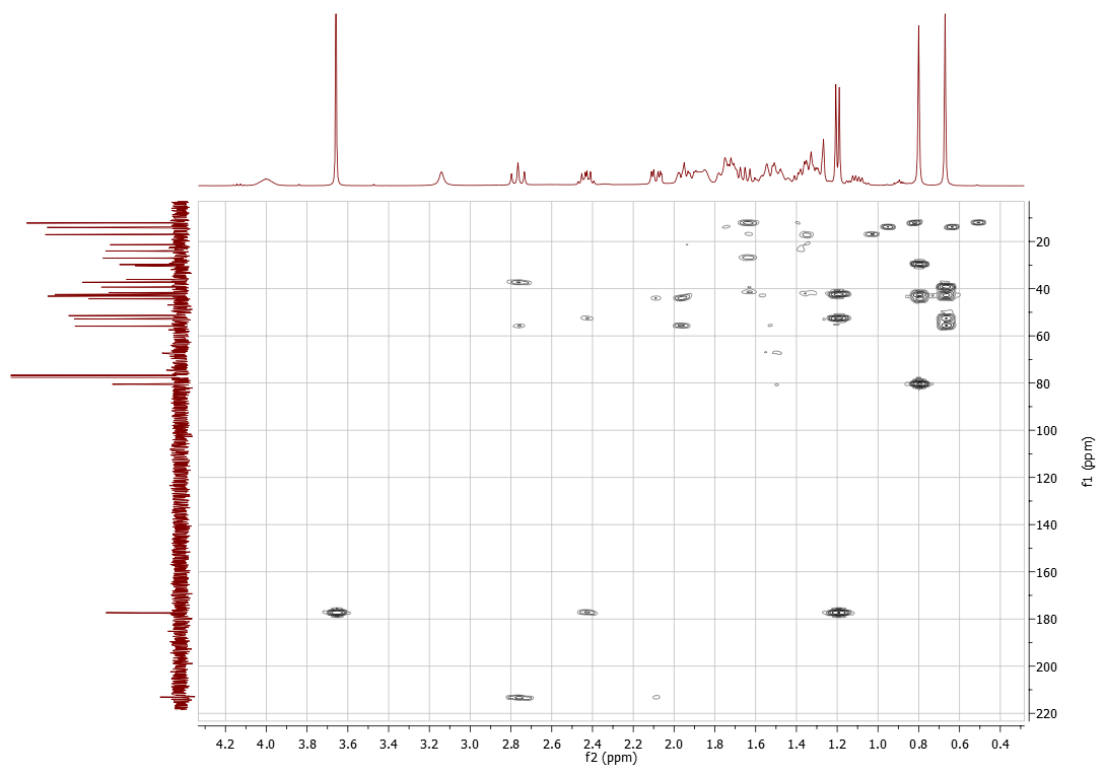
Espectro  $^{13}\text{C}$ -DEPT-135



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

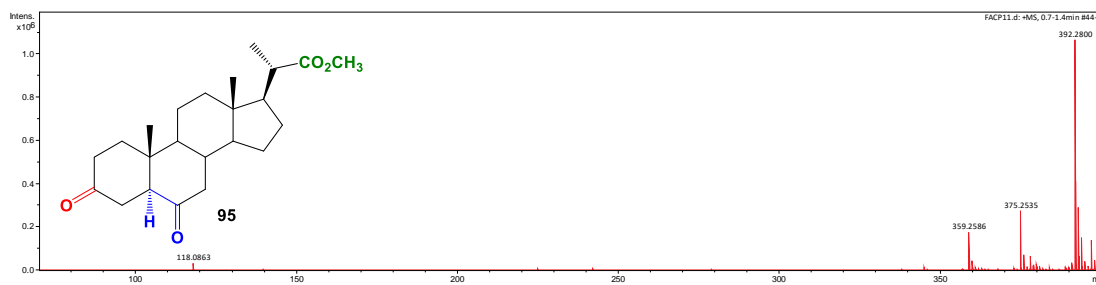


Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

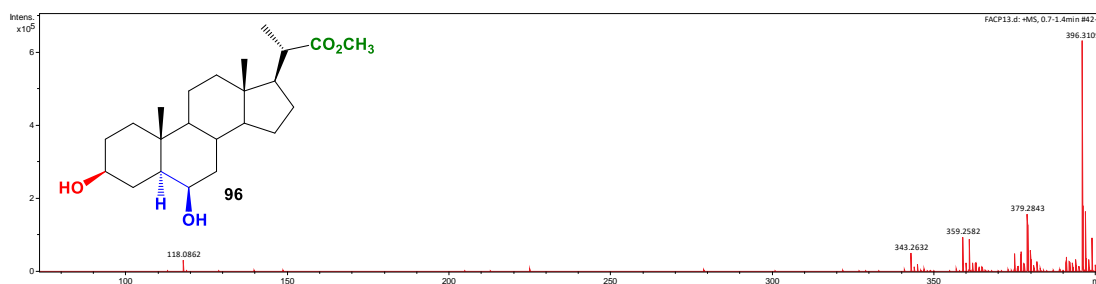


Espectros de EMAR (M + NH<sub>4</sub>) para los compuestos **95-99**.

