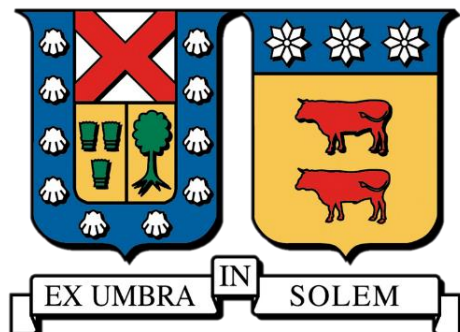


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL



**“SÍNTESIS DE NUEVOS ANÁLOGOS DE
BRASINOESTEROIDES. ESTUDIOS IN-SILICO DE RELACIÓN
ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.”**

IGNACIO NICOLÁS SOTO SALAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA:

DR. LUIS JAVIER ESPINOZA CATALÁN

PROFESORES CORREFERENTES:

DR. HENRIK KIRSTEIN HANSEN KNUD

DRA. KATY PAULINA DÍAZ PERALTA

DICIEMBRE – 2023

VALPARAISO – CHILE

Agradecimientos

A mi madre y padre, Paula y Joel, por su amor, apoyo y comprensión incondicional durante esta etapa académica. Gracias por creer en mí y brindarme el aliento necesario para enfrentar los retos que surgieron en este camino.

A mis amigos, en especial a Alejandro, Angelo, Javier y Nicolás, con quienes las risas siempre se multiplicaron. Gracias por estar en las buenas y las malas; si algo me llevo de la vida universitaria, son los recuerdos y su amistad.

A mi pareja, Camila, quien me mostró que en poco tiempo se puede querer profundamente. Gracias por tu aliento, apoyo y disposición incondicional.

A mis profesores correferentes y docentes de apoyo, cuyos conocimientos y enseñanzas han sido esenciales en el desarrollo de este trabajo. En especial a María “La Jefa”, quien fue fundamental guiando los largos meses de trabajo de laboratorio. Agradezco su paciencia, estímulo y motivación constante.

A mi director de memoria, Luis Espinoza, por su orientación experta, apoyo constante y valiosos consejos a lo largo de todo este proceso. Su dedicación y guía fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A todos aquellos que, de una forma u otra, colaboraron y aportaron ideas en este proyecto; Mauro, César, Don Mauri, Ernesto, Franchezca y Juana; mi más sincero agradecimiento.

Al Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María por proporcionar los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación y por el ambiente propicio para el aprendizaje y desarrollo académico.

Finalmente, y citando al gran Snoop Doggy Dog;

“Last but not least, I wanna thank me. I wanna thank me for believing in me. I wanna thank me for doing all this hard work. I wanna thank me for having no days off. I wanna thank me for, for never quitting. I wanna thank me for always being a giver. And tryna give more than I receive. I wanna thank me for tryna do more right than wrong. I wanna thank me for just being me at all times.”

Resumen Ejecutivo

Las fitohormonas desempeñan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre ellas se encuentran los brasinoesteroides (BRs), que promueven el crecimiento y protegen a las plantas del estrés biótico y abiótico. Estos compuestos son utilizados por sus propiedades en la agricultura para aumentar la producción y mejorar la calidad de los cultivos. Se han aislado más de 80 BRs de origen natural y más de 100 de origen sintético. Se realizó la síntesis de los nuevos análogos de BRs **78a-c** con estructuras de ésteres de bencilo y sustituciones con átomos de halógenos en posiciones *orto* y *para* en el anillo aromático de la cadena lateral, los cuales fueron diseñados mediante un estudio *in-sílico* de Docking molecular. La síntesis de los nuevos análogos se realizó a partir del ácido 3 β -acetoxi-23,24-bisnor-5-en-colénico (**69**). Estos fueron evaluados en cuanto a su potencial actividad en el crecimiento vegetal mediante ensayos de inclinación de lámina de arroz (ILA) y elongación de segundo entrenudo de frijol (SEF), además fueron caracterizados completamente midiendo sus propiedades físicas y espectroscópicas.

Se cuantificó una actividad biológica inferior a la brasinólida (**1**) en el crecimiento vegetal, siendo el análogo (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxílate de 4-fluorobencilo (**78b**) el que presentó los mejores resultados respecto a los compuestos estudiados. El estudio de Docking molecular predijo que los análogos con sustituciones en la cadena lateral presentan mayor afinidad en el complejo receptor BRI1/BAK1, lo que se contradice con lo observado en los ensayos biológicos por lo que no fue posible validar los estudios *in-sílico*, para lo cual se propone realizar un espectro más amplio de estructuras análogas de BRs y evaluar sus actividades biológicas.

Índice General

Nomenclatura.....	7
I. Introducción	9
II. Objetivos.....	11
III. Marco Teórico	12
i. Fitohormonas y Reguladores de crecimiento vegetal.	12
ii. Brasinoesteroides (BRs).....	13
iii. Relación estructura-actividad de los BRs.	15
iv. Relación estructura-actividad respecto a modificaciones en el anillo A.	18
v. Relación estructura-actividad respecto a modificaciones en el anillo B.	20
vi. Relación estructura-actividad respecto al tipo de fusión de los anillos A/B.	21
vii. Relación estructura-actividad respecto a los grupos funcionales y longitud de la cadena lateral.	21
viii. Síntesis de brasinoesteroides y sus análogos.	22
ix. Análogos sintéticos con modificación de la cadena lateral.	23
x. Estudios <i>in-silico</i> de acoplamiento molecular (Molecular Docking).....	26
IV. Metodología	30
i. Metodología síntesis químicas.....	30
ii. Métodos de caracterización.....	32
iii. Metodología evaluaciones biológicas.....	32
a) Ensayo de inclinación de lámina de arroz (ILA)	32
b) Ensayo del segundo entrenudo de frijol (SEF)	33
iv. Metodología de estudios <i>in-silico</i> de relación estructura-actividad (Docking molecular).....	33
v. Materiales y equipos para la síntesis orgánica	34
vi. Materiales y equipos de pruebas biológicas.....	36
V. Resultados.....	37
i. Estudios <i>in-silico</i> de Docking Molecular	37
ii. Síntesis de compuestos.....	39
iii. Evaluaciones biológicas	49
a) Ensayo de inclinación de lámina de arroz (ILA)	49
b) Ensayo del segundo entrenudo de frijol (SEF)	51
VI. Discusión de Resultados	53

i. Estudios <i>in-silico</i> de Docking Molecular	53
ii. Síntesis de compuestos	55
iii. Evaluaciones biológicas	62
VII. Conclusiones	63
Referencias	64
Anexo 1: Modos predictivos de unión con BRI1 y BRI1-BAK1 para 1 , 75' y 78a-c	70
Anexo 2: Diagramas de interacciones con BRI1 y BRI1-BAK1 para 1 , 75' y 78a-c	75
Anexo 3: Espectros de RMN para los compuestos 69-75 , 75' , 76 , 77a-c y 78a-c	80
Anexo 4: Espectros de Masas de Alta Resolución para los compuestos 75' y 78a-c	114

Índice de Figuras

Figura 1: Fitohormonas reguladoras del desarrollo de las plantas [19].....	12
Figura 2: Estructura de brasinoesteroides naturales.	14
Figura 3: Sustituyentes en los anillos A y B, y en la cadena lateral de Brasinoesteroides naturales.	15
Figura 4: Ejemplo de aplicación del ensayo ILA en brasinólida (1) y análogo 9	16
Figura 5: Imagen que muestra el efecto de elongación del segundo entrenudo en el ensayo SEF.	16
Figura 6: 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 esteroideal del 5 α -colestano y 5 β -colestano con fusión [30].	17
Figura 7: Estructuras de 2-deoxi-3 β -28-homobrasinólida (10) y 28-homotifasterol (11).	18
Figura 8: Estructuras de brasinoesteroides y análogos con diferentes funcionalidades en el anillo A.	19
Figura 9: Estructuras de análogos sintéticos de 2-desoxi-BRs naturales obtenidos desde 28-homobrasinólido (5), 28-homocastasterona (6), tifasterol (21) y teasterona (14).	20
Figura 10: Efecto en la actividad biológica de grupos funcionales en el anillo B.	20
Figura 11: Conformaciones espaciales del núcleo esteroideal de 5 α -colestano y 5 β -colestano con fusión de los anillos A/B tipo trans (izquierda) y con fusión de los anillos A/B tipo cis (derecha).	21
Figura 12: Estructura de 22,23-diepi-28-homobrasinólida (39) y efecto en la actividad biológica de los sustituyentes en la cadena lateral.	22
Figura 13: Precursores esteroideales naturales utilizados para la síntesis de brasinoesteroides naturales y sus análogos.	23
Figura 14: Estructuras de análogos de Brasinoesteroides con importantes modificaciones en la cadena lateral y con cadenas laterales del tipo 23,24-norpregnanos, con funciones éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y amidas [30]	24
Figura 15: Estructuras de arilbrasinoesteroides [26].	25

Figura 16: Análogos de brasinoesteroides del tipo 24-Nor colanos, con funciones benzoato en la posición C-23 de la cadena lateral.	26
Figura 17: Complejo BRI1-BAK1 co-cristalizado con brasinólida (Código PDB: 4M7E).	27
Figura 18: Vista lateral del receptor BRI1 sin unirse a la al brasinólida (1) en azul se muestra el extremo N-terminal y C-terminal y en amarillo se muestra el dominio isla B. Vista superior del receptor BRI1 sin unirse a brasinólida (1). C. Interacción del dominio d del dominio de inserción con la superficie cóncava [57].	27
Figura 19: Nuevos análogos de brasinoesteroides propuestos para la semi-síntesis.	29
Figura 20: Ruta de síntesis para la obtención de la serie 78a-c , desde ácido 3 β -acetoxi-23,24-bisnor-5-colénico (69).	31
Figura 21: Poses predichas para brasinólida (1) en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).	53
Figura 22: Poses predichas para el análogo 78a en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).	54
Figura 23: Poses predichas para el análogo 78b en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).	54
Figura 24: Poses predichas para el análogo 78c en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).	55
Figura 25: Estructura 3D del compuesto 73 , donde se muestras los acoplamiento H-H para los hidrógenos H-4 y H-6, cuyos valores confirman la presencia del anillo de ciclopropano y estereoquímica del C-6.	56
Figura 26: Espectro 2D HSQC ed., con proyección de ¹³ C DEPT-135, donde se muestran las correlaciones heteronucleares a ¹ JHC para los hidrógenos H-2, H-3, H-5, H-20, H-7 β , H-18, H-19 y H-21, para el glicol 75'	57
Figura 27: Espectro 2D HMBC para el compuesto 75' y su estructura, que muestran las principales correlaciones heteronucleares a ² JHC (flechas en negro) y ³ JHC (flechas en verde).	58
Figura 28: Adición preferencial del OsO ₄ por la cara inferior del plano del enlace doble C2-C3, en el compuesto 75 , que permitirá la formación diastereoespecífica del diol 2 α -3 α en el compuesto 75'	59
Figura 29: Espectro 2D HSQC parcial, con proyección de ¹³ C DEPT-135, que muestra las principales correlaciones heteronucleares a ¹ JHC (flechas en rojo y verde) del grupo bencilo (-OCH ₂ Ar) para el compuesto 77a y su correspondiente estructura.	60
Figura 30: Espectro 2D HMBC parcial, que muestra las principales correlaciones heteronucleares a 2JHC (flechas en azul) y 3JHC (flechas en rojo) del grupo bencilo (-OCH ₂ Ar) que muestran la conexión entre este sistema y el carbono C-22 para el compuesto 77a	61

Índice de Tablas

Tabla 1: Valores de afinidad entre el complejo receptor BRI1 y los análogos analizados por Docking Molecular.	37
Tabla 2: Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1 y cada uno de los análogos estudiados.	38
Tabla 3: Valores de afinidad entre el complejo receptor BRI1-BAK1 y los análogos analizados por Docking Molecular.....	38
Tabla 4: Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.....	39
Tabla 5: Actividad de análogos de BRs disueltos en DMSO mediante bioensayos in vitro de Inclínación de la lámina de arroz. Letras indican el nivel de significancia de acuerdo con Test de t-Student ($P<0,05$).	50
Tabla 6: Efecto de análogos de BRs en el bioensayo de elongación del segundo entrenudo del frijol a una concentración de 1×10^{-8} M. Letras indican el nivel de significancia de acuerdo con Test de t-Student ($P<0,05$).....	51

Nomenclatura

Abreviaturas y siglas síntesis química

• Ac ₂ O	:	Anhídrido acético.
• AcOEt	:	Acetato de etilo.
• AcOH	:	Ácido acético.
• anh.	:	Anhidro.
• BRs	:	Brasinoesteroides.
• CC	:	Cromatografía en columna.
• CCF	:	Cromatografía en capa fina.
• DCM	:	Diclorometano.
• DMAP	:	4-dimetil amino piridina.
• Et ₂ O	:	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.
• SEF	:	Segundo entrenudo de frijol.

Abreviaturas y siglas 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.
• ² J _{HC} y ³ J _{HC}	:	acoplamiento escalar heteronuclear a dos y tres enlaces, respectivamente.

- $^1J_{CF}, ^2J_{CF}, ^3J_{CF} \text{ y } ^4J_{CF}$: acoplamiento escalar heteronuclear a uno, dos, tres y cuatro enlaces, C-F respectivamente.
- DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
- HSQC ed. : Heteronuclear Single Quantum Correlation editado.
- HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Connectivities.
- NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy.
- 1D : Espectro mono-dimensional.
- 2D : Espectro bidimensional.
- *H : Asignación intercambiable con otro hidrógeno marcado con asterisco.
- *C : Asignación intercambiable con otro carbono marcado con asterisco.

Abreviaturas y siglas espectroscopia infrarrojo

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

Abreviaturas y siglas espectroscopia de masas

- EMAR : Espectrometría de Masas de Alta Resolución.
- $[M]^+$: Ion molecular.
- $[M+NH_4]^+$: Ion molecular + masa gas $NH_3 + 1$.

Abreviaturas y siglas acoplamiento molecular

- BRI1 : Brassinosteroid Intensitive- 1.
- BAK1 : Proteína destructora del antagonista homólogo bcl-2.
- PDB : Protein Data Bank.
- OPLS4 : Optimized Potentials for Liquid Simulations.

I. Introducción

El metabolismo y crecimiento de las plantas es un proceso complejo que involucra una variedad de señales y eventos fisiológicos, muchos de los cuales son controlados por hormonas vegetales o fitohormonas; la germinación, el crecimiento y la floración, siendo esenciales para el desarrollo y la supervivencia de las plantas [1]. Estas moléculas actúan a bajas concentraciones ($\sim 10^{-9}$ [M]) y entre ellas 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. Cada una de estas hormonas tiene un papel específico en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas [1].

Los brasinoesteroides (BRs) son polihidroxiesteroides de origen vegetal, una clase de fitohormonas que se caracterizan por promover el crecimiento y elongación de las células vegetales de las plantas, además de protegerlas contra el estrés abiótico y biótico. Esta capacidad de protección hace que los BRs sean un objetivo atractivo para su uso en la agricultura y la horticultura [2].

El uso de estas sustancias de forma sintética ha permitido el desarrollo de variedades, mayor producción y mejor calidad de frutos. Actualmente existen productos comerciales basados en hormonas vegetales, como el ácido indolacético y la giberelina, que son utilizados para estimular el crecimiento de las plantas y mejorar su rendimiento. Asimismo, los brasinoesteroides y sus análogos estructurales han ganado interés dentro de la investigación en la agricultura debido a su capacidad para estimular el crecimiento y la resistencia de las plantas a factores abióticos como el estrés hídrico y la salinidad del suelo [3].

El interés en la síntesis de brasinoesteroides comenzó en la década de 1980, cuando se logró aislar el primer brasinoesteroide, llamado Brasinólida, el cual demostró aceleración en el crecimiento de ciertos tipos de plantas. Desde entonces, se han logrado aislar más de 70 BRs y se ha desarrollado un gran interés en sus análogos estructurales para la aplicación en la agricultura [4].

Debido a que los BRs se encuentran en concentraciones demasiado bajas en las plantas como para que sea rentable su extracción, 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 [5,6]. 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 y una amplia gama de funcionalizaciones en su estructura, por lo que realizar una síntesis total no parece ser un método práctico de obtención de estas hormonas [7–9].

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 objetivo molecular a sintetizar y con funciones orgánicas en posiciones específicas que puedan ser modificables químicamente [5,6]. 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 y esteroides como la serie del androstano y pregnano, de los cuales destacan la pregnenolona y la androsterona y la pregnenolona, las cuales se encuentran de forma abundante debido a su uso en la producción de hormonas esteroideas farmacéuticas [5,6].

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 A y B 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. 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 [10–16].

Dentro de este contexto, se propone la síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides (Serie **78a-c**), diseñados por un estudio de acoplamiento molecular, con estructuras de ésteres de bencilos en la cadena lateral con sustituciones de flúor en el anillo aromático. Lo anterior con el objetivo de estudiar y validar la actividad reguladora del crecimiento vegetal, predicha por el Docking Molecular, además de una caracterización mediante técnicas espectroscópicas y de propiedades físicas de los compuestos obtenidos.

II. Objetivos

Hipótesis

Nuevos análogos de brasinoesteroides con estructuras de ésteres de bencilos en la cadena lateral con sustituciones de átomos de flúor en el anillo aromático, diseñados por estudio de acoplamiento molecular, tendrán actividad reguladora de crecimiento vegetal.

Objetivo general

Obtener nuevos análogos de brasinoesteroides sintéticos con modificaciones estructurales en la cadena lateral; evaluar y validar la actividad reguladora en el crecimiento vegetal predicha por estudios *in-silico* de Docking Molecular.

Objetivos específicos

1. Realizar estudios de acoplamiento molecular (Docking Molecular) de los nuevos análogos de brasinoesteroides propuestos (Serie **78a-c**).
2. Desarrollar una ruta sintética para la obtención de los nuevos análogos de brasinoesteroides potencialmente activos estudiados en el punto anterior.
3. Realizar la caracterización espectroscópica (espectro infrarrojo (IR), espectro de masa (EM) y espectro de resonancia magnética nuclear (RMN)) y punto de fusión de los nuevos análogos.
4. Evaluar la actividad biológica de los análogos de brasinoesteroides sintetizados mediante ensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA) y/o segundo entrenudo de frijol (SEF).
5. Validar el estudio de acoplamiento molecular mediante un estudio de la Relación-Estructura-Actividad de los análogos sintetizados.

III. Marco Teórico

i. Fitohormonas y Reguladores de crecimiento vegetal.

Las hormonas vegetales, similarmente a las hormonas animales, son producidas a nivel celular en zonas con mayor concentración que otras dependiendo del tipo de hormona, actuando de forma fisiológica a nivel local y a muy bajas concentraciones en comparación con otros nutrientes y vitaminas tanto en plantas como animales, alrededor de 1×10^{-9} a 1×10^{-6} M [1]. Se pueden producir análogos sintéticos que producen efectos fisiológicos similares a las fitohormonas naturales, cumpliendo el rol de reguladores del crecimiento vegetal.

Las etapas de crecimiento y desarrollo de la planta están estrechamente relacionadas y reguladas por las fitohormonas, influyendo en procesos como la diferenciación, metabolismo, morfogénesis y senescencia a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Al mismo tiempo tienen un rol importante en controlar las respuestas y/o reacciones a estímulos externos como factores medioambientales tanto bióticos como abióticos [17].

Gran parte del conocimiento actual sobre las fitohormonas y el funcionamiento que tienen en las plantas se deben a bioensayos realizados mediante su aplicación exógena, sintetizando el compuesto en estudio y observando su efecto en la especie al ser aplicado en distintas concentraciones [18]. Actualmente se han podido identificar variados tipos de hormonas vegetales, entre las que se encuentran el ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA), auxina, ácido jasmónico (JA), ácido salicílico, brasinoesteroides (BRs), citoquininas y etileno, como se observa en la Figura 1.

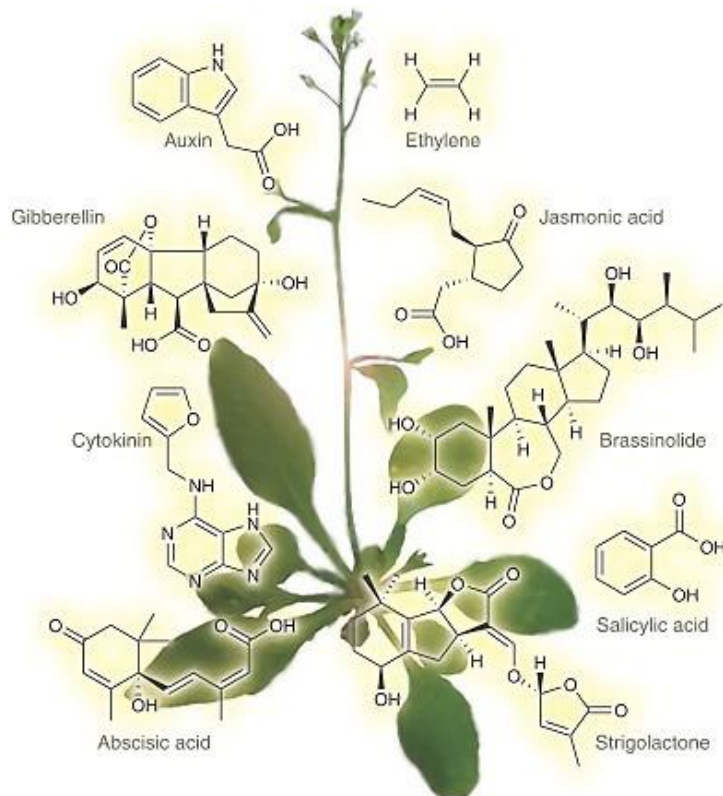


Figura 1: Fitohormonas reguladoras del desarrollo de las plantas [19].

Las funciones fisiológicas de las fitohormonas han sido estudiadas por varias décadas, pero aún no se logra un entendimiento total de sus mecanismos de biosíntesis, transporte y respuesta. Existen rutas biosintéticas bien caracterizada como es el caso de ABA, BR y GA, mientras que otras aún no se definen por completo como la auxina o JA [19].

Se ha identificado el rol de algunas fitohormonas [20], por ejemplo las auxinas influyen principalmente en procesos de floración, elongación de celdas y crecimiento de los meristemos (células indiferenciadas responsables del crecimiento permanente de las plantas); Las giberelinas participan en la germinación de semillas e inducen la formación de flores y frutos; Las citoquininas retardan la caída de la hoja y el envejecimiento e inducen la diferenciación celular y la formación de nuevos tejidos; El ácido abscísico es responsable del cierre de estomas cuando existe un déficit hídrico o bien inhibe el crecimiento vegetal en momentos de estrés tipo biótico, produciendo una especie de letargo; y por último, el etileno, facilita la maduración de los frutos, la degradación de la clorofila y la posterior caída de las hojas [19,20]

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 [21].

ii. Brasinoesteroides (BRs).

Los brasinoesteroides (BRs) son esteroides de origen vegetal que desempeñan un papel esencial en el desarrollo de las plantas. A nivel estructural, estos compuestos son similares a los esteroides presentes en animales e insectos. Las plantas tienen la capacidad de sintetizar una amplia variedad de esteroides, y se ha postulado su función en numerosas ocasiones. No obstante, no fue sino hasta 1979 cuando se descubrió la función hormonal de los BRs en las plantas. En ese año, se informó sobre la existencia de una lactona esteroideal llamada brasinólida, que fue extraída del polen de *Brassica Napus L.* [17]. Hasta la fecha, se han aislado más de 81 BRs de origen natural, incluidos 5 conjugados, y más de 137 análogos sintéticos, en la Figura 2 se presentan algunos esteroides naturales como el BRs [22].

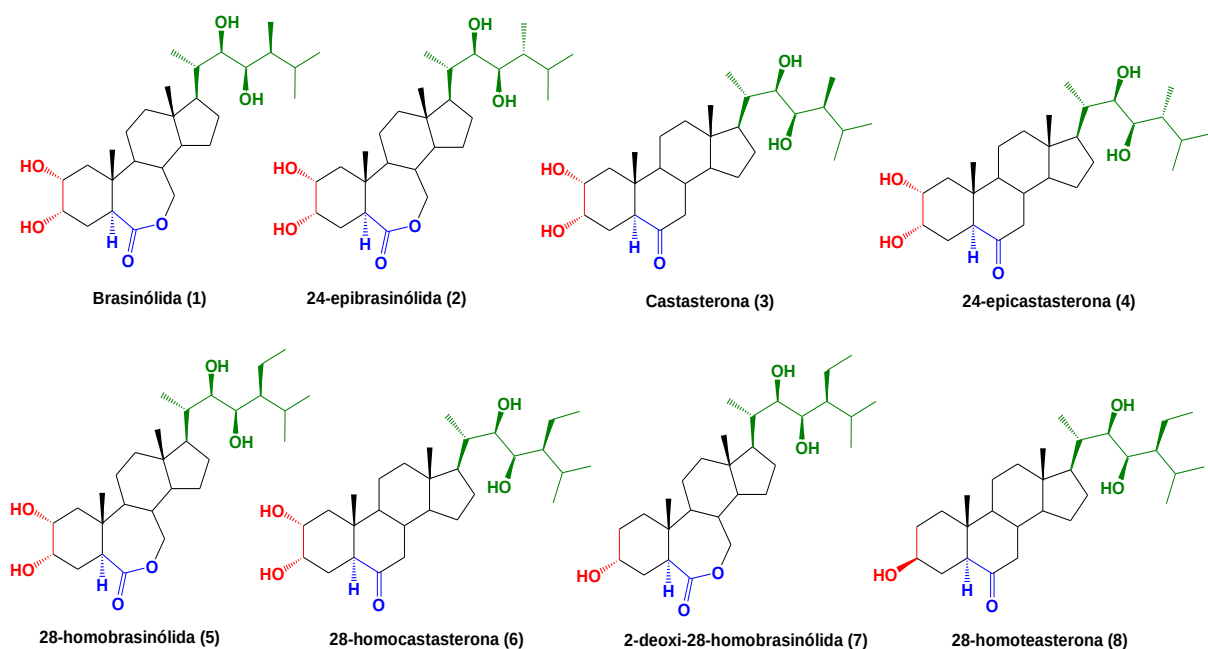


Figura 2: Estructura de brasinoesteroides naturales.

En un principio, las investigaciones se centraron en las propiedades fisiológicas de los BRs y su mecanismo de acción. Desde el comienzo de las investigaciones en Estados Unidos, se consideró a los BRs como compuestos prometedores debido a sus posibles aplicaciones en agricultura. Se observaron diferentes tipos de actividades regulatorias en el crecimiento y desarrollo de las plantas, y se predijo su valor económico como agentes para aumentar el rendimiento de los cultivos a principios del siglo XX [23].

La importancia de los BRs en el desarrollo de las plantas radica en su capacidad para regular una amplia gama de procesos fisiológicos. Estos compuestos están involucrados en la elongación celular, la diferenciación de tejidos, la división celular, la respuesta al estrés, la floración, la germinación de semillas y la maduración de frutas. Los BRs ejercen su función a través de receptores específicos en la membrana celular, lo que desencadena una cascada de eventos intracelulares que finalmente modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas [24].

Además de su rol fundamental en la biología vegetal, los BRs también han despertado un gran interés en la agricultura debido a su potencial para mejorar el rendimiento de los cultivos. Se ha observado que la aplicación de BRs puede aumentar la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés abiótico, como sequías, altas temperaturas y salinidad. Estos compuestos también pueden mejorar la calidad de los productos agrícolas al influir en la síntesis de compuestos secundarios, como flavonoides y fenoles [18].

Varias investigaciones han demostrado que los brasinoesteroides (BRs) generan una amplia gama de respuestas en las plantas. Estas respuestas incluyen la elongación de los tallos, el doblamiento de las hojas y la epinastia, la inducción de la biosíntesis de etileno y la activación de la bomba de protones. También se ha observado que los BRs promueven la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, regulan la asimilación de carbohidratos y su distribución, y activan la fotosíntesis [21].

Desde el punto de vista estructural, los BRs son derivados del esqueleto del 5α -colestano, y sus variaciones estructurales se deben al tipo y la posición de los grupos funcionales presentes en los anillos A/B y en la cadena lateral. Estas modificaciones son resultado de las reacciones de oxidación-reducción que ocurren durante la biosíntesis de estos compuestos. Los BRs que tienen funciones α -hidroxi, β -hidroxi o ceto en la posición C-3 en el anillo A son precursores de derivados $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxisados adyacentes. Aquellos con hidroxilos adyacentes $2\alpha,3\beta$ -, $2\beta,3\alpha$ -, o $2\beta,3\beta$ - pueden ser metabolitos de los $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxisados. En cuanto a los sustituyentes en el anillo B, los BRs se clasifican como 6-oxo (cetona) o 6-oxo-7-oxa (lactona). En la cadena lateral, los BRs tienen dioles vecinales orientados en los C-22 y C-23 [25,26]. En la Figura 3 Se presentan los sustituyentes y la configuración de los anillos posibles para los BRs.

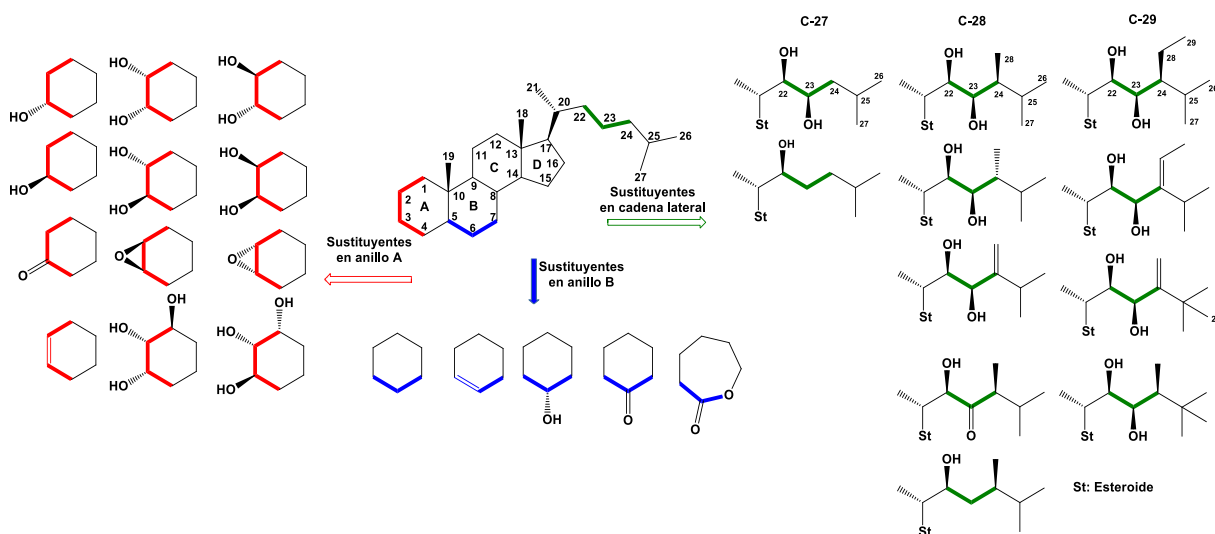


Figura 3: Sustituyentes en los anillos A y B, y en la cadena lateral de Brasinoesteroides naturales.

iii. Relación estructura-actividad de los BRs.

Debido a que los brasinoesteroides (BRs) tienen una alta actividad biológica en plantas a concentraciones muy bajas, se requiere utilizar bioensayos sensibles y específicos para medir esta actividad y distinguirla de la de otras hormonas endógenas. El ensayo del segundo entrenudo de frijol (SEF) fue el primer bioensayo utilizado para monitorear la actividad biológica de los BRs. Junto con el ensayo de inclinación de la lámina de arroz (ILA), estos son los métodos más utilizados para evaluar la actividad de los BRs [14]. Otros ensayos biológicos incluyen el primer entrenudo de frijol, del epicótilo en frijol mungo, el de enrollamiento de la hoja de trigo, bioensayos en tomate y rábano, y de crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* [27].

Diferentes grupos han adoptado el protocolo ILA utilizando diferentes cultivares de arroz, lo cual ha llevado a una variabilidad significativa en la sensibilidad de este método. Entre las 60 variedades de arroz existentes, se seleccionaron dos cultivares, Arborio J-1 y Nihonbare, como los más confiables en términos de resultados. El límite de detección para la el brasinólida en este método es inferior a 0,1 ng/planta, y se ha encontrado que la castasterona tiene aproximadamente una octava parte de la actividad de la brasinólida [26]. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de la aplicación del ensayo de ILA.

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 tener en sus anillos y cadena lateral, así como el tipo de fusión de los anillos A/B que poseen y que afecta la actividad de estos compuestos en el crecimiento de las plantas, se ha logrado encontrar ciertas generalizaciones sobre las características estructurales que un BR debe tener para mostrar una alta actividad biológica en el crecimiento vegetal [26].

Las características que se deben presentar para observar una alta actividad se pueden resumir en: la presencia de un grupo 2 α -hidroxilo o 2 α ,3 α -diol en el anillo A, funciones de 7-oxolactona o 6-oxo en el anillo B, y la fusión trans de los anillos A/B. En cuanto a la cadena lateral, se ha observado que el orden de actividad de los sustituyentes en el C-24 es CH₃ > C₂H₅ > H, y los compuestos con grupos 22R,23R-cis-dioles muestran una mayor respuesta que los isómeros 22S,23S [29]. La Figura 6 muestra un resumen de las funcionalizaciones más relevantes en términos de actividad biológica de estos compuestos.

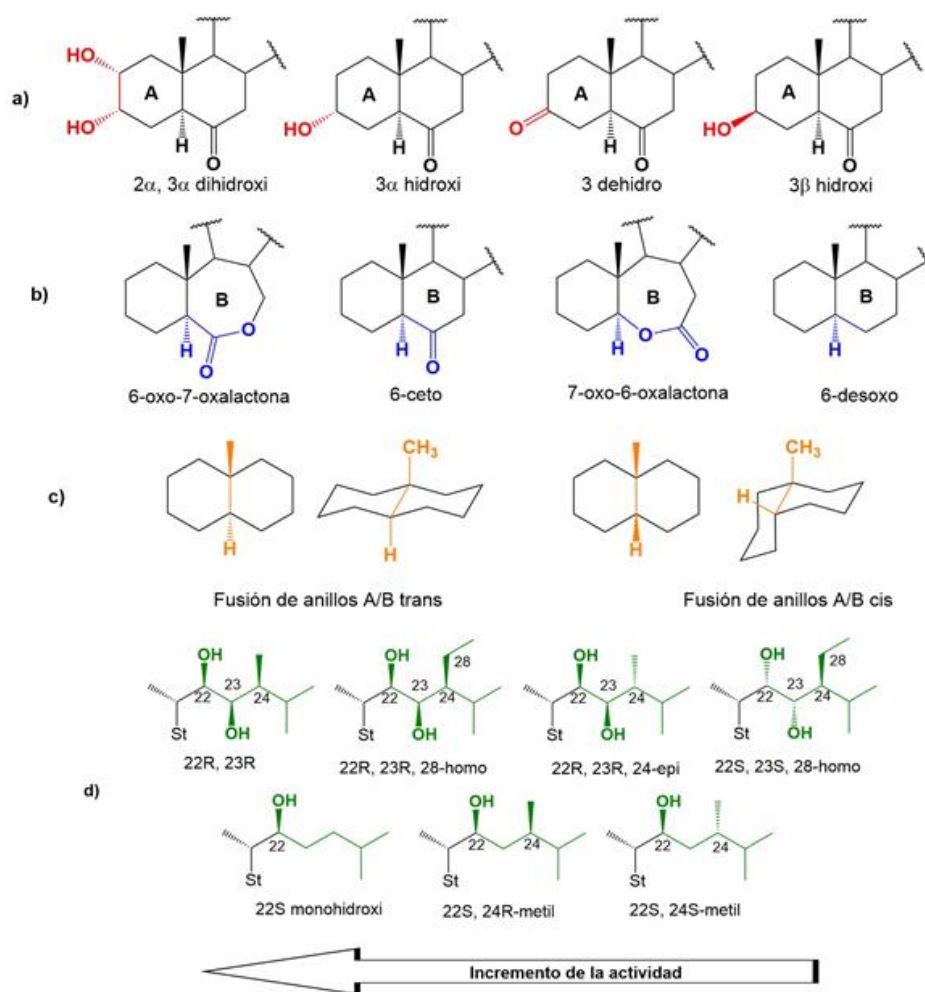


Figura 6: a) Relación Estructura-Actividad relativa en el anillo A. (b) efecto de la funcionalización relativa del anillo B en la actividad biológica. (c) Relación de las conformaciones espaciales del núcleo esteroidal del 5 α -colestano y 5 β -colestano con fusión [30].

La relación estructura-actividad de estos 4 puntos se describe con mayor detalle en las siguientes secciones.

iv. Relación estructura-actividad respecto a modificaciones en el anillo A.

Se realizaron estudios sobre la funcionalización del anillo A y su impacto en la actividad biológica de las plantas, centrándose en la serie de brasinoesteroides (BRs) 28-homo [31]. Se observó que al cambiar las posiciones de los grupos hidroxilos 2α , 3α a 2α , 3β en el 28-homobrasinólido, hubo una ligera disminución en la bioactividad en el ensayo ILA (*Oryza sativa* cultivar Arborio). Además, se encontró que el 28-homobrasinólido era diez veces más activo que sus derivados 2-desoxi-28-homobrasinólido y su epímero 3β . Por otro lado, el 28-homotifasterol mostró aproximadamente diez veces menos actividad que la 28-homocastasterona en el mismo ensayo, lo que indica que la sustitución en la posición 2α no es esencial para la actividad biológica de los BRs.

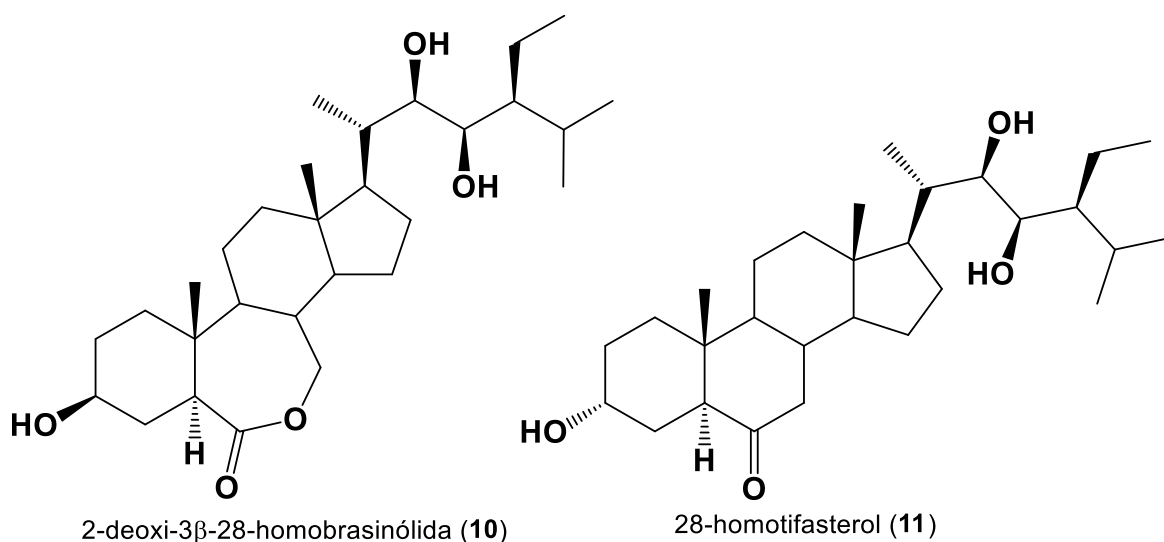


Figura 7: Estructuras de 2-deoxi-3β-28-homobrasinólida (10) y 28-homotifasterol (11).

Adicionalmente estos autores [31] informaron que 3-deshidro-2-desoxi-28-homobrasinólido (12) y 2,3-didesoxi-28-homobrasinólido (13) poseen el 5% de la actividad relativa de 28-homobrasinólido (5), mientras que la serie derivada de testosterona (14) y epitesterona (15) entrega una actividad relativa 10 y 100 veces menor para 3-deshidro-28-homotesterona (16) y 3-desoxi-28-homotesterona (17) respecto a 2,3-didesoxi-28-homobrasinólido (13).

Estos resultados sugieren que el grupo 7-oxalactona juega un rol más importante en la promoción de crecimiento de las plantas que el grupo 6-oxo. Adicionalmente se informó una disminución en la actividad relativa a través de la serie 28-homobrasinólida (5), 28-homocastasterona (6), 28-homotifasterol (11), y 28-homotesterona (8), en ILA utilizando *Oryza sativa* [32–38]. Los isómeros 3β , como 28-homotesterona (8) también son 10 veces menos activos que la 28-homobrasinólida (5) y 28-homocastasterona (6), respectivamente. 3-deshidrotesterona (18), secasterona (19) y 2,3-diepoxisecasterona (20) muestran, respectivamente, 74%, 59% y 89% de la actividad relativa de 24-epicastasterona (4) en el ensayo ILA [32–38] (Figura 8). Estos resultados indican que la posición 3α sería preferible a la 3β en términos de actividad biológica.

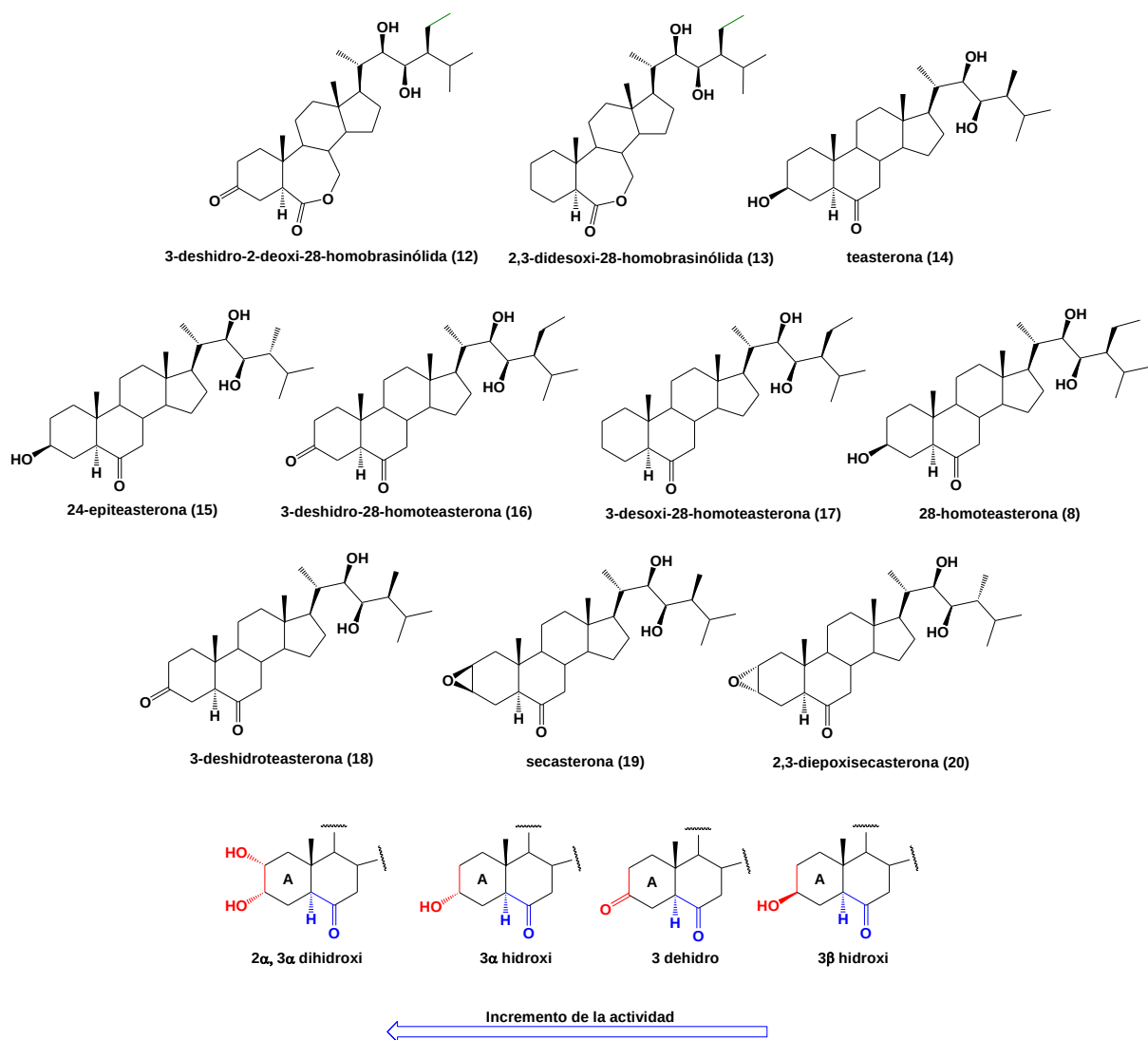


Figura 8: Estructuras de brasinoesteroides y análogos con diferentes funcionalidades en el anillo A.

Un interesante estudio fue desarrollado para evaluar el efecto en la actividad biológica de un conjunto de 2-desoxi-BRs naturales y análogos sintéticos de 28-homobrasinólida (5), 28-homocasterona (6), tiferol (21) y teasterona (14) (Figura 9), al incorporar el grupo 7-oxa y 6-oxa lactona en el anillo B, en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz. Desde estos experimentos, los autores encontraron que los compuestos 21, 14, 25, 26, 29 y 30 (Figura 9) mostraron actividades comparables entre ellos, donde resaltan una leve mayor actividad para los compuestos 25 y 26, mientras que el resto de los compuestos fueron menos activos. Se concluye que la introducción de la función lactona 7-oxa y/o 6-oxa, no mostró diferencias significativas en los valores observados para el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz [39]. Posteriormente se informó el aislamiento de los 2-desoxi-BRs naturales 33-36. Sin embargo, no se reportaron ensayos biológicos para estos compuestos [40].

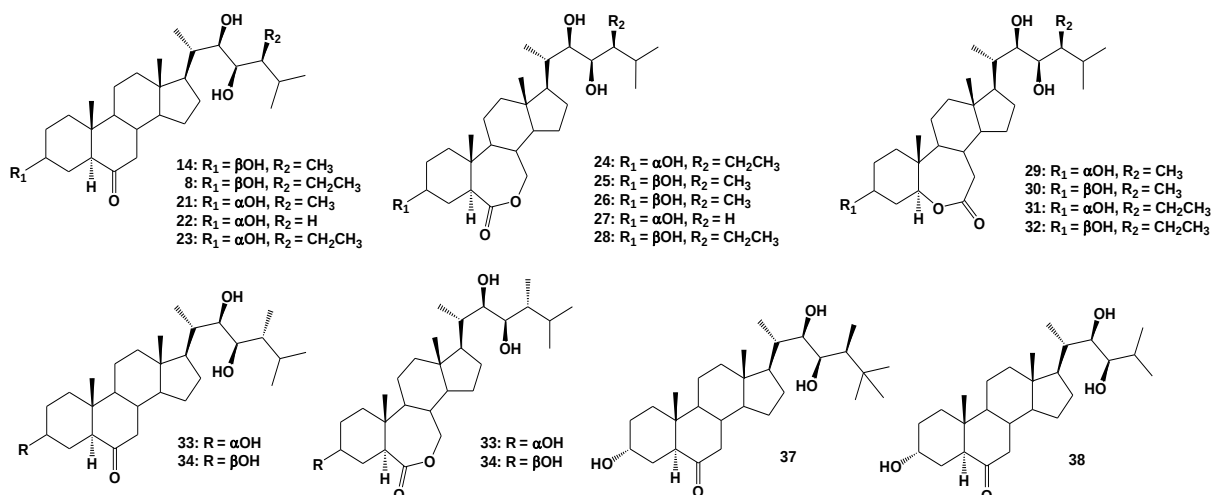


Figura 9: Estructuras de análogos sintéticos de 2-desoxi-BRs naturales obtenidos desde 28-homobrasinólido (5), 28-homocasterona (6), tifasterol (21) y teasterona (14).

Adicionalmente estos autores informaron que 3-deshidro-2-desoxi-28-homobrasinólida (12) y 2,3-didesoxi-28-homobrasinólida (13) poseen el 5% de la actividad relativa de 28-homobrasinólida (5), mientras que la serie derivada de testosterona (14) y 24-epitesterona (15) entrega una actividad relativa 10 y 100 veces menor para 3-deshidro-28-homotesterona (16) y 3-desoxi-28-homotesterona (17) respecto a 2,3-didesoxi-28-homobrasinólida (13). Estos resultados sugieren que el grupo 7-oxalactona juega un rol más importante en la promoción de crecimiento de las plantas que el grupo 6-oxo.

v. Relación estructura-actividad respecto a modificaciones en el anillo B.

Los brasinoesteroides que presentan una mayor actividad biológica son aquellos con función 6-oxo-7-oxalactona, seguidos en actividad relativa por los BRs con función 6-ceto. En la literatura se ha reportado que la ausencia de una función de oxígeno en las posiciones C6 - C7 en el anillo B afecta negativamente la actividad relativa de BRs, como es el caso de la 6-deoxocasterona que muestra sólo el 1% de la actividad relativa de la castasterona (3) [36], llegando a resultados en donde los BRs 6-desoxo son prácticamente inactivos [35]. Por otro lado, la transformación de la 6-oxo-7-oxalactona a 6-oxa-7-oxalactona reduce drásticamente su actividad relativa (Figura 10) [32–34,39].

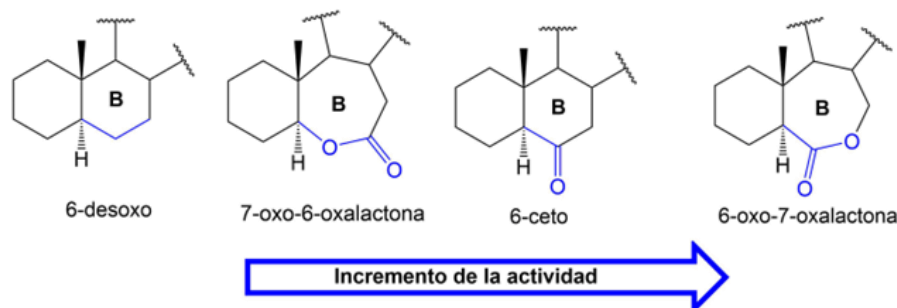


Figura 10: Efecto en la actividad biológica de grupos funcionales en el anillo B.

vi. Relación estructura-actividad respecto al tipo de fusión de los anillos A/B.

La estructura del núcleo esteroidal de BRs ha sido confirmada por cálculos de orbitales moleculares, experimentos de RMN y estudios de difracción de rayos X, los cuales también han revelado que en la serie 5α , los anillos A y B asumen una conformación “silla” (Figura 11). Este tipo de conformación ha sido también confirmada por el anillo B de 6-cetobrasinosteroide, mientras que en los 6-oxo-7-oxalactona el anillo B de 7 miembros tiende a inclinarse respecto al plano de los anillos adyacentes [28,29].

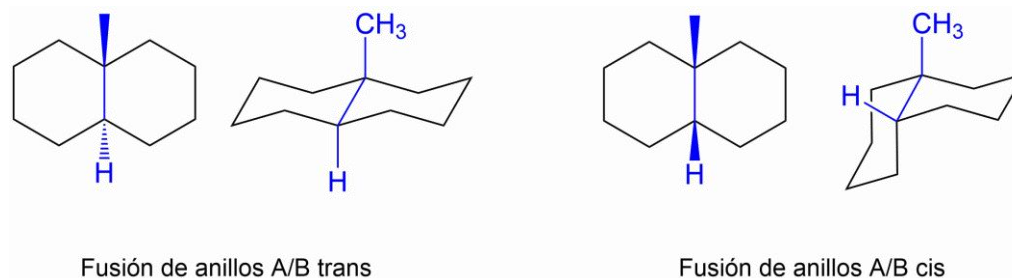


Figura 11: Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5α -colestano y 5β -colestano con fusión de los anillos A/B tipo trans (izquierda) y con fusión de los anillos A/B tipo cis (derecha).

En BRs de la serie 5β (fusión de anillos A/B cis), el anillo A también asume una conformación “silla”, pero se establece casi perpendicularmente al plano formado por los anillos B, C y D. Aunque BRs con una fusión de anillo cis (configuración 5β) aún no han sido aislados a partir de fuentes naturales, sólo se han sintetizado algunos análogos. La fusión cis de anillos A/B, junto con una función diol 2β , 3β son característicos en los ecdisteroides [41].

La transformación de brasinólida (de conformación nativa 5α) a 5β -brasinólida [42], mostró una pérdida casi completa de la actividad relativa, medida a través de ILA que indica que la fusión trans de anillos A/B es esencial para la actividad biológica [43].

vii. Relación estructura-actividad respecto a los grupos funcionales y longitud de la cadena lateral.

La diversificación de la cadena lateral y su importancia se reportó en el año 1980 con la síntesis de 22, 23 diepi-28-homobrasinólida (**39**) y su alta actividad biológica en ILA (*Oryza sativa* cultivar Kinmaze), la que obtuvo un ángulo de 120° , superando en 97° al control [44]. Los BRs 28-homobrasinólida (**5**) y 28-homocasterona (**6**) presentaron 100% y 87% de la actividad relativa comparada con el brasinólida (**1**) y castasterona (**3**) respectivamente, en el ensayo ILA (Figura 12) [45].

Distintas estructuras con cadena lateral corta han sido reportadas, obteniendo resultados en pruebas de actividad biológica similares a aquellas del 24-epibrasinólida (**2**) para algunos análogos [46,47]. Estas variantes no han sido particularmente estudiadas por lo que aún no es claro su relación con la actividad promotora del crecimiento.

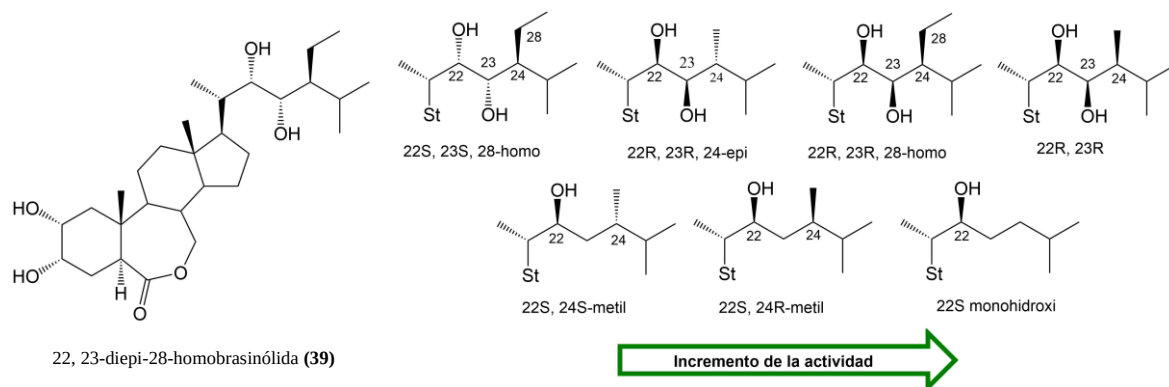


Figura 12: Estructura de 22,23-diepi-28-homobrasinólida (39) y efecto en la actividad biológica de los sustituyentes en la cadena lateral.

viii. Síntesis de brasinoesteroides y sus análogos.

Los brasinoesteroides (BRs) se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, abarcando algas, helechos, gimnospermas, angiospermas, monocotiledóneas, dicotiledóneas, entre otros. Estas hormonas vegetales han despertado el interés de especialistas en diversos campos como química, biología y agricultura debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal cuando se aplican en bajas concentraciones (20-50 mg/ha).

Sin embargo, dado que los BRs se encuentran en concentraciones muy bajas en las plantas, su extracción resulta costosa, lo que ha impulsado la necesidad de sintetizar análogos de BRs como una alternativa más económica para obtener tanto los BRs naturales como sus análogos semisintéticos [48].

La síntesis total de estos compuestos no parece ser un método práctico debido a la complejidad estructural de los BRs, que poseen entre 10 y 13 centros quirales, así como una amplia variedad de funcionalizaciones en su estructura. Para abordar este desafío, se ha optado por la síntesis semisintética, utilizando esteroides naturales abundantes como precursores [49].

Como se planteó anteriormente, los requerimientos estructurales que deben poseer los BRs para presentar actividad biológica se han establecido como:

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

Por lo que es preferible seleccionar precursores con características estereoquímicas similares al objetivo molecular que se desea sintetizar.

Los esteroides con un enlace doble Δ^{22} , como el estigmasterol (40) y el ergosterol (43), son los precursores más adecuados para la síntesis de análogos de BRs con C-29 y C-28, respectivamente. Sin embargo, muchos de los compuestos precursores con cadenas laterales largas son difíciles de encontrar o presentan cadenas laterales saturadas que dificultan su funcionalización. Otra opción es utilizar ácidos cólicos, como el ácido hiodeoxicólico (41), y esteroides derivados del androstano y pregnano.

