

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS, MENCIÓN QUÍMICA

Estudios *in Sílico*, síntesis y evaluación biológica de nuevos análogos de Brasinoesteroides.

Vanessa Aitken Silva

Magíster en Ciencias mención Química

Junio de 2024



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA



Departamento
de **Química**



Magíster en Ciencias
Mención **Química**

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS,
MENCIÓN QUÍMICA

Estudios *in Sílico*, síntesis y evaluación biológica de nuevos análogos de Brasinoesteroides.

Tesis de Grado presentada por

Vanessa Aitken Silva

Como requisito parcial para optar al grado de

Magíster en Ciencias, mención Química.

Director de Tesis
Dr. Luis Espinoza Catalán
Codirector de Tesis
Ph.D. Miroslav Kvasnica

Junio 2024

PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS, MENCIÓN QUÍMICA

TITULO DE LA TESIS:

Estudios *in silico*, síntesis y evaluación biológica de nuevos análogos de Brasinoesteroides.

AUTOR:

Vanessa Aitken Silva

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. Javier Ramírez.

Dr. Lautaro Taborga Morales.

Dr. Miroslav Kvasnica.

Dr. Luis Espinoza Catalán.

Valparaíso, Chile. Junio de 2024

Agradecimientos,

Antes de compartir con ustedes mi fascinante recorrido por el complejo (y a ratos, incluso, indescifrable) mundo de la química bioorgánica aplicada, quisiera agradecer encarecidamente a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida durante los años que fui parte de este maravilloso proyecto educativo, la Universidad Técnica Federico Santa María. Y tal cómo entonaríamos tantas veces en nuestro solemne himno, siempre es importante recordar que,

***Compañeros es nuestro destino
comprender, trabajar y crear.
Construyamos el propio camino,
a los sones de nuestro cantar!***



Dedicado a mis abuelitos Yemo y Yoya, cuya sabiduría y amor incondicional han sido mi guía y mi inspiración. Los amo infinito ahora y siempre.

CONTENIDO

RESUMEN	7
SUMMARY	8
CAPITULO 1 - INTRODUCCIÓN	9
1.1 Seguridad alimentaria en condiciones climáticas desfavorables	9
1.2 Hormonas y reguladores de crecimiento vegetal	9
1.3 Brasinoesteroides	12
1.4 Relación estructura-actividad de los Brasinoesteroides	14
1.5 Síntesis de brasinoesteroides y sus análogos	16
1.6 Análogos sintéticos con modificación de la cadena lateral	17
1.7 Receptores de BRs y estudios in silico de acoplamiento molecular (Molecular Docking)	20
CAPITULO 2 – Hipótesis y OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN	25
HIPOTESIS	25
2.1 Objetivos Generales	25
2.2 Objetivos Específicos	25
CAPÍTULO 3 - METODOLOGÍAS	27
3.1 Metodología síntesis químicas	27
3.1.2 Métodos instrumentales de caracterización de los compuestos a sintetizar	28
3.2 METODOLOGÍA ENSAYOS BIOLÓGICOS	29
3.2.1. Ensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA)	29
3.2.2 Ensayo del segundo entrenudo del frijol (SEF)	30
3.2.3 Estudios iniciales de docking molecular	30
3.4 Materiales y equipos: Síntesis orgánica	31
Solventes	31
3.5 Insumos	31
3.6 Reactivos	31
3.7 Cromatografía en capa fina	32
3.8 Cromatografía en columna	32
3.9 Materiales y equipos: biológicos	33
3.10 Abreviaturas y Siglas	33
3.11 Abreviaturas en resonancia magnética nuclear	34
3.12 Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo	35
3.13 Abreviaturas en espectrometría de masas	35

3.14 Abreviaturas de Acoplamiento Molecular	35
Capítulo 4 Parte Experimental	36
4. 1 Síntesis de compuestos	36
4. 1.1 (20S)-3 β -Acetoxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (50)	36
4.1.2 (20S)-3 β -hidroxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (51)	36
4.1.3 (20S)-3 β -(4-toluennsulfoniloxi)-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (52)	37
4. 1.4 (20S)-6 β -hidroxi-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (53)	38
4.1.5 (20S)-6-Oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (54).....	39
4. 1.6 (20S)-6-Oxo-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (55)	39
4. 1.7 (20S)-6,6-etilenodioxy-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (56)	40
4.1.8 (20S)-22-hydroxy-5 α -pregn-2-ene-23,24-dinor-6-ona (57)	41
4.1.9 (20S)-2 α , 3 α , 22-trihidroxi-5 α -pregn-6-ona (58).....	42
4.1.10 Síntesis de (20S)-22-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (59a-c).....	43
4.1.11 (20S)-22-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (59a).....	43
4.1.12 (20S)- 22-(4-fluoro)-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (59b)	44
4.1.13 (20S)- 22-(2-fluoro)-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (59c).....	44
4.1.14 Síntesis de (20S)-22-benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (49a-c) ..	45
4.1.15 (20S)-22-benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (49a)	46
4.1.16 (20S)- 22-(4-fluoro)-benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (49b).....	46
4.1.17 (20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (49c).....	47
4.2 Ensayos Biológicos.....	48
4.2.1. Ensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA).....	48
4.2.2 Ensayo del segundo entrenudo del frijol (SEF)	48
4.2.3 Estudios de acoplamiento molecular (molecular docking)	50
CAPITULO 5 – RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
5.1 Síntesis químicas	52
5.2 Ensayos Biológicos.....	62
5.2.1 Actividad Biológica de Análogos de Brasinoesteroide en la Prueba de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA).	62
5.2.2 Actividad biológica de Análogos de Brasinoesteroide en el Bioensayo del Segundo Internudo de Frijol. (SEF)	63
5.3 Estudios de acoplamiento molecular	64
CAPITULO 6 – CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	69

ANEXOS 77

ANEXO 1: Espectros de RMN para los compuestos 16, 50-58, 59a-c y 49a-c	77
Ácido (20S)-3β-acetoxi-5-pregnen-22-oico (16).....	77
(20S)-3β-Acetoxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (50).....	78
(20S)-3β-hidroxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (51).....	79
(20S)-3β-(4-toluenensulfoniloxi)-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (52).	81
(20S)-6b-hidroxi-3α,5-ciclo-5α-pregnano-20-carboxilato de metilo (53).....	83
(20S)-6-Oxo-3α,5-ciclo-5α-pregnano-20-carboxilato de metilo (54).....	86
(20S)-6-Oxo-5α-pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (55)	88
(20S)-6,6-etilenodioxy-5α-pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (56)	91
(20S)-22-hydroxy-5α-pregn-2-ene-23,24-dinor-6-ona (57)	93
(20S)-2α, 3α, 22-trihidroxi-5α-pregn-6-ona (58).....	96
(20S)-22-benzoato de 6-oxo-5α-pregn-2-eno (59a)	98
(20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 6-oxo-5α-pregn-2-eno (59c).....	103
(20S)-22-benzoato de 2α, 3α-dihidroxi-6-oxo-5α-pregnano (49a).....	106
(20S)-22-(4-fluoro) benzoato de 2α, 3α-dihidroxi-6-oxo-5α-pregnano (49b).....	108
(20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 2α, 3α-dihidroxi-6-oxo-5α-pregnano (49c)	111
ANEXO 2: Espectros de Masas de Alta Resolución (EMAR) de los análogos 49a, 49b, 49c y 58 , (M + H) ⁺	113
(20S)-22-benzoato de 2α, 3α-dihidroxi-6-oxo-5α-pregnano (49a).....	113
(20S)-22-(4-fluoro) benzoato de 2α, 3α-dihidroxi-6-oxo-5α-pregnano (49b).....	114
(20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 2α, 3α-dihidroxi-6-oxo-5α-pregnano (49c)	114
(20S)-2α, 3α, 22-trihidroxi-5α-pregn-6-ona (58).....	114
ANEXO 3: Interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre el complejo BRI1-BAK1 y los análogos sintetizados.	115

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Serie propuesta de nuevos análogos de brasinoesteroides 23, 24- bisnorcolénicos 49a-c	7
Figure 1: Proposed series of new 23, 24- bisnorcolenic brassinosteroid analogs 49a-c	8
Figura 1.1: Estructura de algunas fitohormonas reguladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas.....	11
Figura 1.2: Algunos ejemplos de brasinoesteroides naturales.....	12
Figura 1.3: Variedad de sustituyentes en los anillos A y B, y en la cadena lateral de Brasinoesteroides naturales.....	13
Figura 1.4: a) Relación Estructura-Actividad relativa en el anillo A. (b) efecto de la funcionalización relativa del anillo B en la actividad biológica. (c) Relación de las conformaciones espaciales del núcleo esteroidal del 5 α -colestano y 5 β -colestano con fusión de anillos A/B tipo trans (izquierda) y fusión de los anillos A/B tipo cis; con la actividad biológica. (d) Efecto de los sustituyentes de la cadena lateral.....	15
Figura 1.5: Estructura de esteroides que se han utilizado como precursores en la síntesis de brasinoesteroides naturales y sus análogos.....	17
Figura 1.6: Estructura de análogos de brasinoesteroides con importantes modificaciones en la cadena lateral.....	18
Figura 1.7: Análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales del tipo 23,24-dinor colánicas, funcionalizadas en forma de glicoles, éteres, ésteres y ácidos carboxílicos.....	19
Figura 1.8: Estructuras de (22R,23R)-23-arilbrasinosteroides.....	20
Figura 1.9: Análogos de brasinoesteroide del tipo 24-norcolanos con ésteres de benzoatos en la cadena lateral.....	20
Figura 1.10: BRI1 (LRR) posee una estructura selenoide helicoidal: a) Estructuras del receptor BRI1 (LRR) vista lateralmente. b) Estructura del BRI1 vista de forma frontal. Las N-acetilglucosaminas (dominio isla) se muestran en color magenta. Los enlaces disulfuro se muestran en color naranja. ID, corresponde al dominio de inserción del ligando. Los extremos N- y C- terminales se muestran en gris y azul marino, respectivamente. Los números en azul indican las posiciones de los LRR. La lámina β (β 1) del extremo N-terminal está delimitada. c) Estructura del receptor BRI1 unido a un BRs (en amarillo) [61].....	21
Figura 1.11: Poses del compuesto 24-epibrasinólida (2) (amarillo) y tres nuevos análogos de BRs, 38 (verde), 39b (calipso) y 42a (gris) en el sitio de unión de BRI1.....	23
Figura 1.12: Estructuras de nuevos análogos de Brasinoesteroides de tipo 23,24-bisnorcolénicos a estudiar en esta investigación.....	24
Figura 2.1: Nuevos análogos de brasinoesteroide de tipo 23,24-bisnorcolénicos a ser estudiados en esta investigación.....	26
Figura 4.1: Efecto de análogos de BRs y control positivo (brasinólida (1)) en el bioensayo de elongación del segundo internodo del frijol a una concentración de 1×10^{-8} M.....	50

Figura 5.1: Estructura 3D del compuesto 53 , donde se muestran los acoplamientos H-H para los hidrógenos H-4 y H-6, cuyos valores confirman la presencia del anillo de ciclopropano y estereoquímica del C-6.....	54
Figura 5.2: Estructuras del compuesto 58 y compuestos relacionados 58a-f	55
Figura 5.3: Espectro parcial 2D HSQC ed., donde se muestran las correlaciones heteronucleares a $1J_{HC}$ para los hidrógenos H-2, H-3, H-5, H-22a y H-22b, para el análogo 58	56
Figura 5.4: a) Espectro 2D HMBC completo para el compuesto 58 y su estructura, que muestran las principales correlaciones heteronucleares a $^2J_{HC}$ (flechas segmentadas) y $^3J_{HC}$ (flechas continuas). b) Ampliación espectro 2D HMBC que muestra otras correlaciones para confirmar las posiciones de los grupos OH en los carbonos C-2, C-3 y C-22.....	57
Figura 5.5: Adición preferencial del OsO_4 por la cara inferior del plano del enlace doble C2-C3, en el compuesto 57 , que permitirá la formación diastereoespecífica del diol 2α - 3α en el compuesto 58	58
Figura 5.6: a) Espectro 1H RMN del compuesto 58 . b) Espectro de NOE selectivo, que muestra la excitación selectiva de H-2 y los efectos NOE observados con H-4b y CH_3 -19. Mientras que la otra señal observada corresponde a acoplamiento escalar con H-3.....	59
Figura 5.7: Estructura del compuesto 59a y espectro 1H - ^{13}C HSQC parcial con proyección de espectro ^{13}C DEP 135, que muestra las principales correlaciones entre los hidrógenos aromáticos H-2', H-3' y H-4', con sus correspondientes carbonos a $^1J_{HC}$. Adicionalmente se muestran las correlaciones heteronucleares a $^1J_{HC}$ para los hidrógenos H-2, H-3 y H-22ab y sus correspondientes carbonos C-2, C-3 y C-22.....	60
Figura 5.8: Estructura parcial del compuesto 59a y espectro 1H - ^{13}C HMBC, que muestra las principales correlaciones a $^3J_{HC}$ entre los hidrógenos H-22ab de la cadena lateral con el carbono carboxílico de la función benzoato. Adicionalmente se muestran las correlaciones heteronucleares a $^2J_{HC}$ y $^3J_{HC}$ entre los hidrógenos aromáticos H-2', H-3' y H-4', con el resto de los carbonos del anillo.....	61
Figura 5.10: Modo predictivo de unión para brasinólida (1) y 49c en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).....	64
Figura 5.11. Modo predictivo de unión para brasinólida (1) y 49c en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).....	65
Figura 6.1. Modo predictivo de unión de 49b en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E)....	116
Figura 6.2. Modo predictivo de unión de 49a en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E)....	117
Figura 6.3. Modo predictivo de unión de 49e en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E)....	117
Figura 6.4. Modo predictivo de unión de 49d en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E)....	118
Figura 6.5. Modo predictivo de unión de 58 en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).....	118

INDICE DE TABLAS

Tabla 4.1: Actividad de análogos de BRs disueltos en Etanol/DMSO mediante bioensayos in vitro de Inclinación de la lámina de arroz.....	49
Tabla 4.2: Ensayo de Elongación del Segundo Internudo del Frijol (SEF) de análogos de Brasinoesteroides 49a-49c y 58 a la concentración de 1×10^{-8} M.....	50

Tabla 4.3: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.....	51
Tabla 4.4: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1 y cada uno de los análogos estudiados.....	51
Tabla 5.1: Actividad de análogos de BRs disueltos en Etanol/DMSO mediante bioensayos in vitro de Inclinación de la lámina de arroz.....	62
Tabla 5.2: Ensayo de Elongación del Segundo Internudo del Frijol (SEF) de análogos de brasinoesteroides 49a-49c y 58 a la concentración de 1×10^{-8} M.....	63
Tabla 5.3: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1 y cada uno de los análogos estudiados.....	64
Tabla 5.4: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.....	65
Tabla 5: Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.....	116

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Ruta de síntesis propuesta para la obtención del intermedio avanzado 57 , desde 3 β -acetil-23,24-bisnor-5-colénico (16).....	28
Esquema 2: Obtención de los nuevos análogos de BRs 49a-e desde el intermedio avanzado 57 ...28	
Esquema 1: Ruta de síntesis propuesta para la obtención del intermedio avanzado 57 , desde 3 β -acetil-23,24-bisnor-5-colénico (16).....	53
Esquema 2: Obtención de los nuevos análogos de BRs 49a-e desde el intermedio avanzado 57 ...59	

RESUMEN

En este trabajo de tesis, tres análogos de brasinoesteroides con funciones $2\alpha,3\alpha$ -diol en el anillo A, fusión de anillos A/B tipo trans, función 6-oxo en el anillo B y función benzoato en C-22, junto con sustituyentes mono-fluorados en el anillo aromático (**Figura 1**), fueron sintetizados a partir del ácido 3β -acetil-23,24-bisnorcolénico (**16**) con rendimientos entre el 50,7% y el 98,6% en cada paso de síntesis.

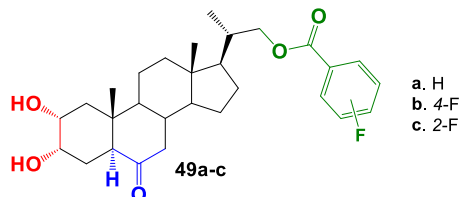


Figura 2: Serie propuesta de nuevos análogos de brasinoesteroides 23, 24-bisnorcolénicos **49a-c**.

Para estudiar la interacción entre los análogos sintetizados y el receptor BRI1 se realizó un Estudio de Acoplamiento Molecular, en la que el análogo **49c** mostró una afinidad significativa, superando a la brasinólida (**1**) en Docking score tanto para BRI1 como para el heterodímero BRI1-BAK1.

Para evaluar la actividad biológica de los análogos sintetizados se realizaron los ensayos de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA) y el bioensayo del Segundo Entrenado de Frijol (SEF). En el Ensayo ILA, se observó un aumento en la actividad biológica con la concentración creciente, siendo el análogo **49c** el más destacado, superando incluso a la brasinólida. En el ensayo SEF, el análogo **49b** demostró ser el más activo, superando en algunos casos a la brasinólida.

Este trabajo abre la puerta a la síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroide halogenados, con el potencial de mejorar rendimientos y escalar el proceso. Se destaca la necesidad de investigaciones futuras que amplíen la diversidad de compuestos sintetizados, explorando modificaciones en la cadena lateral para comprender mejor la relación estructura-actividad y descubrir compuestos más efectivos y selectivos.

SUMMARY

In this thesis work, three analogs of brassinosteroids with $2\alpha,3\alpha$ -diol functions in ring A, trans-fused A/B ring fusion, 6-oxo function in ring B, and benzoate function at C-22, along with mono-fluorinated substituents in the aromatic ring (**Figure 1**), were synthesized from 3β -acetyl-23,24-bisnorcholenic acid (**16**) with yields ranging from 50.7% to 98.6% at each synthesis step.

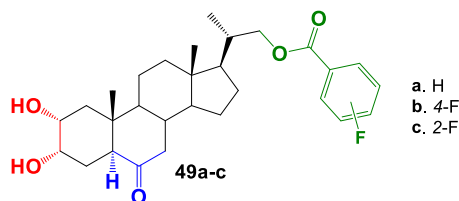


Figure 1: Proposed series of new 23, 24- bisnorcholenic brassinosteroid analogs **49a-c**.

To study the interaction between the synthesized analogs and the BRI1 receptor, a Molecular Docking Study was conducted, in which analog **49c** showed significant affinity, surpassing brassinolide (**1**) in Docking score for both BRI1 and the heterodimer BRI1-BAK1.

To evaluate the biological activity of the synthesized analogs, Rice Lamina Inclination Test (RLIT) and the Second Bean Internode Bioassay (BSIB) were performed. In the RLIT assay, an increase in biological activity with increasing concentration was observed, with analog **49c** standing out as the most prominent, even surpassing brassinolide. In the BSIB assay, analog **49b** proved to be the most active, surpassing brassinolide in some cases.

This work opens the door to the synthesis of new halogenated brassinosteroid analogs, with the potential to improve yields and scale the process. The need for future research is emphasized to expand the diversity of synthesized compounds, exploring modifications in the side chain to better understand the structure-activity relationship and discover more effective and selective compounds.

CAPITULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1 Seguridad alimentaria en condiciones climáticas desfavorables.

Uno de los mayores desafíos que se presentan para el desarrollo de la agricultura nacional en las próximas décadas reside en la adaptación al cambio climático, más específicamente, a la disminución de la disponibilidad del recurso hídrico de forma permanente. En las últimas tres décadas las cuencas del Aconcagua, Maipo, Rapel, Mataquito y Maule los caudales han disminuido entre 13 y 37%[1]. En la zona sur, en tanto, gran parte de las cuencas presentan una baja del caudal que oscila entre 3 y 32%[1]. En promedio, se proyecta disminuciones de 50 a 200 [mm] anuales hasta los 52° de latitud y un aumento de 50 a 100 [mm] al año desde los 52° de latitud sur, zona que corresponde esencialmente a la pampa patagónica[1]. Dichas variaciones repercuten directamente en los montos de escorrentía, proyectándose disminuciones de ésta en las zonas donde habrá menos precipitación y aumentos, de menor magnitud, en zonas con aumento de precipitación. Esto último se explica por aumentos en los montos de evapotranspiración, asociados a alzas de temperatura, que se traducirían en un aumento de temperatura promedio de 1°C hacia el período 2030-2060 [2]. El déficit hídrico afecta negativamente la actividad agrícola, no solo de forma directa, sino que también indirectamente al afectar la calidad del agua disponible para regadío (aumento de salinidad, cambios en pH, disminución del oxígeno disuelto, aumento de la concentración de metales, etc.) por lo que se podría ver afectada la capacidad productiva de los cultivos en la zona [1].

La sequía prolongada, exacerbada por el mal manejo y distribución del agua y la aplicación de políticas públicas insuficientes para hacer frente a este delicado problema, ha provocado que se requiera, tanto de la modernización de las normativas vigentes respecto al uso del agua, como de la creación de nuevos conocimientos que permitan la producción de alimentos de una manera más eficiente [3].

1.2 Hormonas y reguladores de crecimiento vegetal.

Todo organismo multicelular requiere de la comunicación entre los diversos sistemas bioquímicos que la componen, con el fin de tener un correcto funcionamiento interno y

una respuesta adecuada a estímulos externos. Para hacer efectiva dicha comunicación, es necesaria la acción de “mensajeros químicos” capaces de migrar entre dichos sistemas y generar una respuesta fisiológica. A estos compuestos se les conoce como hormonas, y se definen como “una sustancia que, siendo producida en cualquier lugar del organismo, es transferida a otro lugar en el que influencia un proceso fisiológico específico” [4].

Cabe recalcar que, dependiendo del tipo de organismo involucrado, el mecanismo de acción de las hormonas es diferente: las hormonas animales son producidas en tejidos específicos y son transportadas a través del torrente sanguíneo hacia otro tejido donde realiza una acción específica, en contraste, la mayoría de las células vegetales son capaces de producir una amplia gama de hormonas, sus mecanismos de transporte a través de la planta son diversos y su acción puede afectar tanto a la célula que las produce como a otras distantes [5].

A través de los años, han existido diversos avances en la comprensión de los diversos mecanismos en los que se encuentran involucradas las hormonas vegetales. Durante el siglo XIX, en uno de los primeros estudios relacionados con el tema, Julius von Sachs y Charles Darwin [6,7] demostraron que varios de los procesos de crecimiento de las plantas son regulados por ciertas “sustancias” que se mueven entre distintas partes de la planta. Más de un siglo después, se sabe que estas sustancias son moléculas derivadas de distintas rutas metabólicas, más conocidas como hormonas. Estas moléculas actúan a bajas concentraciones ($\sim 10^{-9}$ [M]) en zonas cercanas a la célula que las originó (de forma local), o tejidos distantes. Con los avances en las investigaciones a lo largo de los años se ha podido identificar una serie de hormonas vegetales, entre las que se encuentran el ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (IAA o auxina), brasinoesteroides (BRs), citoquininas, ácido giberélico (GA), etileno, ácido jasmónico (JA), y ácido salicílico (Figura 1.1). Estos compuestos químicos actúan en conjunto para regular cada aspecto de la vida de las plantas, tales como su desarrollo y crecimiento, o la respuesta ante el estrés tanto biótico como abiótico [8].

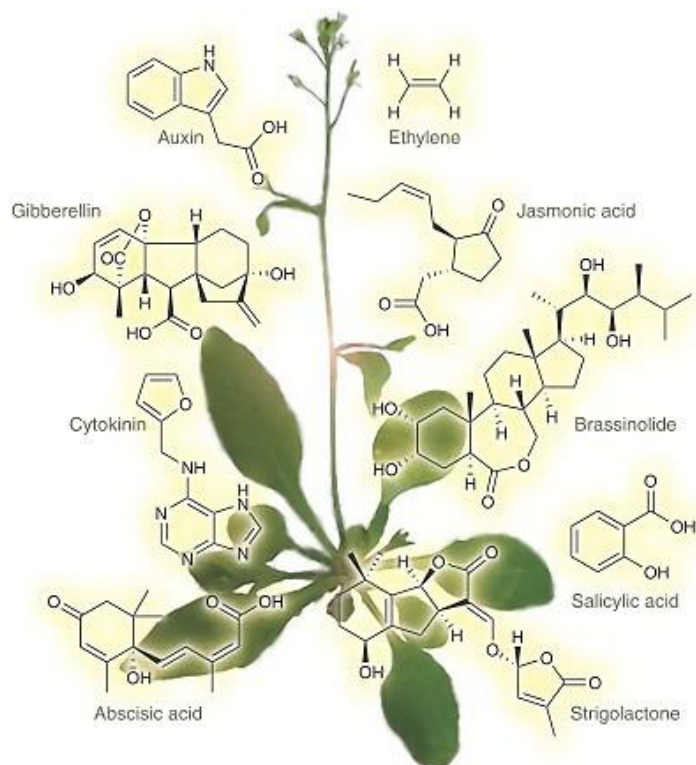


Figura 1.1: Estructura de algunas fitohormonas reguladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas [8].

Aunque la función fisiológica de la mayoría de estos compuestos ha sido estudiada durante décadas, las últimas dos décadas han visto un dramático progreso en el entendimiento de sus mecanismos de biosíntesis, transporte y respuesta. La mayoría de las rutas biosintéticas de estas fitohormonas ha sido bien caracterizada (como es el caso de ABA, BR y GA), o se encuentran aún en estudios (tal es el caso de la auxina o JA)[9].

También ha habido grandes avances en la comprensión del funcionamiento de la respuesta hormonal, que incluye la identificación de receptores de la mayoría de las hormonas más importantes. Existe abundante información fisiológica que sugiere que todas las fitohormonas interactúan con una o más hormonas adicionales y, dependiendo del caso, estas interacciones pueden provocar cambios en el nivel o respuesta hormonal [9,10].

1.3 Brasinoesteroides.

Los BRs son polihidroxiesteroides de origen vegetal, que cumplen con un rol esencial en el desarrollo de las plantas. Estos compuestos estructuralmente son similares a los esteroides encontrados en animales e insectos. Las plantas poseen la habilidad de biosintetizar una gran variedad de esteroides y su función en estas ha sido postulada en repetidas oportunidades. Aun así, no fue sino hasta 1979 que la función hormonal de los BRs fue descubierta en plantas. Ese año se reportó una lactona esteroideal llamada brasinólida (**1**) (Figura 1.2) extraída desde el polen de *Brassica Napus* L. Dos años más tarde, la castasterona (**3**) (Figura 1.2) fue aislada desde la bilis del insecto *Castanea crenata* spp. Hasta la fecha, más de 70 análogos de BRs han sido aislados desde fuentes naturales y se han publicado más de 1000 artículos, mayoritariamente por científicos de Japón (45%), USA (15%), Alemania (10-15%), China (10-15%) y de la ex Unión Soviética (10-15%). Inicialmente, las investigaciones se enfocaron en las propiedades fisiológicas de los BRs y su mecanismo de acción. Desde el principio de las investigaciones en USA, los BRs fueron considerados compuestos prometedores por sus aplicaciones en la agricultura, ya que mostraban varios tipos de actividad regulatoria en el crecimiento y desarrollo de plantas, y su valor económico como agentes de incremento del rendimiento de los cultivos fue predicho a principios del siglo XX [11].

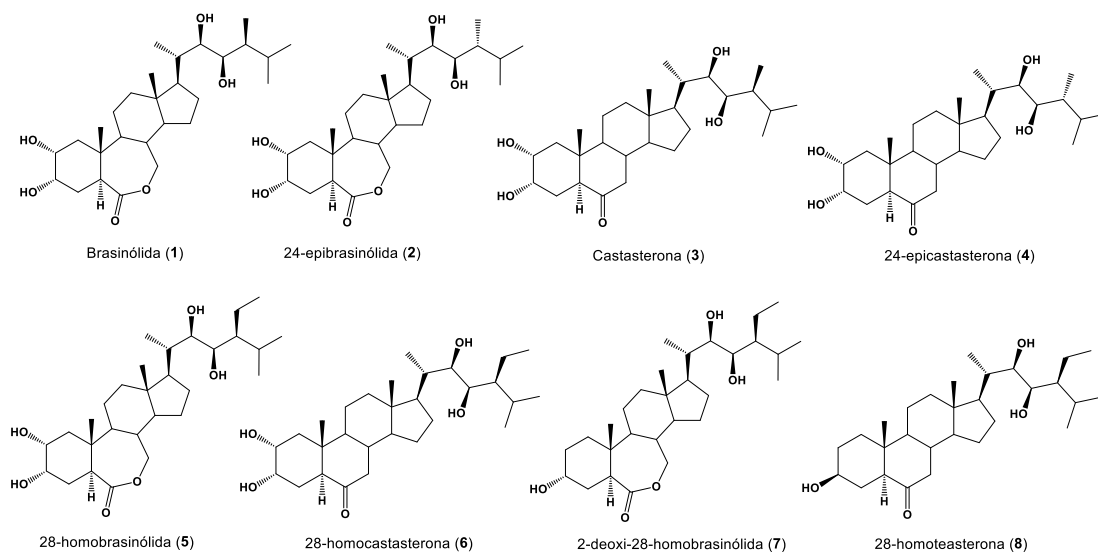


Figura 1.2: Algunos ejemplos de brasinoesteroides naturales.

Diversas investigaciones revelan que estas fitohormonas generan un amplio espectro de respuestas en vegetales, entre ellas se encuentran la elongación de los tallos, doblamiento de hojas y epinastía, inducción de la biosíntesis de etileno y la activación de la bomba de protones, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, regulación de la asimilación de carbohidratos y alocación, y la activación de la fotosíntesis [12]. Además, los BRs pueden proteger a las plantas de varios tipos de estrés, ya sea abiótico como biótico [13,14].

Desde el punto de vista de las estructuras, los BRs son derivados del esqueleto de 5α -colestano y sus variaciones estructurales vienen dadas por el tipo y posición de los grupos funcionales en los anillos A/B y de la cadena lateral (Figura 1.3); dichas modificaciones son producidas debido a las reacciones de oxido-reducción involucradas durante la biosíntesis de estos compuestos. Los BRs con funciones α -hidroxi, β -hidroxi o cetona en la posición C-3 en el anillo A son precursores de derivados $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi vecinales, aquellos con hidroxilos vecinales $2\alpha,3\beta$ -, $2\beta,3\alpha$ -, o $2\beta, 3\beta$ - pueden ser metabolitos de $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi. Respecto a los sustituyentes en el anillo B, los BRs se clasifican ya sea como 6-oxo (cetona) o 6-oxo-7-oxa (lactona). En la cadena lateral, los BRs tienen dioles vecinales R, R-orientados en los C-22 y C-23. La castasterona (**3**), con un grupo hidroxilo en el C-22 es precursor de BRs con este tipo de dioles [15].

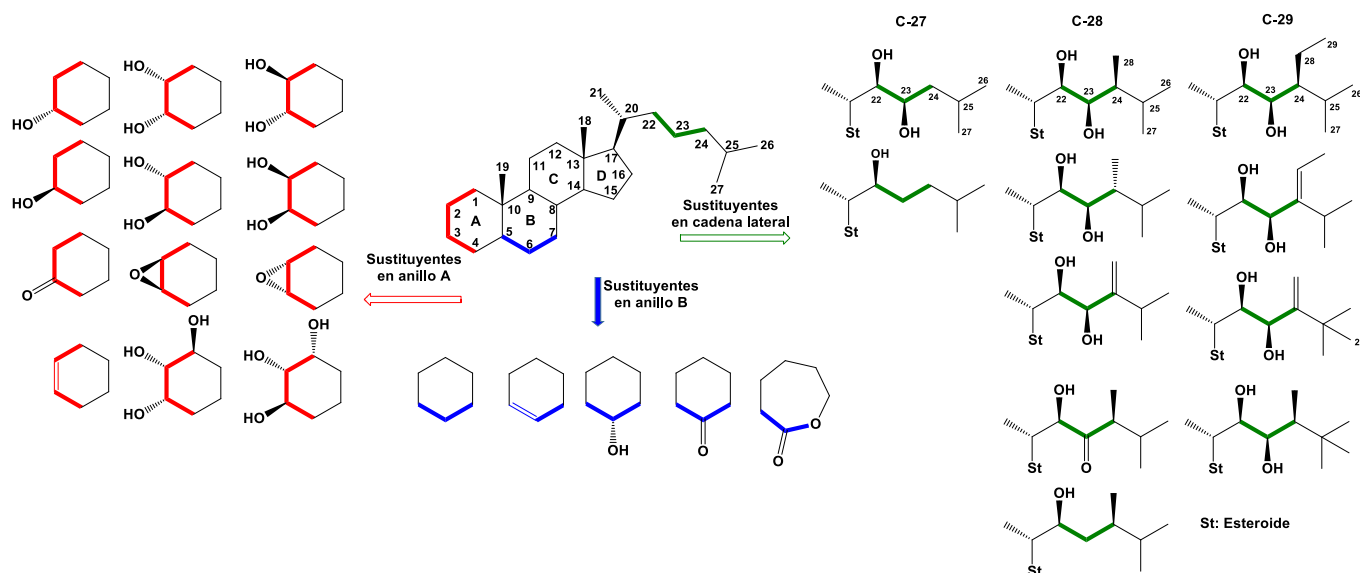


Figura 1.3: Variedad de sustituyentes en los anillos A y B, y en la cadena lateral de Brasinoesteroideos naturales.

1.4 Relación estructura-actividad de los Brasinoesteroides.

Dado que los BRs en plantas actúan a concentraciones muy bajas, exhibiendo una alta actividad biológica, la medición de esta actividad requiere del uso de bioensayos sensibles y específicos, tal que pueda diferenciarse el efecto de los BRs de otras hormonas endógenas. La prueba del segundo entrenudo de frijol (SEF) fue la primera prueba utilizada para monitorear la actividad biológica de los BRs [15,16] y, junto con el ensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA) [14], son los métodos más utilizados para la evaluación de la actividad de BRs [15]. Otros ensayos biológicos incluyen el test del primer entrenudo de frijol, el bioensayo de epicotilo en frijol mungo, el ensayo de enrollado de la hoja de trigo, bioensayos en tomate y rábano [11], y el ensayo de crecimiento de la raíz de *Arabidopsis-Thaliana* [17].

Varios grupos han adoptado el protocolo de ILA utilizando diferentes cultivares de arroz, teniendo una gran variabilidad en la sensibilidad del método [14]. Dos cultivares, Arborio J-1 y Nihonbare fueron seleccionados como los cultivares de arroz con resultados más confiables de las 60 variedades de arroz existentes [18]. El límite de detección para la brasinólida (**1**) en este método es menor a 0,1 [ng/planta], y la castasterona (**3**) resulta tener un octavo de la actividad de (**1**) [19,20].

En cuanto al ensayo del SEF, los cambios morfológicos en las plantas (elongación, inflación, curvatura y división de los entrenudos tratados) dependen de la estructura y dosis de los BRs aplicados, los cuales son evaluados a través de dos métodos: 1) porcentaje de elongación respecto al control, y 2) respuesta de crecimiento en una escala del 0 al 5. Según este código, se concluyó que los compuestos sin grupos hidroxilos en la cadena lateral son relativamente inactivos, que en general, los compuestos con grupos *cis*-hidroxilos en C-22 y C-23 y un sustituyente en C-24 eran altamente activos, pero con una menor actividad que la brasinólida (**1**) [21].

A pesar de la falta de estandarización de los bioensayos, y las complicaciones en el análisis de datos debido a la amplia variedad de sustituyentes que estas moléculas pueden alojar tanto en sus anillos como en la cadena lateral [21], así como el tipo de fusión de anillos A/B que éstas posean y que afectan la actividad de estos compuestos en el crecimiento de las plantas [22], se ha logrado encontrar ciertas generalizaciones en cuanto a qué características estructurales debe poseer un BRs para mostrar una alta actividad biológica de crecimiento vegetal, las cuales se pueden resumir en: existencia de grupo 2α -

hidroxilo, o 2 α ,3 α -dioles en el anillo A, funciones 7-oxolactona o 6-oxo en el anillo B [22] y fusión trans de los anillos A/B [23]. En cuanto a la cadena lateral, el orden de actividad de sustituyentes en el C-24 es CH₃>C₂H₅>H, los compuestos con grupos 22*R*,23*R*-*cis*-dioles muestran una mayor respuesta que los isómeros 22*S*,23*S* [14,24]. En la Figura 1.4 se muestra un resumen de las funcionalizaciones más relevantes en cuanto a actividad biológica de estos compuestos.

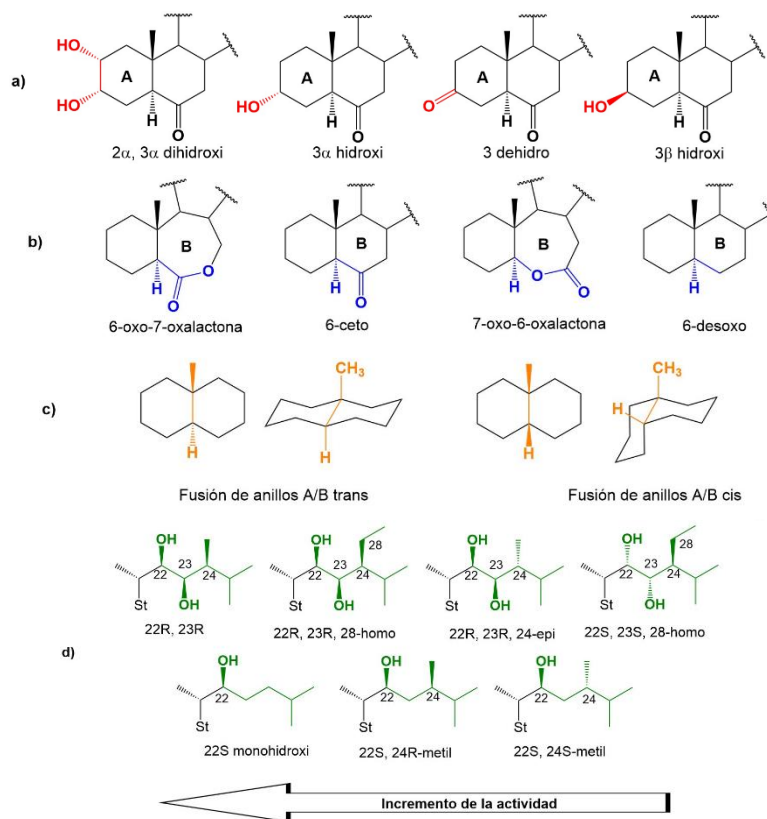


Figura 1.4: a) Relación Estructura-Actividad relativa en el anillo A. (b) efecto de la funcionalización relativa del anillo B en la actividad biológica. (c) Relación de las conformaciones espaciales del núcleo esteroidal del 5 α -colestano y 5 β -colestano con fusión de anillos A/B tipo trans (izquierda) y fusión de los anillos A/B tipo cis; con la actividad biológica. (d) Efecto de los sustituyentes de la cadena lateral.

1.5 Síntesis de brasinoesteroides y sus análogos.

Los BRs se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, incluyendo algas, helechos, gimnospermas, angiospermas, monocotiledones, dicotiledones, etc. [25] y son capaces de generar un efecto de crecimiento vegetal al ser aplicadas en bajas concentraciones (20-50 [mg/ha]), por lo que estos compuestos han atraído la atención de especialistas en diversos campos de la química biología y agricultura. Puesto que los BRs se encuentran en concentraciones demasiado bajas en las plantas como para que sea rentable su extracción, es que se ha hecho necesario realizar la síntesis de análogos de BRs como un método más económico de obtención de BRs naturales y sus análogos semisintéticos [14].

Para conseguir esta tarea, se debe tener en consideración el hecho de que estos compuestos poseen una estructura compleja (10-13 centros quirales) y la presencia de diversas funcionalizaciones en su estructura, por lo que realizar una síntesis total no parece ser un método práctico de obtención de estas hormonas [26,27]. La solución a este problema radica en realizar una semi-síntesis, partiendo desde esteroides naturales abundantes. Preferentemente se han de elegir precursores con características estereoquímicas similares al target molecular a sintetizar [14].

Los precursores más apropiados para la síntesis de BRs y sus análogos son esteroides con un enlace doble Δ^{22} , tal como el estigmasterol (**9**), el crinosterol (**11**) y ergosterol (**12**) (Figura 1.5), que pueden ser utilizados en la síntesis de brasinoesteroides con C-29 y C-28, respectivamente. La mayoría de los compuestos precursores de cadena lateral larga son difíciles de encontrar o tienen cadenas laterales saturadas que complican la funcionalización de estas. Otra posibilidad es la de utilizar ácidos cólicos como precursores, tales como el ácido hiodeoxicólico (**10**) y esteroides como la serie del androstano y pregnano, de los cuales destacan la pregnenolona (**13**) y la androsterona (**14**), las cuales se encuentran de forma abundante debido a su uso en la producción de hormonas esteroidales farmacéuticas [14]. En la Figura 1.5 se muestran algunos de los esteroides más utilizados como precursores de análogos de BRs.

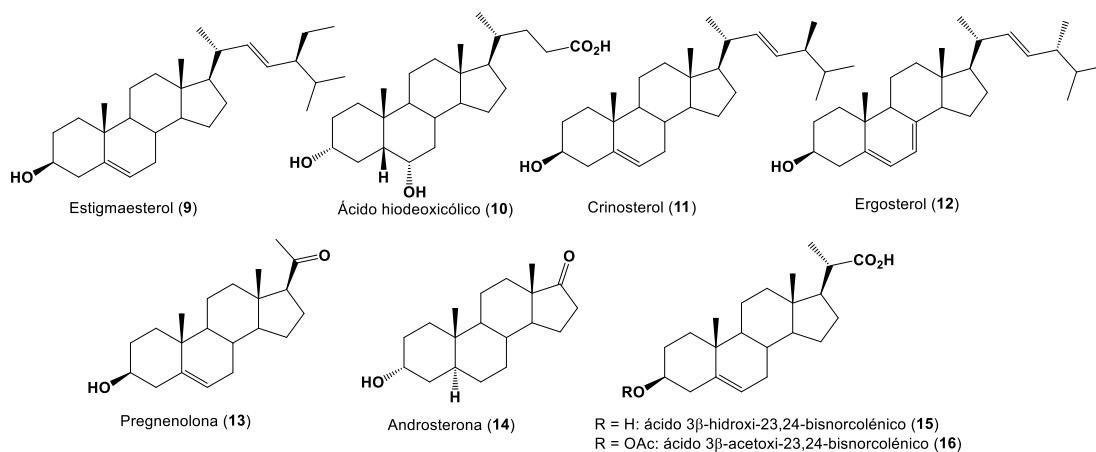


Figura 1.5: Estructura de esteroides que se han utilizado como precursores en la síntesis de brasinoesteroides naturales y sus análogos.

Para la síntesis de anillos A/B funcionalizados, se utilizan precursores como esteroides, pregnenolona (**13**), androstenolona (**14**), alcaloides esteroideales y sapogininas. Existe un gran número de investigaciones dedicadas a la síntesis a partir de estos compuestos, como la funcionalización 2 α ,3 α -diol [14,21,28–35]. Para lograr la introducción de la lactona en el anillo B desde 6-oxoesteroides, el método más común es la oxidación de Baeyer-Villiger con CF₃CO₃H [36,37] o ácido *m*-cloroperoxibenzóico [38,39]. En la reacción se forman dos regioisómeros (derivados 7-oxolactona y 6-oxolactona), y la proporción de estos productos depende de la naturaleza electrónica de los sustituyentes en el anillo A [13,28].

La presencia de dos grupos hidroxilo en C-3 y C-6 en el ácido hioideoxicólico lo presentan como un atractivo material precursor en la síntesis de análogos de BRs [40–42].

1.6 Análogos sintéticos con modificación de la cadena lateral.

Si bien, a partir de las múltiples investigaciones realizadas para determinar la actividad biológica de una amplia gama de derivados de brasinoesteroides, se ha logrado definir las principales características estructurales de los anillos que estas moléculas deben poseer para exhibir una alta actividad de crecimiento vegetal. Sin embargo, la funcionalidad en la cadena lateral aún no se encuentra del todo definida [43–47]. Es así como se han reportado las síntesis de un considerable número de análogos con importantes modificaciones en la cadena lateral y que han demostrado tener algún tipo

de actividad en crecimiento [43–48]. En la Figura 1.6 se muestran algunos ejemplos de estructuras de análogos de BRs con importantes modificaciones en la cadena lateral.

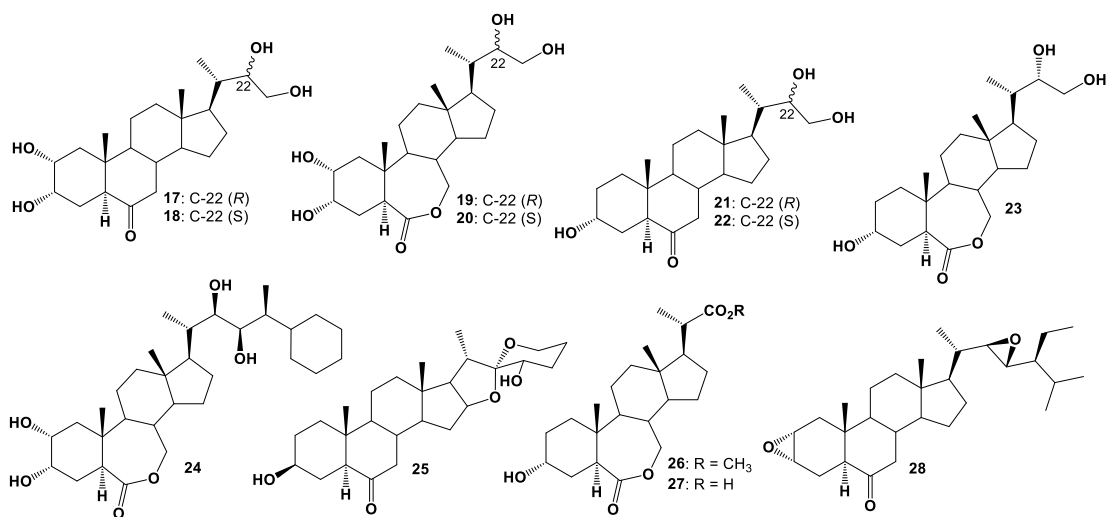


Figura 1.6: Estructura de análogos de brasinoesteroides con importantes modificaciones en la cadena lateral.

En cuanto al tamaño de la cadena lateral, se han realizado estudios donde se indica las propiedades que favorecen la actividad biológica [48], dentro de los cuales se indica la presencia de la función C-22 hidroxilada, C-23 hidroxilo o grupos aceptores de puentes de hidrógeno (aunque su aporte a la actividad biológica es menos relevante), grupos atrectores de electrones (halógenos) en la cadena, preferencia por ramificaciones por sobre la elongación de la cadena [48]. En cuanto a este último punto, se han realizado diversos esfuerzos para sintetizar BRs de cadena lateral más corta con distintos tipos de funcionalizaciones [30,45,49–51], así como derivados del tipo pregnanos y 23,24-dinorcolánicos [46,51,52]. En la Figura 1.7 se muestran algunos ejemplos de análogos de BRs con de cadenas laterales más cortas en forma de éteres, ácidos carboxílicos y ésteres.

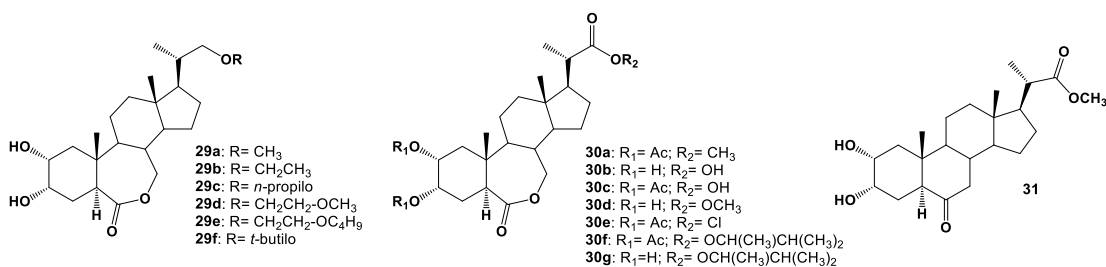


Figura 1.7: Análogos de brasinoesteroides con cadenas laterales del tipo 23,24-dinor colánicos, funcionalizadas en forma de glicoles, éteres, ésteres y ácidos carboxílicos.

La actividad biológica de BRs de cadena corta ha sido analizada para la serie (**29a-29f**) por medio del bioensayo del segundo entrenado de frijol, donde el compuesto **29b** exhibió la mayor actividad de la serie [32]. En cuanto a la serie (**30a-30g**), la actividad de crecimiento vegetal se estudió mediante las pruebas de curvatura del primer entrenado y elongación del segundo entrenado de frijol, donde se observó que el compuesto **30b** posee una actividad destacable dentro de su serie en ambos ensayos, lo que abrió la posibilidad de encontrar análogos de BRs más simples estructuralmente, sin comprometer la actividad biológica [30]. Cabe comentar que la actividad biológica del compuesto **31** preparado desde 23,24-dinorcolanos no fue informada [53], lo que crea una oportunidad de estudiar la actividad biológica de análogos de BRs de cadena lateral corta y con función 6-oxo.

En cuanto a los sustituyentes en análogos de BRs de cadena corta, un caso interesante de analizar es la posibilidad de incorporar sistemas aromáticos (arilbrasinoesteroides) a la cadena, ya sea heterocíclicos o sustituidos. Por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 1.8, se sintetizaron (*22R,23R*)-23-arilbrasinoesteroides *o*-sustituidos, *p*-sustituidos, *m*-sustituidos y polisustituidos con grupos atractores y dadores de electrones (halógenos y alquílicos, respectivamente) [49,53,54]. De estos compuestos cabe destacar la alta actividad de los análogos **33** y **34** en el ensayo de alargamiento de hipocótilo de *Arabidopsis det-2* y en el ensayo del segundo entrenado de frijol francés [55]. Por otra parte, los análogos fluorados en posiciones *p* y *o* **36** y **38** mostraron actividades biológicas similares a las del compuesto 24-epicasterona (**4**). En cuanto a las lactonas de la serie **37a-37h**, destaca la actividad de **37c** en el ensayo del segundo entrenado de frijol francés, comparable a la del Brasinólido (**1**). Cabe destacar que el compuesto precursor **37a** también mostró una excelente actividad biológica en dicho ensayo [55]. Entre los arilbrasinoesteroides halogenados, los análogos más activos fueron **36**, **38a** y **39b** [49]. También se determinó que, en general, la presencia de grupos voluminosos (fenilo, *t*-butilo o metilo) disminuye la actividad biológica [49].

