



---

---

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“Síntesis y evaluación biológica de compuestos  
esteroidales en semillas de interés económico”**

**Tesis para obtener el título de  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**Sandra Andrade Montaña**

Director:

**Dr. Jesús Sandoval Ramírez**

Co-director:

**Dra. Etelvina Gándara Zamorano**

**Marzo, 2020**



## Agradecimientos

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez y la Dra. Etelvina Gándara Zamorano por compartirme su experiencia, conocimiento y motivación para el desarrollo del trabajo

Al M. en C. Alan Carrasco Carballo por su apoyo incondicional, dedicación y amistad brindada.

A la M. en C. Itzel Paulina Morales Sandoval por enseñarme tanto, por la compañía y amistad brindada.

A la M. en C. Ana Lucia Castillo Meza por el apoyo incondicional, paciencia, motivación, orientación, conocimientos y amistad brindada.

A la Dra. Dulce María Figueroa Castro por el tiempo dedicado a la revisión, por darme una mejor perspectiva para realizar mejoras a mi tesis y por enseñarme a ser una mejor estudiante.

A mis compañeros por las enseñanzas y apoyo, en especial a Denis, Christian y Alberto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No.... que me fue otorgada.

## Dedicatoria

A mi familia por darme tanto amor y siempre tratar de hacer de mi un mejor ser humano, en especial a Lucy, Guadalupe y Mary quienes siempre me ha apoyado y ha dado tonto de si para verme crecer, ¡gracias por todo!

A mi esposo, por todo el amor y apoyo para continuar con mi carrera.

## ÍNDICE

---

<b>RESUME</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>MÉTODOS</b> .....	17
Descripción de especies .....	17
<b>SÍNTESIS QUÍMICA</b> .....	23
PURIFICACIÓN DE DIOSGENINA.....	24
APERTURA DE DIOSGENINA .....	24
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ESTUDIO BIOLÓGICO .....	25
<b>PRUEBAS BIOLÓGICAS</b> .....	25
HOMOGENIZACIÓN DE SEMILLAS.....	25
DESINFECCIÓN DE SEMILLAS .....	26
TIEMPOS DE IMBIBICIÓN.....	27
DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27
PRUEBAS IN VITRO.....	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	33
APERTURA DE DIOSGENINA .....	33
VELOCIDAD DE GERMINACIÓN .....	38
Maíz ( <i>Zea mays</i> ).....	38
Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) .....	40
Rábano ( <i>Raphanus sativus</i> ).....	41
ACLOPAMIENTO MOLECULAR .....	42
Maíz .....	43
Frijol .....	47
Rábano .....	51
<b>DISCUSIÓN</b> .....	56
EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	56
Velocidad de germinación .....	56
Variables morfométricas .....	57

<b>CONCLUSIÓN</b> .....	59
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Brassica napus .....	7
Figura 2. Ejemplo de un (25R)-espirostano.....	8
Figura 3. Principales especies de Dioscorea por su concentración de diosgenina.....	9
Figura 4. Nuevos análogos de brasinoesteroides.....	10
Figura 5. Estructura de la diosgenina.....	15
Figura 6. Estructura de la semilla de maíz.....	17
Figura 7. Estadios vegetativos y reproductivos del maíz.....	19
Figura 8. Composición interna de la semilla de frijol.....	20
Figura 9. Estadios vegetativos y reproductivos del frijol.....	21
Figura 10. Porcentaje de germinación por especie.....	23
Figura 11. Fórmula de Sturges.....	23
Figura 11. Productos de la reacción.....	30
Figura 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, a 500 MHz, de Ac-Ac .....	31
Figura 14. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, a 125 MHz, de Ac-Ac .....	31
Figura 15. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, a 500 MHz, de Ac-OH.....	32
Figura 16. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C a 125 MHz de Ac-OH.....	32
Figura 17. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, a 500 MHz, de OH-OH.....	33
Figura 18. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, a 125 MHz, de OH-OH.....	33
Figura 19. Velocidad de germinación para maíz .....	35
Figura 20. Velocidad de germinación para frijol .....	36
Figura 21. Velocidad de germinación para rábano .....	37
Figura 22. ΔG de las uniones ligando- receptor .....	38
Figura 23. Diagrama de Caja-Bigotes para ancho de vástago en maíz.....	40
Figura 24. Diagrama de Caja-Bigotes de biomasa de la raíz en maíz.....	41
Figura 25. Diagrama de Caja-Bigotes de biomasa del vástago en maíz.....	42