Entre ellos, destacan la androsterona y la pregnenolona, que son abundantes debido a su uso en la producción de hormonas esteroideas farmacéuticas [48]. En la Figura 13 se presentan algunos de los esteroides más utilizados como precursores de análogos de BRs.

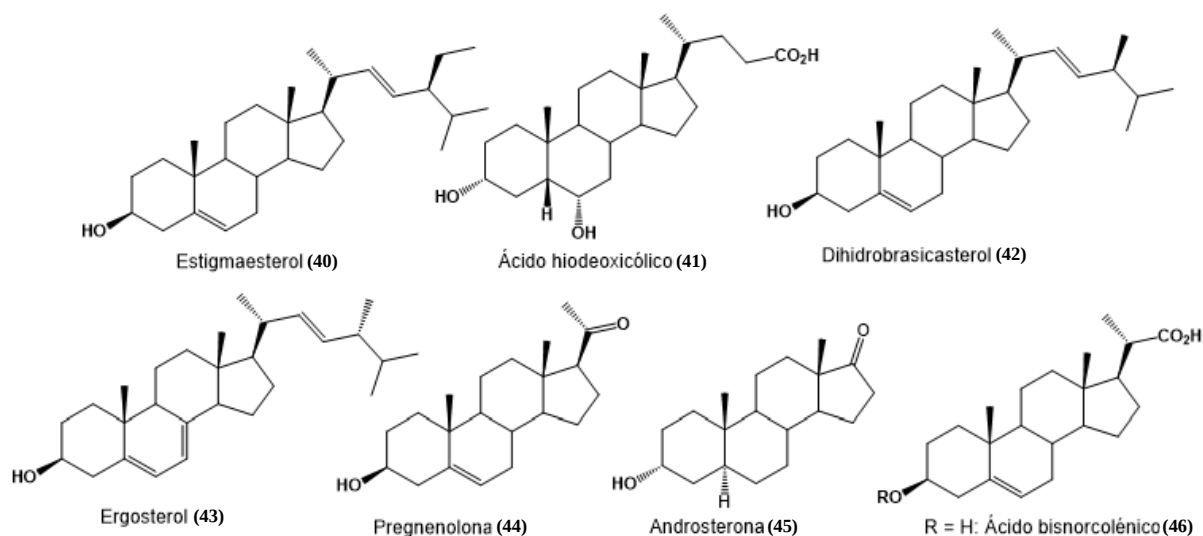


Figura 13: Precursores esteroideas naturales utilizados para la síntesis de brasinoesteroides naturales y sus análogos.

Para la síntesis de anillos A/B funcionalizados, se utilizan precursores como esteroides, pregnenolona (44), androstenolona (45), alcaloides esteroideales y sapogininas. Existe un gran número de investigaciones dedicadas a la síntesis a partir de estos compuestos, como la funcionalización $2\alpha,3\alpha$ -diol [7–9,31,41,42,50].

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 $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$ o ácido *m*-cloroperoxibenzóico [37,47,51]. En la reacción se forman dos regioisómeros (derivados 7-oxolactona y 6-oxolactona), y la proporción de estos productos depende de la naturaleza electrónica los sustituyentes en el anillo A [6,32].

La presencia de dos grupos hidroxilo en C-3 y C-6 en el ácido hildeoxicolico (41) lo presentan como un atractivo material precursor en la síntesis de análogos de BRs [10,44].

ix. Análogos sintéticos con modificación de la cadena lateral.

A través de múltiples investigaciones, se ha logrado identificar las características estructurales clave de los brasinoesteroides (BRs) necesarios para exhibir una alta actividad de crecimiento vegetal. Sin embargo, la funcionalidad de la cadena lateral aún no está completamente definida. En consecuencia, se han informado síntesis de numerosos análogos con modificaciones significativas en la cadena lateral, los cuales han demostrado cierto grado de actividad biológica[14,16,52]. En la Figura 14 se presentan algunos ejemplos de análogos de BRs con modificaciones notables en la cadena lateral.

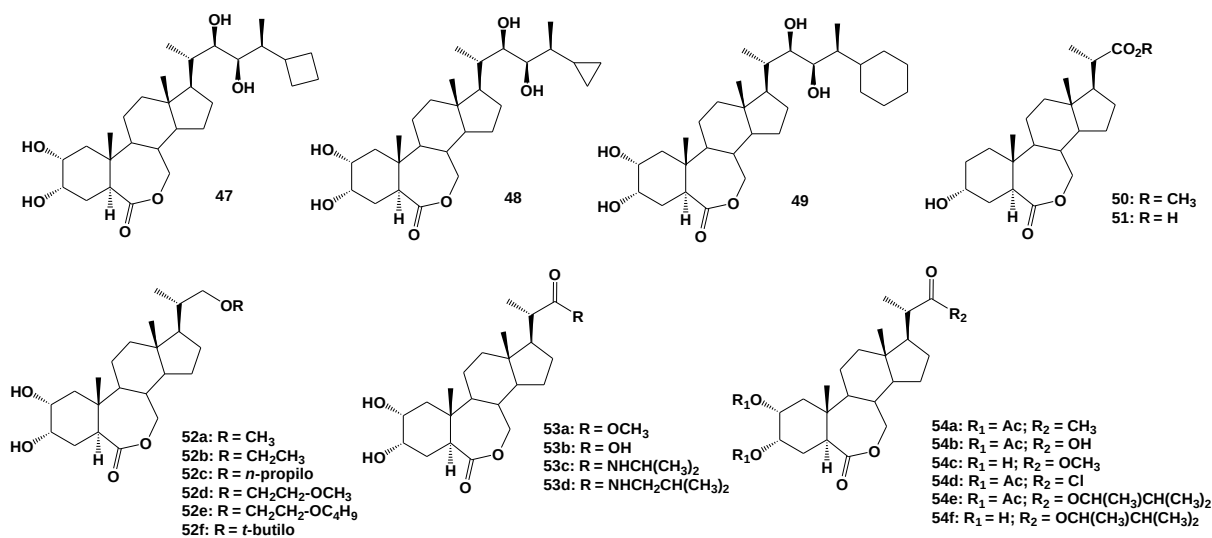


Figura 14: Estructuras de análogos de Brasiinoesteroides con importantes modificaciones en la cadena lateral y con cadenas laterales del tipo 23,24-norpregnanos, con funciones éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y amidas [30]

Respecto al tamaño de la cadena lateral, se han llevado a cabo estudios que indican las propiedades que favorecen la actividad biológica. Entre ellas se incluye la presencia de una función C-22 hidroxilada, C-23 hidroxilo o grupos aceptores de puentes de hidrógeno, aunque su contribución a la actividad biológica es menos relevante. Además, se ha observado que la introducción de grupos atractores de electrones (como halógenos) en la cadena lateral y la preferencia por las ramificaciones en lugar de la elongación de la cadena también influyen en la actividad biológica [16].

La actividad biológica de los brasiinoesteroides (BRs) de cadena corta se ha evaluado en estudios utilizando bioensayos en el segundo entrenudo de frijol, obteniendo resultados positivos, lo que sugiere la posibilidad de encontrar análogos de BRs más simples en términos estructurales sin comprometer la actividad biológica [30].

Resulta interesante explorar la posibilidad de incorporar sistemas aromáticos como sustituyentes en los análogos de BRs de cadena corta, conocidos como arilbrasiinoesteroides, ya sea heterocíclicos o sustituidos en la posición *orto*, *meta* y *para* del anillo aromático. Por ejemplo, en la Figura 15 se presentan los (22*R*,23*R*)-23-arilbrasiinoesteroides *p*-sustituidos, *m*-sustituidos y polisustituidos, los cuales contienen grupos atractores y donadores de electrones, como halógenos y alquílicos, respectivamente. Entre los arilbrasiinoesteroides halogenados, los análogos más activos fueron **62a**, **62c** y **62e**. Además, se determinó que, en general, la presencia de grupos voluminosos, como fenilo, *t*-butilo o metilo, disminuye la actividad biológica [52,53].

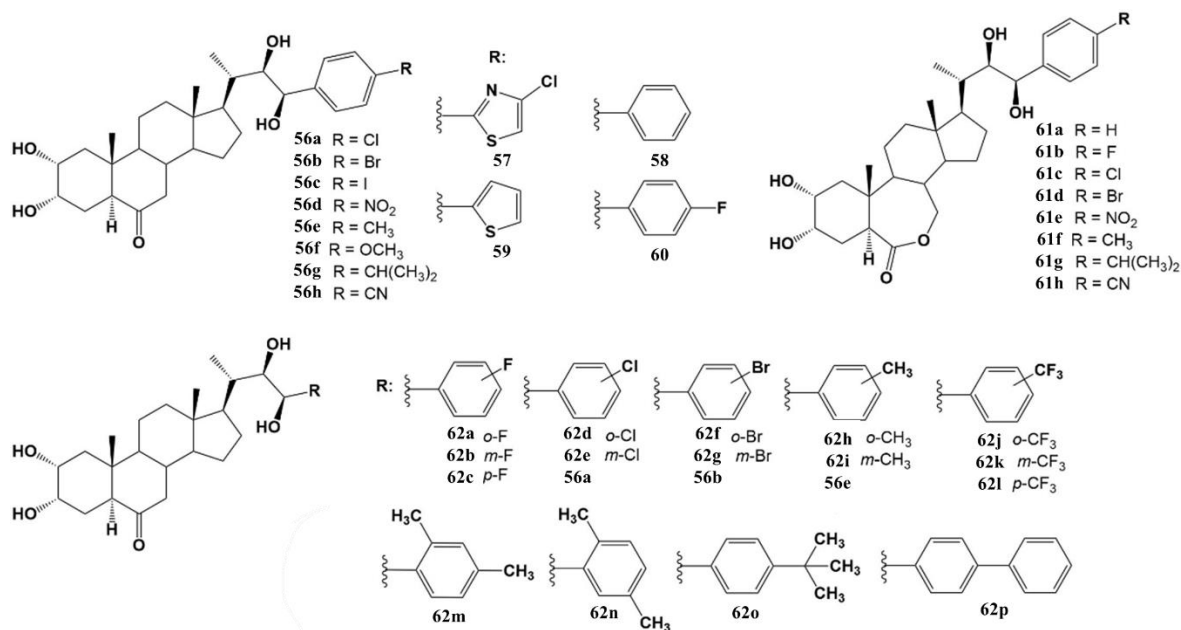


Figura 15: Estructuras de arilbrasinoesteroides [26].

Se ha reportado la síntesis y evaluación biológica de nuevos análogos de BRs del tipo 24-Nor colanos, con funciones benzoato en la posición C-23 de la cadena lateral (Figura 16) obtenidos a partir del ácido hiodesoxicólico (**41**) [14,28]. De esta forma, se evaluó la actividad biológica de los compuestos **63-68** (Figura 16) utilizando el Ensayo de Inclinación de Lámina de Arroz (ILA) y elongación de raíces en *Arabidopsis thaliana*.

En estos ensayos, los compuestos **63** y **64** mostraron una actividad biológica similar entre ellos, a concentraciones de 1×10^{-8} , 1×10^{-7} y 1×10^{-6} M, siendo el análogo **64** ligeramente más activo en ILA. Sin embargo, el compuesto **52** fue más activo que el brasinolido (**1**) en todas las concentraciones evaluadas. Mientras que el compuesto **65** fue considerablemente menos activo en el mismo ensayo, pero fue el más activo en el ensayo de *A. thaliana* [27].

Además, los resultados de un estudio de acoplamiento molecular (Docking molecular) para ILA sugieren que este comportamiento podría explicarse en términos de interacciones hidrofóbicas del ligando con el receptor BRI1-LRR y después de la formación del complejo BRI1-Ligando-BAK1 generando enlaces de hidrógeno del ligando con BAK1 [27].

Además, los compuestos **66** y **67** también se evaluaron en ILA, sin embargo, la mezcla de diastereoisómeros **66/67** (proporción 1:0/0,44) fue significativamente más activa que la brasinólida (**1**) a la concentración 1×10^{-8} M. Mientras que el análogo **68** (dibenzoato) fue mucho menos activo en las tres concentraciones evaluadas [28]. Sin embargo, se sabe que los análogos de brasinoesteroides con fusión de anillos A/B cis son menos activos que aquellos que contienen la fusión de anillos A/B trans [43].

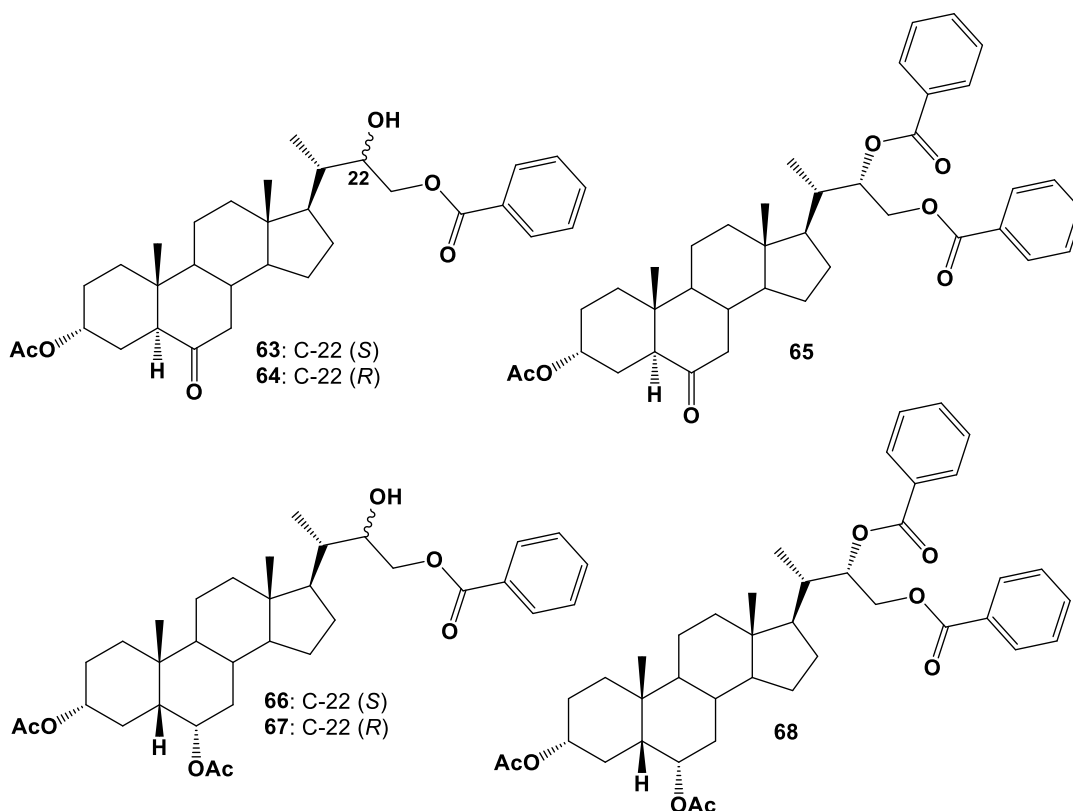


Figura 16: Análogos de brasinoesteroides del tipo 24-Nor colanos, con funciones benzoato en la posición C-23 de la cadena lateral.

x. Estudios in silico de acoplamiento molecular (Molecular Docking).

Variados estudios, sumados a aproximaciones bioquímicas recientes han logrado desentrañar varios aspectos de la señalización de BRs, 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 [54].

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 [13,55].

La obtención de la estructura cristalina del receptor BRI1 tanto en su forma libre como unido a brasinólida (**1**) mediante cristalografía de rayos X [56,57], ha permitido generar la estructura terciaria de BRI1, elucidar que región y aminoácidos forman el sitio de unión de BRI1 y como interactúan con regiones específicas de la brasinólida (**1**) (Figura 17), además, demostrar que la unión de brasinólida (**1**) facilita cambios conformacionales que permiten la asociación con BAK1 [56–58].

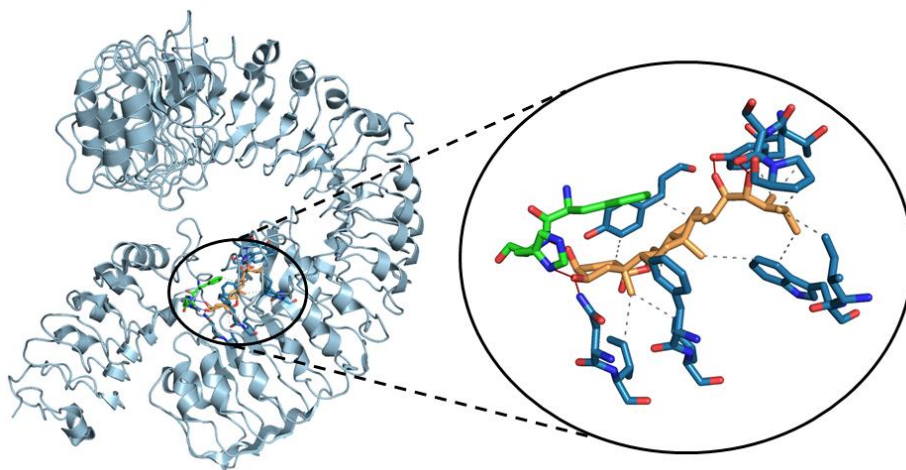


Figura 17: Complejo BRI1-BAK1 co-cristalizado con brasinólida (Código PDB: 4M7E).

La estructura del dominio de la unión ligando-receptor tiene forma de superhélice (Figura 18) 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 [57]. 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 [13].

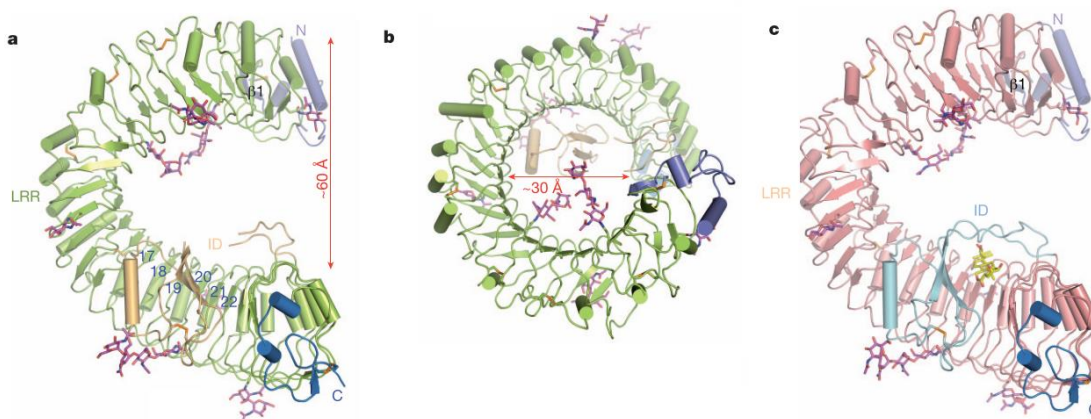


Figura 18: Vista lateral del receptor BRI1 sin unirse a la al brasinólida (**1**) en azul se muestra el extremo *N*-terminal y *C*-terminal y en amarillo se muestra el dominio isla B. Vista superior del receptor BRI1 sin unirse a brasinólida (**1**). C. Interacción del dominio d del dominio de inserción con la superficie cóncava [57].

Un monómero de BRI1 se une a una molécula de brasinólida (**1**) en un bolsillo hidrofóbico situado entre el dominio de unión y el lado cóncavo. Tanto el dominio isla como parte de las repeticiones de leucina retorcidas (LRRs) de la superhélice contribuyen a la formación del sitio de unión. La interacción entre brasinólida (**1**) y el sitio de unión puede ser analizada en diferentes partes de la molécula.

El anillo A tiene una participación leve en la interacción, mientras que el anillo B interactúa de manera hidrofóbica con el aminoácido apolar Tyr642. El átomo de oxígeno del carbonilo en C-6 actúa como aceptor de puente de hidrógeno con una molécula de agua, que también forma un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de Tyr599. Los anillos C y D se intercalan entre dos aminoácidos apolares, Phe681 y Tyr599.

Los grupos metilo en C-18 y C-19 se acoplan a dos cavidades en la parte inferior del bolsillo de unión, mientras que la parte opuesta de estos dos grupos metilo se orienta hacia el entorno del solvente. La cadena lateral alquílica encaja en un bolsillo hidrofóbico de tamaño pequeño, que no permite la presencia de grupos voluminosos. Este bolsillo está formado por residuos de aminoácidos apolares como Ile563, Trp564, Met657 y Phe658. Los átomos de carbono desde C-24 hasta C-28 se encuentran completamente enterrados en el surco hidrofóbico.

La función cis-diol en C-22 y C-23 es expuesta al solvente, y el grupo hidroxilo en C-23 forma un puente de hidrógeno con Ser647. La función cis- α -diol en C-2 y C-3 también es expuesta al solvente. La parte de la molécula de brasinólida (**1**) que está expuesta al solvente desempeña un papel importante en la interacción con el co-receptor BAK1, como se muestra en la parte inferior izquierda de la Figura 17.

Respecto a estudios de Docking Molecular en arilbrasinoesteroides, 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, obteniendo una correlación directa entre la afinidad predicha por los estudios de Docking molecular y los resultados de actividad biológica observados en las pruebas realizadas (bioensayo de inhibición del guisante y la prueba de sensibilidad de la raíz de *Arabidopsis*) [53].

En otro estudio realizado por Kvasnica et al., se sintetizaron diez derivados monohidroxilados del ácido 3 β -acetil-23,24-bisnor-5-cólenico (**69**), los cuales fueron evaluados en el ensayo del Segundo Entrenado del Frijol (SEF) utilizando 24-epibrasinólida (**2**) como control positivo, y luego se realizó el estudio de acoplamiento molecular (docking) de todos los compuestos evaluados [13,52]. Los análogos de BRs monohidroxilados fueron débilmente activos en el bioensayo del Segundo Entrenado de Frijol (SEF), solamente la mejor actividad observada fue de 17,1 mm, donde se aplicó una cantidad de 10^{-10} mol por planta.

Dentro de estos estudios de Docking Molecular, es posible asociar un valor de medida de la afinidad de los ligandos con el sitio activo, conocido como Docking Score, permitiendo relacionar las estructuras de los análogos con su potencial efecto biológico. De esta forma se puede conocer, de forma preliminar, qué compuestos de toda la serie son más llamativos de estudiar y por ende sintetizar, lo que ayuda a optimizar recursos y tiempo al no considerar los compuestos de la serie con baja afinidad/actividad potencial, estimando la energía liberada al formarse los complejos ligando-BRI1 (receptor libre) y ligando-BRI1-BAK1(receptor BRI1 unido a su correceptor) [49,59].

A raíz de la información presentada en este marco teórico, y considerando las diversidades estructurales de los análogos de brasinoesteroides y sus efectos en la actividad biológica de crecimiento vegetal, se propone la síntesis de nuevos análogos de BRs, que contengan las siguientes características estructurales:

- Cadena lateral del tipo 23,24-bisnorcolánicos, con grupo benzoato en C-23.
- Función 2 α ,3 α , glicol en el anillo A.
- Fusión de anillos A/B del tipo trans.
- Función cetona en el anillo B.

Estos nuevos análogos serán preparados desde ácido 3 β -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**69**). Adicionalmente, serán evaluados en el ensayo de Inclínación de la Lámina de Arroz (ILA) y en el ensayo del Segundo Entrenado de Frijol (SEF). Adicionalmente, los resultados serán analizados por estudios *in-silico* de Docking molecular, a modo de establecer una Relación-Estructura-Actividad con el fin de validar dicho estudio con los resultados obtenidos de los ensayos biológicos. Se propone la síntesis de los análogos **78a-c**, determinados de forma preliminar por un estudio *in-silico* de acoplamiento molecular (Molecular Docking) para una serie más amplia de análogos, siendo los que presentan resultados más prometedores en cuanto a Docking Score. En la Figura 19 se presenta la serie de análogos que se obtendrán a partir de ácido 3 β -acetoxi, 23, 24-bisnorcolénico (**69**).

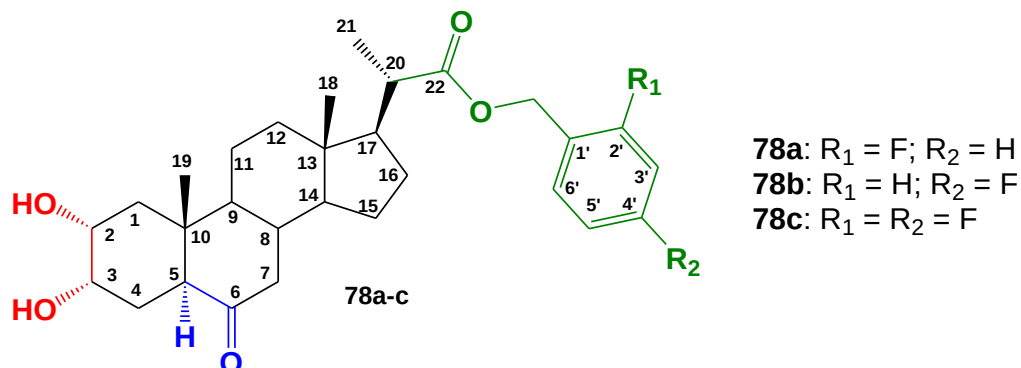


Figura 19: Nuevos análogos de brasinoesteroides propuestos para la semi-síntesis.

IV. Metodología

i. Metodología síntesis químicas

Se utilizará el ácido 3 β -acetil-23, 24-bisnor-5-cólenico (**69**) 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 de la serie **78a-c**.

En una primera etapa se procederá a la obtención de intermedio avanzado **76**, desde ácido 3 β -acetil-23,24-bisnor-5-cólenico (**69**), siguiendo la ruta de síntesis indicada en el Figura 20, la cual se resume a continuación: Tratamiento de **69** por esterificación con CH₂N₂, producirá el derivado esterificado **70** [60]. Saponificación selectiva del grupo acetato en C-3 con el sistema KHCO₃/MeOH/H₂O bajo reflujo permitirá la obtención del derivado **71** [60]. Posteriormente el grupo hidroxilo en posición C-3 β , se tosilará con *p*-TsCl/piridina/DMAP/CH₂Cl₂, lo que permitirá la obtención del derivado **72** [60]. 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 [60,61]; la cual consiste en realizar una reacción de solvólisis del tosionato **72** 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 **73** [60–62]. 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 [60,63], obteniéndose el intermediario **74**, cuyo anillo de ciclopropano será abierto mediante el tratamiento con Bromuro de Litio (LiBr) en *N,N*-dimetilacetamida en presencia de tosionato de piridinio bajo condiciones de reflujo para formar el alqueno **75** [60] (Figura 20). La función carboxilato de metilo se transforma en ácido carboxílico mediante una saponificación en un sistema KOH/MeOH/H₂O bajo reflujo, obteniendo el ácido **76** [14].

Con el intermediario avanzado **76** se sintetizará la serie **77a-c** disolviéndolo en MeOH, agua y DMF, agregando Cs₂CO₃ junto con el bromuro de bencilo correspondiente al compuesto a sintetizar de la serie; el alqueno obtenido será purificado en columna usando SiO₂ con una mezcla de Hexano / AcOEt / MeOH como eluyente [64]. Finalmente, se someten los alquenos obtenidos a una reacción de dihidroxilación de Sharpless, obteniendo la serie **78a-c**; los dioles obtenidos serán purificados en columna usando SiO₂ con una mezcla de Hexano / AcOEt / MeOH como eluyente [52]. Adicionalmente, se realiza la misma reacción de dihidroxilación de Sharpless al compuesto **75**, obteniendo el diol **75'**, de esta forma se puede comparar el efecto de las sustituciones en la cadena lateral de la serie **78a-c** respecto a **75'** en los estudios de docking molecular y evaluaciones biológicas.

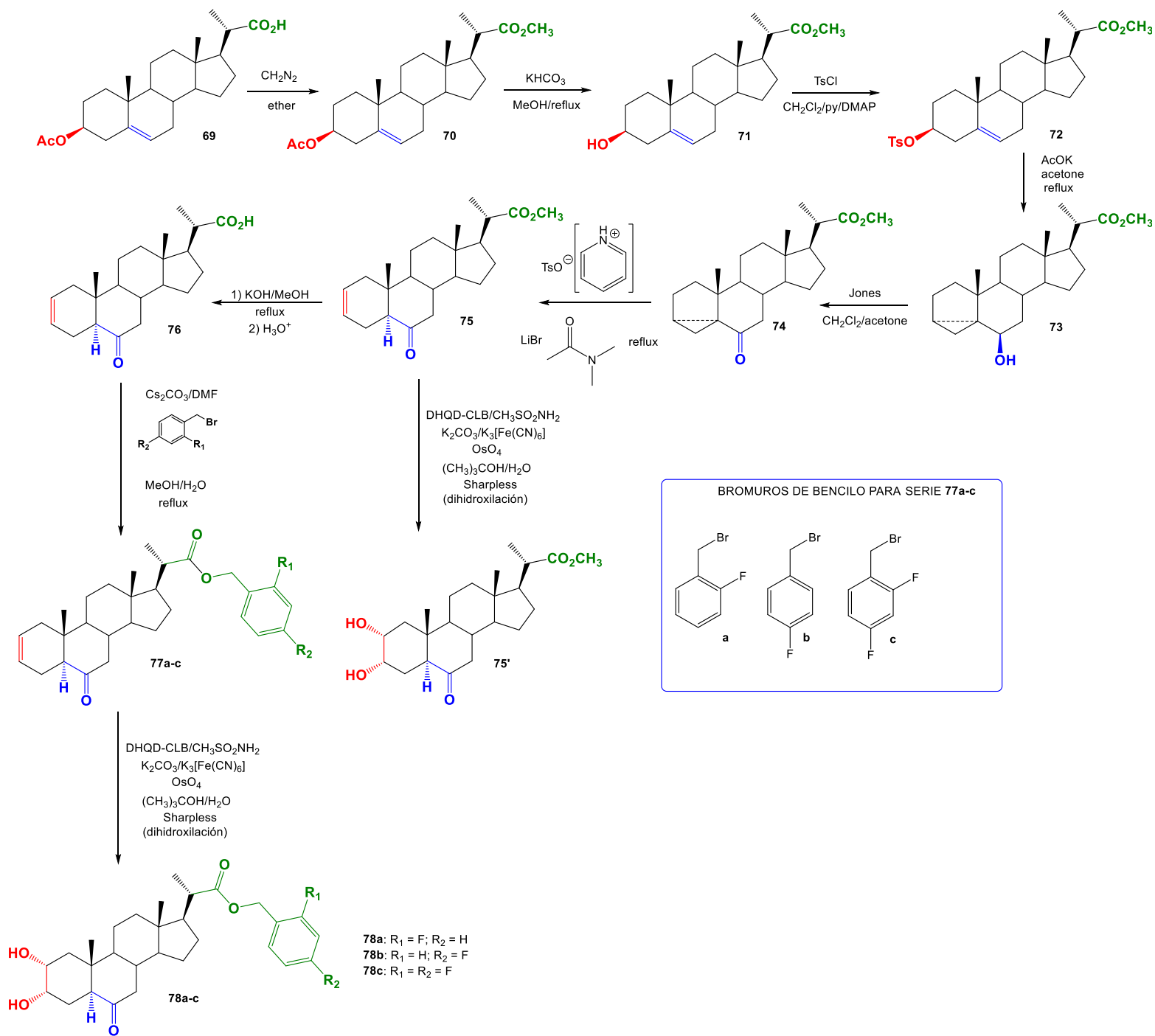


Figura 20: Ruta de síntesis para la obtención de la serie **78a-c**, desde ácido 3β-acetoxy-23,24-bisnor-5-colénico (**69**).

ii. Métodos de caracterización

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°C/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.

iii. Metodología evaluaciones biológicas

El estudio de los efectos de los nuevos análogos de brasinoesteroides sobre el crecimiento de plantas serán realizados con la colaboración de la Dra. Katy Díaz Peralta, en el laboratorio de pruebas biológicas perteneciente al Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

a) Ensayo de inclinación de lámina de arroz (ILA)

Para determinar la actividad sobre la elongación de la lámina de arroz de los análogos de BRs se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa*) variedad Zafiro facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-La Platina. Las semillas se lavarán y se dejarán en remojo con agua destilada estéril durante 24 horas, luego se sembrarán en sustrato/perlita/vermiculita (3:1:1).

Una vez que las plantas alcancen el tamaño ideal para obtener el segundo entrenudo de la lámina, se cortarán los segmentos de la hoja, que consiste en la segunda lámina foliar (5 cm de largo) y la segunda lámina conjunta y la vaina (4 cm de largo), estos segmentos se incubarán en 60 mL de agua destilada estéril y se probarán a distintas concentraciones de brasinólida (1) y análogos de BRs (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) y control negativo solo llevará agua.

Después de incubar durante 48 horas a 25°C en oscuridad, la magnitud de la apertura del ángulo se medirá entre la hoja y la vaina [27,65]. (Versión modificada de Wada et al., 1984 [66]). El control positivo utilizado será brasinólida (**1**) (APE*BIO®). Los resultados fueron expresados como el promedio del tratamiento $\pm$ la desviación estándar. Para la significación estadística se utiliza la prueba t de Student. Se obtuvieron datos de n=6-12 repeticiones.

b) Ensayo del segundo entrenado de 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 y solución de Hoagland modificada (a concentración media y pH = 5,7). Las macetas se pondrán en una 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, a una concentración de los compuestos de 10⁻⁸ M, los cuales serán evaluados en 2 μ l de lanolina. Las plantas de control se tratarán solo con lanolina. 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 [60].

Al igual que para el ensayo de ILA, los resultados fueron expresados como el promedio del tratamiento $\pm$ la desviación estándar, utilizando para la significación estadística la prueba t de Student, considerando datos de n=6-12 repeticiones.

iv. Metodología de estudios *in-silico* de relación estructura-actividad (Docking molecular).

Para definir preliminarmente cuales análogos de la serie serán los que presentan mayor afinidad de unión en el sitio activo de la proteína receptora, se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular de la activación inducida por brasinólida (**1**) sobre la estructura cristalina del complejo BRI1-BAK1 (PDB 4M7E) utilizando el software Maestro Schrodinger 13.1.

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. 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 en ChemDraw 2D y 3D, los que luego se 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. Docking score se utiliza para como parámetro comparativo para estimar la afinidad de unión y clasificar los ligandos [67,68].

Se estudiará una serie de análogos con diferentes sustituyentes, y serán comparados con la brasinólida (**1**) junto a él análogo **75'**, en el bolsillo hidrofóbico de la superficie de unión a brasinólida (**1**) ya cristalizado en la proteína PBD para determinar el patrón de unión probable, las interacciones clave dentro del sitio activo, así como la aproximación de la energía libre de unión de cada uno de ellos.

Para validar el procedimiento de acoplamiento, se retiró manualmente el ligando cristalizado y se volvió a acoplar en el sitio activo utilizando el mismo protocolo, incluidos los parámetros de cuadrícula que no se modificaron en el proceso. Esto se hizo para asegurar que el ligando se une exactamente a la hendidura del sitio activo. A continuación, el complejo reacomodado se superpuso al co-cristalizado de referencia y se calculó la desviación cuadrática media (RMSD). El RMSD del ligando indica que tan estable es el ligando respecto a la proteína y su bolsillo de unión, por lo que se seleccionó como criterio para evaluar la estabilidad de los sistemas unidos al ligando que este no supere el valor de 2 Å para asegurar una unión en el sitio activo similar al ligando cristalizado. A continuación, se llevó a cabo una agrupación de poses a partir del docking basándose en los valores de RMSD y los valores de docking score de cada una de las poses obtenidas.

v. Materiales y equipos para la síntesis orgánica

a) 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 sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4).

- Acetato de etilo, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, Merck (EMSURE) (destilación a 77° C).
- Acetona, Sigma-Aldrich
- Benceno, C_6H_6 , Merck, (EMSURE).
- Cloroformo deuterado 99,96 atom % D, CDCl_3 , Sigma-Aldrich.
- Cloroformo, CHCl_3 , Merck (EMSURE).
- Diclorometano, CH_2Cl_2 , Merck (EMSURE) (destilación a 40° C).
- 1,4-Dioxano, ACS reagent, $\geq 99.0\%$, Merck.
- Éter dietílico, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$, Merck (EMSURE).
- Éter de petróleo, MTEDIA.
- Hexano, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, Merck (EMSURE) (destilación entre 60° a 80° C).
- Metanol, CH_3OH , Merck (EMSURE).
- Metanol deuterado 99,8 atom % D, CD_3OD , Sigma-Aldrich.

b) Insumos

- Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 , Merck.
- Cloruro de sodio, NaCl , Merck (EMSURE).
- Cromatoplasmas de sílicagel 60 F254 Merck.
- Papel filtro 125 mm, Filtros Anolia S. A.
- Papel pH, Prolabo.
- Sílicagel para cromatografía en columna (0,040-0,063 mm), MERCK.
- Sílicagel 60 para cromatografía en columna (0,063-0,200mm) Merck.
- Sulfato de magnesio anhidro, MgSO_4 , Merck (EMSURE).
- Sulfato de sodio anhidro, Na_2SO_4 , (Merck)

c) Reactivos

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

d) Cromatografía de capa fina (TLC)

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

e) 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. Para compuestos considerablemente polares, se añade una fracción de metanol al eluyente de la columna.

vi. Materiales y equipos de pruebas biológicas

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 APE BIO, Boston , MA, USA.
- Los fungibles principales fueron materiales de plásticos como placas petri, tubos eppendorf y falcón y puntas de micropipeta P10, P200, P1000 y P5000.
- Los materiales utilizados para llevar a cabo la siembra de las plantas fueron sustrato, perlita, vermiculita, macetas y bandejas.

Los equipos utilizados fueron:

- Cámara de crecimiento de plantas, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo.
- Gabinete de bioseguridad Tipo II NUARE®.
- 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.

V. Resultados

i. Estudios *in-silico* de Docking Molecular

Los resultados de afinidad de unión entre el ligando y el receptor se presentan en las Tablas 1 y 3, para el receptor BRI1 y el complejo BRI1-BAK1 respectivamente. Se plantean estos dos casos de receptores ya que interesa conocer la afinidad inicial de unión entre el ligando y BRI1, siendo este el primer proceso de unión que ocurre para luego unirse a la coproteína BAK1. Las interacciones intermoleculares entre los aminoácidos del sitio activo del complejo receptor-correceptor y cada uno de los ligandos se presentan en las Tablas 2 y 4, para el receptor BRI1 y BRI1-BAK1 respectivamente.

En el Anexo 1 se presentan imágenes 3D de cada ligando en el sitio activo en el receptor BRI1 y el complejo BRI1-BAK1. Adicionalmente, en el Anexo 2 se presentan imágenes 2D de las interacciones entre los aminoácidos del sitio activo y cada ligando para los receptores BRI1 y BRI-BAK1.

Tabla 1: Valores de afinidad entre el complejo receptor BRI1 y los análogos analizados por Docking Molecular.

Ligandos	Energía mín. BRI1-Ligando (kcal/mol)	RMSD (Å)
1	-12,525	0,924
78a	-10,596	0,744
78b	-10,583	0,709
78c	-9,485	0,690
75'	-8,222	0,864

Tabla 2: Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1 y cada uno de los análogos estudiados.

Ligandos	Interacciones de carácter hidrofílico (Puentes de Hidrógeno)	Interacciones de carácter hidrofóbico (Fuerzas de London)
1	ASN705, SER647	ILE706, ILE682, PHE681, PRO648, ILE592, ILE540, ALA539, TRP564, ILE563, LEU615, TYR642, TYR599, TYR597, PHE658, MET657
78a	ASN705, SER647, TYR597	VAL62, ILE706, PHE60, ILE682, PHE681, PRO648, MET657, TYR642, TYR599, TYR597, LEU615, ILE540, ILE592, TRP564, ILE563
78b	ASN705, SER647	ILE706, ILE682, PHE681, PHE60, MET657, PRO648, LEU615, TYR642, TYR599, TYR597, TRP564, ILE563, ALA539, ILE540, ILE592
78c	ASN705, SER647	VAL62, ILE706, PHE60, ILE682, PHE681, PRO648, MET657, ILE592, TYR642, TYR599, TYR597, LEU615, TRP564, ILE563, ILE540, ALA539
75'	ASN705, SER647	ILE706, ILE682, PHE681, MET657, PHE658, TRP564, ILE563, ILE592, ILE540, TYR599, TYR597, TYR642, LEU615, PRO648

Tabla 3: Valores de afinidad entre el complejo receptor BRI1-BAK1 y los análogos analizados por Docking Molecular.

Ligandos	Energía mín. BRI1/BAK1-Ligando (kcal/mol)	RMSD (Å)
1	-14,719	0,980
78a	-15,618	0,643
78b	-13,891	0,500
78c	-13,847	0,449
75'	-13,637	0,788

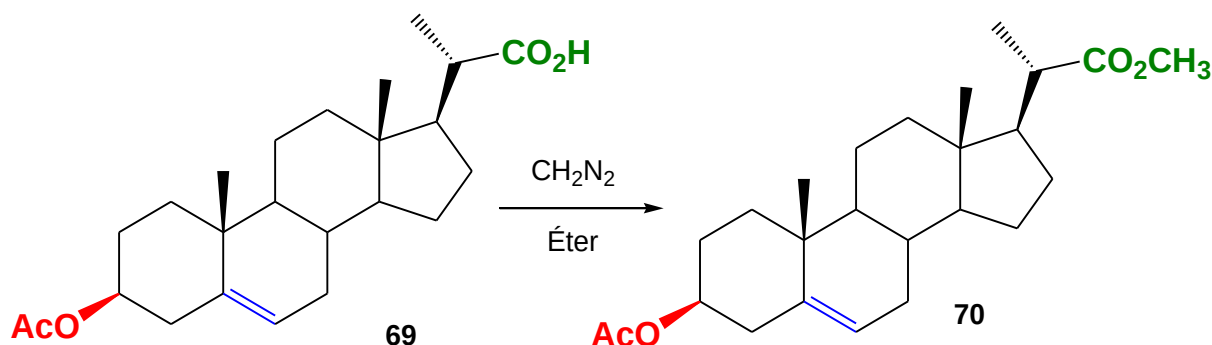
Tabla 4: Interacciones intermoleculares entre el sitio activo del complejo receptor-correceptor BRI1-BAK1 y cada uno de los análogos estudiados.

Ligandos	Interacciones de carácter hidrofílico (Puentes de Hidrógeno)	Interacciones de carácter hidrofóbico (Fuerzas de London)
1	HIS61, ASN705, SER647	VAL62, ILE706, PHE60, TRP59, ILE682, PHE681, PHE658, MET657, LEU615, ILE563, TRP654, ILE540, ILE592, PRO648, TYR642, TYR599, TYR597
78a	HIS61, ASN705	VAL62, PHE60, TRP59, ILE706, ILE682, PHE681, PHE658, MET657, TYR642, TYR599, PRO648, TYR597, ILE563, ILE592, TRP564, LEU615, ILE540
78b	HIS61, ASN705, SER647	VAL62, PHE60, TRP59, ILE706, ILE682, PHE681, TYR642, PHE658, MET657, TRP564, PRO648, TYR599, TYR597, LEU615
78c	HIS61, ASN705, SER647	TRP59, PHE60, VAL62, ILE706, PHE681, ILE682, TYR642, PHE658, MET657, TRP564, PRO648, TYR599, TYR597, LEU615
75'	HIS61, ASN705	MET727, VAL62, PHE60, TRP59, ILE706, ILE682, PHE681, PHE658, MET657, TRP564, TYR642, TYR599, TYR597, LEU615

ii. Síntesis de compuestos

Se presentan los resultados de procedimiento, rendimiento de reacción y caracterización de los compuestos mencionados en el esquema de reacción propuesto (Figura 20). Adicionalmente, en el Anexo 3 se presenta el detalle de los resultados espectroscópicos obtenidos.

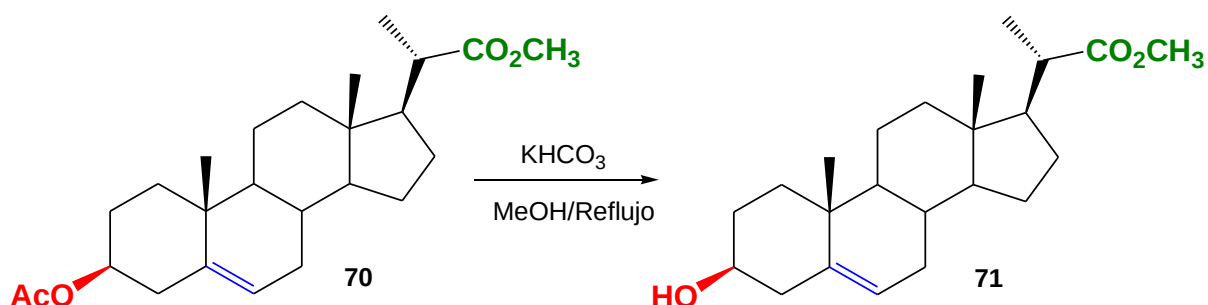
a) Síntesis de (20S)-3β-acetoxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (70).



A una solución del ácido 3 β -acetil-23,24-Bisnor-5-cólenico (**69**) (5,00 g, 12,87 mmol) en 50 mL de una mezcla (1:1) de éter:CH₂Cl₂, se le adicionó 300 mL de solución de diazometano (CH₂N₂) en éter. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 2 h. El fin de la reacción se verificó por TLC. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se concentró a sequedad bajo presión reducida. El sólido se recrystalizó con un sistema de éter/CH₂Cl₂ (1:1).

El compuesto **70** (5,18 g, 12,87 mmol, 99,9% de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco (p. f. = 147,9-152,8 °C (144-146 °C, [60])). **IR** $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3060 (=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, ca, 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 [61].

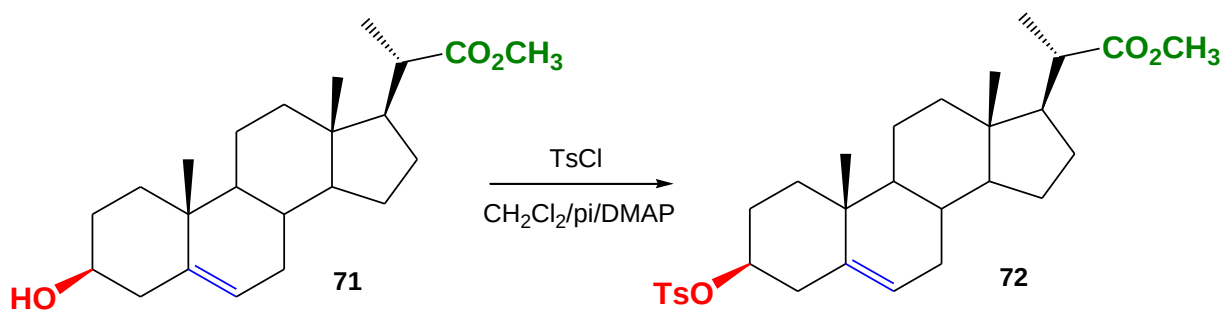
b) Síntesis de (20S)-3 β -hidroxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (**71**).



Una solución de **70** (2,08 g, 5,16 mmol) y bicarbonato de sodio NaHCO₃ (1,59 g, 18,92 mmol) en una mezcla de Metanol (200 mL) y agua (17 mL) se llevó a temperatura de reflujo y agitación constante durante 2 horas. El fin de la reacción se verificó por TLC. La mezcla de reacción se concentró hasta un volumen de aproximadamente 25 mL, se le adicionó una solución de HCl (pH = 4; 50 mL) hasta la formación de un sólido blanco en suspensión el cual se extrajo con AcOEt (2 x 60 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y el solvente se evaporó a sequedad bajo presión reducida.

Se obtuvo el compuesto **71** (1,85 g, 5,14 mmol, 99,6% de rendimiento), como un sólido blanco (p.f. = 142,3-144,1 °C (141-142 °C, [60])). **IR** $\nu_{\max}$ (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); 0,9 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177,36 (C-22); 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).

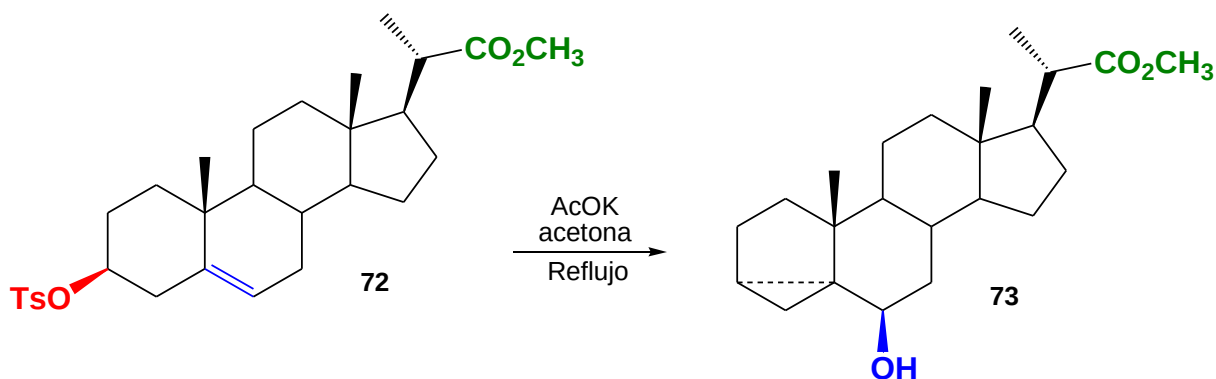
c) Síntesis de (20S)-3β-(4-toluensulfoniloxi)-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (**72**).



Una solución de **71** (2,00 g; 5,55 mmol) en piridina (30 mL), se trató con un exceso de cloruro de tosilo (2,05 g; 10,79 mmol) y cantidades catalíticas de DMAP (0,12 g; 0,94 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante y temperatura de 45 °C durante una noche (15 h). La extracción líquido-líquido se realizó con CH₂Cl₂ y una solución de HCl (5%) hasta que la fase acuosa tenga pH = 4. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó en vacío a sequedad. El crudo de reacción obtenido se recrystalizó en CH₂Cl₂ y éter dietílico.

Se obtuvo el compuesto **72** (2,47 g, 4,80 mmol, 86,5% de rendimiento) como un sólido blanco (p.f. = 127,3-128,1 °C (140-142 °C, [60])). IR ν_{max} (cm⁻¹): 2944 (=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, OCH₃); 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 (C-22); 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).

d) Síntesis de (20S)-6-hidroxi-3α,5-ciclo-5α-pregnano-22-carboxilato de metilo (**73**).

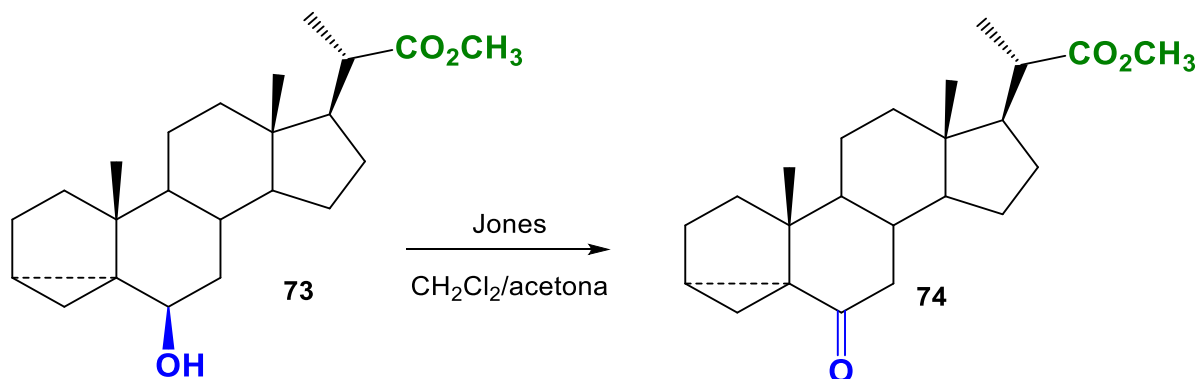


El tosilado **72** (4,56 g, 8,85 mmol) y acetato de potasio KOAc (10,20 g, 103,92 mmol) en una mezcla de solvente acetona / agua (150 mL / 50 mL) fueron llevados a temperatura de reflujo y agitación constante durante 6 h. El fin de la reacción se verificó por TLC.

La mezcla de solvente se evaporó hasta un volumen aproximado de 10 mL bajo presión reducida. Se extrajo con CH₂Cl₂ (40 mL) y se lavó con agua (3 x 20 mL), la fase orgánica de CH₂Cl₂ se secó con MgSO₄ y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando sílica gel y como eluyente una mezcla de Hexano / AcOEt (85 : 15) [60].

Se obtuvo el compuesto **73** (2,49 g, 6,85 mmol, 77,4 % de rendimiento) como un sólido blanco (p.f. = 125,8-127,0 °C). IR $\nu_{\max}$ (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 (C-22); 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).

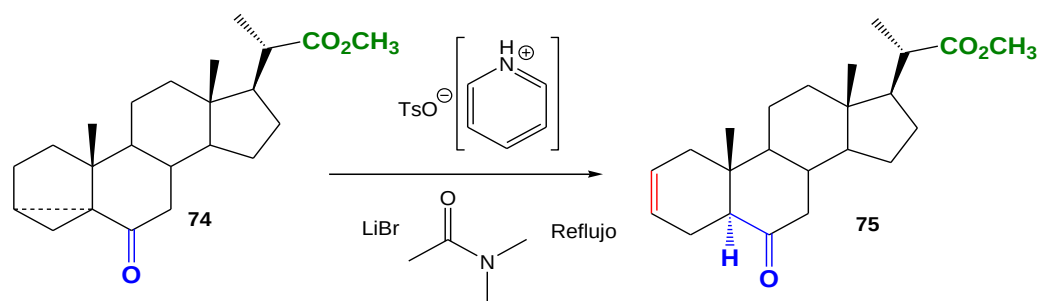
e) Síntesis de (20S)-6-oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnan-22-carboxilato de metilo (74**).**



Una solución de **73** (2,46 g, 6,79 mmol) en una mezcla de solvente Acetona / CH₂Cl₂ (60 mL / 30 mL) se llevó a 5 °C y se trató con el Reactivo de Jones (6,0 mL) [63] hasta que la solución permaneció de color naranja. La mezcla de reacción se dejó bajo agitación suave y constante durante 2 horas. El fin de la reacción se verificó por TLC. El exceso de oxidante se destruyó con la adición de metanol. Seguidamente, se evaporó el solvente bajo presión reducida y se le agregó 30 mL CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl (3 x 10 mL) y agua (2 x 10 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó el solvente a sequedad bajo presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía usando sílica gel y una mezcla de hexano / AcOEt (85:15).

Se obtuvo el compuesto **74** (2,13 g, 5,92 mmol, 87,1 % de rendimiento) como un sólido blanco (p.f. = 111,0-112,9 °C (112,8-113,0 °C) [60])). IR $\nu_{\max}$ (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, OCH₃); 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 (C-22); 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).

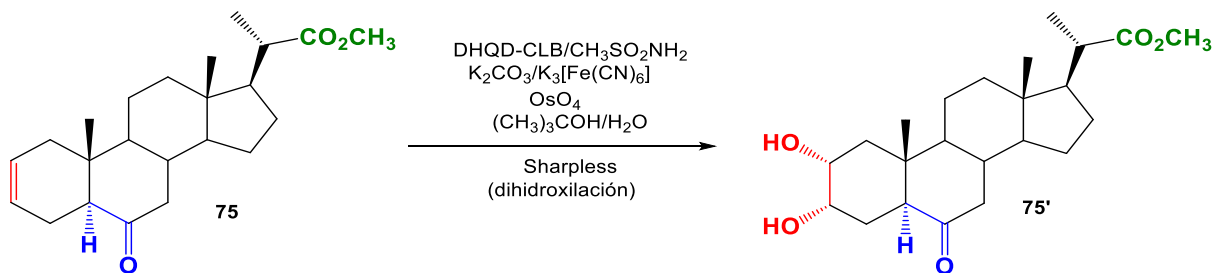
f) Síntesis de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de metilo (75).



A una solución del derivado ciclopropano **74** (2,52 g; 6,99 mmol) en *N,N*-dimetilacetamida (82 mL) se agregó piridinio tosilato (0,32 g; 1,24 mmol) y bromuro de litio (0,32 g; 3,54 mmol). La mezcla de reacción se dejó en refluxo a 160 °C, agitación constante y atmosfera de nitrógeno durante 3 h. Luego, se le agregó otra porción de piridinio tosilato (0,64 g, 2,48 mmol) y bromuro de litio (0,64 g, 7,08 mmol) y se dejó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente durante 90 minutos adicionales. El fin de la reacción se verificó por TLC. Después de enfriar la mezcla, se le agregó agua (10 mL). El producto se extrajo con éter dietílico (2 x 20 mL), se lavó con agua (3x 15mL), se secó con MgSO₄ y se evaporó al vacío a sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando SiO₂ y una mezcla de hexano / AcOEt (90:10).