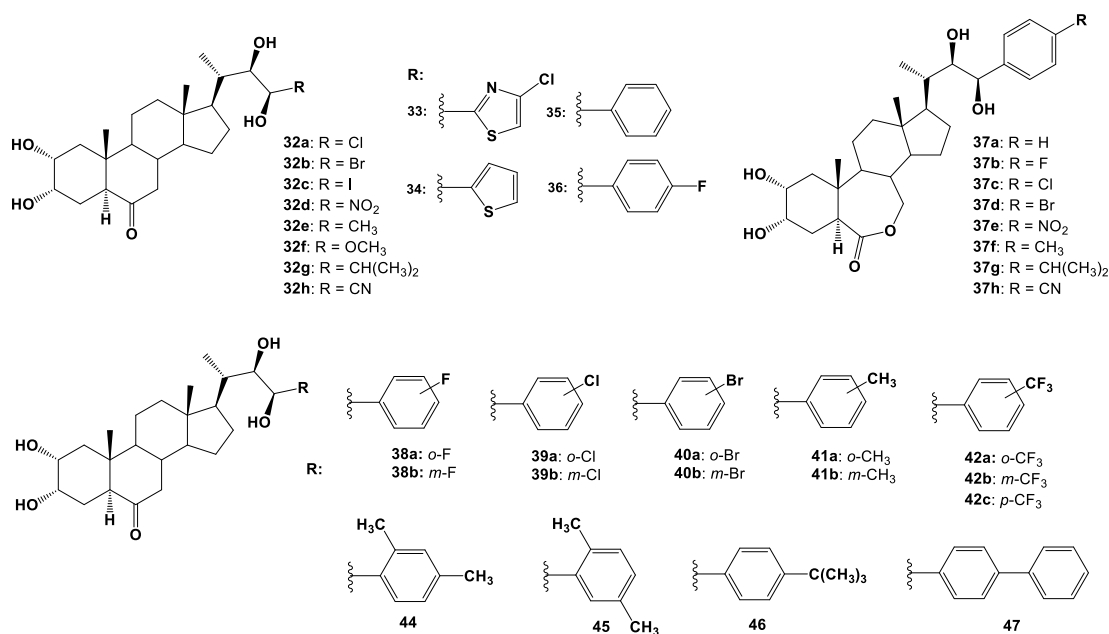


Figura 1.8: Estructuras de (22R,23R)-23-arilbrasinosteroides.

Finalmente, en investigaciones recientes se sintetizaron derivados de ésteres benzoatos en la cadena lateral (Figura 1.9) utilizando el ácido hideoxicólico (**10**) como precursor [56]. La actividad de crecimiento vegetal de estos compuestos fue evaluada mediante el ensayo ILA, donde los análogos **48a** y **48b** mostraron una actividad biológica comparable con la brasinólida (**1**) [57]. También se determinó que la incorporación de las dos funciones de benzoatos en C-22 y C-23, disminuye la actividad biológica [57].

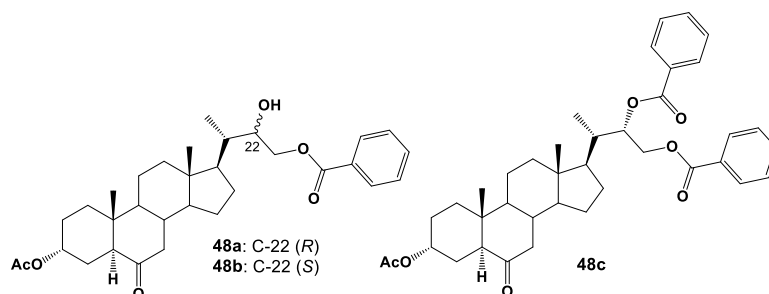


Figura 1.9: Análogos de brasinosteroides del tipo 24-norcolanos con ésteres de benzoatos en la cadena lateral.

1.7 Receptores de BRs y estudios in silico de acoplamiento molecular (Molecular Docking).

En las últimas décadas, diversos estudios de genética molecular, utilizando plantas modelo tales como *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, han llevado a la identificación de

numerosos genes involucrados en la biosíntesis y regulación genética de los BRs. Estos estudios, sumados a aproximaciones bioquímicas recientes han logrado desentrañar varios aspectos de la señalización de BRs [58], entre ellas destacan las vías de señalización necesarias para la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, basadas en la identificación de los blancos directos de las proteínas BRASSINAZOLES-RESISTANT1 (**BZR1**) y BR-INSENSITIVE1 (**BRI1**)-EMS-SUPPRESSOR1(BES1)/BZR2, las cuales son los receptores de BRs involucrados en la actividad de crecimiento vegetal [59]. Los BRs se perciben en la superficie celular mediante la unión directa al dominio extracelular (ECD) del receptor de membrana BR-INSENSITIVE1 (**BRI1**), perteneciente a la familia de receptores tipo kinasa (**RK**) con unidades repetidas en leucina (**LRR-LRK**), caracterizadas por un dominio **LRR** extracelular, un segmento de un paso transmembrana, y un dominio kinasa citoplasmático intracelular [45,60]. La estructura del dominio de la unión ligando-receptor tiene forma de superhélice (Figura 1.10) compuesta de una secuencia de señal N-terminal, seguida de unidades de leucina repetidas (25 LRR) retorcidas, creando un empaquetamiento de forma de herradura con un diámetro interno de 30 Å (Figura 1.10) [61]. Un dominio de isla de 70 aminoácidos entre los LRR-21 (Ser561-Gln583) y el LRR-22 (Asn653-Ser677) se pliega hacia el interior de la superhélice, creando un bolsillo en la superficie donde se unen los BRs (Figura 1.10) [45].

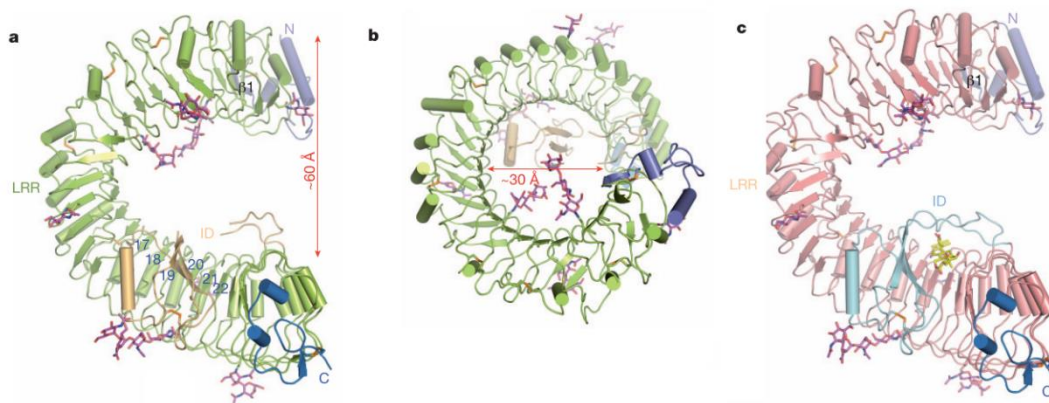


Figura 1.10: BRI1 (LRR) posee una estructura selenoide helicoidal: a) Estructuras del receptor BRI1 (LRR) vista lateralmente. **b)** Estructura del BRI1 vista de forma frontal. Las N-acetilglucosaminas (dominio isla) se muestran en color magenta. Los enlaces disulfuro se muestran en color naranja. **ID**, corresponde al dominio de inserción del ligando. Los extremos N- y C- terminales se muestran en gris y azul marino, respectivamente. Los números en azul indican las posiciones de los LRR. La lámina β ($\beta 1$) del extremo N-terminal está delimitada. **c)** Estructura del receptor BRI1 unido a un BRs (en amarillo) [61].

El receptor BRI1 se encuentra generalmente en forma de homodímero y su forma permanece prácticamente inalterada durante la unión con los BRs, excepto por un reordenamiento en los bucles en el interdominio kinasa alrededor de su sitio activo, que puede ser asociada con la señalización inducida por estos ligandos [61]. Esta interacción lleva a la fosforilación de BRI1 [62], quien heterodimeriza con su co-receptor BAK1 (Receptor kinasa 1 asociado a BRI1) y se disocia de su regulador negativo BKI1 (Inhibidor Kinasa 1 BRI1), lo que estimula la actividad de la kinasa [58]. La activación del BRI1 induce la activación de la proteína kinasa BUS1 (Supresor 1 de BRI1), desactivando BIN2 (Brassinosteroid-insensitive 2) por desfosforilación. Es entonces que BIN2 es degradada por las proteasas citoplasmáticas. La inhibición de BIN1 permite la activación de dos factores de transcripción que son mediadores en los cambios transcripcionales inducidos por los BRs, conocidos como BZR1 (BRASSINAZOLES-RESISTANT1) y BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1), también conocido como BZR2 [58].

Debido a la importancia biológica de la interacción BRI1-BRs, en los últimos años han aumentado los estudios referentes al tema. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la interacción entre la brasinólida (**1**) u otros BRs naturales, y el receptor BRI1 [45,58,61,63–65], por lo que actualmente existen pocas evidencias de investigaciones relacionadas con el modo de unión de los análogos sintéticos de BRs al complejo BRI1-BAK1 en las plantas. Estudios recientes afirman que la pose en que los BRs se unen al receptor depende mayoritariamente del número de residuos no-polares en la ranura del sitio activo, formando un bolsillo hidrofóbico que interactúa con las zonas apolares de los anillos y la cadena lateral de los Brs [45]. En la actualidad, el diseño de fármacos asistido por computador (CADD, por sus siglas en inglés) es utilizado con frecuencia para predecir compuestos que puedan tener algún tipo de actividad en un receptor. Las ventajas de estos métodos reside en su bajo costo y poco tiempo empleado [66]. En particular, la afinidad de enlace de un gran set de moléculas de prueba en una enzima es estimada utilizando la técnica de docking molecular, que es un procedimiento computacional que permite predecir la unión no-covalente entre una macromolécula (receptor) y una molécula pequeña (ligando) de manera eficiente, a partir de la optimización sus estructuras individuales, obtenidas desde bases de datos experimentales (RMN, cristalografía con difracción de rayos X y el Protein Data Bank), simulaciones moleculares, entre otras [66,67]. Entre los softwares más utilizados para realizar docking molecular, destacan Autodock4 (AD4) y Autodock Vina (Vina), que son

paquetes de código libre que pueden determinar con una gran velocidad la afinidad ligando-receptor. Estudios recientes indican que Vina realiza predicciones de afinidad ligando-receptor con mayor certeza que AD4 al realizar cálculos cortos, es por esto que el programa se ha vuelto más popular que AD4 y por qué se utilizará en este proyecto [66,68].

Respecto a estudios de Docking Molecular en aril-brasinoesteroides, cabe destacar la investigación realizada por Korinkova, *et al.*, quienes analizaron una serie de nuevos análogos de Brs sintetizados con el fin de comparar los resultados obtenidos en estudios biológicos (biotest de inhibición del gisante y la prueba de sensibilidad de la raíz de *Arabidopsis*) [49]. Para esto utilizaron el software Autodock Vina y las poses de algunos de sus análogos sintetizados se muestran en la Figura 1.11.

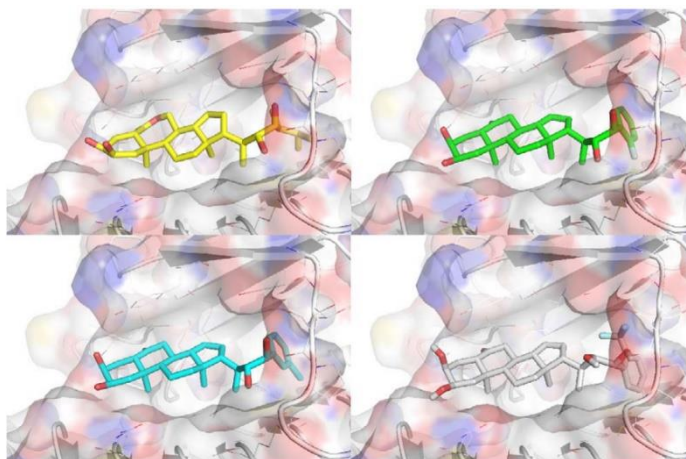


Figura 1.11: Poses del compuesto 24-epibrasinólida (**2**) (amarillo) y tres nuevos análogos de BRs, **38** (verde), **39b** (calipso) y **42a** (gris) en el sitio de unión de BR11.

En base a la alta actividad biológica presentada por derivados aril-brasinoesteroideales, en especial aquellos con cadenas laterales del tipo 23,24-dinor colánicos (Figura 1.7), la actividad de análogos de brasinoesteroide del tipo 24-norcolanos con un grupo éster de benzoatos en la cadena lateral (compuestos **48a** y **48b**) mostrados en la Figura 1.9 y la interesante actividad biológica de crecimiento vegetal que exhiben derivador de aril-BRs halogenados, especialmente los compuestos con átomos de Flúor en el anillo aromático (Figura 1.8), es que en este proyecto de Tesis se propone un estudio de acoplamiento molecular, síntesis y evaluación de la actividad biológica de una serie de nuevos análogos de Brasinoesteroides con cadena lateral de tipo 23,24-bisnorcolánicos, con función Benzoato en el C-22 y sustituyentes mono y di-fluorados en el anillo aromático (Figura

1.12). Para esto, se realizarán estudios de docking molecular a los compuestos a sintetizar, además de la brasinólida (**1**), que se utilizará como patrón de referencia, y se realizará la ruta de síntesis que permita obtenerlos con un buen rendimiento. Una vez sintetizados, se realizarán estudios de actividad biológica mediante los ensayos ILA y SEF, para posteriormente validar el estudio de docking molecular a través de la comparación de la actividad biológica obtenida en las simulaciones y de forma experimental.

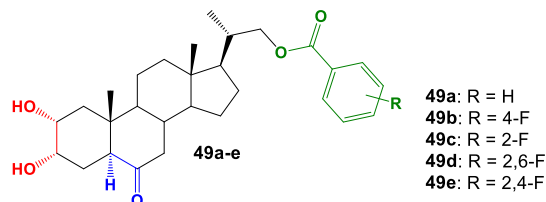


Figura 1.12: Estructuras de nuevos análogos de Brasinoesteroides de tipo 23,24-bisnorcolénicos a estudiar en esta investigación.

En cuanto a la estructura general de estos nuevos análogos de BRs, por antecedentes bibliográficos se definió que debían poseer: a) Grupo 2 α ,3 α -diol en el anillo A, b) Fusión de anillos A/B tipo trans y c) Función 6-oxo en el anillo B.

CAPITULO 2 - HIPÓTESIS Y OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN

HIPOTESIS

Los nuevos análogos de Brasinoesteroides de tipo 23,24-bisnorcolanos, con funciones 2 α ,3 α -diol en el anillo A, fusión de anillos A/B tipo trans, función 6-oxo en el anillo B y función benzoato en C-22, con sustituyentes mono y di-fluorados en el anillo aromático, presentarán una alta interacción con el receptor BRI1 y, además, exhibirán actividad biológica de crecimiento vegetal en los bioensayos de inclinación de la lámina de arroz (ILA) y segundo entrenado de frijol (SEF).

2.1 Objetivos Generales

Sintetizar una serie de nuevos análogos de Brasinoesteroides con funciones 2 α ,3 α -diol en el anillo A, fusión de anillos A/B tipo trans, función 6-oxo en el anillo B y función benzoato en C-22, con sustituyentes mono y di-fluorados en el anillo aromático, evaluar la unión al receptor BRI1 mediante un estudio de docking molecular, evaluar la actividad biológica de crecimiento vegetal de los compuestos sintetizados, para finalmente proponer una Relación Estructura-Actividad entre la posición de los sustituyentes con flúor y la unión al receptor.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Realizar un estudio de docking molecular de las nuevas series de análogos de Brasinoesteroides propuestos (**49a-e**) con el fin de determinar los compuestos más promisorios (Figura **2.1**).
- ii. Sintetizar los análogos de la serie **49a-e**, a partir del precursor ácido 3 β -acetil-23,24-bisnorcolénico (**16**), de acuerdo con las rutas de síntesis mostrada en los Esquemas 1 y 2. Realizar la caracterización por técnicas espectroscópicas de IR, EM y RMN. Además, de caracterizar por medio de punto de fusión, de todos los compuestos intermedios y finales sintetizados.
- iii. Evaluar la actividad biológica de los análogos sintetizados **49a-e** en los bioensayos de inclinación de la lámina de arroz (ILA) y segundo entrenado de frijol (SEF).

- iv. Contrastar el estudio de docking molecular con los resultados de los estudios de actividad biológica realizados para las dos series de nuevos análogos de brasinoesteroides.

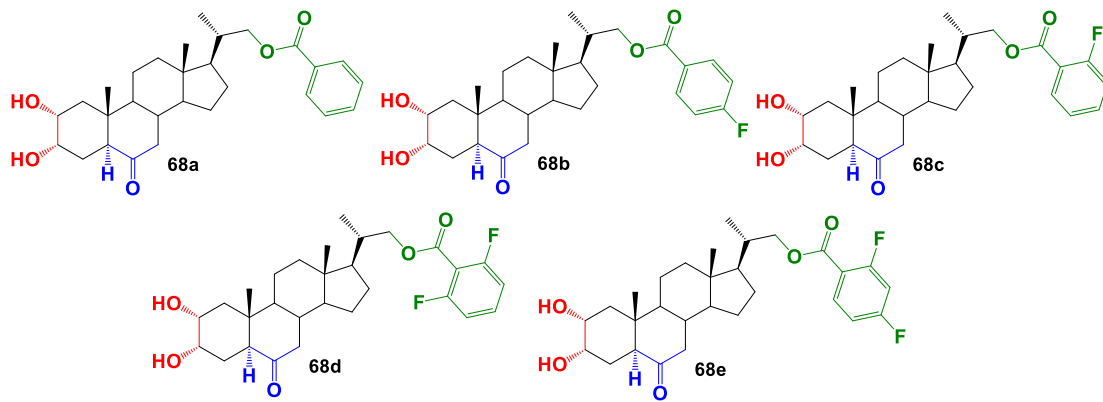


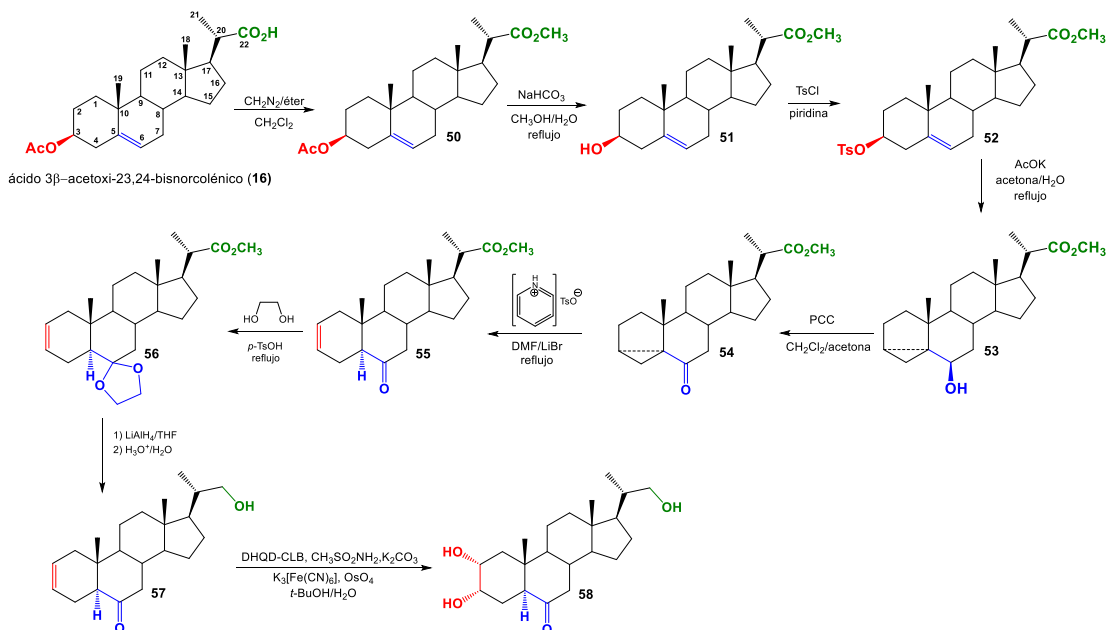
Figura 2.1: Nuevos análogos de brasinoesteroide de tipo 23,24-bisnorcolénicos a ser estudiados en esta investigación.

CAPÍTULO 3 - METODOLOGÍAS

3.1 Metodología síntesis químicas

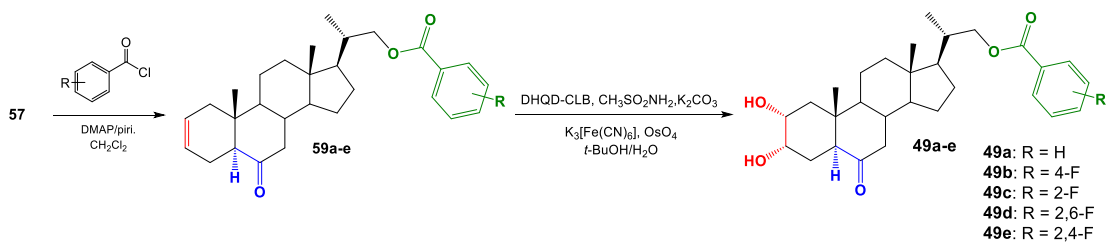
Se utilizará el ácido 3 β -acetil-23,24-bisnor-5-cólenico (**16**) como material de partida, que está disponible en el mercado, posee un costo relativamente bajo, y tiene las funciones orgánicas en posiciones adecuadas para las transformaciones químicas necesarias que permitirá la obtención de los nuevos análogos **49a-e**. Este producto se obtiene por ozonólisis de estigmasterol (**9**) [69].

En una primera etapa se procederá a la obtención de intermedio avanzado **58** (Esquema 1), desde ácido 3 β -acetil-23,24-bisnor-5-cólenico (**16**), siguiendo la ruta de síntesis indicada en el Esquema 1, reportada previamente la cual se resume a continuación: tratamiento de **16** por esterificación con CH₂N₂, producirá el derivado esterificado **50** [53]. Saponificación selectiva del grupo acetato en C-3 con el sistema NaHCO₃/MeOH/H₂O bajo reflujo permitirá la obtención del derivado **51** [53]. Posteriormente el grupo hidroxilo en posición C-3 β , se tosilará con p-TsCl/piridina, lo que permitirá la obtención del derivado **52** [53]. Desde aquí en adelante se procederá con el procedimiento clásico llamado transposición de isoesteroide, aplicada ampliamente para esteroides del tipo 5 Δ -3 β -tosilo o 5 Δ -3 β -mesilo [53,70], la cual consiste en realizar una reacción de solvólisis del tosilato **52** con AcOK/acetona bajo condiciones de reflujo, que permitirá la introducción del grupo hidroxilo en C-6 y la formación del anillo de ciclopropano en posición C-3 y C-5 (3,5-cicloesteroide) generando el compuesto **53** [53,70,71]. La función hidroxilada en C-6 será oxidada a cetona mediante el uso de clorocromato de piridinio (PCC) o reactivo de Jones en CH₂Cl₂ y acetona [72], obteniéndose el intermediario **54**, cuyo anillo de ciclopropano será abierto mediante el tratamiento con Bromuro de Litio (LiBr) en *N,N*-dimetilacetamida en presencia de tosilato de piridinio bajo condiciones de reflujo para formar el alqueno **55** [53] (Esquema 1). Protección del grupo cetona en C-6 del intermedio **55** con etilenglicol en medio ácido permitirá la formación del acetal **56** [73]. Reducción de la función éster en el C-22 de **56**, utilizando LiAlH₄ en THF, seguido de tratamiento ácido formará el intermedio avanzado **57** [74]. Adicionalmente desde **57** se sintetizará el triol **58** por reacción de dihidroxilación de Sharpless [45,56], con el objetivo de evaluar el efecto biológico de este compuesto comparado con los análogos benzoilados **49a-d**.



Esquema 1: Ruta de síntesis propuesta para la obtención del intermedio avanzado 57, desde 3β-acetil-23,24-bisnor-5-colónico (16).

El grupo hidroxilo en C-22 será esterificado con los cloruros de acilo correspondientes (dependiendo de la funcionalización del anillo aromático), para formar los compuestos **59a-e** [46,56] (Esquema 2), los cuáles finalmente serán sometidos a la reacción de dihidroxilación de Sharpless [45,56] con el fin de obtener los nuevos análogos de la serie **49a-e**, según se indica en Esquema 2.



Esquema 2: Obtención de los nuevos análogos de BRs **49a-e** desde el intermedio avanzado 57.

3.1.2 Métodos instrumentales de caracterización de los compuestos a sintetizar.

Puntos de fusión (PF): Los puntos de fusión serán medidos utilizando el equipo StuartTM melting point apparatus SMP3, el cual posee un bloque de calefacción que acomoda 3 tubos capilares. Para el control de temperatura, el aparato cuenta con sensores Pt100. La calefacción es programable, con opciones de calentamiento rápido a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ a unos

pocos grados del punto de fusión esperado y así como también cuenta con velocidades de rampa más lentas.

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

Espectros de Masas de Alta Resolución (HRMS-ESI), se registrarán 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 (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT-135, 2D-HSQC y 2DHMBC) serán registrados en un espectrómetro digital Bruker Avance NEO 400. Las mediciones serán llevadas a cabo utilizando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3) al 99,8% o metanol deuterado (CD_3OD) al 99,8%. Los desplazamientos químicos (δ) serán expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento J en Hertz (Hz). Como referencia se utilizará el desplazamiento químico de las señales residuales para los espectros de ^1H : $\delta \text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm, $\delta \text{CD}_3\text{OD}(1) = 3,30$ ppm, $\delta \text{CD}_3\text{OD}(2) = 4,78$ ppm; y las señales para los espectros de ^{13}C : $\delta \text{CDCl}_3 = 77,00$ ppm y $\delta \text{CD}_3\text{OD} = 49,0$ ppm.

3.2 METODOLOGÍA ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.2.1. Ensayo 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 utilizarán semillas de arroz (*Oryza sativa*) variedad Zafiro (un cultivar local de arroz) 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 la brasinóida (**1**) y los análogos de BRs (10-6, 10-7, 10-8 M) y el 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 [57]. (Versión modificada [18]). El control positivo utilizado será la brasinólida (**1**) (APE***BIO**).

3.2.2 Ensayo del segundo entrenado del frijol (SEF)

Se germinarán semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., var. Pinto) durante dos días y se plantarán las semillas seleccionadas en macetas que contengan perlita, vermiculita y sustarto. Las macetas se pondrán en una sala de cultivo o cámara de crecimiento con luz controlada (25-27 °C, con luz de 48 W/m², en período claro/oscuridad de 16h/8h). Se tratarán grupos de ocho plántulas de frijol de 7 días de edad con segundos entrenados de 1-2 mm de largo, con diferentes concentraciones de los compuestos. Las medidas se realizarán después de 5 días. La diferencia entre la longitud del segundo entrenado de las plantas tratadas y de control se usará como una medida de la actividad [53].

La medida será informada como el promedio de la prolongación exhibida (en [mm]) ± la desviación estándar, para la evaluación estadística se utiliza la prueba de *t* de Student. Se obtendrán datos de n=6-10 repeticiones.

3.2.3 Estudios iniciales de docking molecular.

Para evaluar la actividad potencial de los compuestos objetivo, se realizará un screening virtual basado en las estructuras de los nuevos análogos de BRs. Las coordenadas de rayos X de las proteínas en complejo con sus ligandos se extraen del Banco de datos de proteínas. Las estructuras PDB se preparan para el acoplamiento utilizando Protein Preparation Workflow (Maestro Schrodinger, LLC, Nueva York, NY, 2021). El receptor se optimiza usando campos de fuerza OPLS4 antes del estudio Docking. Los grid se generan utilizando las proteínas preparadas, con las rejillas de acoplamiento en el centro de cada ligando ubicado en la proteína. Los ligandos se generan y preparan utilizando LigPrep implementado en Maestro 13.1 Los ligandos se acoplan utilizando el protocolo de acoplamiento XP sin restricciones y un factor de escala de radio de 0.80 van der Waals (vdW) y 0,15 corte de carga parcial. Las posturas de ligando generadas se evalúan con función de puntuación empírica. GlideScore, una versión modificada de ChemScore, implementada en Glide [75], se utiliza para estimar la afinidad de unión y clasificar los ligandos. Glide emodel se utiliza para estimar la pose mejor acoplada para

cada ligando, así como Glide Score [76] se utiliza para estimar la afinidad de unión [77]. Los resultados de acoplamiento se ordenan por GlideScore y la mejor clasificación.

3.4 Materiales y equipos: Síntesis orgánica

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 sodio anhidro (Na_2SO_4) y/o cloruro de calcio anhidro (CaCl_2).

- Hexano COMERCIAL VIMARONI S.A. (destilación entre 60° a 80° C).
- Acetato de etilo QUIMICA PASSOL (destilación a 77° C).
- Diclorometano QUIMICA PASSOL (destilación a 40° C).
- Metanol, 99% pureza, QUIMICA PASSOL procedencia nacional.
- Acetato de etilo, técnico, (purificado por destilación a 77°C).
- Hexano, técnico (purificado por destilación entre 60 a 80° C).
- Diclorometano, técnico, (purificado por destilación a 40°C).
- Acetona, técnica, COMERCIAL VIMARONI S.A. (purificada por destilación a 56,5 °C).

3.5 Insumos

- Cromatoplasmas de sílicagel 60 F₂₅₄ MERCK.
- Sílica gel para cromatografía en columna (0,040-0,063 mm), MERCK.
- Sulfato de magnesio, fraccionado por Distribuidora Científica.
- Bicarbonato de sodio, p.a, Merck.
- Carbonato de potasio, Merck.
- Cloruro de calcio anhidro, Merck.
- Sulfato de sodio, Fluka-Garantie.

3.6 Reactivos

- Ácido 3β-acetil-23,24-bisnorcolénico p.a, 96%, MERCK.

- Ácido sulfúrico, técnico, 98%, 1,84 g/mL.
- Ácido clorhídrico, p.a, 37%, 1,19 g/mL, MERCK.
- Anhídrido acético, BDH.
- Borohidruro de sodio, p.a, 98%, MERCK.
- Cloro cromato de piridina (PCC), p.a, 98%, SIGMA ALDRICH.
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP), Merck.
- N-metilmorfolina N-óxido, p.a, 99%, MERCK.
- Piridina, p.a, FLUKA.
- NaHCO₃, Aldrich.
- Carbonato de potasio 15% p/v.
- Solución reveladora H₂SO₄ 10% v/v.
- Ácido clorhídrico 2,5% v/v.
- Ácido clorhídrico 10% v/v.
- Tetraóxido de osmio, 4% v/v, MERCK
- *p*-clorobenzoato de piridinio (DHQD-CLB), Merk.
- Metansulfonamida, Merk.
- Hexacianoferrato de Potasio, Merk.
- Tetraoxido de Osmio, Sigma Aldrich.

3.7 Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas cromatográficas de Sílica gel 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.

3.8 Cromatografía en columna

Se realizaron con Sílica gel Merck 60 (0,032 -0,063 mm) o Sílica gel 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.

3.9 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 brasinólida (**1**), $C_{28}H_{48}O_6$, adquirido desde Sigma-Aldrich.
- Los fungibles principales fueron materiales de plásticos como placas petri, tubos eppendorf y falcón 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.
- Instrumentos: micropipetas, bisturí, transportador.

Los equipos utilizados fueron:

- Gabinete de Bioseguridad Marca NUARE.
- Cámara de crecimiento de plantas (BIOBASE 50L), 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.

3.10 Abreviaturas y Siglas

- Ac_2O : Anhídrido acético.
- $AcOEt$: Acetato de etilo.
- $AcOH$: Ácido acético.
- anh. : Anhidro.
- BRs : Brasinoesteroides.
- CC : Cromatografía en columna.
- CCF : Cromatografía en capa fina.
- DCM : Diclorometano.
- DMAP : 4-dimetil amino piridina.
- Et_2O : Éter dietílico.
- Hex. : Hexano.
- $MeOH$: Metanol.
- N_2 : 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.

3.11 Abreviaturas en resonancia magnética nuclear

- RMN : Resonancia Magnética Nuclear.
- δ : 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.
- $^2J_{HC}$ y $^3J_{HC}$: acoplamiento escalar heteronuclear H-C a dos y tres enlaces, respectivamente.
- $^1J_{CF}$, $^2J_{CF}$, $^3J_{CF}$ y $^4J_{CF}$: acoplamiento escalar heteronuclear C-F a uno, dos, tres y cuatro 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.

- $^{*}\text{C}$: Asignación intercambiable con otro carbono marcado con asterisco.

3.12 Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo

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

3.13 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 $\text{NH}_3 + 1$.

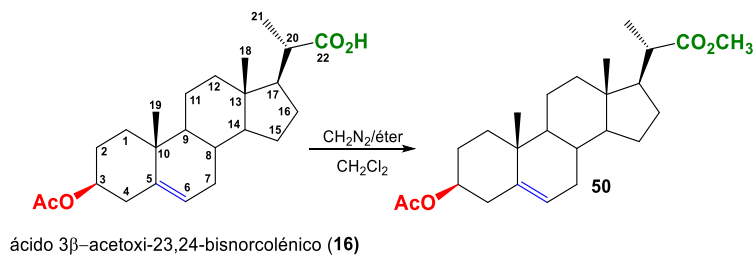
3.14 Abreviaturas de Acoplamiento Molecular

- BRI1: Brassinosteroid Intensitive- 1
- BAK1: Proteína destructora del antagonista homólogo bcl-2
- PDB: Protein Data Bank

Capítulo 4 Parte Experimental

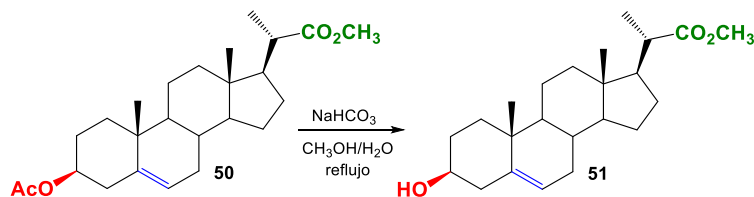
4. 1 Síntesis de compuestos

4. 1.1 (20S)-3β-Acetoxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (50)



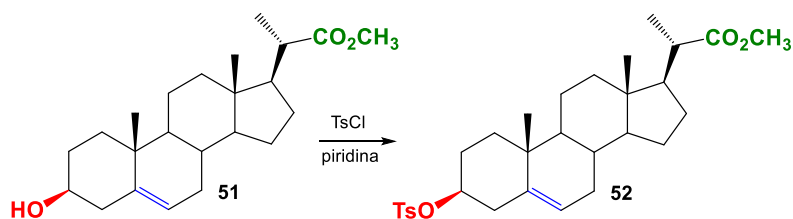
En un balón se disolvieron 2,00 g (5,16 mmol) de **16** en 10 mL de CH₂Cl₂. Se agregó 20 mL de CH₂N₂ y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. El monitoreo de la reacción se realizó mediante CCF. Posteriormente, el solvente se eliminó a presión reducida en rotavapor, obteniendo 2,05 g (5,09 mmol) de compuesto **50** (98,6%). Sólido incoloro (p.f. = 147,9-152,8 °C (144-146 °C [53])). IR_{vmax} (cm⁻¹): 3060 (C=C-H); 2938 (CH₃-); 2898 (CH₂-); 2848 (CH₂-); 1734 (C=O); 1715 (C=O); 1466 (CH₂-); 1386 (CH₃-); 1262 y 1065 (C-O). ¹H RMN (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,36 (1H, da, J = 5,1 Hz, H-6); 4,63-4,55 (1H, m, H-3); 3,64 (3H, s, OCH₃); 2,42 (1H, dc, J = 10,8 y 6,9 Hz, H-20); 2,02 (3H, s, CH₃CO); 1,19 (3H, d, J = 6,7 Hz, H-21); 1,01 (3H, s, H-19); 0,68 (3H, s, H-18). ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177,30 (C-22); 170,51 (CH₃CO); 139,62 (C-5); 122,47 (C-6); 73,90 (C-3); 56,22 (C-14); 51,31 (OCH₃); 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 (CH₃CO); 20,93 (C-11); 19,29 (C-19); 17,11 (C-21); 12,00 (C-18). Los datos espectroscópicos de IR y ¹H RMN fueron consistentes con los reportados [53].

4.1.2 (20S)-3β-hidroxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (51)



Se preparó una solución del compuesto **50** (2,00 [g]; 4,97 [mmol]) en 210 [mL] de una solución 20:1 MeOH-H₂O. Posteriormente, se agregó 1,95 g de NaHCO₃ (23,2 mmol) y la mezcla se llevó a reflujo por 2 h. Una vez finalizada la reacción, se eliminó el solvente a presión reducida y el sólido se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 20 [mL]). La fase orgánica resultante se lavó con una solución saturada de NaCl, hasta llegar a pH neutro. A la fase orgánica se le agregó MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida, obteniéndose finalmente 1,67 [g] (4,65 mmol) de compuesto **51** (93,6%). Sólido incoloro (p.f. = 142,3-144,1 °C [141-142 °C], [53]). **IR**_{vmax} (cm⁻¹): 3497-3417 (O-H); 2938 (CH₃-); 2896 y 2849 (CH₂-); 1735 y 1716 (COO); 1459 (CH₂-); 1382 (CH₃-); 1274 y 1055 (C-O). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,34-5,33 (1H, da, *J* = 5,3 Hz, H-6); 3,64 (3H, s, O-CH₃); 3,55-3,48 (1H, m, H-3); 2,42 (1H, dc, *J* = 10,4 y 6,8 Hz, H-20); 2,31-2,19 (2H, m, H-4); 2,00-1,19 (2H, m, H-7 y H-12), 1,86-1,82 (2H, m, H-2 y H-1), 1,18 (3H, d, *J* = 6,9 Hz, H-21); 1,00 (3H, s, H-19); 1,00-0,91 (1H, m, H-9); 0,69 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177,36 (CH₃CO); 140,71 (C-5); 121,51 (C-6); 71,70 (C-3); 56,29 (C-14); 52,83 (C-17); 51,31 (OCH₃); 50,01 (C-9); 42,44 (C-20); 42,37 (C-13); 42,22 (C-4); 39,50 (C-12); 37,20 (C-1); 36,45 (C-10); 31,85 (C-8); 31,77 (C-7); 31,58 (C-2); 27,12 (C-16); 24,29 (C-15); 20,98 (C-11); 19,35 (C-19); 17,08 (C-21); 11,98 (C-18).

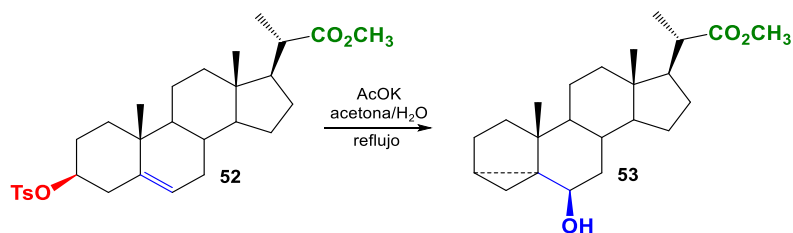
4.1.3 (20*S*)-3β-(4-toluensulfoniloxi)-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (**52**)



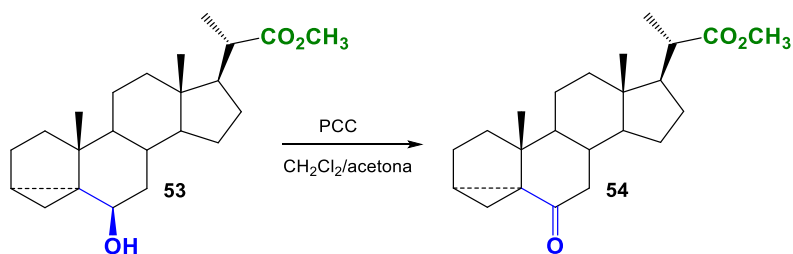
Se disolvió 1,0 g (2,49 mmol) de **51** en 30 mL de piridina. Se agregó 4,03 g de Cloruro de Tosilo (21,1 mmol) y 161 mg (1,31 mmol) de DMAP. La mezcla se agitó por 15 h a 45°C y el avance de la reacción se monitoreó por CCF. Posteriormente, la mezcla de reacción fue extraída en CH₂Cl₂ y lavada con una solución acuosa al 5% HCl, seguida de una solución saturada de NaCl hasta obtener un pH neutro. A la fase orgánica se le agregó MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida, para finalmente obtener 1,19 g (2,31 mmol) de compuesto **52** (92,9%). Sólido incoloro (p.f. = 127,3-128,1 °C [140-142 °C [53]]). **IR**_{vmax} (cm⁻¹): 2944 (C=C-H); 2902 (CH₃-); 2852 (CH₂-); 1734 (C=O); 1458 (CH₂-); 1363 (CH₃-); 1257 y 1053 (C-O). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,78 (2H, da, *J* = 8,3, H-2'); 7,31 (2H, da, *J* = 8,3, H-3'); 5,28 (1H, da, *J* = 5,3, H-6); 4,34-4,26 (1H, m, H-3); 3,62 (3H, s,

O-CH₃); 2,43 (3H, s, Ar-CH₃); 2,45-2,36(2H, m, H-4 y H-20); 2,25 (1H, ddd, $J = 13,2; 5,4$ y 1,7 Hz, H-4); 1,96-1,89 (2H, m, H-1 y H-12); 1,81-1,77 (2H, m, H-2 y H-7); 1,73-1,63 (2H, m, H-16 y H-2), 1,60-1,51 (2H, m, H-15 y H-17), 1,16 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, H-21); 0,95 (3H, s, H-19); 0,89 (1H, ddd, $J = 11,2, 11,2$ y 5.4 Hz, H-9); 0,66 (3H, s, H-18). ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 177,25 (CH₃CO); 144,37 (C-1'); 138,77 (C-5); 134,58 (C-4'); 129,69 (C-3'); 127,57 (C-2'); 123,30 (C-6); 82,22 (C-3); 56,14 (C-14); 52,75 (C-17); 51,28 (OCH₃); 49,75 (C-9); 42,36 (C-20); 42,30 (C-13); 39,34 (C-12); 38,77 (C-4); 36,79 (C-7); 36,26 (C-10); 31,67 (C-1); 31,66 (C-8); 28,53 (C-2); 27,04 (C-16); 24,21 (C-15); 21,58 (Ar-CH₃); 20,84 (C-11); 19,07 (C-19); 17,04 (C-21); 11,92 (C-18).

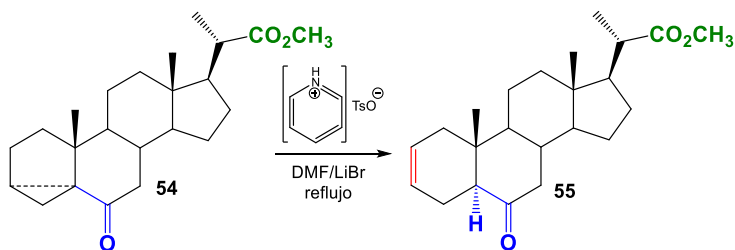
4. 1.4 (2*S*)-6*b*-hidroxi-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (**53**)



Se agregó Acetato de Potasio (5,47 g, NN mmol) a una solución de tosilato **52** (3,00 g, 5,83 mmol) en acetona (140 mL) y agua (40 mL), y la reacción se agitó a refluxo por 7 h. Luego, el exceso de acetona fue removido a presión reducida y la mezcla residual fue redisoluelta en 100 mL de CH₂Cl₂ y extraída 2 veces con 100 mL de solución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con MgSO₄ y el solvente se eliminó en el rotavapor. El residuo fue redisoluelto en 3 [mL] de CH₂Cl₂, mezclado con gel de sílice y cromatografiado en sílica gel con mezclas de AcOEt/hexano de polaridad creciente (0,2:9,8 → 3,0:7,0), obteniéndose finalmente 1,19 [g] (3,30 mmol) del compuesto **53** (56,7%). Sólido incoloro (p.f. = 125,8-127,0 °C). IR_{vmax} (cm⁻¹): 3489-3442 (O-H); 2934 (CH₃-); 2869 (CH₂-); 2851 (CH₂-); 1739 (C=O); 1458 (CH₂-); 1372 (CH₃-); 1253 y 1057 (C-O). ¹H RMN (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3,64 (3H, s, O-CH₃); 3,25 (1H, ta, $J = 2,8$ Hz, H-6); 2,47-2,39 (1H, m, H-20); 1,92 (1H, dt, $J = 12,3$ y 3,3 Hz, H-12); 1,18 (3H, d, $J = 6,9$, H-21); 1,05 (3H, s, H-19); 0,90-0,81 (2H, m, H-1 y H-9); 0,73 (3H, s, H-18); 0,52 (1H, ta, $J = 4,4$ Hz H-4_{gem}); 0,29 (1H, dd, $J = 8,1$ y 4,9 H-4_{trans/gem}). ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 177,41 (CH₃CO); 73,65 (C-6); 56,02 (C-14); 53,01 (C-17); 51,29 (OCH₃); 47,58 (C-9); 42,86 (C-10); 42,79 (C-13); 42,41 (C-20); 39,91 (C-12); 38,84 (C-5); 37,04 (C-7); 33,18 (C-1); 29,86 (C-8); 27,19 (C-16); 24,97 (C-2); 24,22 (C-3); 24,22 (C-15); 22,60 (C-11); 20,18 (C-19); 17,09 (C-21); 12,33 (C-18); 11,56 (C-4).

4.1.5 (2*S*)-6-Oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (**54**)

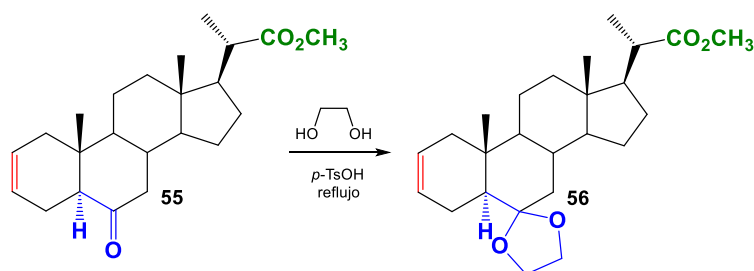
Se agregaron 2,5 mL de reactivo de Jones a una solución del hidroxí éster **53** (0,47 g, 1,30 mmol) en acetona (50 mL) a 0°C. La reacción se mantuvo en agitación a 0°C durante 20 min y el exceso de reactivo de Jones fue neutralizado con 5 mL de isopropanol. La acetona fue removida a presión reducida y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua (2x50 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y el solvente fue eliminado en rotavapor. El crudo de reacción fue redisolto en 3 mL de CH₂Cl₂, mezclado con gel de sílice y cromatografiado en sílica gel con mezclas de AcOEt/hexano de polaridad creciente (0,2:9,8 → 1,0:9,0), obteniéndose finalmente 0,33 g (0,92 mmol) del compuesto **54** (70,8 %). Sólido incoloro (p.f. = 111,0-112,9 °C (112,8-113,0 °C) [53]). IR_{vmax} (cm⁻¹): 2945 (CH₃-); 2871 (CH₂-); 1736 (C=O); 1687 (C=O); 1458 (CH₂-); 1368 (CH₃-); 1257 y 1052 (C-O). ¹H RMN (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3,64 (3H, s, O-CH₃); 2,47-2,37 (2H, m, H-20 y H-7); 1,97 (1H, dt, *J* = 12,5 y 3,3 Hz, H-12); 1,19 (3H, d, *J* = 6,7, H-21); 0,99 (3H, s, H-19); 1,03-0,85 (1H, m, H-1); 0,72 (3H, s, H-18); 0,72-0,70 (1H, m, H-4). ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 209,35 (C-6); 177,15 (CH₃CO); 56,49 (C-14); 52,74 (C-17); 51,84 (OCH₃); 46,67 (C-10); 46,25 (C-5); 45,97 (C-9); 44,64 (C-7); 42,72 (C-13); 42,32 (C-20); 39,42 (C-12); 35,31 (C-3); 34,71 (C-8); 33,42 (C-1); 27,03 (C-16); 25,84 (C-2); 24,04 (C-15); 22,74 (C-11); 19,63 (C-19); 17,06 (C-21); 12,15 (C-18); 11,63 (C-4).

4.1.6 (2*S*)-6-Oxo-5 α -pregna-2-eno-20-carboxilato de metilo (**55**)

Se añadió Tosilato de piridinio (59 mg, 0,24 mmol) y Bromuro de litio (67 mg, 0,78 mmol) a una solución de **54** (467 mg, 1,30 mmol) en *N,N*-dimetilacetamida (15 mL). La mezcla de reacción se calentó a 160 °C bajo atmósfera de Nitrógeno por 4 h. Posteriormente, se

agregó una porción de Tosilato de piridinio (116 mg, 0,46 mmol) y Bromuro de litio (130 mg, 1,50 mmol) a la mezcla de reacción y la reacción continuó a reflujo por 6 h. La mezcla se llevó a temperatura ambiente y la mezcla se redisolvió en dietil éter (50 mL) y lavada con agua (2x50 mL). La fase orgánica se secó con MgSO_4 y el solvente fue eliminado en rotavapor. El crudo de reacción fue redisoluelto en 3 mL de CH_2Cl_2 , mezclado con gel de sílice y cromatografiado en sílica gel con mezclas de AcOEt/hexano de polaridad creciente (0,2:9,8 \rightarrow 2,0:8,0), obteniéndose finalmente 0,23 g (0,66 mmol) del compuesto **55** (50,7 %). Sólido incoloro (p.f. = 138,5-139,9 °C (149-150°C [53])). IR_{vmax} (cm^{-1}): 3023 (C=C-H); 2969 y 2903 (CH_3 -); 2871 y 2841 (CH_2 -); 1729 (C=O); 1706 (C=O); 1656 (C=C); 1448 (CH_2 -); 1367 (CH_3 -); 1279 y 1023 (C-O). $^1\text{H RMN}$ (400,1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5,69-5,65 (1H, m, H-3); 5,58-5,53 (1H, m, H-2); 3,63 (3H, s, O- CH_3); 2,46-2,38 (1H, m, H-20); 2,36-2,31 (2H, m, H-7 y H-9); 2,28-2,20 (1H, m, H-1); 1,19 (3H, d, J = 6,8 Hz, H-21); 1,16-1,05 (1H, m, H-15); 0,70 (3H, s, H-19); 0,68 (3H, s, H-18). $^{13}\text{C RMN}$ (100,6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 211,70 (C-6); 177,15 (CH_3CO); 124,92 (C-3); 124,42 (C-2); 56,26 (C-14); 53,77 (C-9); 53,27 (C-5); 52,76 (C-17); 51,35 (OCH_3); 46,85 (C-7); 42,82 (C-13); 42,30 (C-20); 39,96 (C-10); 39,28 (C-12); 39,21 (C-4); 37,59 (C-8); 26,92 (C-16); 23,95 (C-15); 21,66 (C-1); 21,01 (C-11); 17,06 (C-21); 13,46 (C-19); 12,07 (C-18).