Figura 26. Diagrama de Caja-Bigotes de ancho del vástago en frijol.....	43
Figura 27. Diagrama de Caja-Bigotes de largo de la raíz en frijol.....	44
Figura 28. Diagrama de Caja-Bigotes de largo del vástago en frijol.....	45
Figura 29. Diagrama de Caja-Bigotes de biomasa de la raíz en frijol .....	46
Figura 30. Diagrama de Caja-Bigotes de ancho de la raíz en rábano. ....	47
Figura 31. Diagrama de Caja-Bigotes de ancho del vástago en rábano .....	48
Figura 32. Diagrama de Caja-Bigotes de biomasa de la raíz en rábano.....	49
Figura 33. Comparación de espectros de RMN de 1H a 500 MHz de Ac-Ac, Ac-OH y OH-OH.....	51
Figura 34. Comparación de espectros de RMN de 13C a 125 MHz de Ac-Ac, Ac-OH y OH-OH.....	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de estadios vegetativos y reproductivos más representativos del desarrollo del maíz.....	17
Cuadro 1. Descripción de estadios vegetativos y reproductivos más representativos del desarrollo del frijol .....	20
Cuadro 2. Descripción de estadios más representativos del desarrollo del rábano....	22
Cuadro 3. Protocolos de desinfección de semillas aplicado a cada especie.....	24
Cuadro 5. Proteínas evaluadas con código de PD Bank.....	27
Cuadro 6. Región búsqueda de cada malla y coordenadas correspondientes.....	28
Cuadro 7. Valores de devianza para maíz.....	34
Cuadro 8. Valores de devianza para frijol.....	35
Cuadro 9. Valores de devianza para rábano.....	36
Cuadro 10. Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos Ac-Ac, Ac-OH y OH-OH.....	37
Cuadro 11. Valores de devianza de variables morfométricas para maíz.....	39
Cuadro 12. Valores de devianza para ancho del vástago de maíz.....	39
Cuadro 13. Valores de devianza para biomasa de la raíz en maíz.....	40

Cuadro 14. Valores de devianza para biomasa del vástago en maíz.....	41
Cuadro 15. Valores de devianza de variables morfométricas para frijol.....	42
Cuadro 16. Valores de devianza para ancho del vástago en frijol.....	43
Cuadro 17. Valores de devianza para el largo de la raíz en frijol.....	43
Cuadro 18. Valores de devianza para el largo del vástago en frijol.....	44
Cuadro 19. Valores de devianza para biomasa de la raíz en frijol.....	45
Cuadro 20. Valores de devianza de variables morfométricas para rábano.....	46
Cuadro 21. Valores de devianza para ancho de la raíz en rábano.....	47
Cuadro 22. Valores de devianza para ancho del vástago en rábano.....	47
Cuadro 23. Valores de devianza para biomasa de la raíz en rábano.....	48

## **ÍNDICE DE ESQUEMAS**

Esquema 1. Degradacion de Marker .....	8
Esquema 2. Reacción de cuatro pasos y compuesto principal de reacción.....	11
Esquema 3. Apertura de diosgenina.....	15

## RESUMEN

---

Las fitohormonas son importantes para el crecimiento y desarrollo vegetal, particularmente los brasinoesteroides son importantes ya que influyen una amplia gama de procesos, tales como la germinación, formación de raíces, floración, maduración y senescencia, por lo que tienen un amplio potencial para la agricultura.

Con el propósito de generar familias miméticas a los brasinoesteroides, en el presente trabajo se describe la metodología para la obtención de derivados 22-oxo-colestánicos a partir de la apertura de la cadena lateral espiroestánica de la diosgenina con  $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$  y  $\text{Ac}_2\text{O}$  en una vía sintética de un paso. Producto de la reacción, se obtuvo una mezcla de siete compuestos que se purificaron y caracterizaron, de los cuales los tres productos más abundantes denominados **Ac-Ac**, **Ac-OH**, **OH-OH**, se retomaron para evaluar su actividad como promotores del crecimiento vegetal en plantas de maíz, frijol y rábano, empleando pruebas *in vitro*. Las semillas fueron embebidas con soluciones con los compuestos sintetizados a tres diferentes concentraciones ([0.01 mg/L], [0.1 mg/L] y [1.0 mg/L]), se sembraron en cultivo agar-agua al 6% y se monitoreó el crecimiento durante las primeras etapas de desarrollo, mediante la evaluación de la velocidad de germinación y variables morfométricas durante las primeras etapas de las plántulas.