Se obtuvo el compuesto **75** (2,25 g, 6,27 mmol, 89,8 % de rendimiento) como un sólido blanco (p.f. = 138,5-139,9 °C (149,0-150,0°C [60])). **IR** ν_{max} (cm⁻¹): 3023 (=C-H); 2969 y 2903 (CH₃-); 2871 y 2841 (CH₂-); 1729 (C=O); 1706 (C=O); 1656 (C=C); 1448 (CH₂-); 1367 (CH₃-); 1279 y 1023 (C-O). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,69-5,65 (1H, m, H-3); 5,58-5,53 (1H, m, H-2); 3,63 (3H, s, OCH₃); 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). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,70 (C-6); 177,15 (C-22); 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 (OCH₃); 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).

g) Síntesis de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (75')

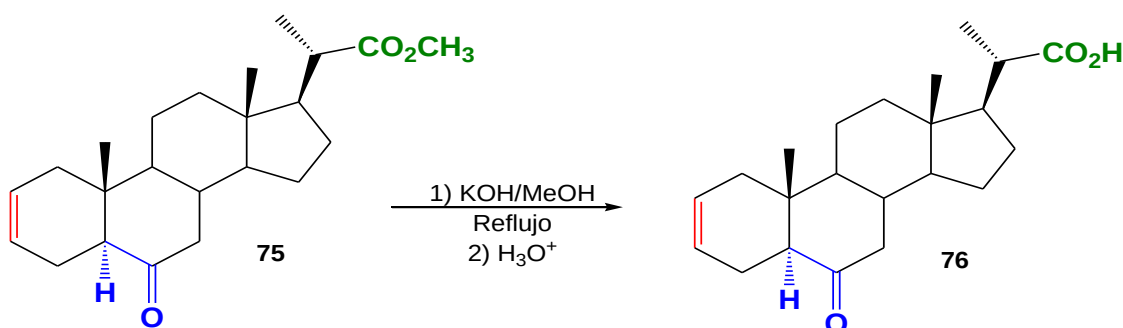


A una solución de **75** (0,2 g; 0,56 mmol) en *t*-BuOH/H₂O (21 mL 1:1) se agregó DHQD-CLB (0,06 g; 0,12 mmol), CH₃SO₂NH₂ (0,08 g; 0,88 mmol), K₂CO₃ (0,38 g; 2,58 mmol) y K₃[Fe(CN)₆] (1,33 g; 4,05 mmol). Posteriormente se adicionó OsO₄ en *t*-BuOH (0,36 mL; 0,07 mmol) [52]. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 72 horas. Finalizado este tiempo, se agregó una solución saturada de bisulfito de sodio (NaHSO₃) y se dejó en agitación durante 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 hasta sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando SiO₂, eluyendo por gradiente de polaridad usando una mezcla de solventes hexano/AcOEt/MeOH (6:4:0 → 4.8:4.8:0.4).

Se obtuvo el compuesto **75'** (0,17 g, 0,43 mmol, 77,6% de rendimiento) como un sólido blanco (p.f. = 181,2-182,9 °C). **IR** $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3388 (OH); 2945 (CH₃-); 2867 y 2830 (CH₂-); 1739 (C=O); 1711 (C=O); 1446 (CH₂-); 1375 (CH₃-); 1263 y 1042 (C-O). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4,03 (1H, da, *J* = 2,8 Hz, H-3); 3,74 (1H, ddd, *J* = 11,5, 4,7 y 3,1 Hz, H-2); 3,63 (3H, s, OCH₃); 2,67 (1H, dd, *J* = 12,6 y 3,0 Hz, H-5); 2,41 (1H, dc, *J* = 10,5 y 6,8 Hz, H-20); 2,28 (1H, dd, *J* = 13,1 y 4,5 Hz, H-7 β); 1,18 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-21); 1,11 (1H, ddd, *J* = 17,3, 11,9 y 6,2 Hz, H-15); 0,74 (3H, s, H-19); 0,66 (3H, s, H-18). **¹³C-RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,95 (C-6); 177,18 (C-22); 68,31 (C-3); 68,21 (C-2); 56,19 (C-14); 53,61 (C-9); 52,69 (C-17); 51,40 (C-5); 50,67 (OCH₃); 46,61 (C-7); 42,95 (C-13); 42,51 (C-10); 42,32 (C-1); 40,13 (C-12); 39,11 (C-8); 37,56 (C-20); 26,91 (C-16); 26,27 (C-4); 23,94 (C-15); 21,09 (C-11); 17,04 (C-21); 13,52 (C-19); 12,15 (C-18). **HRMS-ESI** (modo positivo): *m/z* calculado para C₂₃H₃₆O₅: 392,2563 [M]⁺; encontrado 393,2638 [M + H]⁺.

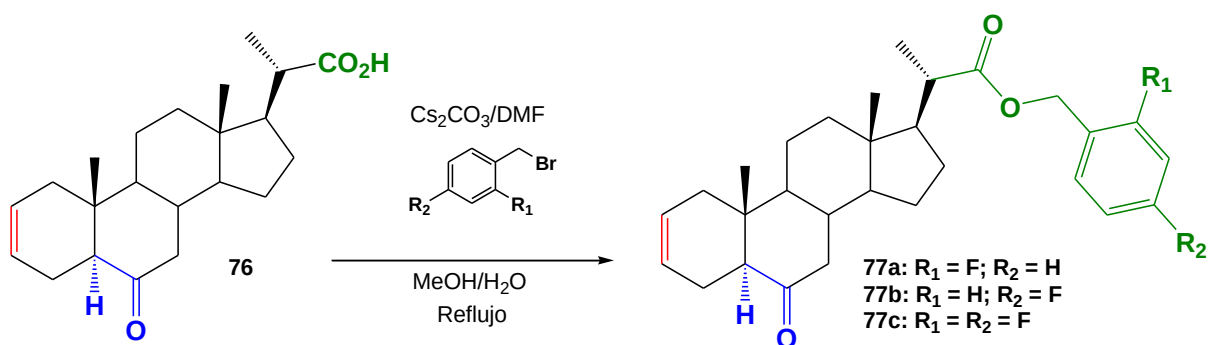
h) Síntesis de ácido (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílico (**76**).



A una solución de **75** (0,50 g; 1,40 mmol) en MeOH / agua (50 mL / 10 mL) se agregó KOH (1,00 g; 17,82 mmol). La mezcla de reacción se dejó en reflujo a 100 °C, agitación constante durante 6 h. El fin de la reacción se verificó por TLC. La mezcla de solvente se evaporó hasta un volumen aproximado de 10 mL bajo presión reducida con el objetivo de eliminar el MeOH. Posteriormente se adicionó una solución de HCl (5%) hasta la formación de un sólido blanco en suspensión el cual se extrajo con CH₂Cl₂ (40 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y el solvente se evaporó a sequedad bajo presión reducida.

Se obtuvo el compuesto **76** (0,47 g, 1,37 mmol, 98,4% de rendimiento) como un sólido blanco (p.f. = 194,5-196,0 °C). **IR** $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3382-2664 (OH); 3017 (=C-H); 2973 y 2938 (-CH₃); 2908 y 2864 (CH₂-); 1704 (C=O); 1657 (C=C); 1445 (CH₂-); 1384 (CH₃-); 1248 y 1092 (C-O); 667 (=C-H). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,67-5,63 (1H, m, H-3); 5,54-5,51 (1H, m, H-2); 2,39 (1H, dc, *J* = 10,1 y 6,9 Hz, H-20); 2,33 (1H, dd, *J* = 12,3 y 4,2 Hz, H-7 β); 2,26-2,18 (1H, m, H-1); 1,22 (3H, d, *J* = 6,9 Hz, H-21); 1,17-1,05 (1H, m, H-15); 0,68 (3H, s, H-19); 0,67 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,88 (C-6); 182,80 (C-22); 124,84 (C-3); 124,35 (C-2); 56,19 (C-14); 53,71 (C-9); 53,17 (C-5); 52,25 (C-17); 46,74 (C-7); 42,83 (C-13); 42,38 (C-20); 39,91 (C-10); 39,22 (C-12); 39,18 (C-4); 37,52 (C-8); 26,99 (C-16); 23,92 (C-15); 21,59 (C-1); 20,96 (C-11); 16,93 (C-21); 13,41 (C-19); 12,01 (C-18).

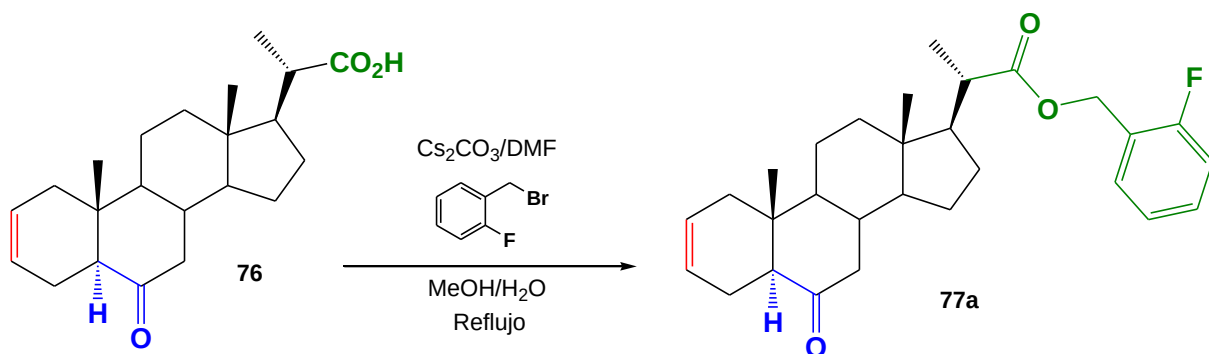
i) Síntesis de serie 77a-c.



Procedimiento general:

A una solución de **76** en MeOH / agua se adicionó *N,N*-dimetilformamida (DMF) y carbonato de cesio (Cs_2CO_3) [64]. Posteriormente se agregó el bromuro de bencilo correspondiente. La mezcla de reacción se dejó en reflujo a 160 °C y agitación constante durante 6 h. El fin de la reacción se verificó por TLC. La mezcla de solvente se evaporó hasta un volumen aproximado de 10 mL bajo presión reducida con el objetivo de eliminar el MeOH. El volumen resultante de 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 MgSO_4 , se filtró y se concentró en rotavapor hasta sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando SiO_2 , eluyendo por gradiente de polaridad usando una mezcla de solventes hexano/AcOEt/MeOH (6:4:0 → 4.8:4.8:0.4). Finalmente se colectaron las fracciones con el producto.

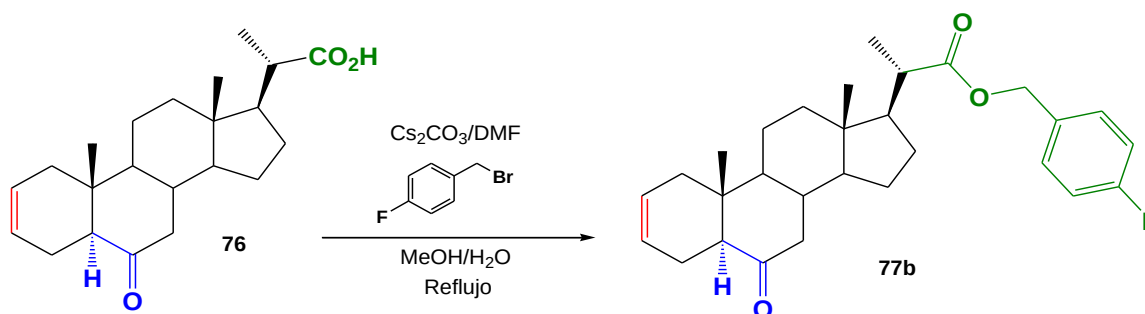
1. Síntesis de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (77a).



Compuesto **76** (0,15 g; 0,44 mmol), MeOH (35 mL), agua (5 mL), DMF (15 mL), Cs_2CO_3 (1,80 g; 5,52 mmol), $\text{C}_7\text{H}_6\text{BrF}$ (1,80 g; 9,52 mmol). El compuesto **77a** (0,10 g, 0,21 mmol, 48,7% de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco (p.f. = 113,9 – 115,5 °C). **IR** ν_{max} (cm^{-1}): 3024 (=C-H); 2969 y 2938 (-CH₃); 2872 y 2849 (CH₂-); 1741 (C=O); 1702 (C=O); 1656 (C=C); 1455 (CH₂-); 1381 (CH₃-); 1243 y 1160 (C-O); 758 (=C-H). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7,37 (1H, ddd, J = 9,2, 7,4 y 1,6 Hz, H-6'); 7,34-7,29 (1H, m, H-4'); 7,13 (1H, ddd, J = 9,2, 7,5 y 1,0 Hz, H-5'); 7,07 (1H, ddd, J = 9,5, 8,3 y 0,8 Hz, H-3'); 5,69-5,65 (1H, m, H-3); 5,57-5,54 (1H, m, H-2); 5,14 (2H, s, -OCH₂-Ar); 2,46 (1H, dc, J = 10,4 y 6,9 Hz, H-20); 1,21 (3H, d, J = 6,9 Hz, H-21); 1,14-1,04 (1H, m, H-15); 0,70 (3H, s, H-19); 0,67 (3H, s, H-18).

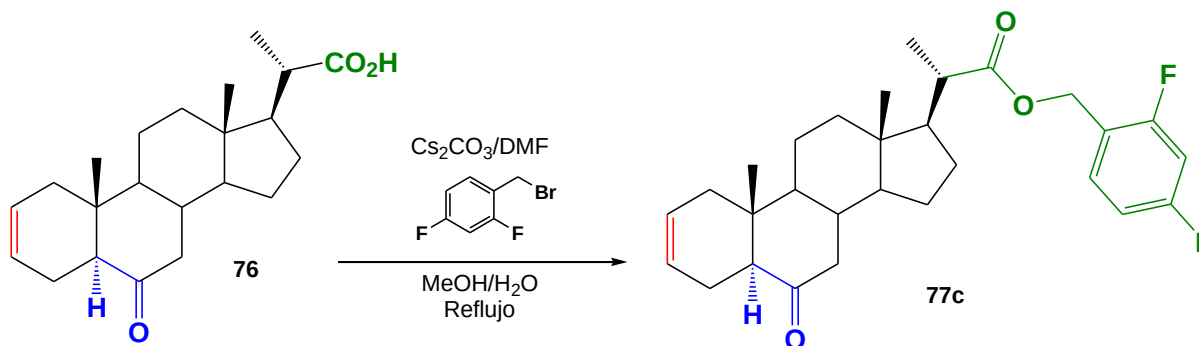
¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,69 (C-6); 176,35 (C-22); 161,01 (d, ¹J_{CF} = 246,9 C-2'); 130,69 (d, ³J_{CF} = 3,9 Hz, C-6'); 130,16 (d, ³J_{CF} = 8,0 Hz, C-4'); 124,91 (C-3); 124,41 (C-2); 124,07 (d, ⁴J_{CF} = 4,1 Hz, C-5'); 123,28 (d, ²J_{CF} = 14,7 Hz, C-1'); 115,44 (d, ²J_{CF} = 21,3 Hz, C-3'); 59,97 (d, ³J_{CF} = 4,1 Hz, -OCH₂-Ar); 56,20 (C-14); 53,76 (C-9); 53,26 (C-5); 52,70 (C-17); 46,84 (C-7); 42,86 (C-13); 42,48 (C-20); 39,95 (C-10); 39,28 (C-12); 39,19 (C-4); 37,57 (C-8); 26,85 (C-16); 24,00 (C-15); 21,66 (C-1); 21,00 (C-11); 17,03 (C-21); 13,45 (C-19); 12,07 (C-18).

2. Síntesis de (20S)-6-oxo-5α-preg-2-en-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (77b).



Compuesto **76** (0,10 g; 0,29 mmol), MeOH (23 mL), agua (3 mL), DMF (10 mL), Cs₂CO₃ (1,20 g; 3,68 mmol), C₇H₆BrF (1,20 g; 6,35 mmol). El compuesto **77b** (0,11 g, 0,24 mmol, 83,0% de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco (p.f. = 140,3 – 141,0 °C). **IR** v_{max} (cm⁻¹): 3028 (=C-H); 2965 y 2939 (CH₃-); 2899 y 2868 (CH₂-); 1732 (C=O); 1705 (C=O); 1598 (C=C); 1457 (CH₂-); 1384 (CH₃-); 1242 y 1160 (C-O); 824 (=C-H); 666 (=C-H). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,31 (2H, dd, *J* = 8,6 y 5,6 Hz, H-2' y H-6'); 7,03 (2H, t, *J* = 8,6 Hz, H-3' y H-5'); 5,68-5,64 (1H, m, H-3); 5,56-5,53 (1H, m, H-2); 5,03 (2H, s, -OCH₂-Ar); 2,44 (1H, dc, *J* = 10,1 y 6,8 Hz, H-20); 1,19 (3H, s, H-21); 1,13-1,06 (1H, m, H-15); 0,69 (3H, s, H-19); 0,66 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,62 (C-6); 176,34 (C-22); 161,51 (d, ¹J_{CF} = 246,5 C-4'); 131,87 (d, ⁴J_{CF} = 3,2 Hz, C-1'); 130,17 (d, ³J_{CF} = 8,3 Hz, C-2' y C-6'); 124,88 (C-3); 124,37 (C-2); 115,38 (d, ²J_{CF} = 21,0 Hz, C-3' y C-5'); 65,21 (-OCH₂-Ar); 56,15 (C-14); 53,72 (C-9); 53,21 (C-5); 52,68 (C-17); 46,79 (C-7); 42,83 (C-13); 42,47 (C-20); 39,91 (C-10); 39,24 (C-12); 39,16 (C-4); 37,53 (C-8); 26,91 (C-16); 23,95 (C-15); 21,63 (C-1); 20,97 (C-11); 16,99 (C-21); 13,42 (C-19); 12,03 (C-18).

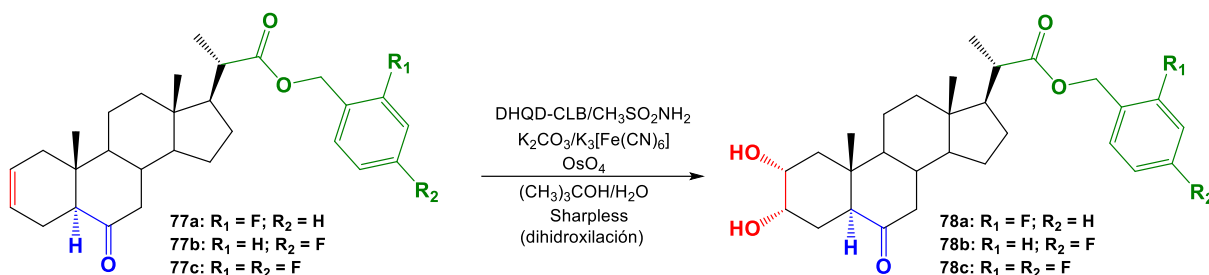
3. Síntesis de (20S)-6-oxo-5α-preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (77c).



Compuesto **76** (0,15 g; 0,44 mmol), MeOH (35 mL), agua (5 mL), DMF (15 mL), Cs₂CO₃ (1,80 g; 5,52 mmol), C₇H₅BrF₂ (1,80 g; 8,70 mmol). El compuesto **77c** (0,11 g, 0,24 mmol, 55,2% de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco (p.f. = 114,0 – 115,7 °C).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3028 (=C-H); 2965 y 2939 (CH₃-); 2899 y 2868 (CH₂-); 1732 (C=O); 1705 (C=O); 1598 (C=C); 1458 (CH₂-); 1384 (CH₃-); 1242 y 1154 (C-O); 824 (=C-H); 666 (=C-H). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,35 (1H, dt, J = 8,3 y 6,4 Hz, H-6'); 6,88-6,79 (2H, m, H-3' y H-5'); 5,69-5,64 (1H, m, H-3); 5,56-5,53 (1H, m, H-2); 5,08 (2H, s, -OCH₂-Ar); 2,44 (1H, dc, J = 10,4 y 7,0 Hz, H-20); 1,18 (3H, s, H-21); 1,13-1,06 (1H, m, H-15); 0,69 (3H, s, H-19); 0,66 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,73 (C-6); 176,37 (C-22); 163,36 (dd, $^1J_{\text{CF}}$ = 175,6 Hz, y $^3J_{\text{CF}}$ = 12,4 Hz, C-2'); 160,87 (dd, $^1J_{\text{CF}}$ = 177,2 Hz, y $^3J_{\text{CF}}$ = 11,6 Hz, C-4'); 131,85 (dd, $^3J_{\text{CF}}$ = 9,4 y $^3J_{\text{CF}}$ = 5,1 Hz, H-6'); 124,90 (C-3); 124,39 (C-2); 119,27 (dd, $^2J_{\text{CF}}$ = 14,8 Hz y $^4J_{\text{CF}}$ = 4,0 Hz, C-1'); 111,26 (dd, $^2J_{\text{CF}}$ = 21,1 Hz y $^4J_{\text{CF}}$ = 3,7 Hz, C-5'); 103,95 (t, $^2J_{\text{CF}}$ = 25,5 Hz, C-3'); 59,44 (d, $^3J_{\text{CF}}$ = 3,2 Hz, -OCH₂-Ar); 56,23 (C-14); 53,80 (C-9); 53,30 (C-5); 52,76 (C-17); 46,88 (C-7); 42,92 (C-13); 42,51 (C-20); 40,00 (C-10); 39,33 (C-12); 39,24 (C-4); 37,61 (C-8); 26,91 (C-16); 24,05 (C-15); 21,72 (C-1); 21,05 (C-11); 17,05 (C-21); 13,50 (C-19); 12,11 (C-18).

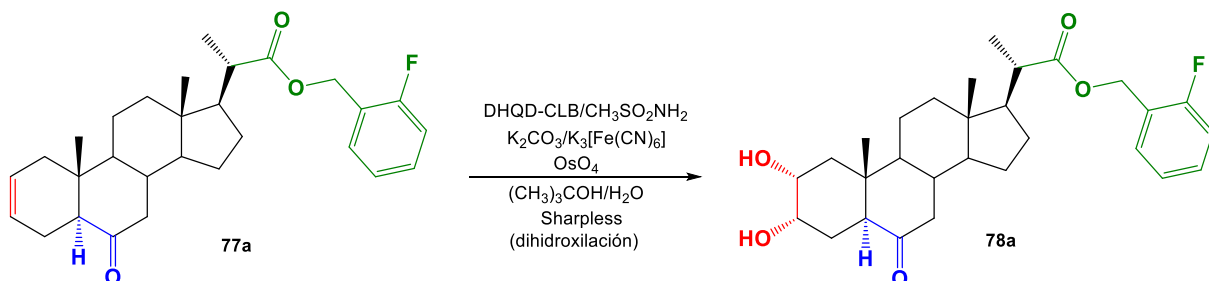
j) Síntesis de serie 78a-c.



Procedimiento general:

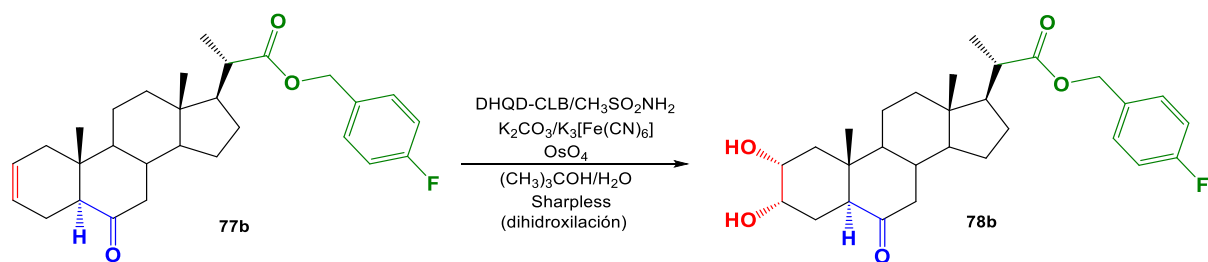
A una solución de **77** en *t*-BuOH/H₂O (1:1) se agregó hidroquinidina 4-cloro-benzoato (DHQD-CLB), metanosulfonamida (CH₃SO₂NH₂), carbonato de potasio (K₂CO₃) y ferricianuro de potasio (K₃[Fe(CN)₆]). Posteriormente se adicionó tetraóxido de osmio (OsO₄) en *t*-BuOH (1,0 g en 20 mL) [52]. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 72 horas. Finalizado este tiempo, se agregó una solución saturada de bisulfito de sodio (NaHSO₃) y se dejó en agitación durante 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 hasta sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando SiO₂, eluyendo con gradiente de polaridad usando una mezcla de solventes hexano/AcOEt/MeOH (6:4:0 → 4:8:4:8:0:4). Finalmente se colectaron las fracciones con el producto.

1. Síntesis de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxílate de 2-fluorobencilo (**78a**).



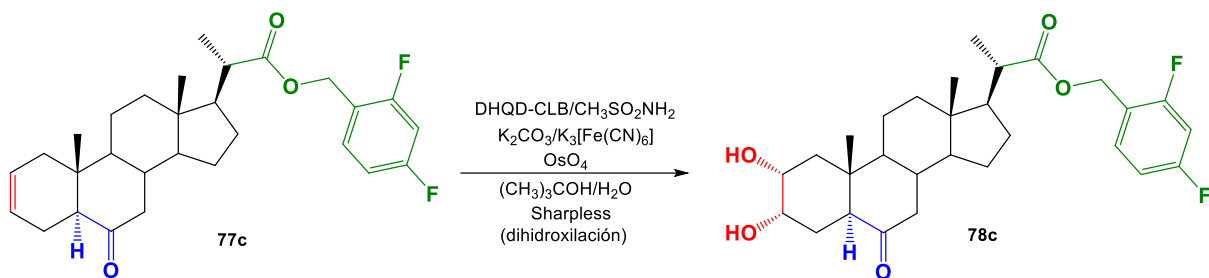
Compuesto **77a** (0,10 g; 0,23 mmol), *t*-BuOH/H₂O (12 mL 1:1), DHQD-CLB (0,03 g; 0,06 mmol), CH₃SO₂NH₂ (0,04 g; 0,46 mmol), K₂CO₃ (0,19 g; 1,34 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (0,59 g; 1,79 mmol), OsO₄ (0,20 mL; 0,04 mmol). El compuesto **78a** (0,10 g, 0,20 mmol, 85,3% de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco (p.f. = 141,6 – 143,0 °C). **IR** $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3405 (O-H); 2944 (CH₃-); 2867 (CH₂-); 1735 (C=O); 1710 (C=O); 1458 (CH₂-); 1384 (CH₃-); 1259 y 1152 (C-O); 759 (=C-H). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = xxxxxx. **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,35 (1H, ddd, *J* = 9,2, 7,4 y 1,7 Hz, H-6'); 7,32-7,27 (1H, m, H-4'); 7,13 (1H, ddd, *J* = 7,7, 7,6 y 1,1 Hz, H-5'); 7,07 (1H, ddd, *J* = 9,2, 8,7 y 0,9 Hz, H-3'); 5,12 (2H, s, -OCH₂-Ar); 4,00 (1H, da, *J* = 2,4 Hz, H-3); 3,71 (1H, ddd, *J* = 10,7, 4,8 y 3,3 Hz, H-2); 2,65 (1H, dd, *J* = 12,8 y 2,7 Hz, H-5); 2,43 (1H, dc, *J* = 10,3 y 6,8 Hz, H-20); 2,24 (1H, dd, *J* = 13,2 y 4,5 Hz, H-7 β); 1,18 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-21); 1,07 (1H, ddd, *J* = 16,6, 8,5 y 5,2 Hz, H-15); 0,71 (3H, s, H-19); 0,63 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 212,24 (C-6); 176,39 (C-22); 160,93 (d, ¹*J*_{CF} = 248,1 C-2'); 130,63 (d, ³*J*_{CF} = 3,7 Hz, C-6'); 130,16 (d, ³*J*_{CF} = 8,2 Hz, C-4'); 124,04 (d, ⁴*J*_{CF} = 3,7 Hz, C-5'); 123,03 (d, ²*J*_{CF} = 14,7 Hz, C-1'); 115,38 (d, ²*J*_{CF} = 21,1 Hz, C-3'); 68,21 (C-3); 68,12 (C-2); 59,98 (d, ³*J*_{CF} = 4,2 Hz, -OCH₂-Ar); 56,03 (C-14); 53,49 (C-9); 52,57 (C-17); 50,44 (C-5); 46,52 (C-7); 42,93 (C-13); 42,44 (C-10); 42,42 (C-20); 39,98 (C-12); 39,03 (C-4); 37,49 (C-8); 26,77 (C-16); 26,25 (C-15); 23,93 (C-1); 21,02 (C-11); 16,96 (C-21); 13,45 (C-19); 12,09 (C-18). **HRMS-ESI** (modo positivo): *m/z* calculado para C₂₉H₃₉FO₅: 486,2782 [M]⁺; encontrado 487,2860 [M + H]⁺.

2. Síntesis de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**78b**).



Compuesto **77b** (0,17 g; 0,36 mmol), *t*-BuOH/H₂O (18 mL 1:1), DHQD-CLB (0,05 g; 0,10 mmol), CH₃SO₂NH₂ (0,07 g; 0,73 mmol), K₂CO₃ (0,29 g; 2,13 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (0,94 g; 2,84 mmol), OsO₄ (0,30 mL; 0,06 mmol). El compuesto **78b** (0,13 g, 0,26 mmol, 70,4% de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco (p.f. = 168,1 – 169,8 °C). **IR** $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3385 (O-H); 2945 (CH₃-); 2866 (CH₂-); 1734 (C=O); 1711 (C=O); 1606 (C=C); 1510 (C=C); 1458 (CH₂-); 1383 (CH₃-); 1259 y 1152 (C-O); 832 (=C-H). **¹H RMN** (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,32 (2H, dd, *J* = 8,4 y 5,5 Hz, H-2' y H-6'); 7,04 (2H, t, *J* = 8,4 Hz, H-3' y H-5'); 5,04 (2H, s, -OCH₂-Ar); 4,05 (1H, sa, H-3); 3,77-3,75 (1H, m, H-2); 2,68 (1H, dd, *J* = 12,5 y 2,9 Hz, H-5); 2,44 (1H, dc, *J* = 10,1 y 6,7 Hz, H-20); 2,28 (1H, dd, *J* = 12,9 y 4,6 Hz, H-7 β); 1,19 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H-21); 1,09 (1H, ddd, *J* = 16,6, 11,9 y 5,2 Hz, H-15); 0,74 (3H, s, H-19); 0,65 (3H, s, H-18). **¹³C RMN** (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211,99 (C-6); 176,43 (C-22); 162,55 (d, ¹*J*_{CF} = 247,1 C-4'); 131,84 (d, ⁴*J*_{CF} = 3,6 Hz, C-1'); 130,21 (d, ³*J*_{CF} = 8,0 Hz, C-2' y C-6'); 115,42 (d, ²*J*_{CF} = 21,3 Hz, C-3' y C-5'); 68,29 (C-3); 68,19 (C-2); 65,29 (-OCH₂-Ar); 56,11 (C-14); 53,57 (C-9); 52,69 (C-17); 50,70 (C-5); 46,58 (C-7); 42,99 (C-13); 42,50 (C-10); 42,49 (C-20); 40,10 (C-12); 39,09 (C-4); 37,54 (C-8); 26,92 (C-16); 26,27 (C-15); 24,99 (C-1); 21,07 (C-11); 17,00 (C-21); 13,50 (C-19); 12,14 (C-18). **HRMS-ESI** (modo positivo): *m/z* calculado para C₂₉H₃₉FO₅: 486,2782 [M]⁺; encontrado 487,2867 [M + H]⁺.

3. Síntesis de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (78c).



Compuesto **77c** (0,11 g; 0,24 mmol), *t*-BuOH/H₂O (13 mL 1:1), DHQD-CLB (0,03 g; 0,07 mmol), CH₃SO₂NH₂ (0,05 g; 0,50 mmol), K₂CO₃ (0,20 g; 1,46 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (0,64 g; 1,94 mmol), OsO₄ (0,22 mL; 0,04 mmol). El compuesto **78c** (0,11 g, 0,21 mmol, 89,1% de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco (p.f. = 140,2 – 141,9 °C). IR ν_{max} (cm⁻¹): 3402 (O-H); 2944 (CH₃-); 2866 (CH₂-); 1733 (C=O); 1711 (C=O); 1607 (C=C); 1508 (C=C); 1460 (CH₂-); 1384 (CH₃-); 1236 y 1144 (C-O); 815 (=C-H). ¹H RMN (400,1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,34 (1H, dt, *J* = 8,2 y 6,1 Hz, H-6'); 6,87-6,78 (2H, m, H-3' y H-5'); 5,07 (2H, s, -OCH₂-Ar); 4,00 (1H, da, *J* = 2,4 Hz, H-3); 3,70 (1H, dt, *J* = 10,7 y 3,4 Hz, H-2); 2,65 (1H, dd, *J* = 12,5 y 2,9 Hz, H-5); 2,41 (1H, dc, *J* = 10,3 y 6,8 Hz, H-20); 2,24 (1H, dd, *J* = 13,1 y 4,4 Hz, H-7 β); 1,16 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-21); 1,07 (1H, ddd, *J* = 17,2, 11,4 y 6,0 Hz, H-15); 0,71 (3H, s, H-19); 0,63 (3H, s, H-18). ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 212,21 (C-6); 176,34 (C-22); 163,33 (dd, ¹*J*_{CF} = 176,6 Hz, y ³*J*_{CF} = 12,0 Hz, C-2'); 160,83 (dd, ¹*J*_{CF} = 178,3 Hz, y ³*J*_{CF} = 11,6 Hz, C-4'); 131,83 (dd, ³*J*_{CF} = 9,9 y ³*J*_{CF} = 5,7 Hz, H-6'); 119,15 (dd, ²*J*_{CF} = 15,0 Hz y ⁴*J*_{CF} = 4,3 Hz, C-1'); 111,24 (dd, ²*J*_{CF} = 21,1 Hz y ⁴*J*_{CF} = 3,7 Hz, C-5'); 103,93 (t, ²*J*_{CF} = 25,4 Hz, C-3'); 68,22 (C-3); 68,13 (C-2); 59,40 (d, ³*J*_{CF} = 3,7 Hz, -OCH₂-Ar); 56,04 (C-14); 53,50 (C-9); 52,58 (C-17); 50,65 (C-5); 46,52 (C-7); 42,94 (C-13); 42,45 (C-10); 42,39 (C-20); 39,99 (C-12); 39,04 (C-4); 37,50 (C-8); 26,77 (C-16); 26,26 (C-15); 23,93 (C-1); 21,03 (C-11); 16,94 (C-21); 13,46 (C-19); 12,09 (C-18). HRMS-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C₂₉H₃₈F₂O₅: 504,2687 [M]⁺; encontrado 505,2773 [M + H]⁺.

iii. Evaluaciones biológicas

a) Ensayo de inclinación de lámina de arroz (ILA)

Los registros fotográficos y las mediciones del ángulo entre la lámina y la vaina del segundo entrenudo, para concentraciones de 0 M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M de los análogos de brasinoesteroides en solución acuosa y de brasinólida (**1**), se presentan en la Tabla 5.

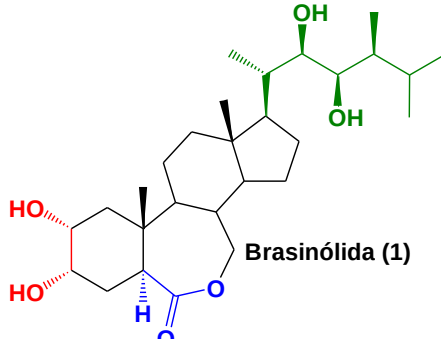
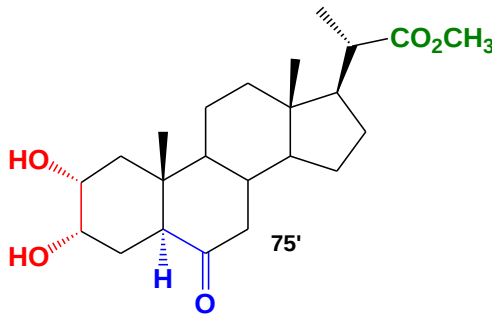
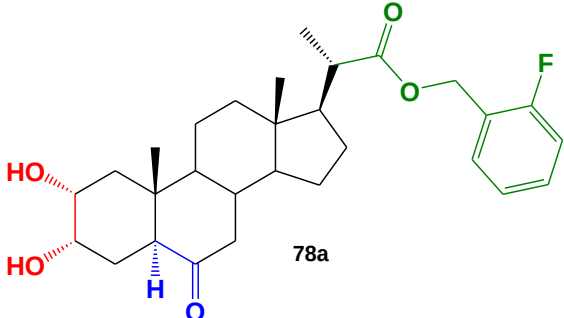
Tabla 5: Actividad de análogos de BRs disueltos en DMSO mediante bioensayos in vitro de Inclinación de la lámina de arroz. Letras indican el nivel de significancia de acuerdo con Test de t-Student ($P < 0,05$).

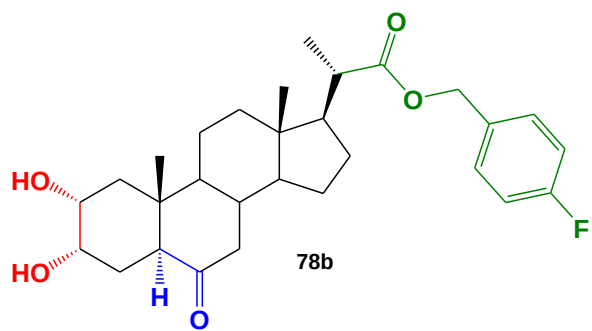
Compuesto	Apertura del ángulo (°)		
	1×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M
 Brasinólida (1)	 $55 \pm 7,1^a$	 $62 \pm 4,8^a$	 $85 \pm 7,5^a$
 75'	 $62 \pm 2,6^a$	 $44 \pm 2,0^b$	 $40 \pm 5,5^c$
 78a	 $48 \pm 3,8^b$	 $31 \pm 2,7^e$	 $13 \pm 5,5^d$
 78b	 $13 \pm 3,2^e$	 $39 \pm 4,5^{bc}$	 $63 \pm 6,6^b$
 78c	 $25 \pm 9,3^d$	 -	 $8 \pm 6,6^{de}$
Control negativo (H ₂ O)		$27 \pm 4,1$	

b) Ensayo del segundo entrenudo de frijol (SEF)

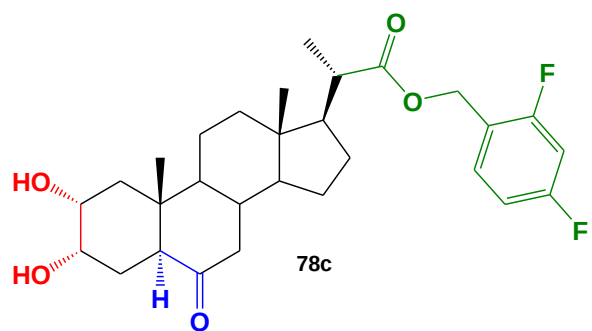
Los resultados de diferencia entre la longitud del segundo entrenudo de las plantas tratadas con los análogos de brasinoesteroides en solución acuosa y de brasinólida (1) como control positivo, todos a una concentración de 10^{-8} M, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Efecto de análogos de BRs en el bioensayo de elongación del segundo entrenudo del frijol a una concentración de 1×10^{-8} M. Letras indican el nivel de significancia de acuerdo con Test de t-Student ($P < 0,05$).

Compuesto	Elongación del Segundo Entrenudo del Frijol (mm)
 Brasinólida (1)	 $13,6 \pm 2,5^a$
 75'	 $5,8 \pm 3,9^a$
 78a	 $2,3 \pm 2,5^b$



4,1±5,3^{ab}



2,6±1,8^b

Control negativo (H₂O)



VI. Discusión de Resultados

i. Estudios *in-silico* de Docking Molecular

Se identifica que para todos los casos estudiados se tiene en general un RMSD menor a 1 Å, lo que indica que existe estabilidad entre el ligando y a la proteína según el criterio definido en la metodología de RMSD de 2 Å como valor máximo.

Inicialmente, se analizan los resultados para el análogo **75'** de forma comparativa respecto a lo obtenido para la serie **78a-c**, de esta forma se puede identificar si las sustituciones planteadas en la cadena lateral del esqueleto principal tienen un efecto positivo o negativo en el Docking score.

Los valores obtenidos para **75'** son de -8,222 y -13,637 para el receptor BRI1 y BRI1-BAK1 respectivamente, siendo en general menores a los valores de afinidad obtenidos para la serie **78a-c** y mucho menores que los obtenidos para la brasinólida (**1**). Adicionalmente, se presentan un número igual o menor de interacciones de puente de hidrogeno y fuerzas de London respecto a los análogos **78a-c** para todos los casos. De esta forma se evidencia que las sustituciones propuestas en la cadena lateral tienen un efecto positivo en la afinidad esperada en los receptores BRI1 y el complejo BRI1-BAK1.

Al analizar los resultados obtenidos para la serie **78a-c**, el compuesto **78a** es el que presenta mayor afinidad de unión, siendo comparable a la afinidad de la brasinólida. Para el caso del receptor BRI1, este análogo presenta un Docking score de -10,596, estando por debajo del valor obtenido para brasinólida de -12,525. Por el contrario, para el caso del receptor BRI1-BAK1, el análogo **78a** presenta un Docking score superior al de brasinólida, siendo -15,618 en comparación a -14,719 respectivamente. En la Figuras 21 y 22 se presentan las poses predichas en el sitio activo para los receptores BRI1 y BRI1-BAK1 de la brasinólida y del análogo **78a** respectivamente.

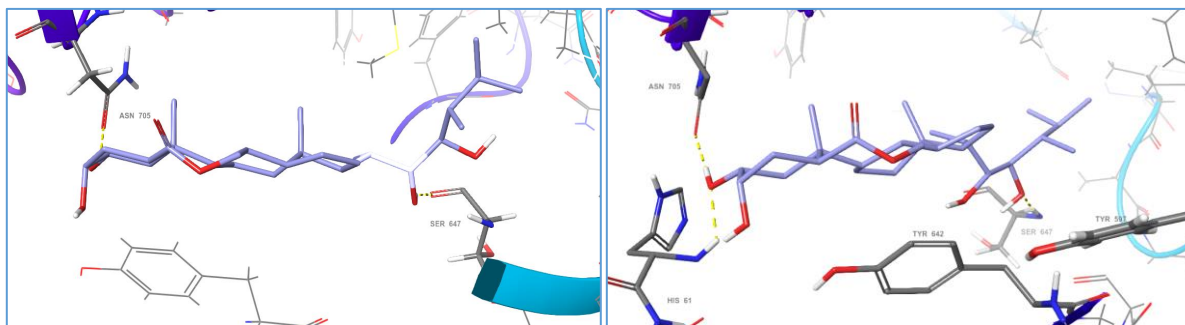


Figura 21: Poses predichas para brasinólida (**1**) en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).

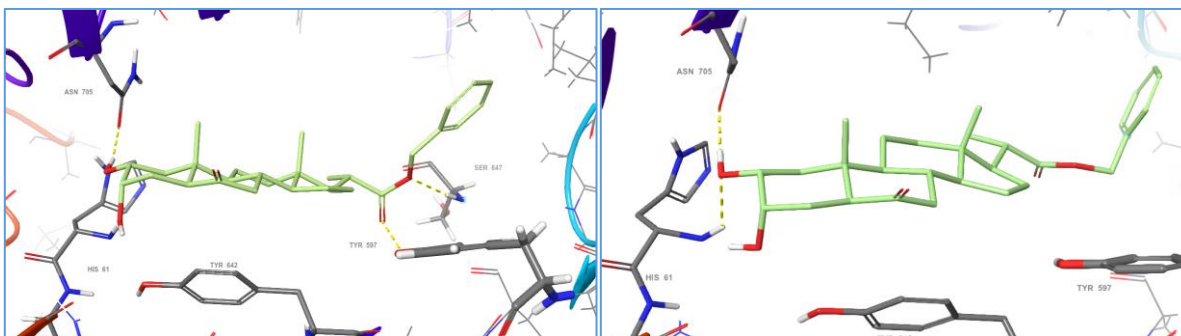


Figura 22: Poses predichas para el análogo **78a** en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).

La pose predicha por el estudio del análogo **78a** en el sitio activo genera 3 interacciones de puente de hidrógeno con los aminoácidos ASN705, SER647 y TYR597, además de 15 interacciones de fuerzas de London para el caso del receptor BRI1. Al mismo tiempo, para el caso del receptor BRI1-BAK1, esta pose genera 2 puentes de hidrógeno con los aminoácidos HIS61 y ASN705, además de 17 interacciones de fuerzas de London.

Otro análogo que se destaca es **78b** obteniendo un Docking score de -10,583, siendo el segundo análogo de la serie con mejor afinidad en el sitio activo del receptor BRI1, mientras que para el receptor BRI1-BAK1 logra un valor de -13,891. A diferencia de **78a**, este análogo logra generar solo 2 puentes de hidrógeno con los aminoácidos ASN705 y SER647, además de las 15 interacciones de fuerza de London para el receptor BRI1. No obstante, logra generar 3 puentes de hidrógeno en el caso del receptor BRI1-BAK1 con los aminoácidos HIS61, ASN705 y SER647, adicionalmente a las 14 interacciones de fuerza de London. En la Figura 23 se presentan las poses predichas en el sitio activo para los receptores BRI1 y BRI1-BAK1 del análogo **78b**.

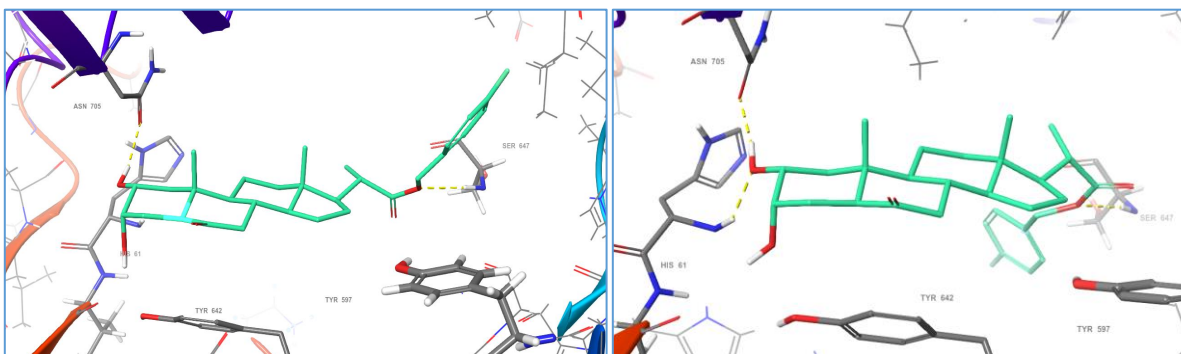


Figura 23: Poses predichas para el análogo **78b** en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).

Ambos análogos (**78a** y **78b**) comparten la similitud de tener monosustituciones de átomos de flúor en posiciones *orto* y *para* respectivamente del anillo aromático, acoplado a la cadena lateral del esqueleto principal. Esto despierta el interés de estudiar la serie completa de análogos que presenten sustituciones de flúor en el anillo aromático, lo que se traduce en considerar el análogo **78c** para el análisis, el cual presenta una disustitución de átomos de flúor en las posiciones *orto* y *para* en el anillo aromático.

El análogo **78c** presenta un Docking score de -9,485 y -13,847 para los receptores BRI1 y BRI1-BAK1 respectivamente. Respecto a las interacciones de puente de hidrógeno, presenta exactamente las mismas que el análogo **78b**, siendo 2 para BRI1 y 3 para BRI1-BAK1.

Análogamente, **78c** presenta la misma cantidad de interacciones de fuerza de London que **78b**. En la Figura 24 se presentan las poses predichas en el sitio activo para los receptores BRI1 y BRI1-BAK1 del análogo **78c**.

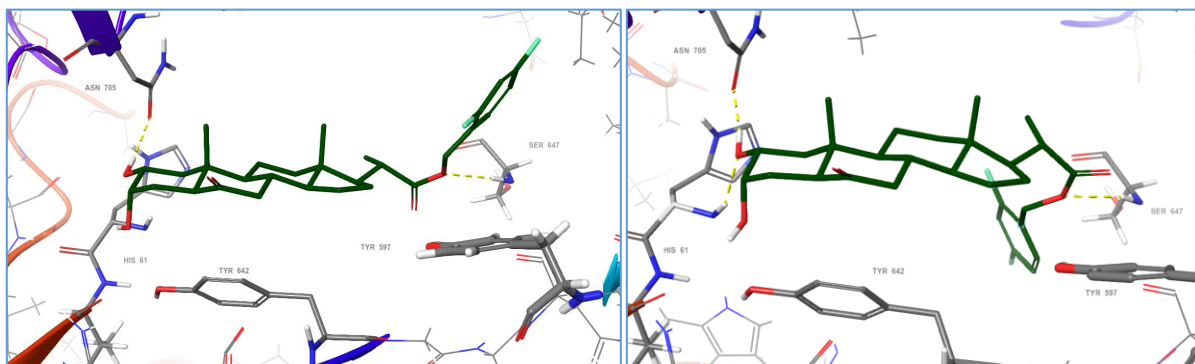


Figura 24: Poses predichas para el análogo **78c** en el sitio activo de BRI1 (Izquierda) y BRI1-BAK1 (Derecha).

Finalmente, luego de evidenciar que las sustituciones en la cadena lateral tienen un efecto positivo en la actividad, además de que los análogos estudiados que presentan sustituciones de átomos de flúor en el anillo aromático son los que presentan mayores valores de Docking score; se seleccionan los análogos **78a-c** para realizar la síntesis química, caracterización y posteriores ensayos biológicos.

ii. Síntesis de compuestos

De acuerdo con la metodología y la ruta de síntesis indicada en la Figura 20, en una primera instancia se procedió a la obtención de los derivados **70-75** desde el ácido 3 β -acetoxi-23,24-dinorcol-5-en-22-colénico (**69**) [61]. De esta forma, la reacción de esterificación con diazometano ($\text{CH}_2\text{N}_2/\text{éter}$) del ácido **69**, permitió la obtención del derivado metilado **70** con 99,9% de rendimiento [61]. El compuesto **70** fue caracterizado por técnicas espectroscópicas combinadas de IR y RMN. En el espectro IR de **70** no fue observada la señal entre 3300-2500 cm^{-1} , asignada al enlace O-H propio de las funciones de los ácidos carboxílicos (precursor **69**). Mientras que la función $\text{R-CO}_2\text{CH}_3$ fue evidenciada por la observación en el espectro de ^1H RMN de la señal a $\delta_{\text{H}} = 3,64$ ppm (3H, s, OCH_3). Adicionalmente desde el espectro de ^{13}C RMN, las señales observadas a $\delta_{\text{C}} = 177,30$ y 51,31 ppm, fueron asignadas al C-22 y grupo OCH_3 respectivamente. Los datos de IR y ^1H RMN fueron consistentes con los reportados para este compuesto [61] (ver Anexo 3).

Posteriormente reacción de saponificación selectiva del grupo acetato en posición C-3 del compuesto **70**, utilizando el sistema $\text{NaHCO}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, en reflujo [61], permitió la obtención del derivado saponificado **71**, con 99,6% de rendimiento. 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 de H-3 a campo alto ($\delta_{\text{H}} = 3,55\text{-}3,48$ ppm, m, 1H). Además, desde el espectro de ^{13}C RMN, no se observaron las señales a $\delta_{\text{C}} = 170,51$ y 21,42 ppm, atribuidas al grupo CH_3CO presentes en el precursor **70**. Mientras que los datos de IR y ^1H RMN fueron consistentes con los reportados para este compuesto [61] (ver Anexo 3).

Reacción de tosilación de **71** con TsCl/pi/DMAP [61], permitió la obtención del derivado tosilado **72** con 86,5% 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 (ver Anexo 3).

Tratamiento del tosilato **72** con el sistema AcOK/acetona-agua bajo condiciones de reflujo de acuerdo con lo reportado [61], permitió la formación del compuesto **73**, con 77,4% de rendimiento. Desde el espectro IR de **73**, se observó la señal entre $3489\text{-}3442\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la función OH en C-6. 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, [69] (ver Figura 25). Mientras que la orientación espacial del grupo OH en C-6 fue establecida como axial sobre el plano, considerando los valores de $J_{\text{H-H}}$ observados ($^3J_{\text{HH}} = 2,8$ Hz) para el H-6, correspondientes a acoplamiento “ecuatorial-ecuatorial” con ambos hidrógenos en H-7 (Figura 25) (ver Anexo 3).

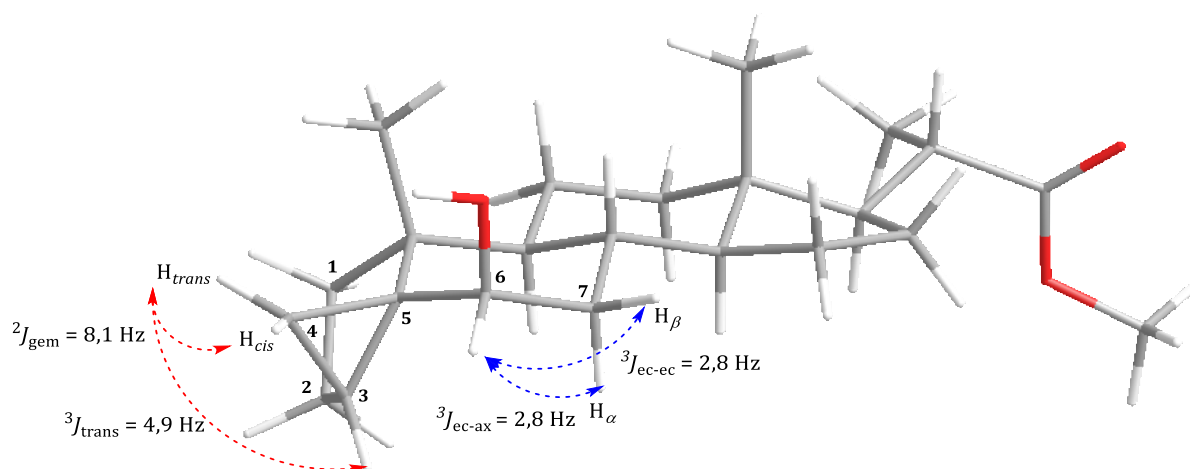


Figura 25: Estructura 3D del compuesto **73**, donde se muestran los acoplamientos H-H para los hidrógenos H-4 y H-6, cuyos valores confirman la presencia del anillo de ciclopropano y estereoquímica del C-6.

Oxidación de Jones/ CH_2Cl_2 /acetona del compuesto **73** [61], produjo la cetona **74** con 87,1% de rendimiento. La evidencia espectroscópica de la formación del grupo carbonilo en C-6, fue evidenciada principalmente por la observación de la señal a $\delta_{\text{C}} = 209,35$ ppm, en el espectro de ^{13}C RMN del compuesto **74** (ver Anexo 3).

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 **74** con el sistema tosilato de piridino, LiBr, DMF bajo condiciones de reflujo según se describió en literatura [61]. Esto permitió la formación del alqueno **75** con 89,8% 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 $\delta_{\text{H}} = 5,69\text{-}5,65$ ppm (1H, m) y $\delta_{\text{H}} = 5,58\text{-}5,53$ ppm (1H, m), asignadas a los hidrógenos H-3 y H-2 respectivamente [61]. Mientras que desde el espectro de ^{13}C RMN, se observaron las señales a $\delta_{\text{C}} = 124,92$ 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 3).

Reacción de dihidroxilación de Sharpless del alqueno **75**, de acuerdo con procedimiento descrito [53], permitió la obtención del glicol **75'**, con 77,6% de rendimiento. El compuesto **75'** había sido preparado y reportado por dihidroxilación de Upjohn, pero solo se informaron datos espectroscópicos de IR, y ^1H RMN [61].

Desde el espectro de ^1H RMN, las señales observadas a $\delta_{\text{H}} = 4,03$ ppm (1H, da, $J = 2,8$ Hz); y $\delta_{\text{H}} = 3,74$ ppm (1H, ddd, $J = 11,5$; 4,7 y 3,1 Hz); fueron asignadas a los hidrógenos carbinólicos H-3 y H-2 respectivamente. Mientras que desde el espectro de ^{13}C RMN, las señales observadas a $\delta_{\text{C}} = 69,31$ y $68,21$ ppm, fueron asignadas a los carbonos C-3 y C-2 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 26.