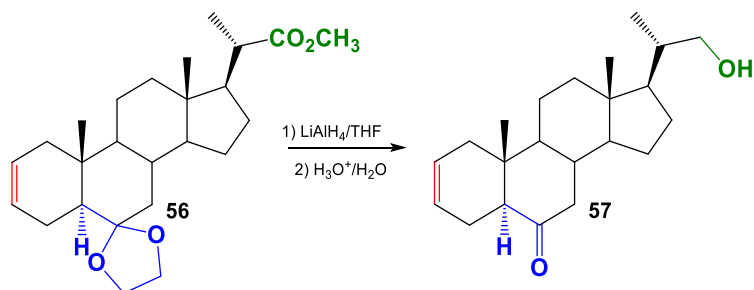
4. 1.7 (20S)-6,6-etilenodioxy-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (**56**)



A una solución de alqueno **55** (0,500 mg, 1,39 mmol) se le agregó etilenglicol (1,7 mL, 30,4 mmol) y *p*-TsOH (116 mg, 0,67 mmol). La reacción se agitó a reflujo por 2,5 h usando una trampa de Dean-Stark y el avance de la reacción se monitoreó por CCF. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se llevó a temperatura ambiente y se agregó 40 mL de una solución saturada de NaHCO_3 . Posteriormente, la mezcla fue extraída en AcOEt (2x50 mL), lavada con solución saturada de NaCl (2x50 mL), la fase orgánica se secó con MgSO_4 y el solvente fue eliminado en rotavapor, obteniéndose finalmente 0,54 g (1,34 mmol) del compuesto **56** (96,4 %). Sólido incoloro (p.f. = 149,8-152,5 °C). IR_{vmax} (cm^{-1}): 3020 (C=C-H); 2938 (CH_3 -); 2872 (CH_2 -); 1737 (C=O); 1458 (CH_2 -); 1380 (CH_3 -); 1276 y 1042 (C-O).

¹H RMN (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,60-5,57 (1H, m, H-3); 5,48-5,44 (1H, m, H-2); 3,91-3,80 (3H, m, cetal); 3,73-3,68 (1H, m, cetal); 3,57 (3H, s, O-CH₃); 2,39-2,31 (1H, m, H-20); 1,70 (1H, dd *J* = 12,8 y 3,5 Hz, H-7_α); 1,12 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-21); 0,95 (1H, dd, *J* = 12,6 Hz, H-7_β); 0,80 (3H, s, H-19); 0,72 (1H, td, *J* = 11,7 y 4,4 Hz, H-9); 0,63 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177,02 (CH₃CO); 125,49 (C-3); 124,54 (C-2); 109,70 (C-6); 65,38 (cetal); 63,90 (cetal); 55,36 (C-14); 53,22 (C-9); 52,74 (C-17); 51,10 (OCH₃); 47,87 (C-5); 42,42 (C-13); 42,25 (C-20); 41,04 (C-1); 40,97 (C-7); 39,37 (C-12); 35,0 (C-10); 33,16 (C-8); 26,87 (C-16); 24,03 (C-15); 21,23 (C-4); 20,64 (C-11); 16,91 (C-21); 13,39 (C-19); 11,96 (C-18).

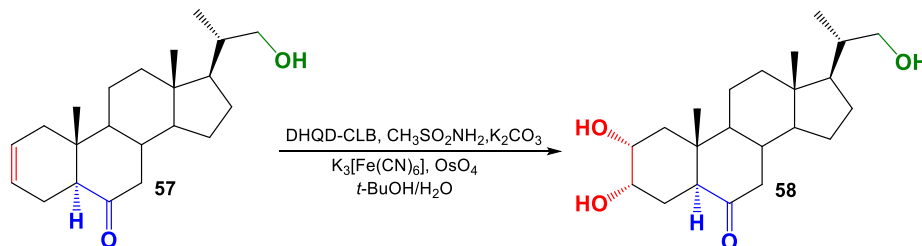
4.1.8 (20*S*)-22-hydroxy-5α-pregn-2-ene-23,24-dinor-6-ona (57)



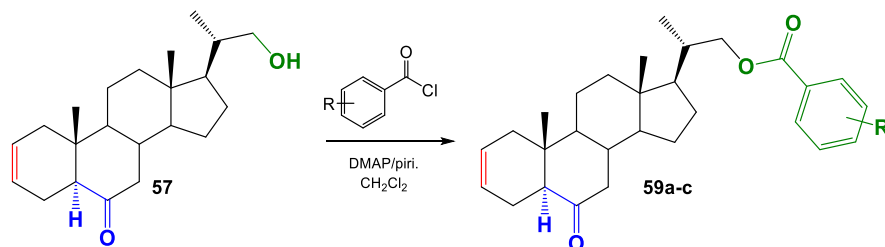
A una solución del éster **56** (1,0 g, 2,48 mmol) en THF (65 ml) se adicionó una solución de LiAlH₄ (22 mL, 2 M) en THF. La mezcla de reacción se agitó de forma constante a temperatura ambiente durante 90 minutos. Seguidamente se trató con 60 mL de acetato de etilo frío para eliminar el reductor en exceso. Luego se adicionó a la mezcla 30 mL de HCl (5%) y se agitó vigorosamente por 1 hora. La fase orgánica de AcOEt se lavó con agua (3x 20 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó al vacío a sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando sílica gel con una mezcla hexano/AcOEt (7:3) como eluyente. Se obtuvieron 0,75 g, (2,27 mmol, 91,5 %) del compuesto **57**, como un sólido incoloro (p.f. = 169,3-172,5 °C, [73]). **IR**_{vmax} (cm⁻¹): 3510 (O-H); 3022 (C=C-H); 2964 y 3940 (CH₃-); 3905 y 2829 (CH₂-); 1693 (C=O); 1659 (C=C); 1457 (CH₂-); 1379 (CH₃-); 1252 y 1055 (C-O). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,70-5,66 (1H, m, H-3); 5,58-5,54 (1H, m, H-2); 3,63 (1H, dd, *J* = 10,5 y 3,2 Hz, H-22a); 3,37 (1H, dd, *J* = 10,5 y 6,8 Hz, H-22b); 2,37-2,33 (2H, m, H-7 y H-5); 2,29-2,20 (1H, m, H-4); 1,87-1,77 (1H, m, H-16); 1,76-1,69 (1H, m, H-8); 1,05 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, H-21); 0,70 (3H, s, H-19); 0,69 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,96 (C-6); 124,91 (C-3); 124,47 (C-2); 67,80 (C-22); 56,44 (C-14); 53,80 (C-5); 53,33 (C-9); 52,31 (C-17);

46,94 (C-7); 42,86 (C-13); 39,99 (C-10); 39,31 (C-12); 39,29 (C-1); 38,59 (C-20); 37,68 (C-8); 27,48 (C-16); 24,01 (C-15); 21,68 (C-4); 21,06 (C-11); 16,70 (C-21); 13,47 (C-19); 11,97 (C-18).

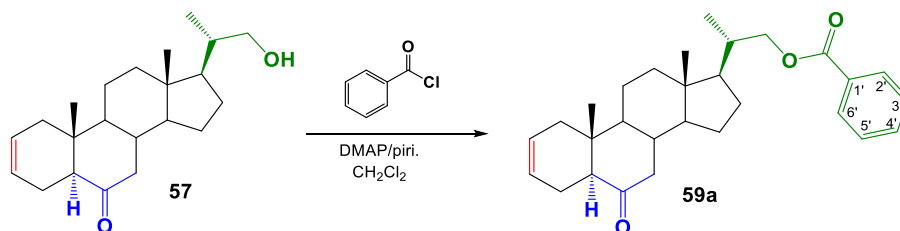
4.1.9 (20S)-2a, 3a, 22-trihidroxi-5 α -pregn-6-ona (**58**)



A una solución del alqueno **57** (0,50 g, 1,51 mmol); en *t*-BuOH/H₂O 1:1 (30 mL), se le agregaron DHQD-CLB (0,18 g, 0,39 mmol); CH₃SO₂NH₂ (0,26 g, 2,73 mmol); K₂CO₃ (1,15 g, 8,32 mmol); K₃[Fe(CN)₆] (2,89 g, 8,78 mmol). Posteriormente se le adicionó tetraóxido de osmio (OsO₄) en *t*-BuOH (1 g por 20 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 36 horas. Finalizado este tiempo, se agregó una solución saturada de sulfito de sodio (Na₂SO₃) y se dejó en agitación durante otros 30 minutos. Seguidamente la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt (2 x 15 mL), la fase orgánica se lavó con agua (2 x 20 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró en rotavapor. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando sílica gel y se eluyó por gradiente de polaridad usando una mezcla de solventes Hexano/AcOEt/MeOH (6:4:0 → 4.8:4.8:0.4). Se obtuvieron 0,39 g (70,9 %) del compuesto **58**, como un sólido incoloro (p.f. = 216,7-221,2 °C). IR_{vmax} (cm⁻¹): 3472 (O-H); 2977 y 2949 (CH₃-); 2902 y 2864 (CH₂-); 1719 (C=O); 1584 (C=C); 1470 (CH₂-); 1393 (CH₃-); 1106 y 1055 (C-O). ¹H RMN (400,1 MHz, MeOD): δ (ppm) = 3,95 (1H, da, *J* = 2,8 Hz, H-3); 3,66 (1H, ddd, *J* = 11,7, 4,7 y 3,1 Hz, H-2); 3,57 (1H, dd, *J* = 10,7 y 3,1 Hz, H-22a); 3,26 (1H, dd, *J* = 10,7 y 7,1 Hz, H-22b); 2,73 (1H, dd, *J* = 12,2 y 3,4 Hz, H-5); 2,21 (1H, dd, *J* = 13,1 y 4,8 Hz, H-7_α); 2,14-2,07 (2H, m, H-7 y H-12); 1,94-1,86 (1H, m, H-16); 1,18-1,10 (1H, m, H-15); 1,05 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H-21); 0,77 (3H, s, H-19); 0,73 (3H, s, H-18). ¹³C RMN (100,6 MHz, MeOD): δ (ppm) = 215,11 (C-6); 69,58 (C-3); 69,23 (C-2); 67,96 (C-22); 57,73 (C-14); 55,19 (C-9); 53,88 (C-17); 52,18 (C-5); 47,63 (C-7); 44,30 (C-13); 43,72 (C-10); 41,10 (C-1); 40,76 (C-12); 40,24 (C-20); 39,27 (C-8); 28,73 (C-16); 27,95 (C-4); 25,19 (C-15); 22,43 (C-11); 17,43 (C-21); 13,98 (C-19); 12,56 (C-18). HRMS-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C₂₂H₃₆O₄: 365,2616 [M+H]⁺; encontrado 365,2700 [M + H]⁺.

4.1.10 Síntesis de (20S)-22-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (**59a-c**)

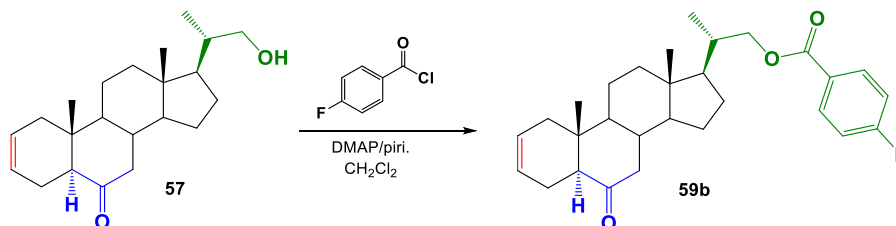
Procedimiento general: El compuesto **57** fue disuelto en CH_2Cl_2 y piridina. Posteriormente fueron adicionados DMAP y el correspondiente cloruro de acilo (*p/o*-PhCOCl), este último se adicionó lentamente y con agitación a temperatura ambiente. El final de la reacción fue verificado por CCF (en promedio 2 h), luego el volumen del solvente fue reducido hasta aproximadamente 10 mL, y entonces se adicionó EtOAc (30 mL). La fase Orgánica fue Lavada con KHSO_4 5% (2×15 mL) y agua (2×15 mL), secada sobre Na_2SO_4 anh. y filtrada. El solvente fue removido por destilación en rotavapor. El crudo fue re disuelto en CH_2Cl_2 (3 mL) y purificado por CC en sílica gel con mezcla de hexano/AcOEt. (9:1).

4.1.11 (20S)-22-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (**59a**)

Compuesto **57** (0,500 g, 1,51 mmol), CH_2Cl_2 (70 mL), piridina (1,2 mL), DMAP (50 mg), PhCOCl (0,83 mL, 3,04 mmol). El compuesto **59a** (0,56 g, 1,29 mmol, 85,4%) como un sólido incoloro (p.f. = 133,2-134,1 °C). IR_{vmax} (cm^{-1}): 3023 (C=C-H); 2942 y 2904 (CH_3 -); 2870 (CH_2 -); 1713 (C=O); 1656 (C=C); 1601 (C=C Ar); 1451 (CH_2 -); 1388 (CH_3 -); 1110 y 1070 (C-O). $^1\text{H RMN}$ (400,1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8,04 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2' y H-6'); 7,56 (1H, tt, $J = 7,6$ y 1,5 Hz, H-4'); 7,44 (2H, ta, $J = 7,6$ Hz, H-3'); 5,71-5,66 (1H, m, H-3); 5,59-5,55 (1H, m, H-2); 4,31 (1H, dd, $J = 10,7$ y 3,5 Hz, H-22a); 4,06 (1H, dd, $J = 10,7$ y 7,1 Hz, H-22b); 2,38-2,33 (2H, m, H-7 y H-5); 2,30-2,21 (1H, m, H-4); 1,96-1,85 (2H, m, H-16 y H-20); 1,80-1,71 (1H, m, H-8); 1,66-1,55 (2H, m, H-11 y H-15); 1,19-1,08 (1H, m, H-15); 1,13 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-21); 0,73 (3H, s, H-18); 0,72 (3H, s, H-19). $^{13}\text{C RMN}$ (100,6 MHz,

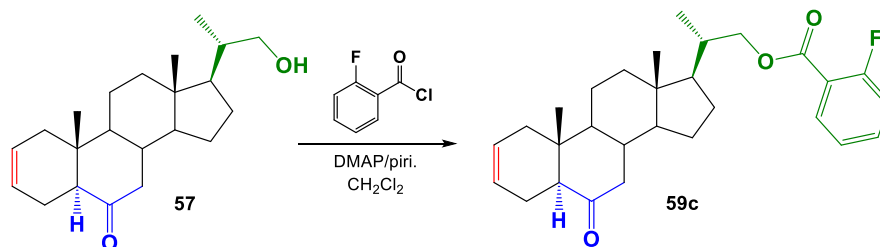
CDCl_3): δ (ppm) = 211,82 (C-6); 166,68 (COAr); 134,81 (C-4'); 130,49 (C-1'); 129,48 (C-2' y C-6'); 128,33 (C-3' y C-5'); 124,95 (C-3); 124,45 (C-2); 69,83 (C-22); 56,41 (C-14); 53,80 (C-5); 53,33 (C-9); 52,82 (C-17); 46,91 (C-7); 42,99 (C-13); 39,97 (C-10); 39,32 (C-1); 39,32 (C-12); 37,66 (C-8); 35,95 (C-20); 27,53 (C-16); 24,02 (C-15); 21,66 (C-4); 21,08 (C-11); 17,32 (C-21); 13,48 (C-19); 11,99 (C-18).

4.1.12 (20S)-22-(4-fluoro)-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (**59b**)



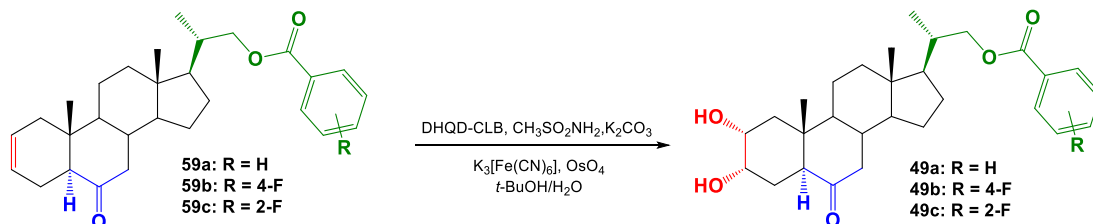
Compuesto **57** (0,30 g, 0,91 mmol), CH_2Cl_2 (45 mL), piridina (0,75 mL), DMAP (50 mg), 4-FPhCOCl (0,74 mL, 6,26 mmol). El compuesto **59b** (0,30 g, 0,66 mmol, 72,5%) fue obtenido como un sólido incoloro (p.f. = 140,3-141,6 °C). IR_{vmax} (cm^{-1}): 3026 (C=C-H); 2942 (CH_3 -); 2903 y 2870 (CH_2 -); 1712 (C=O); 1603 (C=C); 1388 (CH_3 -); 1111 y 1090 (C-O). $^1\text{H RMN}$ (400,1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8,05 (2H, dd, $J = 8,8$ y $5,4$ Hz, H-2' y H-6'); 7,11 (2H, t, $J = 8,7$ Hz, H-3' y H-5'); 5,71-5,66 (1H, m, H-3); 5,59-5,55 (1H, m, H-2); 4,30 (1H, dd, $J = 10,7$ y $3,4$ Hz, H-22a); 4,05 (1H, dd, $J = 10,7$ y $7,2$ Hz, H-22b); 2,38-2,33 (2H, m, H-7 y H-5); 2,30-2,21 (1H, m, H-4); 1,94-1,83 (2H, m, H-16 y H-20); 1,80-1,71 (1H, m, H-8); 1,66-1,55 (2H, m, H-11 y H-15); 1,19-1,08 (1H, m, H-15); 1,12 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-21); 0,73 (3H, s, H-18); 0,71 (3H, s, H-19). $^{13}\text{C RMN}$ (100,6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 211,80 (C-6); 165,72 (COAr); 165,67 (d, $^1J_{\text{FC}} = 253,7$ Hz, C-4'); 131,99 (d, $^3J_{\text{FC}} = 9,1$ Hz, C-2' y C-6'); 126,71 (d, $^4J_{\text{FC}} = 2,7$ Hz, C-1'); 124,95 (C-3); 124,44 (C-2); 115,47 (d, $^2J_{\text{FC}} = 21,9$ Hz, C-3' y C-5'); 69,97 (C-22); 56,40 (C-14); 53,80 (C-5); 53,32 (C-9); 52,81 (C-17); 46,90 (C-7); 42,99 (C-13); 39,97 (C-10); 39,32 (C-1); 39,32 (C-12); 37,65 (C-8); 35,93 (C-20); 27,53 (C-16); 24,01 (C-15); 21,69 (C-4); 21,07 (C-11); 17,30 (C-21); 13,48 (C-19); 11,98 (C-18).

4.1.13 (20S)-22-(2-fluoro)-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (**59c**)



Compuesto **57** (0,30 g; 0,90 mmol), CH₂Cl₂(25 mL), piridina (1,0 mL), DMAP (3 mg), 2-FPhCOCl (0,4 mL; 3,28 mmol). El compuesto **59c** (0,27 g, 0,59 mmol, 65%) fue obtenido como un sólido incoloro (p.f. = 124,4 – 125,6 °C). IR_{vmax} (cm⁻¹): 3072 (C=C-H); 2944 (CH₃-); 2902 y 2869 (CH₂-); 1723 (C=O); 1710 (C=C); 1612 (C=C); 1392 (CH₃-); 1304 y 1134 (C-O); 763 (C=C-H). ¹H RMN (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,94 (1H, dd, *J* = 7,7 y 1,5 Hz, H-6'); 7,55-7,49 (1H, m, H-4'); 7,21 (1H, t, *J* = 7,7 Hz, H-5'); 7,14 (1H, dd, *J* = 10,5 y 8,9 Hz, H-3'); 5,70-5,67 (1H, m, H-3); 5,59-5,55 (1H, m, H-2); 4,33 (1H, dd, *J* = 10,7 y 3,2 Hz, H-22a); 4,08 (1H, dd, *J* = 10,7 y 6,9 Hz, H-22b); 2,38-2,33 (2H, m, H-5 y H-7α); 1,31 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, H-21); 0,72 (3H, s, H-18); 0,71 (3H, s, H-19). ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,89 (C-6); 164,71 (d, ³*J*_{CF} = 3,4 Hz, COAr); 163,98 (d, ¹*J*_{CF} = 151.2 Hz, C-2'); 134,33 (d, ³*J*_{CF} = 8,9 Hz, C-4'); 132,09 (C-6'); 124,95 (C-3); 124,47 (C-2); 123,91 (d, ⁴*J*_{CF} = 3,7 Hz, C-5'); 118,96 (d, ²*J*_{CF} = 9,7 Hz, C-1'); 116,97 (d, ²*J*_{CF} = 22,5 Hz, C-3'); 70,29 (C-22); 56,41 (C-14); 53,81 (C-5); 53,32 (C-9); 52,57 (C-17); 46,92 (C-7); 42,94 (C-13); 39,98 (C-10); 39,32 (C-1); 39,29 (C-12); 37,67 (C-8); 35,83 (C-20); 27,48 (C-16); 24,00 (C-15); 21,69 (C-4); 21,07 (C-11); 17,24 (C-21); 13,48 (C-19); 11,98 (C-18).

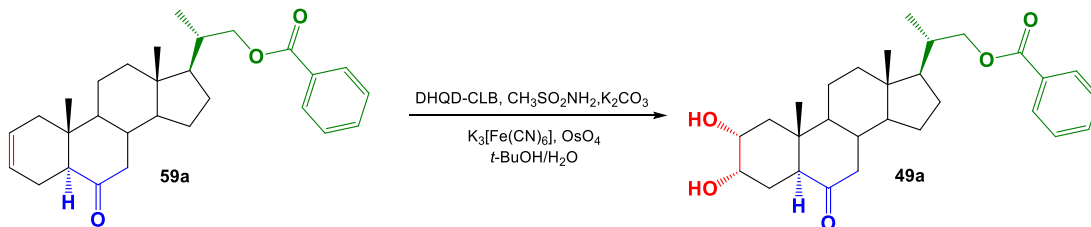
4.1.14 Síntesis de (20S)-22-benzoato de 2α, 3α-dihidroxi-6-oxo-5α-pregnano (**49a-c**)



Procedimiento general para la dihidroxilación de Sharpless [54, 57]: A una solución de los alquenos (**59a-c**), hidroquinidina 4-cloro-benzoato (DHQD-CLB), metanosulfonamida (CH₃SO₂NH₂), carbonato de potasio (K₂CO₃), y ferricianida de potasio (K₃[Fe(CN)₆]) en una mezcla de t-butanol y agua (1 : 1 v/v), se le adicióno tetraóxido de osmio (OsO₄) en t-butanol (1 g por 20 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 36 horas. Finalizado este tiempo, se agregó una solución saturada de sulfito de sodio (Na₂SO₃) y se dejó en agitación durante otros 30 minutos. Seguidamente la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt (2 x 15 mL), la fase orgánica se lavó con agua (2 x 20 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó al vacío el solvente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando sílica gel y se eluyó por gradiente usando una mezcla de solventes Hexano/AcOEt/MeOH (6:4:0 → 4.8:4.8:0.4), se

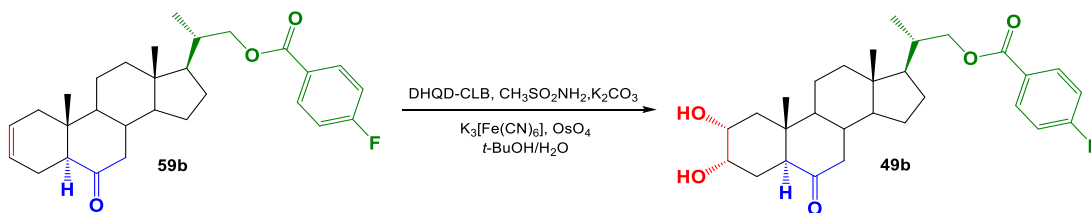
colectaron las fracciones que contenían el producto y se obtuvieron los nuevos análogos dihidroxilados deseados de acuerdo con lo descrito a continuación.

4.1.15 (2*S*)-22-benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49a**)



Alqueno **59a** (0,20 g, 0,46 mmol); DHQD-CLB (0,06 g, 0,13 mmol); CH₃SO₂NH₂ (0,099 g, 1,04 mmol); K₂CO₃ (0,36 g, 2,61 mmol); K₃[Fe(CN)₆] (0,88 g, 2,67 mmol); OsO₄ (0,25 mL, 0,05 mmol). Compuesto **49a** (0,194 g, 0,414 mmol, 90%) se obtuvo como un sólido incoloro (p.f. = 177,7-181,6 °C). IR_{νmax} (cm⁻¹): 3384 (O-H); 2942 (CH₃-); 2866 y 2825 (CH₂-); 1716 (C=O); 1601 (C=C); 1451 (CH₂-); 1388 (CH₃-); 1112 y 1070 (C-O). ¹H-RMN (400.1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8,02 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2'); 7,54 (1H, ta, *J* = 7,4 Hz, H-4'); 7,42 (2H, t, *J* = 7,7 Hz, H-3'); 4,29 (1H, dd, *J* = 10,7 y 3,4 Hz, H-22a); 4,05-4,01 (2H, m, H-2 y H-22b); 3,72 (1H, dt, *J* = 10,7 y 3,8 Hz, H-3); 2,78 (2H, sa, 2xOH); 2,66 (1H, dd, *J* = 12,6 y 2,9 Hz, H-5); 2,27 (1H, dd, *J* = 13,1 y 4,5 Hz, H-7 α); 1,15-1,04 (1H, m, H-15); 1,10 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, H-21); 0,73 (3H, s, H-19); 0,69 (3H, s, H-18). ¹³C-RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 212,21 (C-6); 166,71 (COAr); 132,81 (C-4'); 130,32 (C-1'); 129,41 (C-2'); 128,29 (C-3'); 69,77 (C-22); 68,24 (C-3); 68,14 (C-2); 56,22 (C-14); 53,53 (C-9); 52,68 (C-17); 50,66 (C-5); 46,59 (C-7); 43,03 (C-13); 42,45 (C-10); 40,01 (C-1); 39,14 (C-12); 37,56 (C-8); 35,83 (C-20); 27,44 (C-16); 26,24 (C-4); 23,94 (C-15); 21,08 (C-11); 17,24 (C-21); 13,46 (C-19); 12,00 (C-18). HRMS-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C₂₉H₄₀O₅: 469,2876 [M + H]⁺; encontrado 469,2917 [M + H]⁺.

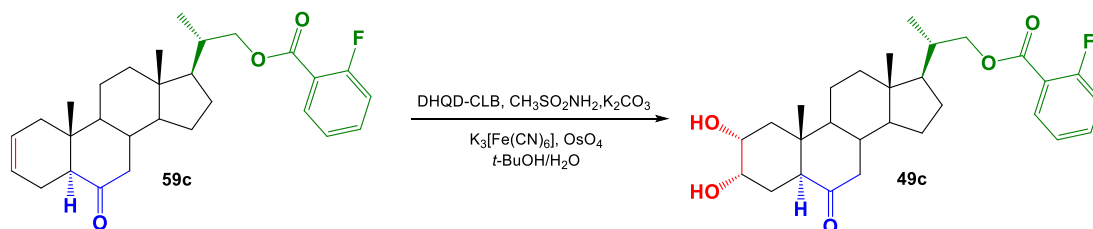
4.1.16 (2*S*)-22-(4-fluoro)-benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49b**)



Compuesto **59b** (0,30 g, 0,66 mmol); DHQD-CLB (0,08 g, 0,17 mmol); CH₃SO₂NH₂ (0,14 g, 1,47 mmol); K₂CO₃ (0,52 g, 3,76 mmol); K₃[Fe(CN)₆] (1,27 g, 3,86 mmol); OsO₄ (0,36 mL,

0,07 mmol). Compuesto **49b** (0,27 g, 0,56 mmol, 84,9%) se obtuvo como un sólido incoloro (p.f. = 186,5-187,2 °C). IR_{vmax} (cm^{-1}): 3518 y 3407 (O-H); 2969 y 2942 (CH_3 -); 2894 y 2849 (CH_2 -); 1712 (C=O); 1604 (C=C); 1389 (CH_3 -); 1109 y 1059 (C-O). $^1\text{H-RMN}$ (400,1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8,05 (2H, dd, $J = 9,0$ y $5,5$ Hz, H-2'); 7,11 (2H, dd, $J = 9,0$ y $8,5$ Hz, H-3'); 4,30 (1H, dd, $J = 10,7$ y $3,3$ Hz, H-22a); 4,06-4,02 (2H, m, H-2 y H-22b); 3,77 (1H, dt, $J = 11,5$ y $3,9$ Hz, H-3); 2,68 (1H, dd, $J = 12,5$ y $3,1$ Hz, H-5); 2,30 (1H, dd, $J = 13,2$ y $4,5$ Hz, H-7 α); 1,18-1,07 (1H, m, H-15); 1,12 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-21); 0,76 (3H, s, H-19); 0,71 (3H, s, H-18). $^{13}\text{C-RMN}$ (100,6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 211,92 (C-6); 165,77 (COAr); 165,70 (d, $^1J_{\text{CF}} = 273,7$ Hz, C-4'); 132,01 (d, $^3J_{\text{CF}} = 9,2$ Hz, C-2'); 126,69 (d, $^4J_{\text{CF}} = 2,8$ Hz, C-1'); 115,05 (d, $^2J_{\text{CF}} = 22,1$ Hz, C-3'); 69,96 (C-22); 68,36 (C-3); 68,25 (C-2); 56,32 (C-14); 53,64 (C-9); 52,77 (C-17); 50,69 (C-5); 46,68 (C-7); 43,13 (C-13); 42,53 (C-10); 40,16 (C-1); 39,23 (C-12); 37,63 (C-8); 35,93 (C-20); 27,54 (C-16); 26,27 (C-4); 24,02 (C-15); 21,16 (C-11); 17,30 (C-21); 13,54 (C-19); 12,07 (C-18). HRMS-ESI (modo positivo): m/z calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{FO}_5$: 487,2782 $[\text{M} + \text{H}]^+$; encontrado 487,2851 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

4.1.17 (20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49c**)



Compuesto **59c** (0,30 g, 0,66 mmol); DHQD-CLB (0,065 g, 0,17 mmol); $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ (0,14 g, 1,47 mmol); K_2CO_3 (0,52 g, 3,76 mmol); $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1,27 g, 3,86 mmol); OsO_4 (0,36 mL, 0,07 mmol). Compuesto **49c** (0,26 g, 0,53 mmol, 82,5%) se obtuvo como un sólido incoloro (p.f. = 222,4 - 224,4 °C). IR_{vmax} (cm^{-1}): 3414 (O-H); 2945 (CH_3 -); 2891 y 2863 (CH_2 -); 1732 (C=O); 1705 (C=O); 1612 (C=C); 1460 (CH_2 -); 1383 (CH_3 -); 1131 y 1080 (C-O); 765 (C=C-H). $^1\text{H-RMN}$ (400,1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7,96 (1H, dd, $J = 7,6$ y $1,8$ Hz, H-6'); 7,57-7,51 (1H, m, H-4'); 7,23 (1H, dd, $J = 7,6$ y $1,0$ Hz, H-5'); 7,16 (1H, ddd, $J = 10,9$; $8,3$ y $1,0$ Hz, H-3'); 4,36 (1H, dd, $J = 10,7$ y $3,0$ Hz, H-22a); 4,11-4,07 (2H, m, H-2 y H-22b); 3,83-3,77 (1H, m, H-3); 2,70 (1H, dd, $J = 12,7$ y $2,3$ Hz, H-5); 2,32 (1H, dd, $J = 13,4$ y $4,6$ Hz, H-7 α); 1,49 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-21); 0,78 (3H, s, H-19); 0,73 (3H, s, H-18). $^{13}\text{C-RMN}$ (100,6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 211,95 (C-6); 164,73 (d, $^3J_{\text{CF}} = 3,4$ Hz, COAr); 161,93 (d, $^1J_{\text{CF}} = 259,6$ C-2'); 134,36 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8,6$ Hz, C-4'); 132,08 (C-6'); 123,93 (d, $^4J_{\text{CF}} = 4,0$ Hz, C-5'); 118,93 (d, $^2J_{\text{CF}} = 10,4$ Hz, C-1'); 116,98 (d, $^2J_{\text{CF}} = 22,3$ Hz, C-3'); 70,25 (C-22); 68,40 (C-3); 68,26 (C-2);

56,31 (C-14); 53,64 (C-9); 52,53 (C-17); 50,72 (C-17); 46,67 (C-7); 43,06 (C-13); 42,52 (C-10); 40,17 (C-1); 39,20 (C-12); 37,62 (C-8); 35,80 (C-20); 27,46 (C-16); 26,30 (C-4); 24,00 (C-15); 21,17 (C-11); 17,22 (C-21); 13,54 (C-19); 12,05 (C-18). HRMS-ESI (modo positivo): m/z calculado para C₂₉H₃₉FO₅: 487,2854 [M + H]⁺; encontrado 487,2849 [M + H]⁺.

4.2 Ensayos Biológicos

4.2.1. Ensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA)

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) [19] y siguiendo un procedimiento descrito anteriormente [18,78–80]. 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, 1×10⁻⁶ M, 1×10⁻⁷ M, 1×10⁻⁸ 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. La medida fue informada como el promedio de la prolongación exhibida (en [mm]) ± la desviación estándar, para la evaluación estadística se utiliza la prueba de *t* de Student. Se obtuvieron datos de n=6-10 repeticiones.

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 4.1.

4.2.2 Ensayo del segundo entrenudo del frijol (SEF)

El ensayo del segundo entrenudo de frijol se llevó a cabo de acuerdo con lo indicado en la metodología y utilizando un procedimiento reportado [53,81] con algunas modificaciones. Se sembraron y germinaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Pinto) durante tres días y luego las semillas germinadas (uniformemente) se

trasplantaron a macetas que contenían perlita, vermiculita y sustrato. Las macetas se mantuvieron en cámara de crecimiento de plantas a 22 °C, con 48 W/m² de luz, 16h/8h luz/oscuridad fotoperíodo. Cuando las plantas de frijol presentaron el segundo entrenudo de 1-2 mm de largo (aprox. después de 7 días) estas fueron tratadas con una solución de 1x10⁻⁸ M (0,01µM) de cada uno de los compuestos disueltos en DMSO y agua, en una pequeña cicatriz generada una vez retirada la bráctea de la base del segundo entrenudo. Al momento de la aplicación, se mezcló una gota de 5 µL de cada solución con una gota de 2 µL de TWEEN® 20 (AMRESCO®) para la adhesión. Las plantas de control se trataron solo con agua y TWEEN 20®. Las mediciones de la longitud del segundo entrenudo se realizaron después de 5 días. Se utilizó como medida de actividad La diferencia entre la longitud del segundo entrenudo de las plantas tratadas y de control. Los resultados se indican en la Figura 4.1.

La medida fue informada como el promedio de la prolongación exhibida (en [mm]) ± la desviación estándar, para la evaluación estadística se utiliza la prueba de *t* de Student. Se obtuvieron datos de n=6-10 repeticiones.

Tabla 4.1: Actividad de análogos de BRs disueltos en Etanol/DMSO mediante bioensayos in vitro de Inclinación de la lámina de arroz.

Compuesto	Apertura del ángulo (°) ILA		
	1x10 ⁻⁸ M	1x10 ⁻⁷ M	1x10 ⁻⁶ M
 Brasinólida (1)	 38±7,5	 46±8,0	 89±4,9
 58	 45±2,0	 26±6,1	 16±4,1
 49a	 6±2,0	 21±2,0	 10±2,6

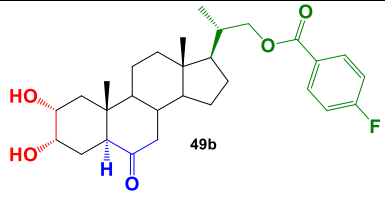


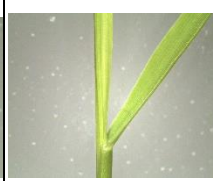
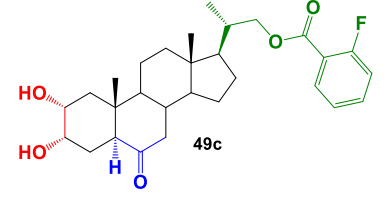

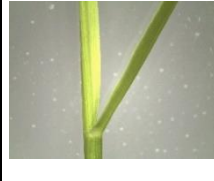

 <p>49b</p>			
	6±3,8	33±2,0	36±2,0
 <p>49c</p>			
	27±0,0	42±0,0	24±2,7
Control negativo (H₂O)		3±2,6	

Tabla 4.2: Ensayo de Elongación del Segundo Internudo del Frijol (SEF) de análogos de Brasinoesteroides **49a-49c** y **58** a la concentración de 1×10^{-8} M.

Análogo	Elongación del Segundo Internudo de frijol (mm±SD), 1×10^{-8} M
1	20,2± 0,65
49a	20,8± 0,26
49b	85,0± 4,0
49c	17,5± 0,52
58	8,5± 0,49
C. Negativo	10± 0,5



Figura 4.1: Efecto de análogos de BRs y control positivo (brasinólida (**1**)) en el bioensayo de elongación del segundo internudo del frijol a una concentración de 1×10^{-8} M.

4.2.3 Estudios de acoplamiento molecular (molecular docking)

De acuerdo con lo indicado en la metodología, para evaluar la actividad potencial de los compuestos objetivo, se realizó un screening *in silico* basado en las estructuras de los

nuevos análogos de BRs. Mediante el estudio de acoplamiento (docking) molecular se determinó la energía liberada al formarse los complejos ligando-BRI1 (receptor libre) y ligando-BRI1-BAK1 (receptor BRI1 unido a su correceptor), estos valores son una medida de la afinidad de los ligandos con el sitio activo y permiten relacionar las estructuras de los análogos con su potencial efecto biológico. Los valores obtenidos se muestran en las Tablas 4.2 y 4.3.

Para realizar el estudio de acoplamiento (docking) molecular y obtener los valores de afinidad ligando-receptor se utilizó el programa Glide. Los valores mostrados en las Tablas 4.2 y 4.3 corresponden a las poses de cada ligando con mayor energía de afinidad (valores más negativos).

Tabla 4.3: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.

Ligando	Energía mín. BRI1-BAK1-Ligando (Kcal/mol)
1	-16,1
49a	-14,2
49b	-14,5
49c	-15,2
49d	-13,7
49e	-13,8
58	-13,2

Tabla 4.4: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1 y cada uno de los análogos estudiados.

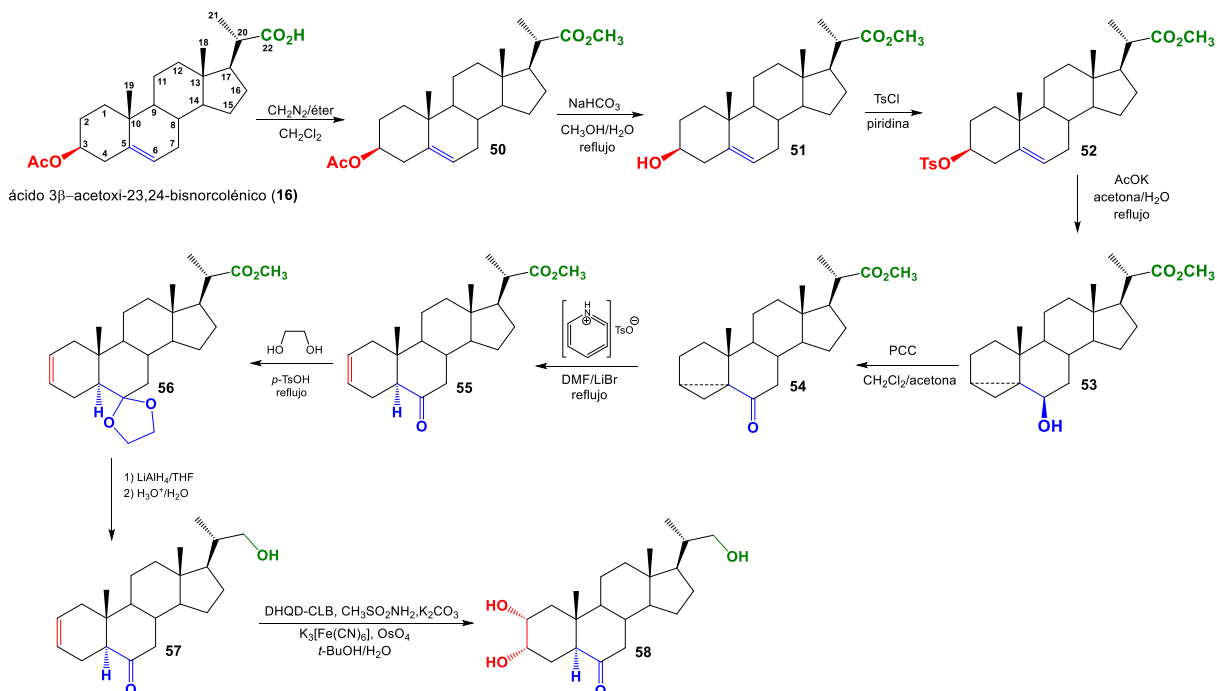
Ligando	Energía mín. BRI1-Ligando (Kcal/mol)
1	-10,7
49a	-9,4
49b	-10,6
49c	-10,6
49d	-7,1
49e	-8,6
58	-7,4

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 **50-59ac** y **49ac**, ensayos biológicos de los nuevos análogos **58**, **49ac** y los estudios de acoplamiento molecular de estos.

5.1 Síntesis químicas

De acuerdo con la ruta de síntesis indicada en el Esquema 1, en una primera parte se utilizó la metodología descrita hasta la obtención del derivado **55** [53]. Por lo tanto, la reacción de esterificación con diazometano ($\text{CH}_2\text{N}_2/\text{éter}$) del ácido 3 β -acetoxi-23,24-dinorcol-5-en-22-colénico (**16**), permitió la obtención el derivado metilado **50** con 98,5% de rendimiento [53]. El compuesto **50** fue caracterizado por técnicas espectroscópicas combinadas de IR y RMN. En el espectro IR de **50** no fue observada la señal entre 3300-2500 cm^{-1} , asignada al enlace O-H propio de las funciones de los ácidos carboxílicos (precursor **16**). Mientras que la función R-CO₂CH₃ fue evidenciada por la observación en el espectro de ¹H RMN de la señal a $\delta_{\text{H}} = 3,64$ ppm (3H, s, OCH₃). Adicionalmente desde el espectro de ¹³C RMN, las señales observadas a $\delta_{\text{C}} = 177,30$ y 51,31 ppm, fueron asignadas al C-22 y grupo OCH₃ respectivamente. Los datos de IR y ¹H RMN fueron consistentes con los reportados para este compuesto [53]. Sin embargo, es importante mencionar que si bien el compuesto fue informado previamente, los autores no reportaron los datos y asignaciones de las señales de ¹³C RMN, como tampoco los estudios bidimensionales respectivos. Posteriormente saponificación selectiva del grupo acetato en posición C-3 del compuesto **50**, utilizando el sistema NaHCO₃/MeOH/H₂O, permitió la obtención del derivado saponificado **51**, con 93,6% de rendimiento [53]. Evidencia espectroscópica de IR muestra una señal a $\nu = 3497\text{-}3417$ cm^{-1} , que se atribuye a la presencia del grupo OH. Mientras que en el espectro de ¹H RMN, se observó el desplazamiento químico de la señal H-3 a campo alto ($\delta_{\text{H}} = 3,55\text{-}3,48$ ppm, m, 1H). Además, desde el espectro de ¹³C RMN, no se observaron las señales a $\delta_{\text{C}} = 170,51$ y 21,42 ppm, atribuidas al grupo CH₃CO presentes en el precursor **50**. Mientras que los datos de IR y ¹H RMN fueron consistentes con los reportados para este compuesto [53]. Hay que mencionar además que los autores no informaron los datos de ¹³C RMN como tampoco otra información de RMN.



Esquema 1: Ruta de síntesis propuesta para la obtención del intermedio avanzado **57**, desde 3β-acetil-23,24-bisnor-5-colénico (**16**).

Reacción de tosilación de **51** con $\text{TsCl}/\text{pi}/\text{DMAP}$ [53], permitió la obtención del derivado tosilado **52** con 92,9% de rendimiento. La principal evidencia espectroscópica de la obtención del derivado tosilado provino desde los espectros de ^1H y ^{13}C RMN, donde en el primero, se observaron las señales a $\delta_{\text{H}} = 7,78$ ppm (2H, d, $J = 8,3$ Hz) y 7,31 ppm (2H, d, $J = 8,3$ Hz), asignadas a los hidrógenos aromáticos del grupo tosilato, como también la señal observada a $\delta_{\text{H}} = 2,43$ ppm (3H, s), perteneciente al grupo $\text{CH}_3\text{-Ar}$. Mientras que desde el espectro de ^{13}C RMN, las señales observadas a $\delta_{\text{C}} = 144,37$; 134,58; 129,69; 127,57 y 123,30 ppm, fueron asignadas a los carbonos aromáticos C-1', C-4', C-3' y C-2', respectivamente.

Tratamiento del tosilato **52** con el sistema $\text{AcOK}/\text{acetona-agua}$ bajo condiciones de reflujo de acuerdo con lo reportado [53], permitió la formación del compuesto **53**, con 56,7% de rendimiento. Desde el espectro IR de **53**, se observó la señal entre 3489-3442 cm^{-1} correspondiente a la función OH. Mientras que desde el espectro de ^1H RMN, la señal observada a $\delta_{\text{H}} = 3,25$ ppm (1H, ta, $J = 2,8$ Hz,) fue atribuida al hidrógeno carbinólico H-6. Mientras que las señales observadas a $\delta_{\text{H}} = 0,52$ ppm (1H, ta, $J = 4,2$ Hz) y 0,29 ppm, (1H, dd, $J = 8,1$ y 4,9 Hz), fueron asignadas a los hidrógenos diasterotópicos H-4_{gem} y 4_{trans} en función de los valores de $J_{\text{H-H}}$ observados del anillo de ciclopropano entre C-3 y C-5, [82]

(ver Figura 5.1). Mientras que la orientación espacial del grupo OH en C-6 fue establecida como axial sobre el plano, considerando los valores de J_{H-H} observados ($^3J_{HH} = 2,8$ Hz) para el H-6 correspondientes a acoplamiento “*ecuatorial-ecuatorial*” con ambos hidrógenos en H-7 (Figura 5.1).

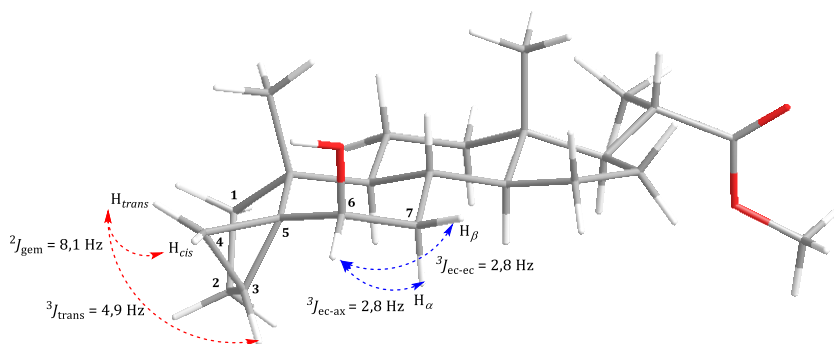


Figura 5.1: Estructura 3D del compuesto **53**, donde se muestran los acoplamientos H-H para los hidrógenos H-4 y H-6, cuyos valores confirman la presencia del anillo de ciclopropano y estereoquímica del C-6.

Oxidación de Jones/ CH_2Cl_2 /acetona del compuesto **53** [53], produjo la cetona **54** con 70,8 % de rendimiento. La evidencia espectroscópica de la formación del grupo carbonilo en C-6, fue evidenciada principalmente por la observación de la señal a $\delta_c = 209,35$ ppm, en el espectro de ^{13}C RMN del compuesto **54**. El paso siguiente consistió en realizar la reacción de apertura del anillo de ciclopropano con formación del alqueno entre los carbonos C2-C3 por tratamiento de la cetona **54** con el sistema tosilato de piridino, LiBr, DMF bajo condiciones de reflujo según se describió en literatura [53]. Esto permitió la formación del alqueno **55** con 50,7% de rendimiento. La presencia del enlace doble entre los carbonos C2-C3 fue detectada desde el espectro de ^1H RMN por la observación de las señales a $\delta_H = 5,69$ -5,65 ppm (1H, m) y $\delta_H = 5,58$ -5,53 ppm (1H, m), asignadas a los hidrógenos H-3 y H-2 respectivamente [53]. Mientras que desde el espectro de ^{13}C RMN, se observaron las señales a $\delta_c = 124,92$ y 124,42 ppm, asignadas a los carbonos C-3 y C-2 respectivamente, las cuales fueron correlacionadas desde los espectros 2D HSQC y 2D HMBC (ver Anexo 1).

Reacción de cetalización de la función cetona en C-6 de compuesto **55**, con etilenglicol/*p*-TsOH/reflujo permitió obtener el cetal **56** con 96,4% de rendimiento. El procedimiento utilizado fue reportado para esteroides de estructuras similares [73]. La presencia del grupo protector fue evidenciada principalmente desde los datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN. De esta forma las señales observadas a $\delta_H = 3,91$ -3,80 ppm (m, 3H) y $\delta_H = 3,73$ -

3,68 ppm (m, 1H) fueron asignadas al anillo dioxolano (-OCH₂CH₂O-). Mientras que en los espectros combinados de ¹³C y ¹³C DEPT-135 RMN, las señales observadas a $\delta_c = 109, 70; 65,38$ y $63,90$ ppm fueron asignadas a los carbonos C-6 y ambos carbonos del anillo de dioxolano, respectivamente. Reducción de **56** con LiAlH₄/THF de forma similar a procedimiento reportado [73] y posterior hidrólisis ácida permitió la obtención del compuesto **57**, con 91,5% de rendimiento. La caracterización espectroscópica desde datos de IR para este compuesto mostró señales a 3510, 1693 y 1659 cm⁻¹, atribuidas a la presencia de las funciones OH, C=O y C=C, respectivamente. Mientras que desde el espectro de ¹H RMN, las señales observadas a $\delta_H = 5,70-5,66$ ppm (m, 1H), $\delta_H = 5,58-5,54$ ppm (m, 1H), $\delta_H = 3,63$ (dd, *J* = 10,5 y 3,2 Hz, 1H) y $\delta_H = 3,37$ ppm (dd, *J* = 10,5 y 6,8 Hz, 1H), fueron asignadas a los hidrógenos H-3, H-2, H-22a y H-22b, respectivamente. Mientras que desde el espectro de ¹³C RMN las señales observadas a $\delta_H = 211,96; 124,91; 124,47$ y $67,80$ ppm, fueron asignadas a los carbonos C-6 (C=O), C-3 y C-2 (C=C) y al carbono carbinílico C-22 (-CH₂-OH), respectivamente.

Reacción de dihidroxilación de Shralpless del alqueno **57**, de acuerdo con procedimiento descrito [45,56], permitió la obtención del nuevo análogo de BRs **58**, con 70,9% de rendimiento. En investigaciones realizadas por otros autores se describió la síntesis de los derivados **58a-f**, que se muestran en la Figura 5.2. Sí bien estos derivados fueron informados y el alqueno **57** fue utilizado como precursor de síntesis, no se indican caracterizaciones estructurales por alguna técnica espectroscópica para **57** como tampoco para sus derivados **58a-f** [32,83].