El compuesto con sustituyentes **OH-OH** mostró acelerar la velocidad de germinación en maíz y frijol en un 25.5% y 8.6% respectivamente, mientras que el compuesto con sustituyentes **Ac-OH** retrasa la germinación en un 35.75%, 41.8% y 118.34% para maíz, frijol y rábano, respectivamente. Para las variables morfométricas no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones y se vieron afectadas positivamente las variables de biomasa de la raíz en maíz, largo y biomasa de la raíz en frijol.

Se obtuvieron compuestos en una vía sintética más rápida, los cuales mostraron acelerar la germinación y mejoras en el sistema radicular la maíz y frijol.

## INTRODUCCIÓN

---

La demanda de alimentos, debida principalmente al aumento exponencial de la población y al modelo económico que deriva granos a otras funciones, ha llevado a la industria agropecuaria y biotecnológica a desarrollar nuevas tecnologías que permitan obtener más y mejores productos en un menor tiempo, pero que al mismo tiempo estén diseñados para causar el menor impacto en el ambiente y en la salud de los consumidores (Food and Agriculture Organization, 2009).

Una de estas tecnologías ha sido la aplicación de fitohormonas, que se definen como sustancias químicas, que actúan a bajas concentraciones para activar o inhibir ciertos procesos fisiológicos, tales como el crecimiento, diferenciación, metabolismo y morfogénesis, además de regular las respuestas al ambiente (Lira, 2007). Actualmente se reconoce a seis grupos principales de fitohormonas: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico, y los brasinoesteroides (Azcón-Bieto & Talon, 2008).

Los brasinoesteroides son una familia de compuestos que actúan como reguladores del crecimiento vegetal, descubiertos por Mitchell y colaboradores (1970), aislados del polen de *Brassica napus* L. (Figura 2), planta oleaginosa conocida como colza. En su estructura básica derivan del campestano, presentan una lactona o cetona en el anillo B y grupos hidroxilo en diversas posiciones. (Hernández & García-Martínez, 2016) A la fecha se han aislado e identificado más de 60 brasinoesteroides a partir de fuentes naturales (Hayat et al., 2019).

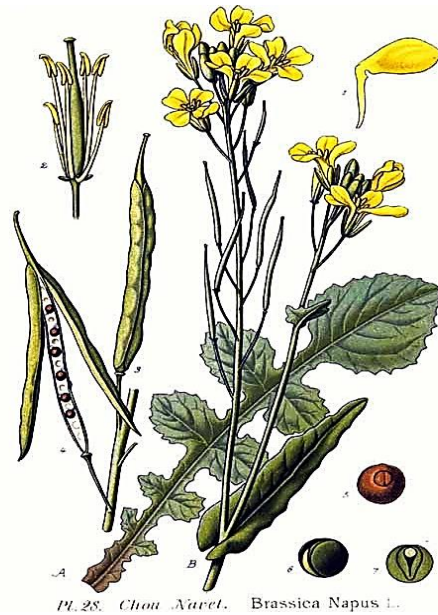


Figura 1. *Brassica napus* (tomada de Masclef, 1987).

Estos se encuentran en polen, hojas, yemas, flores y semillas (Seeta et al., 2002), e influyen en la germinación, formación de raíces, floración, maduración, senescencia, grosor del tallo, incrementan el contenido de clorofila, además de conferir resistencia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, así como a plaguicidas y herbicidas. Esto les confiere un amplio potencial en la agricultura, ya que pequeñas cantidades provocan mejoras en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mandava, 1988; Abe, 1989).

Tras su descubrimiento, debido a su difícil proceso de extracción, se planteó la posibilidad de diseñar rutas sintéticas para obtener nuevos compuestos con actividad similar a los brasinoesteroides, a los cuales se le ha denominado análogos de brasinoesteroides (Núñez, 1999). Los brasinoesteroides naturales (Yokota, 1997) más activos son la brasinólida, la 24-epibrasinólida y la 28-homobrasinólida (Khrpach, Zhabinskii & de Groot, 2000). En el establecimiento de la ruta sintética para la obtención de homobrasinólida a partir de estigmasterol, Brosa y colaboradores evaluaron la relación entre la estructura del derivado y la actividad biológica, concluyendo que los grupos hidroxilo en las posiciones 2 y 3, el grupo carbonilo en la posición 6 y una cadena lateral hidroxilada favorecen la actividad como promotor de crecimiento vegetal (Brosa, 1994; Brosa et al., 1998).