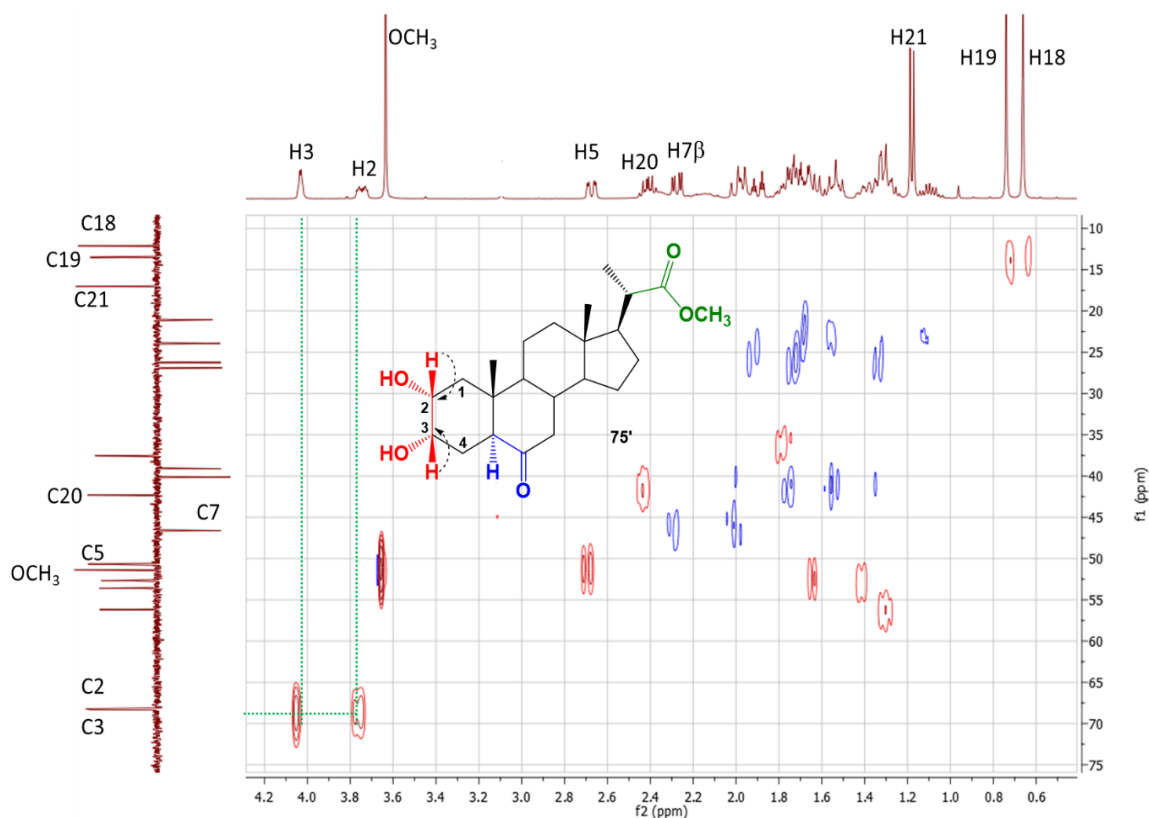


Figura 26: Espectro 2D HSQC ed., con proyección de ^{13}C DEPT-135, donde se muestran las correlaciones heteronucleares a $^1J_{\text{HC}}$ para los hidrógenos H-2, H-3, H-5, H-20, H-7 β , H-18, H-19 y H-21, para el glicol **75'**.

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 (4,03 ppm, da, $J = 2,8$ Hz) mostró correlaciones a $^2J_{\text{HC}}$ con C-2 ($\delta_{\text{C}} = 68,21$ ppm), mientras que la señal de H-5 ($\delta_{\text{H}} = 2,67$ ppm, dd, $J = 12,6$ y $3,0$ Hz) mostró correlaciones a $^3J_{\text{HC}}$ con los carbonos a $\delta_{\text{C}} = 68,31$ y $13,52$ ppm, asignadas a C-3 y C-19 respectivamente, y una correlación a $^2J_{\text{HC}}$ con C-6 ($\delta_{\text{C}} = 211,95$ ppm), y otras correlaciones heteronucleares a $^2J_{\text{HC}}$ y $^3J_{\text{HC}}$, se muestran en la Figura 27.

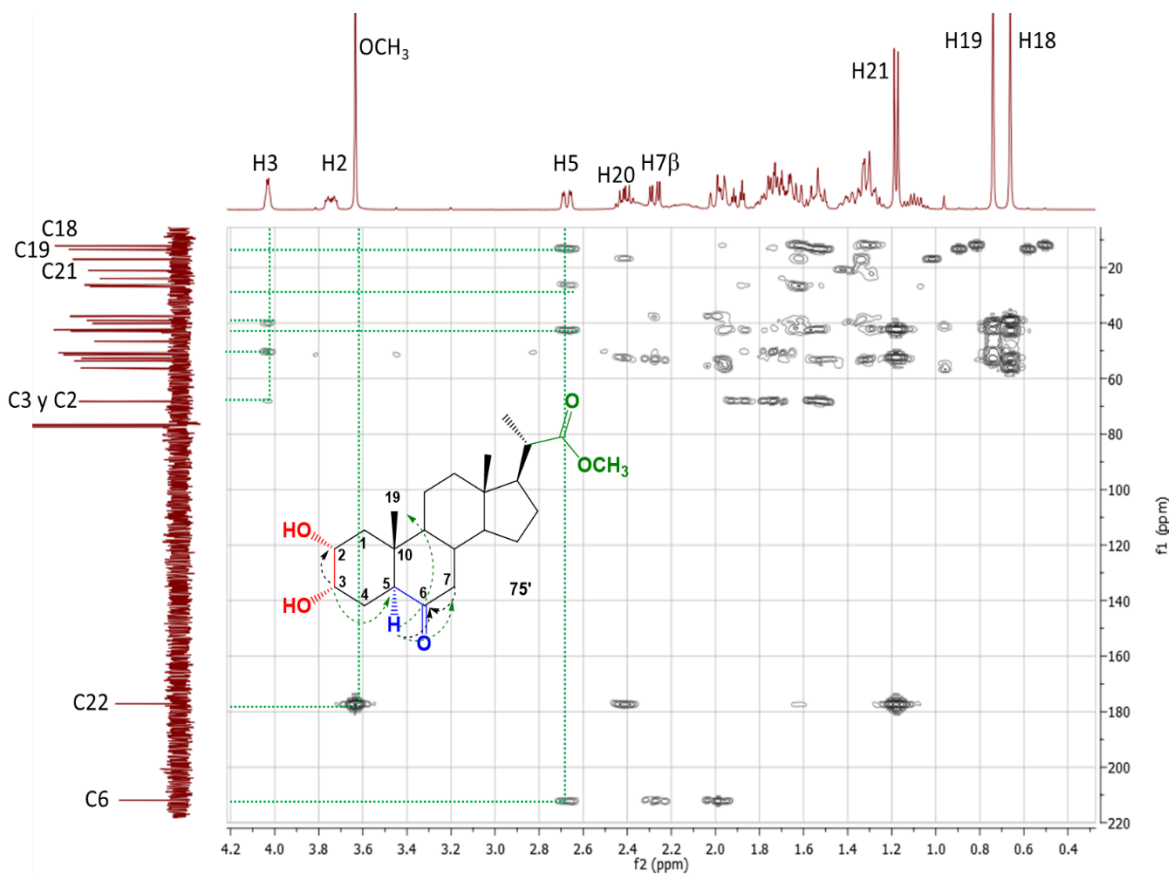


Figura 27: Espectro 2D HMBC para el compuesto 75' y su estructura, que muestran las principales correlaciones heteronucleares a $^2J_{\text{HC}}$ (flechas en negro) y $^3J_{\text{HC}}$ (flechas en verde).

La determinación estereoquímica de los carbonos C-2 y C-3, fue establecida por que la reacción de dihidroxilación ya sea de Upjohn [44,47,51,70–75] o de Sharpless [53] 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 5α), que es debido al impedimento estérico que produce el grupo CH_3 -19 a la aproximación del OsO_4 por la cara superior del anillo A, por lo cual la dihidroxilación se ve favorecida por la cara inferior (Figura 28).

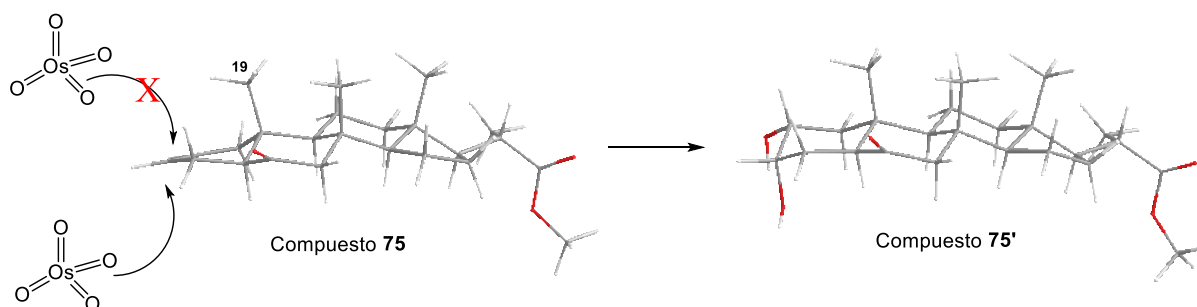
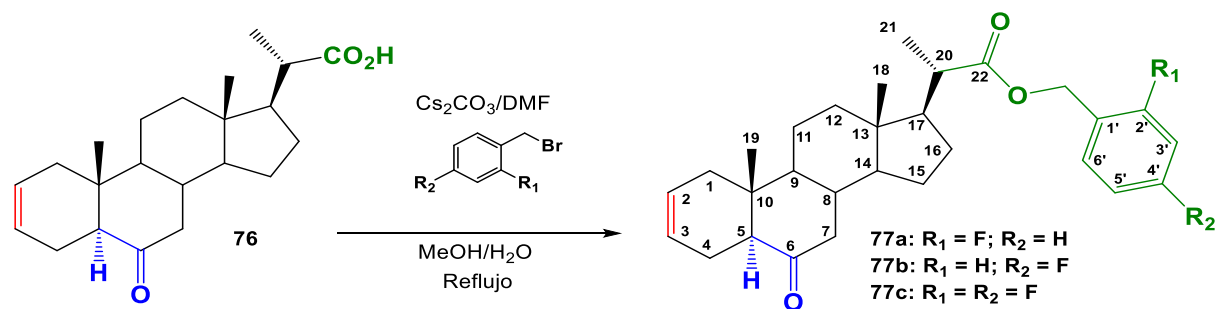


Figura 28: Adición preferencial del OsO_4 por la cara inferior del plano del enlace doble C2-C3, en el compuesto **75**, que permitirá la formación diastereoespecífica del diol **2a-3a** en el compuesto **75'**.

Posteriormente, reacción de saponificación de **75** bajo condiciones estándares ($\text{KOH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, reflujo) y posterior acidificación, produjo el ácido **76** con un rendimiento de 98,4%. Evidencia espectroscópica de IR, indica la observación de la señal entre $3382\text{--}2664\text{ cm}^{-1}$, característica de los grupos O-H presentes en ácidos carboxílicos.

Mientras que desde el espectro de ^1H RMN, no se observa la señal a $\delta_{\text{H}} = 3,63\text{ ppm}$ asignada al grupo OCH_3 en el compuesto **75**. Por otra parte, desde el espectro de ^{13}C RMN, se observó un desplazamiento químico a bajo campo a $\delta_{\text{C}} = 182,80\text{ ppm}$ para la señal de C-22, comparada con la señal de C-22 ($\delta_{\text{C}} = 177,18\text{ ppm}$), presente en el compuesto **75**. Adicionalmente en el espectro de ^{13}C RMN de **76**, no se observó la señal a $\delta_{\text{C}} = 50,67\text{ ppm}$, asignada al grupo $-\text{OCH}_3$ (presente en **75**) (ver Anexo 3).

El paso siguiente consistió en realizar las reacciones de esterificación en la posición C-22 del ácido **76**, con los correspondientes bromuros de bencilos para acceder a los compuestos **77a-c**, según se indica en el esquema de reacción general.



Esta reacción de esterificación se realizó según procedimiento descrito, utilizando el sistema $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{DMF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{reflujo}$ [66], y permitió la obtención de los derivados esterificados **77a-c** con rendimientos de 48,7%, 83,0% y 55,2% de rendimiento.

Las caracterizaciones y determinaciones estructurales para los derivados **77a-c** se realizó principalmente por técnicas combinadas de 1D y 2D RMN. Como ejemplo se realizará la discusión espectroscópica para el derivado **77a**. De esta forma, en el espectro de ^1H RMN, se observaron las señales aromáticas a $\delta_{\text{H}} = 7,37$; $7,34\text{--}7,29$; $7,13$ y $7,07\text{ ppm}$ asignadas a los hidrógenos H-6' (1H, ddd, $J = 9,2, 7,4$ y $1,6\text{ Hz}$); H-4' (1H, m); H-5' (1H, ddd, $J = 9,2, 7,5$ y $1,0\text{ Hz}$) y H-3' (1H, ddd, $J = 9,5, 8,3$ y $0,8\text{ Hz}$) respectivamente. Adicionalmente se observó la señal a $\delta_{\text{H}} = 5,14\text{ ppm}$ que fue asignada al grupo $-\text{OCH}_2\text{-Ar}$ (s, 2H).

Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN, las señales observadas a $\delta_{\text{C}} = 161,01$; $130,69$; $130,16$; $124,07$; $123,28$; $115,44$ ppm fueron asignadas a los carbonos aromáticos C-2'; C-6'; C-4'; C-5'; C-1' y C-3'. Mientras que la señal observada a $\delta_{\text{C}} = 59,97$ ppm fue asignada al grupo bencílico ($-\text{OCH}_2\text{-Ar}$). Por otra parte, las correlaciones entre los hidrógenos aromáticos e hidrógeno oximetilénico ($-\text{OCH}_2\text{-Ar}$), con sus correspondientes carbonos fueron asignadas inequívocamente desde la información proporcionada por el espectro 2D HSQC, las cuales se muestran en la Figura 29.

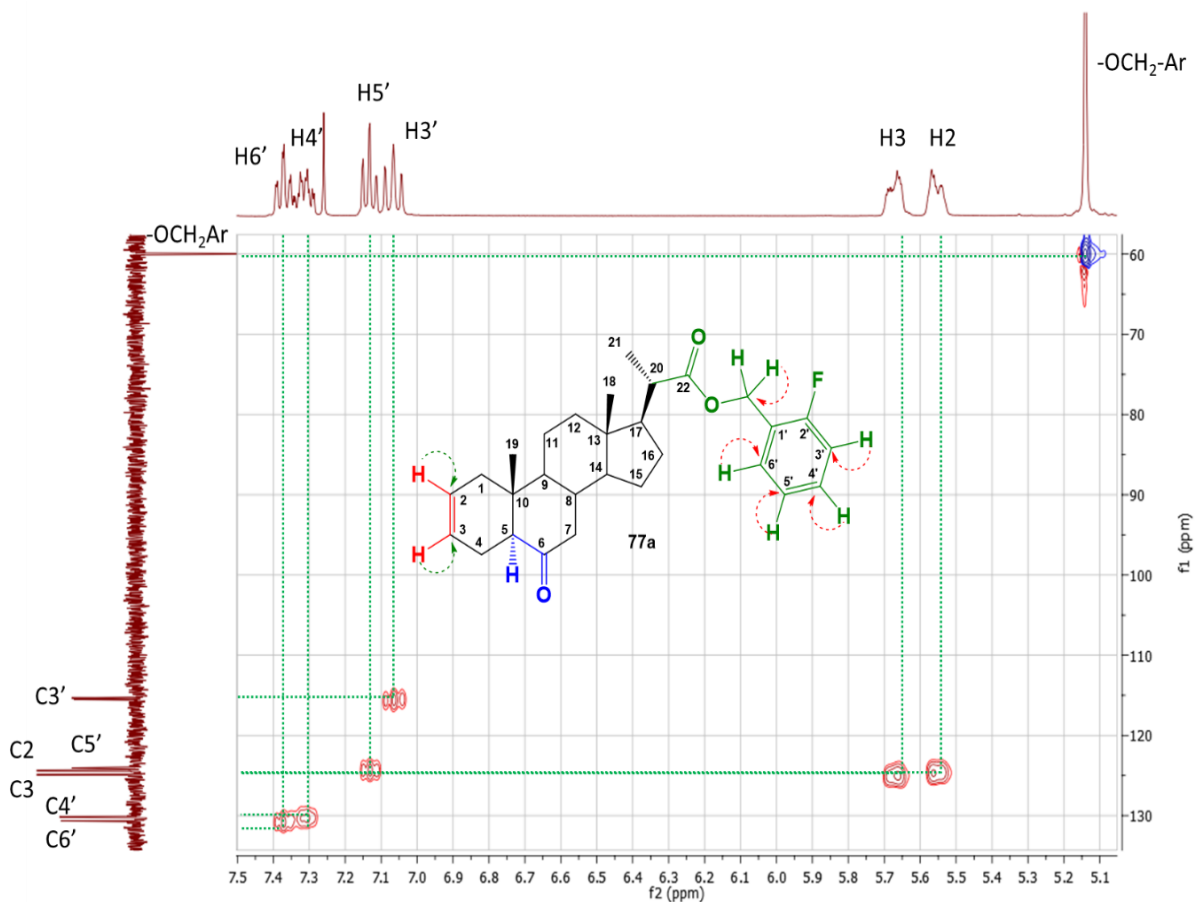


Figura 29: Espectro 2D HSQC parcial, con proyección de ^{13}C DEPT-135, que muestra las principales correlaciones heteronucleares a $^1J_{\text{HC}}$ (flechas en rojo y verde) del grupo bencílico ($-\text{OCH}_2\text{Ar}$) para el compuesto 77a y su correspondiente estructura.

Mientras que la confirmación de unión entre el C-22 (COO^-) y el grupo bencílico ($-\text{OCH}_2\text{Ar}$), provino desde la información proporcionada por el espectro 2D HMBC. De esta forma la señal asignada a los hidrógenos del grupo bencílico ($\delta_{\text{H}} = 5,14$ ppm), mostró correlaciones heteronucleares a $^3J_{\text{HC}}$ con el carbono C-22 ($\delta_{\text{C}} = 176,35$ ppm), como se indica en la Figura 30. Información que adicionalmente fue confirmada por las correlaciones observadas a $^3J_{\text{HC}}$ entre el grupo $-\text{OCH}_2\text{Ar}$, con los carbonos aromáticos C-2' ($\delta_{\text{C}} = 161,01$ ppm) y C-6' ($\delta_{\text{C}} = 130,69$ ppm). Además, los hidrógenos del grupo $-\text{OCH}_2\text{Ar}$ mostraron una correlación heteronuclear a $^2J_{\text{HC}}$ con el carbono C-1' ($\delta_{\text{C}} = 123,28$ ppm). Estas correlaciones y otras que fueron observadas se indican en la Figura 30).

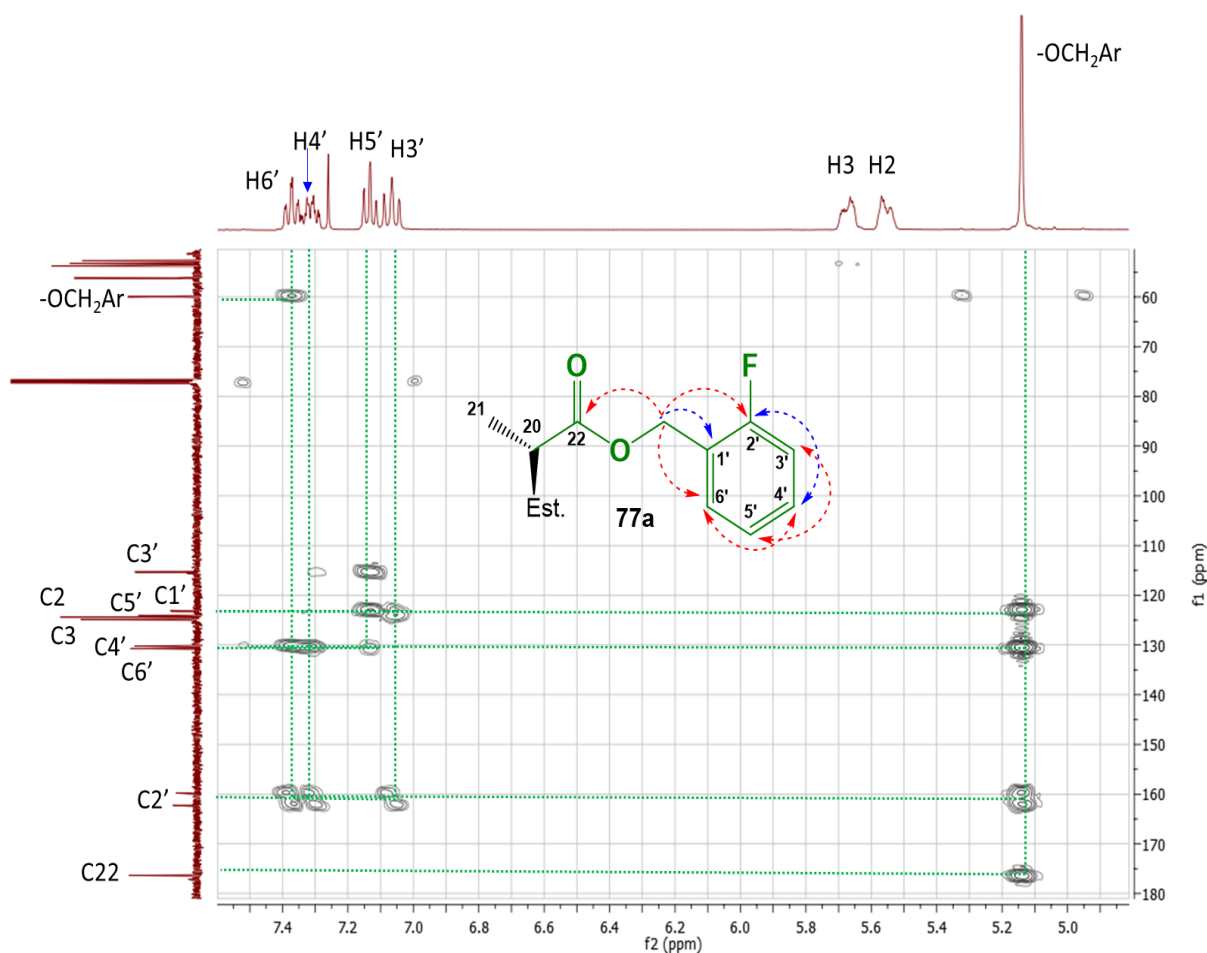


Figura 30: Espectro 2D HMBC parcial, que muestra las principales correlaciones heteronucleares a 2JHC (flechas en azul) y 3JHC (flechas en rojo) del grupo bencilo (-OCH₂Ar) que muestran la conexión entre este sistema y el carbono C-22 para el compuesto 77a.

Con toda la información espectroscópica disponible se logró asignar de forma inequívoca la estructura del compuesto **77a**, lo cual se realizó de forma similar para la determinación estructural de los compuestos **77b** y **77c**.

Finalmente, por reacción de dihidroxilación de Sharpless de los alquenos **77a-c**, se logró la obtención de los nuevos análogos de BRs **78a-c** con rendimientos de 85,3%, 70,4% y 89,1%. El procedimiento experimental para la obtención de estos compuestos se realizó de la misma forma como fue descrito para la obtención del glicol **75'** desde **75**. La determinación estructural para cada uno de los análogos finales se realizó de forma similar a la descrita para **75'** (ver Anexo 3).

iii. Evaluaciones biológicas

Analizando los resultados obtenidos para el ensayo de inclinación de lámina de arroz, se observa que los compuestos **75'**, **78a** y **78b** presentan una actividad superior a la del control negativo (agua) para una de las concentraciones evaluadas. Por el contrario, el compuesto **78c** no presenta actividad; esto podría dar indicios de que una disustitución de flúor en el anillo aromático disminuye la actividad respecto a monosustituciones de flúor.

Al mismo tiempo, se identifica que los compuestos **75'** y **78a** presentan una relación de proporcionalidad inversa entre el ángulo de inclinación observado y la concentración molar. A diferencia de estos, el compuesto **78b** presenta una proporción directa entre el ángulo y la concentración molar, siguiendo el mismo comportamiento observado para el control positivo (**1**).

La mayor actividad observada se logra para el caso de **75'** a una concentración de 10^{-8} M y para **78b** a una concentración de 10^{-6} M; con un ángulo de $62^{\circ} \pm 2,6^{\circ}$ y $63^{\circ} \pm 6,6^{\circ}$ respectivamente. En comparación al control positivo (**1**) estos resultados son similares a lo observado para la brasinólida a una concentración de 10^{-7} M ($62^{\circ} \pm 4,8^{\circ}$) y menores para una concentración de 10^{-8} M ($85^{\circ} \pm 7,5^{\circ}$). De esta forma se puede afirmar que la actividad de **75'** y **78b** a las concentraciones mencionadas presenta una actividad similar a la de la brasinólida (**1**). Adicionalmente, se identifica que al comparar los análogos **78a** y **78b** se evidencia mayor actividad para el análogo con sustitución de flúor en posición *para* en el anillo aromático respecto a tener una sustitución en posición *orto*.

Por último, los resultados de este ensayo indican que no existe una mejora significativa al incorporar este tipo de sustituciones en el anillo aromático de la cadena lateral de los análogos de brasinoesteroides sintetizados, lo que se evidencia en los resultados observados para **75'** respecto a los análogos **78a-c**, siendo opuestos con lo predicho en los estudios de Docking Molecular.

Lo anterior se complementa con los resultados obtenidos para el ensayo de elongación del segundo entrenudo del frijol, donde se observa que la mayor elongación se presenta para el compuesto **75'** con $5,8 \pm 3,9$ mm, seguido por el compuesto **78b** con $4,1 \pm 5,3$ mm. Aun cuando se observa una elongación significativa para estos compuestos, estos valores solo logran alcanzar alrededor de la mitad del valor observado para el control positivo (**1**) de $13,6 \pm 2,5$ mm.

Estas observaciones podrían atribuirse a que los estudios *in-sílico*, si bien son una buena herramienta para predecir la afinidad de un ligando en el sitio activo de un complejo receptor, no consideran el proceso de metabolismo celular mediante el cual el ligando se transporta desde fuera de la célula hasta el complejo receptor. Adicionalmente, se debe considerar que el estudio de Docking molecular predice el acoplamiento entre el ligando y el receptor en un instante de tiempo, pero no entrega información sobre la evolución del comportamiento de afinidad de acoplamiento en el tiempo, pudiendo ser menor respecto al valor predicho por el estudio. Esto se puede complementar con estudios *in-sílico* de Dinámica Molecular, lo que genera una proyección de oportunidad de mejora en la metodología planteada y el diseño de la semi-síntesis realizada.

VII. Conclusiones

Tres análogos de brasinoesteroides de esqueleto similar a la castasterona (**3**) funcionalizados como carboxilato de fluoro bencilo en C-22 fueron sintetizados a partir de ácido 3 β -acetil-23,24-Bisnor-5-cólenico (**69**) y caracterizados completamente por medio de técnicas espectroscópicas. Estos nuevos análogos fueron obtenidos por medio de una ruta de semi-síntesis diseñada y desarrollada de forma eficiente.

Los resultados de los ensayos de inclinación de la lámina de arroz y segundo entrenudo de frijol indicaron que los compuestos **75'** y **78b** fueron los más activos a concentraciones de 10⁻⁸ M y 10⁻⁶ M respectivamente, pero menos activos que la brasinólida (**1**), el cual es uno de los compuestos más activos de los brasinoesteroides de origen natural, y utilizado como control positivo. Al mismo tiempo, se evidencia que el análogo **78b** tiene mayor actividad que **78a** indicando que la sustitución de flúor en el anillo aromático en posición *para* genera un mayor efecto en el crecimiento vegetal respecto a una sustitución en posición *orto*.

Los estudios de Docking molecular predicen un acoplamiento apropiado para los análogos **78a-c** en el sitio activo del complejo receptor BRI1/BAK1, formando interacciones de puentes de hidrogeno y de fuerza de London, obteniendo una energía de unión similar e incluso superior a la de la brasinólida (**1**). Sin embargo, se observó un efecto opuesto entre los resultados predichos por el estudio de Docking molecular y lo observado en los ensayos biológicos, identificando que para el compuesto **75'** se predice una menor afinidad de unión respecto a los análogos **78a-c**, sin embargo, presenta una de las mayores actividades en el crecimiento vegetal en los ensayos aplicados. En base a esto, se plantea la posibilidad de realizar otro tipo de estudio *in silico* como modelaciones de Dinámica molecular para obtener una mejor predicción de la afinidad de unión y que esta sea coherente con lo observado en los bioensayos.

Los resultados observados demuestran que la hipótesis planteada se cumplió en forma parcial, dado a que los nuevos análogos de brasinoesteroides con estructuras de ésteres de bencilos en la cadena lateral con sustituciones de átomos de flúor en el anillo aromático sintetizados (**78a-c**) presentaron una actividad reguladora de crecimiento vegetal leve, en comparación al compuesto **75'** que no tiene en la cadena lateral la función bencílica sustituida y que fue superior a la brasinólida (**1**) para su concentración más baja evaluada.

La actividad observada para el compuesto **75'** plantea la posibilidad de obtener un efecto positivo en el crecimiento vegetal sin la necesidad de alterar la cadena lateral, necesitando menos pasos de reacción en la ruta de síntesis. Esto visto desde una perspectiva de escalamiento industrial de las reacciones es positivo, ya que el rendimiento global aumentaría, pudiendo entrar a competir como un producto aplicado a cultivos comerciales como ya lo son otros derivados sintéticos de brasinoesteroides.

Se crea el interés de continuar la línea de investigación con compuestos sin sustituyentes halogenados en el grupo benzoilo, o cambiar la funcionalidad de la cadena lateral desde benzoilo a benzoato, para estudiar su actividad en el crecimiento vegetal, pudiendo evaluar la factibilidad de una producción a gran escala.

Referencias

1. Myreene, R.; Devaraj, V. Brassinosteroid Signaling in Adaptive Responses to Abiotic Stress. *Jasmonates and Brassinosteroids in Plants* **2022**, 6, 65-74.
2. Tarkowská, D.; Strnad, M. Protocol for Extraction and Isolation of Brassinosteroids from Plant Tissues. *Methods in molecular biology*. Humana Press, New York, NY, **2017**, vol 1564, 1-7. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6813-8_1
3. Sharma, R.; Baghel, M.; Nagaraja, A. Brassinosteroids and Their Use in Fruit Crops. In *Plant Growth Regulators in Tropical and Sub-tropical Fruit Crops*; 1st Edition, London, CRC Press, **2022**, pp. 14-34.
4. Zhu, Z.; Liang, H.; Chen, G.; Tang, B.; Tian, S.; Hu, Z. Isolation of the Brassinosteroid Receptor Genes and Recharacterization of Dwarf Plants by Silencing of SIBRI1 in Tomato. *Plant Growth Regul.* **2019**, 89, 59-71, doi:10.1007/s10725-019-00524-z.
5. Clouse, S.; Sasse, J. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 427-451.
6. Khripach, V.; Zhabinskii, V.; Groot, A. *Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones*; 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, USA, **1998**.
7. Varin, L.; Marsolais, F.; Richard, M.; Roleau, M. Biochemistry and molecular biology of plant sulfotransferases. *The FASEB Journal* **1997**, 11, 517-525.
8. 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.
9. Temmem, O.; Uguen, D.; 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, 3167-3173.
10. Tian, O.; Weisheng, Z.; Weishan, J.; Biao; Pan Studies on Steroidal Plant-Growth Regulator IX: The Preparation of 22R-and 22S-24. *Acta Chimi. Sin.* **1989**, 47, 1017-1021.
11. Iglesias-Arteaga, M.; Pérez Gil, R.; Pérez Martínez, C.; Manchado, C. Spirostanic Analogues of Teasterone. Synthesis, Characterisation and Biological Activity of Laxogenin,(23S)-Hydroxylaxogenin and 23-Ketolaxogenin (23-Oxolaxogenin). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **2001**, 1, 261-266.
12. Back, T.; Pharis, R. Structure–Activity Studies of Brassinosteroids and the Search for Novel Analogues and Mimetics with Improved Bioactivity. *J Plant Growth Regul.* **2003**, 22, 350-361.
13. Kvasnica, M.; Oklestkova, J.; Bazgier, V.; Rarova, L.; Berka, K.; Strand, M. Biological Activities of New Monohydroxylated Brassinosteroid Analogues with a Carboxylic Group in the Side Chain. *Steroids* **2014**, 85, 58-64.
14. Carvajal, R.; González, C.; Olea, A.; 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.

15. 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.
16. 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.
17. Ahammed, G.; Li, X.; Liu, A.; Chen, S. Brassinosteroids in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *J. Plant Growth Regul.* **2020**, 39, 1451-1464.
18. He, Y.; Li, Z. Roles of Brassinosteroids in Plant Reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 872.
19. Jordán, M.; Casaretto, J. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico, Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. **2006**, pp. 1-28.
20. McSteen, P.; Zhao, Y. Plant Hormones and Signaling: Common Themes and New Developments. *Dev. Cell* **2008**, 14, 467-473.
21. Shigenaga, A.; Argueso, C. No Hormone to Rule Them All: Interactions of Plant Hormones during the Responses of Plants to Pathogens. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2016**, 56, 174-189.
22. Bajguz, A.; Tretyn, A. The Chemical Characteristic and Distribution of Brassinosteroids in Plants. *Phytochemistry* **2003**, 62, 1027-1046.
23. Khripach, V.; Zhabinskii, V.; Groot, A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Ann. Bot.* **2000**, 86, 441-447.
24. Bajguz Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, 45, 95-107.
25. Moreno-Castillo, E.; Ramírez-Echemendía, D.; Hernán-Campoalegre, G.; Mesa-Tajada, D.; Coll-Manchado, F.; Coll-García, Y. In Silico Identification of New Potentially Active Brassinosteroid Analogues. *Steroids* **2018**, 138, 35-42.
26. Echeverría, M. "Síntesis de Tres Nuevos Análogos de Brasinoesteroides Benzoilados de La Serie I, Obtenidos Desde El Ácido Hiodeoxicólico", Universidad Técnica Federico Santa María Sede Viña del Mar-José Miguel Carrera: Valparaíso, **2021**.
27. Díaz, K.; Espinoza, L.; Carvajal, R.; Conde-González, M.; Niebla, V.; Olea, A.; Coll, Y. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholesterol Type Analogs. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1832.
28. 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 -cholesterol and 23-benzoate function in the side chain. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 4808.
29. Oyarce, J.; Aitken, V.; González, C.; Ferrer, K.; Olea, A.; Parella, T.; Espinoza, L. Synthesis and Structural Determination of New Brassinosteroid 24-Nor-5 α -Cholesterol Type Analogs. *Molecules* **2019**, 24, 4612.

30. Quezada, M. Síntesis y Caracterización Estructural Por Técnicas Espectroscópicas de Intermedios Para La Obtención de Nuevos Análogos de Brasinoesteroides Con Cadena Lateral Del Tipo 24-nor, Desde Ácido Hiodeoxicólico, Universidad Técnica Federico Santa María Sede Viña del Mar - José Miguel Carrera: Valparaíso, **2021**.
31. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Takematsu, T.; Takeuchi, Y.; Koguchi, M. Structure-Activity Relationship of Brassinosteroids. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2437-2441, doi:10.1016/0031-9422(83)80135-6.
32. Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Abe, H. Structure-Activity Relationship of Brassinosteroids with Respect to the A/B-Ring Functional Groups. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 211-216, doi:10.1248/cpb.35.211.
33. Kishi, T.; Wada, K.; Marumo, S.; Mori, K. Synthesis of Brassinolide Analogs with a Modified Ring B and Their Plant Growth-Promoting Activity. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 1821-1830, doi:10.1080/00021369.1986.10867640.
34. Okada, K.; Mori, K. Stereoselective Synthesis of Dolicholide, a Plant Growth Promoting Steroid. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, 47, 925-926, doi:10.1271/bbb1961.47.925.
35. Mandava, N.B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1988**, 39, 23-52, doi:10.1146/annurev.pp.39.060188.000323.
36. Yokota, T.; Kim, S.K.; Fukui, Y.; Takahashi, N.; Takeuchi, Y.; Takematsu, T. Brassinosteroids and Sterols from a Green Alga, *Hydrodictyon Reticulatum*: Configuration at C-24. *Phytochemistry* **1987**, 26, 503-506, doi:10.1016/S0031-9422(00)81442-9.
37. Voigt, B.; Porzel, A.; Golsch, D.; Adam, W.; Adam, G. Regioselective Oxyfunctionalization of Brassinosteroids by Methyl (Trifluoromethyl)Dioxirane: Synthesis of 25-Hydroxy-Brassinolide and 25-Hydroxy-24-Epibrassinolide by Direct C-H Insertion. *Tetrahedron* **1996**, 52, 10653-10658, doi:10.1016/0040-4020(96)00587-X.
38. Galagovsky, L.R.; Gros, E.G.; Ramírez, J.A. Synthesis and Bioactivity of Natural and C-3 Fluorinated Biosynthetic Precursors of 28-Homobrassinolide. *Phytochemistry* **2001**, 58, 973-980, doi:10.1016/S0031-9422(01)00379-X.
39. Abe, H.; Asakawa, S.; Ando, T.; Mouri, T.; Aburatani, M.; Takeuchi, T. Effect of Introducing a Lactone Group into Typhasterol and Teasterone to Promote Rice Lamina Inclination. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, 56, 1312-1313, doi:10.1271/bbb.56.1312.
40. Schmidt, J.; Voigt, B.; Adam, G. 2-Deoxybrassinolide—A Naturally Occurring Brassinosteroid from *Apium Graveolens*. *Phytochemistry* **1995**, 40, 1041-1043, doi:10.1016/0031-9422(95)00363-C.
41. Thompson, M.J.; Mandava, N.; Flippen-Anderson, J.L.; Worley, J.F.; Dutky, S.R.; Robbins, W.E.; Lusby, W. Synthesis of Brassino Steroids: New Plant-Growth-Promoting Steroids. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 5002-5004, doi:10.1021/jo00394a066.
42. Richter, K.; Koolman, J. *Antiecdysteroid Effects of Brassinosteroids in Insects*; **1991**; Cutler HG, Yokota T, Adam G (eds), Brassinosteroids - Chemistry, Bioactivity and Applications, pp. 265-278. American Chemical Society, Washington, USA.

43. Seto, H.; Fujioka, S.; Koshino, H.; Suenaga, T.; Yoshida, S.; Watanabe, T.; Takatsuto, S. Epimerization at C-5 of Brassinolide with Sodium Methoxide and the Biological Activity of 5-Epi-Brassinolide in the Rice Lamina Inclination Test. *Journal of the Chemical Society* **1998**, 1, 3355-3358, doi:10.1039/a805945d.
44. 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.
45. Aburatani, M.; Takeuchi, T.; Mori, K. Facile Syntheses of Brassinosteroids: Brassinolide, Castasterone, Teasterone and Typhasterol. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51, 1909-1913, doi:10.1080/00021369.1987.10868284.
46. Kohout, L.; Velgová, H.; Strnad, M.; Kamínek, M. Brassin Steroids with Androstane and Pregnane Skeleton. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1987**, 52, 476-486, doi:10.1135/cccc19870476.
47. 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.
48. Oh, M.; Honey, S.; Tax, F. The Control of Cell Expansion, Cell Division, and Vascular Development by Brassinosteroids: A Historical Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1743.
49. Cimino, P.; Núñez, G.; Rosado-Abón, A.; Amesty, A.; Estévez-Braun, A.; Díaz, K.; Iglesias-Arteaga, M. Methyl Esters of 23, 24-Dinor-5 α -Cholan-22-Oic Acids as Brassinosteroid Analogues. *Synthesis, Evaluation of Plant Growth Promoting Activity and Molecular Docking. Steroids* **2023**, 196, 109248.
50. Teixeira Zullo, M.A.; Kohout, L.; de Burgos Martins de Azevedo, M. Some Notes on the Terminology of Brassinosteroids. *Plant Growth Regul.* **2003**, 39, 1-11, doi:10.1023/A:1021802910454.
51. 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.
52. Kvasnica, M.; Oklestkova, J.; Bazgier, V.; Rávorá, L.; Korinkova, P.; Mikulík, J.; Strnad, M. Design, Synthesis and Biological Activities of New Brassinosteroid Analogues with a Phenyl Group in the Side Chain. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 8691-8701.
53. 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.
54. 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.
55. 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, 472, doi:10.3389/fpls.2019.00472.

56. Hothorn, M.; Belkhadir, Y.; Dreux, M.; Dabi, T.; Noel, Joseph.P.; Wilson, I.A.; Chory, J. Structural Basis of Steroid Hormone Perception by the Receptor Kinase BRI1. *Nature* **2011**, 474, 467-471, doi:10.1038/nature10153.
57. She, J.; Han, Z.; Kim, T.-W.; Wang, J.; Cheng, W.; Chang, J.; Shi, S.; Wang, J.; Yang, M.; Wang, Z.-Y.; et al. Structural Insight into Brassinosteroid Perception by BRI1. *Nature* **2011**, 474, 472–476, doi:10.1038/nature10178.
58. Sun, Y.; Han, Z.; Tang, J.; Hu, Z.; Chai, C.; Zhou, B.; Chai, J. Structure Reveals That BAK1 as a Co-Receptor Recognizes the BRI1-Bound Brassinolide. *Cell. Res.* **2013**, 23, 1326–1329, doi:10.1038/cr.2013.131.
59. Zhu, J.; Sae-Seaw, J.; Wang, Z. Brassinosteroid Signalling. *Development* **2013**, 140, 1615-1620.
60. Kohout, L.; Chodounská, H.; Macek, T.; 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. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2000**, 65, 1754-1761, doi:10.1135/cccc20001754.
61. Jiang, B.; Huang, L.; Tian, W.; Zhou, W. Methods for Construction of Sidechain of Brassinosteroids and Application to Syntheses of Brassinosteroids. *Studies in Natural Products Chemistry* **1996**, 19, 245-287, doi:10.1016/S1572-5995(96)80008-1.
62. 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.
63. Hunter, A.C.; Priest, S.-M. An Efficient One-Pot Synthesis Generating 4-Ene-3,6-Dione Functionalised Steroids from Steroidal 5-En-3 β -Ols Using a Modified Jones Oxidation Methodology. *Steroids* **2006**, 71, 30-33, doi:10.1016/j.steroids.2005.07.007.
64. Wang, S.-S.; Gisin, B.F.; Winter, D.P.; Makofske, R.; Kulesha, I.D.; Tzougraki, C.; Meienhofer, J. Facile Synthesis of Amino Acid and Peptide Esters under Mild Conditions via Cesium Salts. *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 1286-1290, doi:10.1021/jo00428a004.
65. Duran, M.; González, C.; Acosta, A.; Olea, A.; Díaz, K.; Espinoza, L. Synthesis of Five Known Brassinosteroid Analogs from Hyodeoxycholic Acid and Their Activities as Plant-Growth Regulators. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 516, doi:10.3390/ijms18030516.
66. 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.
67. 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.
68. 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.

69. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*; 4th ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2009**.
70. Kerb, U.; Eder, U.; Krämer, 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.
71. Zhou, W.; Tian, W. Studies on Steroidal Plant-Growth Hormones II: Stereoselective Synthesis of (22S,23S)-Typhasterol from Hyodeoxycholic Acid. *Acta Chimi. Sin.* **1985**, 43, 1060-1067.
72. Tian, W.; Zhou, W.; Jiang, B.; Pan, X. Studies on Steroidal Plant-Growth Regulator. IX. Preparation of 22R- and 22S-24,25,26,27,28-Pentanorbrassinolides. *Acta Chimi. Sin.* **1989**, 47, 1017-1021.
73. Černý, V.; Zajíček, 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, doi:10.1135/cccc19870215.
74. 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**, 24, 3579, doi:10.1039/p19940003579.
75. 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.

Anexo 1: Modos predictivos de unión con BRI1 y BRI1-BAK1 para **1**, **75'** y **78a-c**.

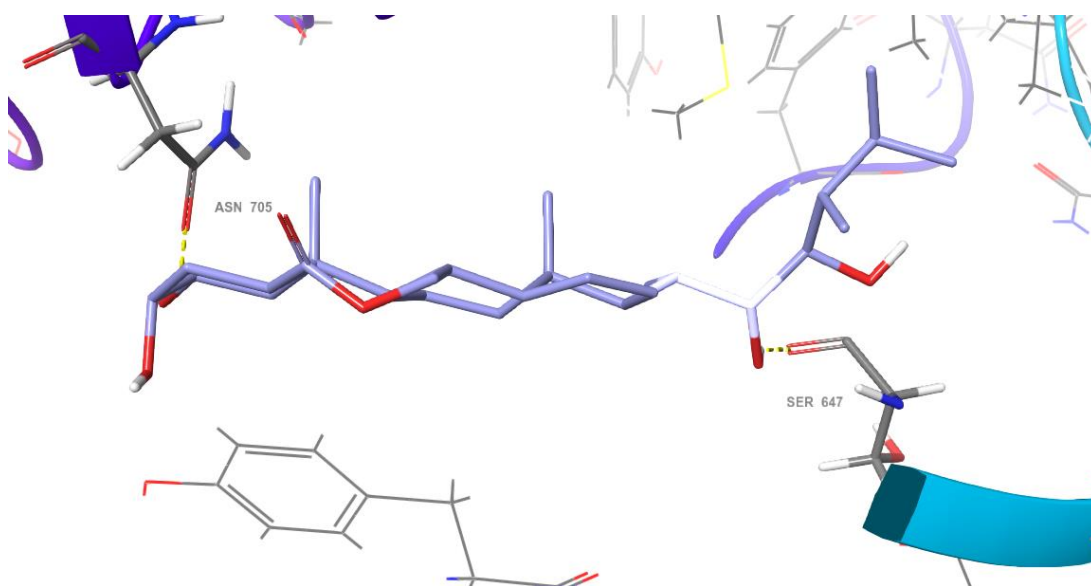


Figura A1. 1: Modo predictivo de unión de **1** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

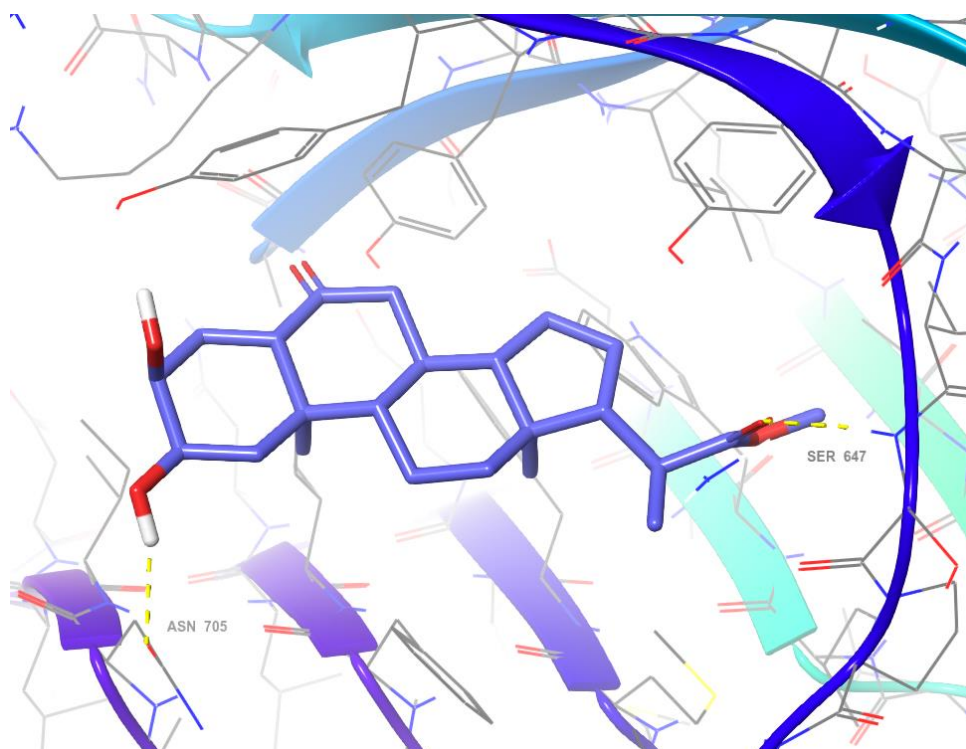


Figura A1. 2: Modo predictivo de unión de **75'** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

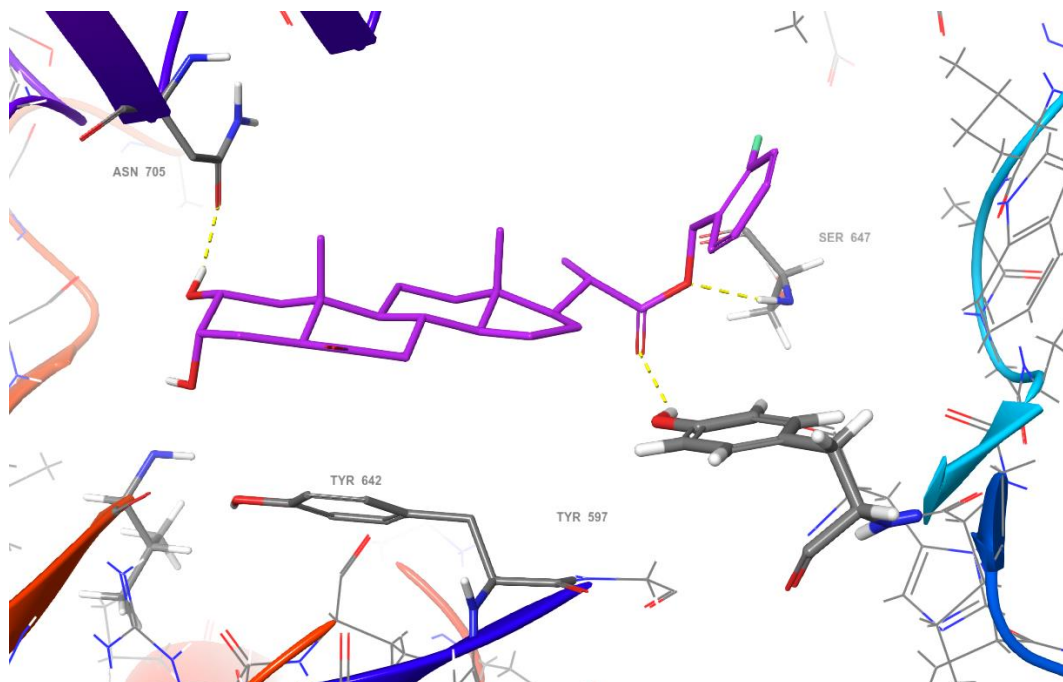


Figura A1. 3: Modo predictivo de unión de **78a** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

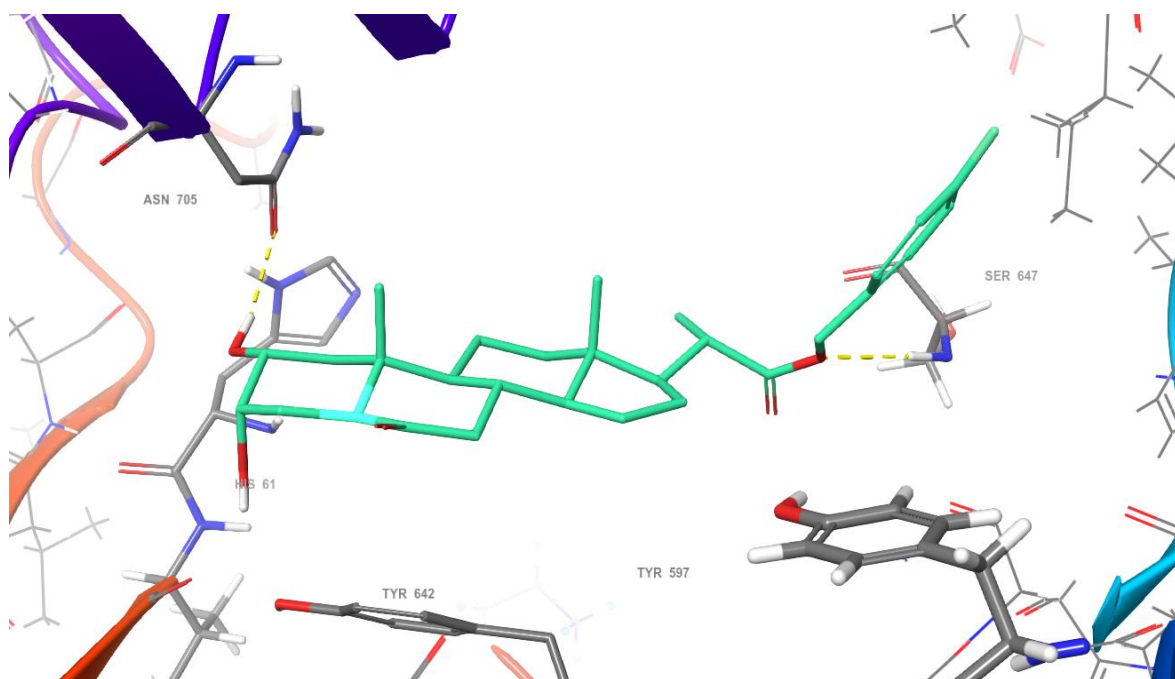


Figura A1. 4: Modo predictivo de unión de **78b** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

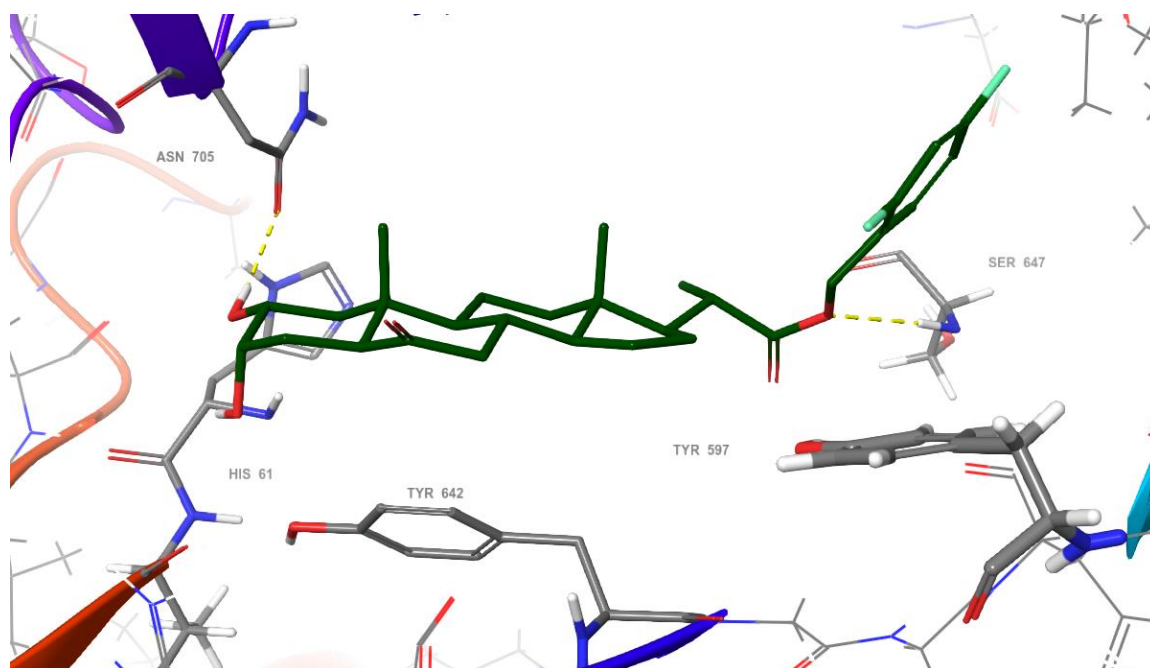


Figura A1. 5: Modo predictivo de unión de 78c en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

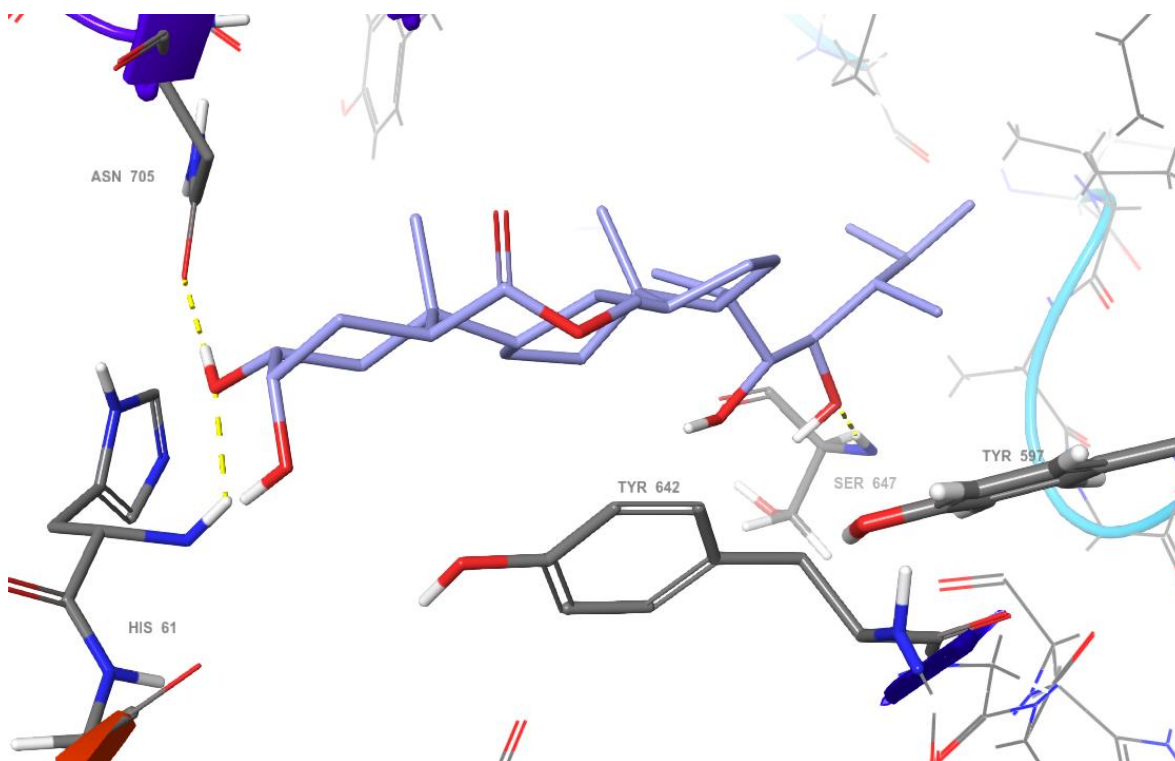


Figura A1. 6: Modo predictivo de unión de 1 en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