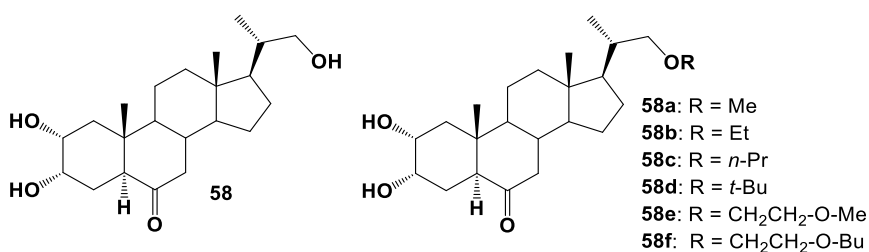


Figura 5.2: Estructuras del compuesto **58** y compuestos relacionados **58a-f**.

La determinación estructural del análogo **58**, se realizó principalmente por técnicas espectroscópicas de 1D y 2D RMN. Es importante destacar que sí bien este compuesto fue sintetizado previamente, solo se entregaron datos espectroscópicos parciales de IR, pero no se realizó la determinación estructural [84]. Desde el espectro de ¹H RMN, las señales

observadas a $\delta_H = 3,95$ ppm (1H, da, $J = 2,8$ Hz); 3,66 ppm (1H, ddd, $J = 11,7$; 4,7 y 3,1 Hz); 3,57 ppm (1H, dd, $J = 10,7$ y 3,1 Hz, H-22a) y 3,26 ppm (1H, dd, $J = 10,7$ y 7,1 Hz) fueron asignadas a los cuatro hidrógenos carbinólicos presentes en la estructura y que fueron identificados como H-3, H-2, H-22a y H-23b respectivamente. Mientras que desde el espectro de ^{13}C RMN, las señales observadas a $\delta_C = 69,58$; 69,23 y 67,96 ppm, fueron asignadas a los carbonos C-3, C-2 y C-22 respectivamente. Las señales carbinólicas observadas en el espectro de ^1H y ^{13}C RMN, fueron correlacionadas a $^1J_{\text{HC}}$ desde el espectro 2D HSQC, de acuerdo con lo indicado en la Figura 5.3.

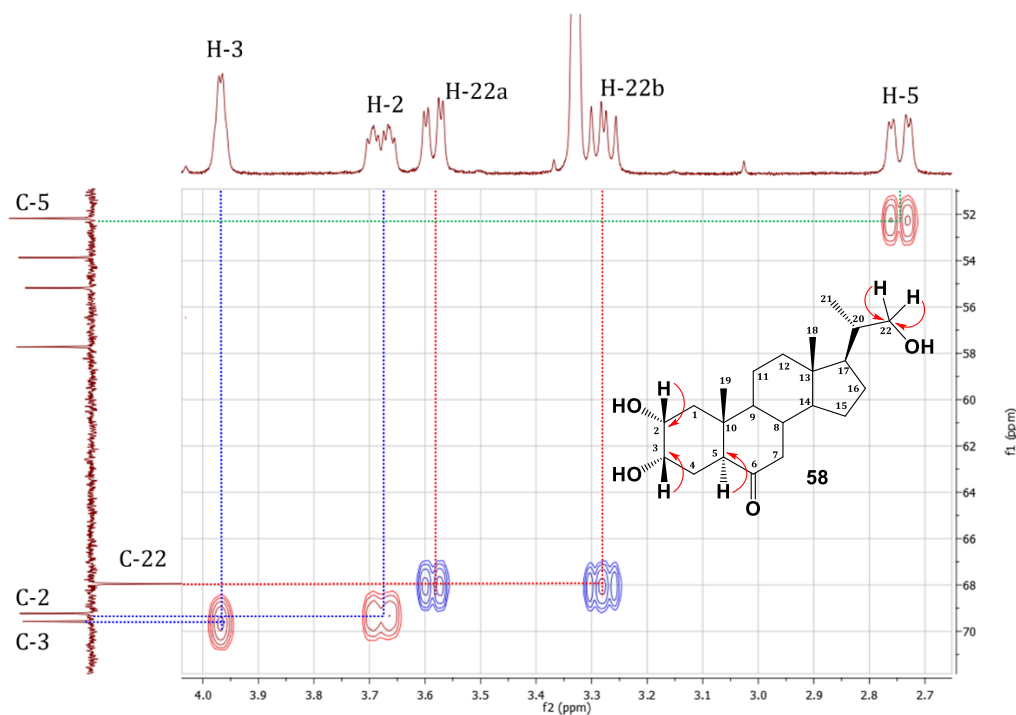


Figura 5.3. Espectro parcial 2D HSQC ed., donde se muestran las correlaciones heteronucleares a $^1J_{\text{HC}}$ para los hidrógenos H-2, H-3, H-5, H-22a y H-22b, para el análogo **58**.

Mientras que la confirmación de las posiciones de los grupos hidroxilos en C-2 y C-3 fueron establecidas desde datos de correlaciones heteronucleares a $^2J_{\text{HC}}$ y $^3J_{\text{HC}}$ observadas en el espectro 2D HMBC. De esta forma la señal H-3 (3,95 ppp, da, $J = 2,8$ Hz) mostró correlaciones a $^2J_{\text{HC}}$ con C-2 ($\delta_C = 69,23$ ppm), mientras que la señal de H-5 (2,73 ppm, dd, $J = 12,2$ y 3,4 Hz) mostró δ_C correlaciones a $^3J_{\text{HC}}$ con los carbonos a $\delta_C = 69,58$ y 13,98 ppm, asignadas a C-3 y C-19 respectivamente, y una correlación a $^2J_{\text{HC}}$ con C-6 ($\delta_C = 215,11$ ppm)

(Figuras 5.4a y 5.4b). Otras correlaciones heteronucleares a $^2J_{\text{HC}}$ y $^3J_{\text{HC}}$, se muestran en la Figura 5.4b.

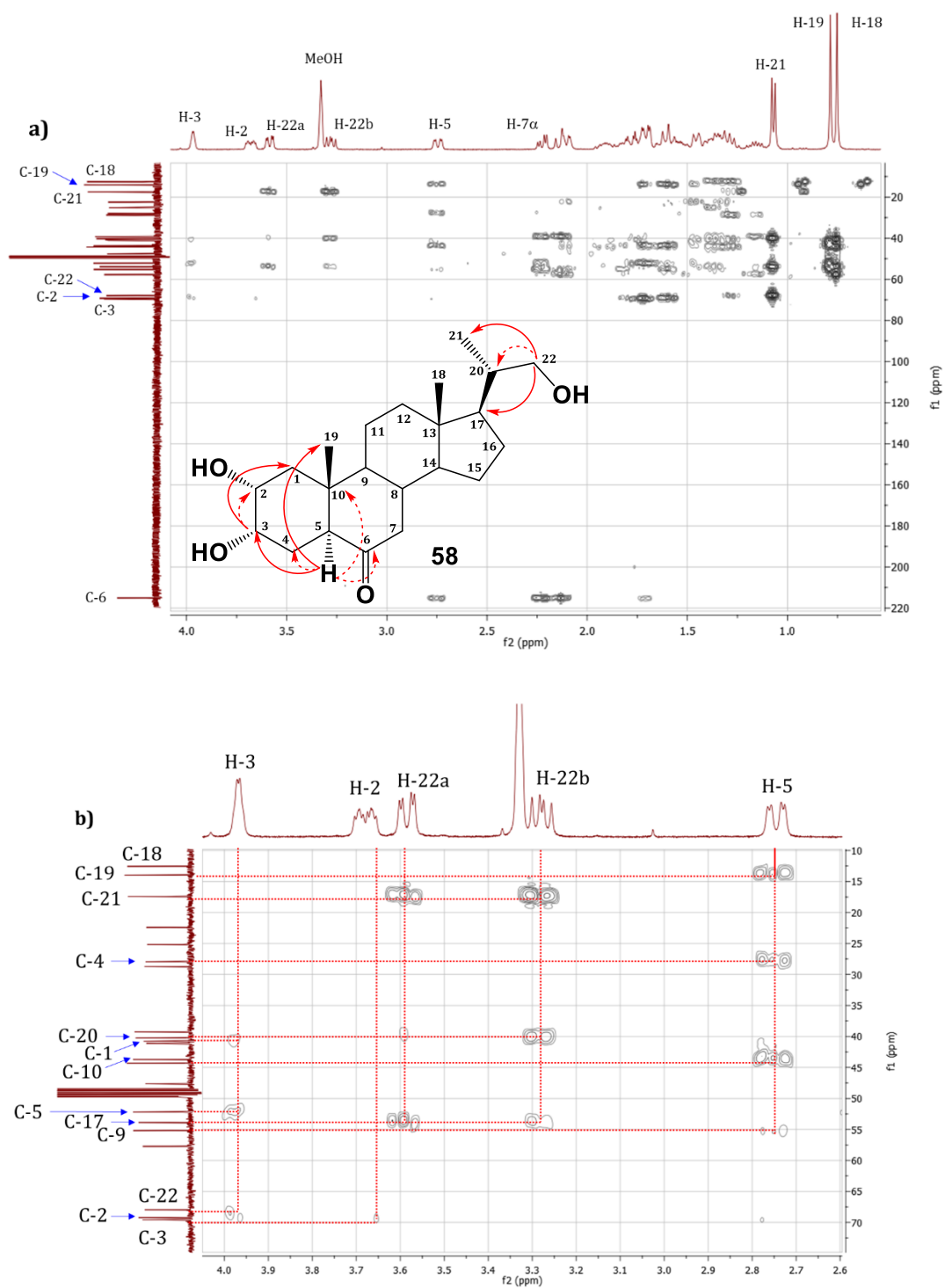


Figura 5.4: a) Espectro 2D HMBC completo para el compuesto **58** y su estructura, que muestran las principales correlaciones heteronucleares a $^2J_{\text{HC}}$ (flechas segmentadas) y $^3J_{\text{HC}}$ (flechas continuas). b)

Ampliación espectro 2D HMBC que muestra otras correlaciones para confirmar las posiciones de los grupos OH en los carbonos C-2, C-3 y C-22.

La determinación estereoquímica de los carbonos C-2 y C-3, fue establecida por dos criterios: 1. Es sabido que la reacción de dihidroxilación ya sea de Upjohn [32,37,39–42,53,74,85–87] o de Sharpless [88] conduce mayoritariamente a la formación de *cis* glicoles con estereoquímicas C-2(*R*) y C-3(*S*) en el anillo A de esteroides con fusión A/B *trans* (esteroides 5 α), que es debido al impedimento estérico que produce el grupo CH₃-19 a la aproximación del OsO₄ por la cara superior del anillo A, por lo cual la dihidroxilación se ve favorecida por la cara inferior (Figura 5.5).

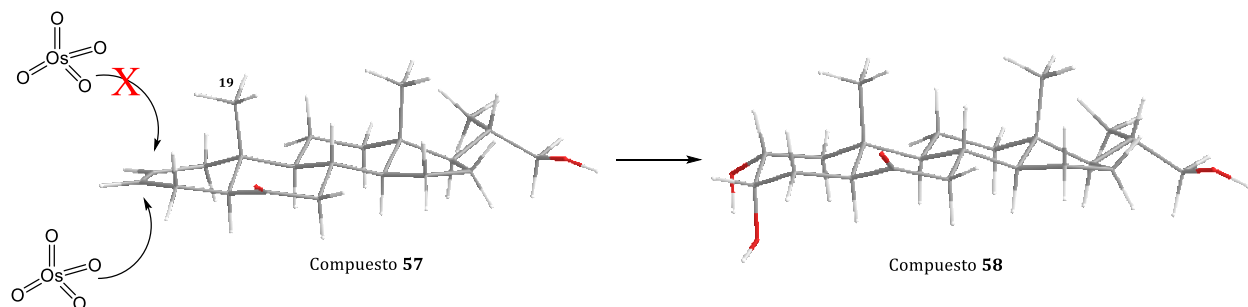


Figura 5.5. Adición preferencial del OsO₄ por la cara inferior del plano del enlace doble C2-C3, en el compuesto 57, que permitirá la formación diastereoespecífica del diol 2 α -3 α en el compuesto 58.

Como segundo criterio de confirmación de la estereoquímica en los carbonos C-2 y C-3, se realizó un experimento de RMN de NOE selectivo sobre la señal de H-2 ($\delta_H = 3,95$ ppm, da, $J = 2,8$ Hz) en el compuesto 58, el cual mostró acoplamiento espacial (NOE) con las señales a $\delta_H = 1,71$ y $0,77$ ppm asignadas a H-4 β (correlacionada por 2D HSQC) y grupo CH₃-19 (Figura 5.6). Además, se observó acoplamiento escalar (J_{HH}) con la señal a $\delta_H = 3,66$ ppm (ddd, $J = 11,7; 4,7$ y $3,1$ Hz), asignada a H-2 (Figura 5.6). De esta forma se confirman las estereoquímicas de C-2 y C-3, donde el diol resultante producto de la dihidroxilación tiene función 2 α -3 α diol.

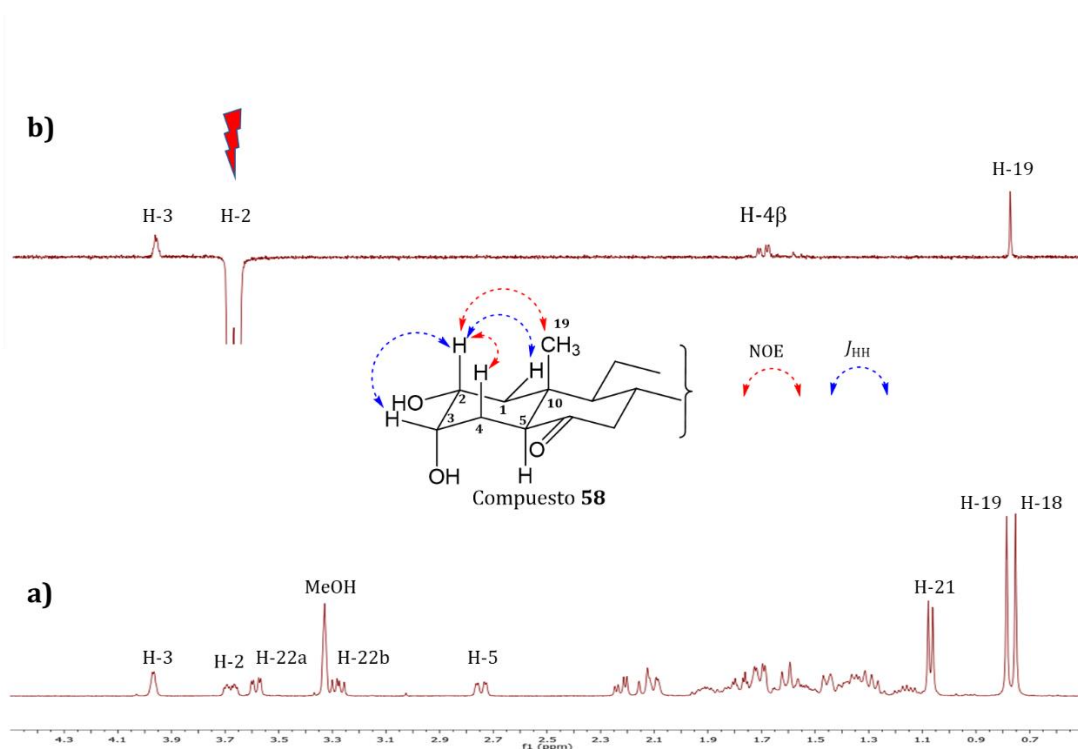
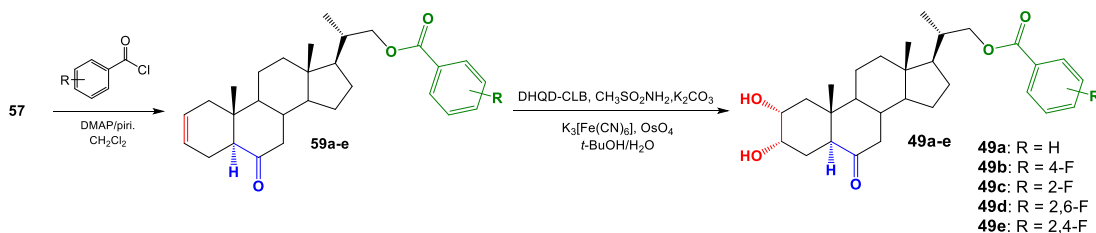


Figura 5.6: a) Espectro ¹H RMN del compuesto **58**. b) Espectro de NOE selectivo, que muestra la excitación selectiva de H-2 y los efectos NOE observados con H-4β y CH₃-19. Mientras que la otra señal observada corresponde a acoplamiento escalar con H-3.

Posteriormente, reacción de benzoilación en C-22 del alqueno **57** con cloruro de benzoilo con DMAP/pi/CH₂Cl₂ (Esquema 2) según fue reportado [46,56], produjo el éster benzoato **59a** con 85,4 % de rendimiento.



Esquema 2: Obtención de los nuevos análogos de BRs **49a-e** desde el intermedio avanzado **57**.

La principal evidencia espectroscópica de la incorporación de la función benzoato provino desde los espectros de ¹H y ¹³C RMN del compuesto **59a**, donde las señales observadas a δ_H = 8,04 ppm (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,56 ppm (1H, tt, J = 7,6 y 1,5 Hz) y 7,44 ppm (2H, ta, J = 7,6 Hz), fueron asignadas a los hidrógenos aromáticos H-2', H-4' y H-3'

respectivamente (Figura 5.7). Mientras que desde el espectro de ^{13}C RMN, las señales observadas a $\delta_c = 134,81$; $129,48$ y $128,33$ ppm, fueron asignadas a los carbonos C-4', C-2' y C-6', C-3' y C-5' respectivamente. Adicionalmente estas señales fueron correlacionadas en forma directa (acoplamiento heteronuclear a $^1J_{\text{HC}}$) desde la información obtenida desde el espectro 2D HSQC (Figura 5.7).

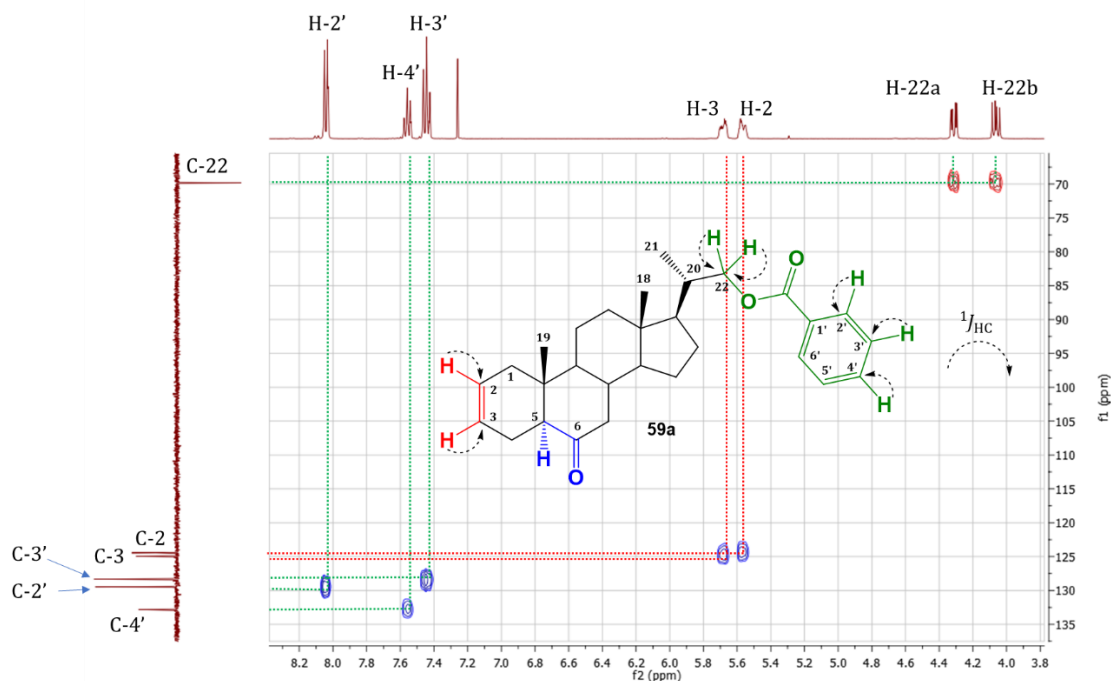


Figura 5.7: Estructura del compuesto **59a** y espectro ^1H - ^{13}C HSQC parcial con proyección de espectro ^{13}C DEP 135, que muestra las principales correlaciones entre los hidrógenos aromáticos H-2', H-3' y H-4', con sus correspondientes carbonos a $^1J_{\text{HC}}$. Adicionalmente se muestran las correlaciones heteronucleares a $^1J_{\text{HC}}$ para los hidrógenos H-2, H-3 y H-22a y H-22b y sus correspondientes carbonos C-2, C-3 y C-22.

Mientras que las señales observadas a $\delta_{\text{H}} = 4,31$ ppm (1H, dd, $J = 10,7$ y $3,5$ Hz) y $4,06$ ppm (1H, dd $J = 10,7$ y $7,1$ Hz), asignadas a los hidrógenos H-22a y H-22b, mostraron correlaciones heteronucleares a $^3J_{\text{HC}}$ en el espectro 2D HMBC con la señal observada a $\delta_c = 166,68$ ppm, asignada al grupo Ar-COO- (Figura 5.8). Con esta información se confirma la unión del grupo benzoato al carbono C-22 de la cadena lateral del esteroide.

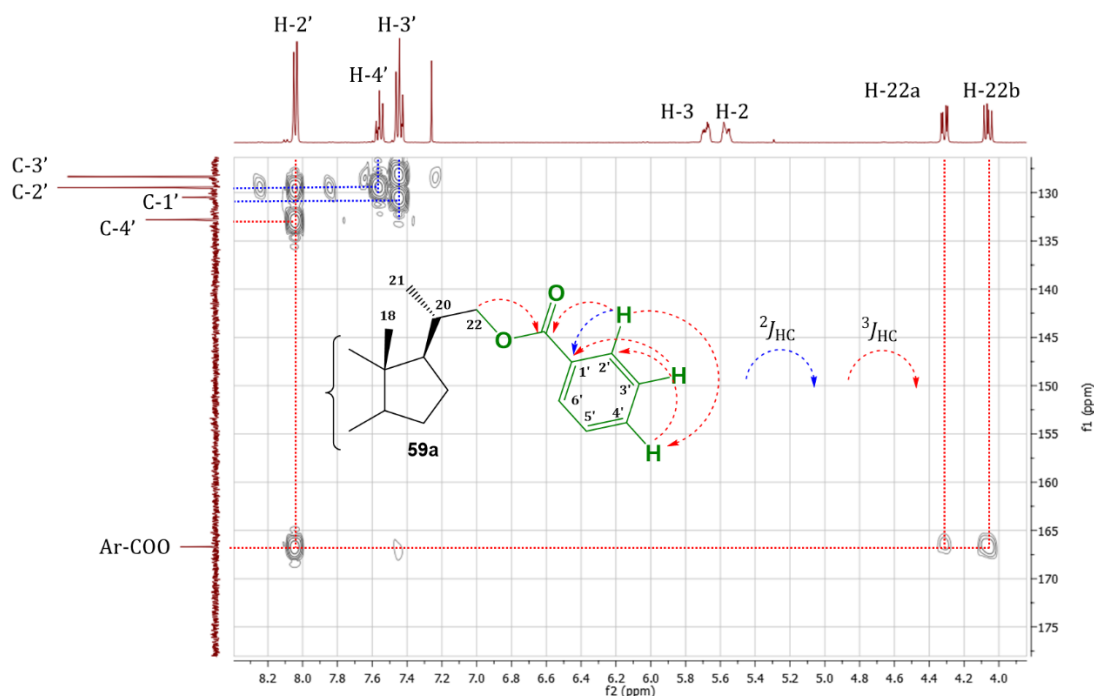


Figura 5.8: Estructura parcial del compuesto **59a** y espectro ^1H - ^{13}C HMBC, que muestra las principales correlaciones a $^3J_{\text{HC}}$ entre los hidrógenos H-22ab de la cadena lateral con el carbono carboxílico de la función benzoato. Adicionalmente se muestran las correlaciones heteronucleares a $^2J_{\text{HC}}$ y $^3J_{\text{HC}}$ entre los hidrógenos aromáticos H-2', H-3' y H-4', con el resto de los carbonos del anillo.

Posteriormente, reacción de benzoilación en C-22 del alqueno **57** con los cloruros de benzoilo con DMAP/ π /CH₂Cl₂ (Esquema 2) siguiendo la misma metodología descrita para la obtención de **59a** produjo los ésteres de benzoato **59b** y **59c** con 72,5 y 65,0 % de rendimiento respectivamente. La caracterización estructural de **59b** y **59c** se realizó de forma similar a la determinación desarrollada para **59a** (ver Anexo 1).

Finalmente, reacción de dihidroxilación de Sharpless según se indicó para el compuesto **57** (Esquema 2) y de acuerdo con los procedimientos reportados [49,54,88], produjo los análogos de brasinoesteroides **49a-c** con 90%, 84,9% y 82,5% de rendimiento respectivamente. Respecto de la caracterización estructural, esta fue determinada principalmente por técnicas de ^1H y ^{13}C RMN en combinación con otras como 2D RMN. Sin embargo, la principal evidencia espectroscópica fue observada desde el espectro de ^1H RMN donde para los tres análogos **49a-c** la presencia de señales en un rango de $\delta_{\text{H}} = 4,11$ - $3,72$ ppm fueron asignadas a los hidrógenos carbinólicos H-3 y H-2 (ver Anexo 1). Mientras que desde el espectro de ^{13}C RMN, la presencia de señales en un rango de $\delta_{\text{C}} = 68,36$ - $68,14$ ppm, fueron asignadas a los carbonos C-3 y C-2 (ver Anexo 1).

5.2 Ensayos Biológicos

Los BRs desempeñan roles importantes en el crecimiento, desarrollo y respuestas al estrés abiótico de las plantas. Está bien establecido que estos efectos se deben principalmente a la regulación de la expansión celular, la división y la elongación celulares. Por lo tanto, la actividad de las BRs puede detectarse y cuantificarse a través de una serie de respuestas vegetales diferentes, y en consecuencia se han propuesto varios bioensayos. Se ha demostrado que diferentes actividades de las BRs se obtienen mediante el uso de pruebas de diferentes actividades biológicas; esto significa que los resultados obtenidos por diferentes métodos no son equivalentes y no pueden compararse [89]. Este es un factor muy importante a tener en cuenta para la comparación de las actividades de las BRs y la propuesta de relaciones estructura-actividad de análogos sintéticos de las BRs [90,91]. En este trabajo, se utilizó el Ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA), uno de los métodos más ampliamente utilizados debido a su alta sensibilidad y especificidad, y el bioensayo del Segundo Internudo de Frijol (SEF).

5.2.1 Actividad Biológica de Análogos de Brasinoesteroide en la Prueba de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA).

La actividad de los análogos de BRs **49a-49c** y **58** fue evaluada mediante ILA utilizando la brasinólida (**1**) como control positivo. Las mediciones se realizaron a tres concentraciones diferentes: 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M (ver Tabla 5.1). Los resultados se expresan como el ángulo de flexión entre las láminas y las vainas.

Tabla 5.1: Actividad de análogos de BRs disueltos en Etanol/DMSO mediante bioensayos in vitro de Inclinación de la lámina de arroz. Las letras representan experimentos con una diferencia significativa entre el control positivo (1) y los tratamientos análogos en el nivel de significancia del 0.05 (prueba t de Student).

Compuesto	Apertura del ángulo (°) ILA		
	1×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M
Brasinólida (1)	38±7,5	46±8,0	89±4,9
58	45±2,0	26±6,1	16±4,1
49a	6±2,0	21±2,0	10±2,6
49b	6±3,8	33±2,0	36±2,0
49c	27±0,0	42±0,0	24±2,7
Control negativo (H₂O)		3±2,6	

Los valores de los ángulos de flexión obtenidos para **1**, en las tres concentraciones probadas, están en línea con los reportados anteriormente [57], e indican que la actividad

biológica de **1** aumenta con la concentración creciente. También se puede observar que los análogos **49b** y **49c**, con un grupo benzoato en C-22 y un átomo de flúor en la posición *orto* y *para*, respectivamente, son más activos que el análogo **58** (sin grupo benzoato) y que el análogo **49a** (sin átomo de F en el grupo benzoato) a las concentraciones de 1×10^{-7} y 1×10^{-6} M (Tabla 5.1). A la concentración de 1×10^{-7} M, el análogo **49c** resultó ser el compuesto más activo, incluso comparable con la mostrada por la brasinólida (**1**). Sin embargo, a la concentración de 1×10^{-6} M, la actividad de la brasinólida (**1**) es de 3 a 9 veces mayor que la exhibida por los análogos **58**, **49a**, **49b**. Así, la comparación de los ángulos de flexión medidos para **49a** con los obtenidos para **49b** y **49c** muestran que la sustitución por el átomo de F en el anillo aromático aumenta la elongación del crecimiento de la planta, y este efecto al parecer depende de la posición del átomo del átomo de F.

5.2.2 Actividad biológica de Análogos de Brasinoesteroide en el Bioensayo del Segundo Internudo de Frijol. (SEF)

Este ensayo se ha utilizado tanto para giberelinas como para BRs. Para las giberelinas, solo se puede detectar la elongación, mientras que, para los BRs, la curvatura, hinchazón y división del internudo se pueden medir fácilmente [30,32,37,45,53,74,92,93].

Los valores obtenidos del ensayo de elongación del segundo internudo del frijol se muestran en la Figura 5.9 y se resumen en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Ensayo de Elongación del Segundo Internudo del Frijol (SEF) de análogos de brasinoesteroides **49a**-**49c** y **58** a la concentración de 1×10^{-8} M. Las letras indican el nivel de significancia según la prueba t de Student $P < 0.05$.

Análogo	Elongación del Segundo Internudo de frijol (mm±SD), 1×10^{-8} M
1	20,2± 0,65
49a	20,8± 0,26
49b	85,0± 4,0
49c	17,5± 0,52
58	8,5± 0,49
C. Negativo	10± 0,5

Los datos en la Tabla 5.2 muestran que la actividad de los análogos benzoilados **49a** y **49c**, medidos por el Bioensayo del Segundo Internudo de Frijol, es similar a la observada para la brasinólida (**1**), mientras que el análogo **49b** (con átomo de F en posición *para*)

exhibe una actividad de elongación sorprendentemente alta. Finalmente, el análogo **58** (sin función benzoato en la cadena lateral) resultó ser inactivo a la misma concentración.

5.3 Estudios de acoplamiento molecular

Los resultados obtenidos indican que el compuesto con mayor afinidad después del Brasinólido es **49c** con Docking score de -10,6 y -15,2 (Tabla 5.3 y 5.4) con BRI1-BAK1 y BRI1, respectivamente. En la pose predicha del compuesto **49c** genera cinco puentes de hidrógeno, tres de ellos actuando como aceptor de puentes de hidrógeno, dos interacciones entre el oxígeno carbonílico en C-22 con el grupo hidroxilo del residuo Tyr597 (2,53 Å) y con el grupo amino de Ser647 (2,09 Å) y una del grupo hidroxilo en C-2 y His61 (2,0 Å); Por otra parte, presenta interacciones de tipo donador de puentes de hidrógeno entre su función C3-hidroxilada y el grupo hidroxilo del residuo Tyr642 (2,27 Å) , así como también, entre el grupo hidroxilo en C-2 y el oxígeno carbonílico de la función amida del residuo Asn705 (1,81 Å). Por otro lado, **49c** genera interacción π - π stacking entre el grupo aromático y el residuo Phe60, también presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos Tyr642, Trp59, Phe60, Val62, Ile706, Pro648, Tyr599, Trp564, Met657, Phe658, Leu615, Ile682 y Phe681 (Figura 5.9).

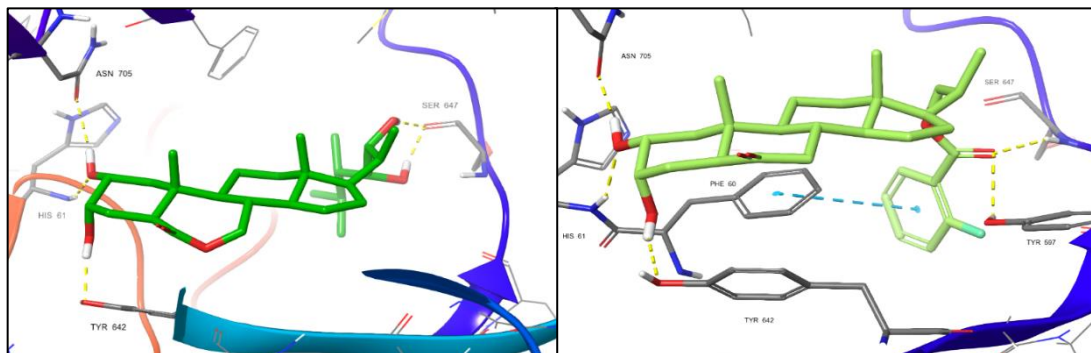


Figura 5.10: Modo predictivo de unión para brasinólida (**1**) y **49c** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

Tabla 5.3: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1 y cada uno de los análogos estudiados.

Ligando	Energía mín. BRI1-Ligando (Kcal/mol)
1	-10,7
49a	-9,4
49b	-10,6
49c	-10,6
49d	-7,1
49e	-8,6
58	-7,4

Tabla 5.4: Valores de energía mínima del complejo formado entre el complejo receptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.

Ligando	Energía mín. BRI1-BAK1-Ligando (Kcal/mol)
1	-16,1
49a	-14,2
49b	-14,5
49c	-15,2
49d	-13,7
49e	-13,8
58	-13,2

Las interacciones de **49c** con BRI1 en la pose predicha, genera cuatro puentes de hidrógeno, dos de ellos actuando como aceptor de puentes de hidrógeno, entre el oxígeno carbonílico en C-22 con el grupo hidroxilo del residuo Tyr597 (2,14 Å) y con el grupo amino de Ser647 (2,11 Å). Por otra parte, presenta interacciones de tipo donador de puentes de hidrógeno entre su función C3-hidroxilada y el grupo hidroxilo del residuo Tyr642 (2,55 Å), así como también, entre el grupo hidroxilo en C-2 y el oxígeno carbonílico de la función amida del residuo Asn705 (2,30 Å). Por otro lado, **49c** presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos Tyr642, Ile706, Tyr599, Trp564, Met657, Ile682, Tyr597 y Phe681 (Figura 5.11). El modo predictivo y sus interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre el complejo BRI1-BAK1 para el resto de los análogos se muestran en el Anexo 3.

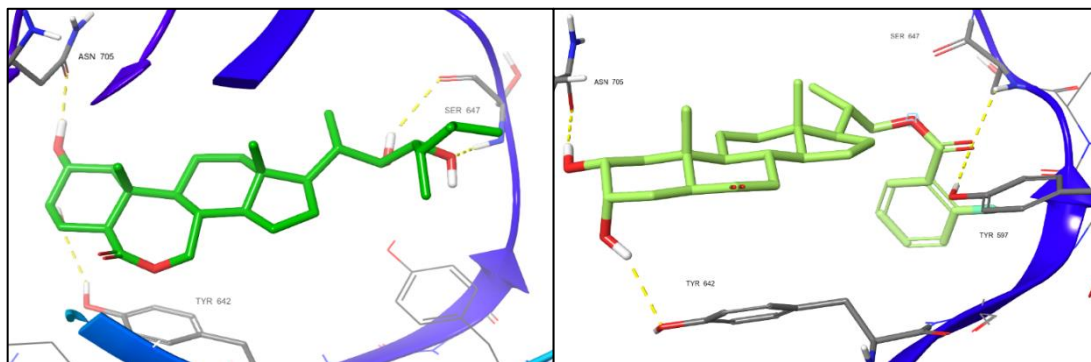


Figura 5.11. Modo predictivo de unión para brassinólida (**1**) y **49c** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

CAPITULO 6 - CONCLUSIONES

Desde ácido 3 β -acetil-23,24-bisnorcolénico (**16**), se sintetizaron tres nuevos análogos de brasinoesteroides con funciones 2 α ,3 α -diol en el anillo A, fusión de anillos A/B tipo trans, función 6-oxo en el anillo B y función benzoato en C-22, correspondiente a los compuestos **49a**, **49b** y **49c**, con rendimientos globales de 8,4%, 6,7% y 5,5%, respectivamente.

En el ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA), los análogos **49b** y **49c**, con un grupo benzoato en C-22 y átomos de flúor en posiciones *orto* y *para*, respectivamente, demostraron ser más activos que el análogo **58** (sin grupo benzoato) y que el análogo **49a** (sin átomo de flúor en el anillo aromático) a concentraciones de 1×10^{-7} y 1×10^{-8} M. El compuesto **49c** se destacó como el más activo, comparándose incluso con la brasinólida (**1**).

En el bioensayo del Segundo Internudo de Frijol (SEF), los análogos de ésteres de benzoatos **49a** y **49c** mostraron actividad similar a la brasinólida (**1**), mientras que el análogo **49b** (con átomo de flúor en posición *para*) exhibió una sorprendente actividad de elongación a 1×10^{-8} M. Contrariamente, el análogo **58** (sin función benzoato en la cadena lateral) resultó inactivo a la misma concentración. El compuesto **49b**, con el átomo de flúor en posición *para* en el anillo aromático, se destacó como el análogo de brasinoesteroides más activo, superando en algunos casos a la brasinólida (**1**).

En el estudio de Acoplamiento Molecular, el análogo **49c** mostró una afinidad significativa, superando a la brasinólida (**1**) en Docking score tanto para BRI1-BAK1 como para BRI1. Particularmente interesante fue la interacción de **49c** con BRI1, donde el análogo **49c** formó cuatro puentes de hidrógeno y mostró interacciones específicas con Tyr597, Ser647 y Tyr642. También se destacaron interacciones hidrofóbicas con varios residuos.

En resumen, el análogo **49c** exhibió una alta afinidad y diversas interacciones, lo que podría explicar la actividad biológica de crecimiento vegetal observada en el bioensayo ILA para dicho compuesto. Si bien, el docking molecular ha sido útil en el estudio de interacciones de nuevos ligandos y su respectivo receptor, su simplificación de la

dinámica molecular puede llevar a predicciones inexactas. En contraste, la dinámica molecular considera la flexibilidad y los cambios conformacionales, ofreciendo predicciones más precisas y detalladas de las interacciones ligando-receptor. Por lo tanto, la dinámica molecular emerge como una alternativa más fiable en el desarrollo de nuevos análogos de brasinoesteroide a utilizar en futuras investigaciones.

Los resultados de actividad de crecimiento vegetal tanto en el ensayo ILA como SEF de los tres análogos sintetizados, sugieren que la presencia de grupos benzoato en C-22 con sustituyentes fluorados en el anillo aromático es una alternativa como potenciales moléculas con actividad biológica de crecimiento vegetal. La hipótesis de esta tesis se acepta con los resultados observados para tres de los cinco análogos propuestos.

REFERENCIAS

1. Peña-Guerrero, M.D.; Nauditt, A.; Muñoz-Robles, C.; Ribbe, L.; Meza, F. Drought impacts on water quality and potential implications for agricultural production in the Maipo River Basin, Central Chile. *Hydrol. Sci. J.* **2020**, *65*, 1005–1021, doi:10.1080/02626667.2020.1711911.
2. Vargas, X.; McPhee, J.; Rondanelli, R.; Daniele, D.; Vicuña, S.; Meza, F.; Suárez, F.; Lagos, M.; Mendoza, P. Actualización del balance hídrico nacional, SIT N° 417 2017.
3. Agüero, T.; Gumucio, A.; Espinoza, J. *Agricultura Chilena: Reflexiones y Desafíos al 2030*; 1st ed.; Santiago, Chile, 2017; ISBN 9789567244300.
4. Kende, H.; Zeevaart, J.A.D. The Plant Cell. *Am. Soc. Plant Physiol.* **1997**, *9*, 1197–1210.
5. Williams, M.E. The Plant Cell. *Am. Soc. Plant Biol.* **2010**, *22*, tpc.110.tt0310, doi:10.1105/tpc.110.tt0310.
6. Ruhland, W. *Encyclopedia of Plant Physiology*; 1959; Vol. 7; ISBN 9783642500909.
7. Darwin, C. *Books of enduring scholarly value The Power of Movement in Plants*; 1880; ISBN 9781108003605.
8. Santner, A.; Calderon-Villalobos, L.I.A.; Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 301–307, doi:10.1038/nchembio.165.
9. Cardemil, L.; Squeo, F.A. Hormonas y Reguladores del Crecimiento : Etileno , Ácido Abscísico , Brasinoesteroides , Poliaminas , Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. In *Fisiología Vegetal*; La Serena, Chile, 2006.
10. Cassab, G.I.; Guevara, Y.S. Capítulo XVII Diferenciación y Crecimiento Diferencial : La Capacidad Motriz de Las Plantas. *Fisiol. Veg.* **2006**, 1–26.
11. Khripach, V.; Zhabinskii, V.; De Groot, A. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann. Bot.* **2000**, *86*, 441–447, doi:10.1006/anbo.2000.1227.
12. Hayat, S.; Ahmad, A. *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*; Hayat, S., Ahmad, A., Eds.; 1st ed.; Springer, 2011; ISBN 978-94-007-0188-5.
13. Clouse, S.D.; Sasse, J.M. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 427–451, doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
14. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N; de Groot, A.E. *Brassinosteroids: a New Class of Plant Hormones*; 1st Editio.; Academic Press: San Diego, California, USA, 1998;
15. Zullo, M.A.T.; Kohout, L.; De Azevedo, M.D.B.M. Some notes on the terminology of brassinosteroids. *Plant Growth Regul.* **2003**, *39*, 1–11, doi:10.1023/A:1021802910454.

16. Takeno, K.; Pharis, R.P. Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf rice seedlings: An auxin-mediated phenomenon. *Plant Cell Physiol.* **1982**, *23*, 1275–1281, doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076471.
17. Müssig, C.; Shin, G.H.; Altmann, T. Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2003**, *133*, 1261–1271, doi:10.1104/pp.103.028662.
18. Wada, K.; Marumo, S.; Abe, H.; Morishita, T.; Nakamura, K.; Uchiyama, M.; Mori, K. A Rice Lamina Inclination Test-A Micro-quantitative Bioassay for Brassinosteroids. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 719–726, doi:10.1271/bbb1961.48.719.
19. Kim, A.S.; Abe, H.; Little, C.H.A.; Pharis, R.P.; Kim, S.; Abe, H.; Little, C.H.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 Published by : American Society of Plant Biologists. **2016**, *94*, 1709–1713.
20. Suzuki, Y.; Yamaguchi, I.; Yokota, T.; Takahashi, N. Identification of castasterone, typhasterol and teasterone from the pollen of *zea mays*. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 3133–3138, doi:10.1080/00021369.1986.10867873.
21. Thompson, M.J.; Meudt, W.J.; Man, N.B.; Lusby, R.; Spaulding, D.W. Synthesis of Brassinosteroids and Relationship of Structure to Plant Growth-Promoting Effects. *Steroids* **1982**, *39*, 89–105.
22. Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Abe, H. Structure-Activity Relationship of Brassinosteroids with Respect to the A/B-Ring Functional Groups1). *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 211–216, doi:10.1248/cpb.35.211.
23. Grove, M.D.; Spencer, G.F.; Rohwedder, W.K.; Mandava, N.; Worley, J.F.; Warthen, J.D.; Steffens, G.L.; Flippen-Anderson, J.L.; Cook, J.C. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen [12]. *Nature* 1979, *281*, 216–217.
24. Richter, K.; Koolman, J. Antiecdysteroid Effects of Brassinosteroids in Insects. In *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and applications*; American Chemical Society: Washington, DC, 1991; pp. 265–278.
25. Varin, L.; Marsolais, F.; Richard, M.; Rouleau, M. *Biochemistry and molecular biology of plant sulfotransferases*; 1997; Vol. 11; ISBN 0444898255.
26. Temmem, O.; Uguen, D.; De Cian, A.; 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, doi:10.1016/S0040-4039(02)00515-4.
27. 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, doi:10.1016/S0040-4039(02)00517-8.
28. Takatsuto, S.; Yazawa, N. Synthesis of (24R)-28-Homobrassinolide Analogues and Structure-Activity relationships of Brassinosteroids in the Rice-Lamina Inclination

- test. **1983**, 22, 1393–1397.
29. Wada, K.; Marumo, S. Synthesis and Plant Growth-promoting Activity of Brassinolide Analogues. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, 45, 2579–2585, doi:10.1271/bbb1961.45.2579.
 30. Černý, V.; Strnad, M.; Kamínek, M. Preparation of 2 α ,3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23,24-dinor-B-homo-5 α -cholanic acid, its esters and amides as brassinolide analogues. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1986**, 51, 687–697.
 31. Aburatani, M.; Takeuchi, T.; Mori, K. Facile Syntheses of Brassinosteroids: Brassinolide, Castasterone, Teasterone and Typhasterol. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51, 1909–1913, doi:10.1271/bbb1961.51.1909.
 32. Kerb, U.; Eder, U.; Krähmer, H. Synthesis of Hexanor-Brassinolide-22-Ethers with Plant Growth-Promoting Activity. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 1359–1360, doi:10.1080/00021369.1986.10867577.
 33. Takatsuto, S. Synthesis of teasterone and typhasterol, brassinolide-related steroids with plant-growth-promoting activity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1986**, 1833–1836, doi:10.1039/p19860001833.
 34. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ishiguro, M.; Morisaki, M.; Ikekawa, N. Stereoselective synthesis of plant growth-promoting steroids, brassinolide, castasterone, typhasterol, and their 28-nor analogues. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 139–146, doi:10.1039/P19840000139.
 35. Kovganko, N. V; Ananich, S.K. Advances in the chemical synthesis of brassinosteroids. *Chem. Nat. Compd.* **1997**, 33, 389–416.
 36. Voigt, B.; Schmidt, J.; Adam, G. Synthesis of 24-epiteasterone, 24-epityphasterol and their B-homo-6 α -oxalactones from ergosterol. *Tetrahedron* **1996**, 52, 1997–2004, doi:10.1016/0040-4020(95)01042-4.
 37. Kohout, L.; Strnad, M. Brassinosteroids with Ester Function with Five Carbon Atoms at the 20 Position. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1992**, 57, 1731–1738, doi:10.1135/cccc19921731.
 38. Mori, K. Synthesis of a Brassinolide Analog with High Plant Growth Promoting Activity. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, 44, 1211–1212, doi:10.1080/00021369.1980.10864107.
 39. Wei-shan, Z.; Biao, J.; Xin-fu, P. Stereoselective synthesis of the brassinolide side chain; novel syntheses of brassinolide and related compounds. *Tetrahedron* **1990**, 46, 3173–3188, doi:10.1016/S0040-4020(01)85457-0.
 40. Zhou, W.-S.; Tian, W.-S. Study on the synthesis of brassinolide and related compounds III. *Tetrahedron* **1987**, 43, 3705–3712, doi:10.1016/s0040-4020(01)86858-7.
 41. Zhou, W.-S.; Tian, W.-S. Studies on Steroidal Plant-growth Hormones II: Stereoselective Synthesis of (22s,23s)-typhasterol from Hyodeoxycholic acid. *Acta Chim. Sin.* **1985**, 43, 1060–1067.