Otros análogos se pueden sintetizar a partir de fuentes naturales como son los estirostanos, que contienen 27 átomos de carbono. Estos compuestos presentan dos anillos más (anillos E y F) que la estructura básica tetracíclica del fenantreno. (Figura 2) (Xochihua, 2005).

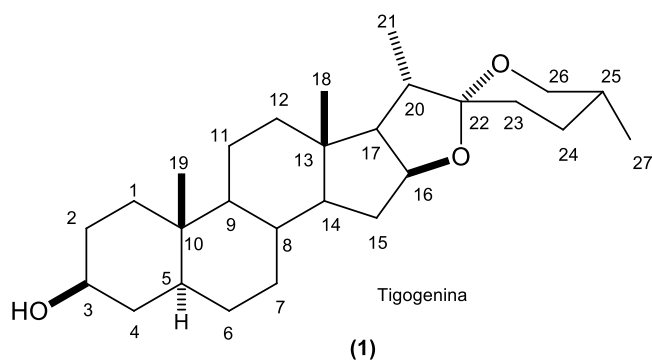
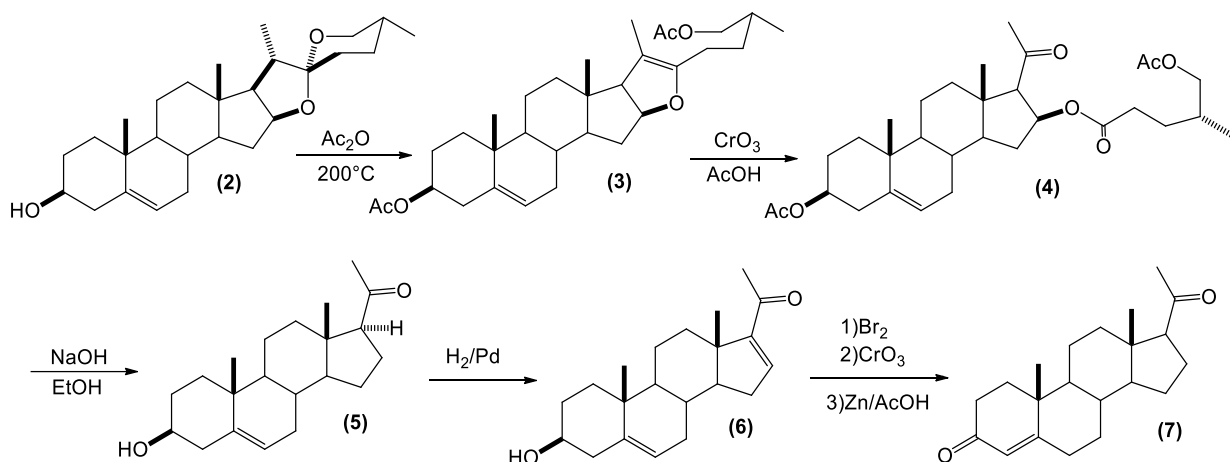


Figura 2. Ejemplo de un (25R)-estirostano.

Entre las saponinas esteroidales, destacan la tigogenina, hecogenina y diosgenina. El uso de la diosgenina comenzó con la búsqueda de plantas como fuente principal de esteroides, para su transformación en progesterona. Russell Marker elaboró una metodología con la cual se pudo transformar a la sarsasapogenina y a la diosgenina en progesterona (Esquema 1), desarrollado en los años 1940 (León, 2001).



Esquema 1. Degradación de Marker.

La diosgenina se obtiene generalmente de plantas del género *Dioscorea*, que incluye a más de 600 especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y templadas de Asia, África y América, de las cuales alrededor de 70 son mexicanas

(Sautour, Mitaine-Offer & Lacaille-Dubois, 2007; Sosa, Schubert & Gómez-Pompa). Las especies que contienen mayor porcentaje de diosgenina son: *D. composita* (Hemsl.), *D. mexicana* (Guillem.), *D. floribunda* (Mart. & Gal.), *D. deltoidea* (Wall.) (Figura 3). En *D. composita* puede alcanzar el 9 % en época reproductiva (Hernández, 2007).