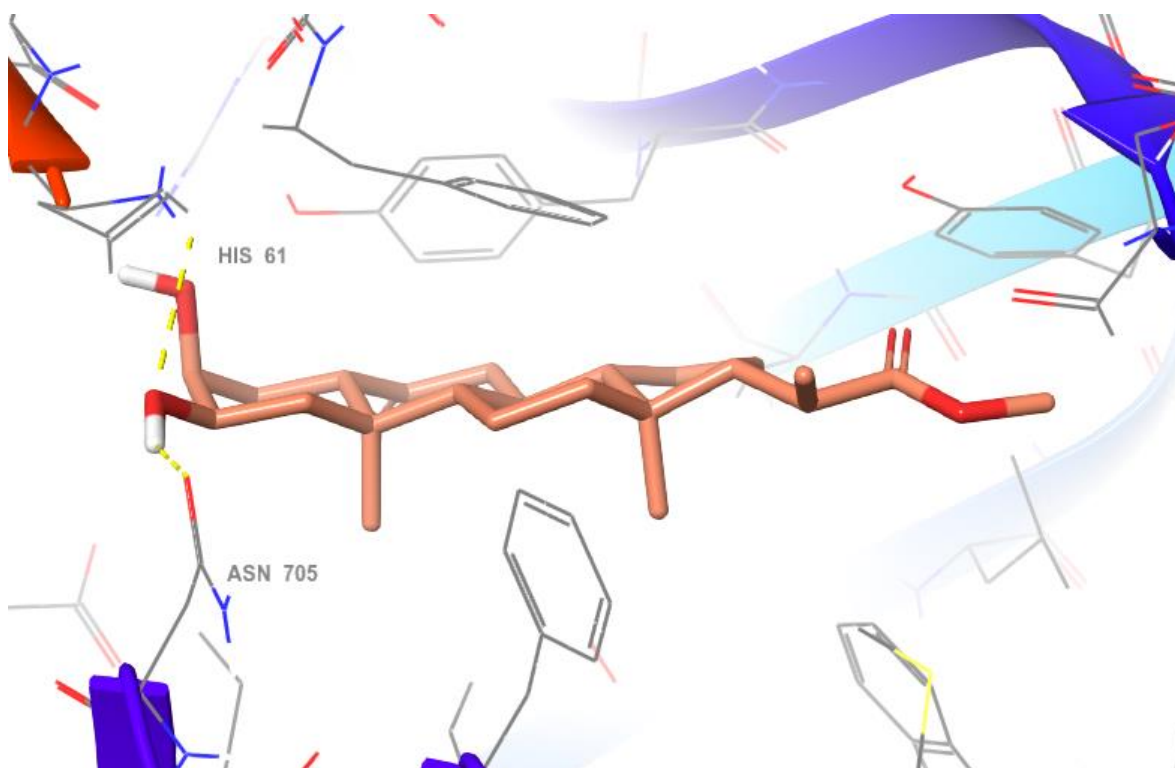


Figura A1. 7: Modo predictivo de unión de 75' en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

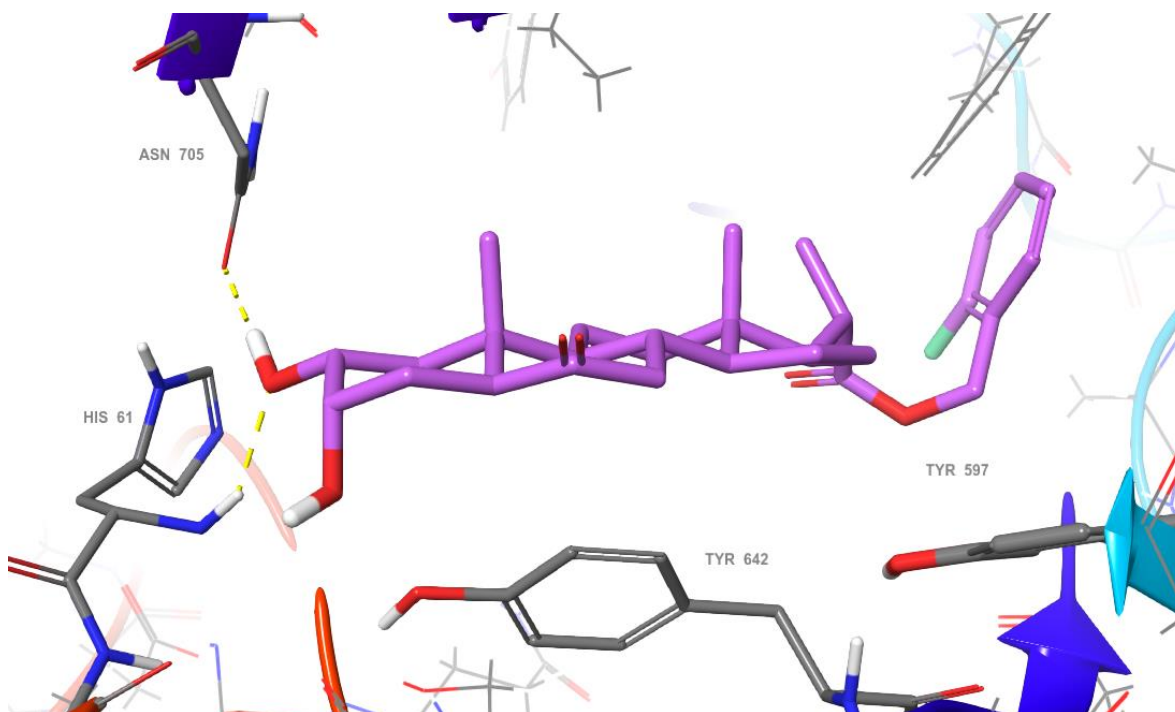


Figura A1. 8: Modo predictivo de unión de 78a en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

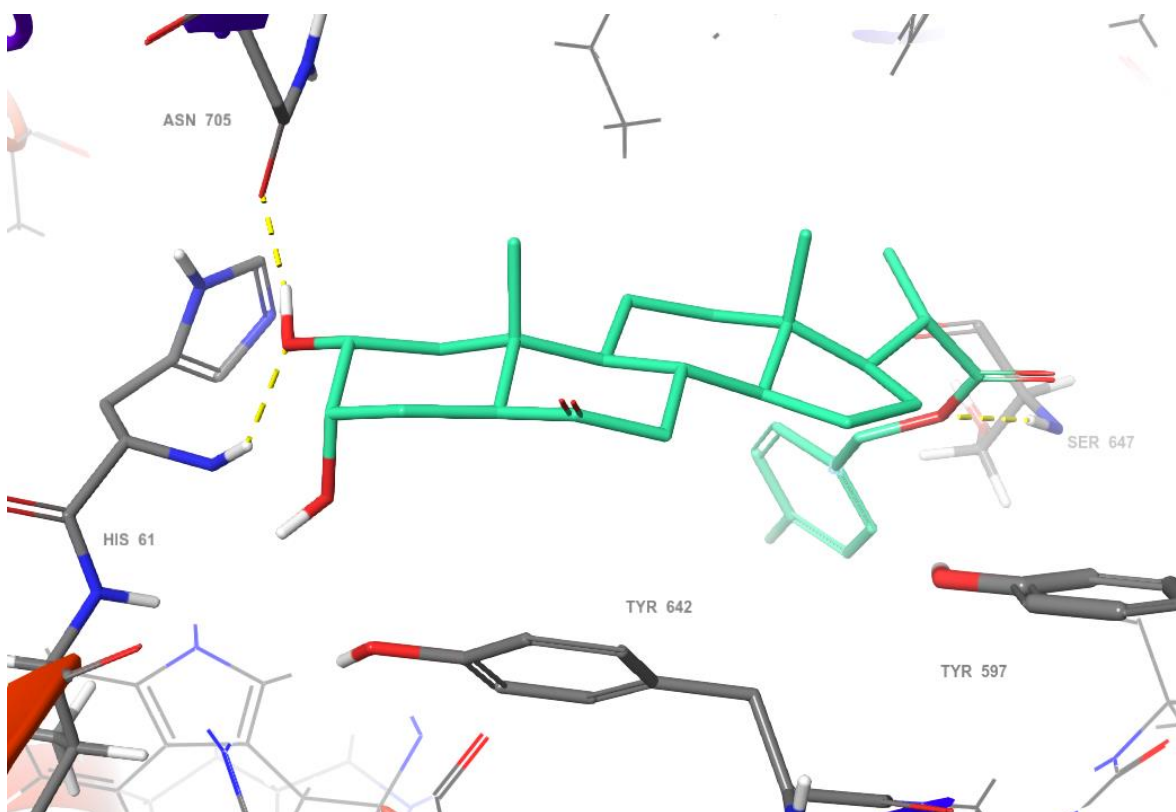


Figura A1. 9: Modo predictivo de unión de **78b** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

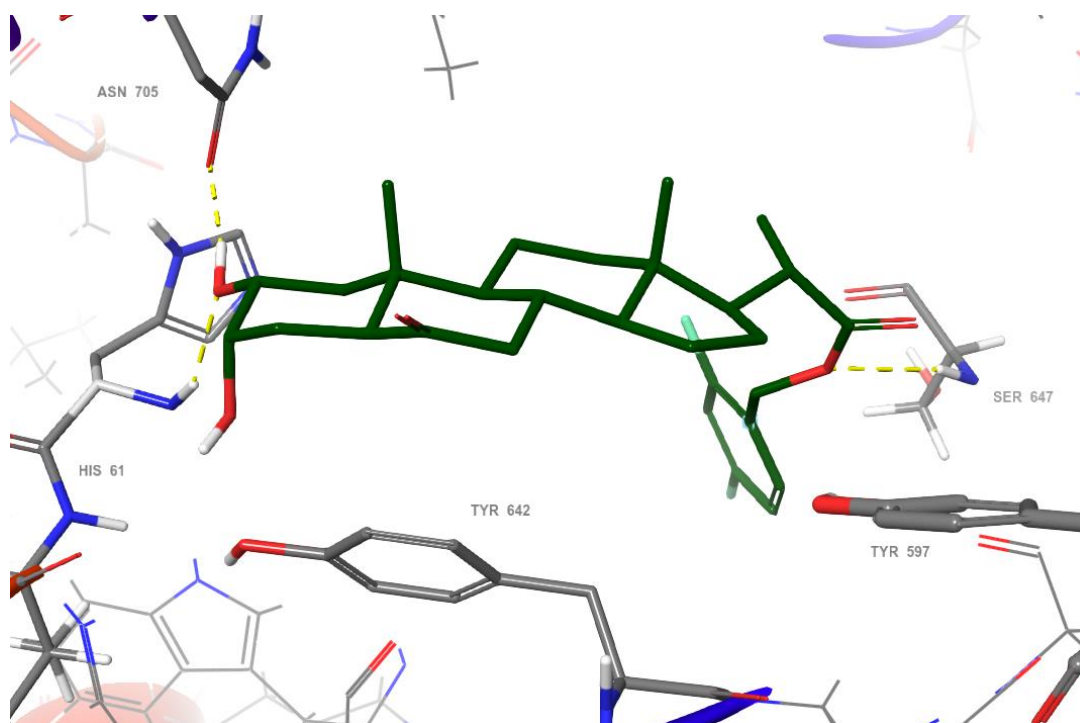


Figura A1. 10: Modo predictivo de unión de **78c** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

Anexo 2: Diagramas de interacciones con BRI1 y BRI1-BAK1 para **1**, **75'** y **78a-c**.

La nomenclatura gráfica de interacciones para los diagramas de interacciones 2D entre los aminoácidos del sitio activo y cada ligando se presenta en la Figura A2.1.



Figura A2. 1: Nomenclatura para diagramas de interacciones 2D.

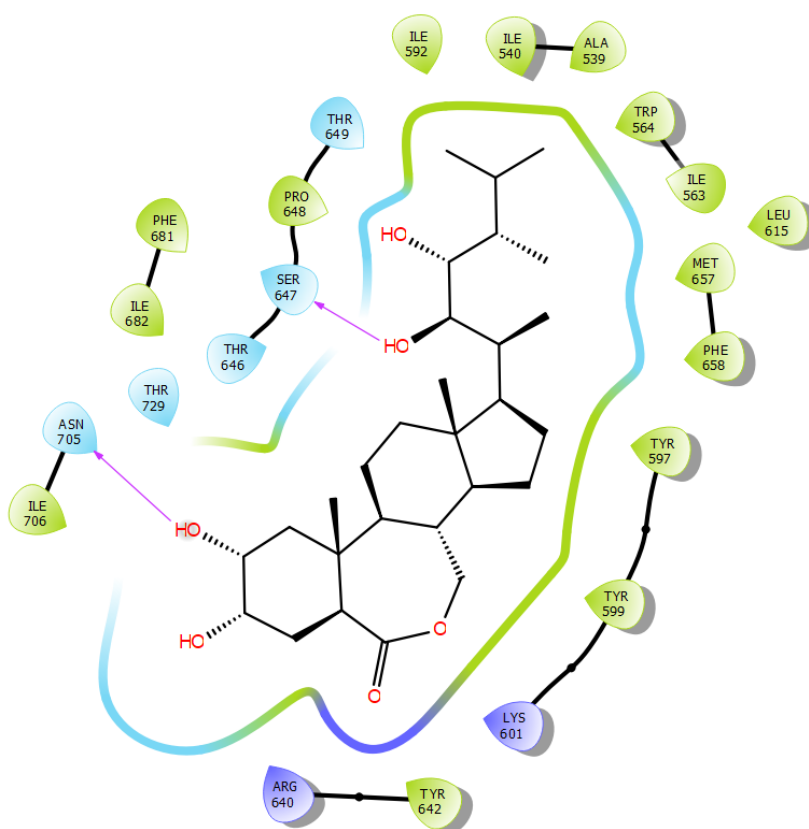


Figura A2. 2: Diagrama de interacciones de **1** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

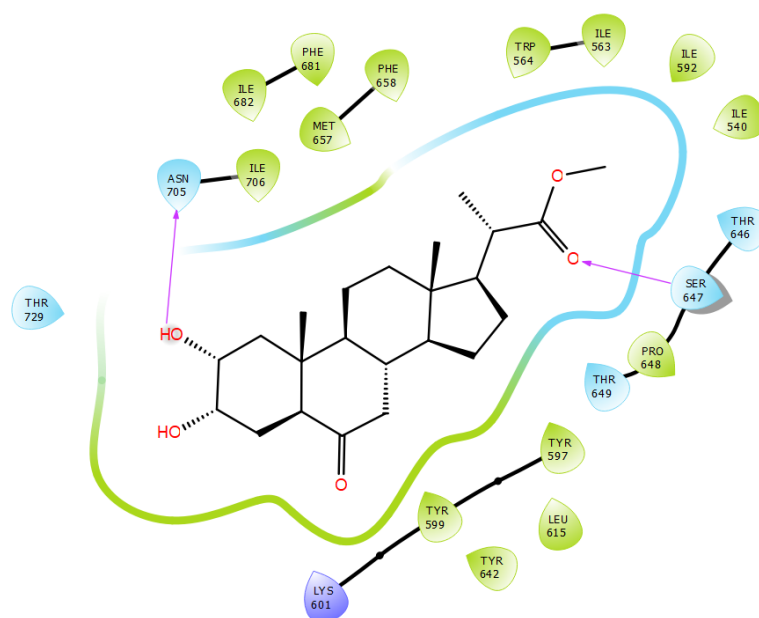


Figura A2. 3: Diagrama de interacciones de 75' en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

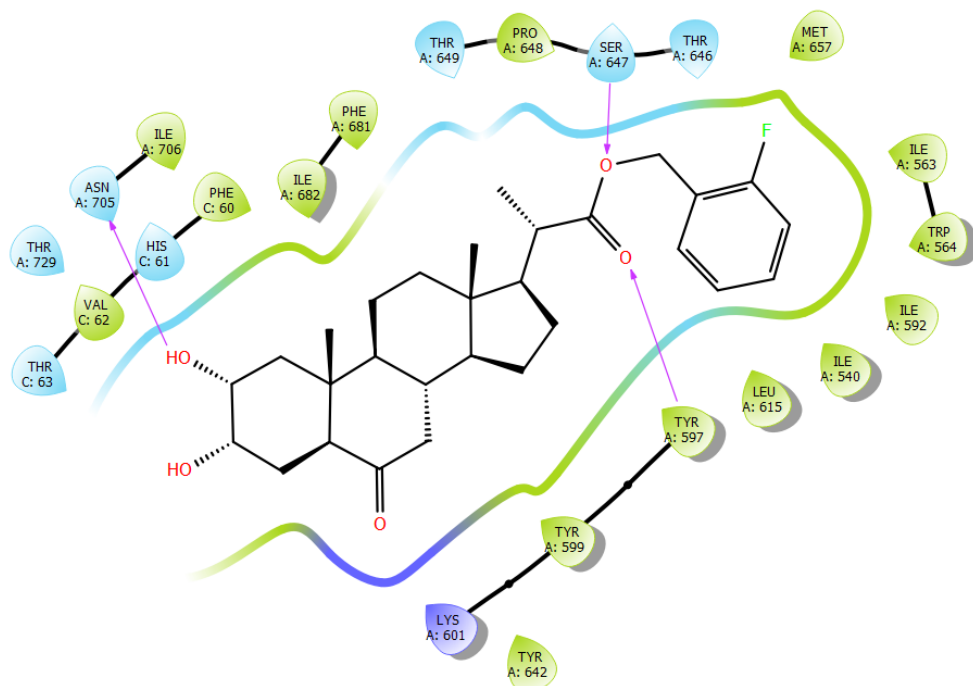


Figura A2. 4: Diagrama de interacciones de 78a en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

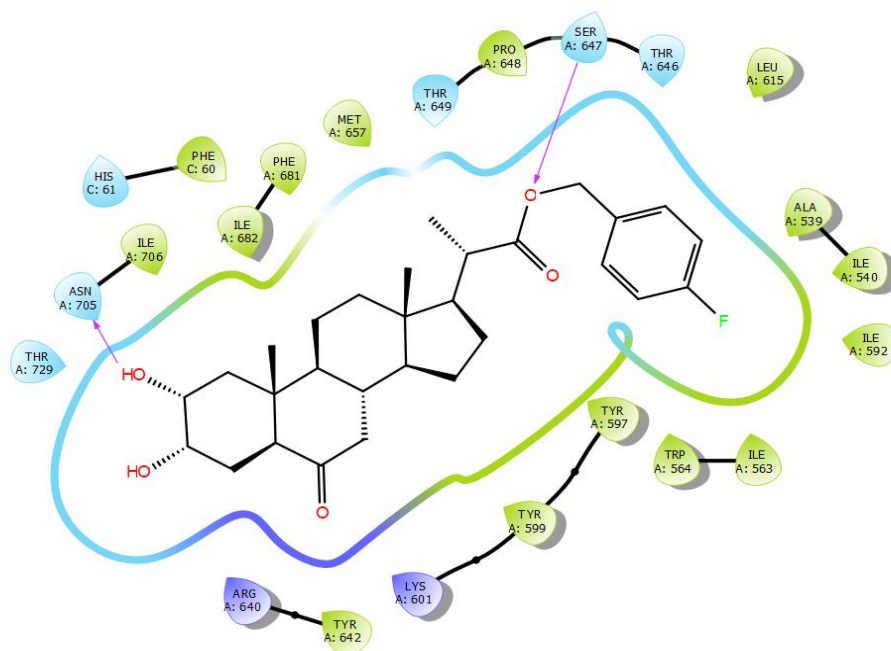


Figura A2. 5: Diagrama de interacciones de **78b** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

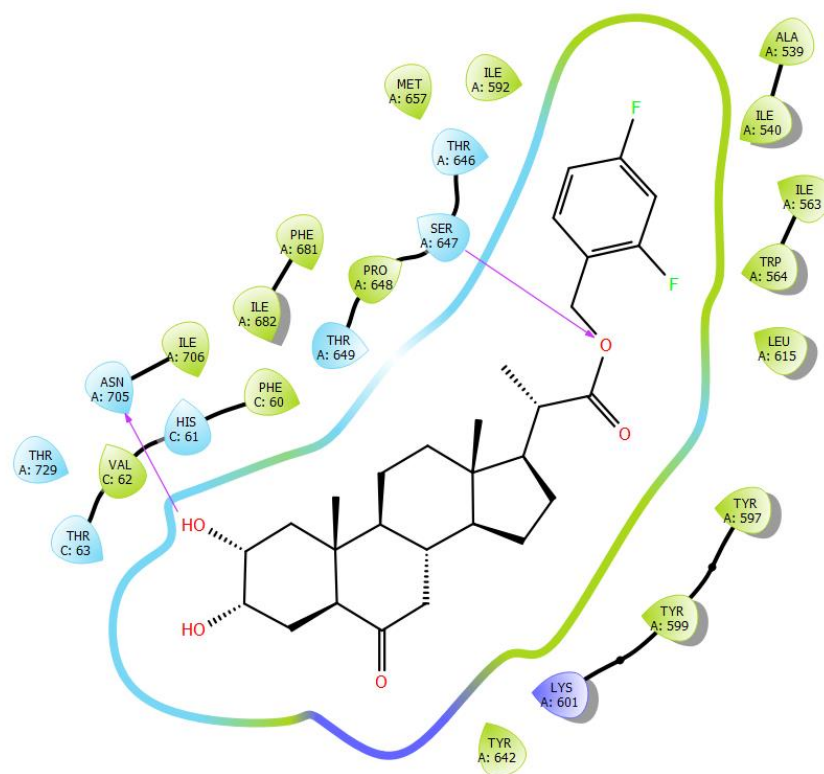


Figura A2. 6: Diagrama de interacciones de **78c** en el sitio de unión de BRI1 (PDB 4M7E).

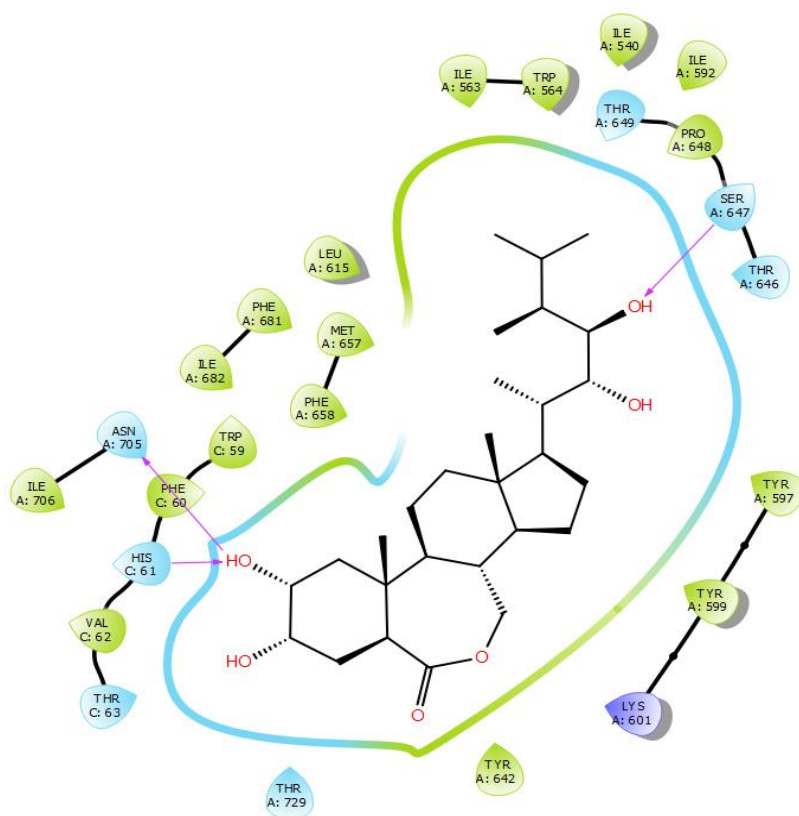


Figura A2. 7: Diagrama de interacciones de 1 en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

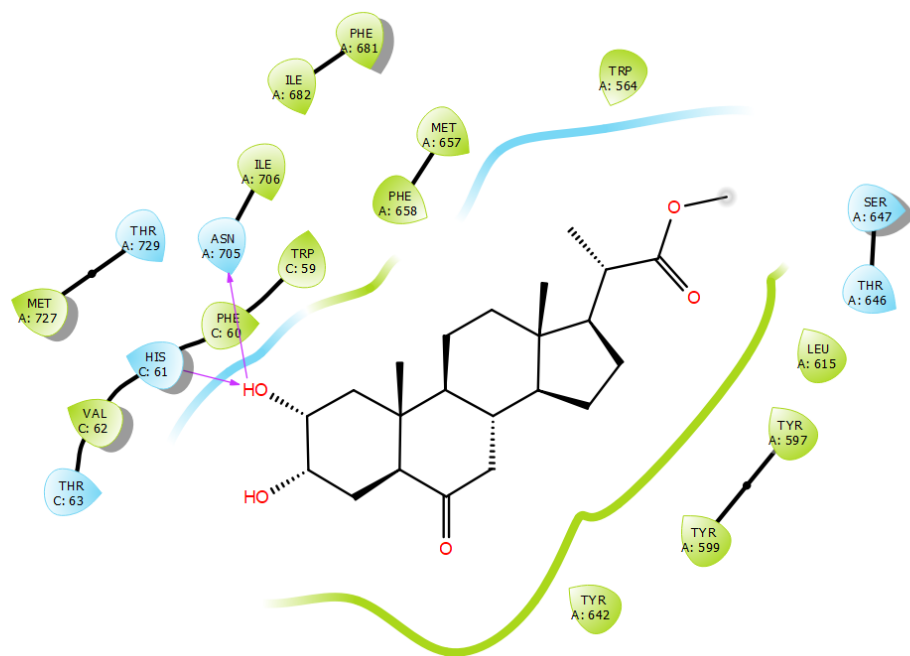


Figura A2. 8: Diagrama de interacciones de 75' en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

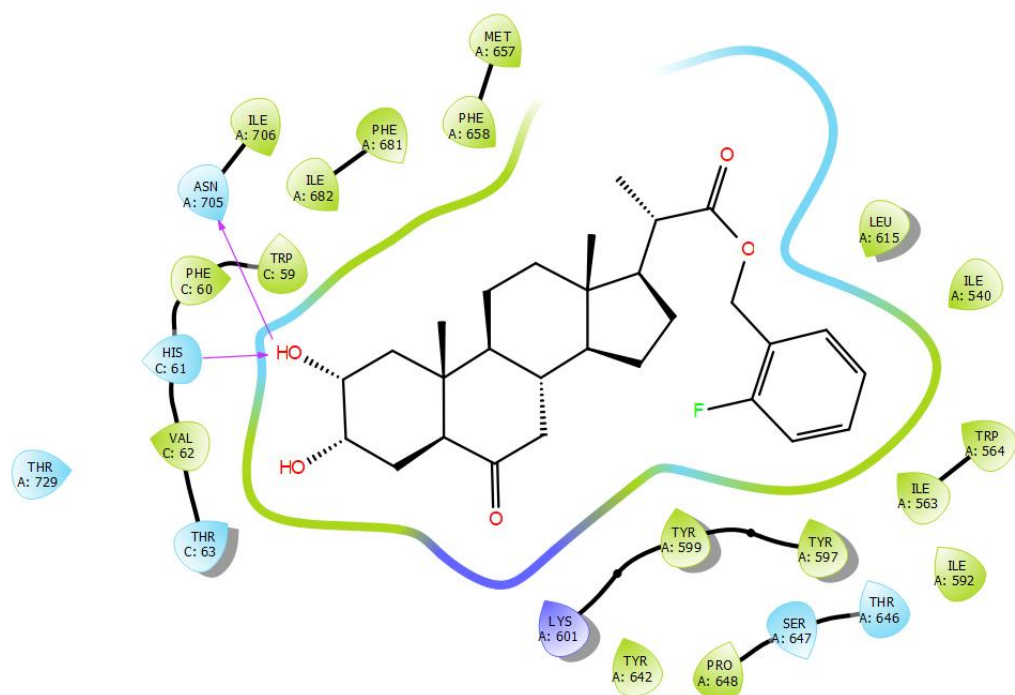


Figura A2. 9: Diagrama de interacciones de **78a** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

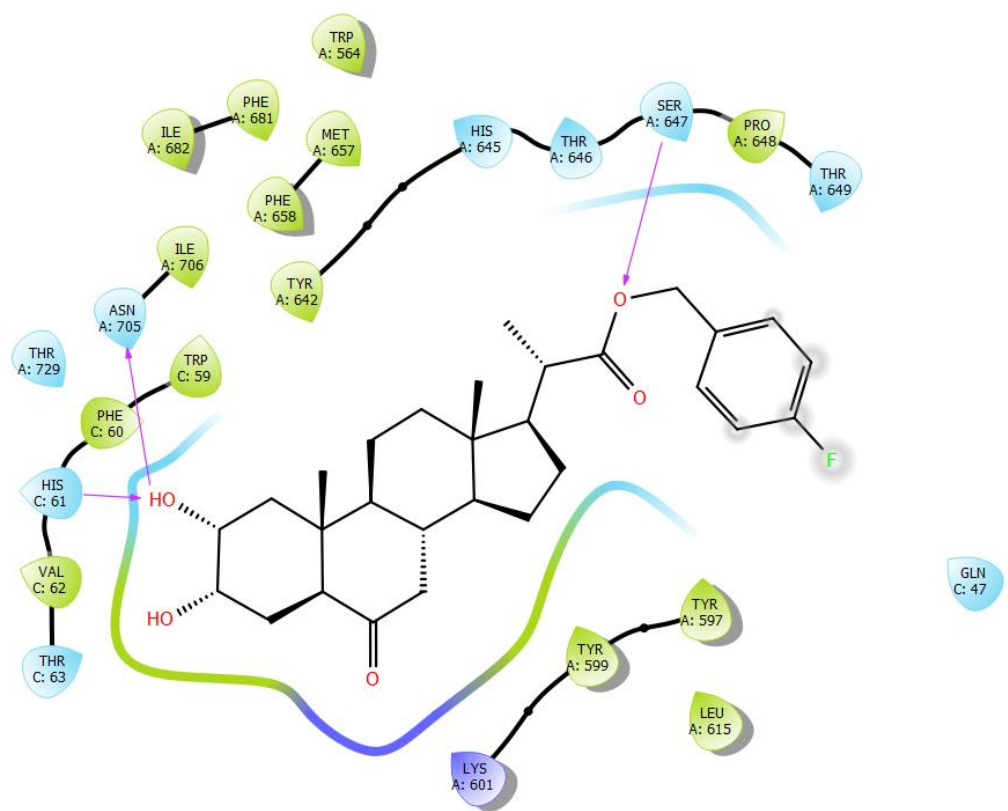


Figura A2. 10: Diagrama de interacciones de **78b** en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

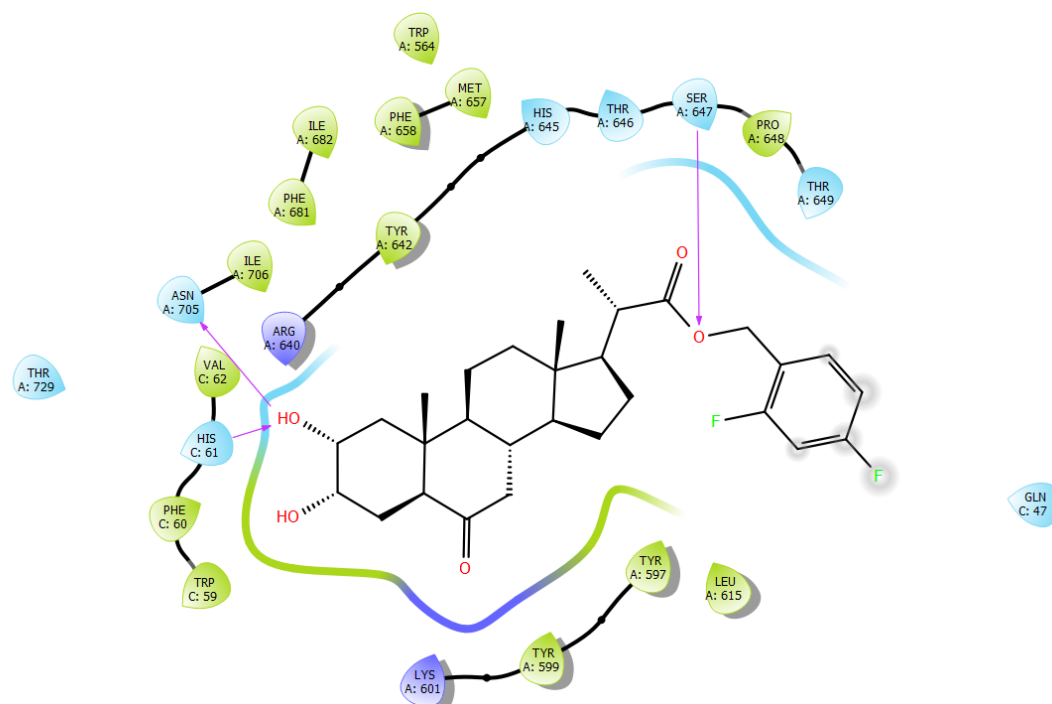


Figura A2. 11: Diagrama de interacciones de 78c en el sitio de unión de BRI1-BAK1 (PDB 4M7E).

Anexo 3: Espectros de RMN para los compuestos 69-75, 75', 76, 77a-c y 78a-c.

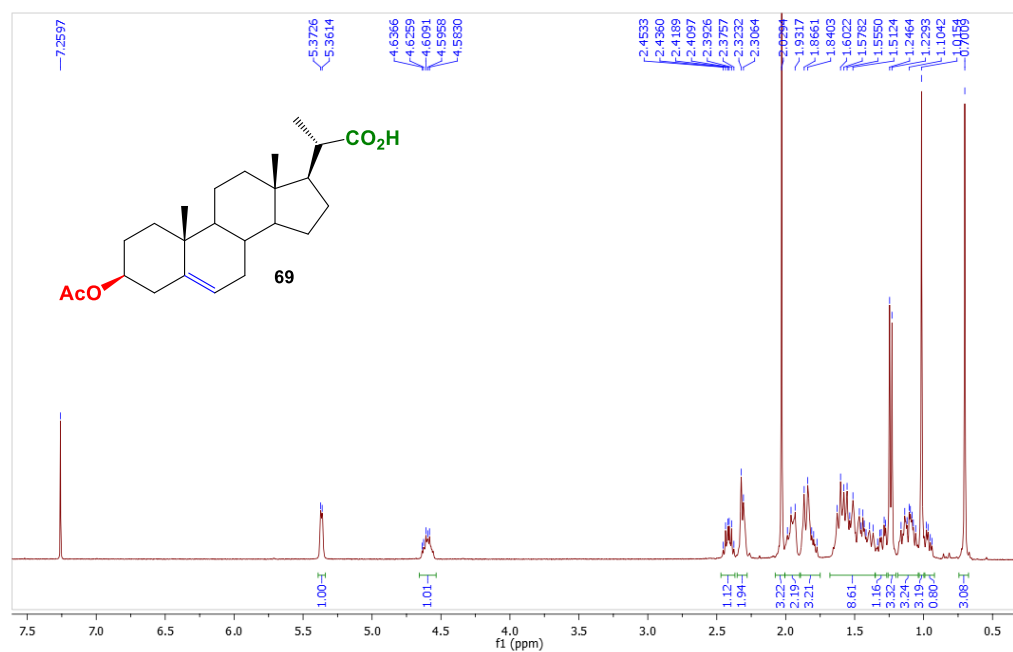


Figura A3. 1: Espectro de ^1H RMN de Ácido (20S)-3 β -acetoxi-5-pregnen-22-oico (69).

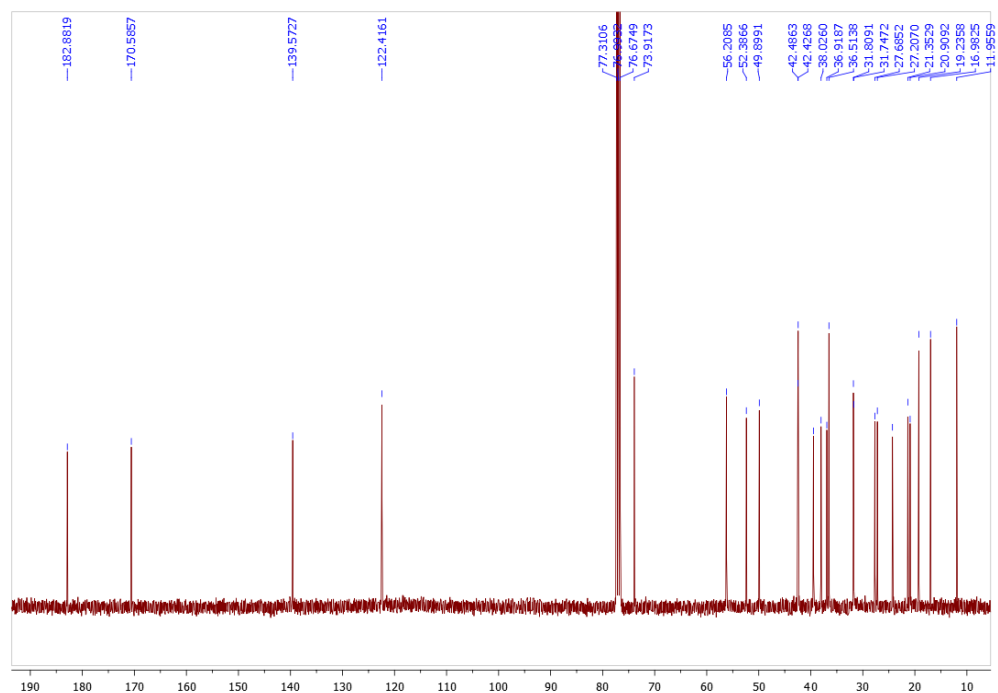


Figura A3. 2: Espectro de ^{13}C RMN de Ácido (20S)-3 β -acetoxi-5-pregnen-22-oico (69).

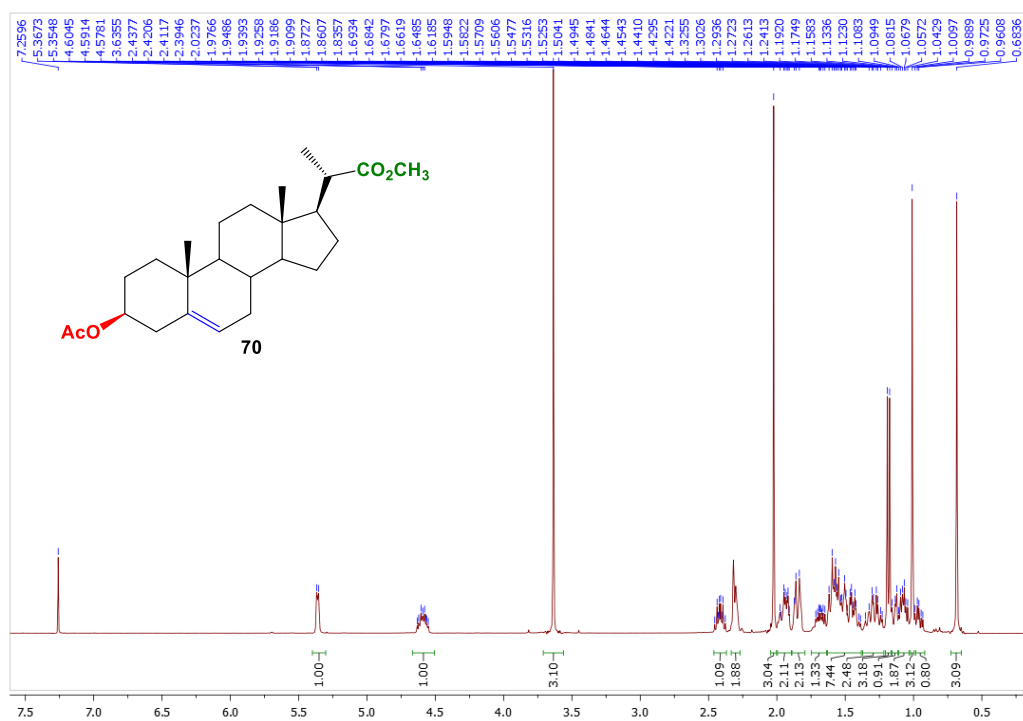


Figura A3. 3: Espectro de ^1H RMN de (20S)-3 β -acetoxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (70).

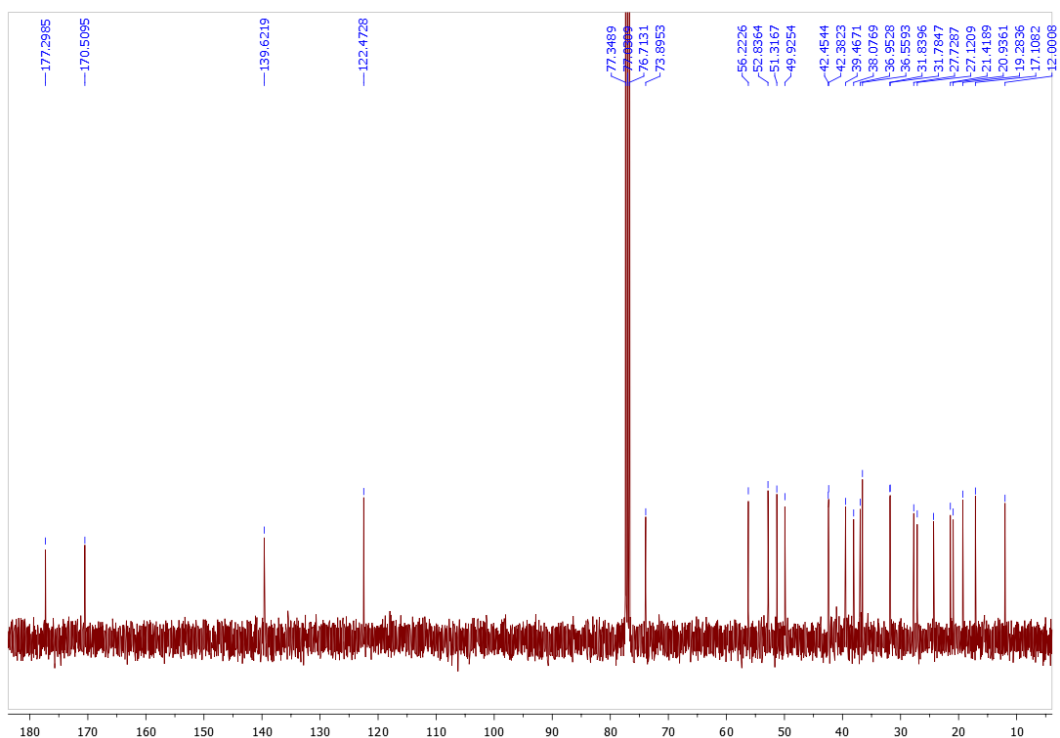


Figura A3. 4: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-3 β -acetoxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (70).

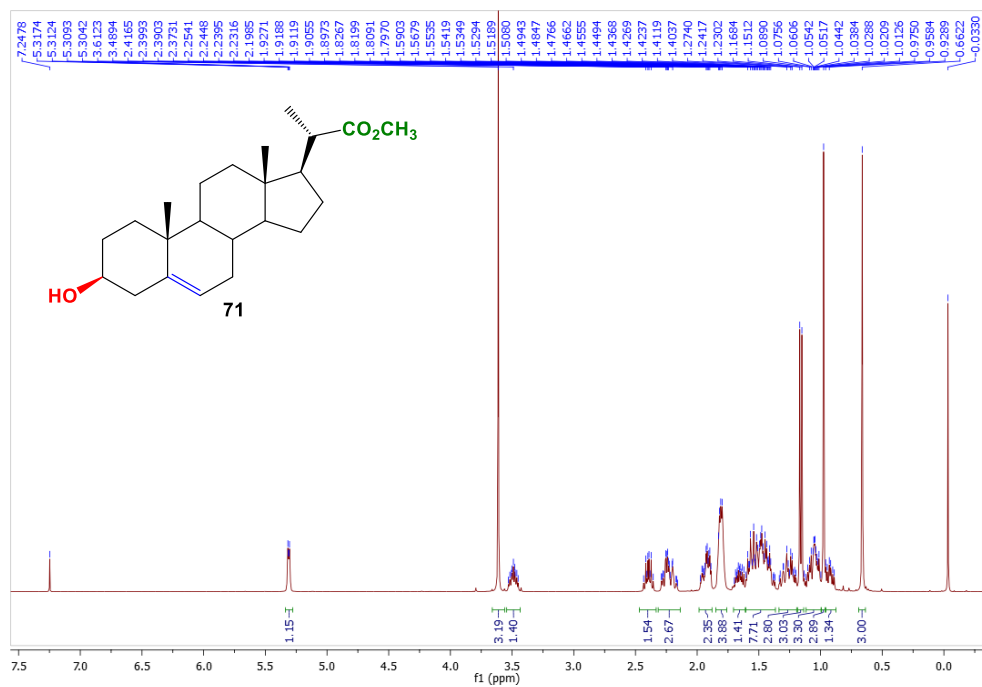


Figura A3. 5: Espectro de ^1H RMN de (20S)-3 β -hidroxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (71).

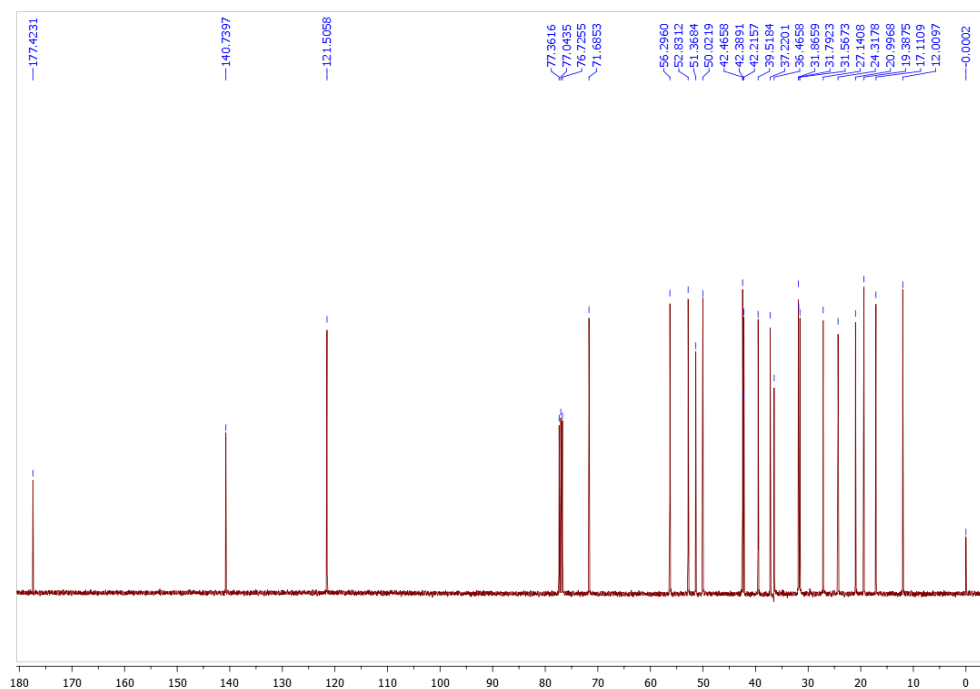


Figura A3. 6: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-3 β -hidroxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (71).

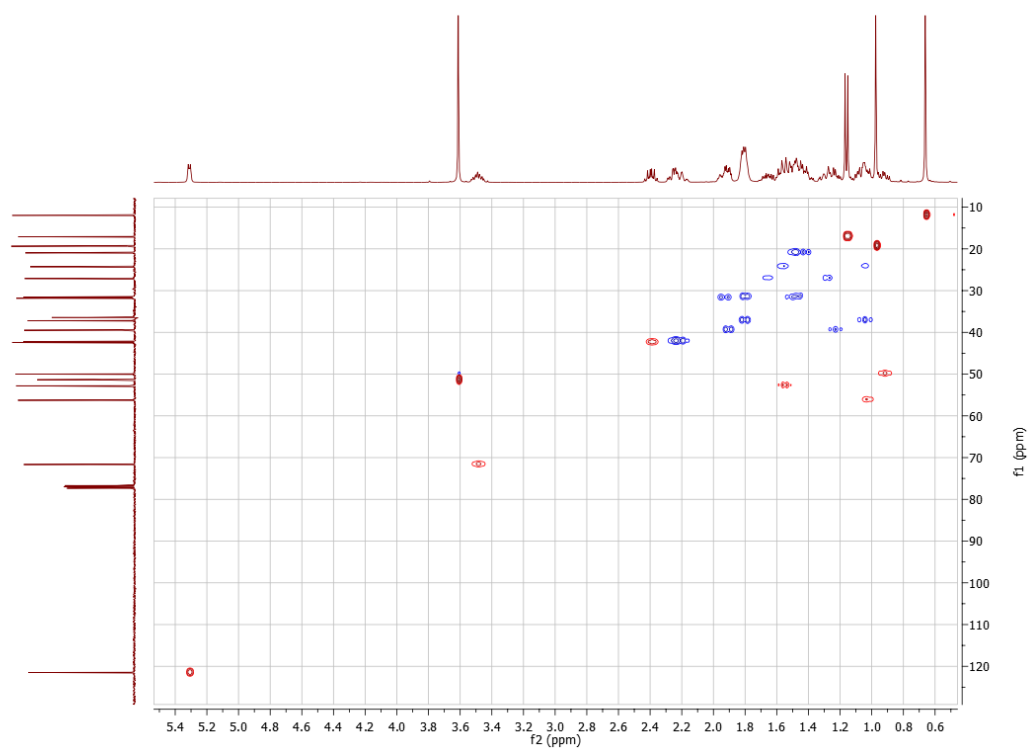


Figura A3. 7: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC-ed. de (20S)-3 β -hidroxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (71).

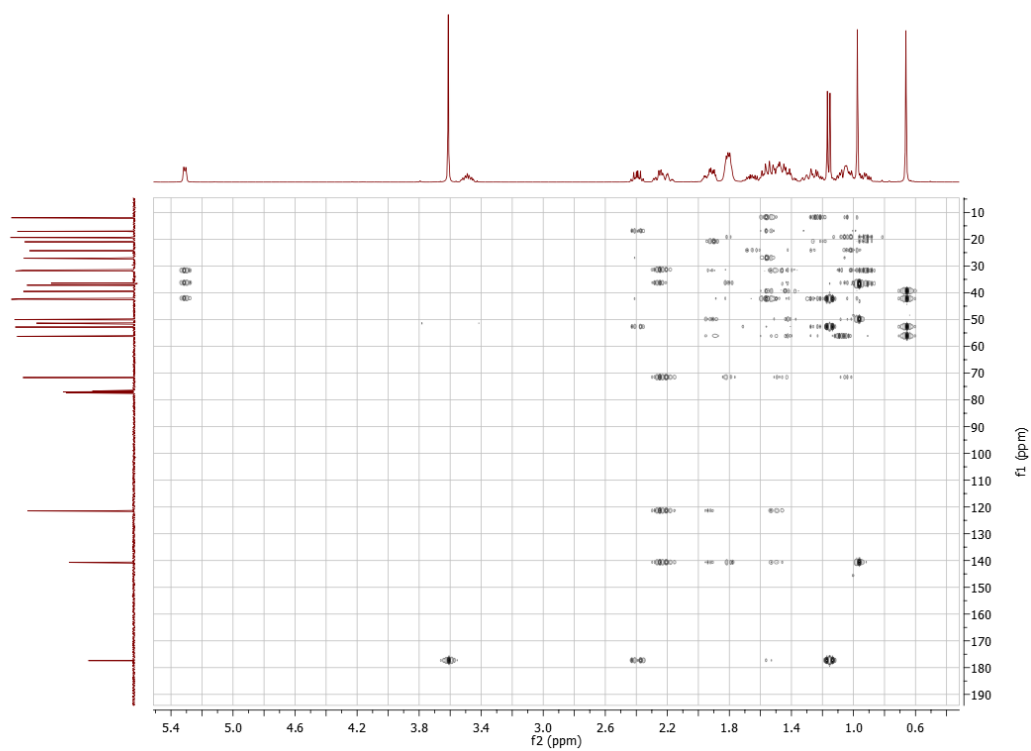


Figura A3. 8: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-3 β -hidroxi-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (71).

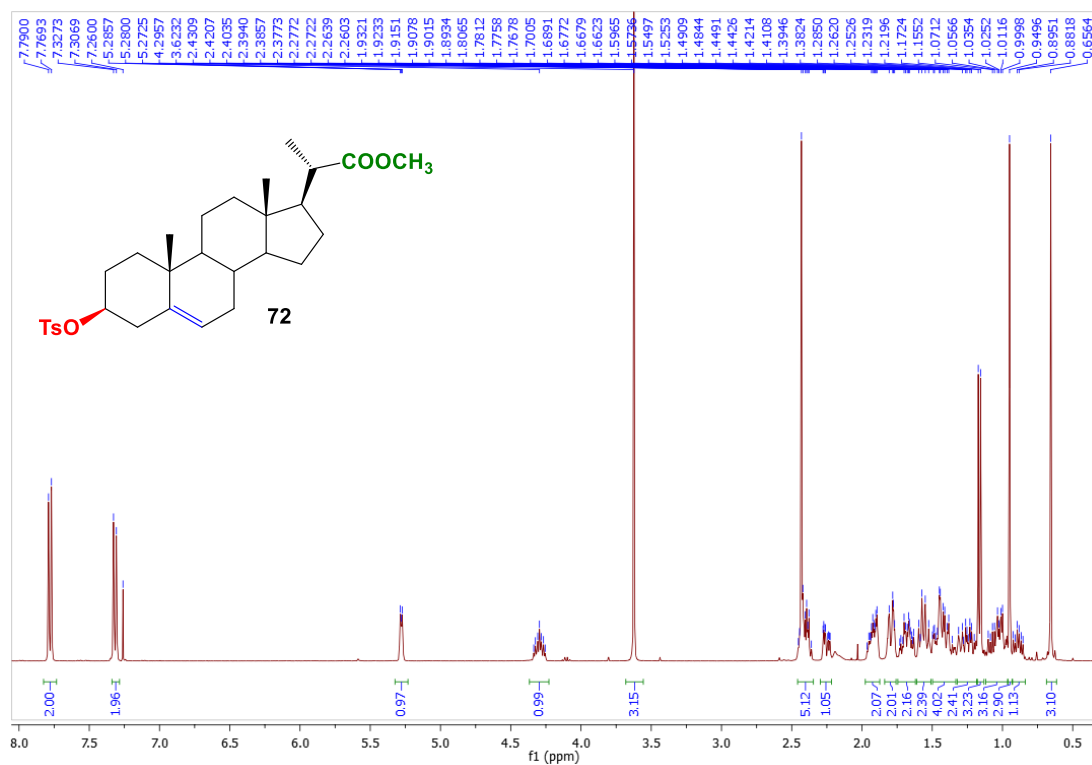


Figura A3. 9: Espectro de ^1H RMN de (20S)-3 β -(4-toluensulfoniloxi)-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (72).