42. Tian, Weisheng; Zhou, Weishan; Jiang, Biao; Pan, X. Studies on steroidal plant-growth regulator. IX. Preparation of 22R- and 22S-24,25,26,27,28-pentananorbrassinolides. *Acta Chim. Sin.* **1989**, *47*, 1017–1021, doi:1990:478812.
43. Iglesias-Arteaga, M.A.; Pérez Gil, R.; Pérez Martínez, C.S.; Coll Manchado, F. Spirostanic analogues of teasterone. Synthesis, characterisation and biological activity of laxogenin, (23S)-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin). *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2001**, 261–266, doi:10.1039/b007656m.
44. Back, T.G.; Pharis, R.P. Structure-Activity Studies of Brassinosteroids and the Search for Novel Analogues and Mimetics with Improved Bioactivity. *J. Plant Growth Regul.* **2003**, *22*, 350–361, doi:10.1007/s00344-003-0057-0.
45. 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, doi:10.1016/j.steroids.2014.04.007.
46. Carvajal, R.; González, C.; Olea, A.F.; Fuentealba, M.; Espinoza, L. Synthesis of 2-deoxybrassinosteroids analogs with 24-nor, 22(s)-23-dihydroxy-type side chains from hyodeoxycholic acid. *Molecules* **2018**, *23*, 1306, doi:10.3390/molecules23061306.
47. Brosa, C.; Miró, X. Synthesis of new brassinosteroids with epoxy functions: The effect on the regioselectivity of the Baeyer-Villiger reaction. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11347–11354, doi:10.1016/S0040-4020(97)00716-3.
48. Ferrer-Pertuz, K.; Espinoza, L.; 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, doi:10.3390/ijms18122734.
49. Korinkova, P.; Bazgier, V.; Oklestkova, J.; Rarova, L.; Strnad, M.; Kvasnica, M. Synthesis of novel aryl brassinosteroids through alkene cross-metathesis and preliminary biological study. *Steroids* **2017**, *127*, 46–55, doi:10.1016/j.steroids.2017.08.010.
50. Uesusuki, S.; Watanabe, B.; Yamamoto, S.; Otsuki, J.; Nakagawa, Y.; Miyagawa, H. Synthesis of brassinosteroids of varying acyl side chains and evaluation of their brassinolide-like activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1097–1105, doi:10.1271/bbb.68.1097.
51. Šíča, M.; Hniličková, J.; Swaczynová, J.; Kohout, L. Syntheses of new androstane brassinosteroids with 17 β -ester groups - Butyrates, heptafluorobutyrate, and laurates. *Steroids* **2005**, *70*, 755–762, doi:10.1016/j.steroids.2005.04.005.
52. Espinoza, L. Synthesis of Four New Brassinosteroids Analogues 11-Oxo-Functionalized on C Ring, with 24-Nor Side Chain and Containing 5 β -Cholanic Acid Skeleton. *Org. Chem. Curr. Res.* **2016**, *04*, 1–5, doi:10.4172/2161-0401.1000156.
53. Kohout, L.; Chodounská, H.; Tomáš, M.; Strnad, M. Synthesis of (20S)-2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-7-oxa-7a-homo-5 α -pregnane-20-carboxylic Acid as a

- Brassinosteroid Part of Ligands for Binding to Affinity Chromatography Carriers. **2000**, *65*, 1754–1761, doi:10.1135/cccc20001754.
54. Kvasnica, M.; Oklestkova, J.; Bazgier, V.; Rárová, L.; Korinkova, P.; Mikulík, J.; Budesinsky, M.; Béres, T.; Berka, K.; Lu, Q.; et al. Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8691–8701, doi:10.1039/c6ob01479h.
 55. Wendeborn, S.; Lachia, M.; Jung, P.M.J.; Leipner, J.; Brocklehurst, D.; De Mesmaeker, A.; Gaus, K.; Mondière, R. Biological Activity of Brassinosteroids – Direct Comparison of Known and New Analogs in planta. *Helv. Chim. Acta* **2017**, *100*, e1600305, doi:10.1002/hlca.201600305.
 56. Oyarce, J.; Aitken, V.; González, C.; Ferrer, K.; Olea, A.F.; Parella, T.; Espinoza, L. Synthesis and structural determination of new brassinosteroid 24-nor-5 α -cholane type analogs. *Molecules* **2019**, *24*, 4612, doi:10.3390/molecules24244612.
 57. Díaz, K.; Espinoza, L.; Carvajal, R.; Conde-González, M.; Niebla, V.; Olea, A.F.; Coll, Y. Biological activities and molecular docking of brassinosteroids 24-norcholane type analogs. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8–10, doi:10.3390/ijms21051832.
 58. Coll, Y.; Coll, F.; Amorós, A.; Pujol, M. Brassinosteroids roles and applications: An up-date. *Biol.* **2015**, *70*, 726–732, doi:10.1515/biolog-2015-0085.
 59. Gudesblat, G.E.; Russinova, E. Plants grow on brassinosteroids. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2011**, *14*, 530–537, doi:10.1016/j.pbi.2011.05.004.
 60. Xi, L.; Wu, X.N.; Gilbert, M.; Schulze, W.X. Classification and interactions of LRR receptors and co-receptors within the arabidopsis plasma membrane – An overview. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1–8, doi:10.3389/fpls.2019.00472.
 61. 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*, 472–477, doi:10.1038/nature10178.
 62. Karlova, R.; de Vries, S.C. Advances in understanding brassinosteroid signaling. *Sci. STKE* **2006**, *2006*, 1–4, doi:10.1126/stke.3542006pe36.
 63. Kim, T.W.; Wang, Z.Y. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 681–704, doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092057.
 64. 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*, 467–472, doi:10.1038/nature10153.
 65. Wang, X.; Kota, U.; He, K.; Blackburn, K.; Li, J.; Goshe, M.B.; Huber, S.C.; Clouse, S.D. Sequential Transphosphorylation of the BRI1/BAK1 Receptor Kinase Complex Impacts Early Events in Brassinosteroid Signaling. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 220–235, doi:10.1016/j.devcel.2008.06.011.
 66. Nguyen, N.T.; Nguyen, T.H.; Pham, T.N.H.; Huy, N.T.; Bay, M. Van; Pham, M.Q.; Nam, P.C.; Vu, V. V.; Ngo, S.T. Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but

- Autodock4 Forms Better Binding Affinity. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 204–211, doi:10.1021/acs.jcim.9b00778.
67. Allouche, A. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J. Comput. Chem.* **2012**, *32*, 174–182, doi:10.1002/jcc.
68. Gaillard, T. Evaluation of AutoDock and AutoDock Vina on the CASF-2013 Benchmark. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *58*, 1697–1706, doi:10.1021/acs.jcim.8b00312.
69. Fernholz, E. Über die Konstitution des Stigmasterins. *Liebigs Ann. Chemm* **1933**, 128–138.
70. Jiang, B.; Huang, L.; Tian, W.; Zhou, W. Methods for construction of sidechain of brassinosteroids and application to syntheses of brassinosteroids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1996**, *19*, 245–287, doi:10.1016/S1572-5995(96)80008-1.
71. Diachkov, M. V.; Ferrer, K.; Oklestkova, J.; Rarova, L.; Bazgier, V.; Kvasnica, M. Synthesis and biological activity of brassinosteroid analogues with a nitrogen-containing side chain. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–27, doi:10.3390/ijms22010155.
72. Herrera, H.; Carvajal, R.; Olea, A.F.; Espinoza, L. Structural modifications of deoxycholic acid to obtain three known brassinosteroid analogues and full NMR spectroscopic characterization. *Molecules* **2016**, *21*, 1139, doi:10.3390/molecules21091139.
73. Antonchick, A.P.; Schneider, B.; Zhabinskii, V.N.; Khripach, V.A. Synthesis of [26,27-2H 6]brassinosteroids from 23,24-bisnorcholenic acid methyl ester. *Steroids* **2004**, *69*, 617–628, doi:10.1016/j.steroids.2004.05.014.
74. Eignerová, B.; Slavíková, B.; Buděšínský, M.; Dračínský, M.; Klepetářová, B.; Št'átná, E.; Kotora, M. Synthesis of fluorinated brassinosteroids based on alkene cross-metathesis and preliminary biological assessment. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5753–5757, doi:10.1021/jm900495f.
75. Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P.C.; Mainz, D.T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196, doi:10.1021/jm051256o.
76. Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G. V.; Mee, R.P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, *11*, 425–445, doi:10.1023/A:1007996124545.
77. Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749, doi:10.1021/jm0306430.
78. 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*, 1–13, doi:10.3390/ijms18030516.
79. Li, H.-Y.; Wang, H.-M.; Jang, S. Rice Lamina Joint Inclination Assay. *Bio-Protocol* **2017**, *7*, 1–8, doi:10.21769/bioprotoc.2409.
 80. 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, doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076173.
 81. Slavikova, B.; Kohout, L.; Budesinsky, M.; Swaczynova, J.; Kasal, A. Brassinosteroids: Synthesis and activity of some fluoro analogues. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3979–3984, doi:10.1021/jm800085p.
 82. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data*; 2009; ISBN 9783540938095.
 83. Kerb, U.; Eder, U. *Hexanor-Brassinolid-22-Ethers*; US. Patent 4,591,650: Berlin, Fed. Rep. of Germany, 1986;
 84. Kondo, M.; Mori, K. Synthesis of brassinolide analogs with or without the steroidal side chain. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 97–102, doi:10.1080/00021369.1983.10865574.
 85. Černý, V.; Zajíčka, J.; Strnad, M. $2\alpha,3\alpha$ -Dihydroxy-7-oxa-6-oxo-B-homo-5 α -pregnan-21-oic acid and its derivatives as brassinolide analogues. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1987**, *52*, 215–222.
 86. Huang, L.-F.; Zhou, W.-S. Studies on Steroidal Plant-growth Regulators. Part 33. Novel Method for Construction of the Side-chain of 23-Arylbrassinosteroids via Heck Arylation and Asymmetric Dihydroxylation as Key Steps. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 3579–3585, doi:10.1039/P19940003579.
 87. Okada, K.; Mori, K. Synthesis of brassinolide analogs and their plant growth-promoting activity. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 89–95, doi:10.1080/00021369.1983.10865573.
 88. Atta-ur Rahman *Studies in Natural Products Chemistry, Structure and Chemistry, Part E, Vol. 19*; Ed. Elsevier B.V.: Amsterdam, Netherlands, 1997;
 89. Soto, N.; Ferrer, K.; Díaz, K.; González, C.; Taborga, L.; Olea, A.F.; Carrasco, H.; Espinoza, L. Synthesis and biological activity of new brassinosteroid analogs of type 24-nor-5 β -cholane and 23-benzoate function in the side chain. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4808, doi:10.3390/ijms22094808.
 90. Oklešt'ková, J.; Rárová, L.; Strnad, M. Brassinosteroids and their Biological Activities. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K., Mérillon, JM. (eds), 2013; pp. 1–4242 ISBN 9783642221446.
 91. Zullo, M.A.T.; Adam, G. Brassinosteroid phytohormones - Structure, bioactivity and applications. *Brazilian J. Plant Physiol.* **2002**, *14*, 143–181, doi:10.1590/S1677-04202002000300001.

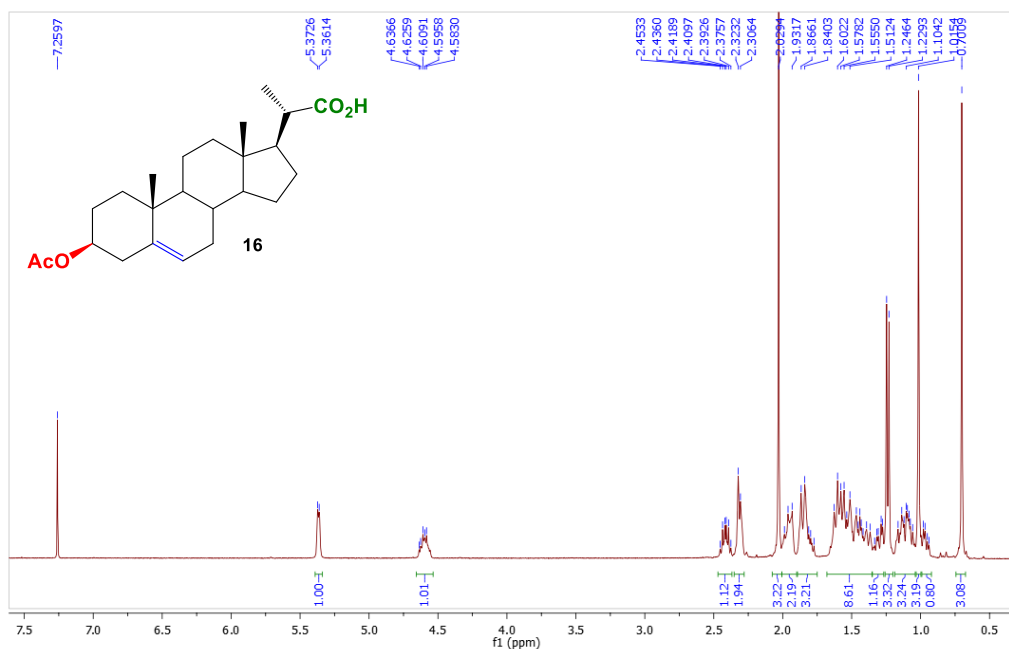
92. Rosado-Abón, A.; De Dios-Bravo, G.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis and plant growth promoting activity of polyhydroxylated ketones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety and cholestane side chain. *Steroids* **2012**, 77, 461–466, doi:10.1016/j.steroids.2012.01.004.
93. Rosado-Abón, A.; De Dios-Bravo, G.; Rodríguez-Sotres, R.; Iglesias-Arteaga, M.A. Synthesis and plant growth promoting activity of dinorcholanic lactones bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, 134, 45–50, doi:10.1016/j.jsbmb.2012.10.007.

ANEXOS

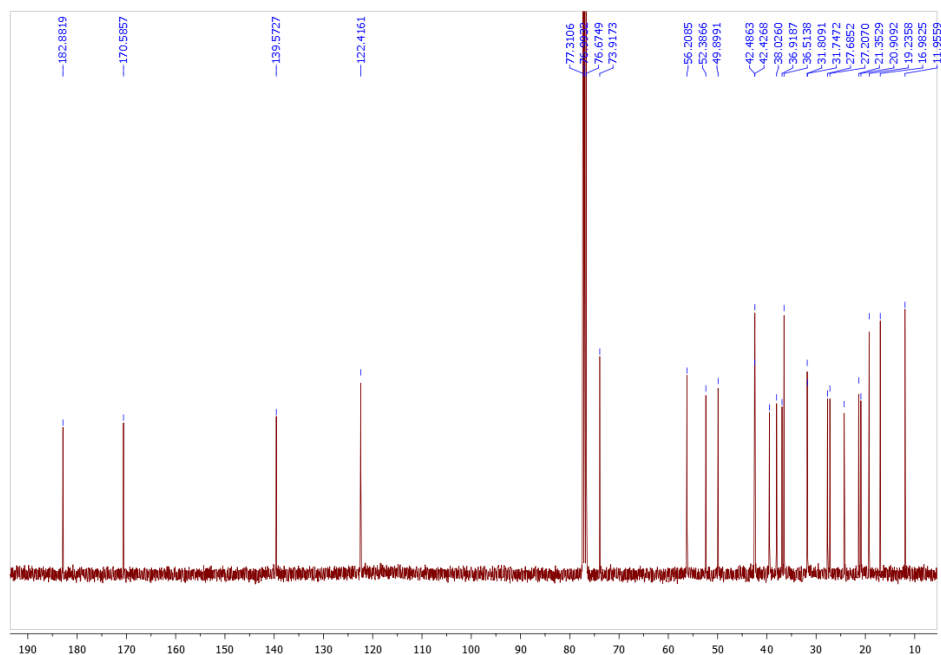
ANEXO 1: Espectros de RMN para los compuestos **16**, **50-58**, **59a-c** y **49a-c**.

Ácido (20S)-3β-acetoxi-5-pregnen-22-oico (**16**)

Espectro de ¹H RMN.

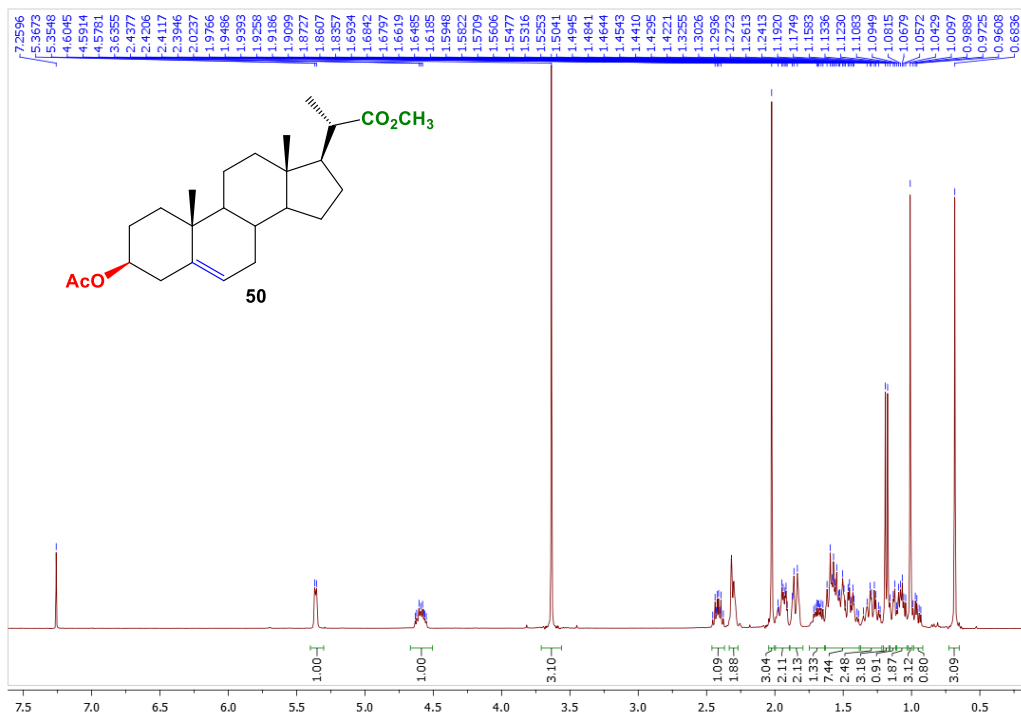


Espectro de ¹³C RMN.

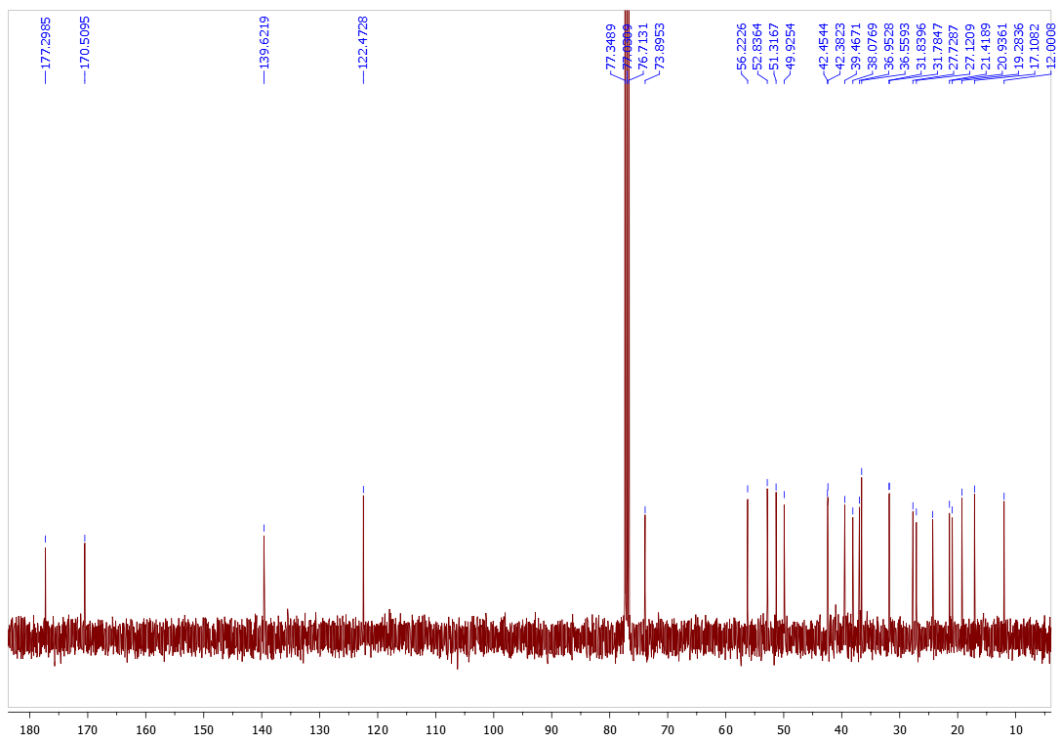


(20S)-3 β -Acetoxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (**50**).

Espectro de ^1H RMN

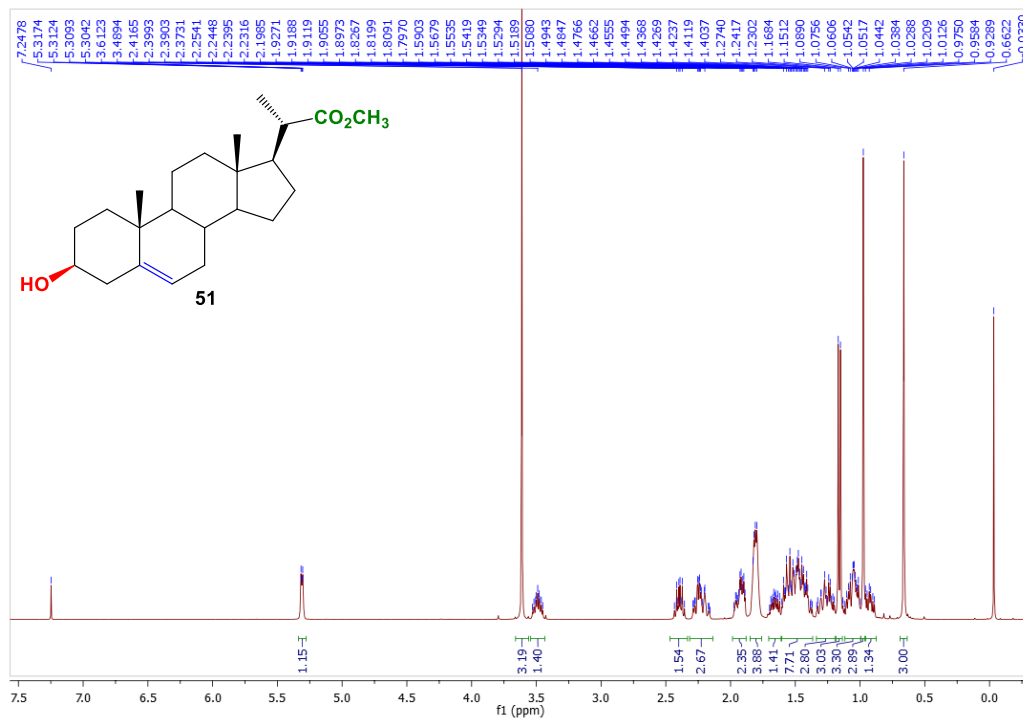


Espectro de ^{13}C RMN

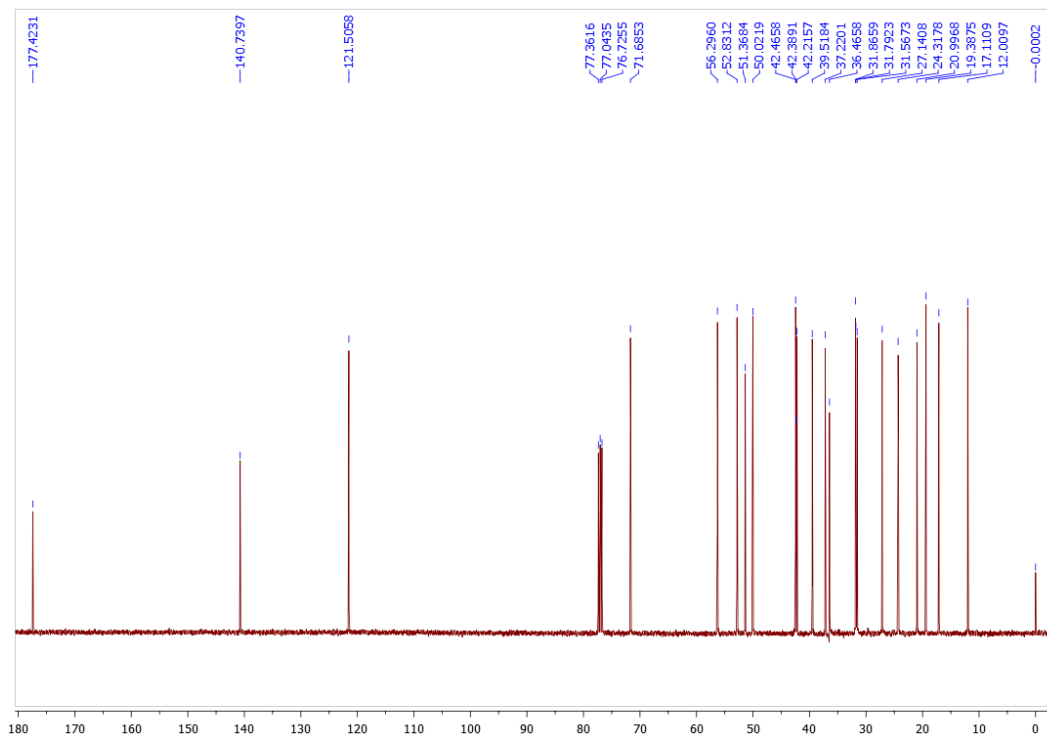


(20S)-3-β-hidroxi-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (**51**)

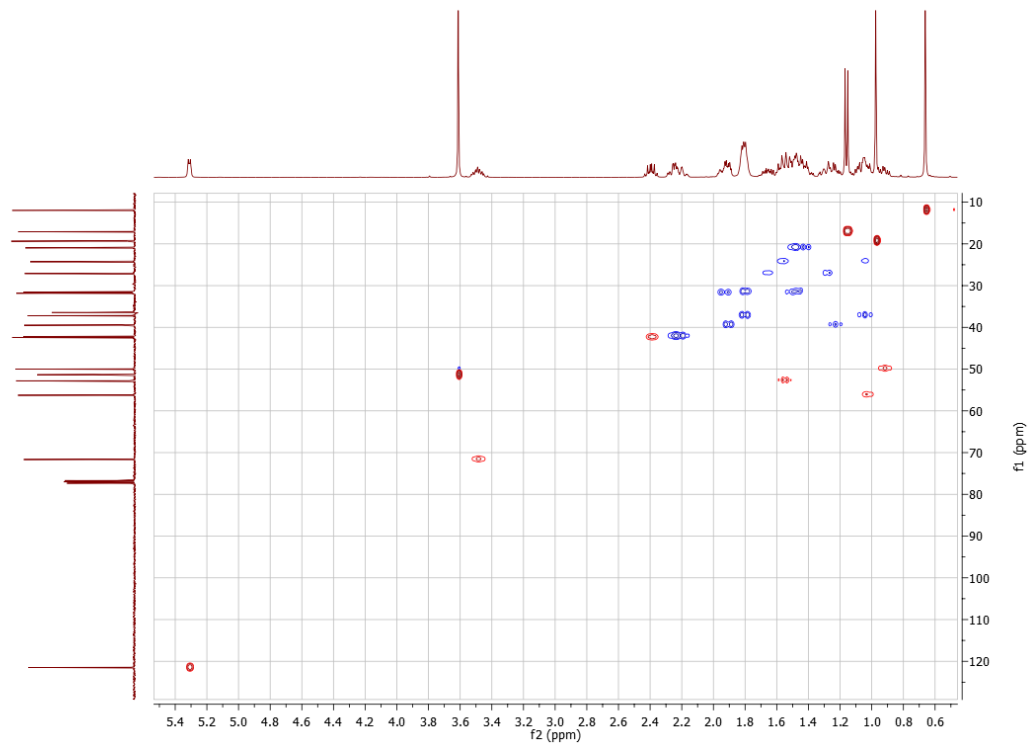
Espectro de ^1H RMN



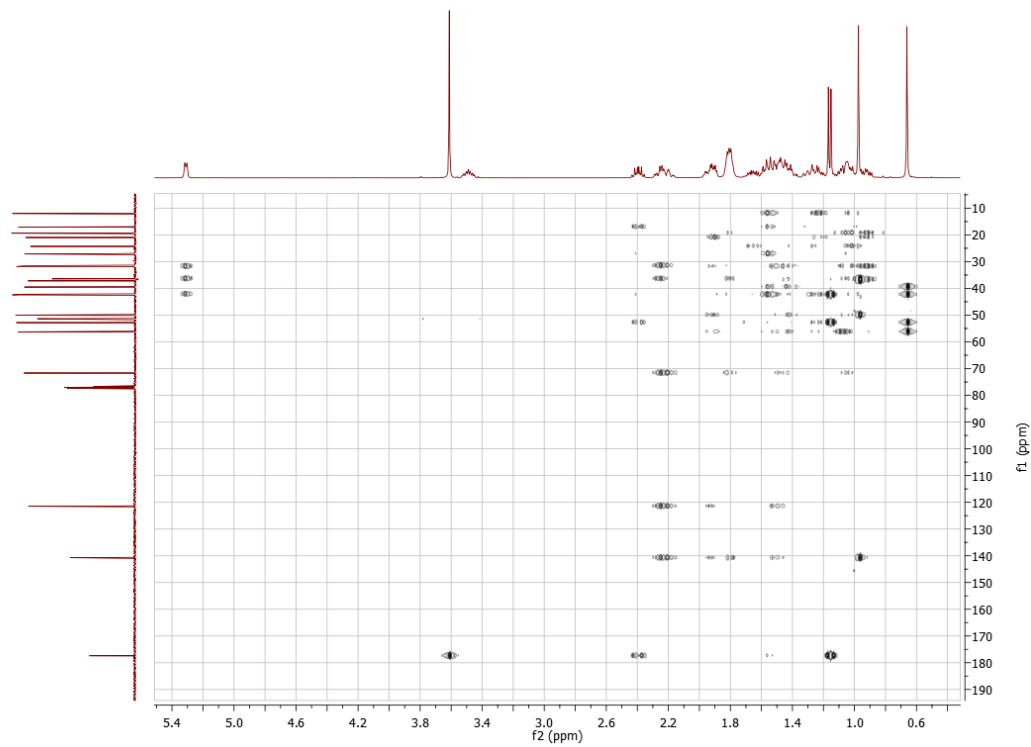
Espectro de ^{13}C RMN



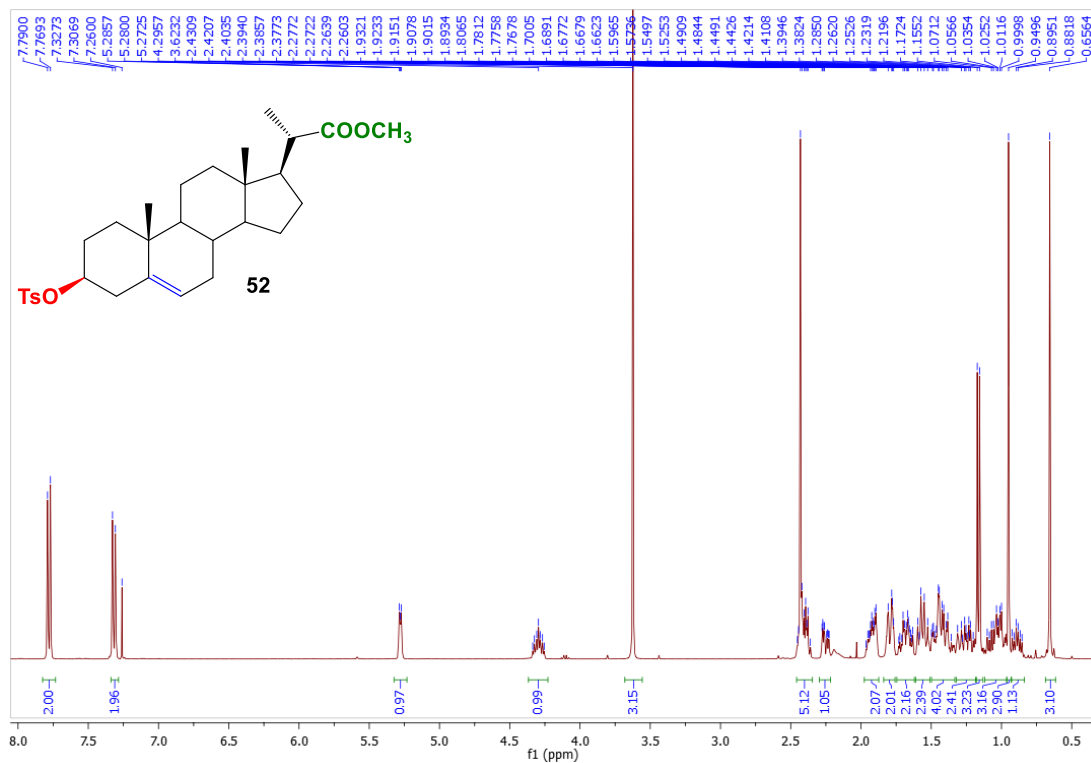
Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC-ed.



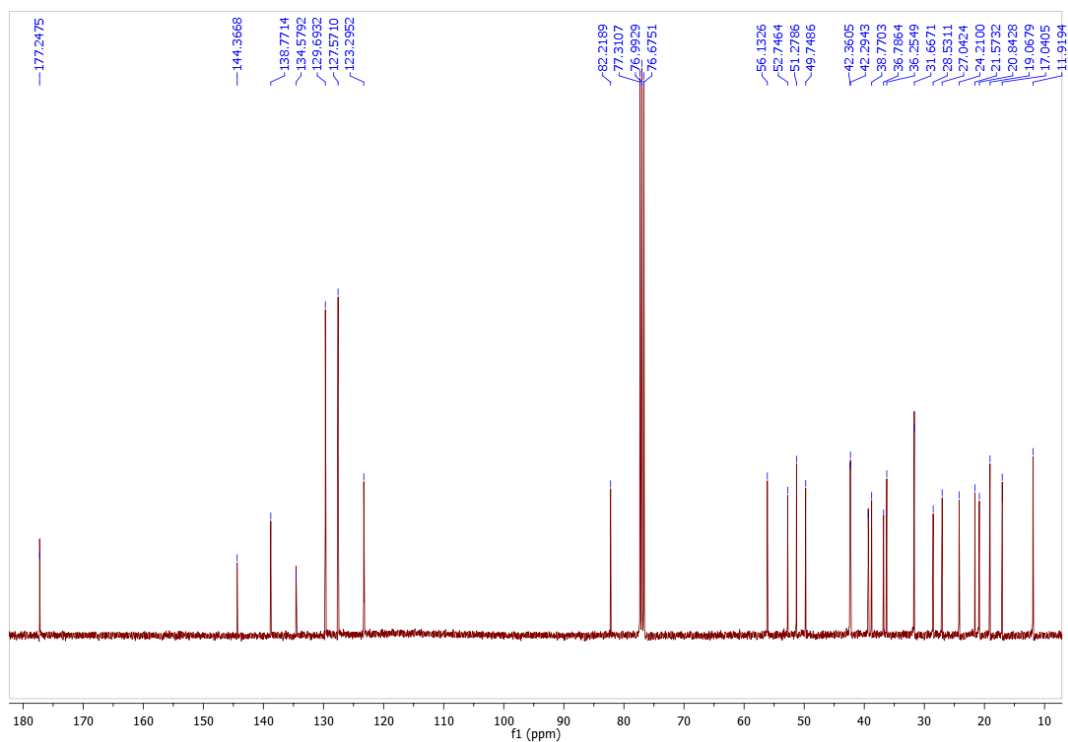
Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC.



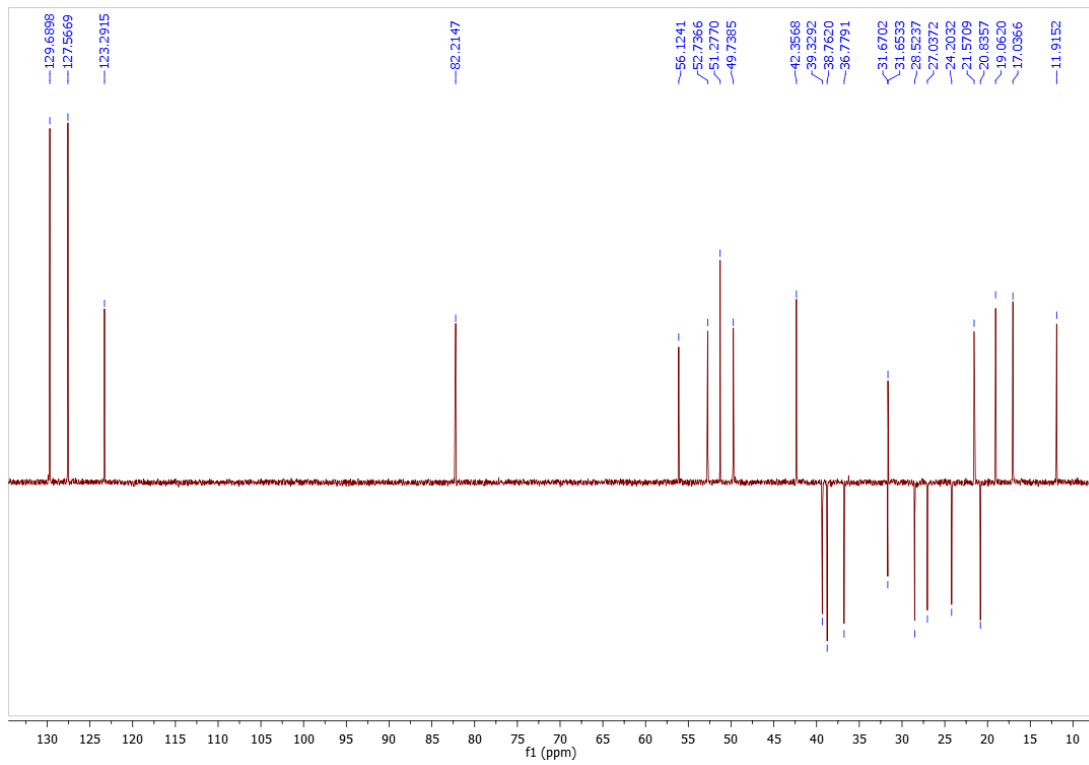
(20S)-3 β -(4-toluennsulfoniloxi)-pregn-5-eno-20-carboxilato de metilo (**52**).
Espectro de ¹H RMN



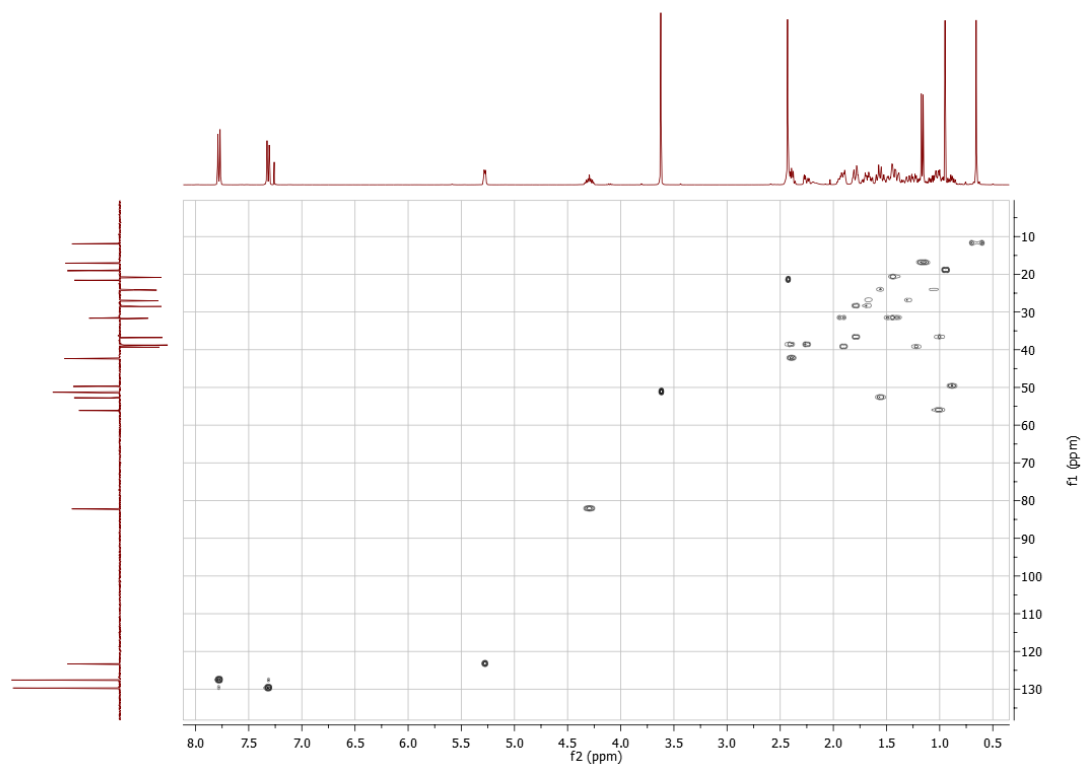
Espectro de ¹³C RMN



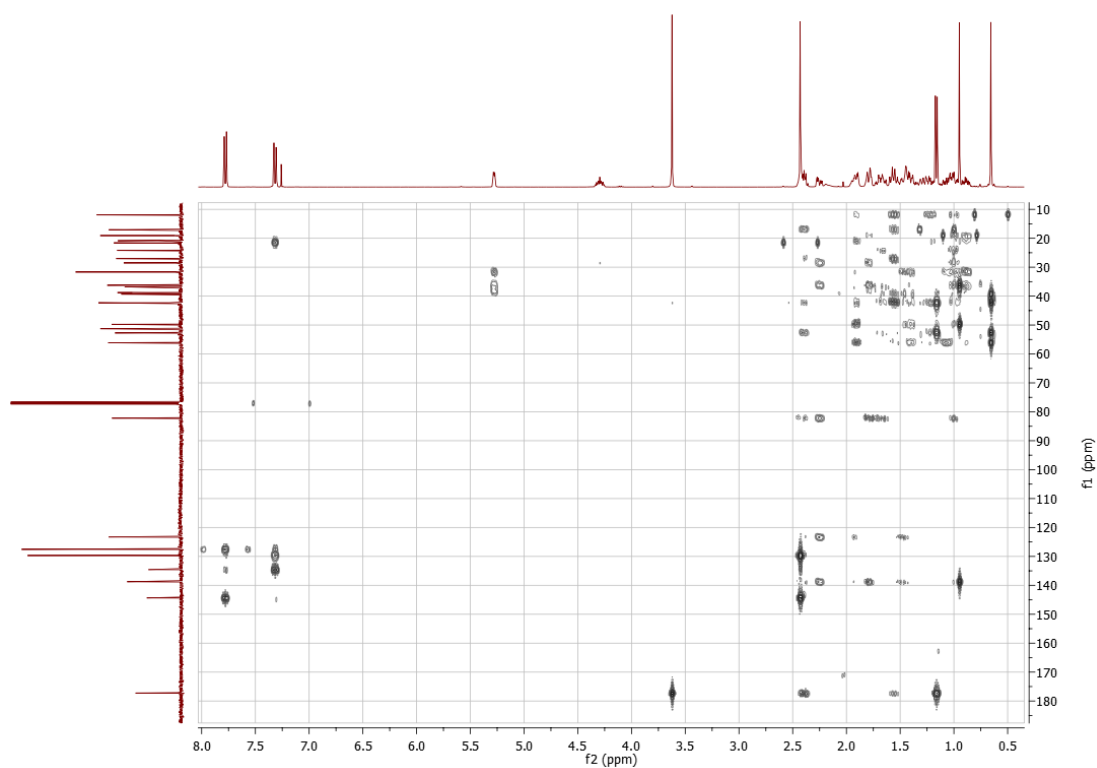
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135



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

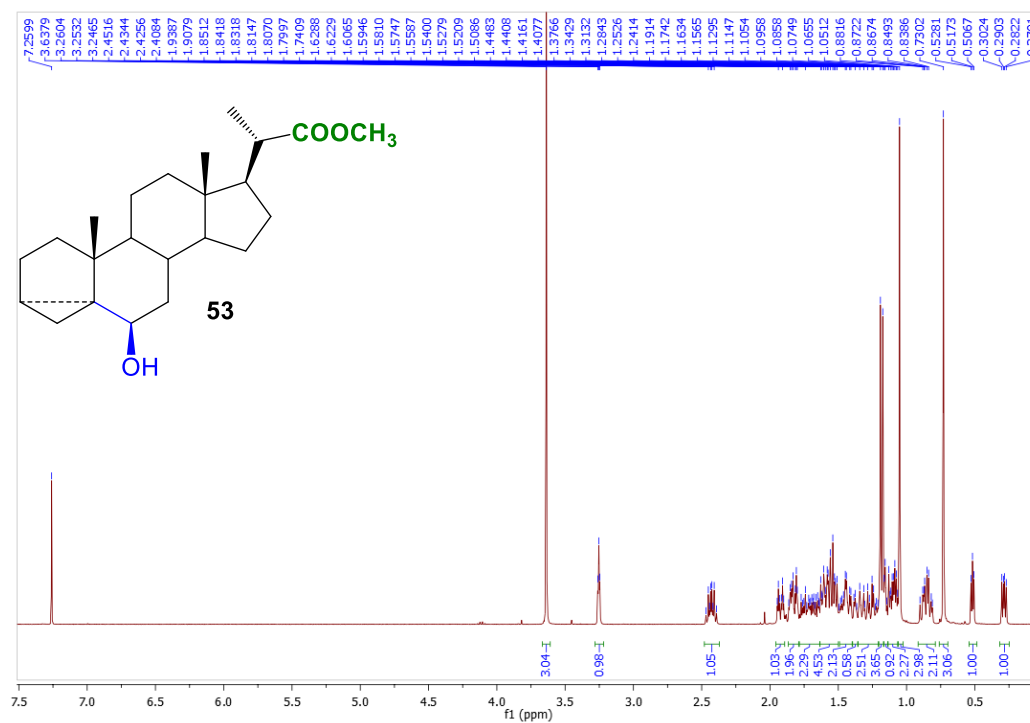


Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC.

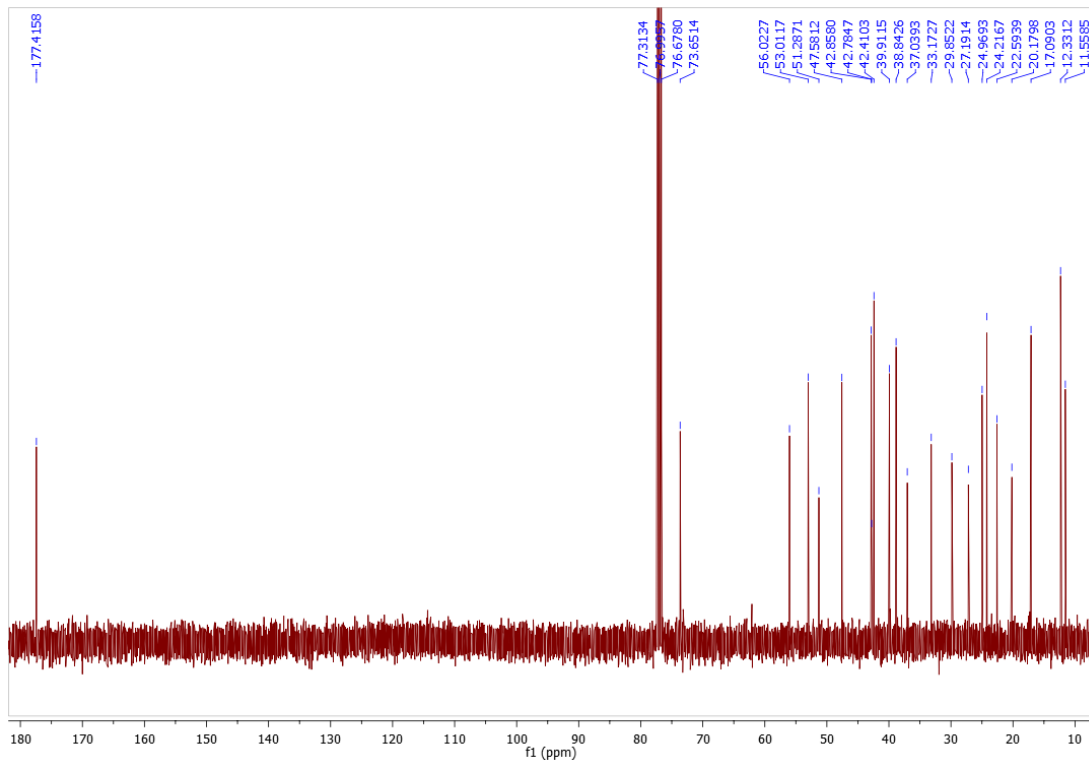


(20S)-6b-hidroxi-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (**53**)

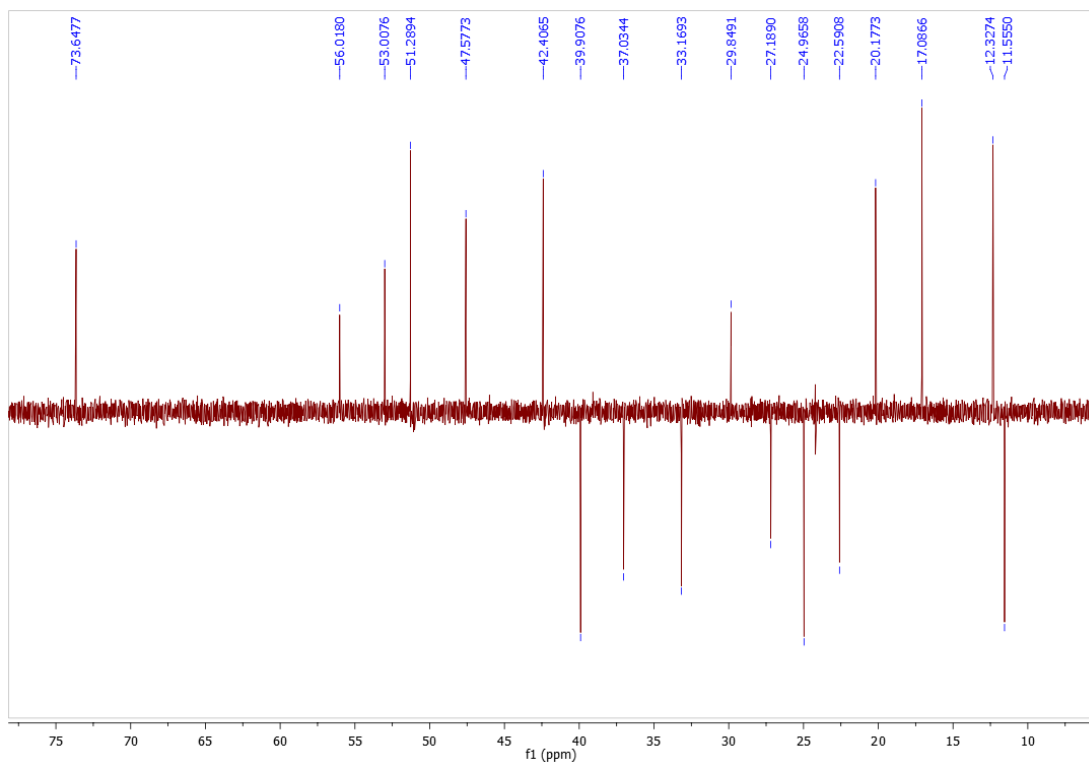
Espectro de ^1H RMN



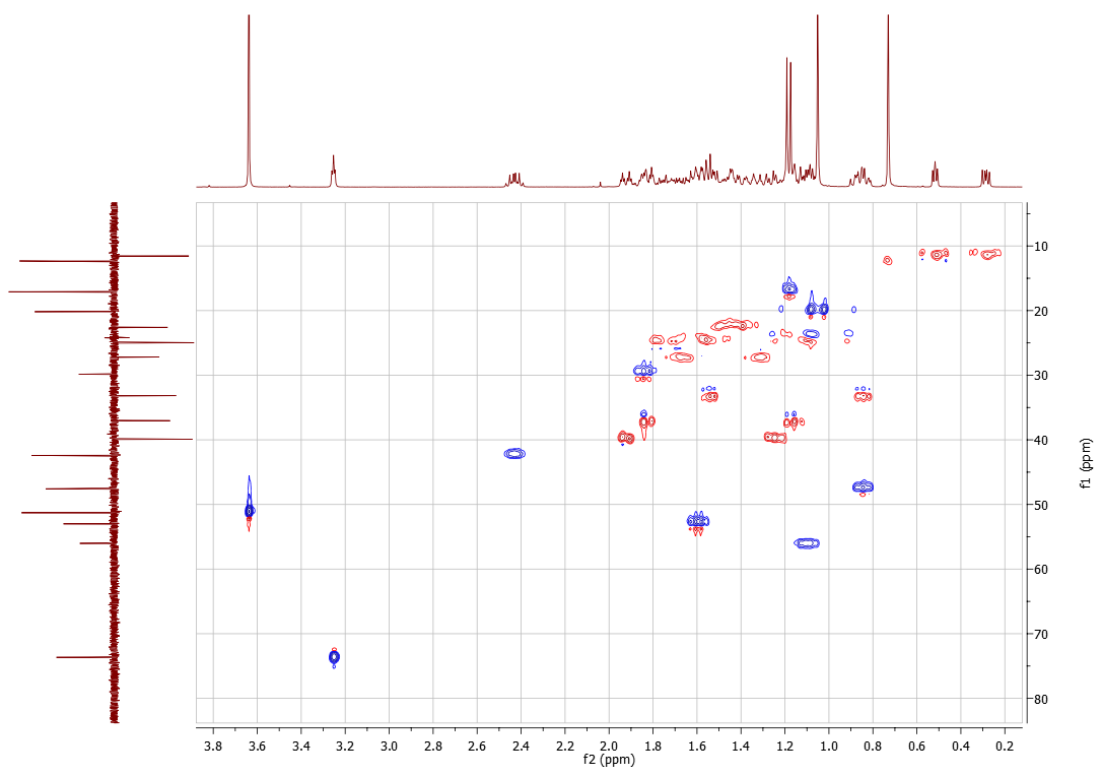
Espectro de ^{13}C RMN



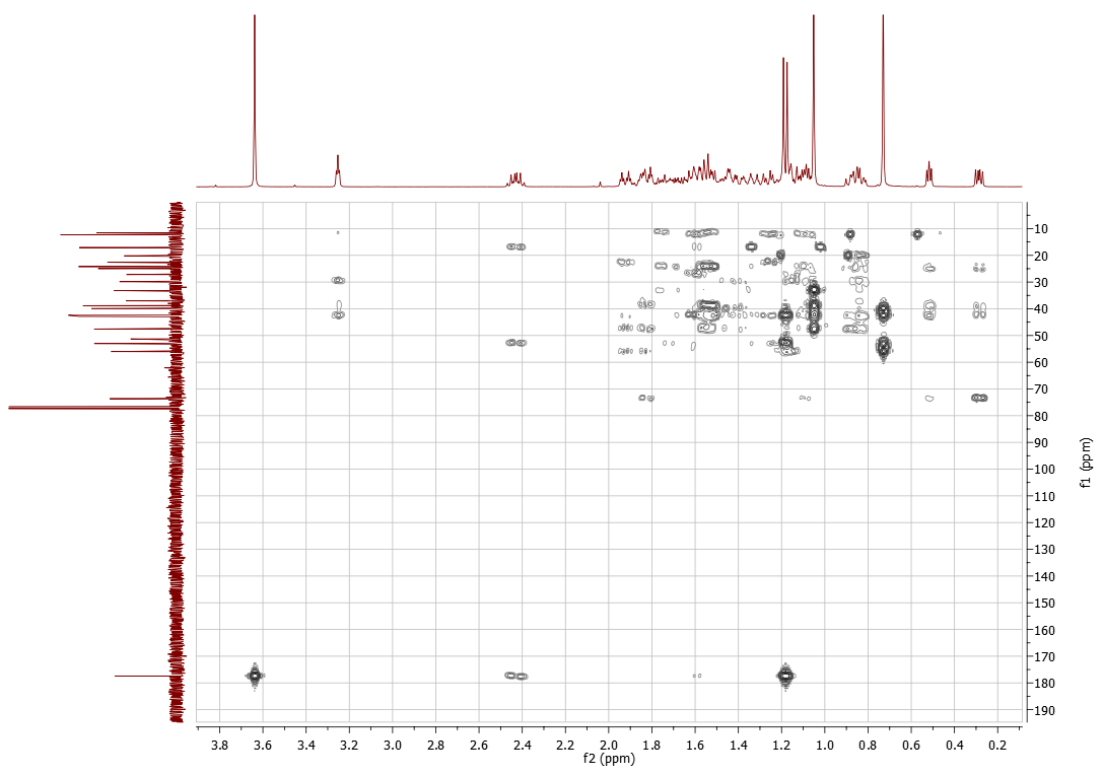
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135



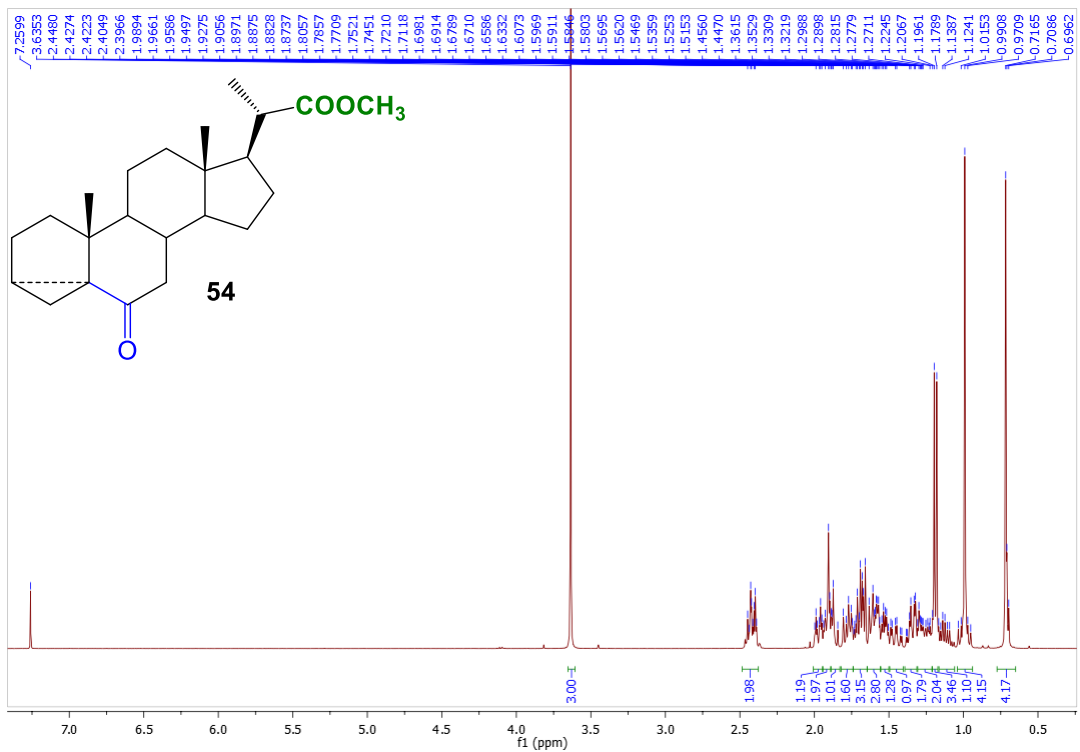
Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed.