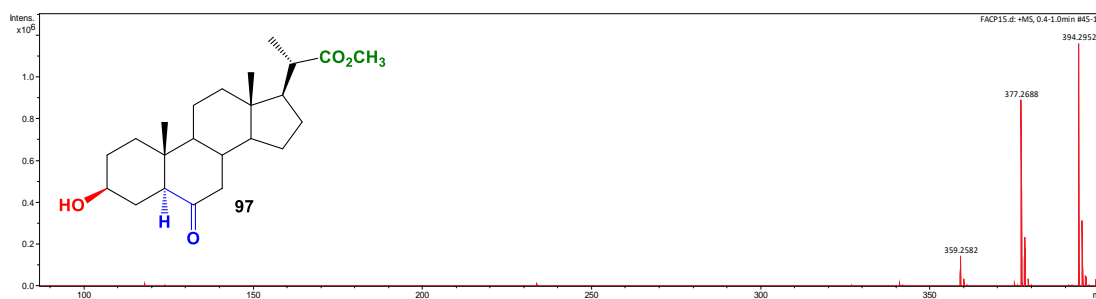
(20S)-3,6-dioxo-5 $\alpha$ -pregnano-20-carboxilato de metilo (**95**)



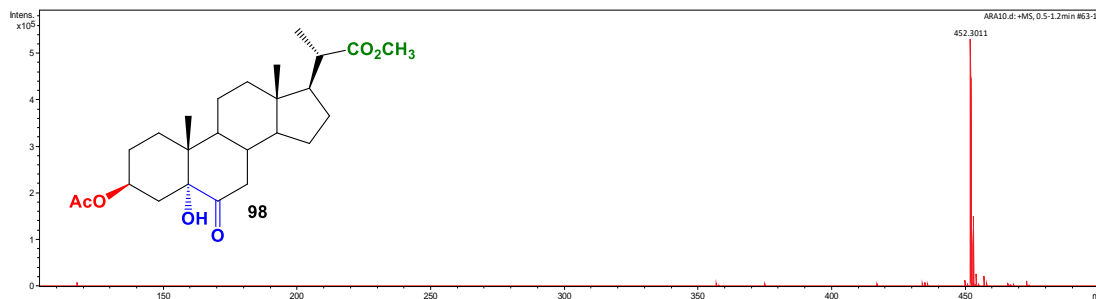
(20S)-3 $\beta$ ,6 $\beta$ -dihidroxi-5 $\alpha$ -pregnano-20-carboxilato de metilo (**96**)



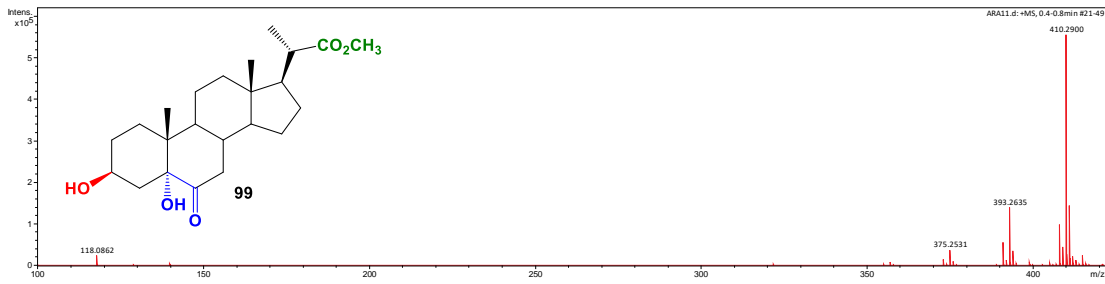
(20S)-3 $\beta$ -hidroxi-6-oxo-5 $\alpha$ -pregnano-20-carboxilato de metilo (**97**)