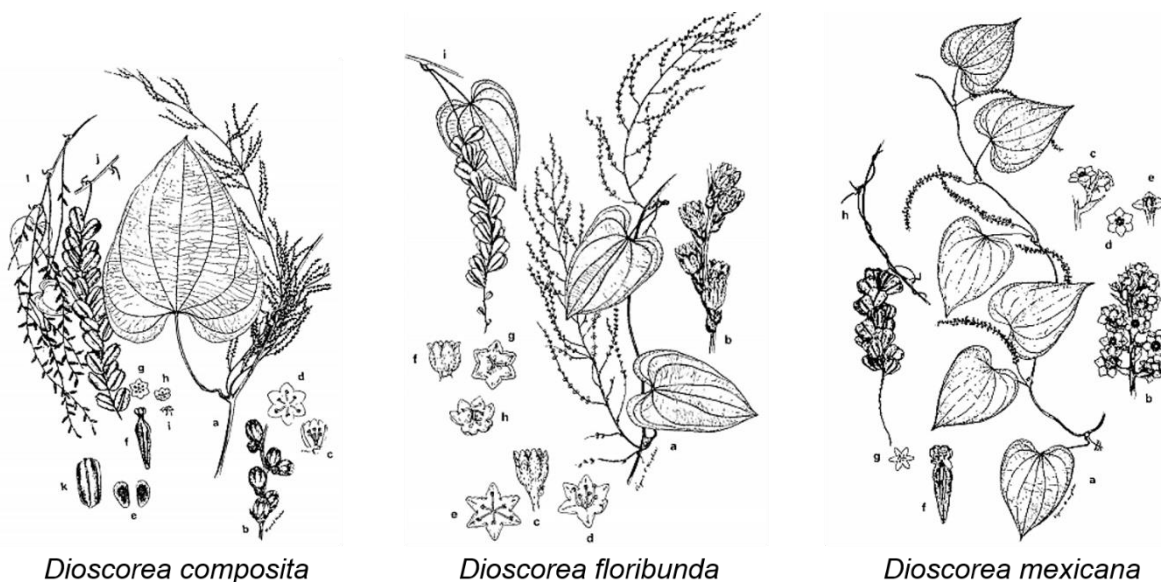


Figura 3. Principales especies de *Dioscorea* por su concentración de diosgenina (tomada de Sosa, Schubert & Gómez-Pompa, 1987).

Los análogos de brasinoesteroides han mostrado efectos en germinación de las semillas, crecimiento y resistencia a estrés (Núñez, 1999), lo que ha resaltado su importancia, por lo que Voigt y colaboradores (1996) sintetizaron análogos de brasinólida, sin el grupo hidroxilo en el C-2, desarrollando un método que implicaba menos pasos en la reacción y por primera vez por medio de reacciones estereoselectivas, facilitando la purificación. Así mismo se han sintetizado compuestos con modificaciones en el heteroátomo de la lactona, insertando átomos de nitrógeno, azufre o carbono en C-2, observando que, al insertar el nitrógeno, se modifica la lactona en lactama (Figura 4), lo que aumenta significativamente la actividad biológica (Baron et al., 1998). En cambio, al insertar carbono en esta posición, la bioactividad disminuye drásticamente, por lo que concluyeron que es determinante la presencia de un grupo polar en esta posición (Baron et al., 1998).