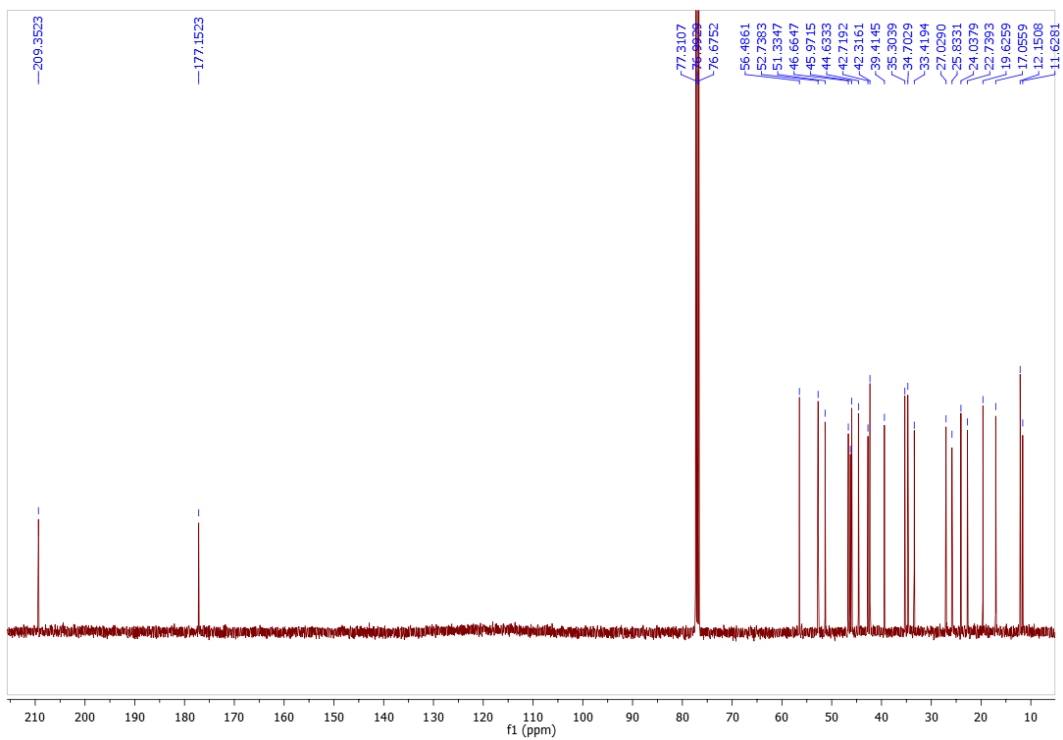
Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC.



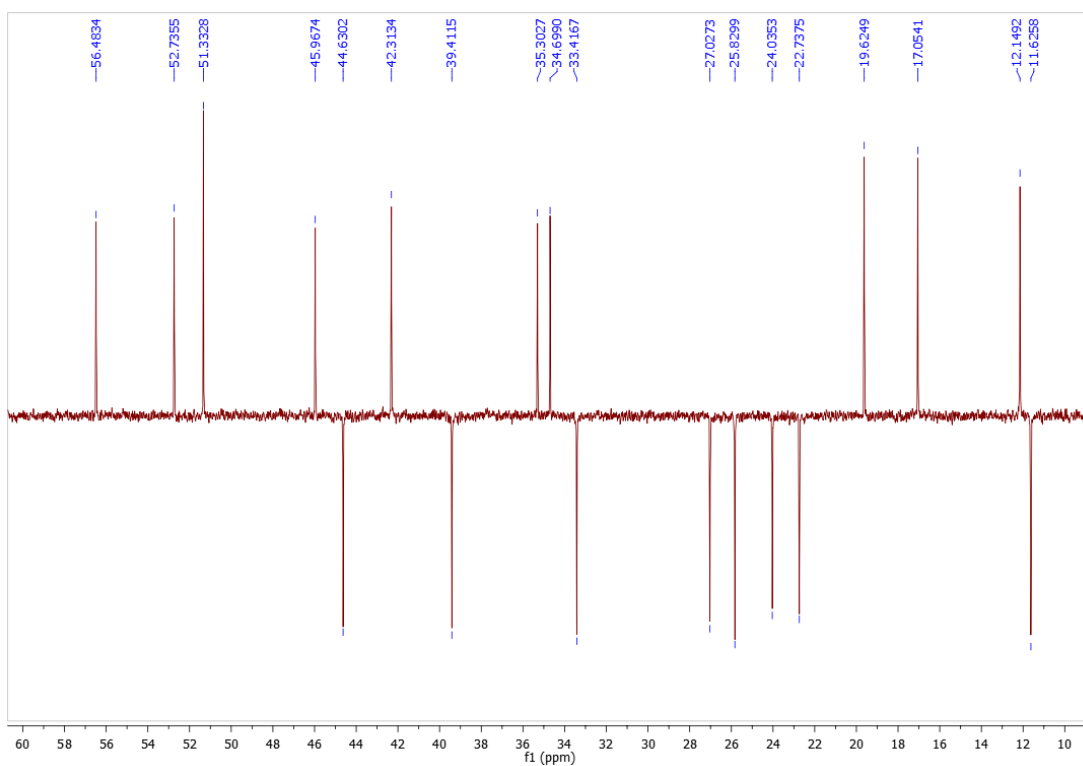
(20S)-6-Oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (**54**)
Espectro de ^1H RMN



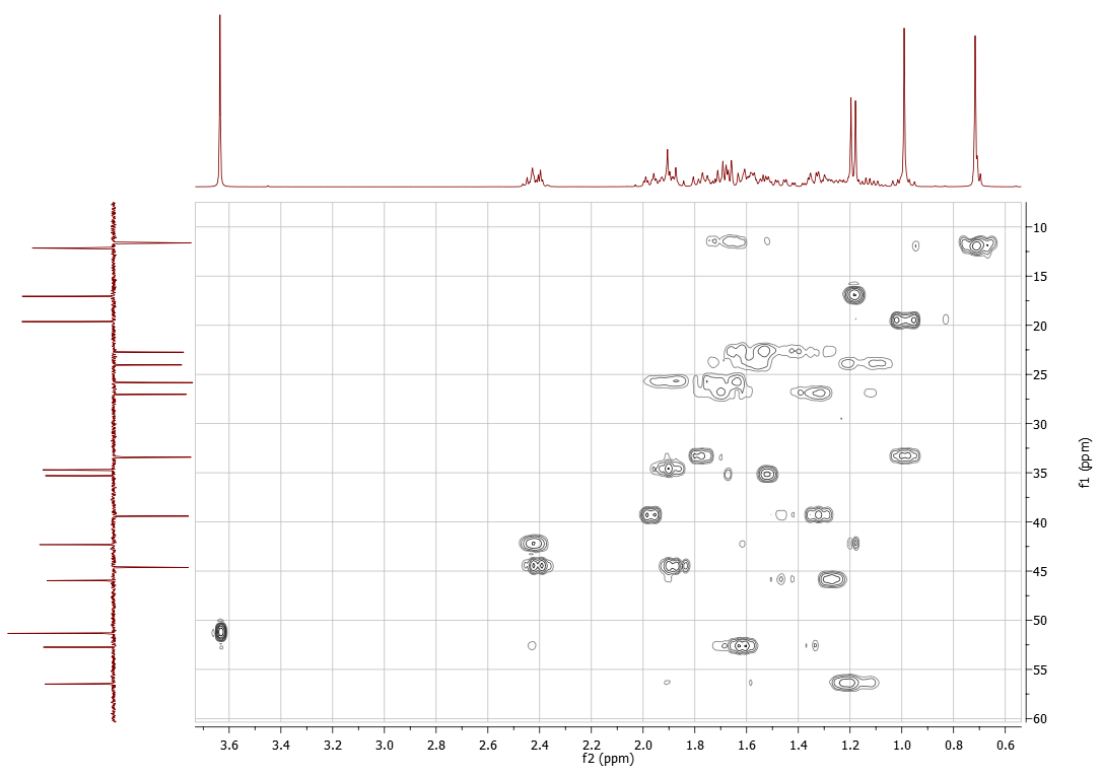
Espectro de ^{13}C RMN



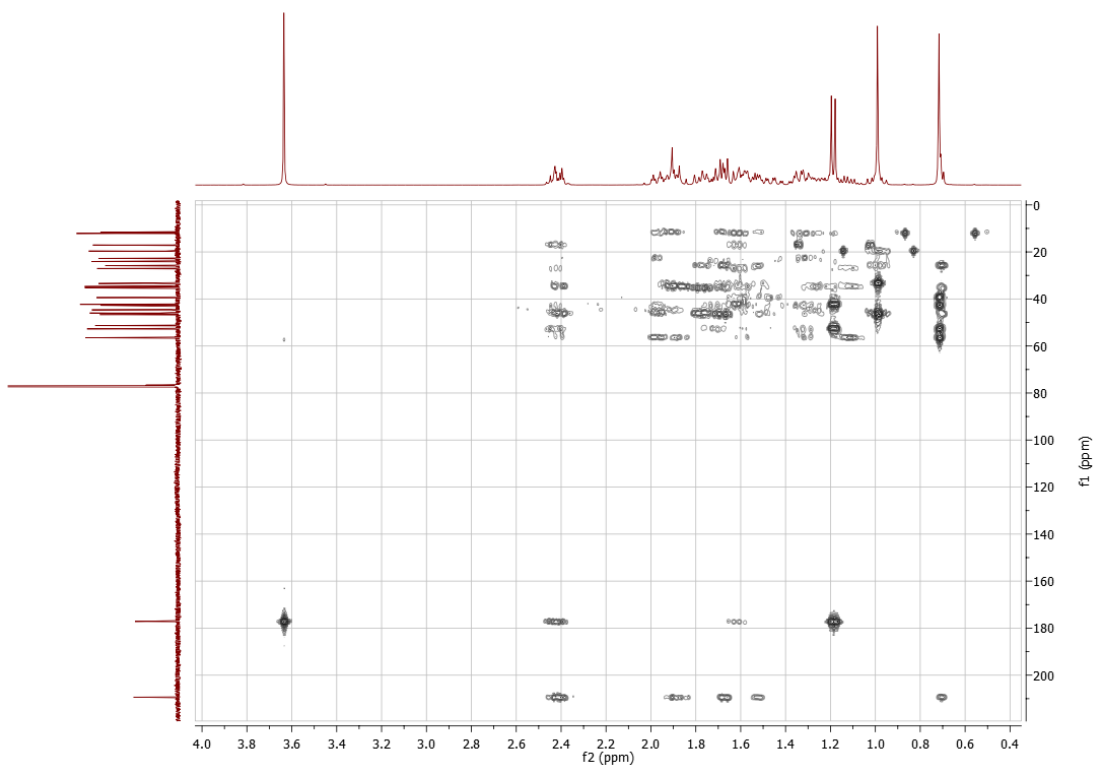
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135



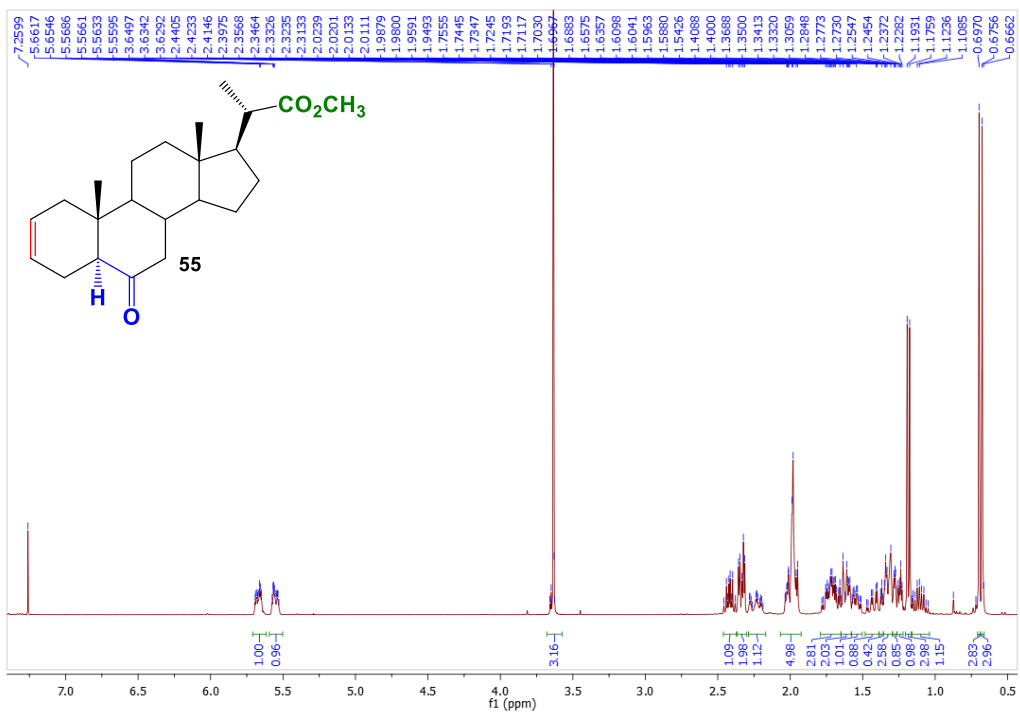
Espectro 2D HSQC.



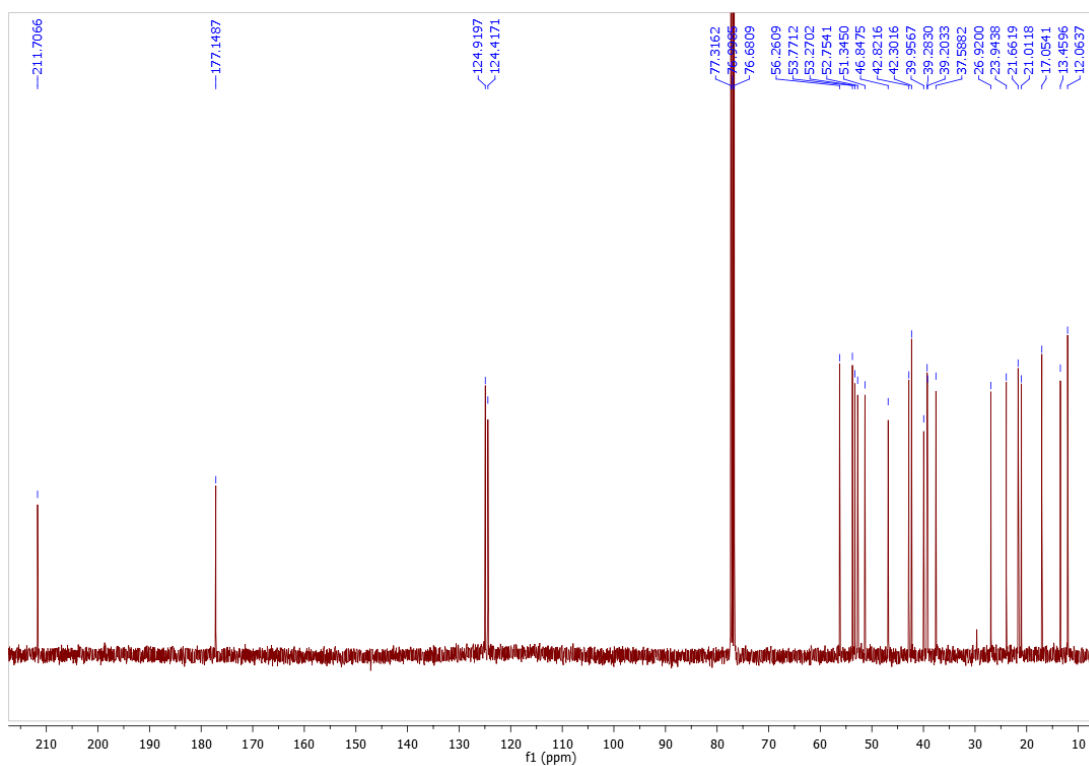
Espectro 2D HMBC



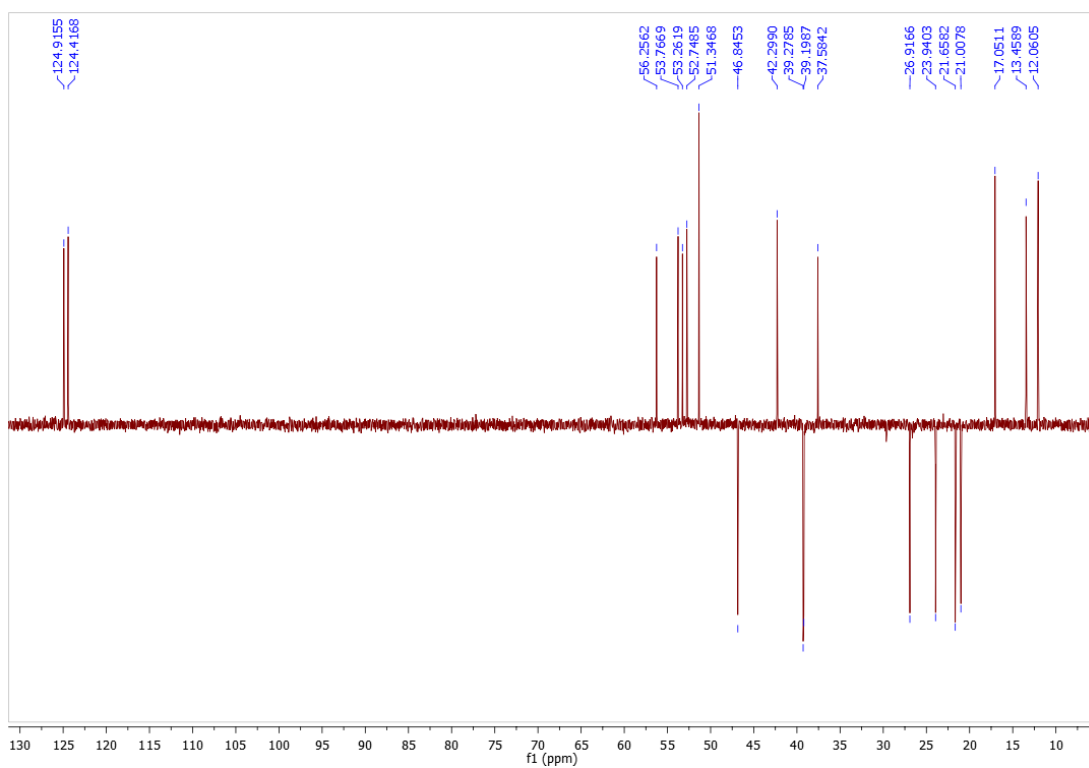
(20S)-6-Oxo-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (**55**)
Espectro de ^1H RMN



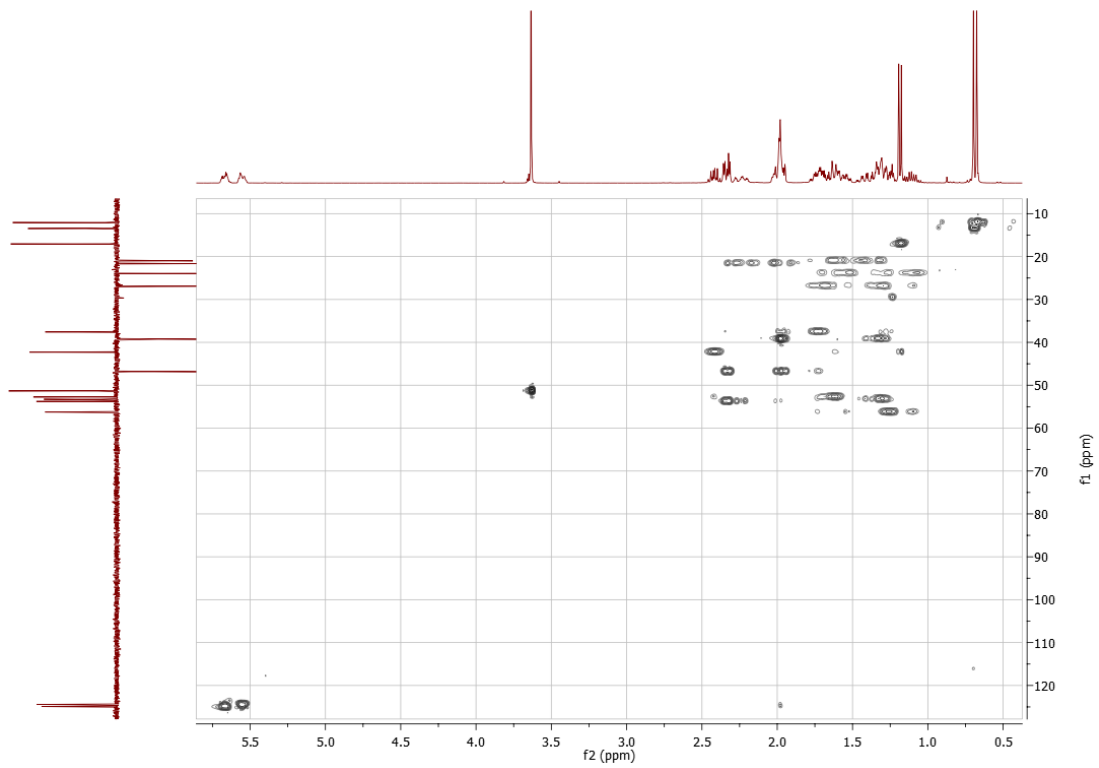
Espectro de ^{13}C RMN



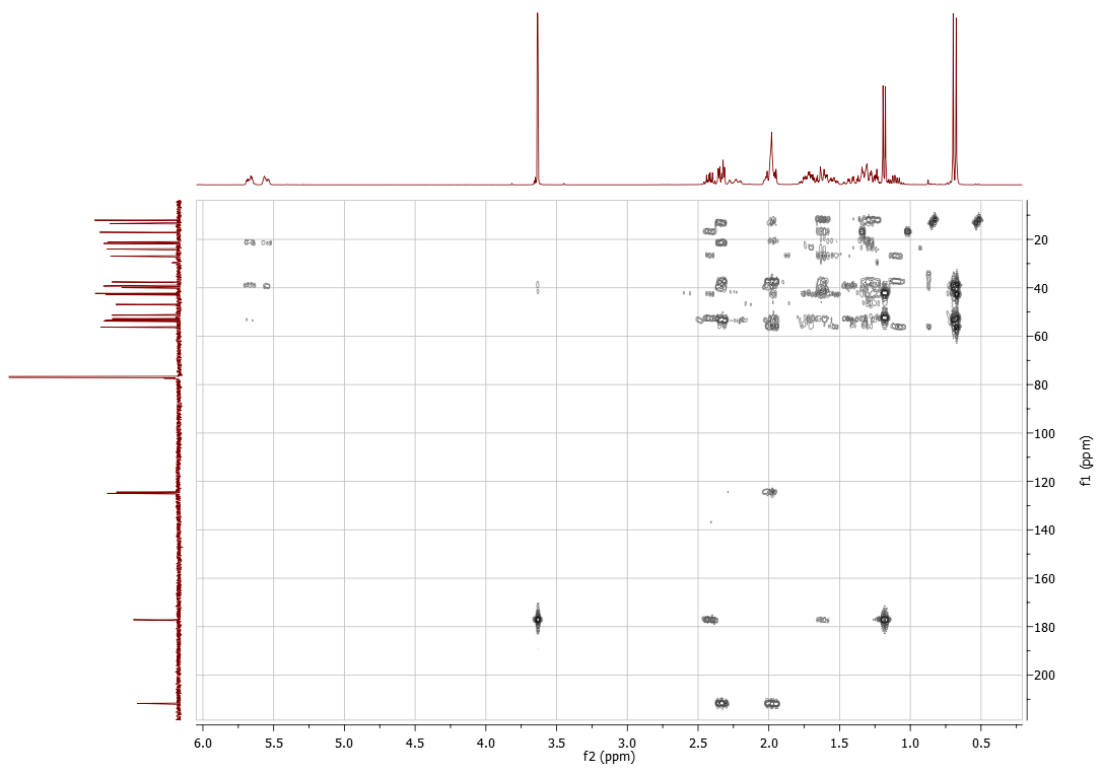
Espectro ^{13}C RMN DEPT-135



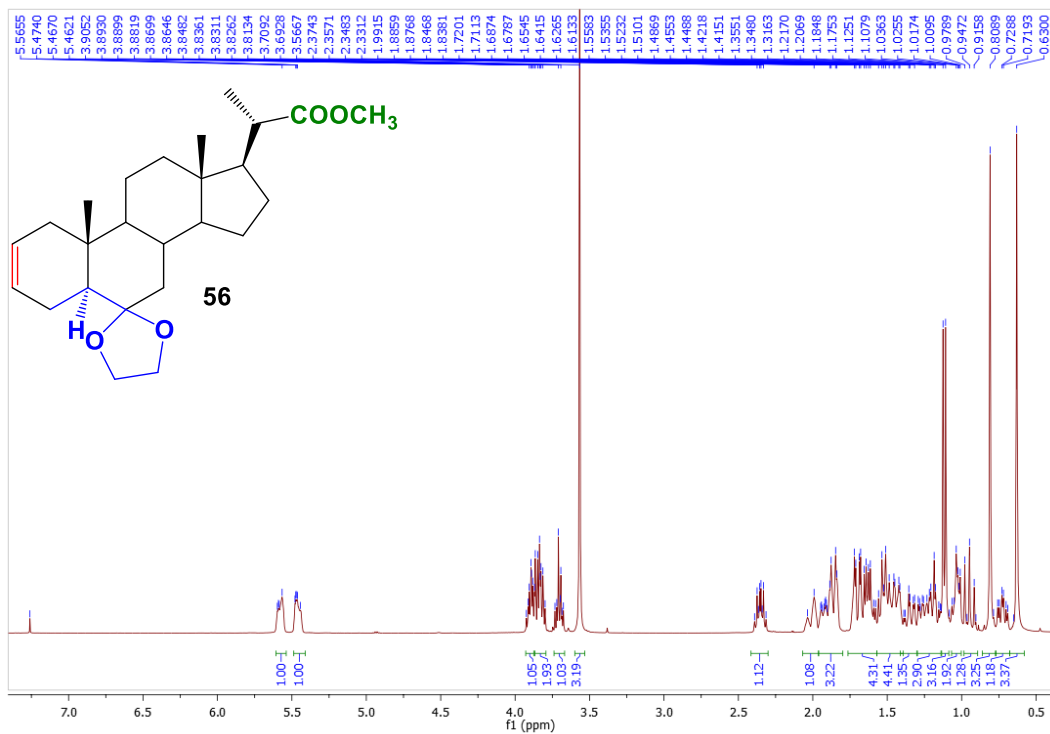
Espectro 2D HSQC



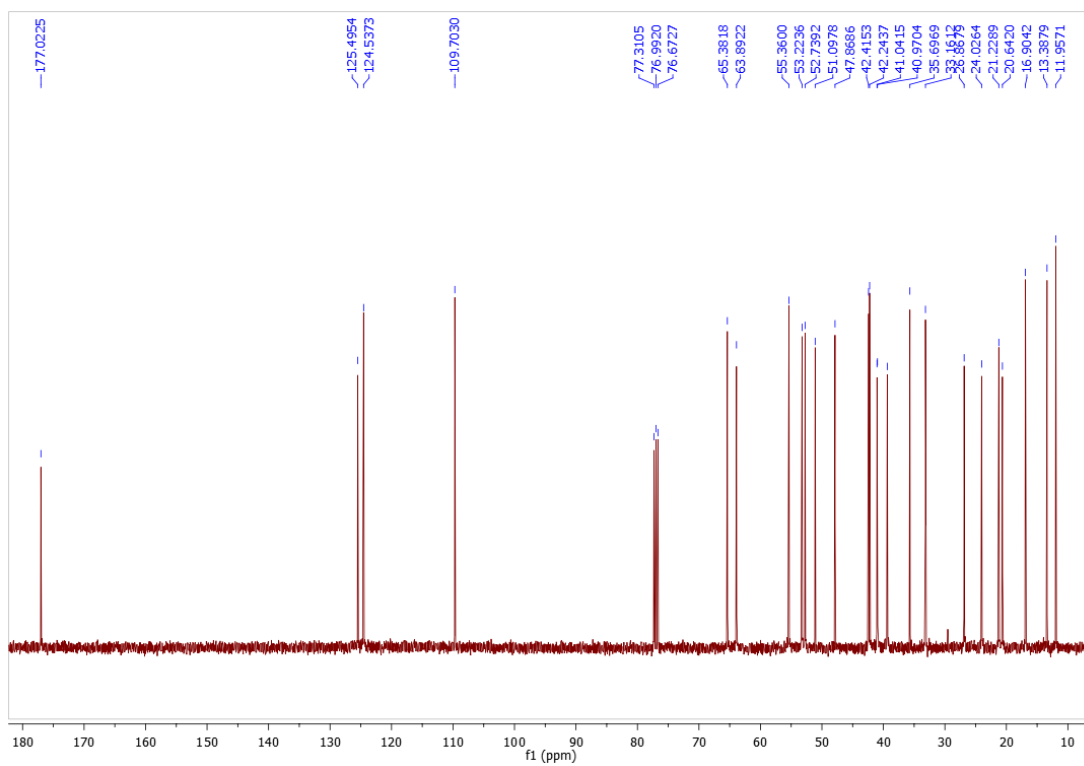
Espectro 2D HMBC



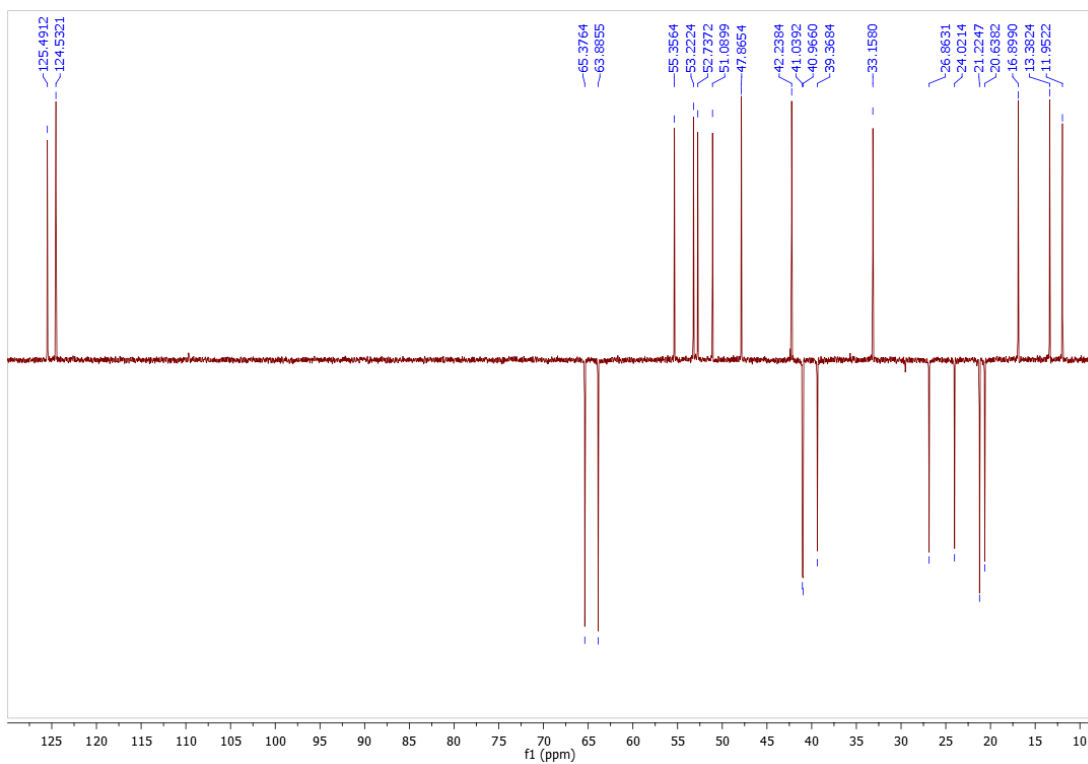
(20S)-6,6-etilenodioxy-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (**56**)
Espectro de ^1H RMN.



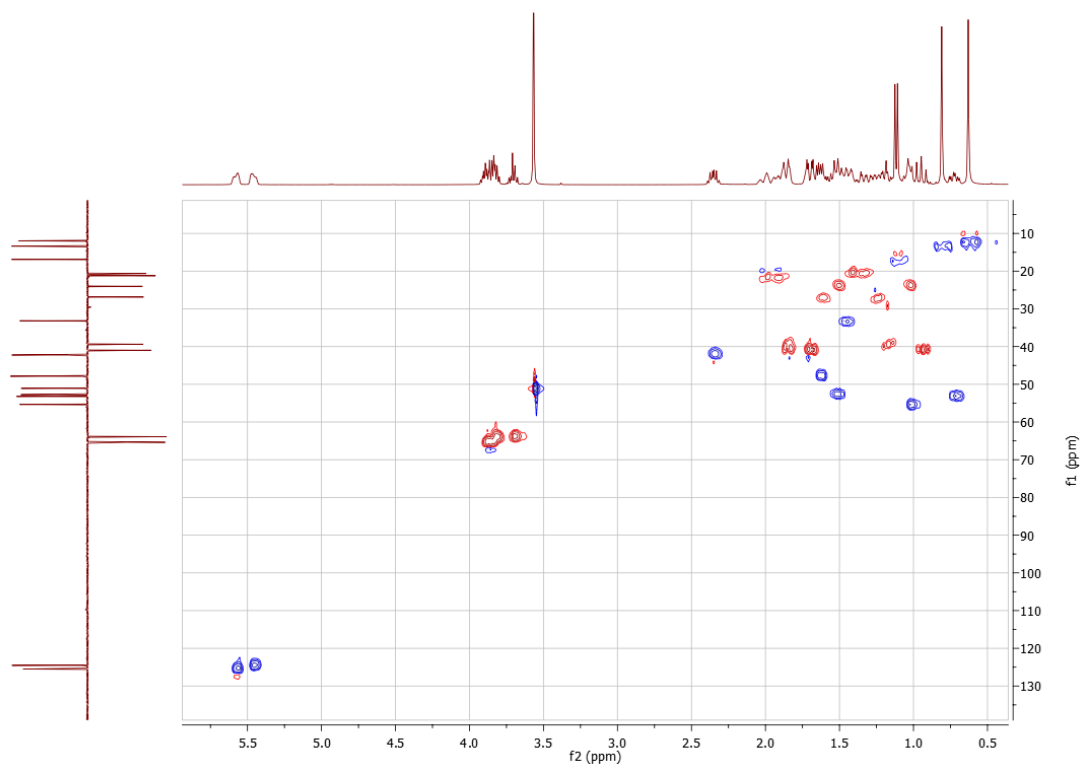
Espectro de ^{13}C RMN.



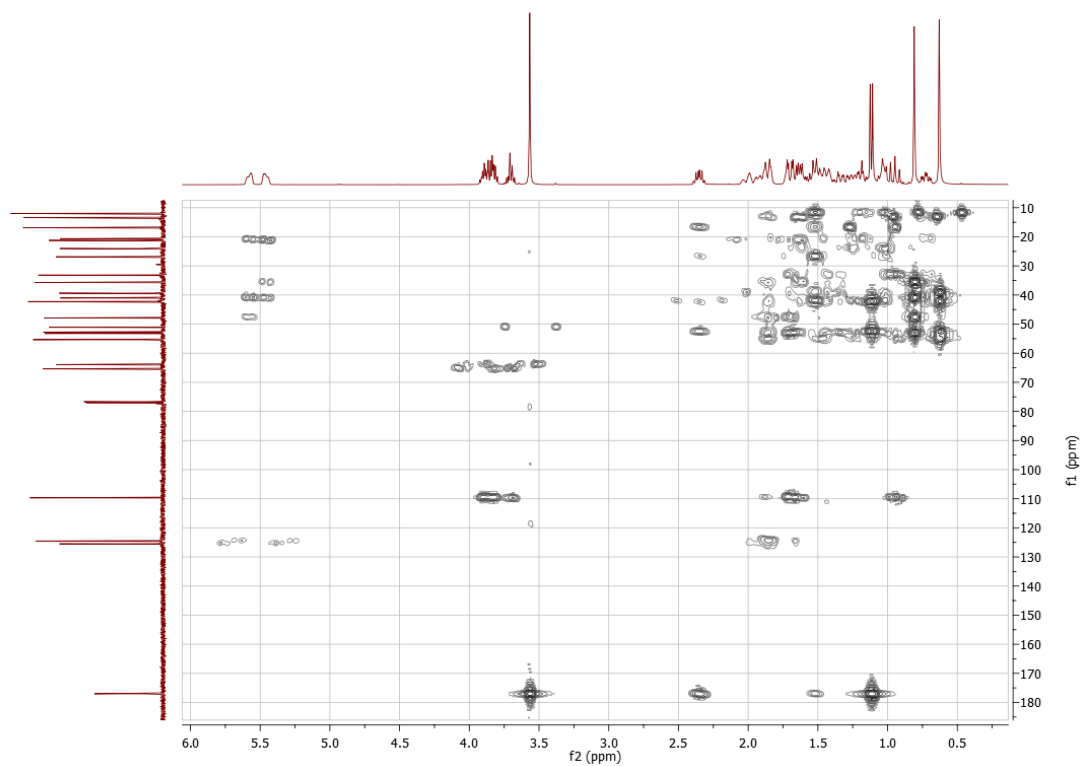
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135



Espectro 2D HSQC ed.

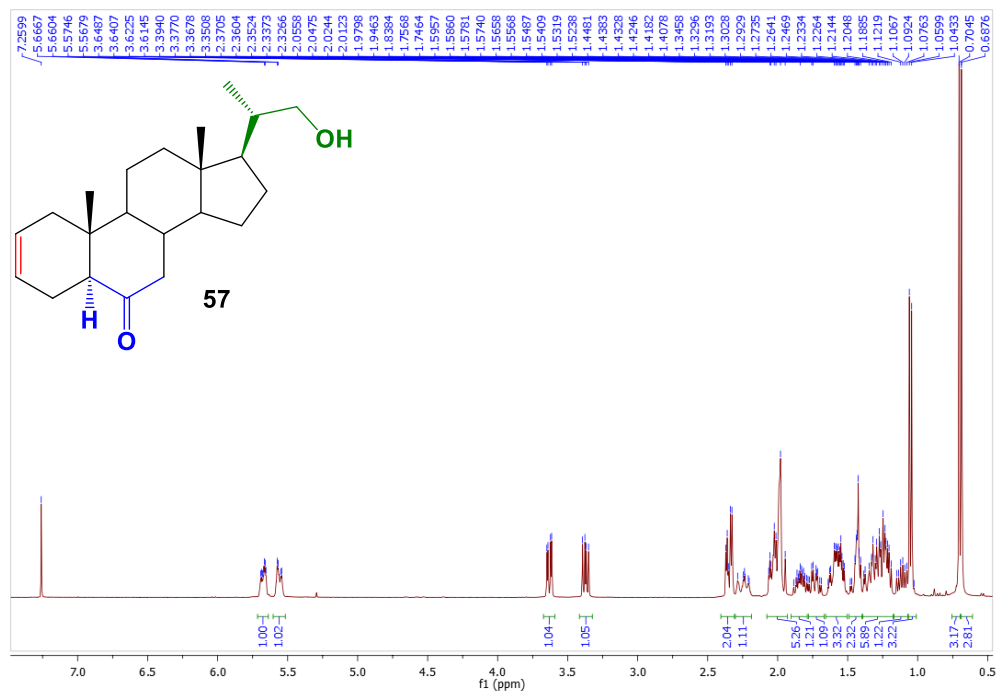


Espectro 2D HMBC

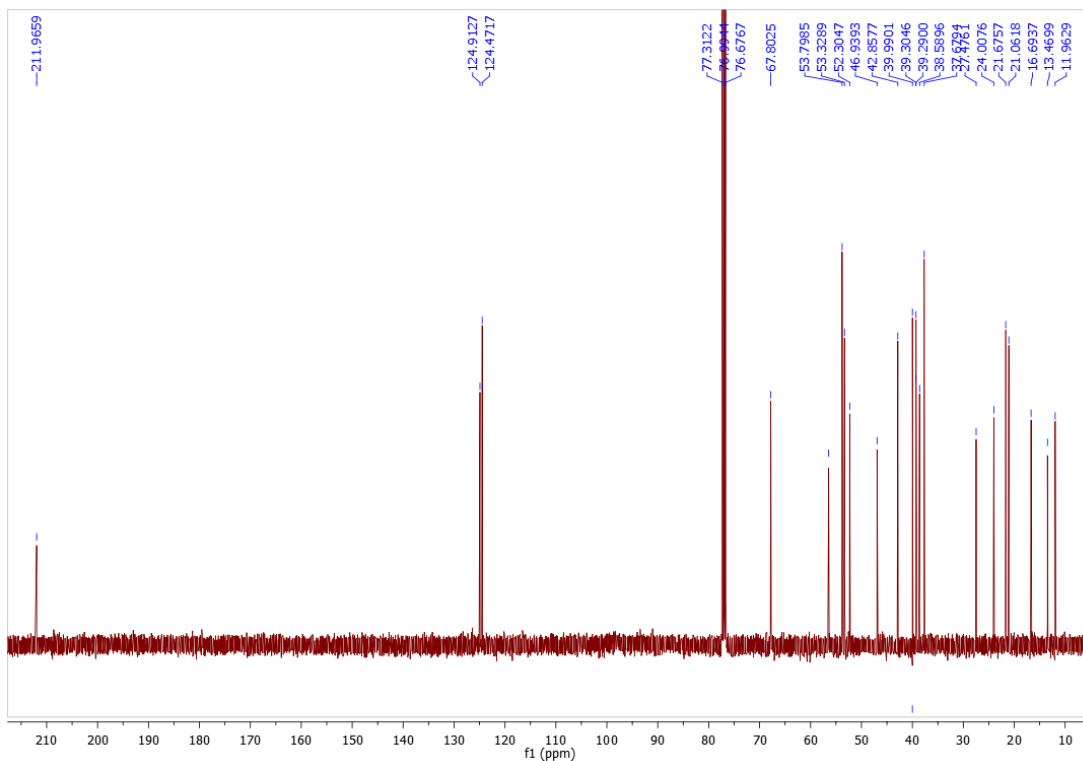


(20S)-22-hydroxy-5 α -pregn-2-ene-23,24-dinor-6-ona (**57**)

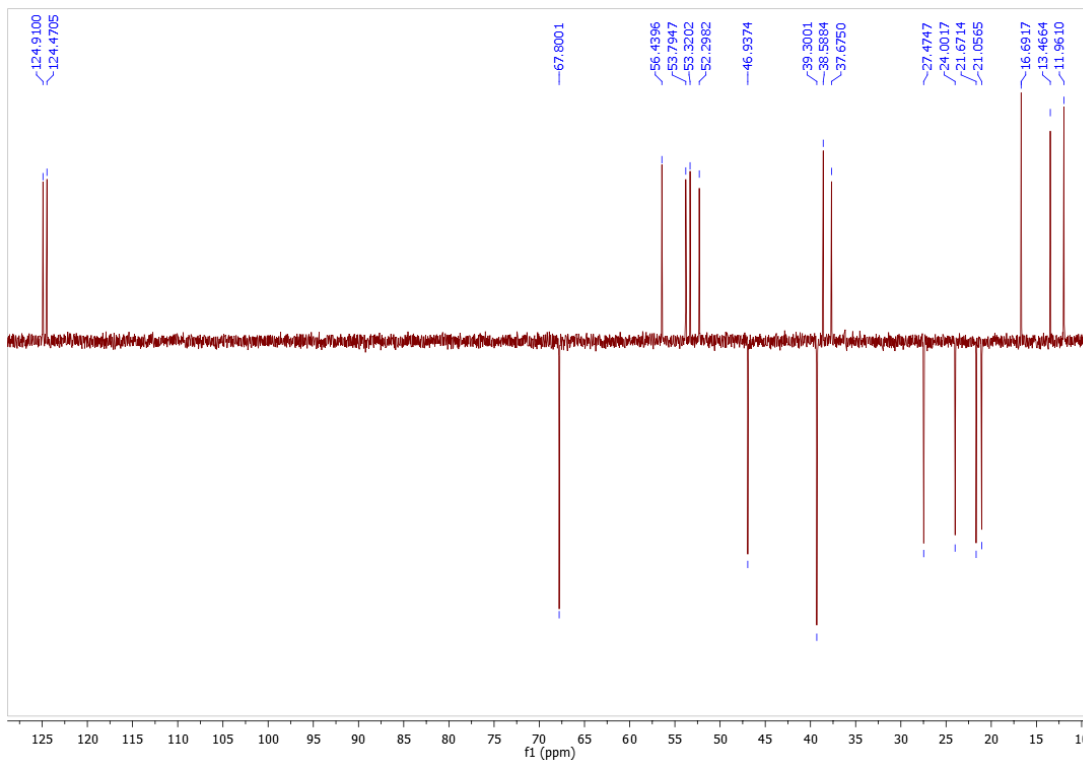
Espectro de ¹H RMN



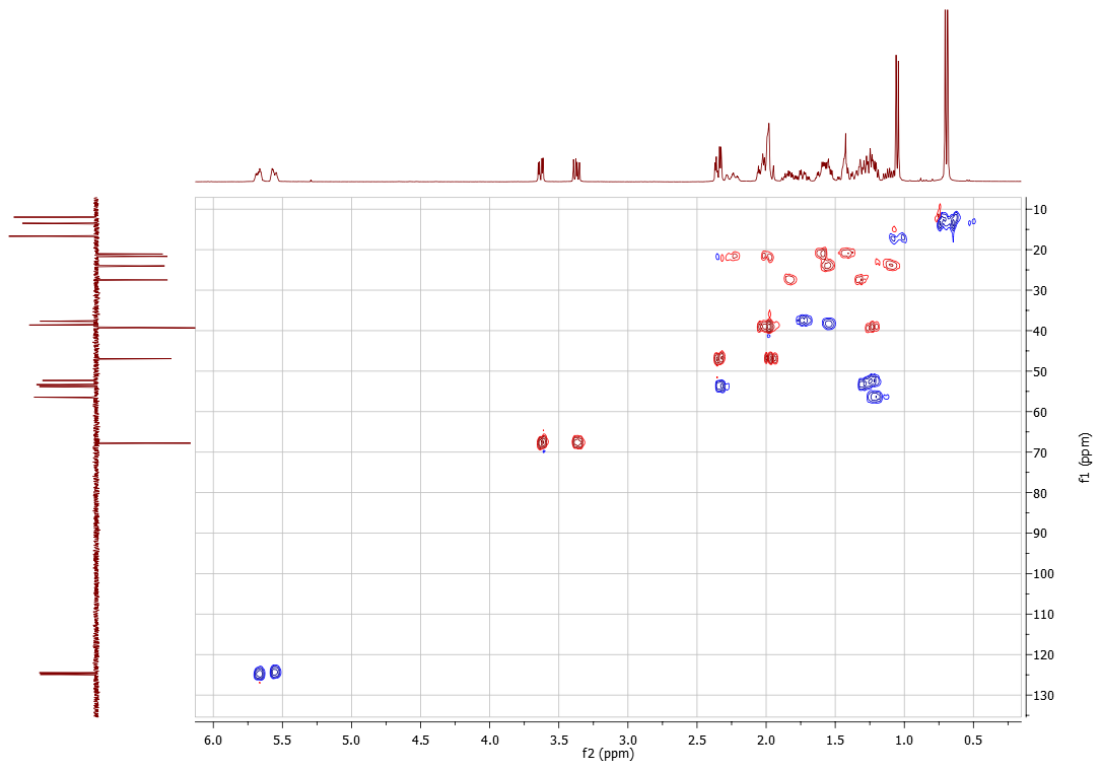
Espectro de ^{13}C RMN



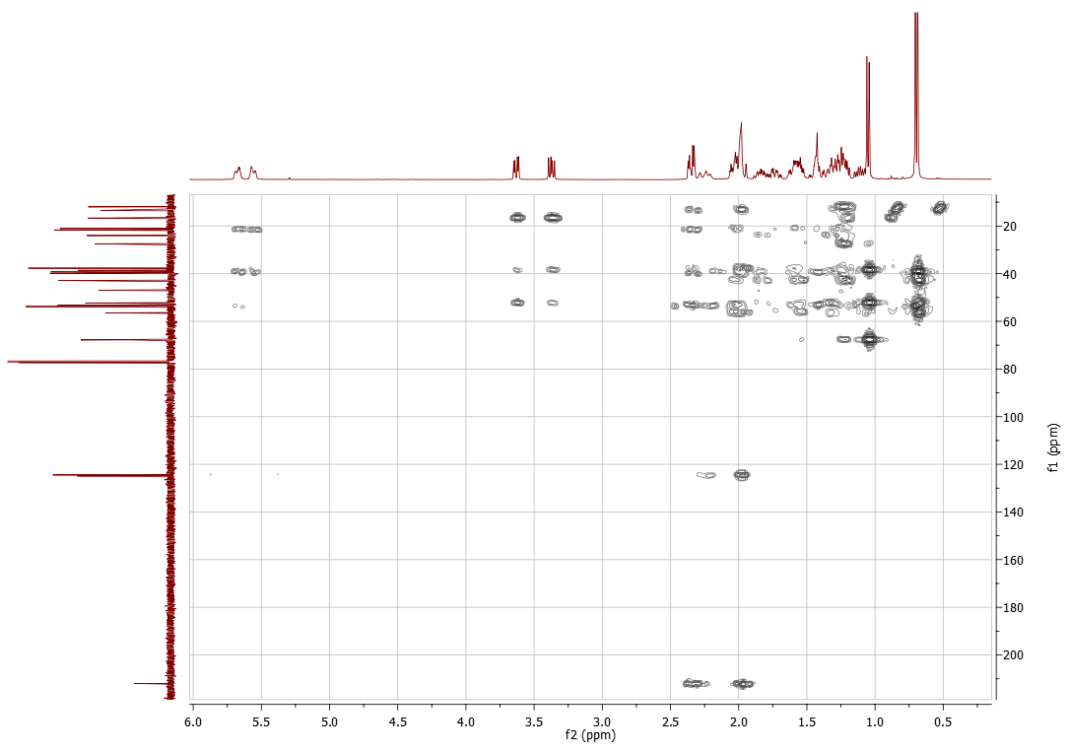
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135



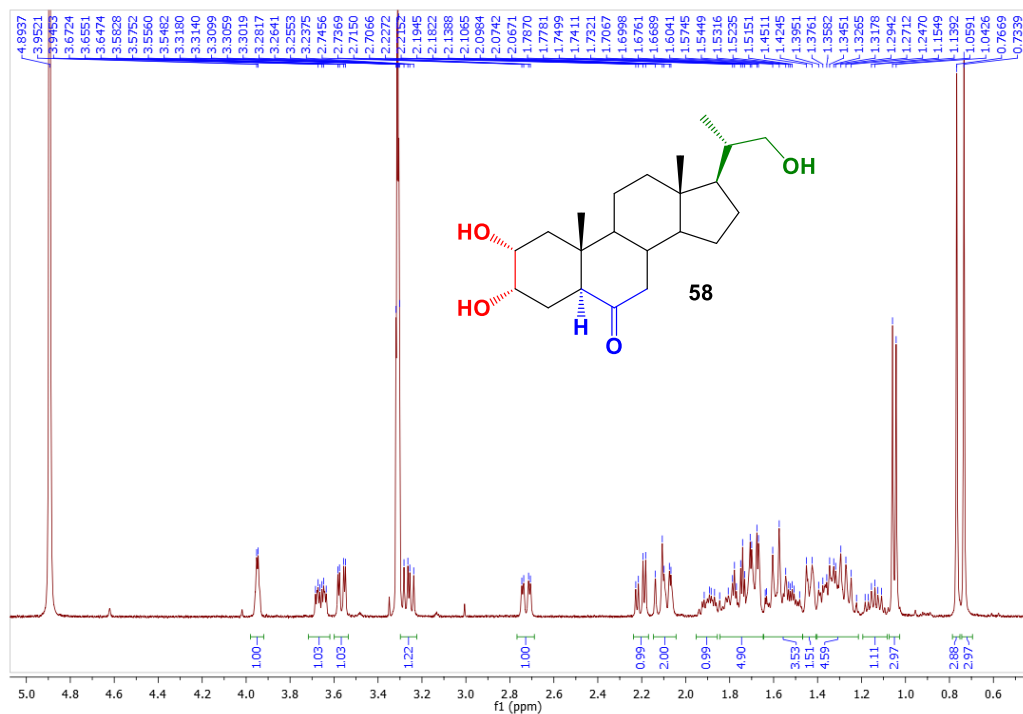
Espectro 2D HSQC ed.