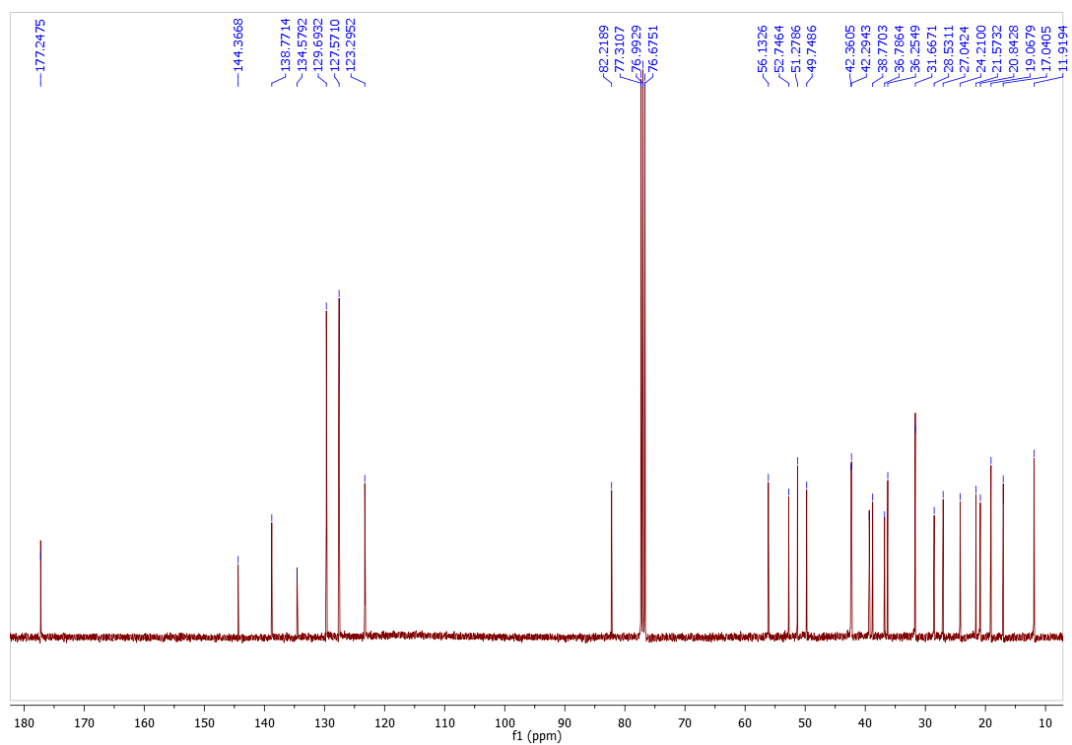


Figura A3. 10: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-3 β -(4-toluensulfoniloxi)-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (72).

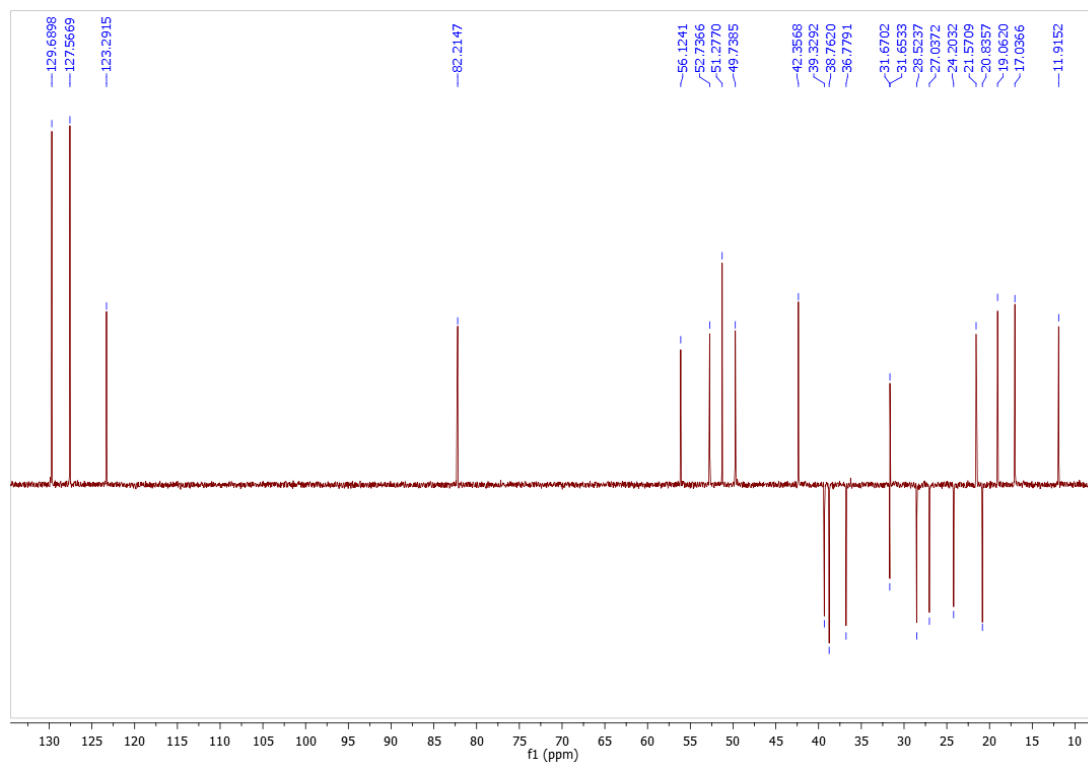


Figura A3. 11: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-3 β -(4-toluensulfoniloxi)-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (72).

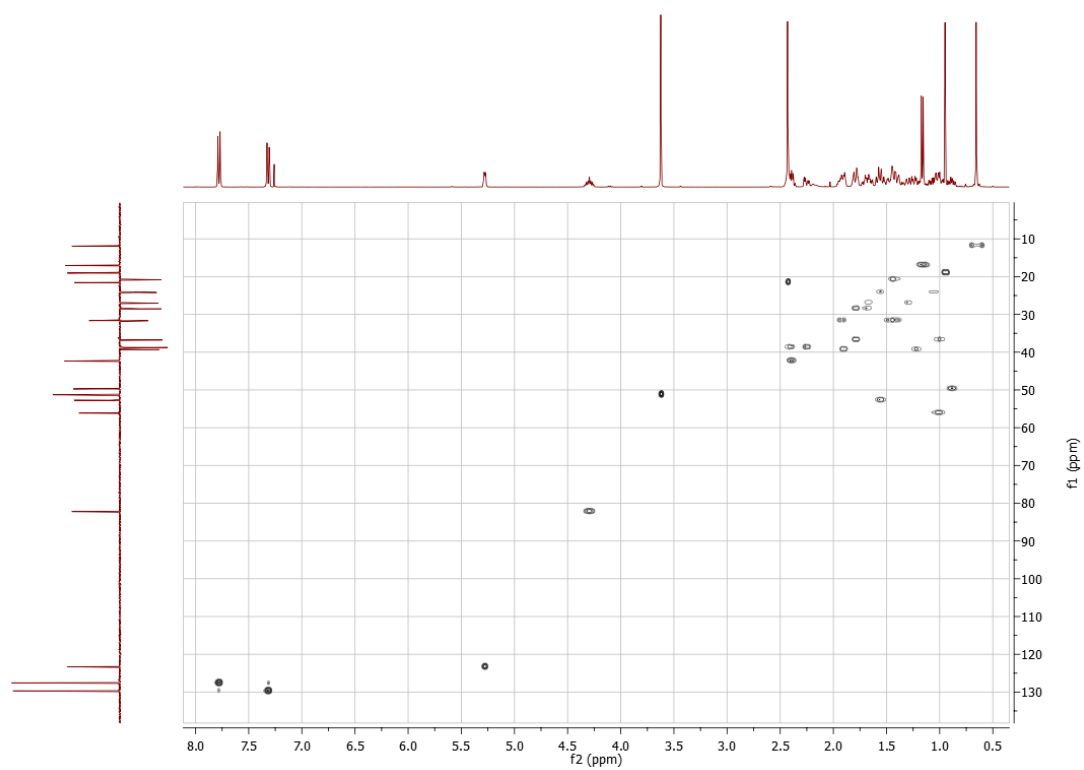


Figura A3. 12: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC de (20S)-3 β -(4-toluensulfoniloxi)-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (72).

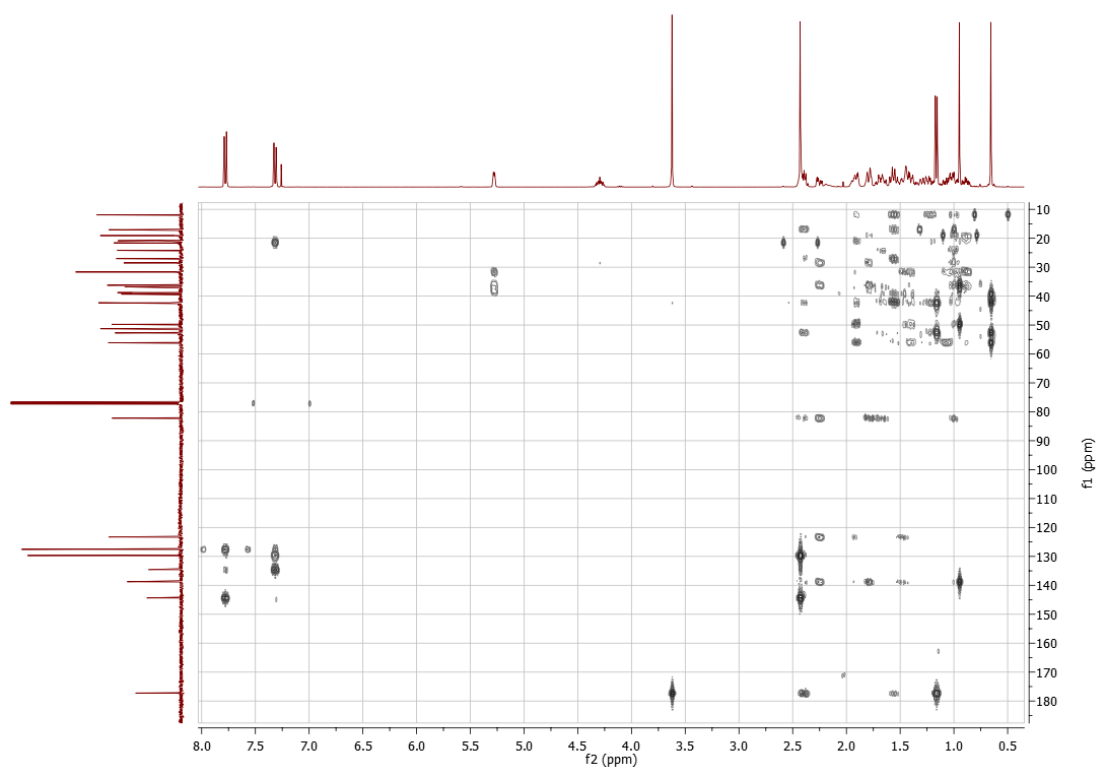


Figura A3. 13: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-3 β -(4-toluensulfoniloxi)-5-pregnen-22-carboxilato de metilo (72).

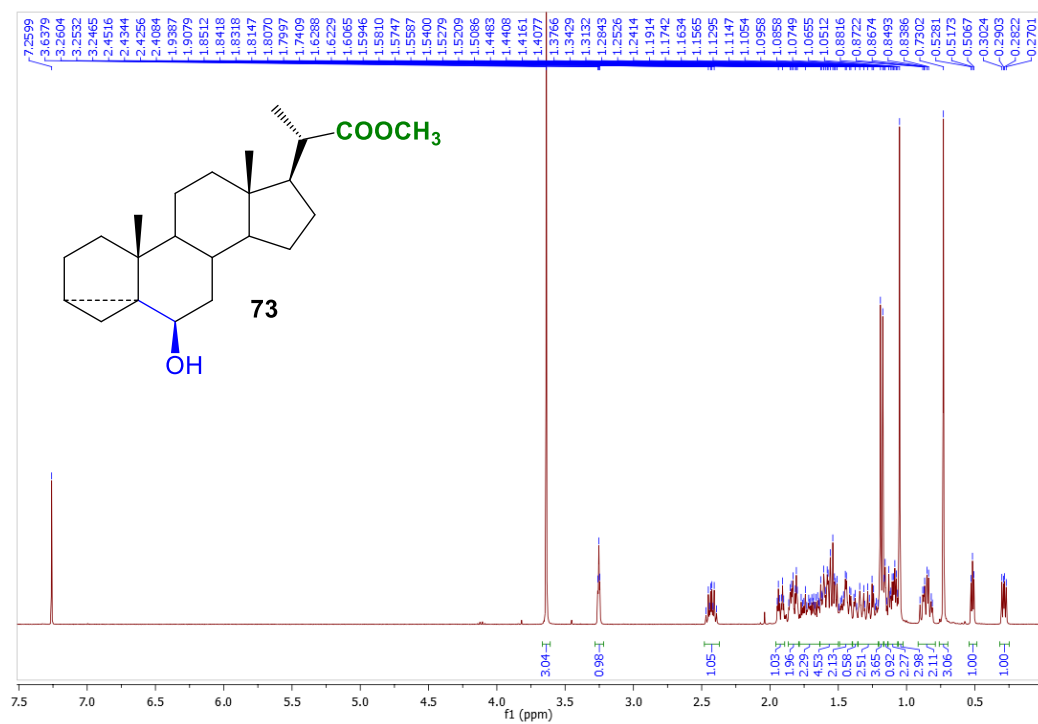


Figura A3. 14: Espectro de ¹H RMN de (20S)-6β-hidroxi-3α,5-ciclo-5α-pregnano-20-carboxilato de metilo (**73**).

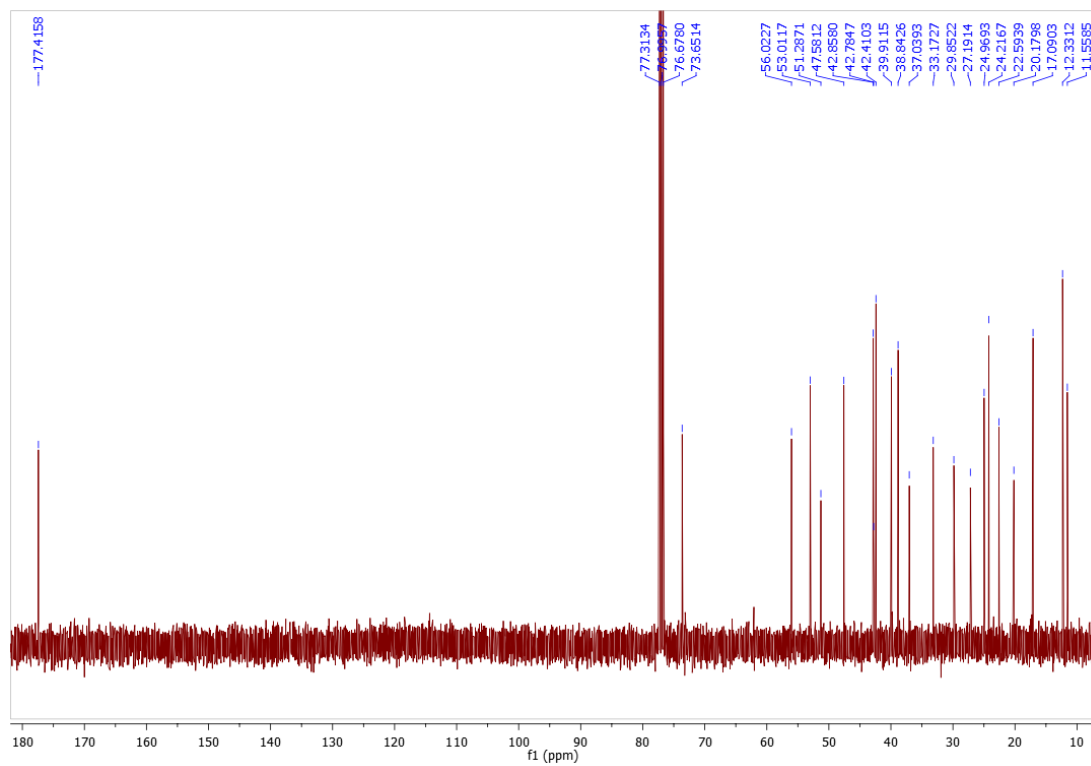


Figura A3. 15: Espectro de ¹³C RMN de (20S)-6β-hidroxi-3α,5-ciclo-5α-pregnano-20-carboxilato de metilo (**73**).

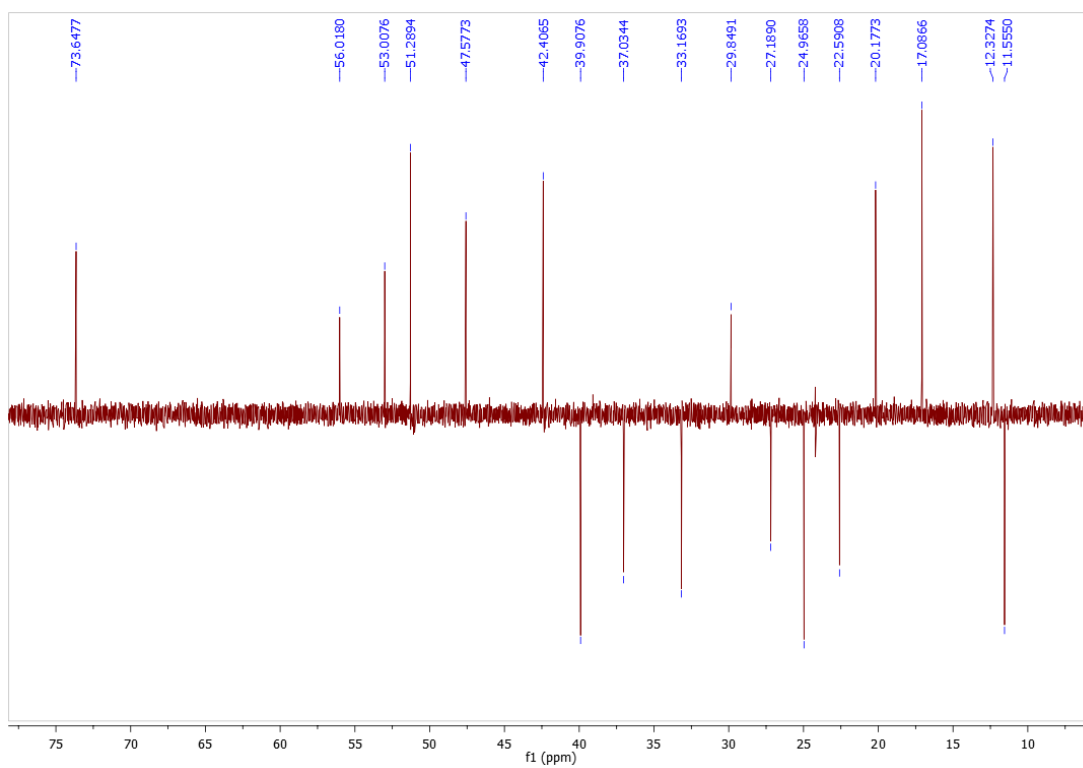


Figura A3. 16: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-6 β -hidroxi-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (73).

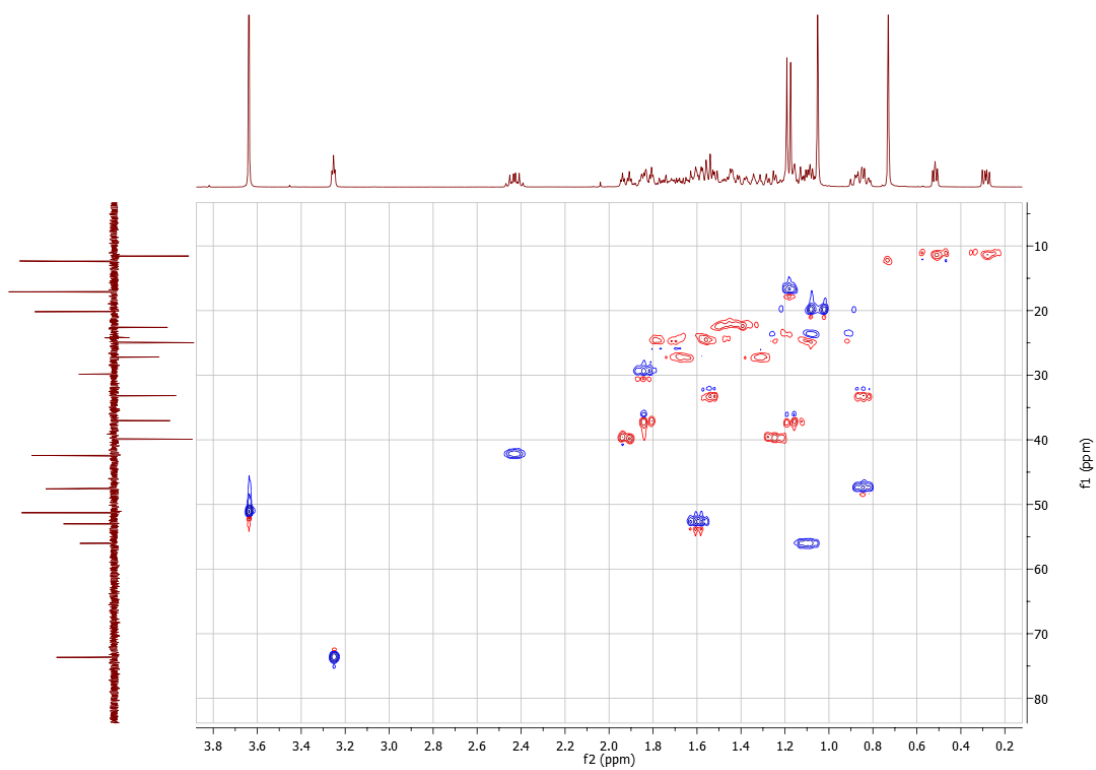


Figura A3. 17: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC-ed. de (20S)-6 β -hidroxi-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (73).

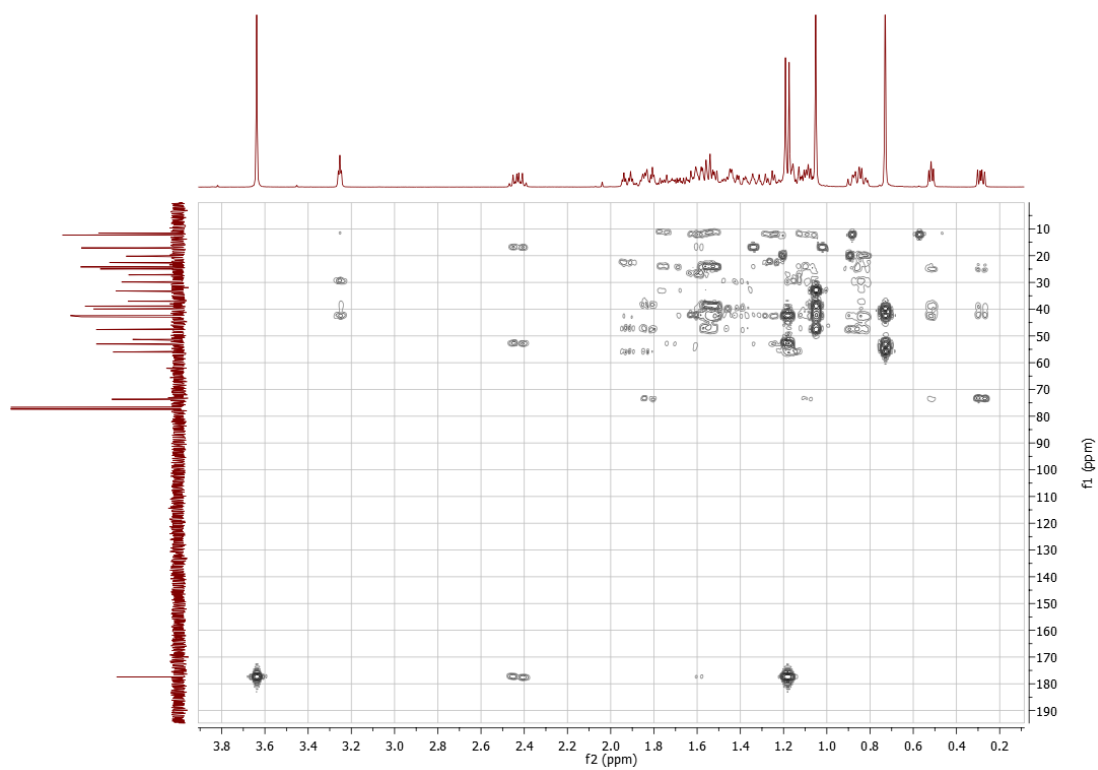


Figura A3. 18: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-6 β -hidroxi-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnano-20-carboxilato de metilo (**73**).

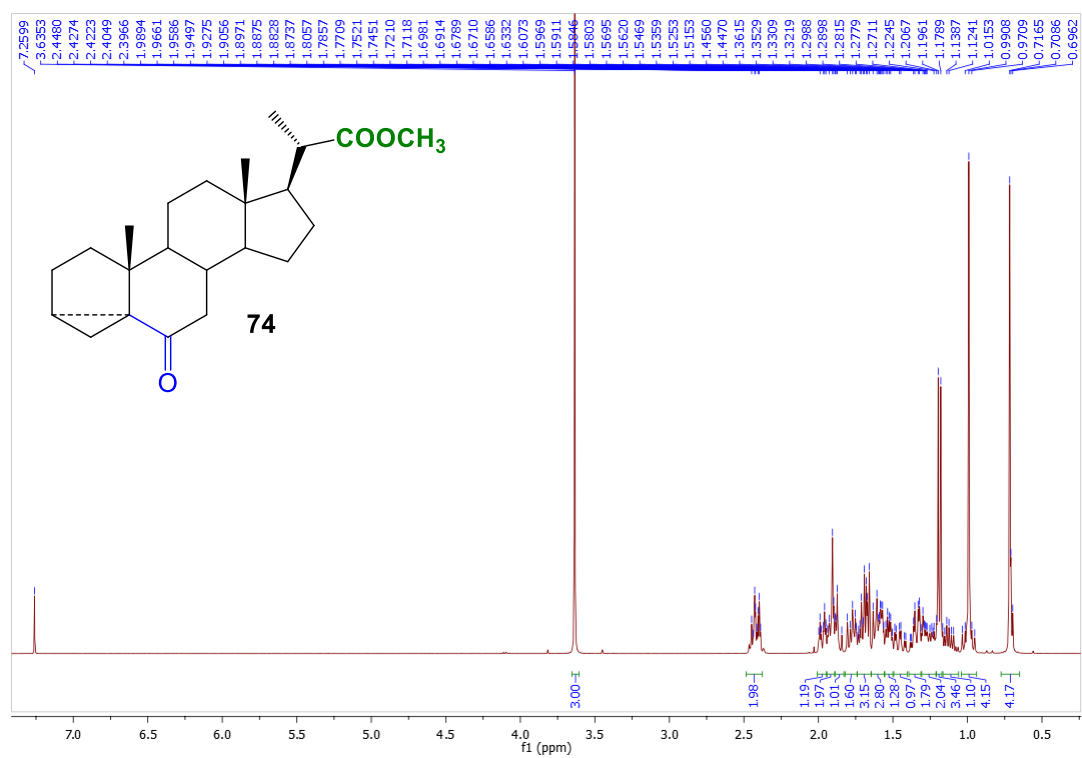


Figura A3. 19: Espectro de ^1H RMN de (20S)-6-oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (**74**).

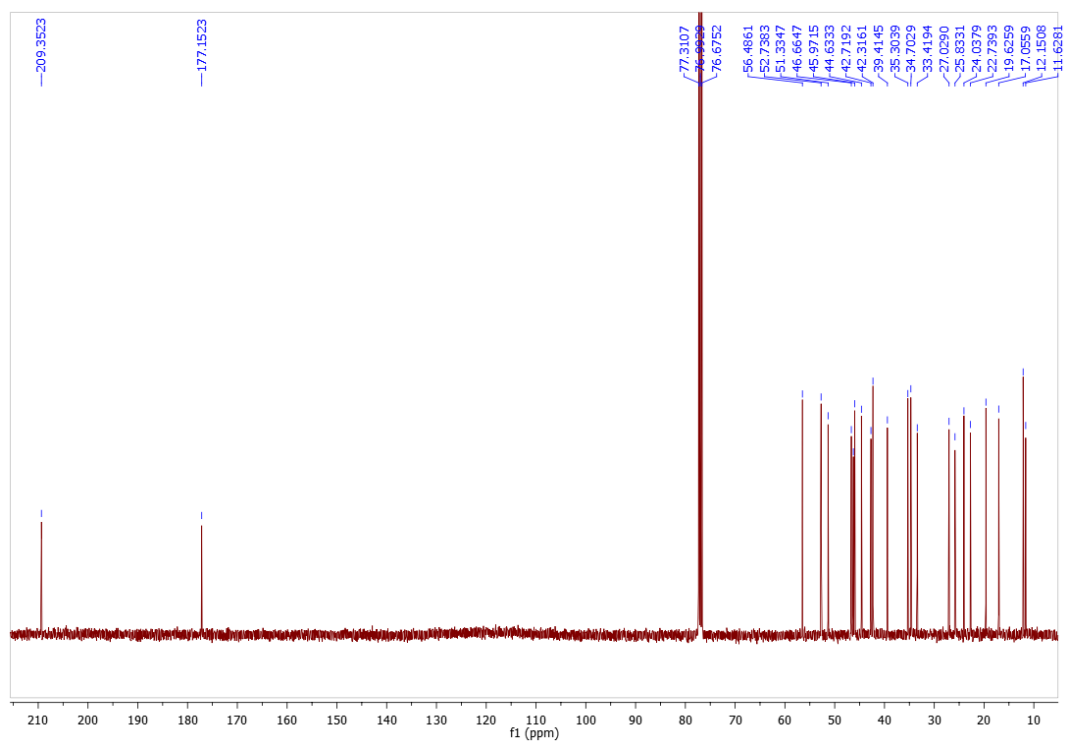


Figura A3. 20: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-6-oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (74).

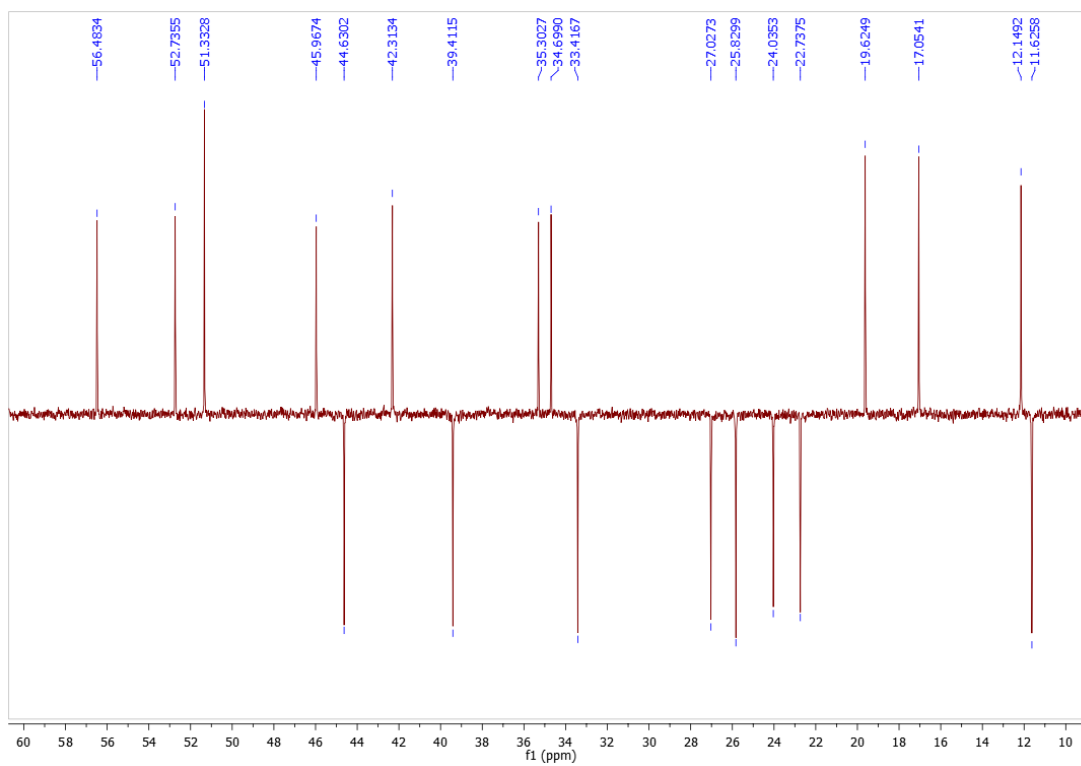


Figura A3. 21: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-6-oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (74).

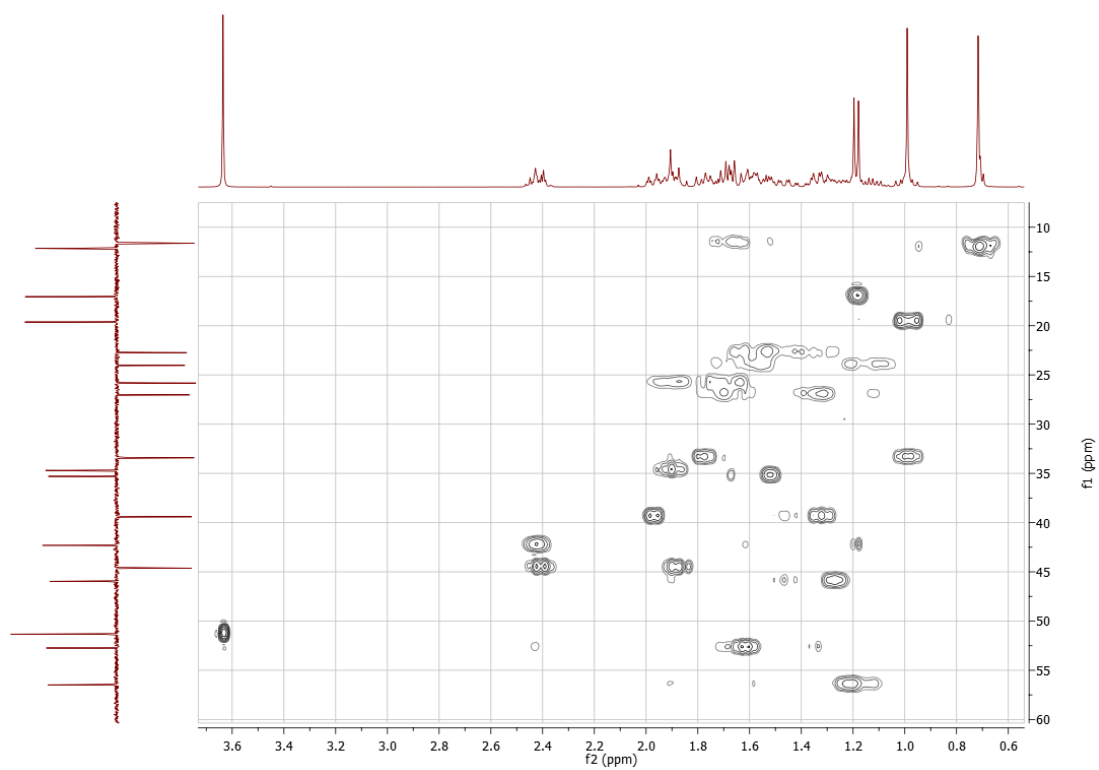


Figura A3. 22: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC de (20S)-6-oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (74).

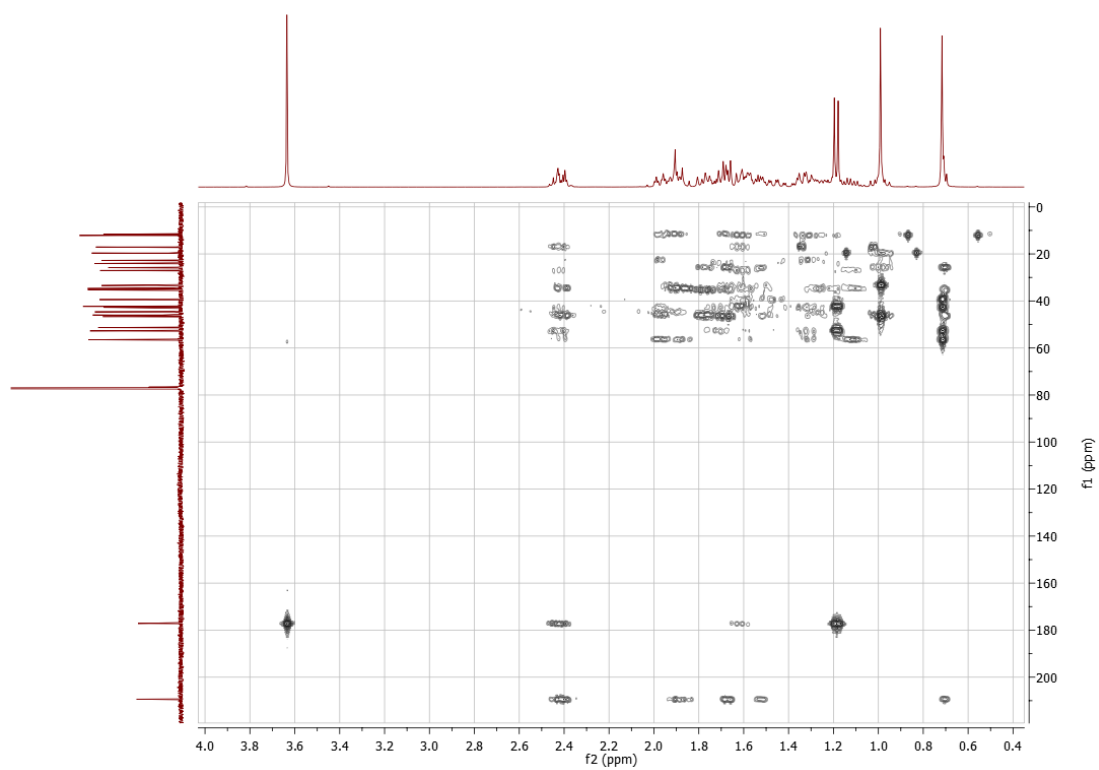


Figura A3. 23: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-6-oxo-3 α ,5-ciclo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (74).

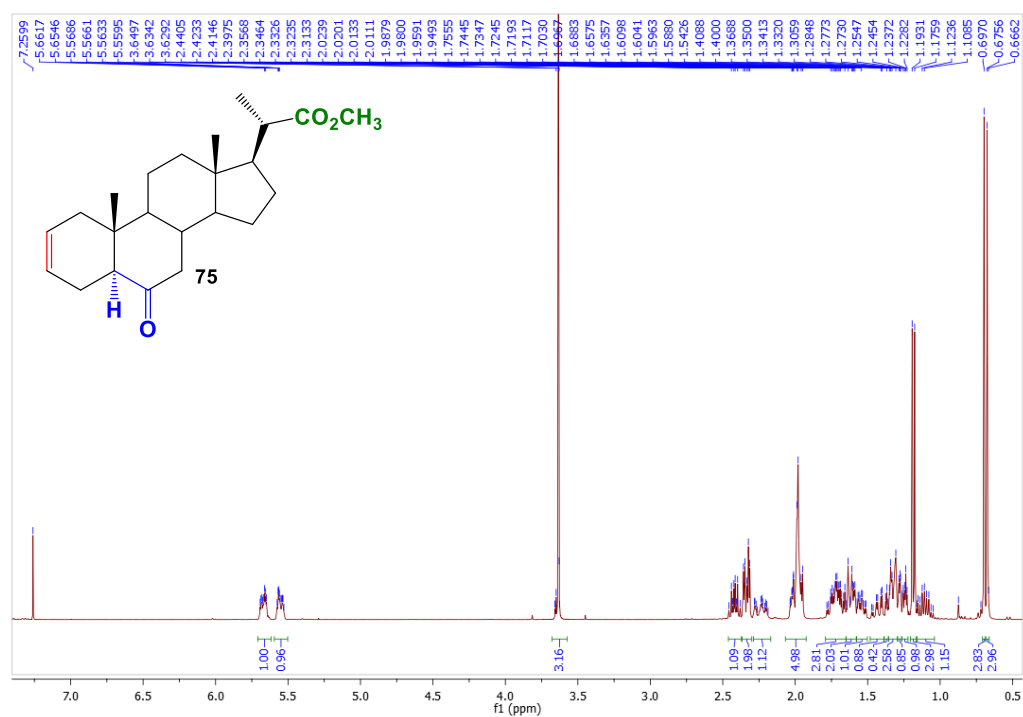


Figura A3. 24: Espectro de ¹H RMN de (20S)-6-oxo-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (75).

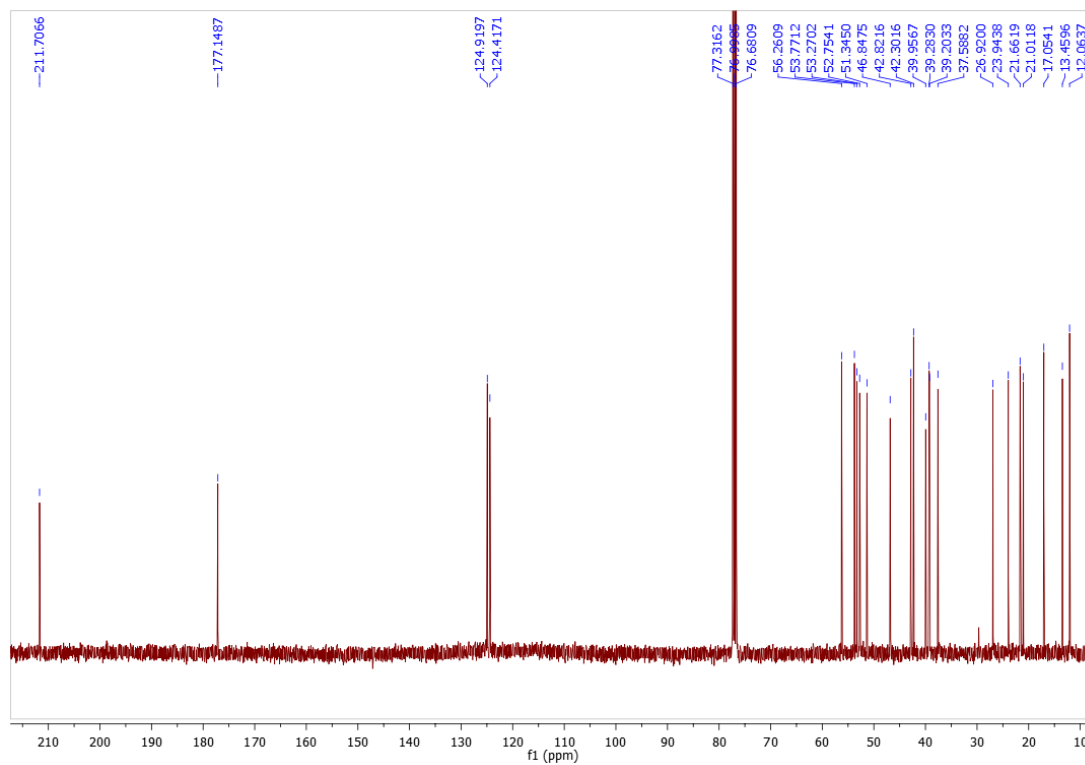


Figura A3. 25: Espectro de ¹³C RMN de (20S)-6-oxo-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (75).

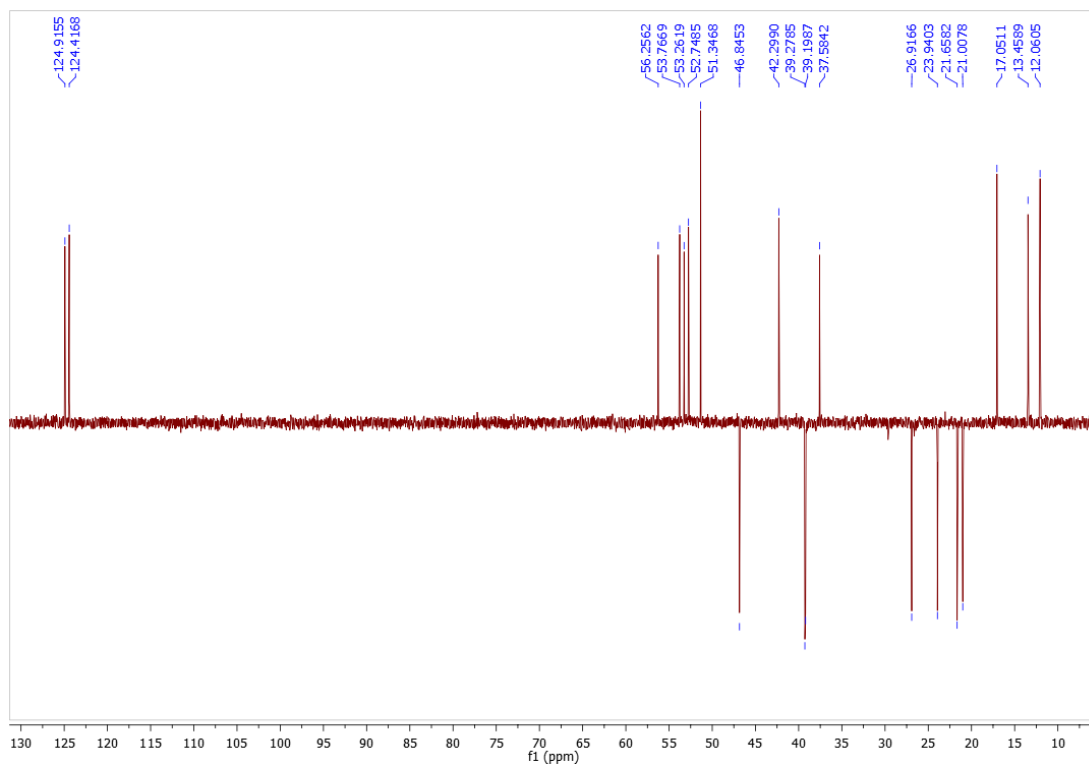


Figura A3. 26: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-6-oxo-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (75).

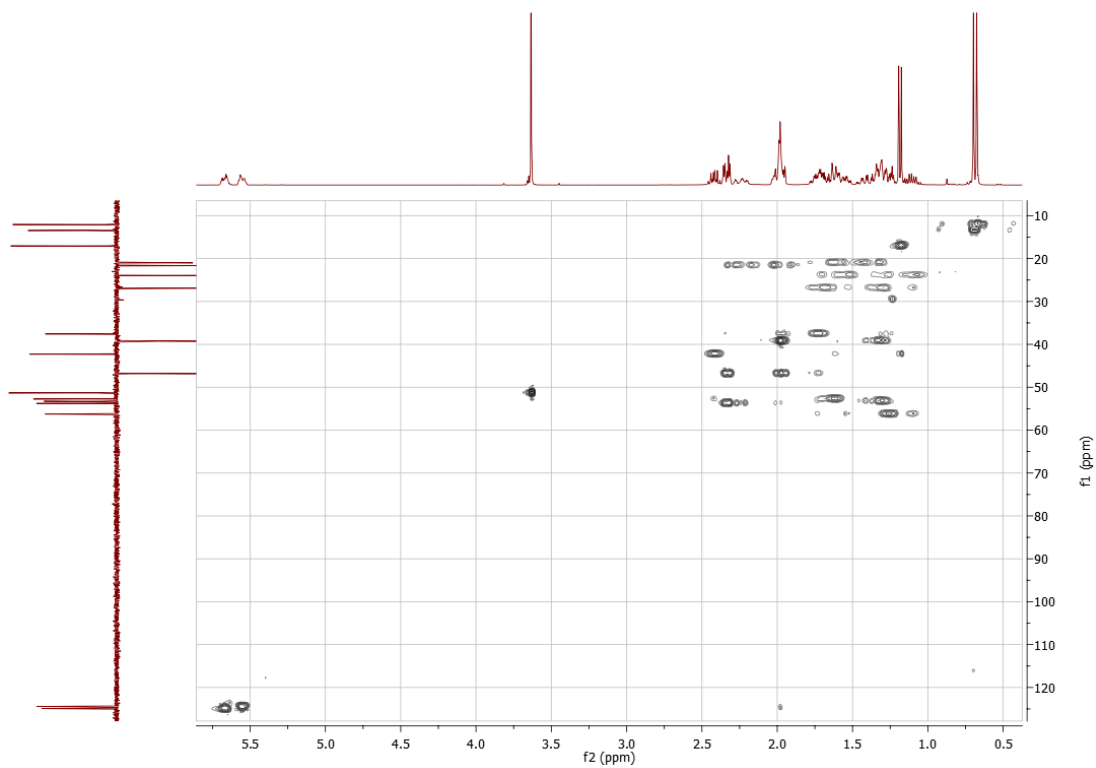


Figura A3. 27: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC de (20S)-6-oxo-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (75).

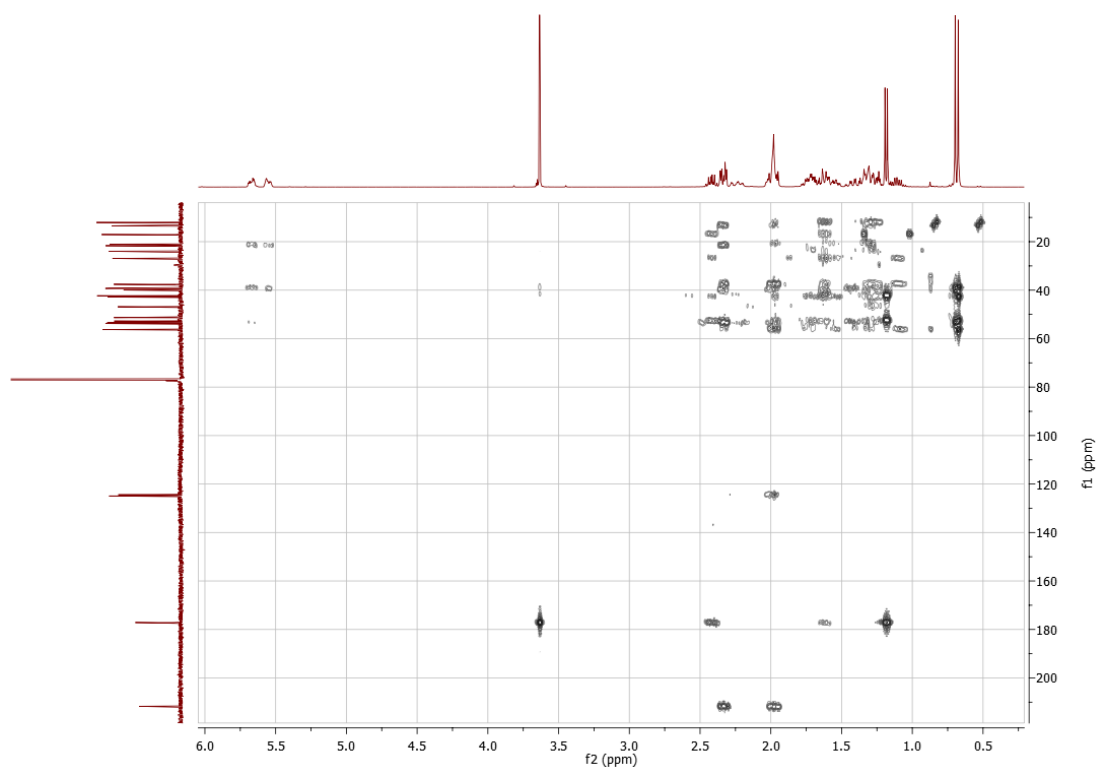


Figura A3. 28: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-6-oxo-5 α -pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (75').

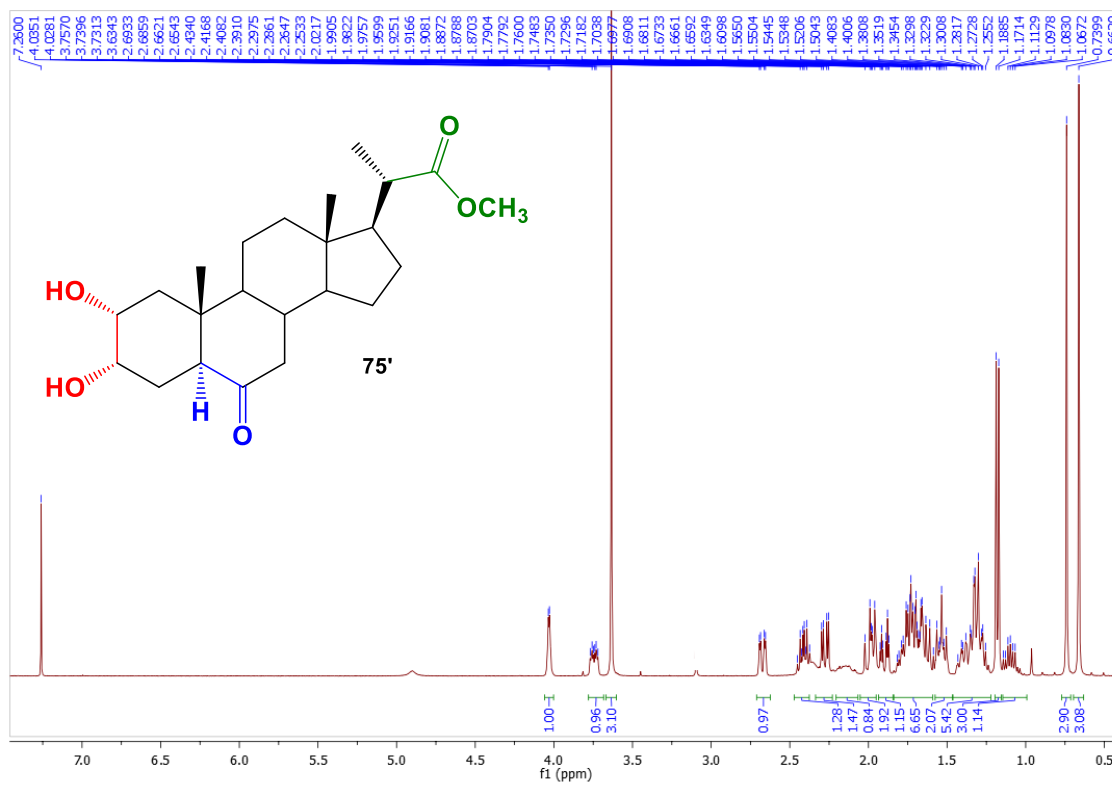


Figura A3. 29: Espectro de ^1H RMN de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (75').

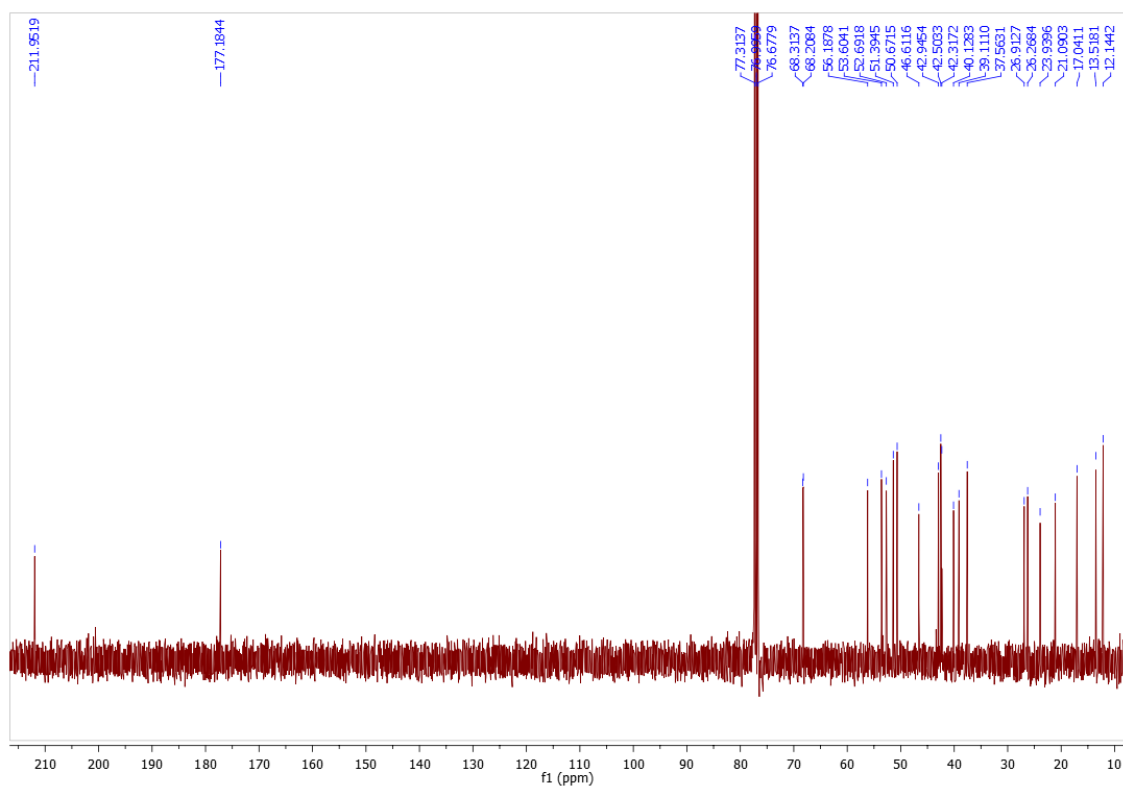


Figura A3. 30: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5a-pregnan-20-carboxilato de metilo (75').