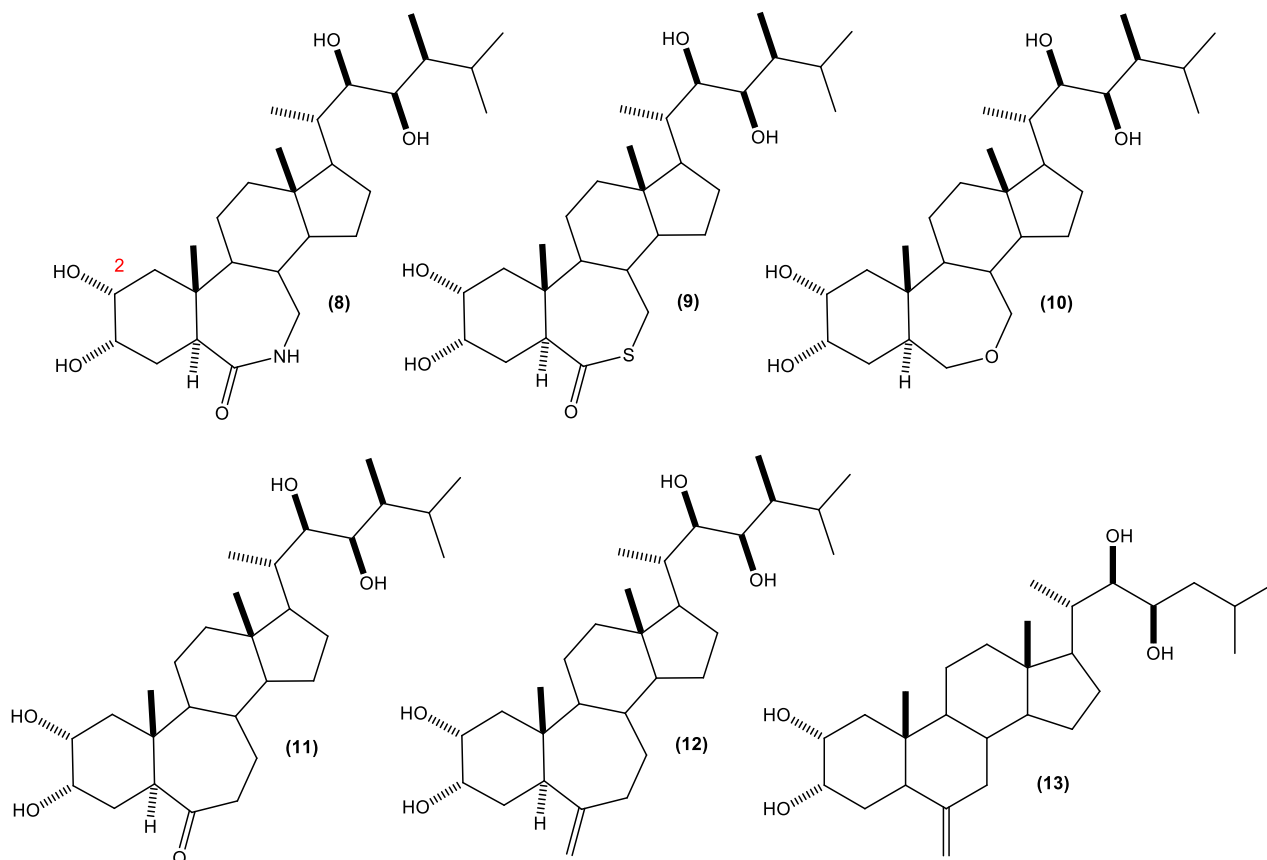
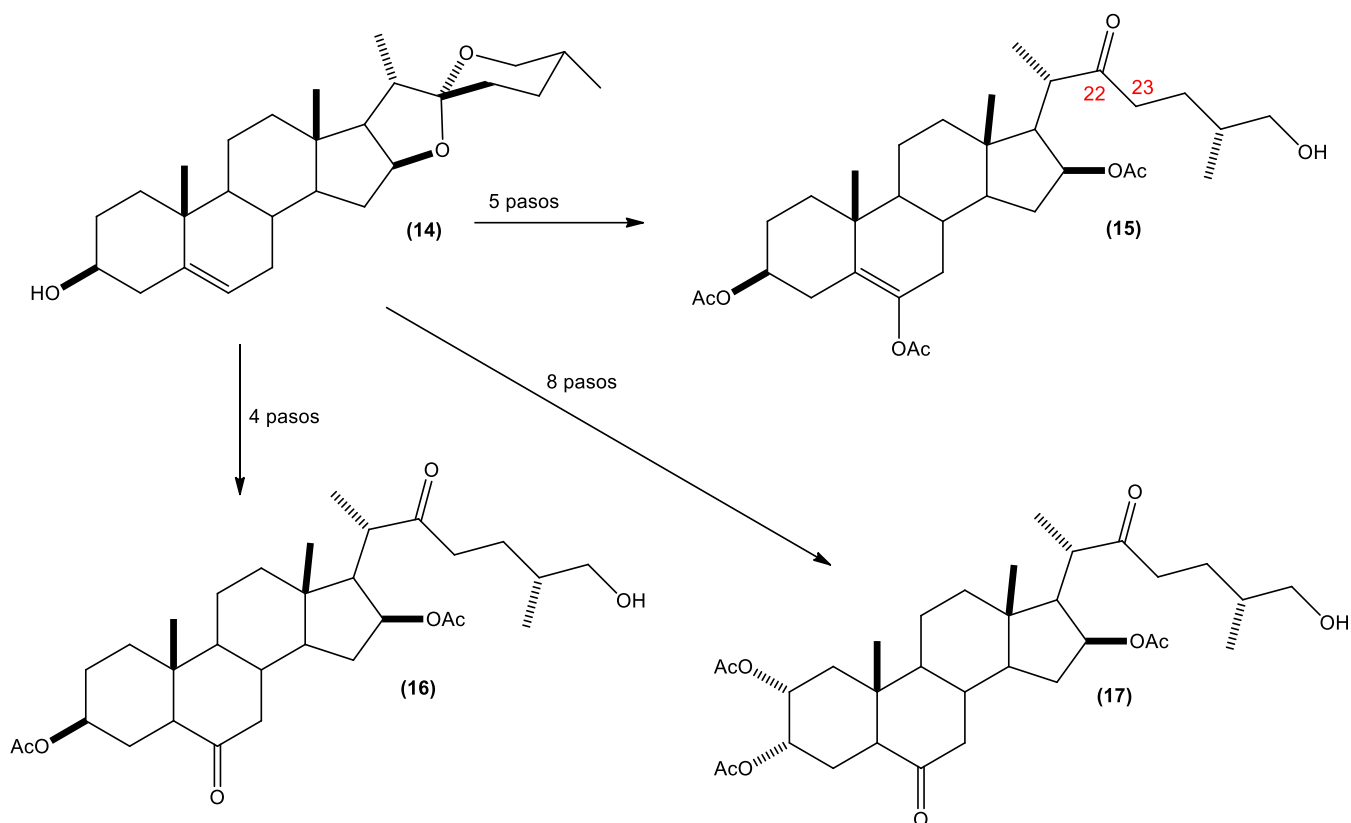