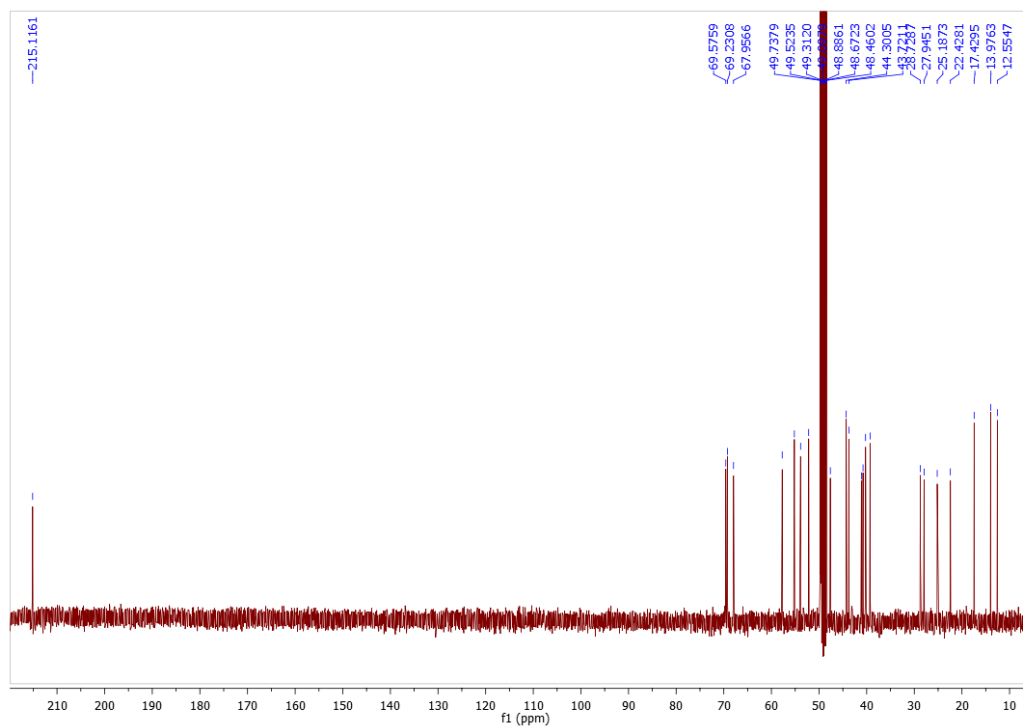
Espectro 2D HMBC



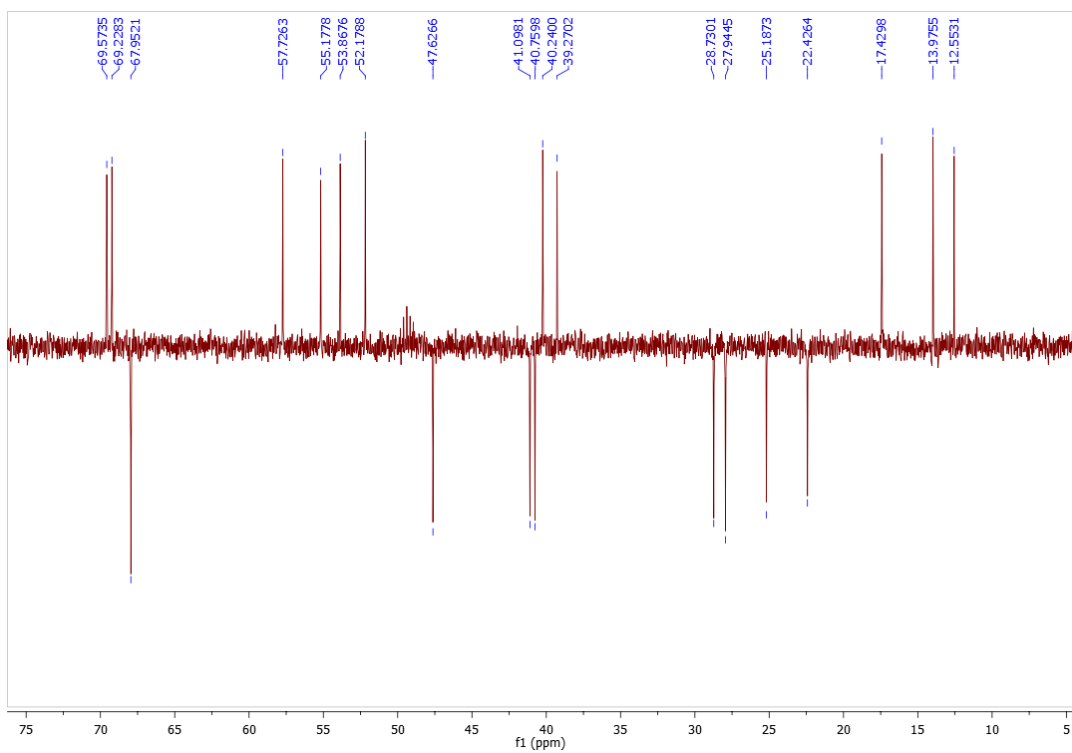
(20S)-2a, 3a, 22-trihidroxi-5 α -pregn-6-ona (**58**)
Espectro de ^1H RMN.



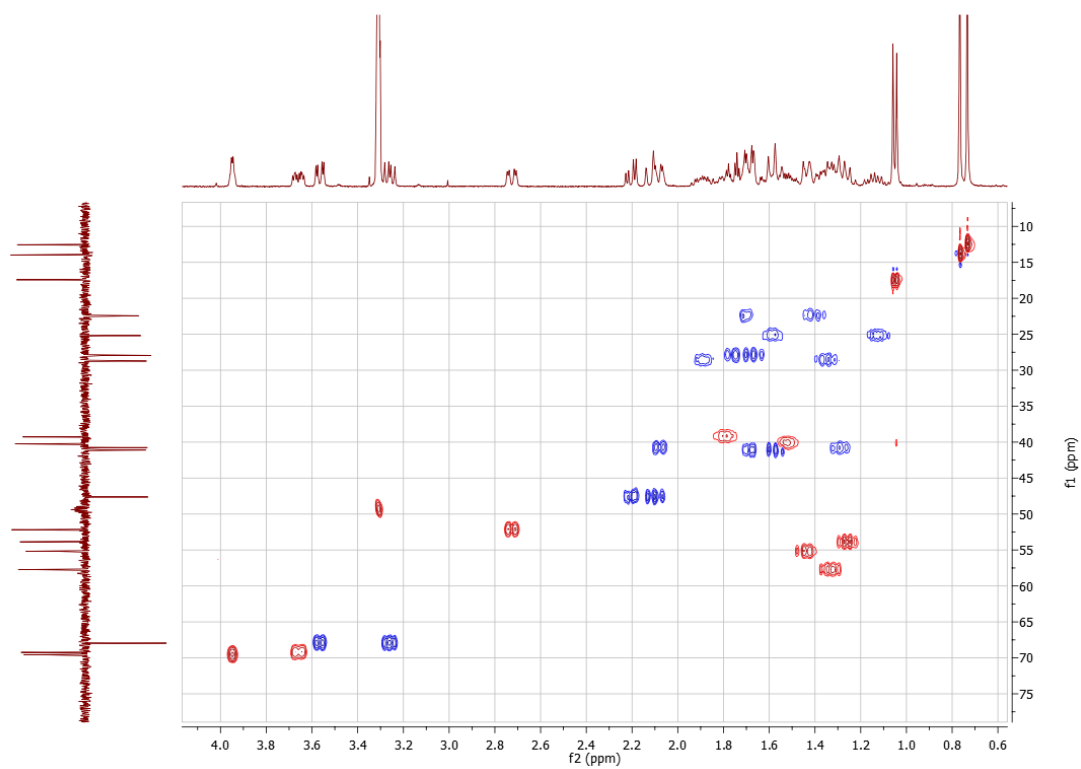
Espectro de ^{13}C RMN.



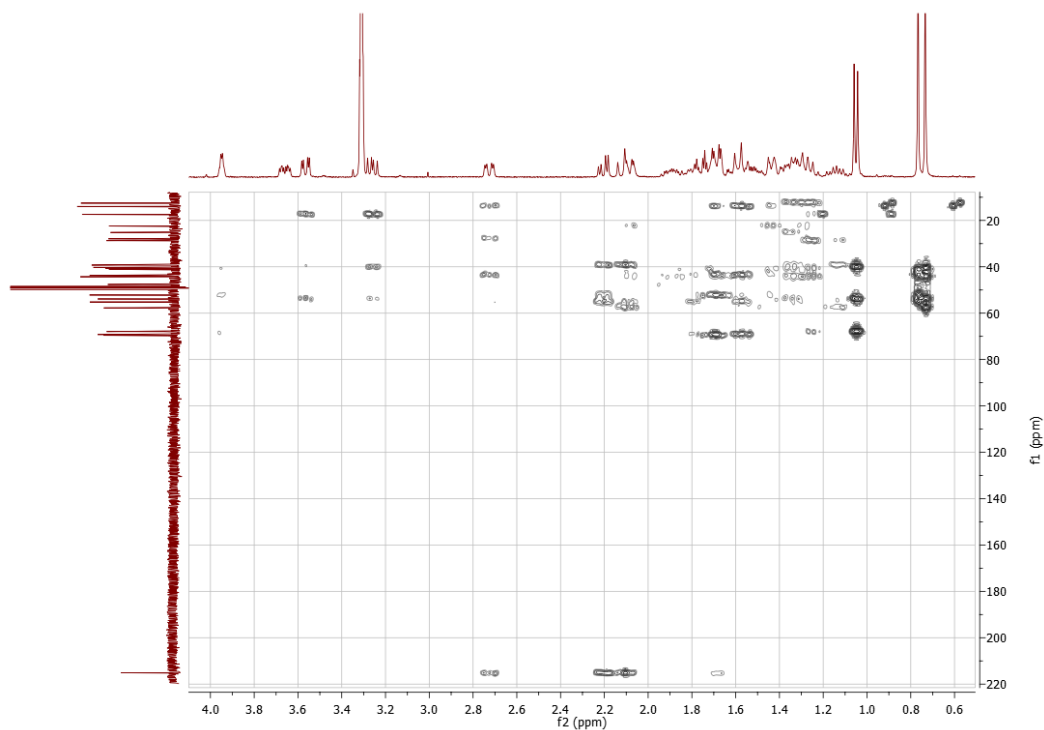
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135



Espectro 2D HSQC ed.

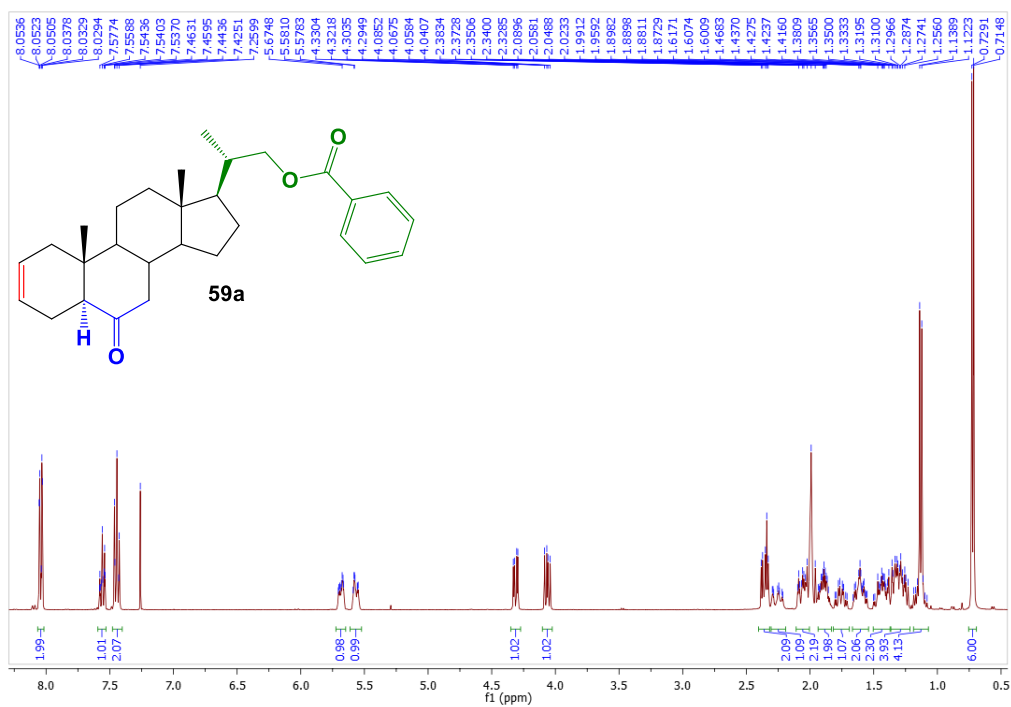


Espectro 2D HMBC

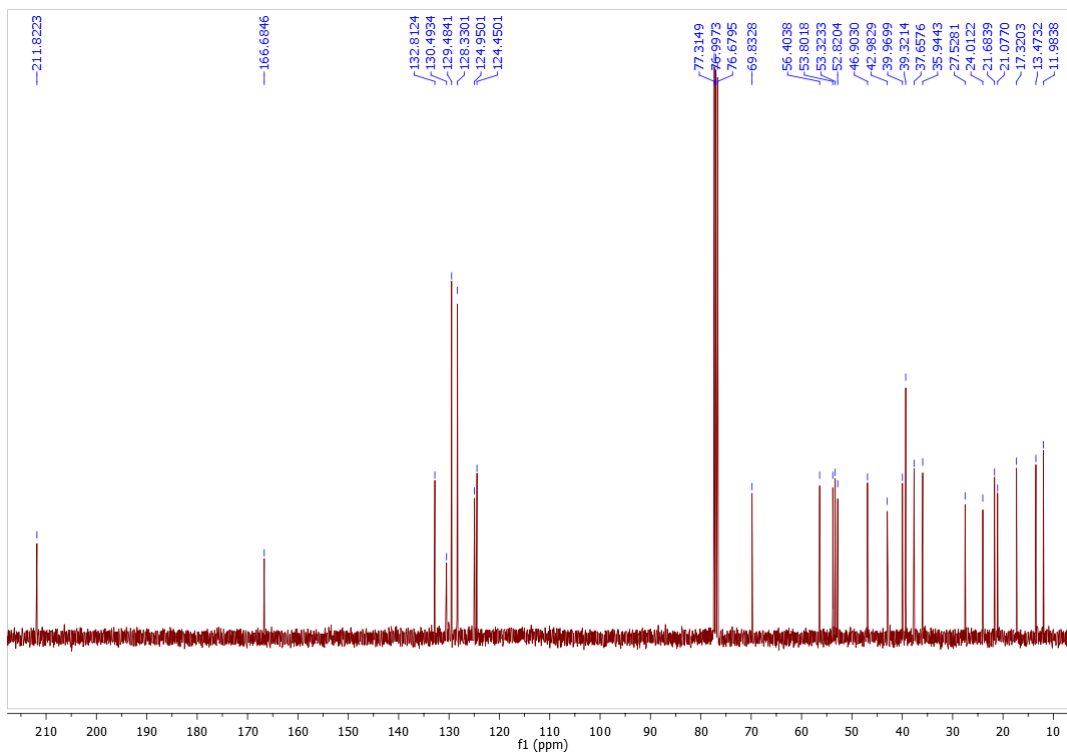


(20S)-22-benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (59a)

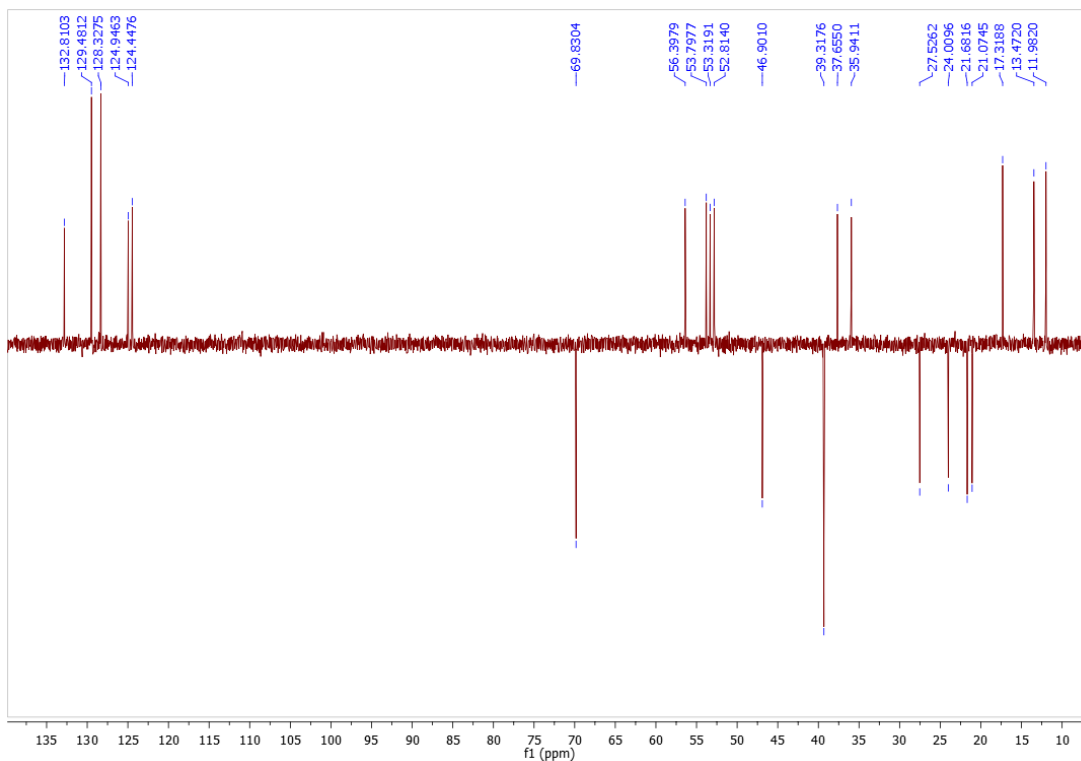
Espectro de ^1H RMN



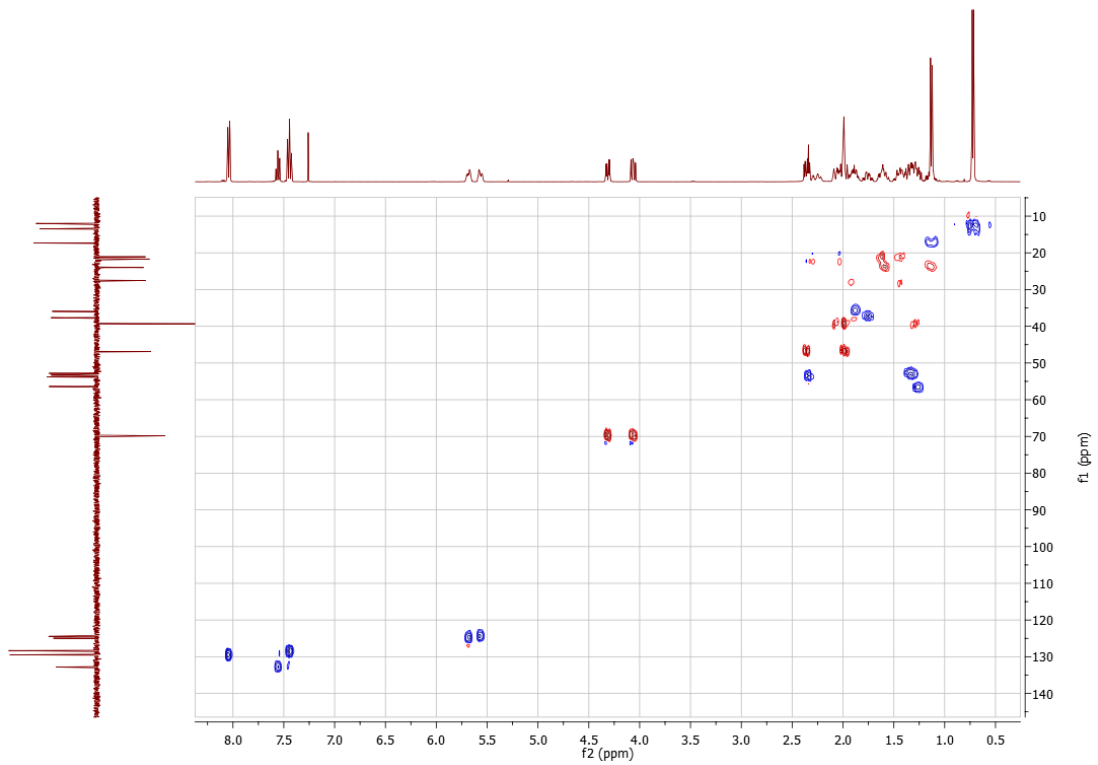
Espectro de ^{13}C RMN



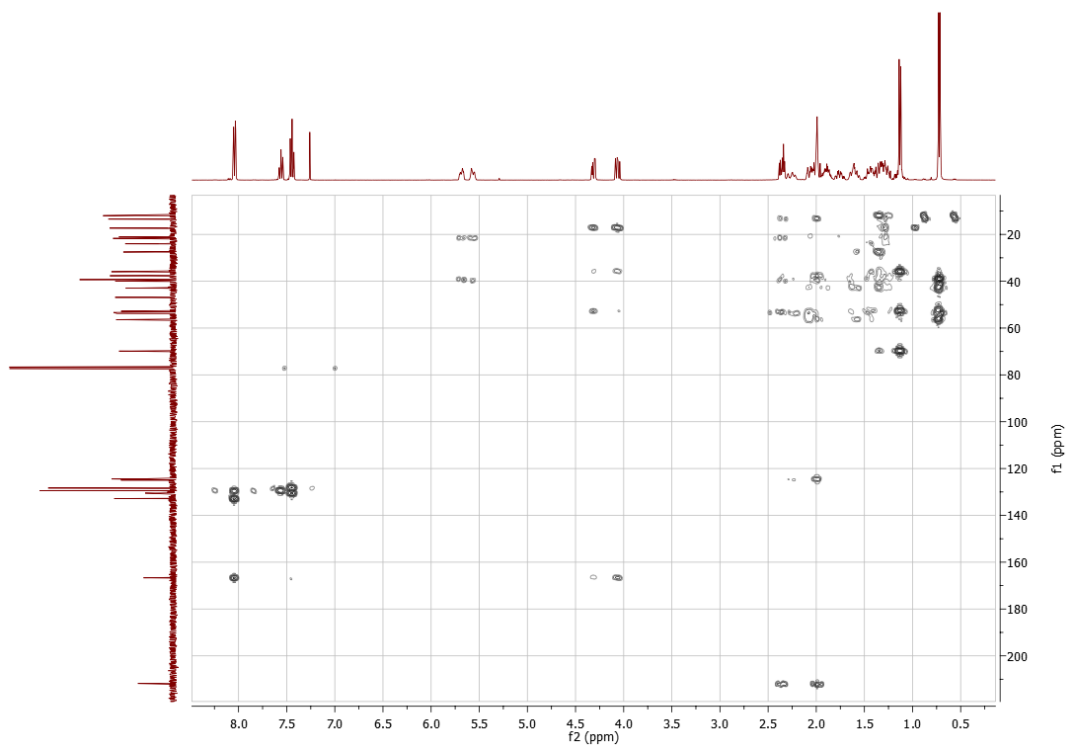
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135



Espectro 2D HSQC ed.

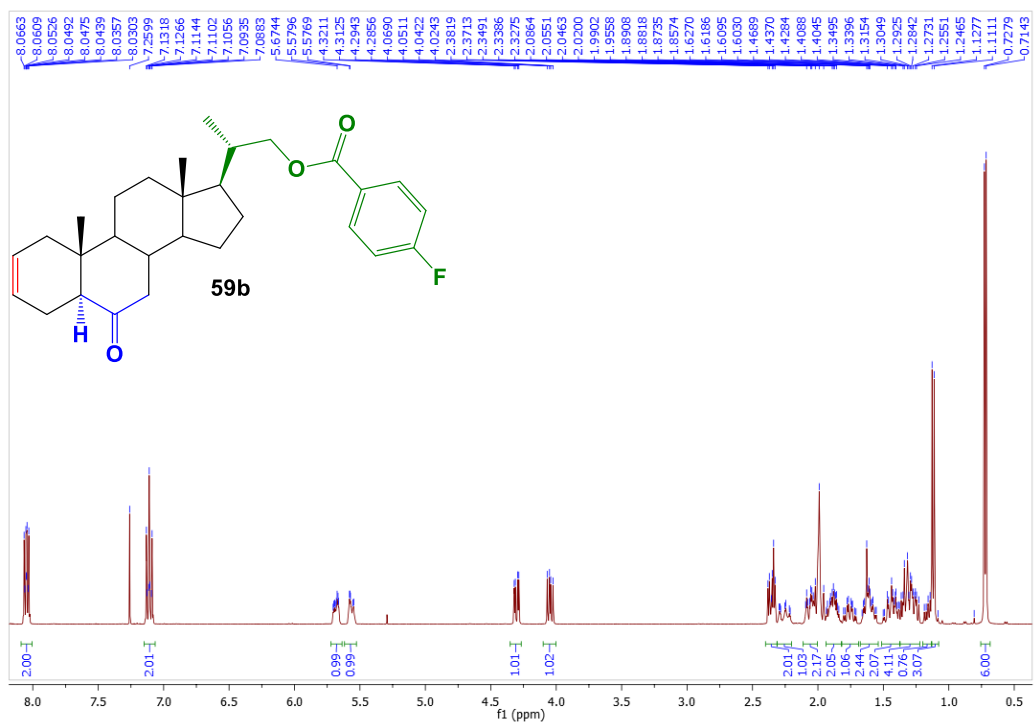


Espectro 2D HMBC.

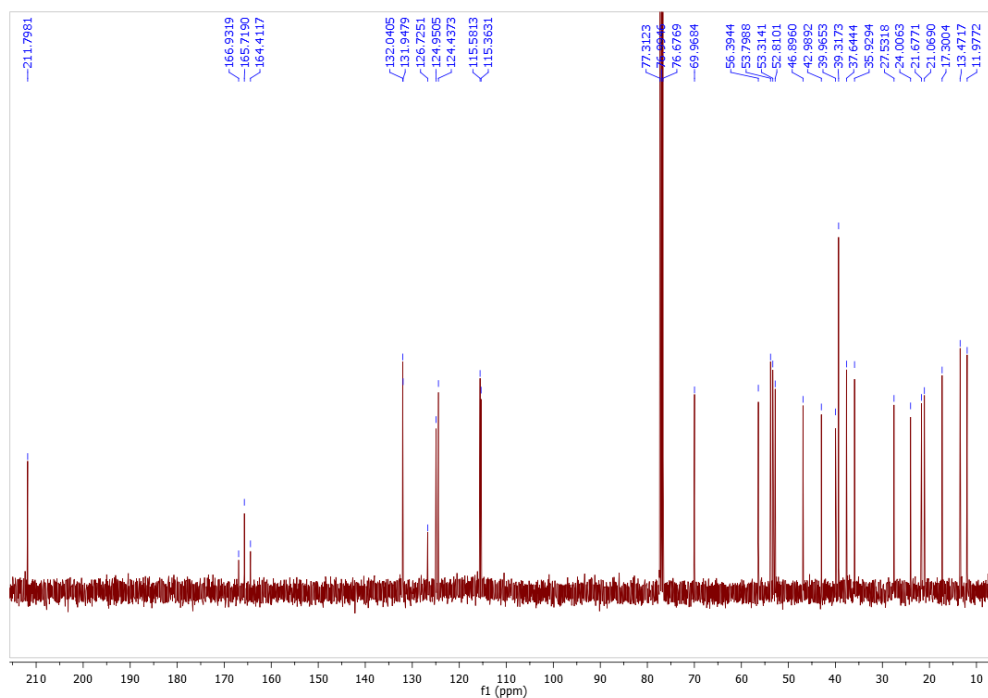


(20S)-22-(4-fluoro) benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (**59b**)

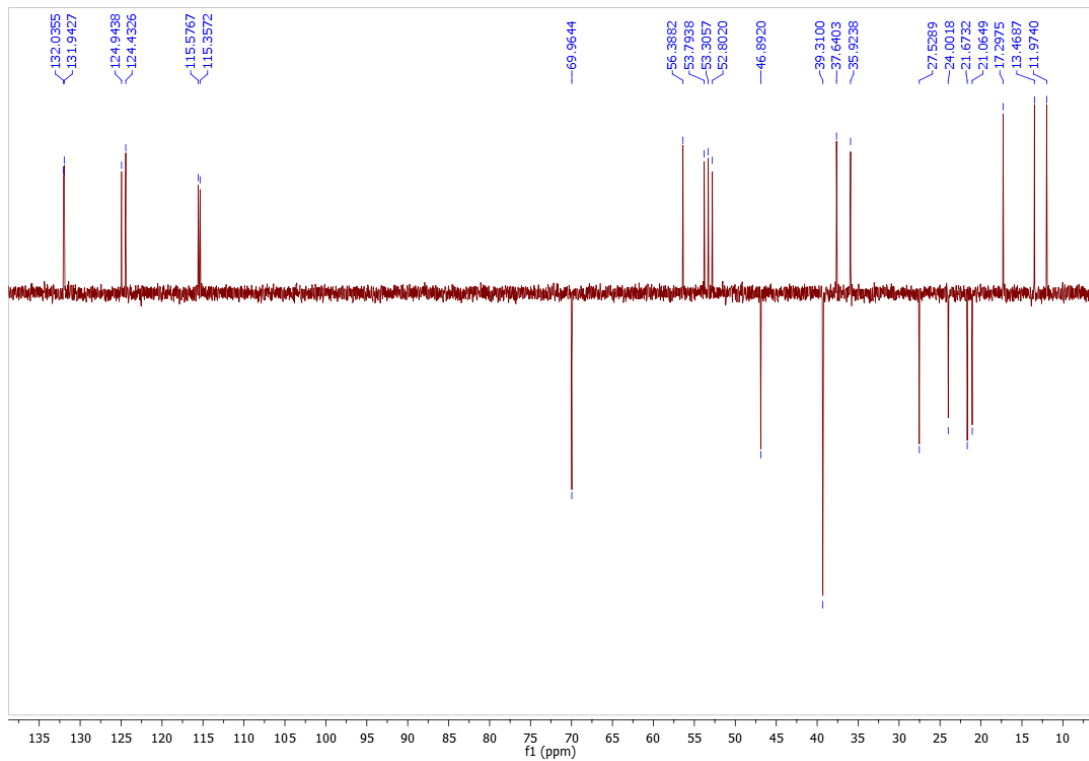
Espectro de ¹H RMN.



Espectro de ¹³C RMN.



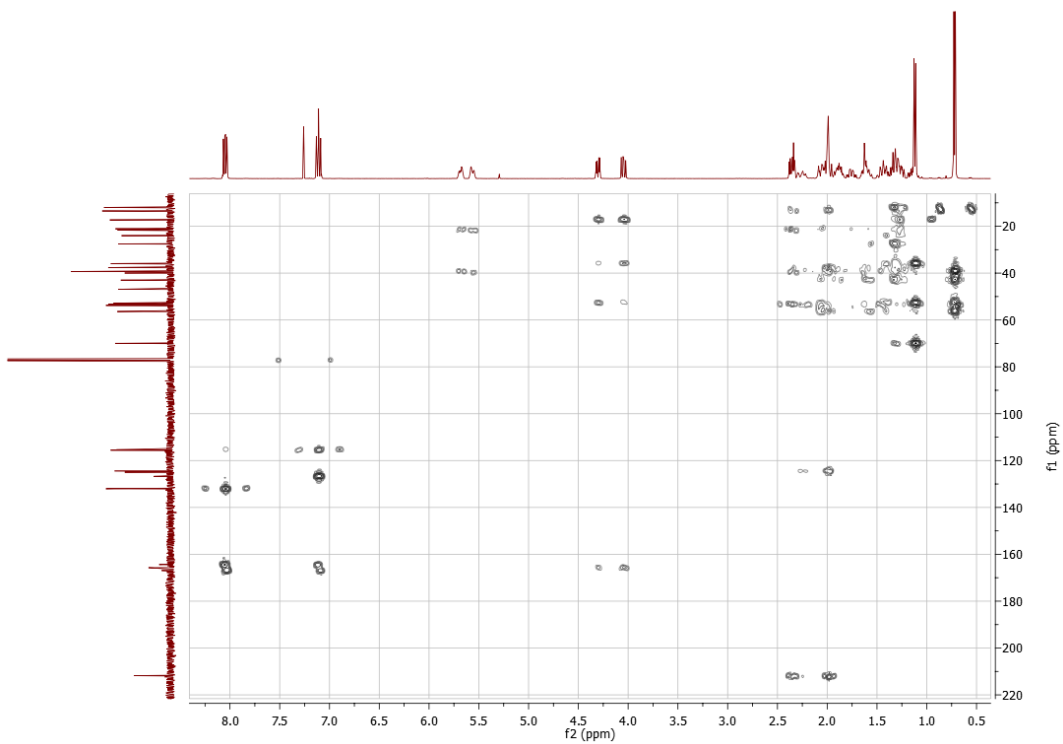
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135.



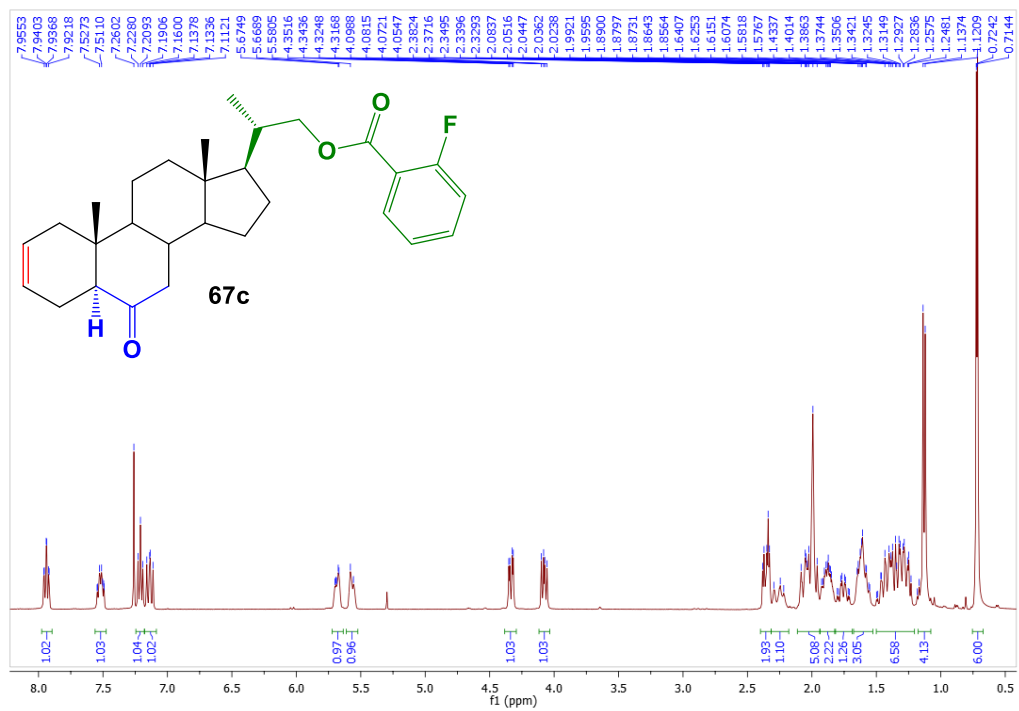
Espectro 2D HSQC ed.



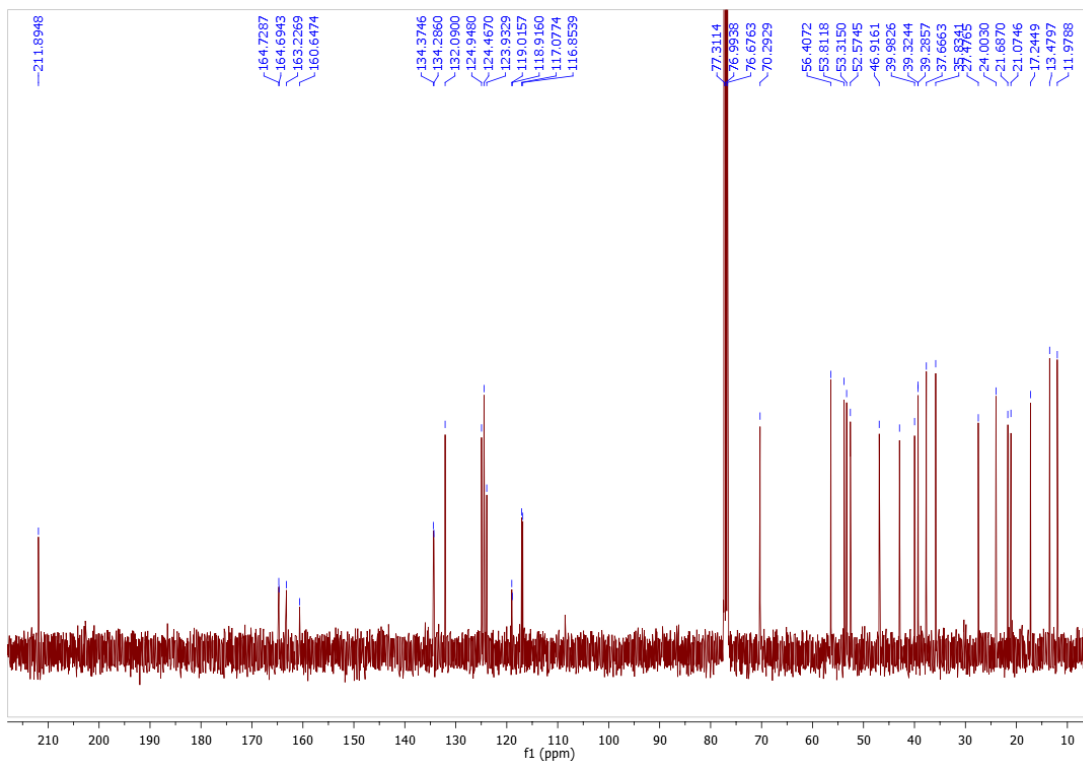
Espectro 2D HMBC.



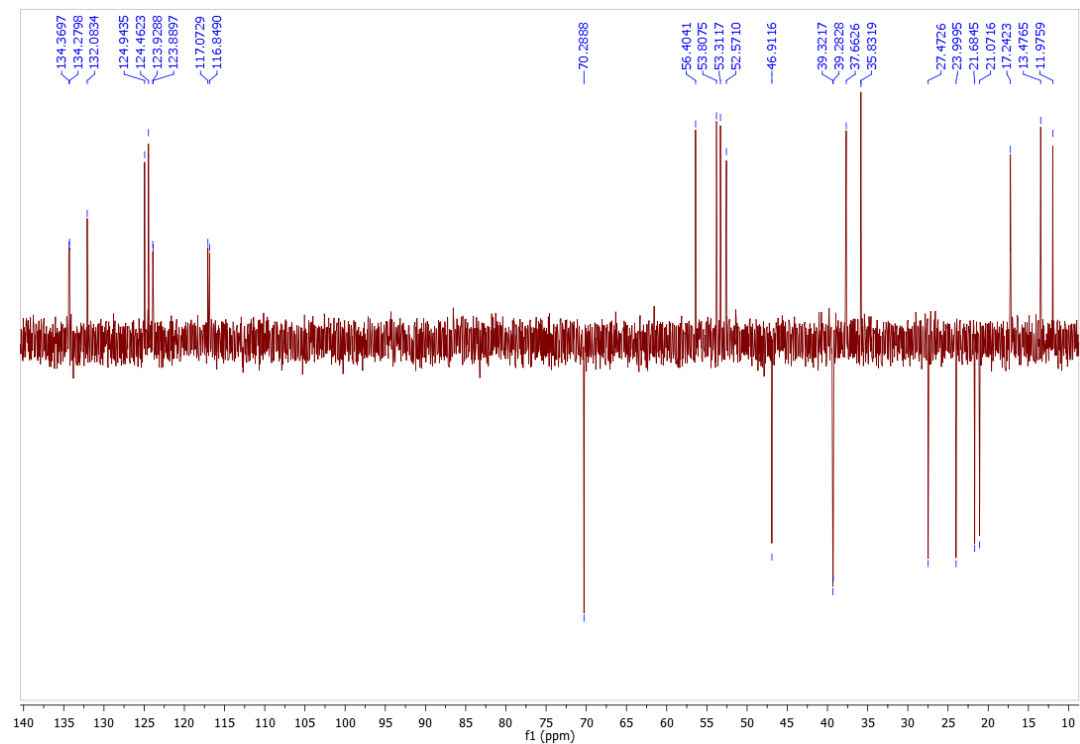
(20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 6-oxo-5 α -pregn-2-eno (59c)
Espectro de ^1H RMN.



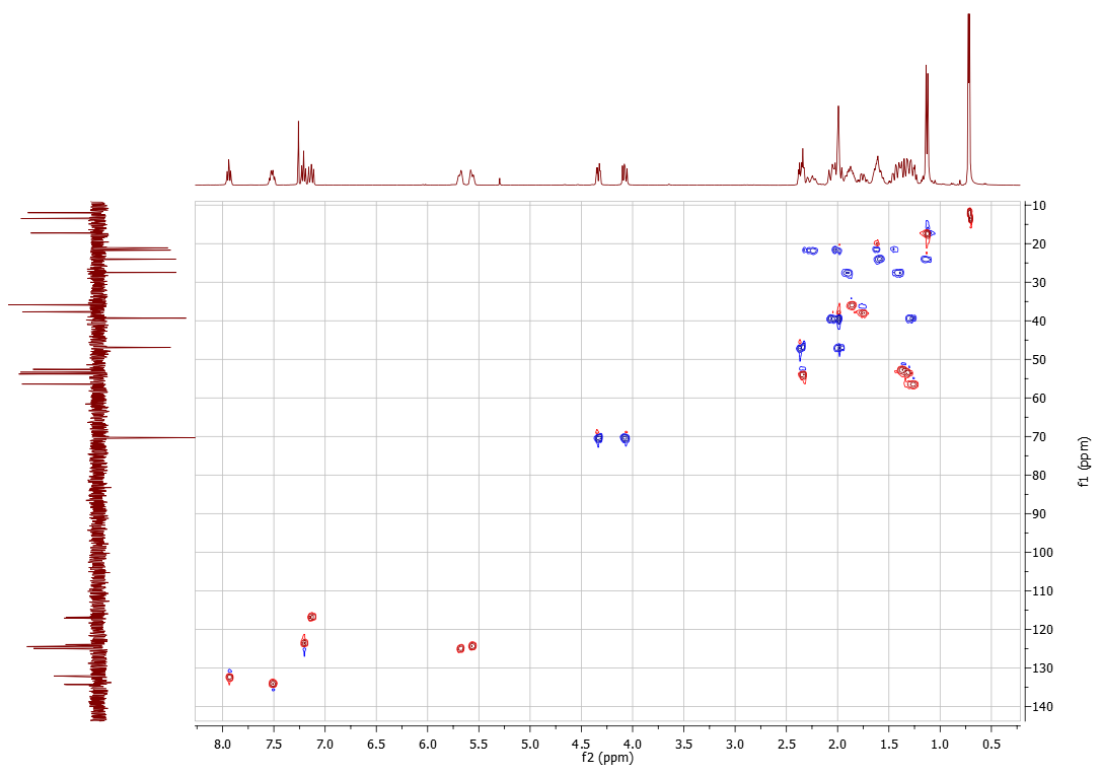
Espectro de ^{13}C RMN.