(20S)-3 $\beta$ -acetoxi-6-oxo-5 $\alpha$ -hidroxy-pregnano-20-carboxilato de metilo (**98**)



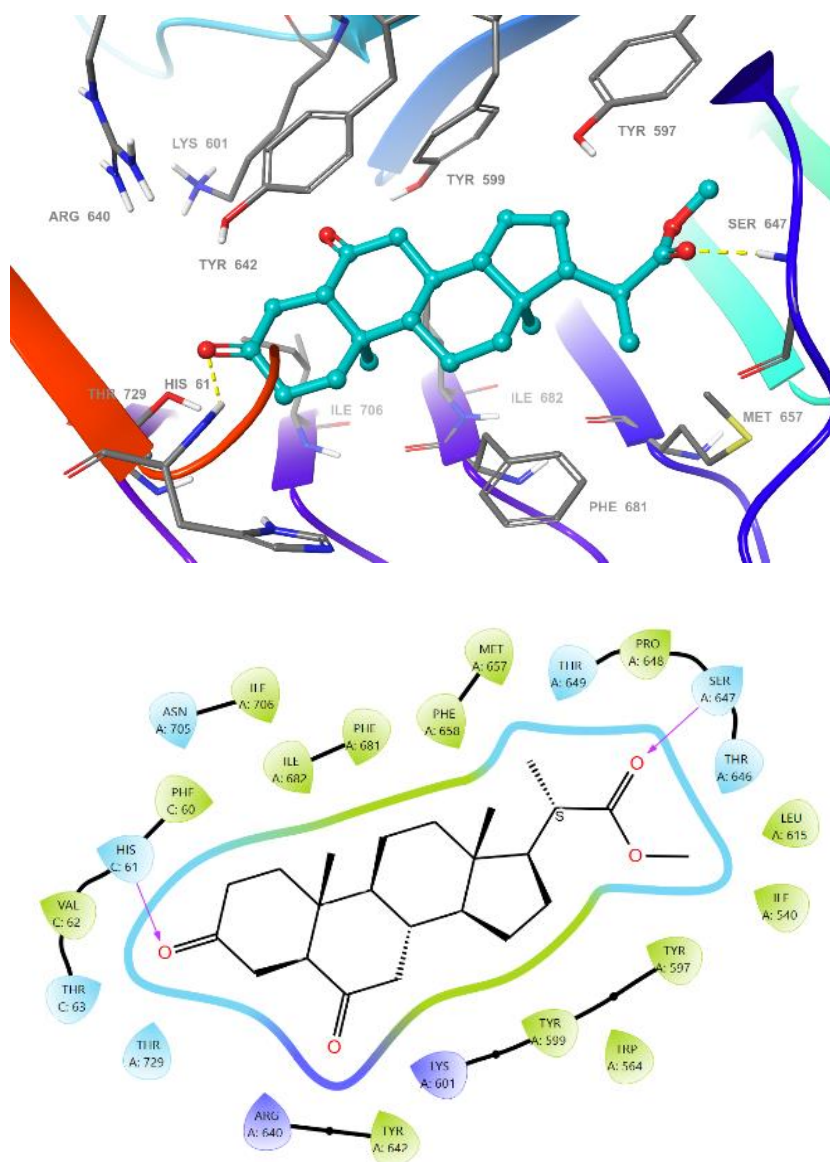
(20*S*)-3β,5α-dihidroxy-6-oxo-pregnano-20-carboxilato de metilo (**99**)