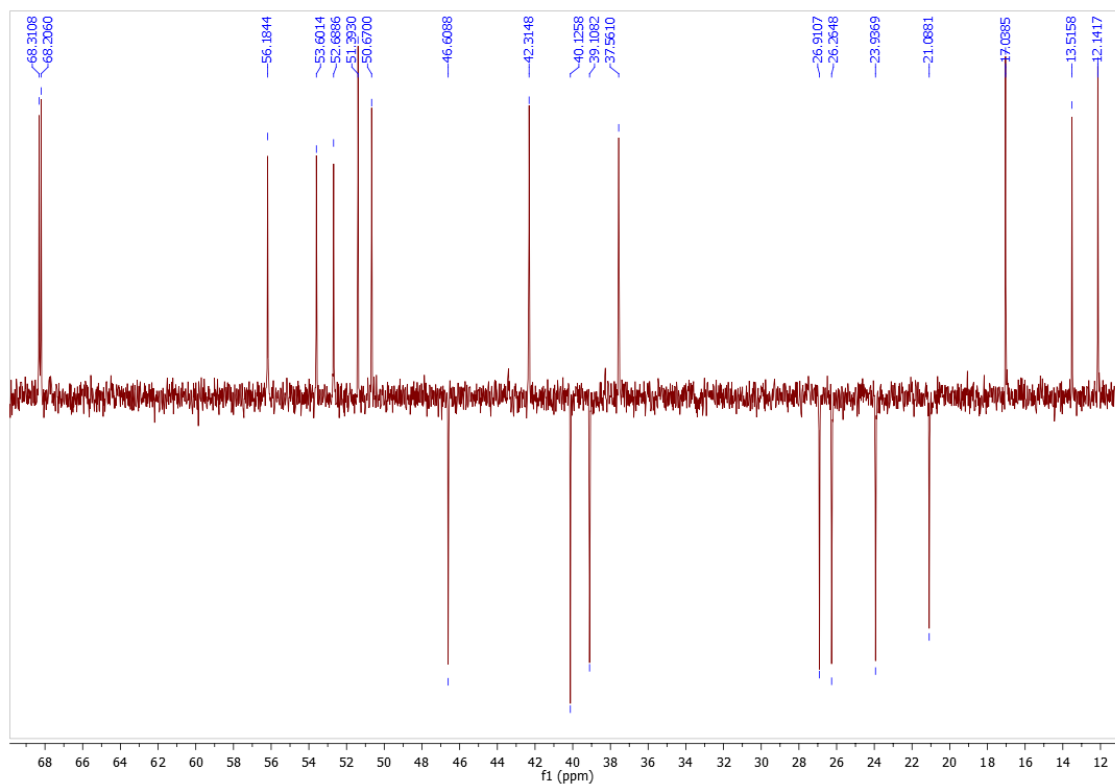


Figura A3. 31: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5a-pregnan-20-carboxilato de metilo (75').

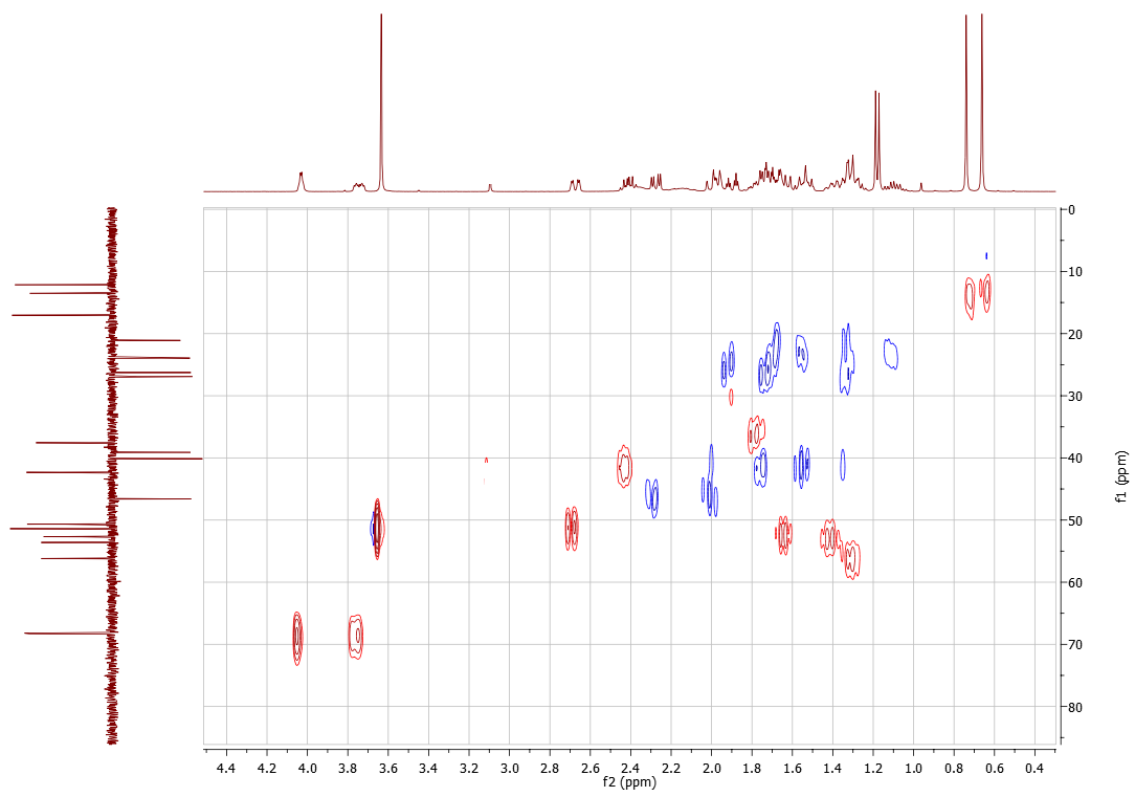


Figura A3. 32: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (75').

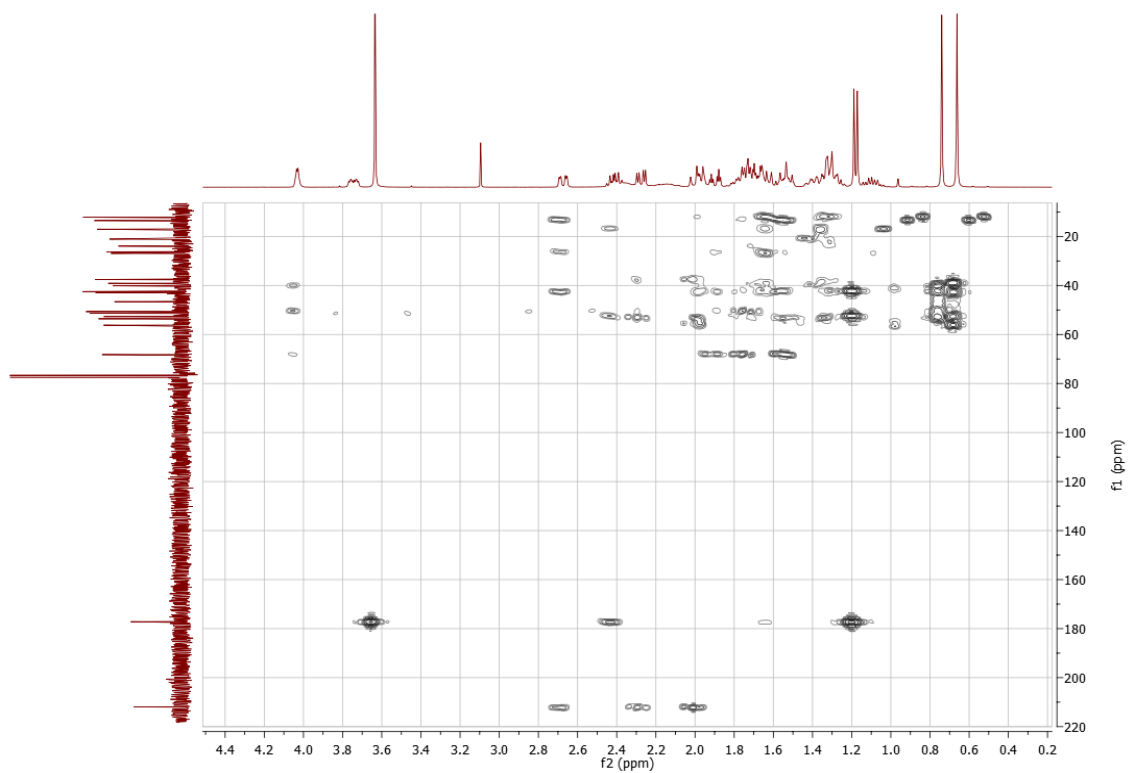


Figura A3. 33: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-20-carboxilato de metilo (75').

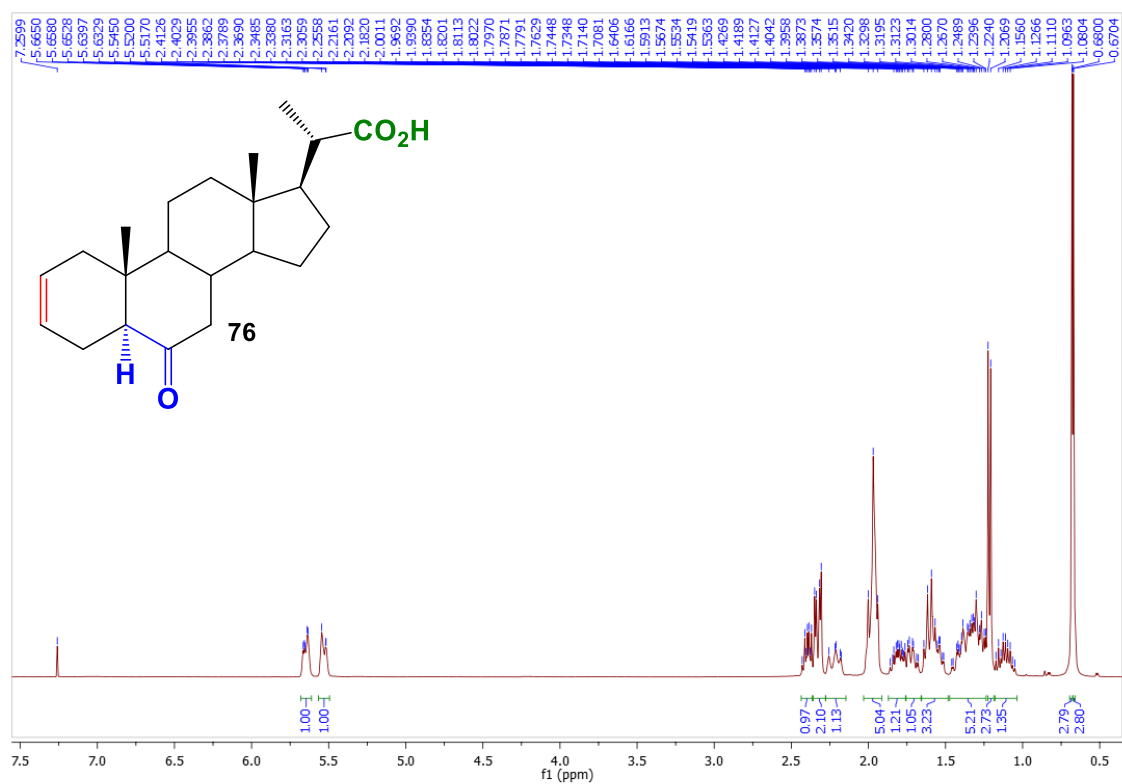


Figura A3. 34: Espectro de ¹H RMN de Ácido (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílico (76).

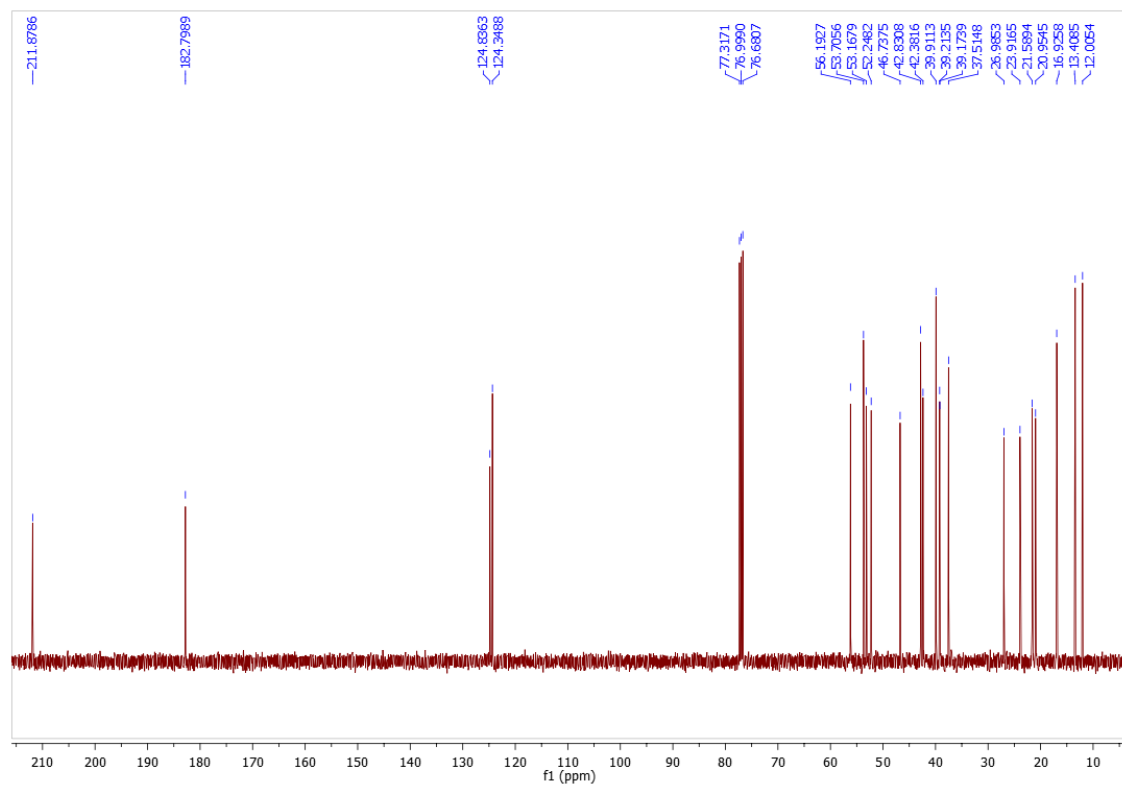


Figura A3. 35: Espectro de ¹³C RMN de Ácido (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílico (76).

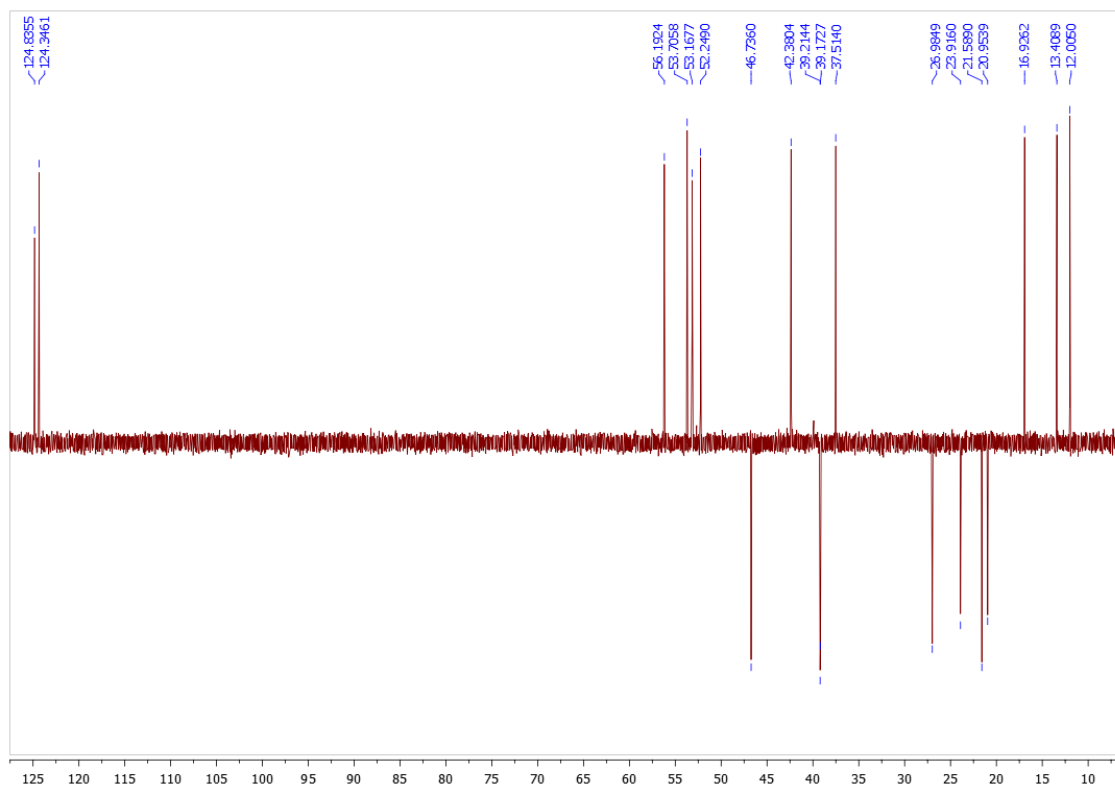


Figura A3. 36: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de Ácido (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílico (76).

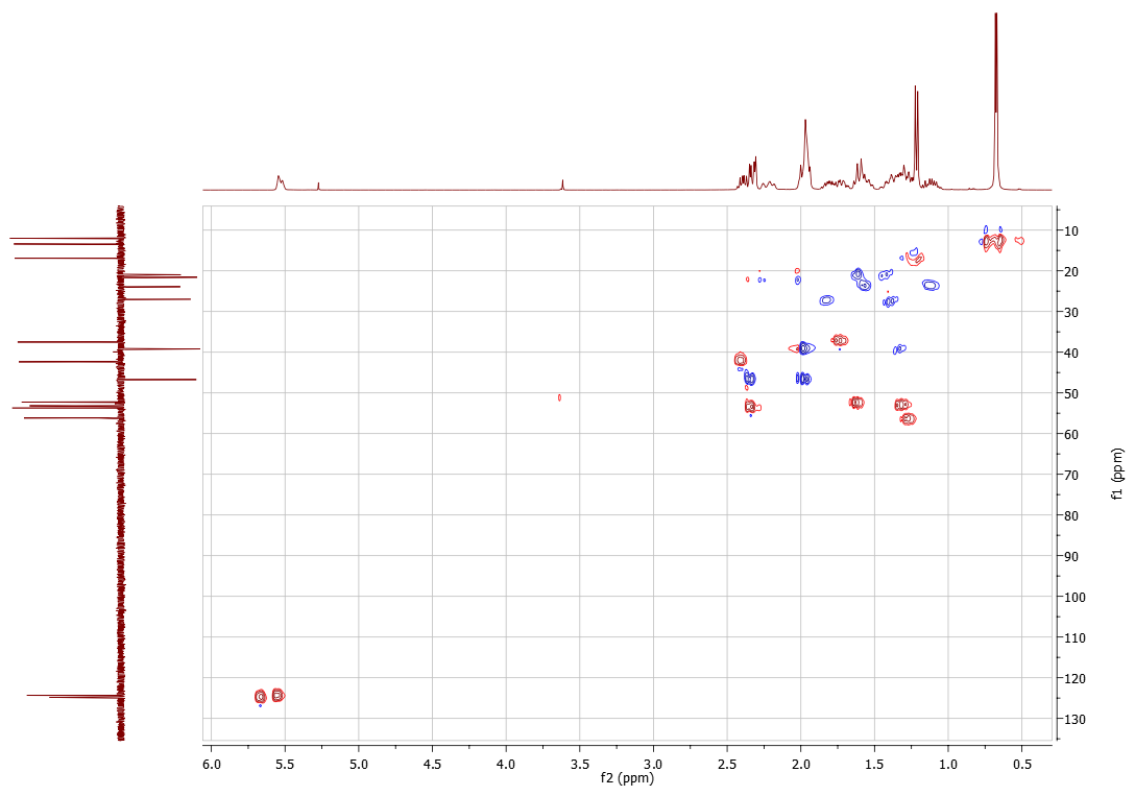


Figura A3. 37: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de Ácido (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílico (76).

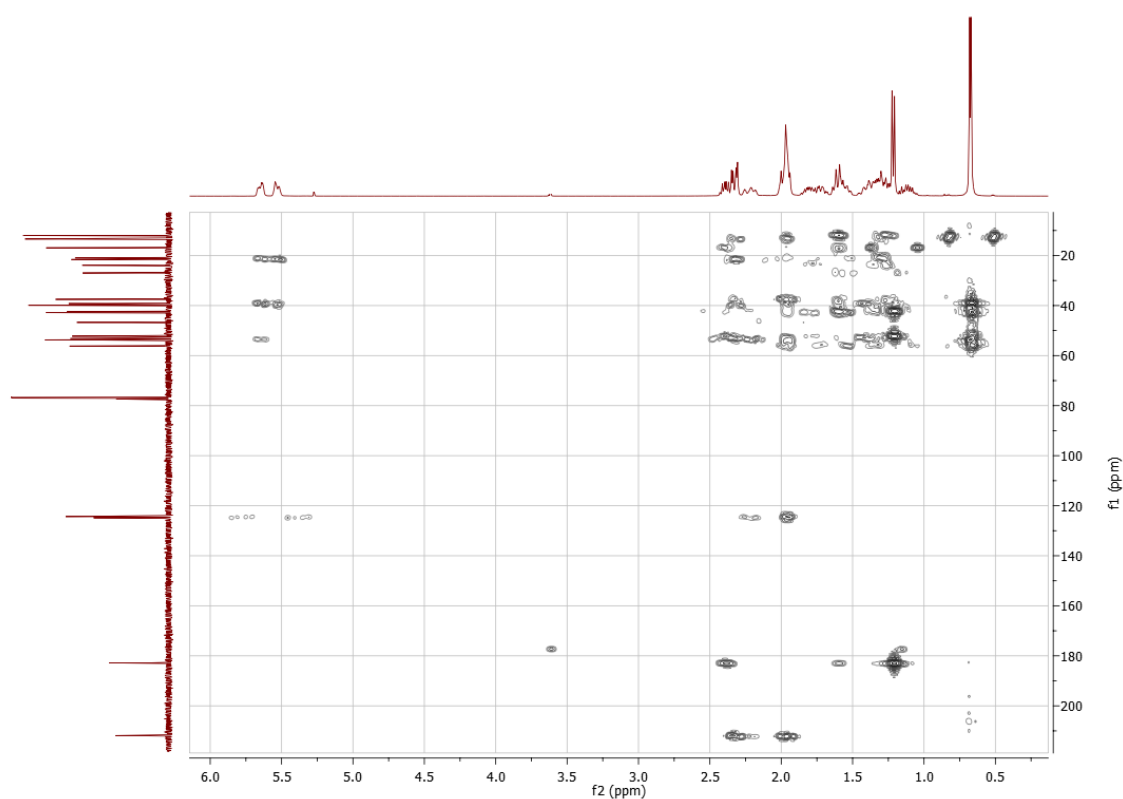


Figura A3. 38: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de Ácido (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílico (76).

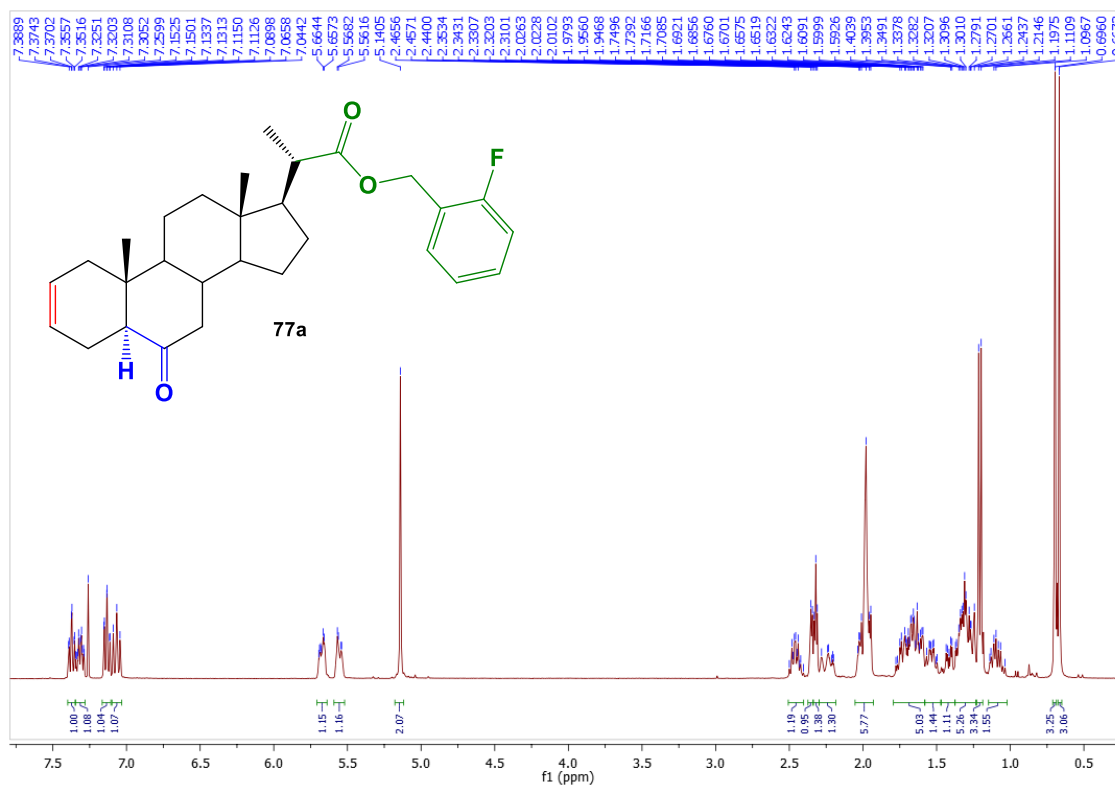


Figura A3. 39: Espectro de ^1H RMN de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (77a).

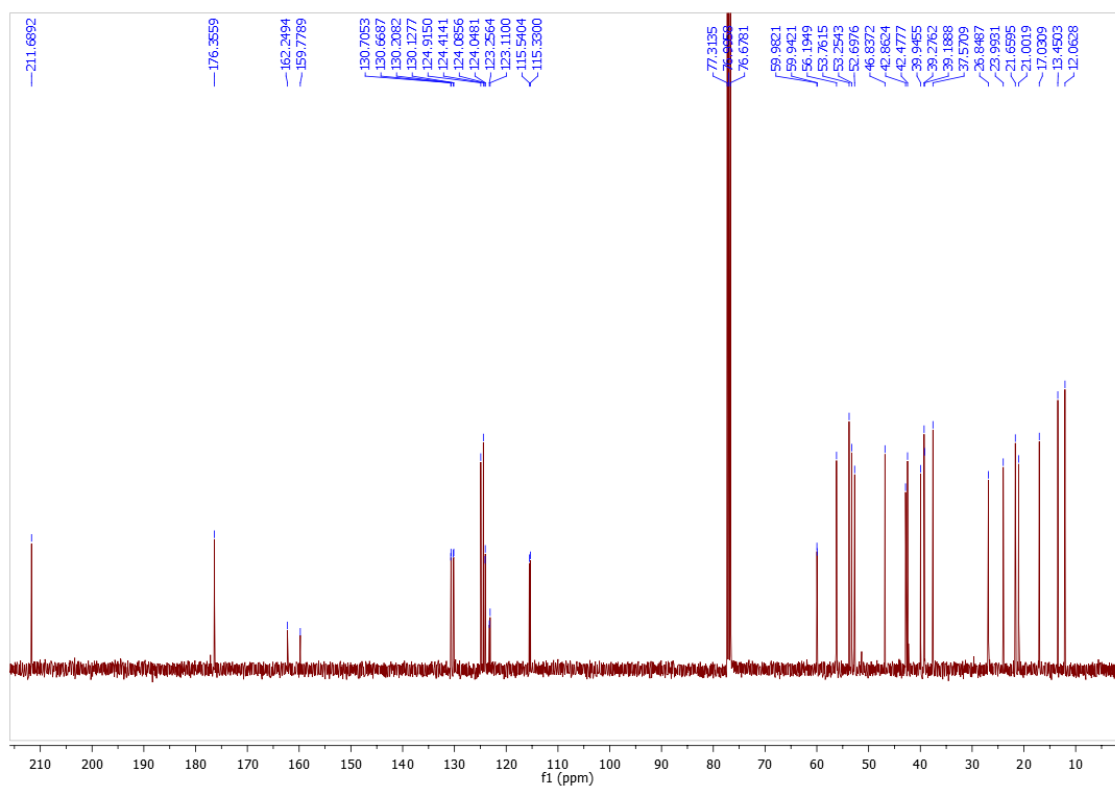


Figura A3. 40: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (77a).

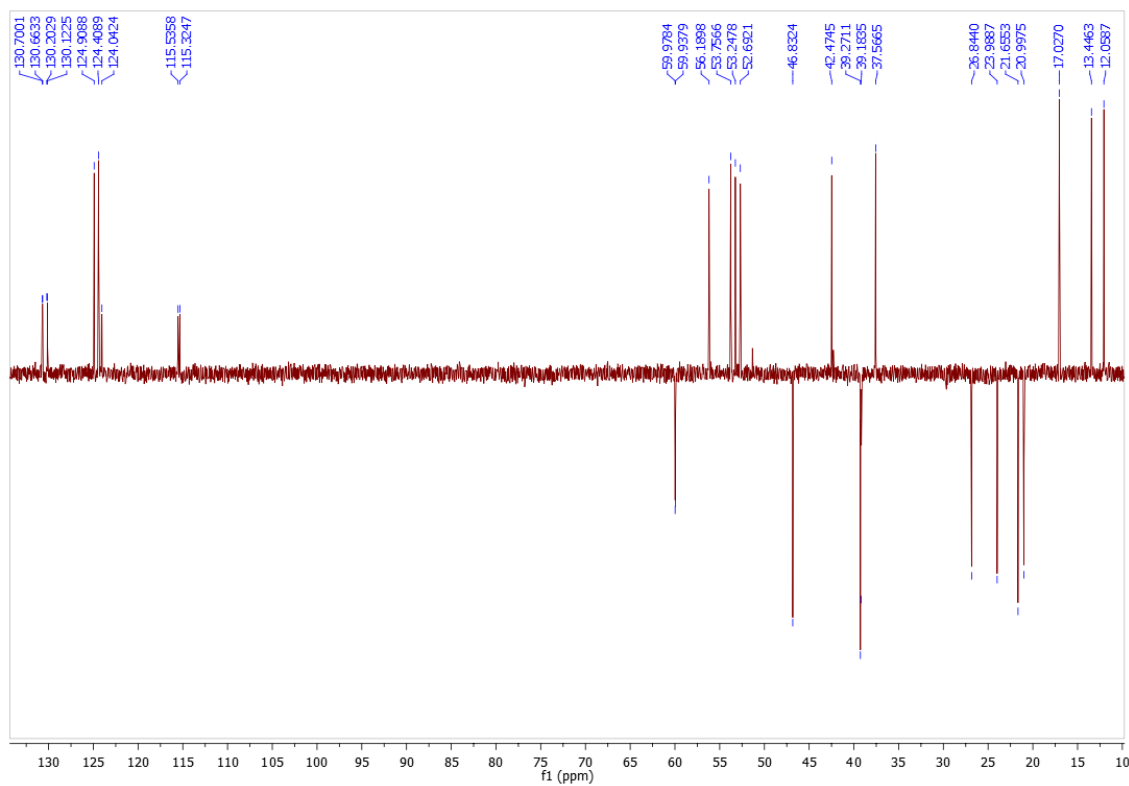


Figura A3. 41: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (77a).

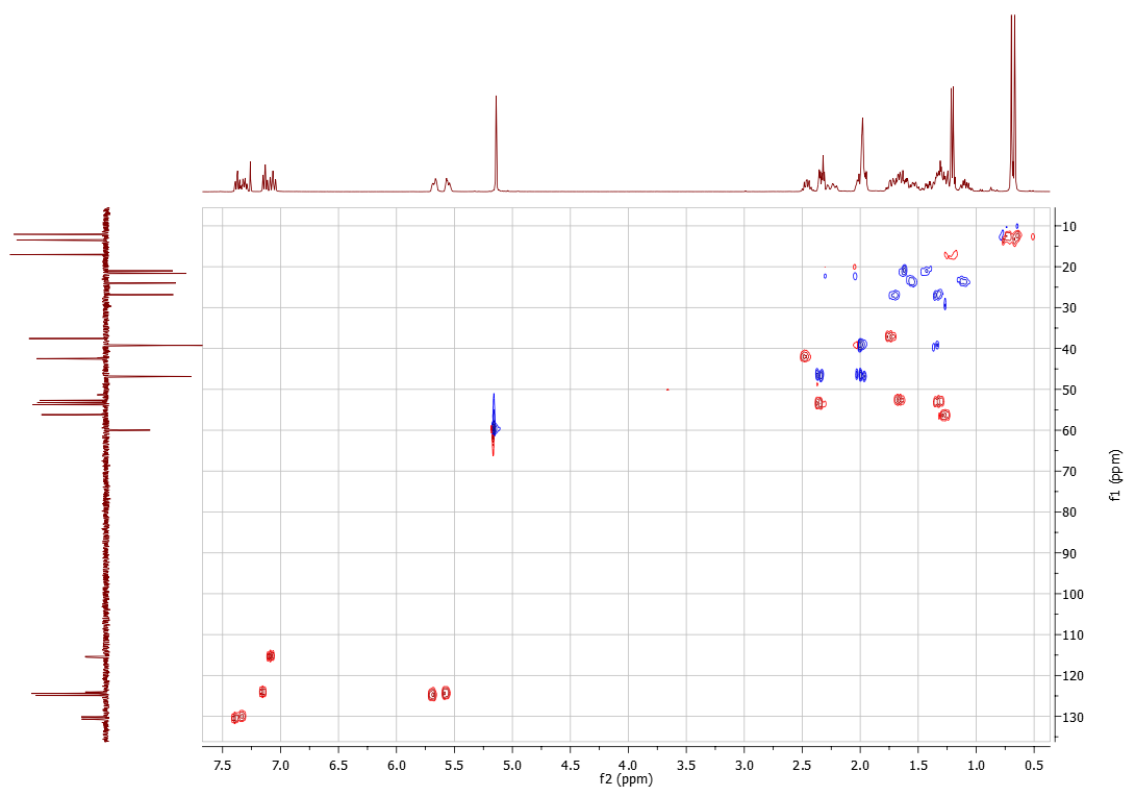


Figura A3. 42: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílate de 2-fluorobencilo (77a).

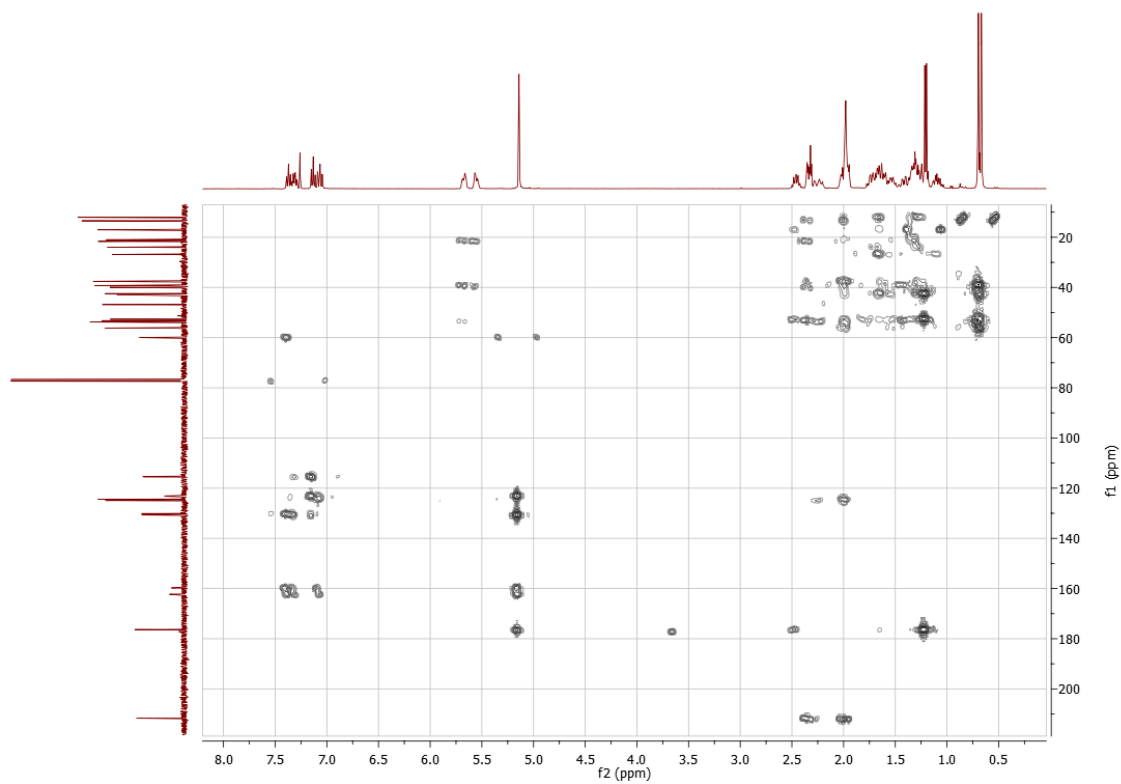


Figura A3. 43: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílate de 2-fluorobencilo (77a).

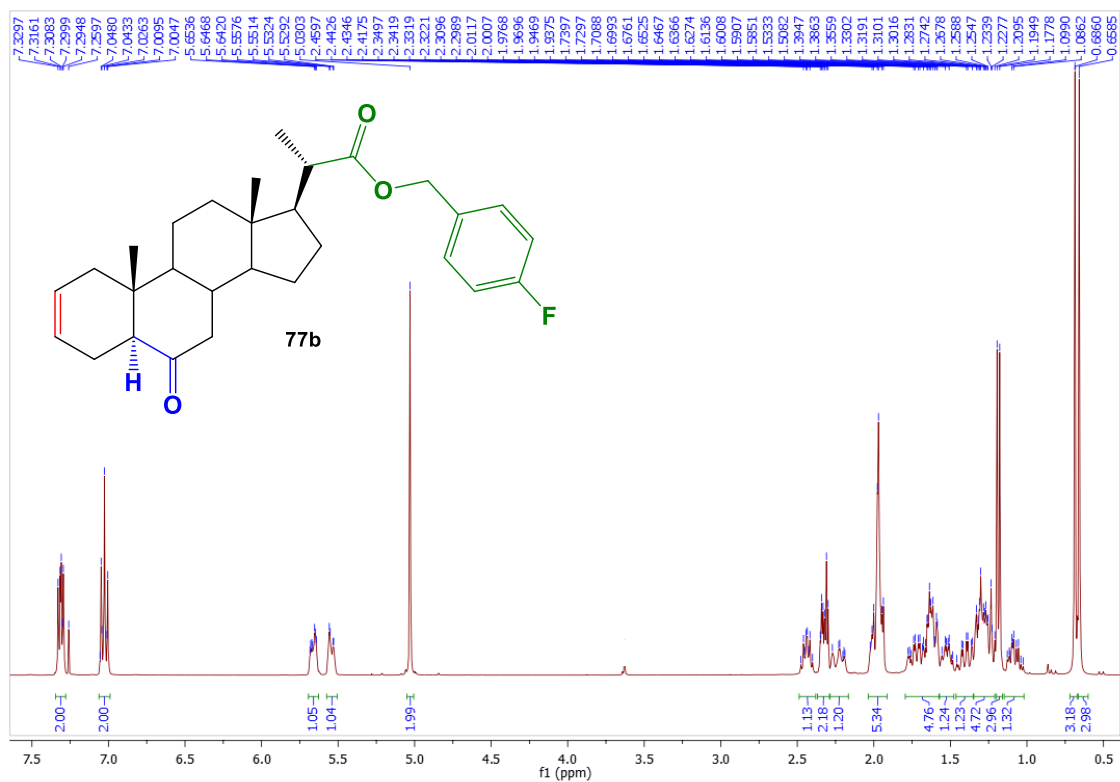


Figura A3. 44: Espectro de ¹H RMN de (20S)-6-oxo-5α-preg-2-en-22-carboxílate de 4-fluorobencilo (**77b**).

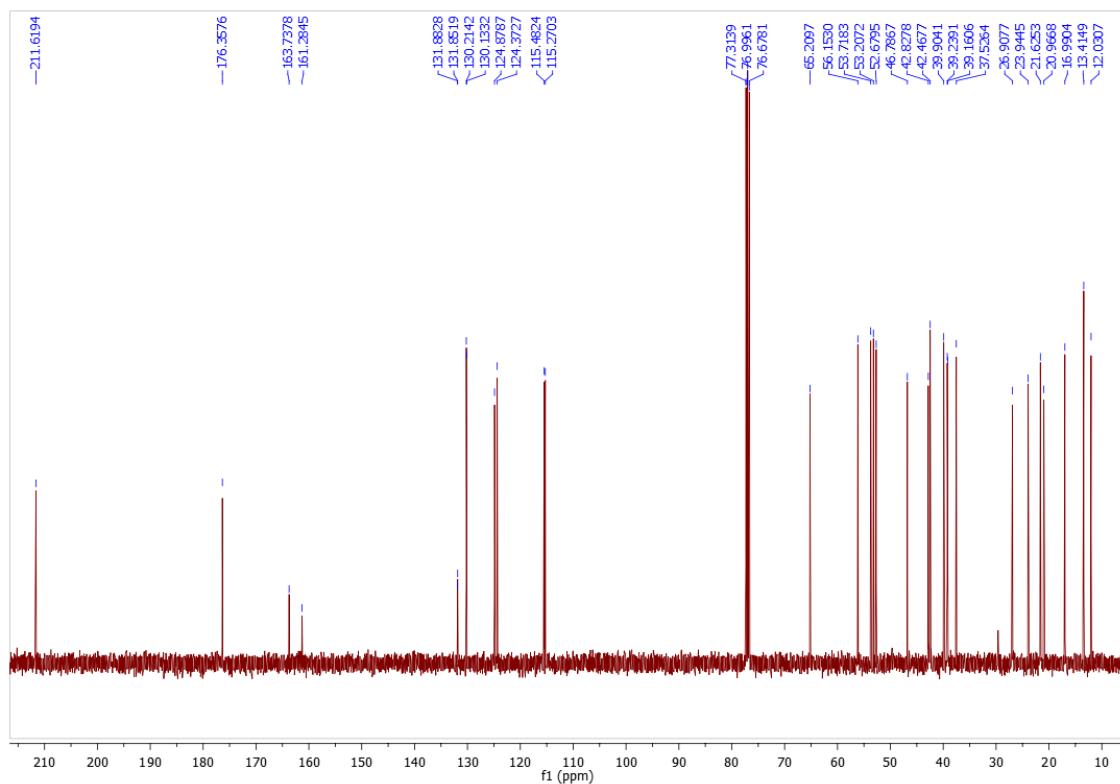


Figura A3. 45: Espectro de ¹³C RMN de (20S)-6-oxo-5α-preg-2-en-22-carboxílate de 4-fluorobencilo (**77b**).

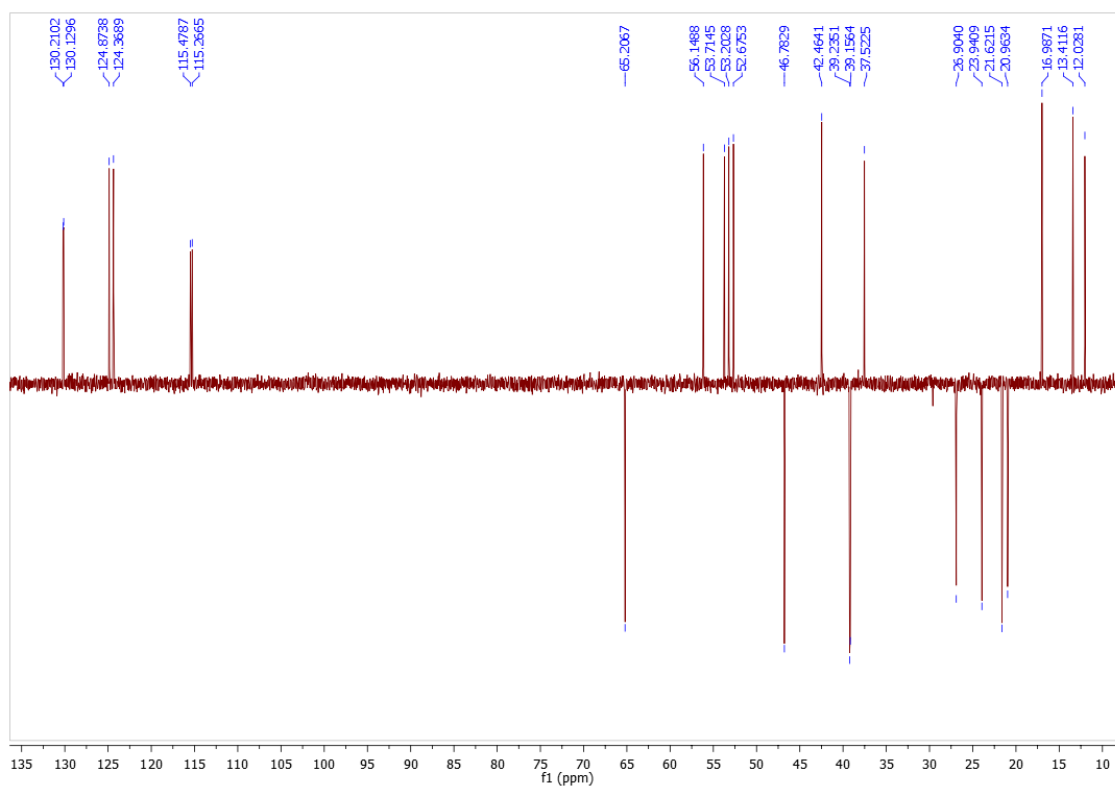


Figura A3. 46: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**77b**).

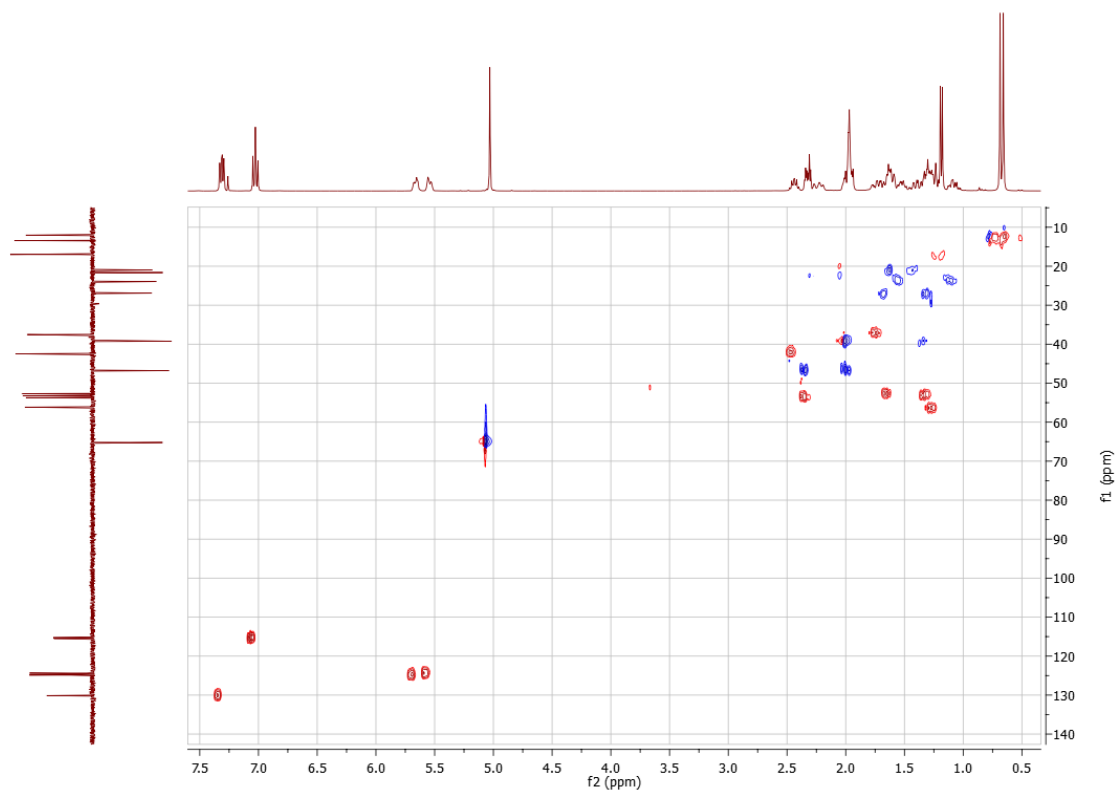


Figura A3. 47: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**77b**).

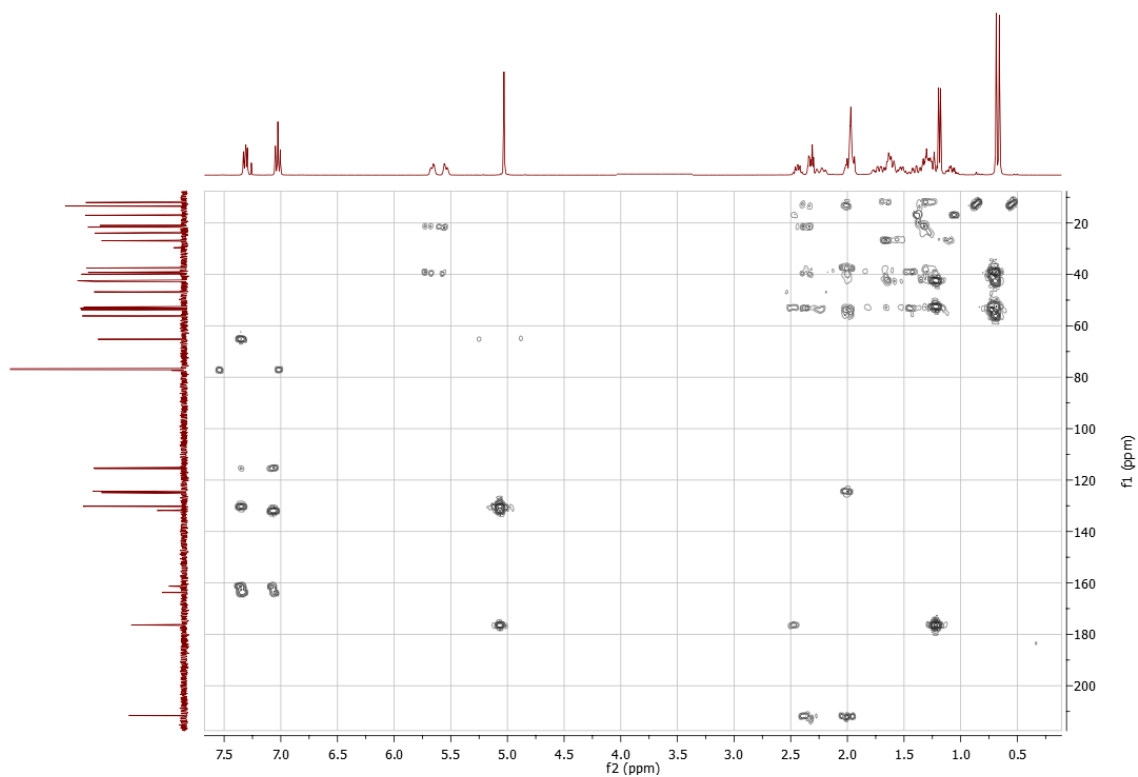


Figura A3. 48: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**77b**).

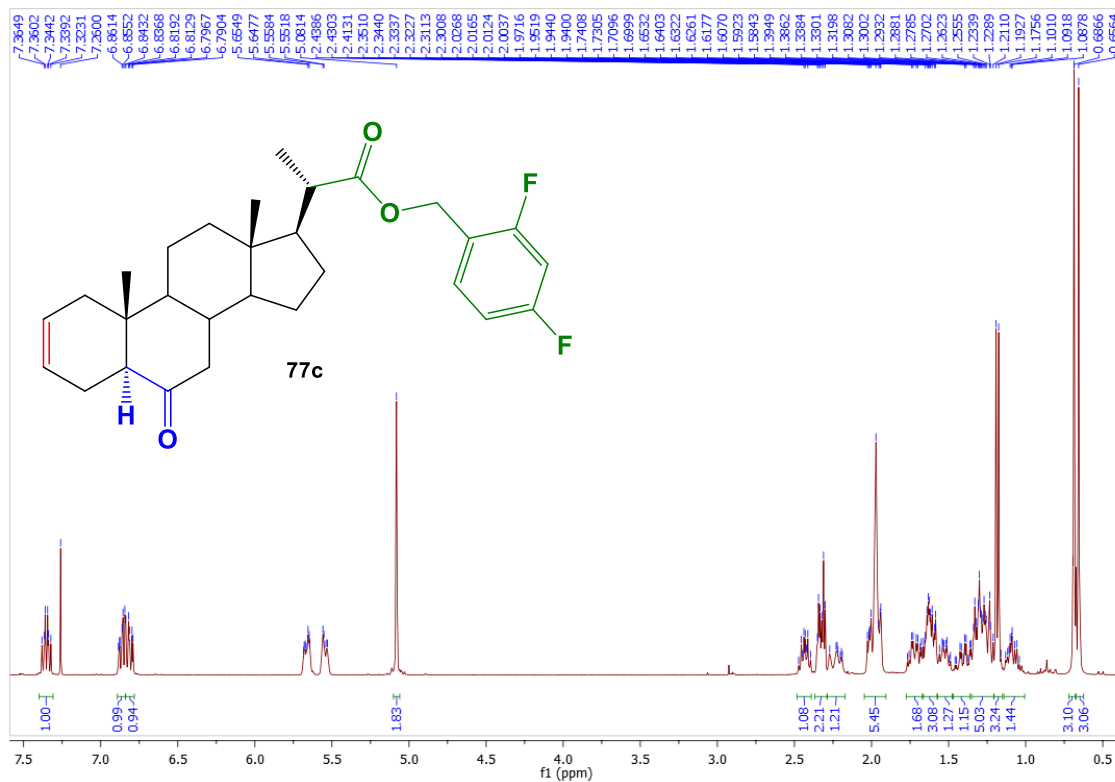


Figura A3. 49: Espectro de ^1H RMN de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (**77c**).

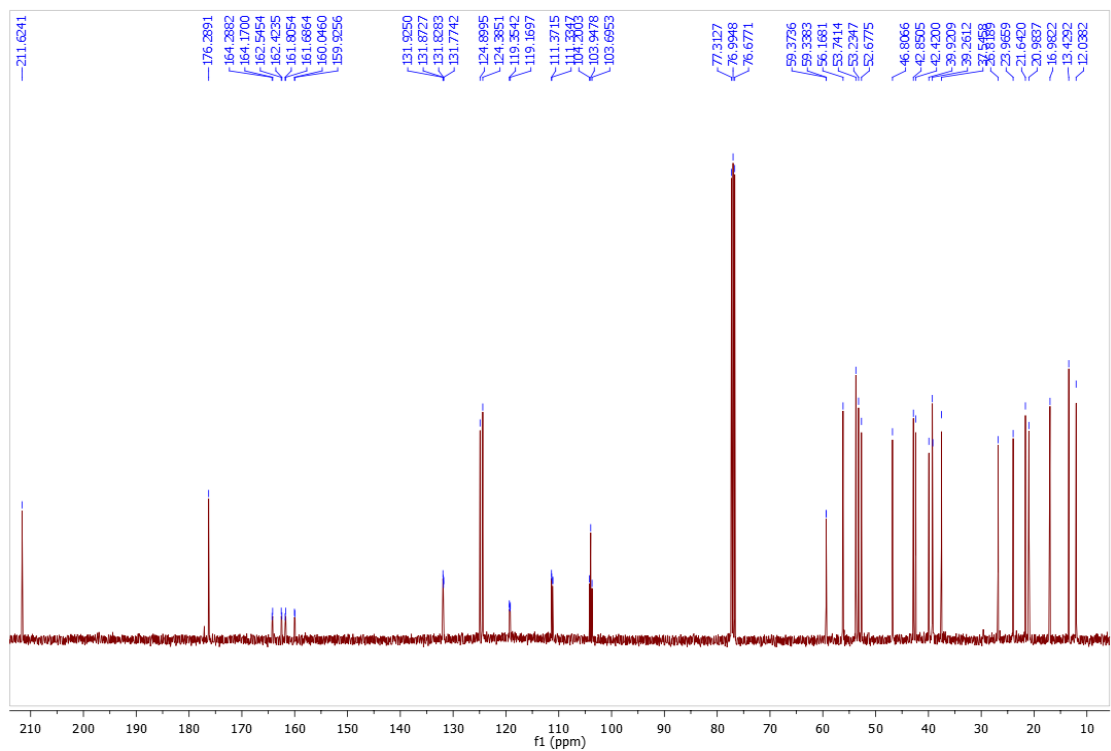


Figura A3. 50: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (77c).