Figura 4. Nuevos análogos de brasinoesteroides sintetizados por Baron y colaboradores.

Sandoval y colaboradores han desarrollado rutas para la obtención de nuevos compuestos promotores del crecimiento vegetal. En 2013 reportaron una nueva forma de obtener derivados 12,22,23-trioxocolestánicos y una ruta para la obtención de cadenas colestánicas funcionalizadas en C-22 y C-23 a partir de diosgenina con una reacción de acetólisis con  $\text{Ac}_2\text{O}$  y  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ . De esta manera lograron efectuar la apertura de los anillos E y F. Posteriormente sintetizaron nuevos derivados 22-oxo-colestánicos derivados de diosgenina y hecogenina con rendimientos de 72-74%, obtenidos en una vía de cuatro pasos, evaluándolos con el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz y comparándolos con homobrasinólida, encontrando dos compuestos que son tan activos como la homobrasinólida (Gómez-Calvario et al., 2013). Así mismo, Zeferino-Díaz y colaboradores (2015, 2017) sintetizaron y caracterizaron de 26-hidroxi-22-oxocolestanos con el propósito de imitar a los brasinoesteroides naturales (Esquema 2), encontrando una actividad

promotora del crecimiento vegetal significativa en el ensayo de la inclinación de la lámina de arroz (Zeferino-Díaz *et al.*, 2015; Zeferino-Díaz *et al.*, 2017).



Esquema 2. Reacción de cuatro pasos y compuesto principal de reacción (Zeferino-Díaz *et al.*, 2017).

Compuestos sintetizados por Fernández (2010) se evaluaron con diferentes pruebas biológicas encontrando que los promotores del crecimiento vegetal BSS-1 y BSS-4 sintetizados en una vía de un paso, pero con rendimientos muy bajos (12%) y de dos pasos respectivamente tienen efectos positivos al aumentar la biomasa en plantas de maíz en invernadero (Moreno, 2009). Al mismo tiempo se evaluó el efecto del aBR12 y aBR18 en una vía sintética de un paso, pero a partir de materia prima costosa y dos pasos con un rendimiento del 2%, en maíz criollo e híbrido y en jitomate, encontrando que aBR18 tiene efectos positivos sobre el desarrollo celular y la biomasa en maíz, mientras que el aBR12 tuvo mejores efectos en jitomate, aumentando la biomasa y la producción del fruto en pruebas realizadas en invernadero (Cruz, 2015; Hilario-Martínez, 2016).

Otra prueba realizada con BSS-4 a diferentes concentraciones evaluó el efecto sobre el desarrollo de plántulas de *Laelia anceps* Lindl. en cultivo *in vitro* con medio MS y hormonas vegetales (NAA y BAP), encontró efectos positivos sobre peso fresco y número de hojas (Galicia, 2014). En el desarrollo de plántulas de *Epidendrum ciliare* L., aumentó el número de hojas y la biomasa (Rojas, 2015).

Por otra parte, los granos son fundamentales en la dieta, por sus características nutritivas y por su costo moderado (Ruíz, 2005). El maíz (*Zea mays* L.) es el principal cultivo a nivel mundial ya que para julio de 2019 aumentó la producción a 1124 millones de toneladas a nivel mundial (Food and Agriculture Organization, 2019). La importancia del maíz se debe a que tiene una amplia gama de usos: el consumo humano y pecuario, en la industria para la producción de almidón, glucosa, aceites, etanol, bebidas alcohólicas (Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo, 2006); en México además de tener importancia económica, tiene importante valor cultural, además de que posee una diversidad genética única (Foro Consultivo Científico y Tecnológico, A.C., 2008).