## ANEXO 2

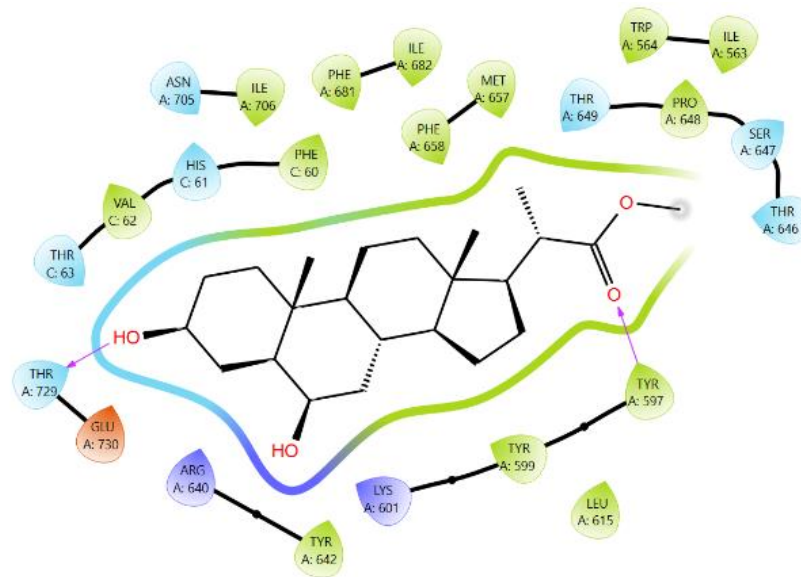
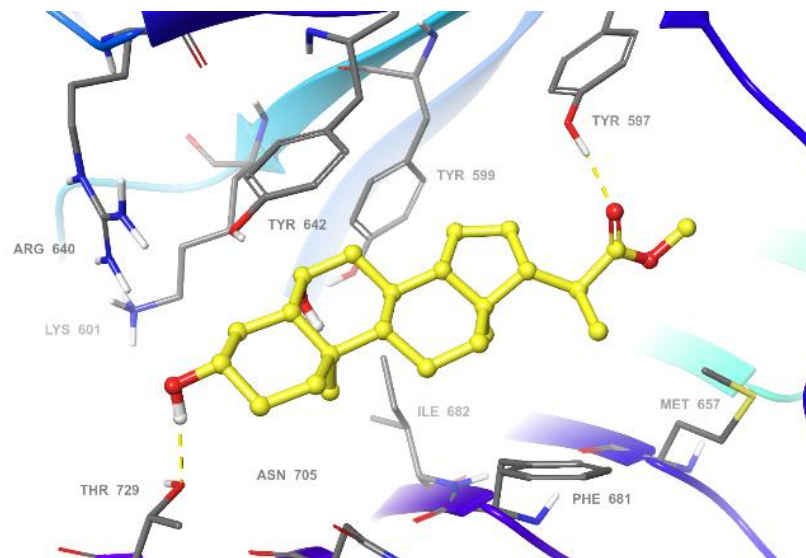
Modos de unión predichos para los compuestos **95**, **96**, **98** y **99** en la superficie del bolsillo de unión al brasinólido (PDB 4M7E) como también sus diagramas de interacción proteína-ligando.

a) Compuesto **95**.



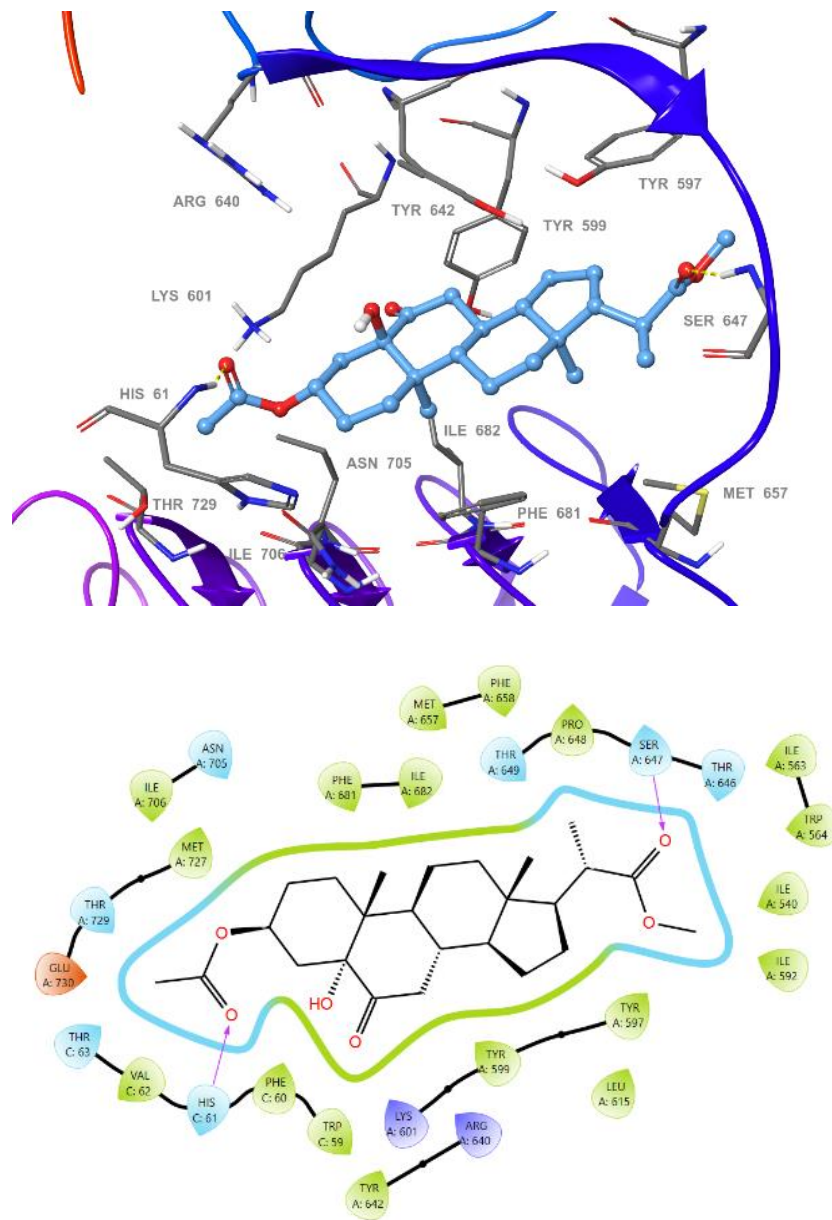
Valor de Docking Score  $-12.93 \text{ kcal mol}^{-1}$ , RMSD =  $1.89 \text{ \AA}$