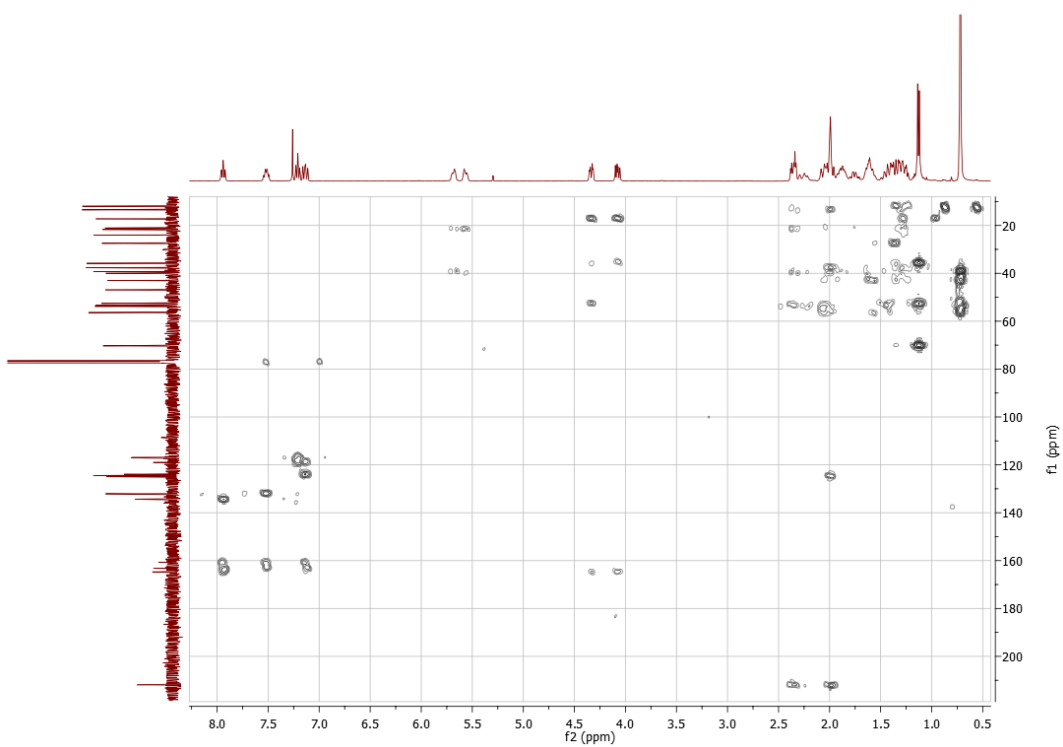
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135.



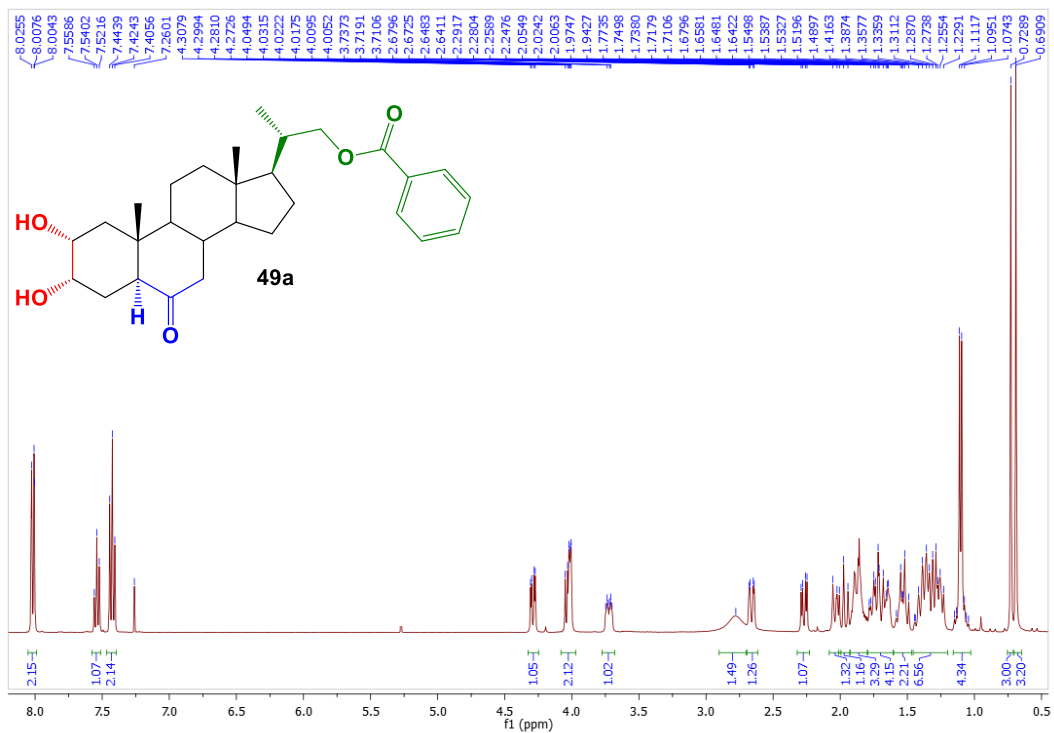
Espectro 2D HSQC ed.



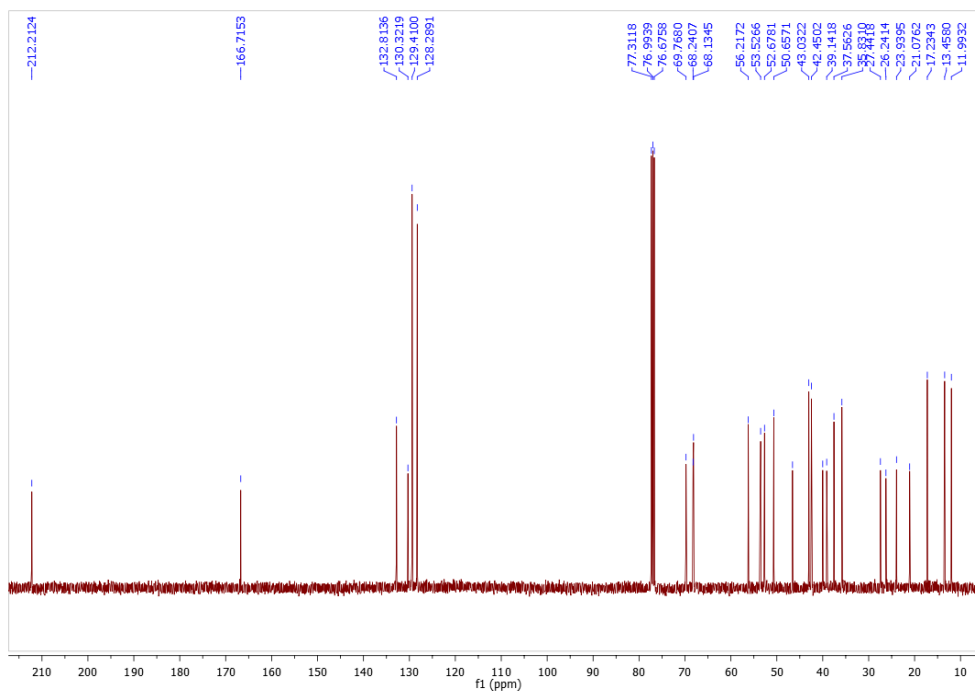
Espectro 2D HMBC.



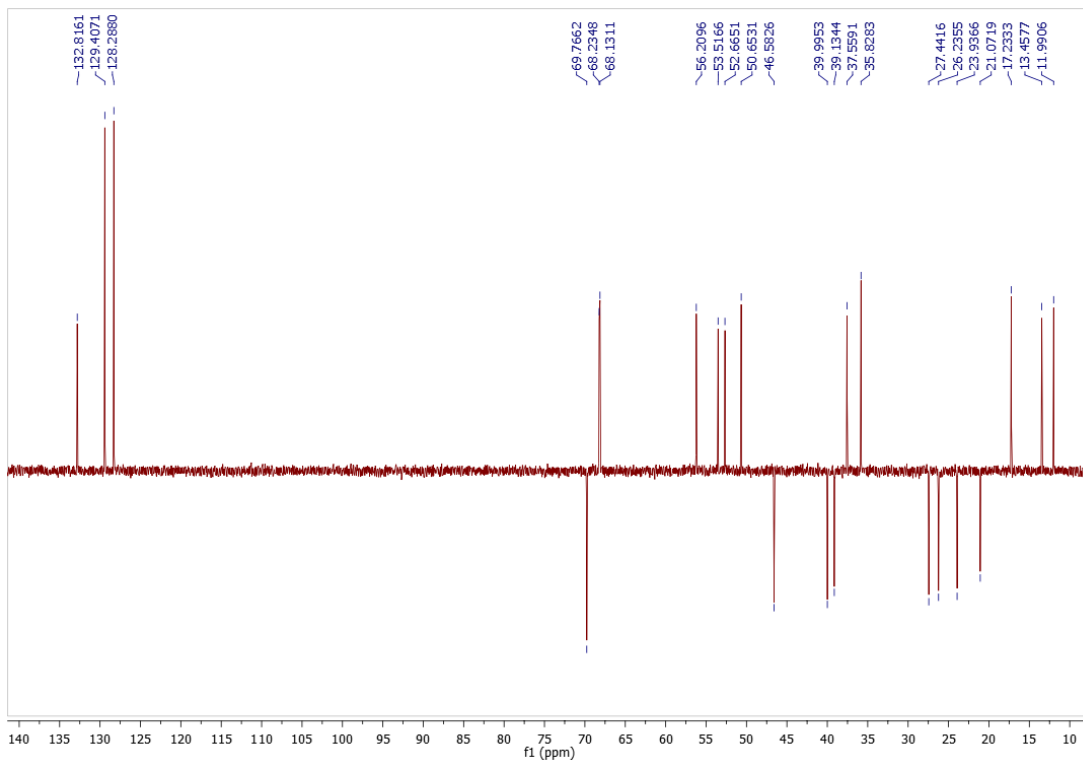
(20S)-22-benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49a**)
Espectro de ^1H RMN.



Espectro de ^{13}C RMN.



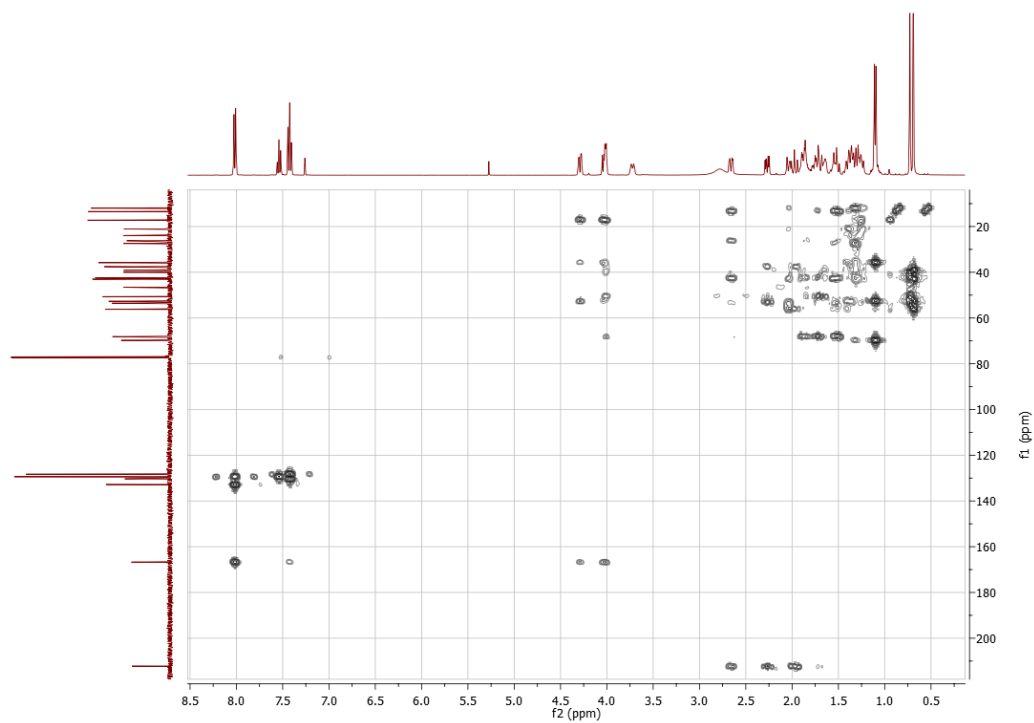
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135.



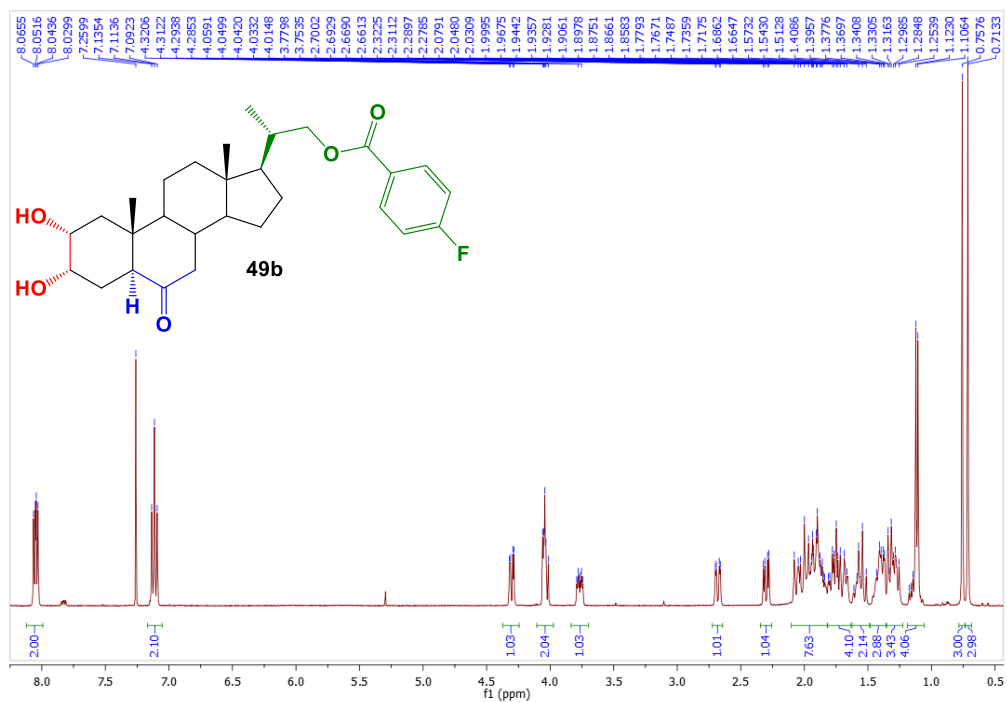
Espectro 2D HSQC ed.



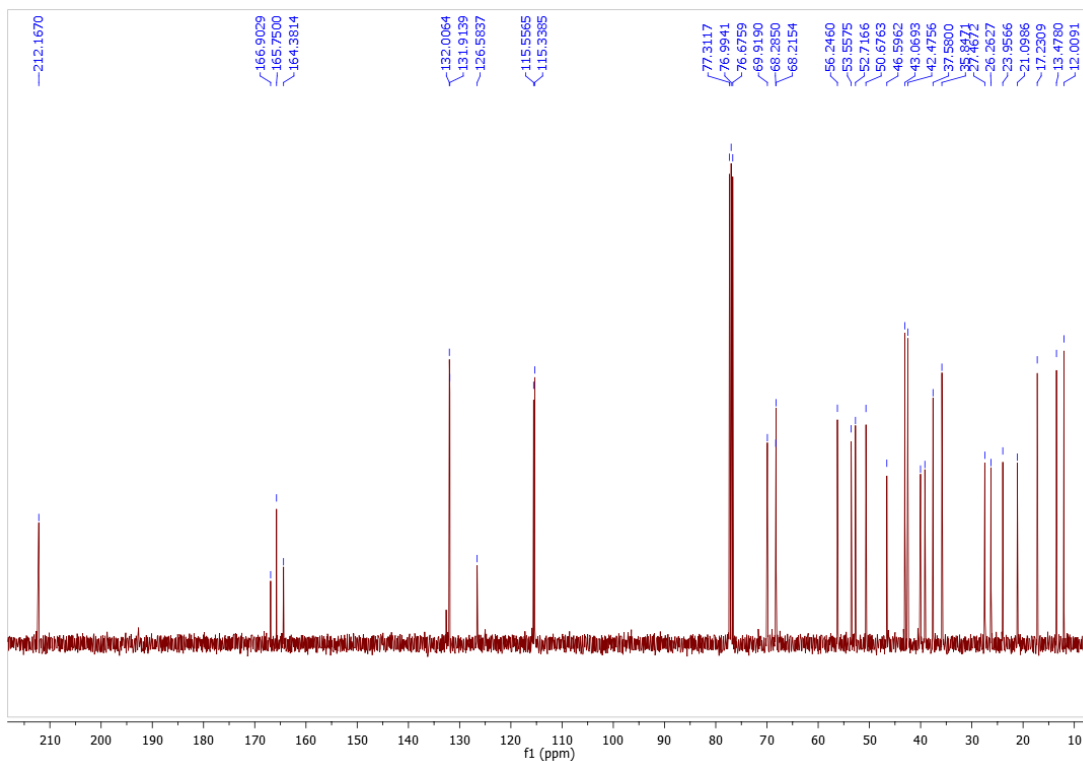
Espectro 2D HMBC.



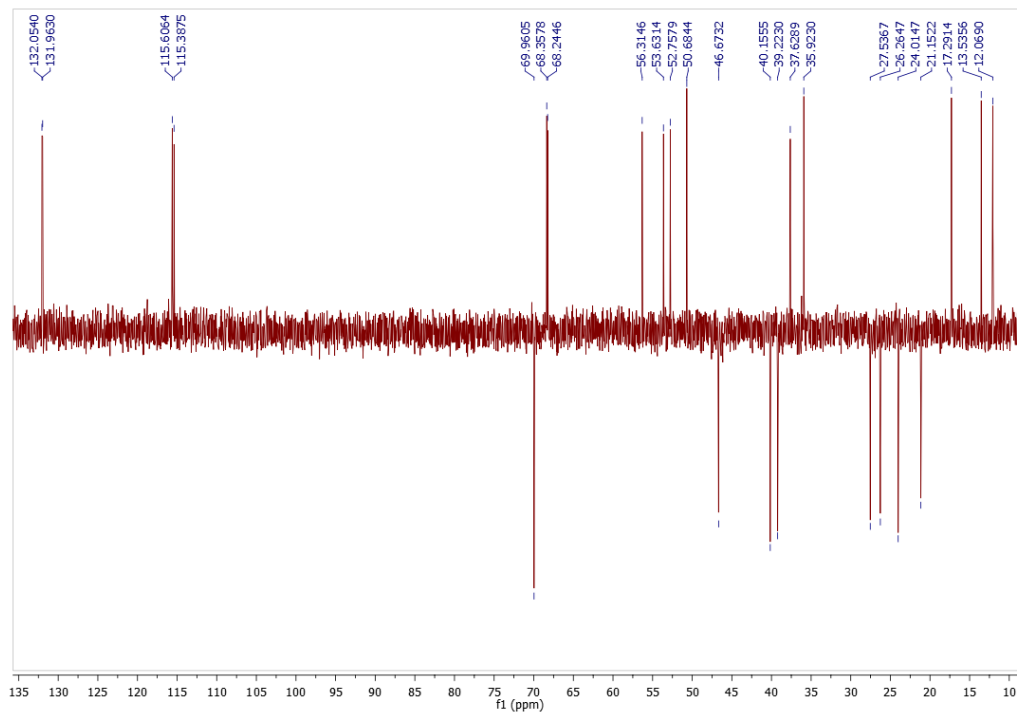
(20S)-22-(4-fluoro) benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49b**)
Espectro de ^1H RMN.



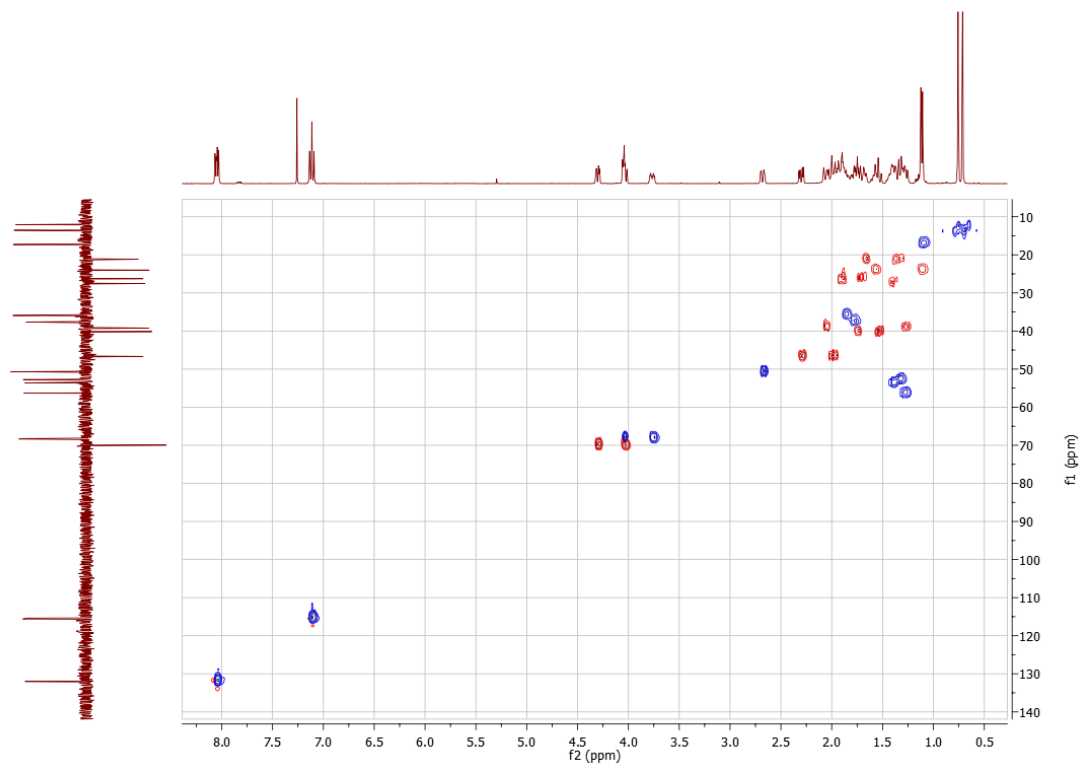
Espectro ^{13}C RMN.



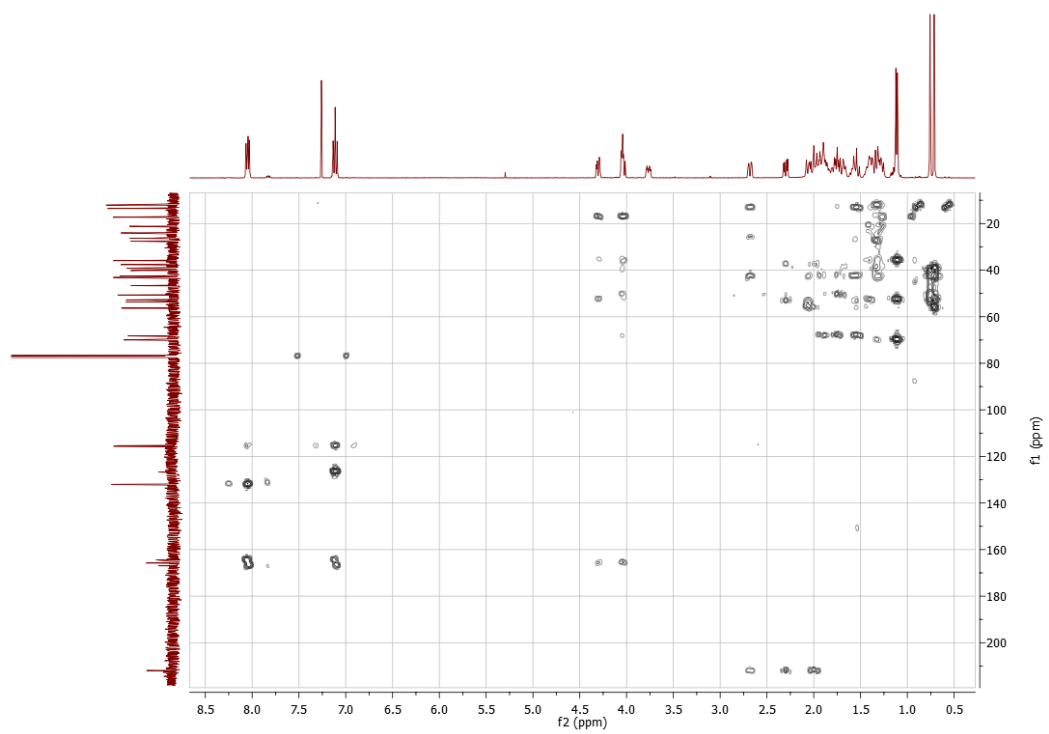
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135.



Espectro 2D HSQC ed.

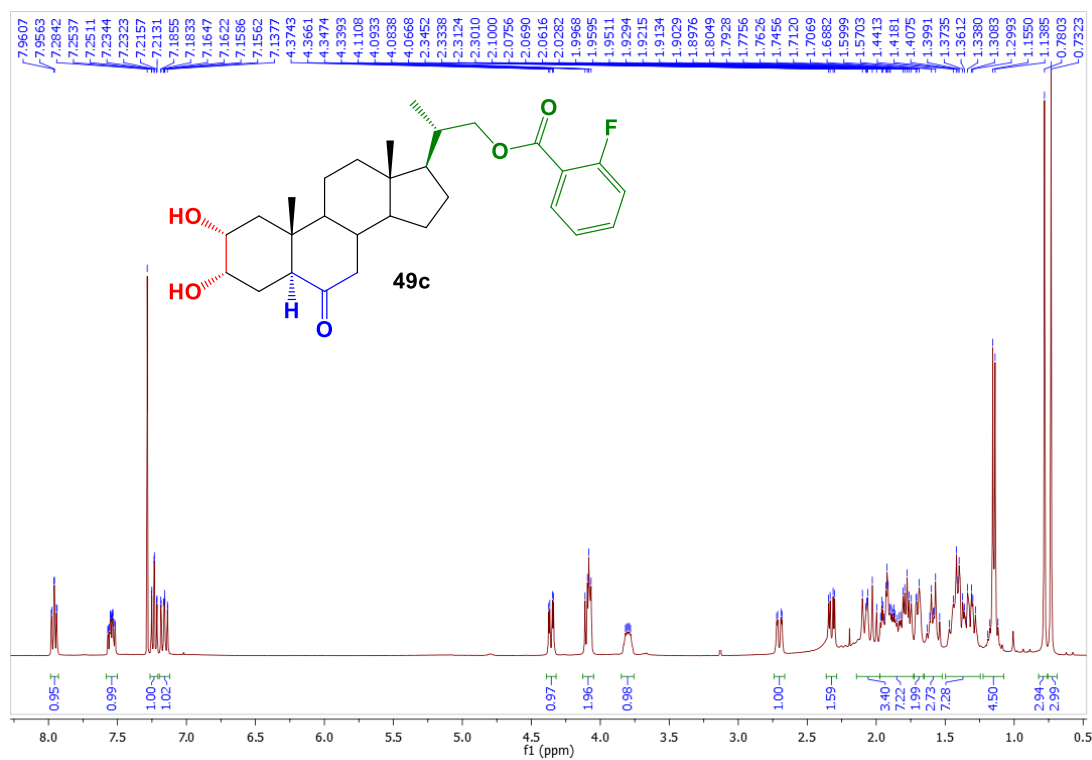


Espectro 2D HMBC.

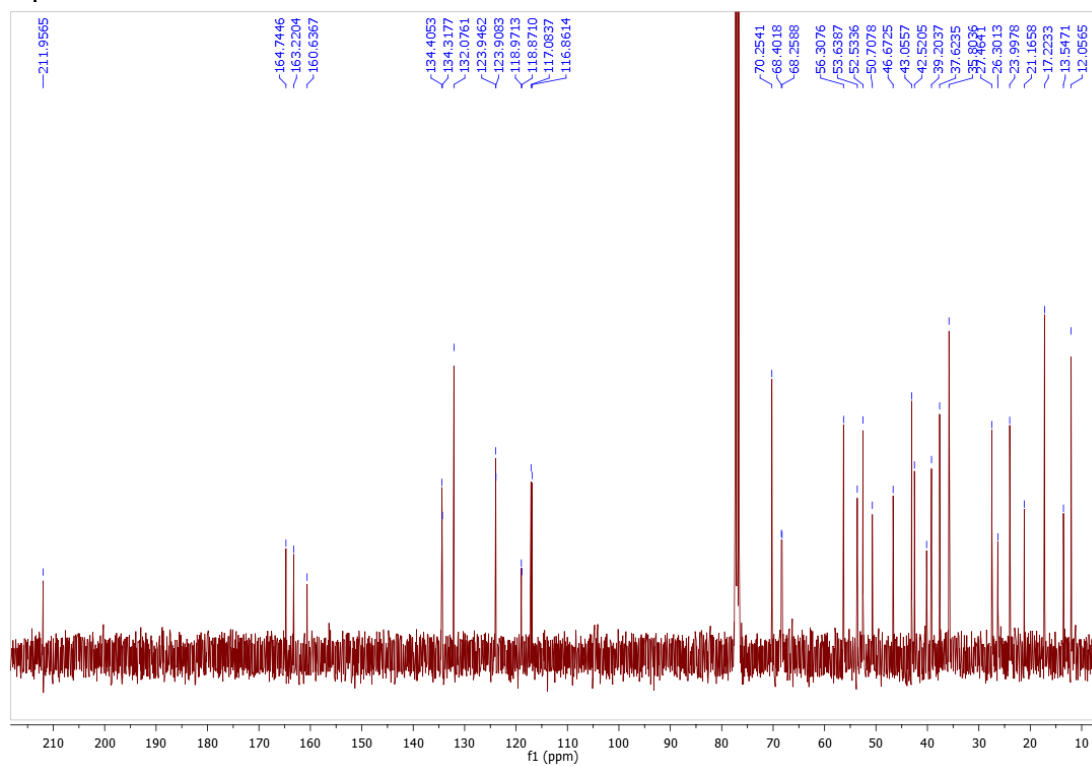


(20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49c**)

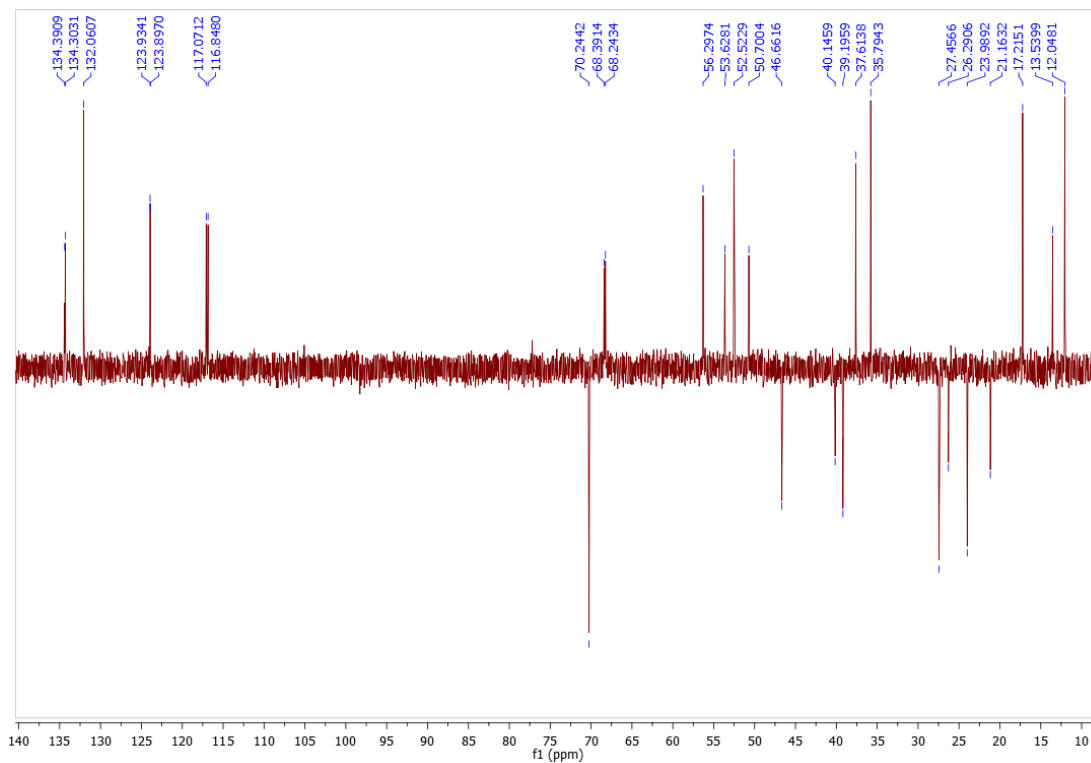
Espectro de ^1H RMN.



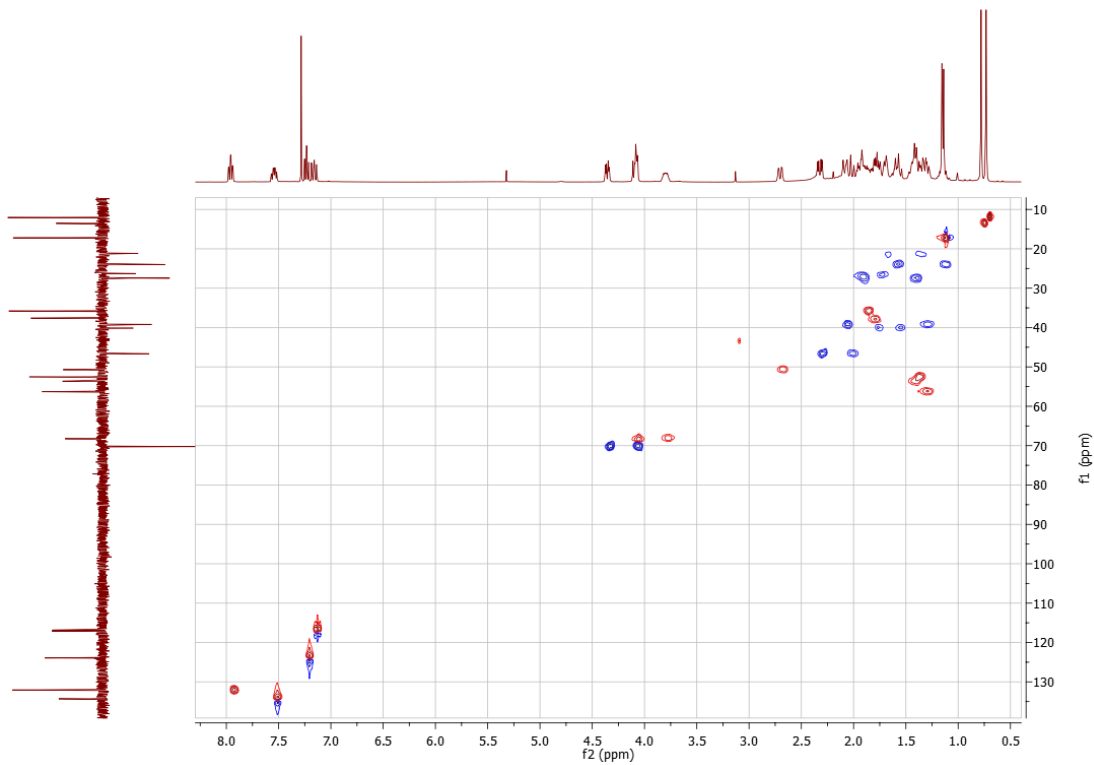
Espectro de ^{13}C RMN.



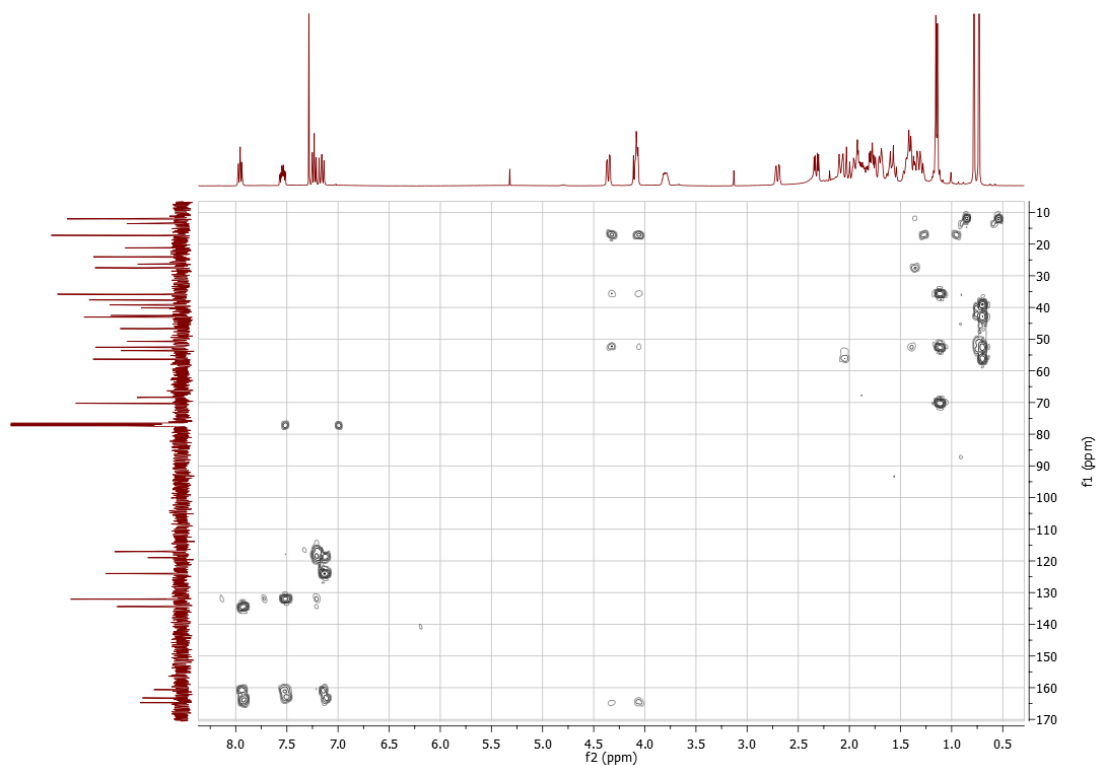
Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135.



Espectro 2D HSQC ed.

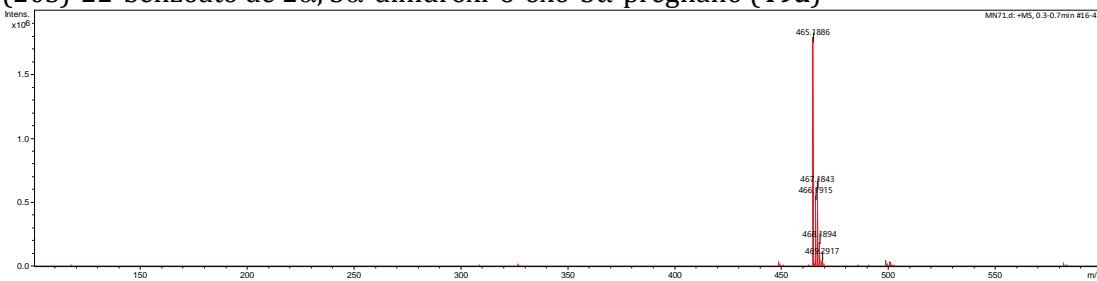


Espectro 2D HMBC.

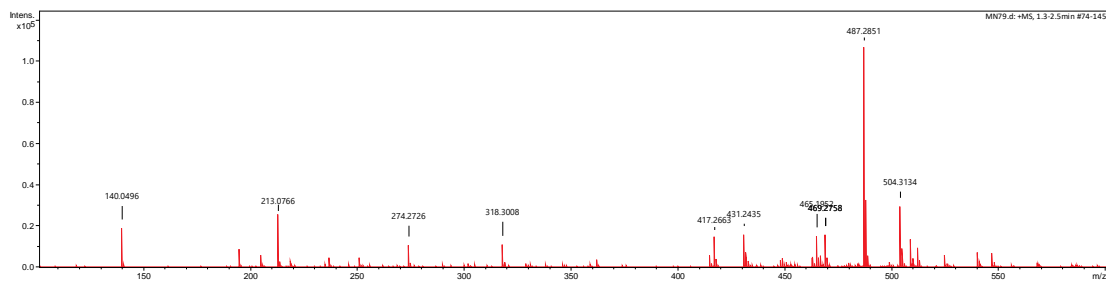


ANEXO 2: Espectros de Masas de Alta Resolución (EMAR) de los análogos 49a, 49b, 49c y 58, (M + H)⁺.

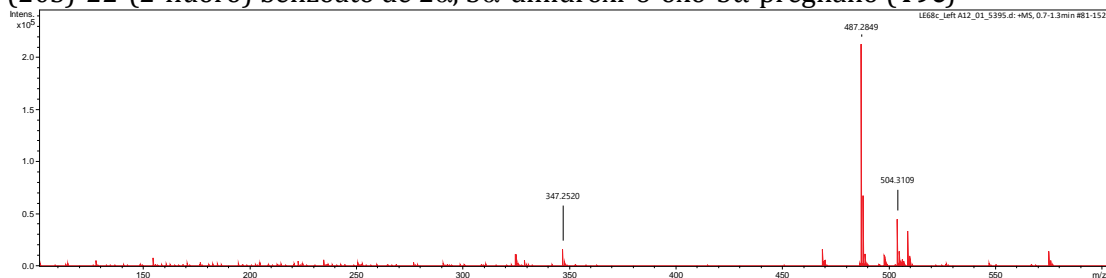
(20S)-22-benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49a**)



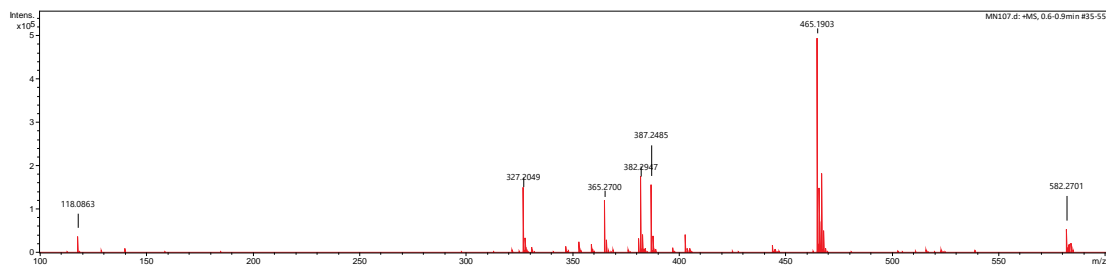
(20S)-22-(4-fluoro) benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49b**)



(20S)-22-(2-fluoro) benzoato de 2 α , 3 α -dihidroxi-6-oxo-5 α -pregnano (**49c**)



(20S)-2 α , 3 α , 22-trihidroxi-5 α -pregn-6-ona (**58**)



ANEXO 3: Interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre el complejo BRI1-BAK1 y los análogos sintetizados.

Tabla 5: Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.

Análogo	Interacciones de puentes de hidrógeno	Interacciones de carácter hidrofóbico (fuerzas de London)
49a	Ser647, Tyr597, Tyr642, Asn705, His61	Trp564, Leu615, Tyr599, Tyr597, Pro648, Tyr642, Ile682, Ile706, Phe681, Phe60, Val62, Trp59, Met657, Phe658
49b	Ser647, Tyr597, Tyr642, Asn705, His61	Tyr642, Trp59, Phe60, Val62, Ile706, Pro648, Tyr599, Trp564, Met657, Phe658, Leu615, Ile682, Phe681.
49c	Ser647, Tyr597, Asn705, His61, Tyr642	Tyr642, Trp59, Phe60, Val62, Ile706, Pro648, Tyr599, Trp564, Met657, Phe658, Leu615, Ile682, Phe681.
49d	Ser647, Tyr597, Asn705, His61, Tyr642	Tyr642, Trp59, Phe60, Val62, Ile706, Pro648, Tyr599, Trp564, Met657, Phe658, Leu615, Ile682, Phe681.
49e	Ser647, Tyr597, Asn705, His61, Tyr642	Tyr642, Trp59, Phe60, Val62, Ile706, Pro648, Tyr599, Trp564, Met657, Phe658, Leu615, Ile682, Phe681.
1	2-Ser647, Tyr642, His61, Asn705	Tyr642, Trp59, Phe60, Val62, Ile706, Pro648, Tyr599, Tyr597, Trp564, Met657, Phe658, Leu615, Ile682, Phe681, Pro648, Ile592, Ile563.

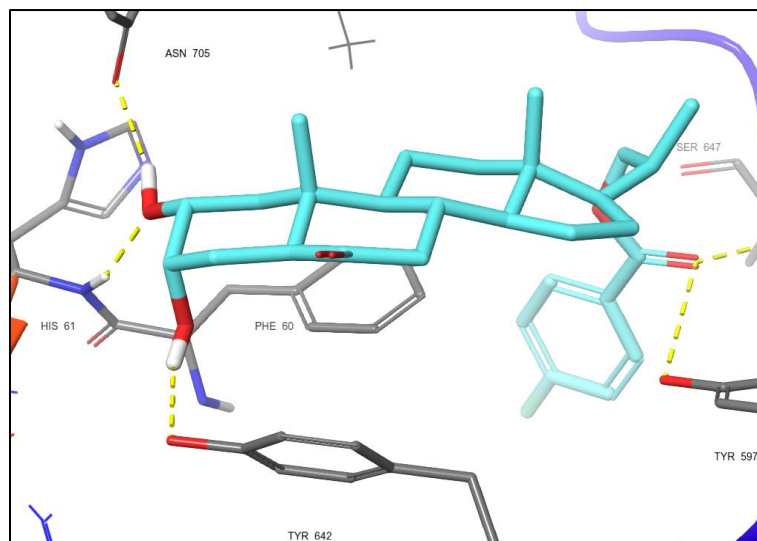


Figura 6.1. Modo predictivo de unión de **49b** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

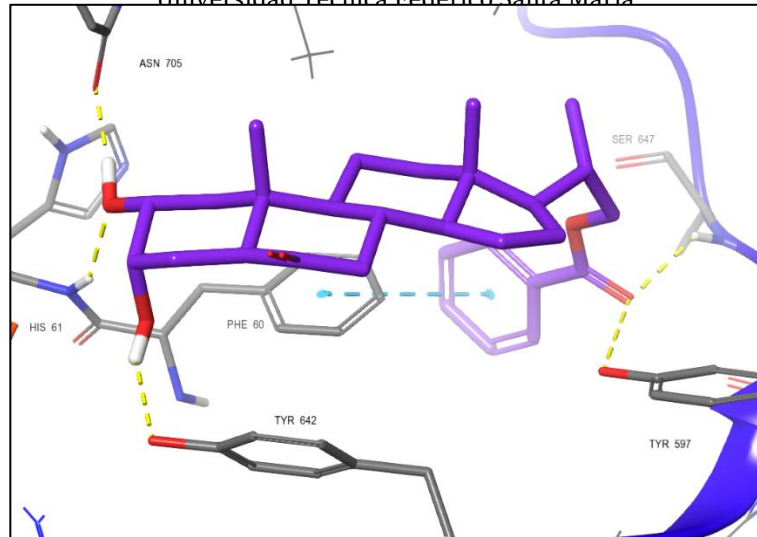


Figura 6.2. Modo predictivo de unión de **49a** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

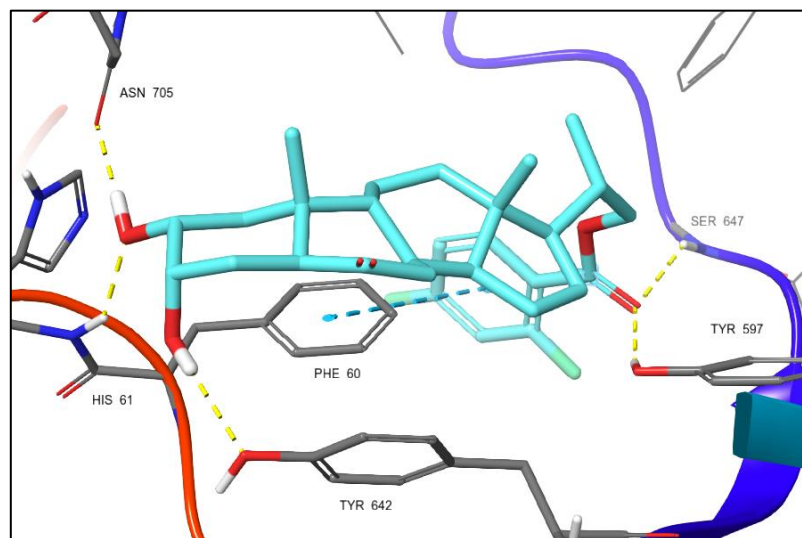


Figura 6.3. Modo predictivo de unión de **49e** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

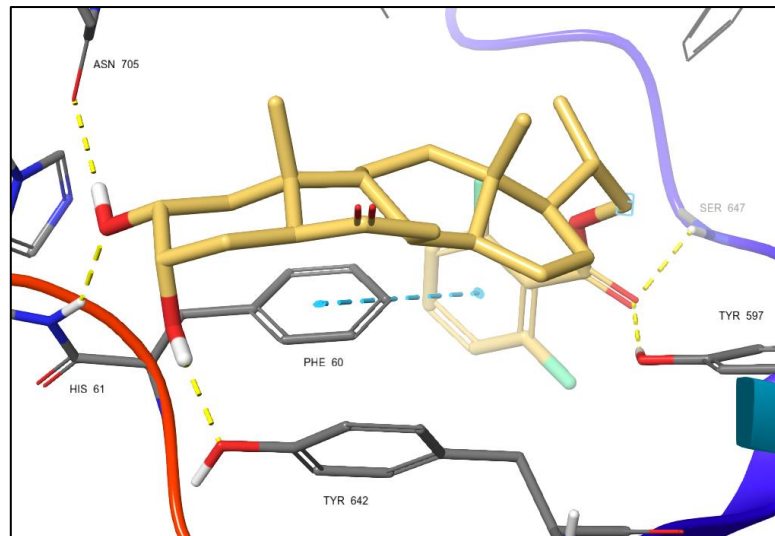


Figura 6.4. Modo predictivo de unión de **49d** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

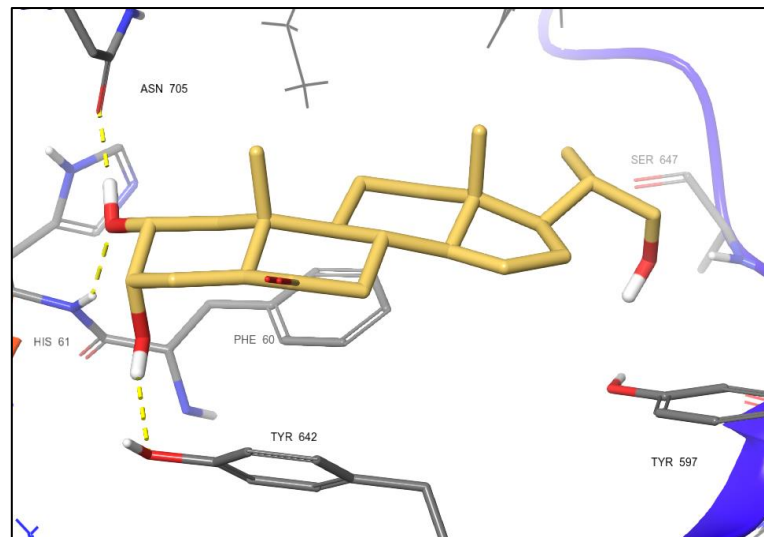


Figura 6.5. Modo predictivo de unión de **58** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).