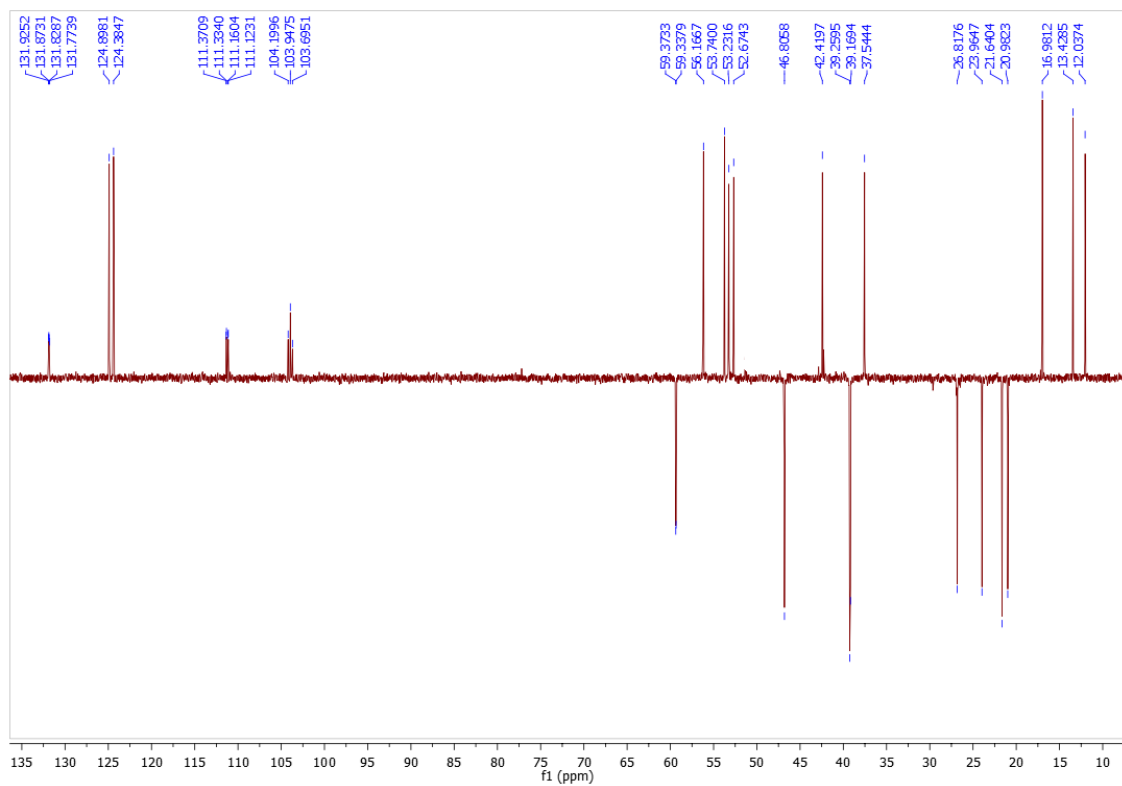


Figura A3. 51: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (77c).

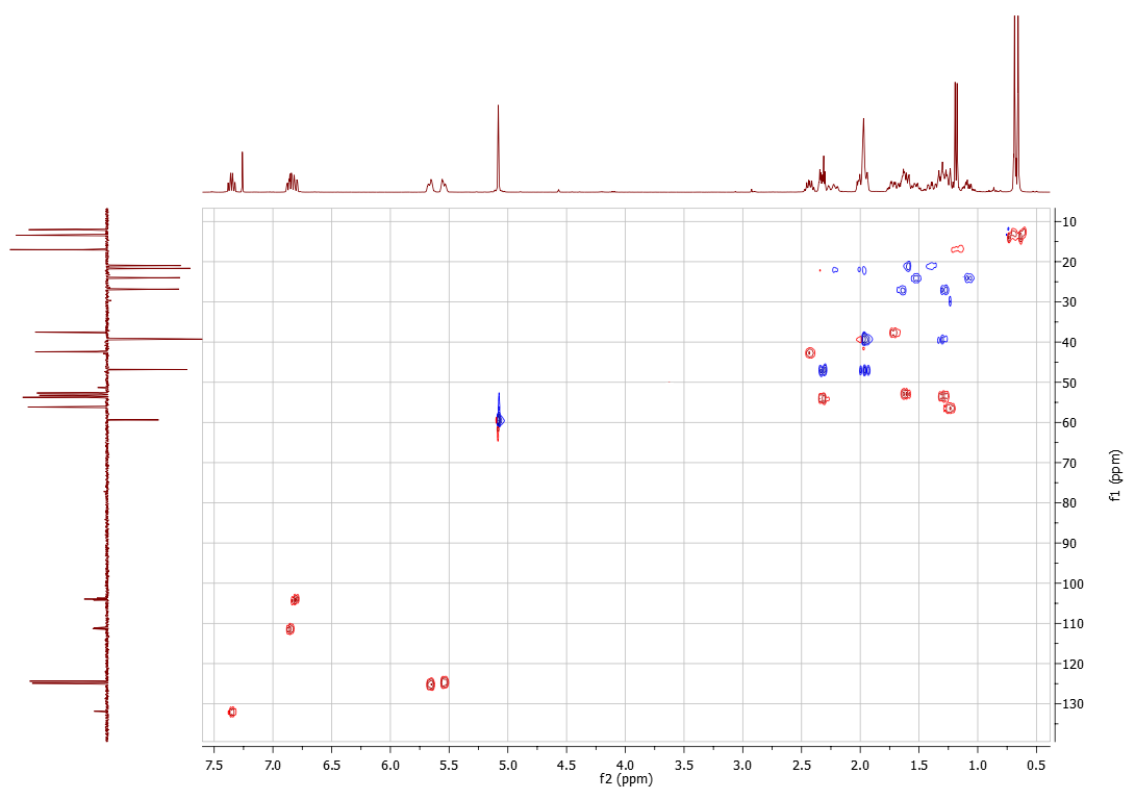


Figura A3. 52: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílate de 2,4-difluorobencilo (77c).

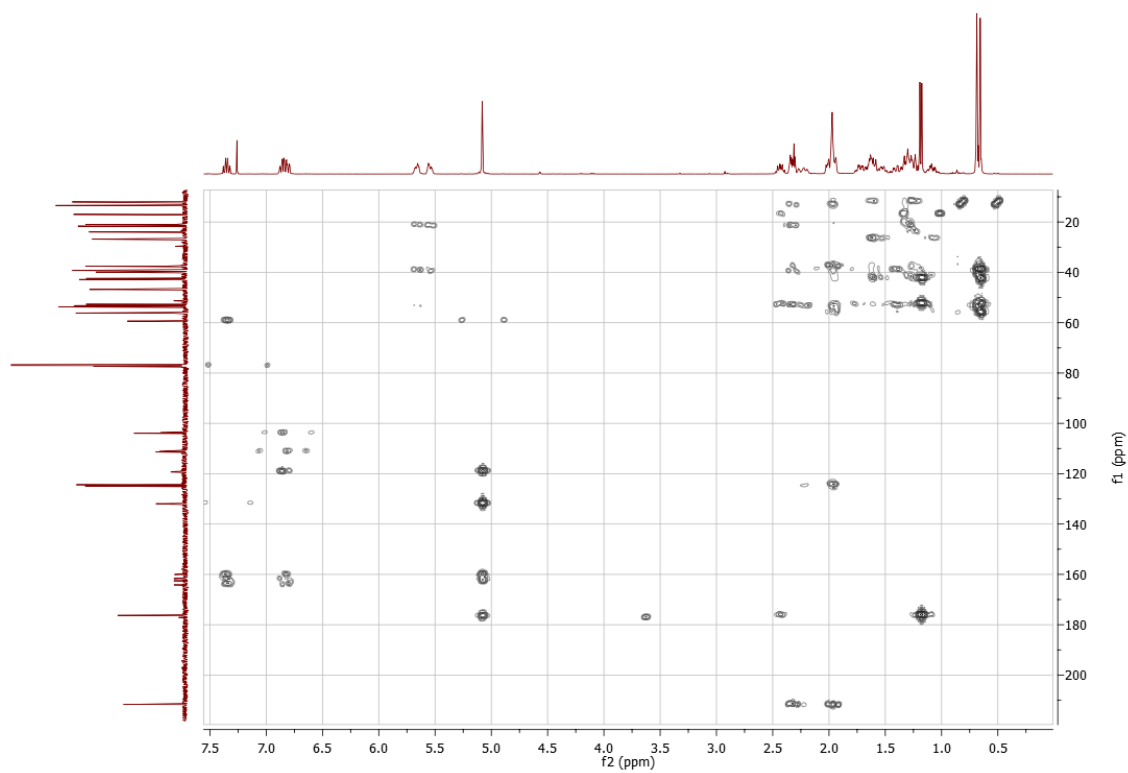


Figura A3. 53: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílate de 2,4-difluorobencilo (77c).

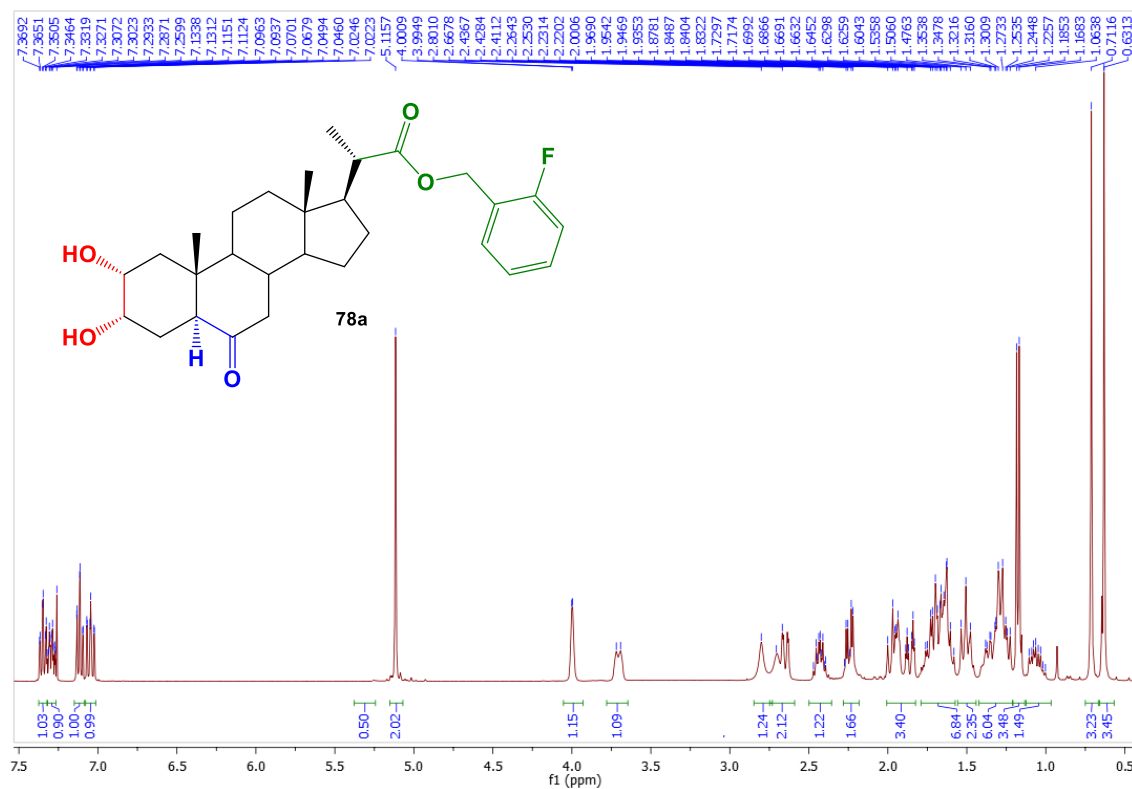


Figura A3. 54: Espectro de ¹H RMN de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5α-pregnan-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (**78a**).

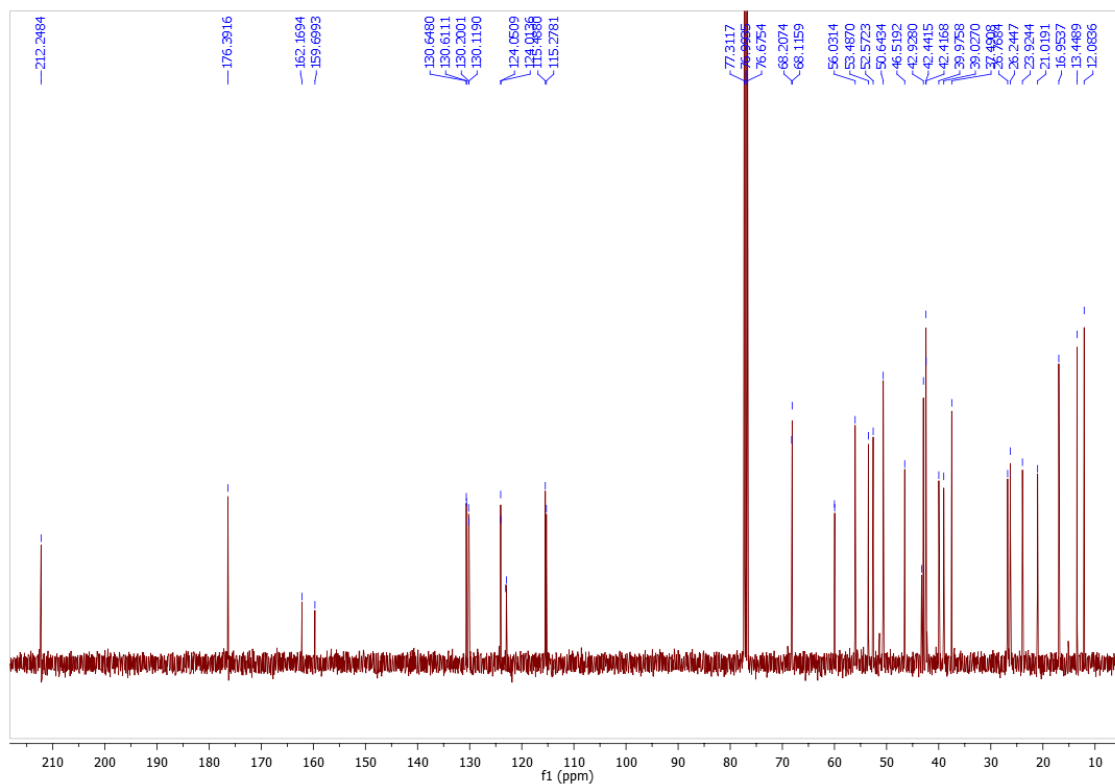


Figura A3. 55: Espectro de ¹³C RMN de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5α-pregnan-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (**78a**).

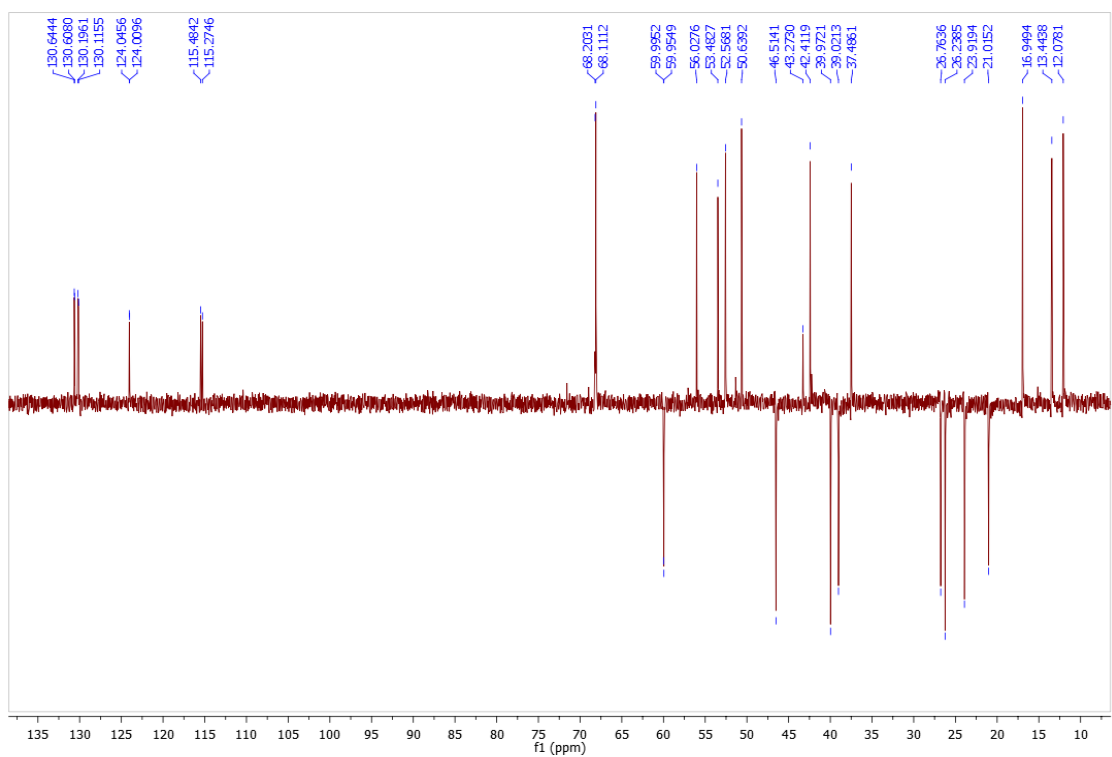


Figura A3. 56: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (**78a**).

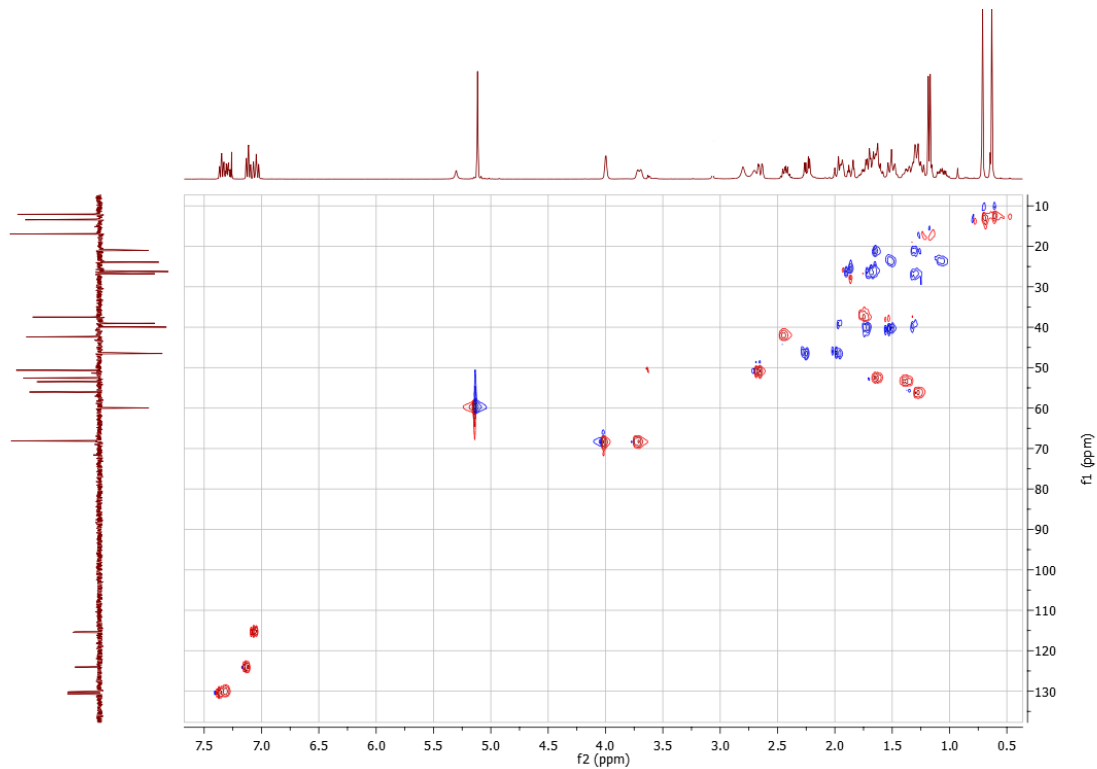


Figura A3. 57: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (**78a**).

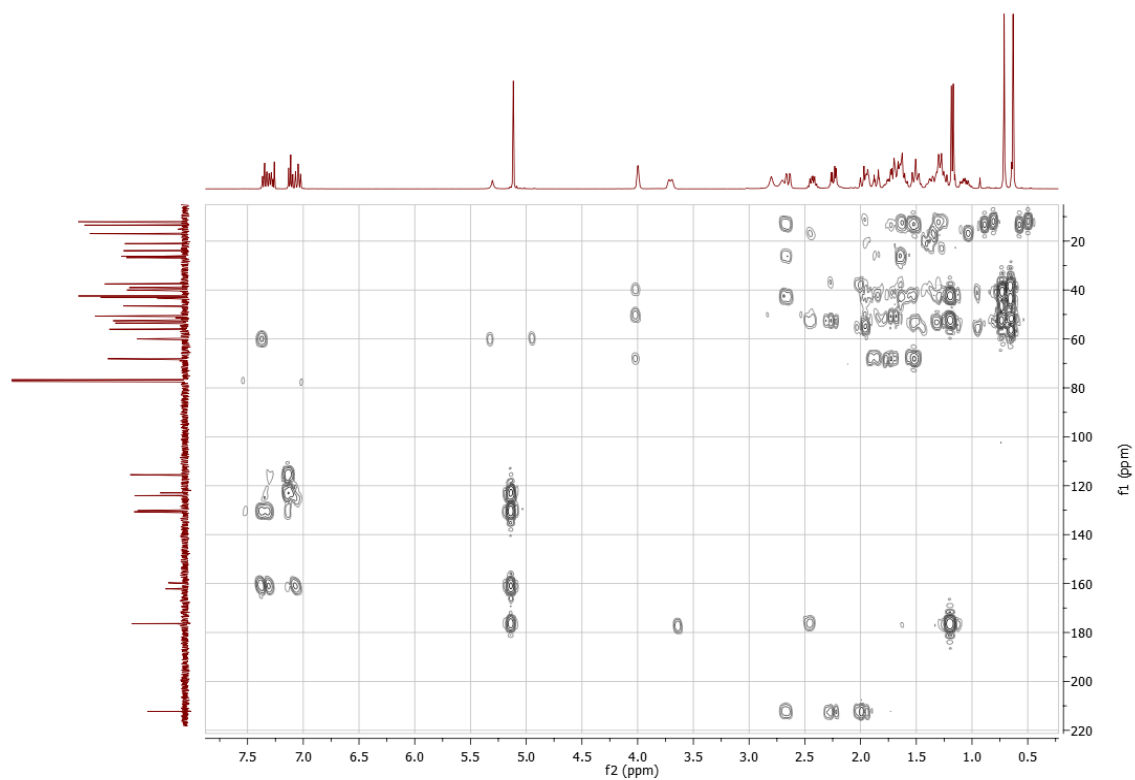


Figura A3. 58: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 2-fluorobencilo (78a).

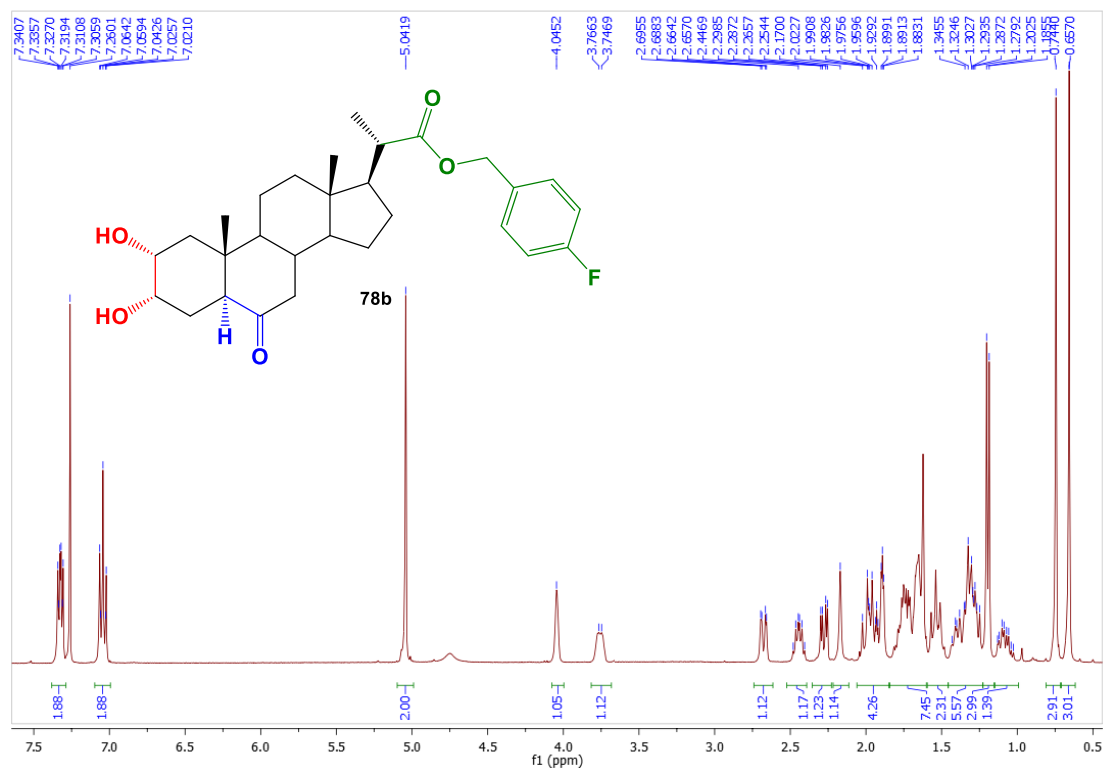


Figura A3. 59: Espectro de ^1H RMN de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (78b).

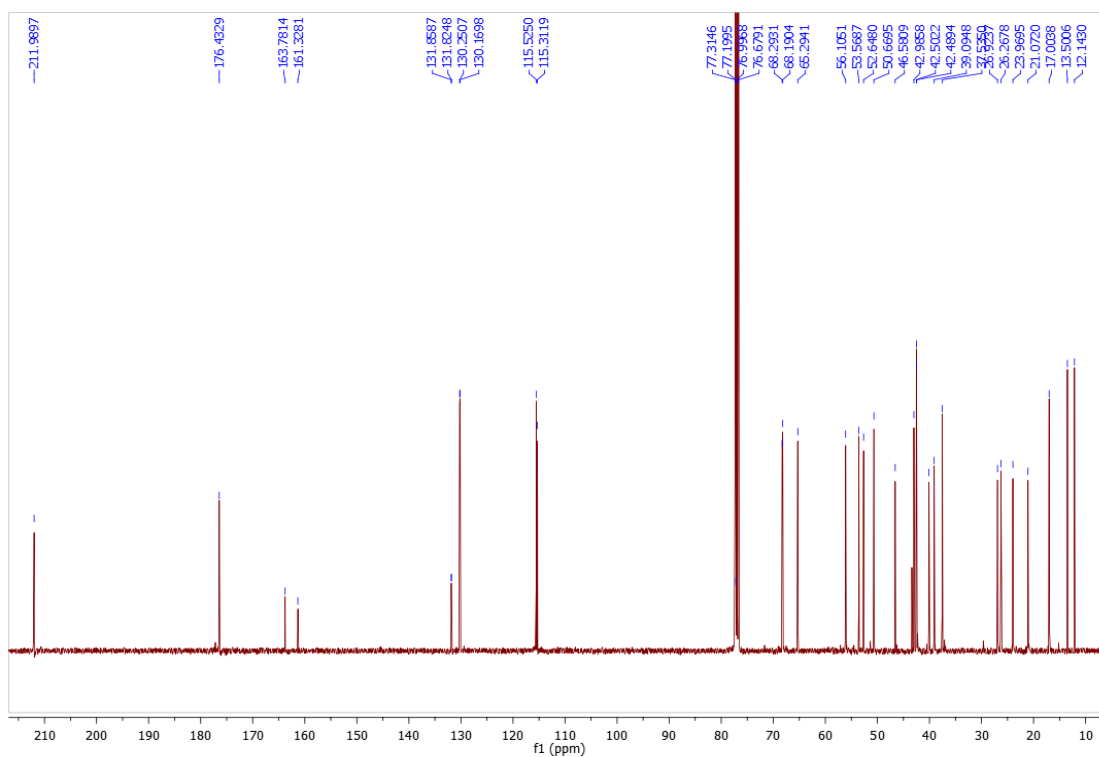


Figura A3. 60: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**78b**).

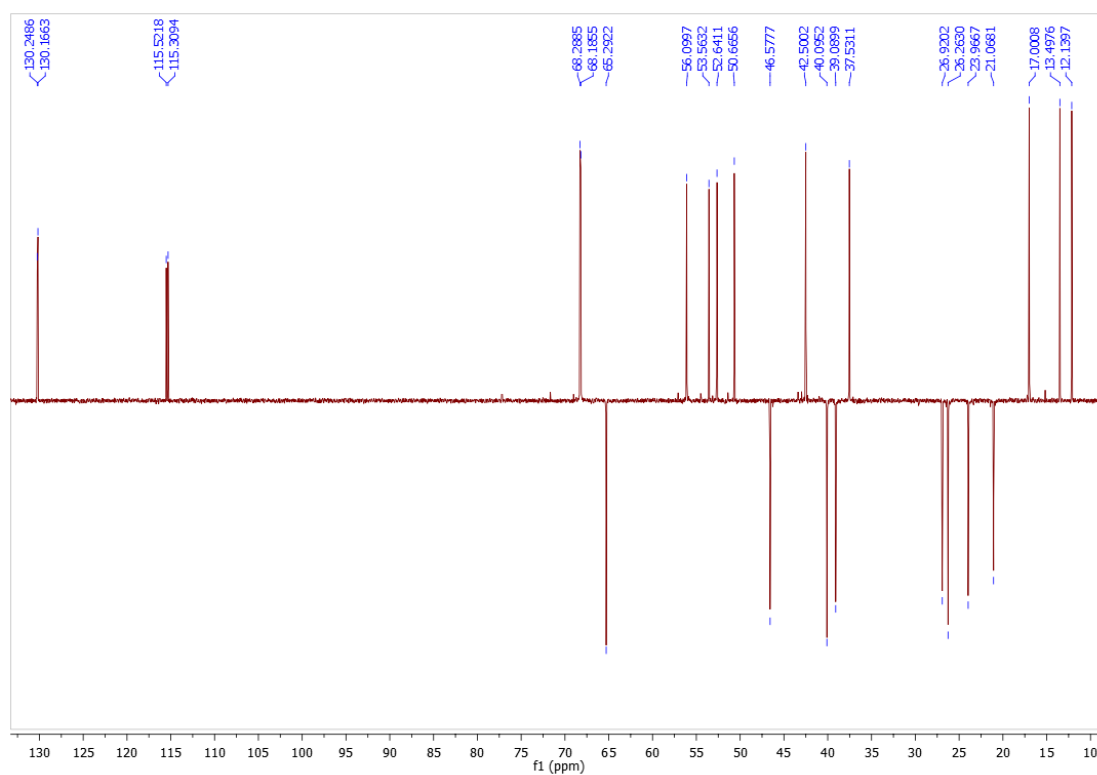


Figura A3. 61: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**78b**).

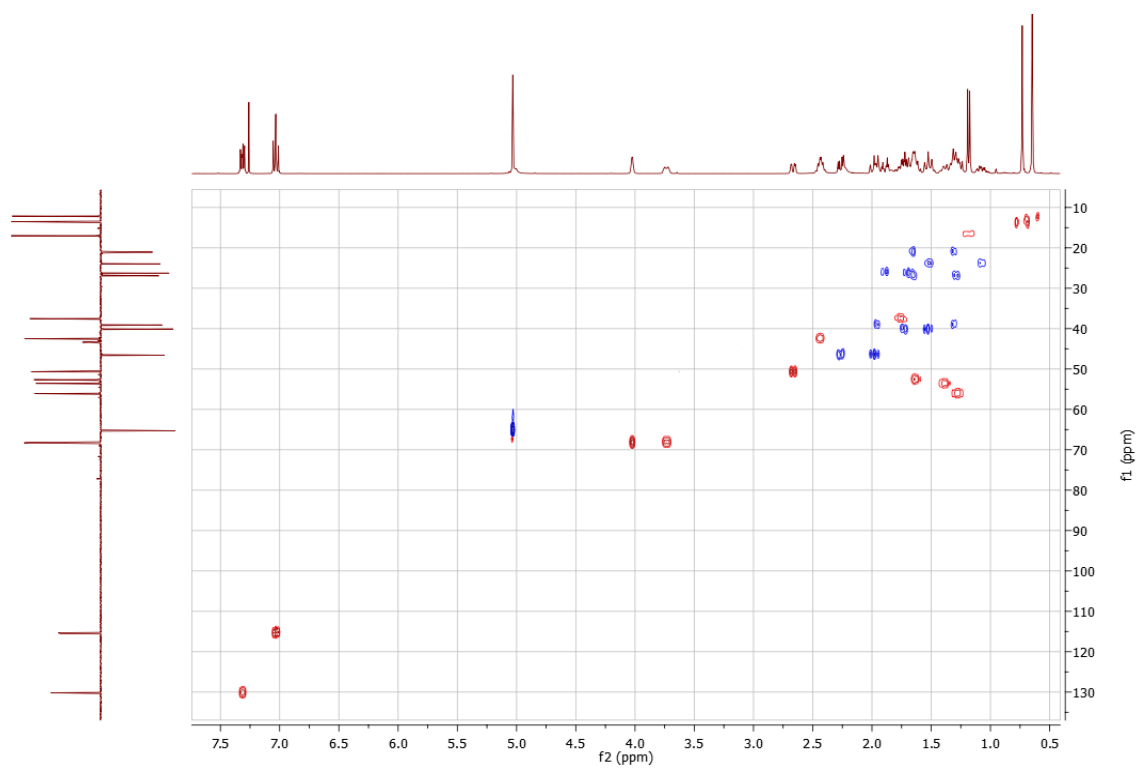


Figura A3. 62: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**78b**).

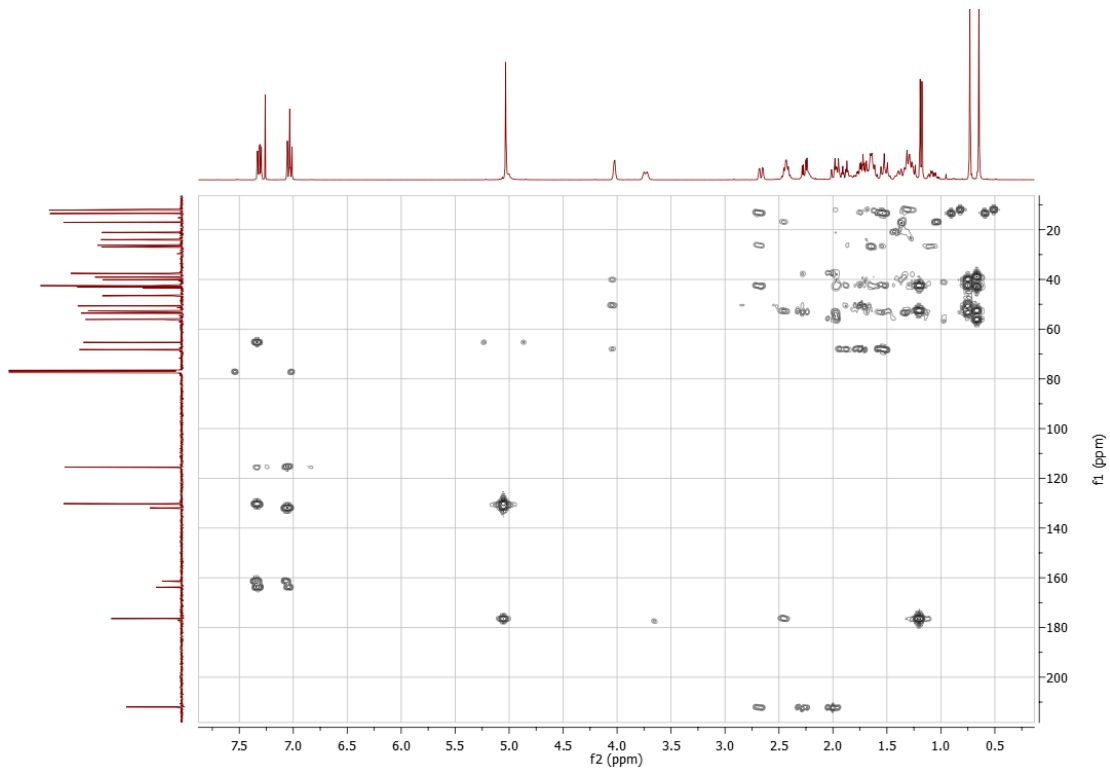


Figura A3. 63: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxilato de 4-fluorobencilo (**78b**).

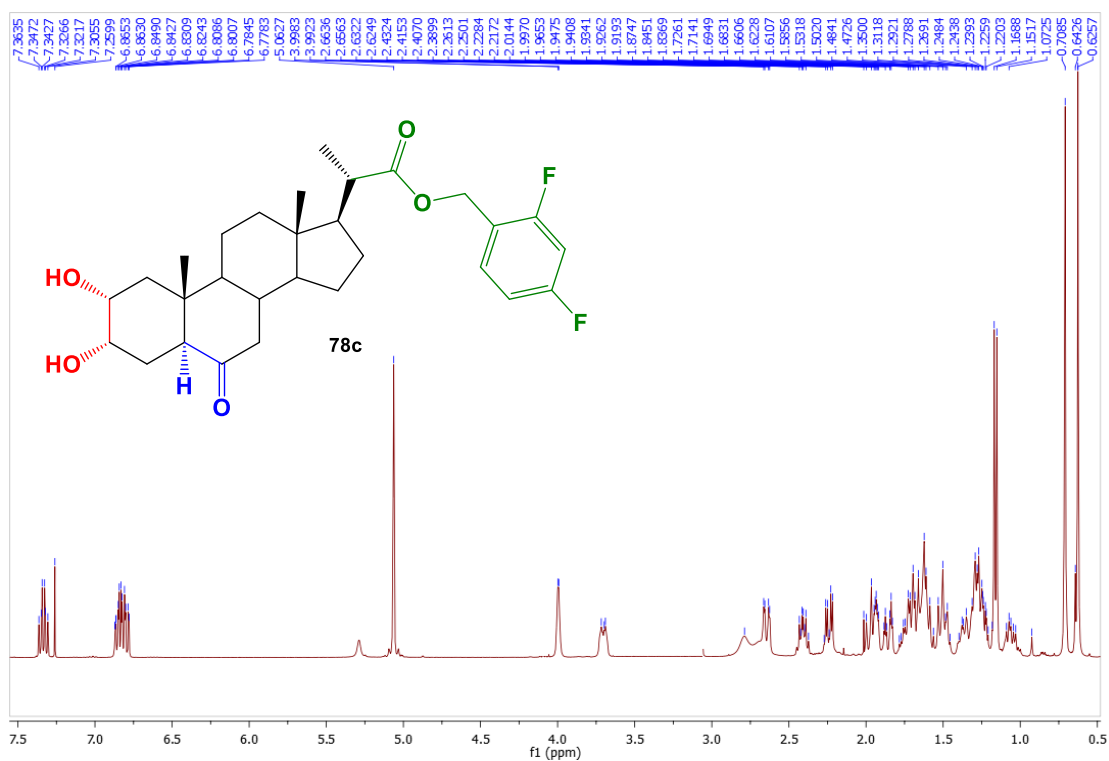


Figura A3. 64: Espectro de ^1H RMN de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-Oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (78c).

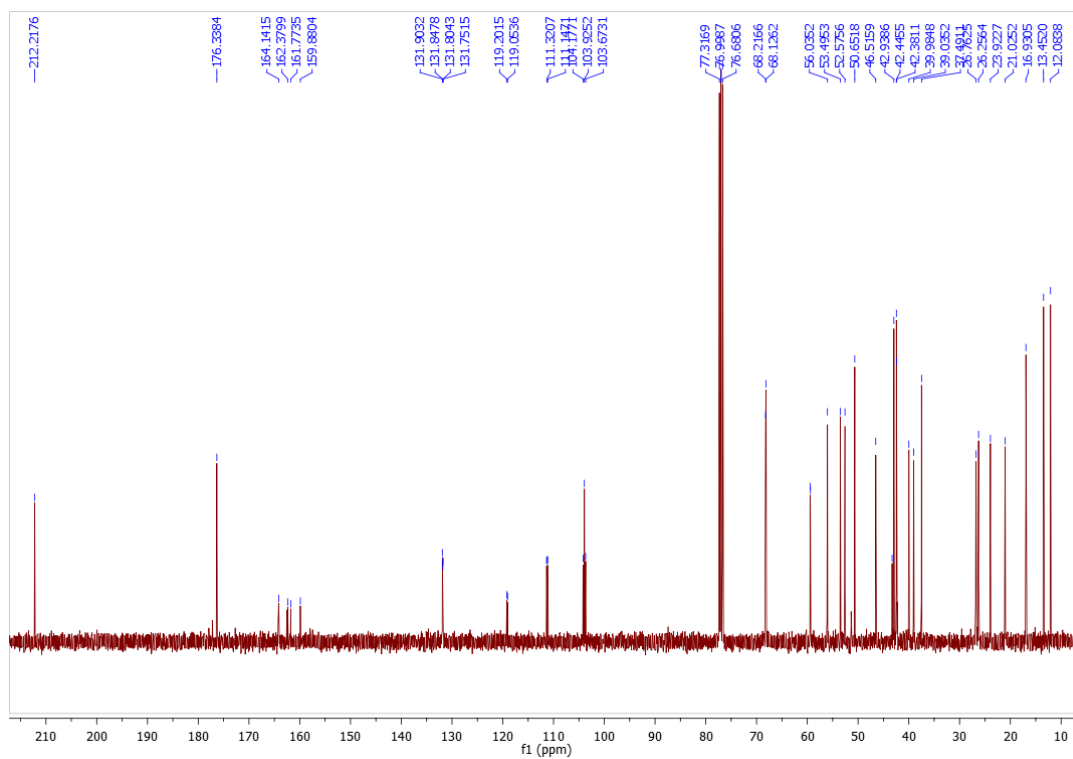


Figura A3. 65: Espectro de ^{13}C RMN de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-Oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (78c).

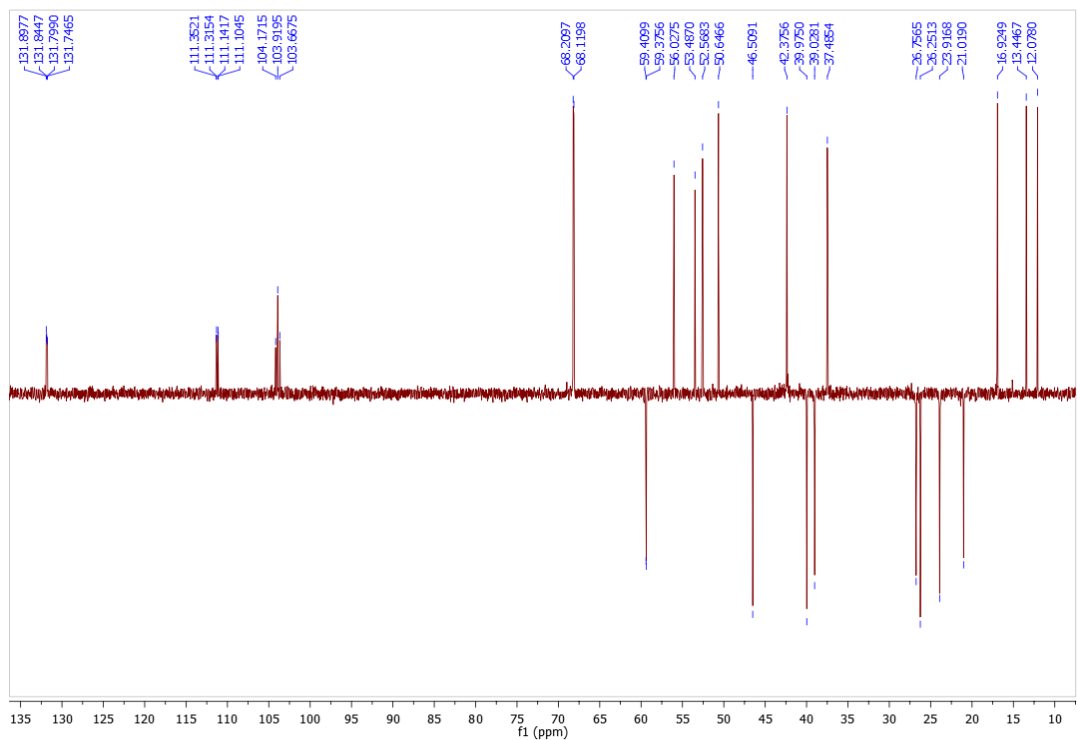


Figura A3. 66: Espectro de ^{13}C RMN DEPT-135 de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-Oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (**78c**).

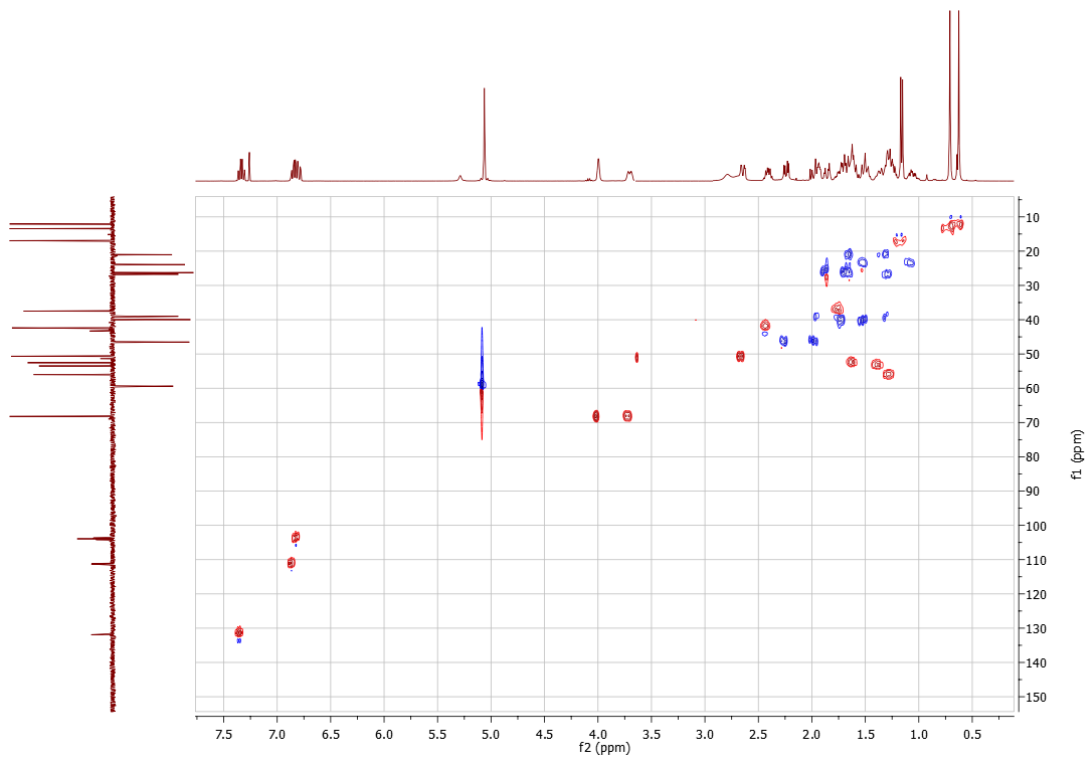


Figura A3. 67: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC ed. de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-Oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (**78c**).

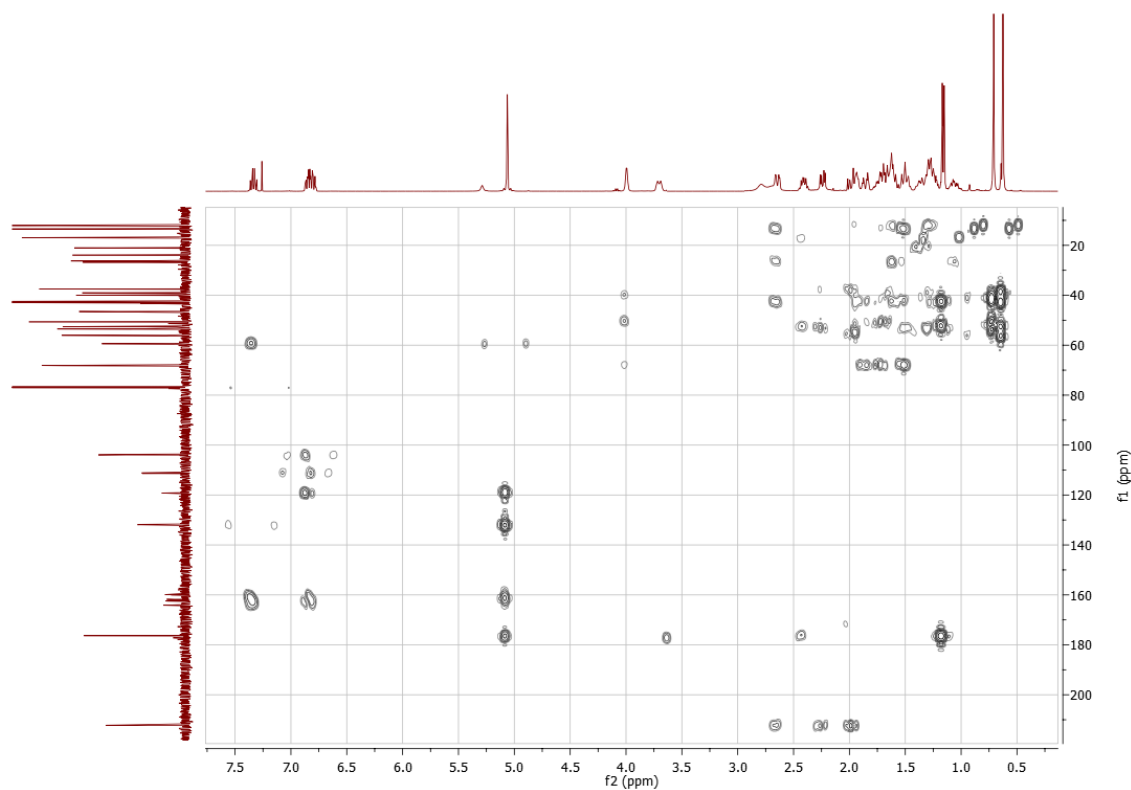


Figura A3. 68: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HMBC de (20S)-2a,3a-dihidroxy-6-Oxo-5a-preg-2-en-22-carboxilato de 2,4-difluorobencilo (**78c**).

Anexo 4: Espectros de Masas de Alta Resolución para los compuestos **75'** y **78a-c**.

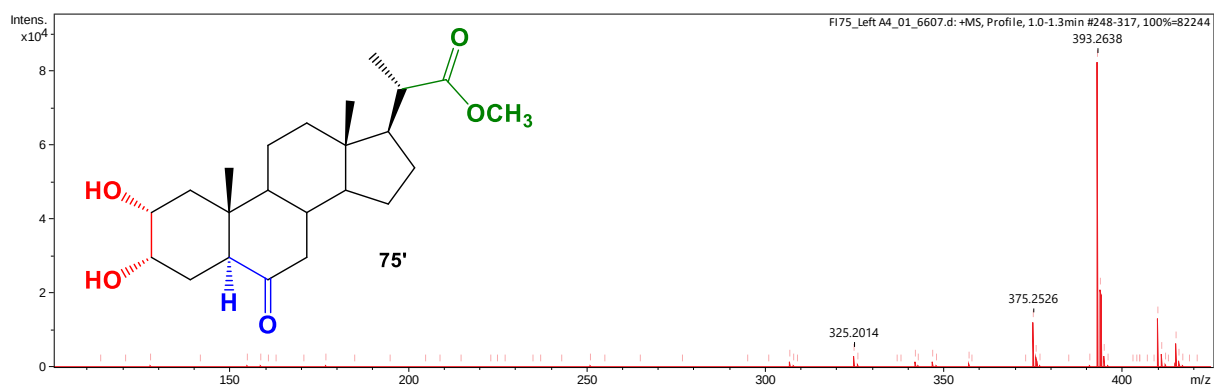


Figura A4. 1: Espectro de Masas de (20S)-6-oxo-5a-pregn-2-eno-20-carboxilato de metilo (**75'**).

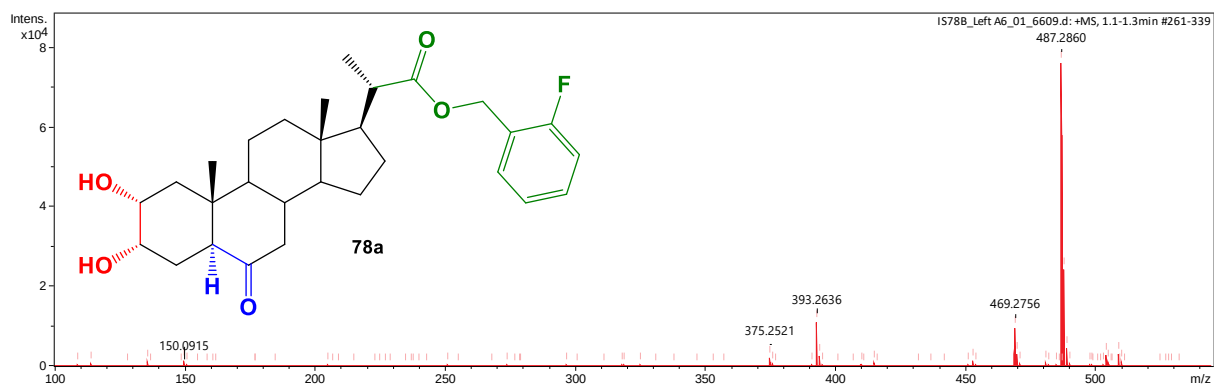


Figura A4. 2: Espectro de Masas de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxílate de 2-fluorobencilo (**78a**).

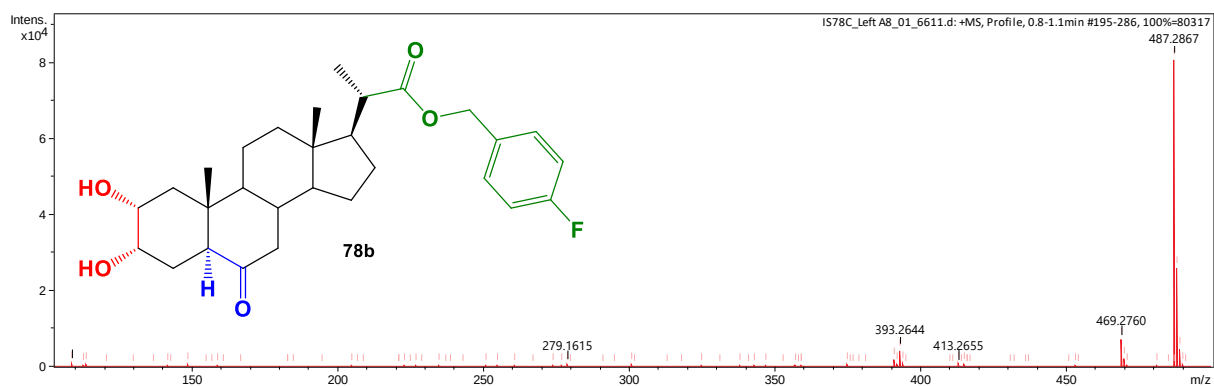


Figura A4. 3: Espectro de Masas de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -pregnan-22-carboxílate de 4-fluorobencilo (**78b**).

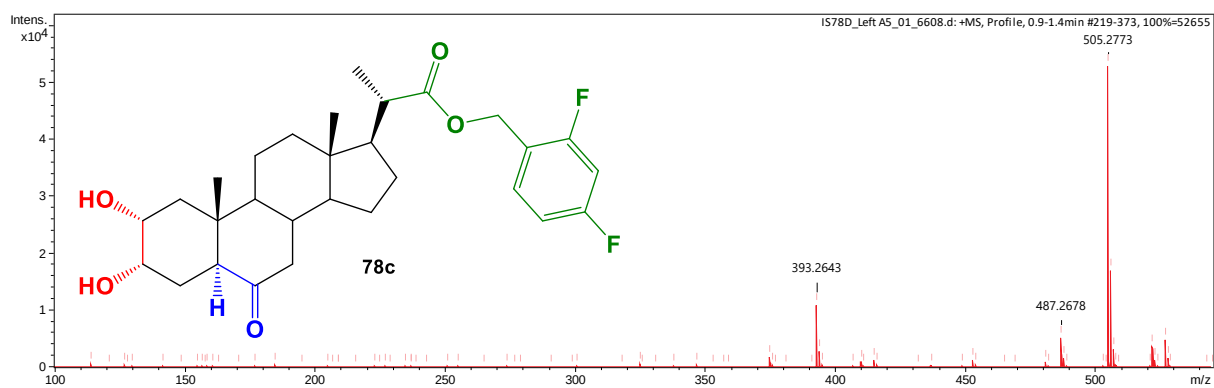


Figura A4. 4: Espectro de Masas de (20S)-2 α ,3 α -dihidroxy-6-oxo-5 α -preg-2-en-22-carboxílate de 2,4-difluorobencilo (**78c**).