b) Compuesto 96.



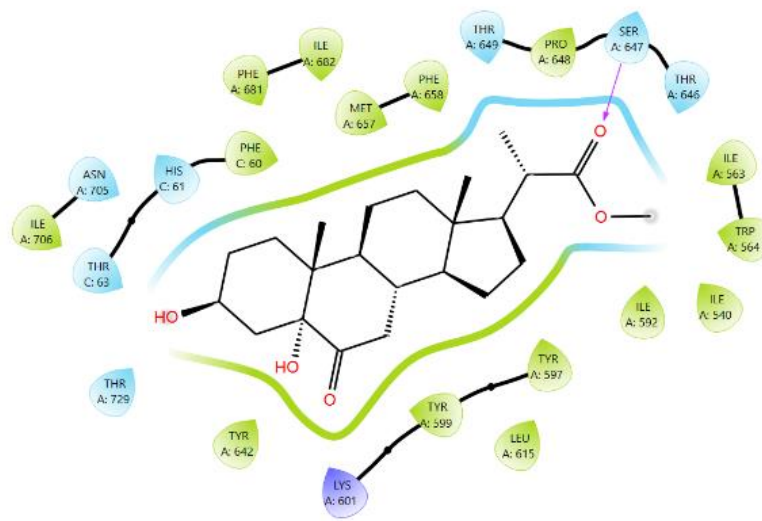
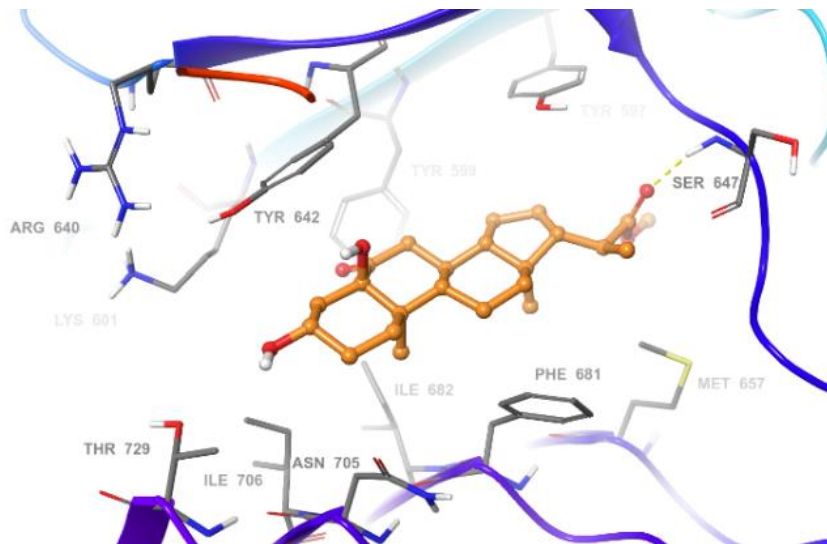
Valor de Docking Score  $-11.73 \text{ kcal mol}^{-1}$ , RMSD =  $1.83 \text{ \AA}$

c) Compuesto **98**.



Valor de Docking Score  $-11.30 \text{ kcal mol}^{-1}$ , RMSD =  $2.75 \text{ \AA}$

d) Compuesto **99**.



Valor de Docking Score  $-12.06 \text{ kcal mol}^{-1}$ , RMSD =  $2.44 \text{ \AA}$