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México representa un cultivo clave en la dieta, junto con el maíz. Se cultivan alrededor de 70 variedades, de las cuales las de mayor consumo son: azufrado, mayocoba y negro Jamapa. En 2019 Sinaloa, Nayarit y Chiapas aportaron el 79.4% de la producción nacional (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2019).

El rábano (*Raphanus sativus* L.) es una hortaliza que se consume fresca; en promedio al año se cosechan 52 mil toneladas, en una superficie alrededor de las 2 600 hectáreas. No solo se comercializa a nivel nacional, se exporta principalmente a Estados Unidos con 37 000 toneladas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018).

## HIPÓTESIS

---

La introducción de grupos funcionales en una estructura esteroideal modifica fuertemente su bioactividad. Así, se pueden generar nuevos compuestos que incidan favorablemente en la germinación y el desarrollo en plantas de maíz, frijol y rábano. Dado que los receptores biológicos no son los mismos para las tres especies, la aplicación de nuevos análogos de brasinoesteroides provocará respuestas diferentes en la velocidad de germinación y variables morfométricas.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL

Sintetizar compuestos esteroidales y evaluar sus efectos en la germinación y el crecimiento durante las primeras etapas, en plantas de interés económico a tres diferentes concentraciones para definir el compuesto con mayor bioactividad.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar compuestos esteroidales a partir de diosgenina por una vía sintética que implica menos pasos e insumos.
2. Determinar los efectos provocados por las concentraciones [0.01 mg/L], [0.1 mg/L], [1.0 mg/L] de los compuestos **Ac-Ac**, **Ac-OH** y **OH-OH** sobre la germinación durante las primeras etapas en maíz, frijol y rábano.

## MÉTODOS

---

### SISTEMA DE ESTUDIO

Se trabajó con tres especies de importancia económica: maíz, frijol y rábano.

### Descripción de especies

- Maíz

*Zea mays* es una especie herbácea, anual, monoica, que puede llegar a los 5 m de altura, con tallo nudoso que lleva de 15 a 30 hojas alargadas abrazadoras de 35 a 40 cm de longitud (Llanos, 1984). El grano está compuesto por una cariósperide que consta de tres partes principales: la pared, el endospermo triploide y el embrión diploide. La cubierta de la semilla, que es la pared del ovario, se llama pericarpio, es dura y debajo de ella se encuentra la capa de aleurona, que le confiere color al grano (blanco, amarillo, morado) y que contiene las proteínas (Figura 6). El embrión está formado por la radícula y la plúmula, ubicándose en el escutelo, localizado en la parte inferior del grano, donde va adherido a la tusa o raquis (Ospina, 2015).

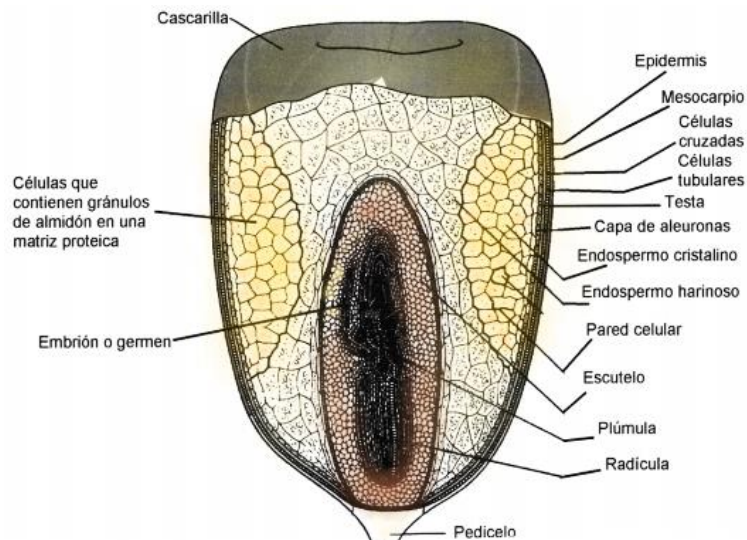


Figura 6. Estructura de la semilla de maíz (Tomada de Hoseney & Faubion, 1992).

El desarrollo del maíz se lleva a cabo en varias etapas con dos momentos principales: el estadio vegetativo (V) y el estadio reproductivo (R). El estadio

vegetativo abarca desde la emergencia (VE) hasta la aparición de la espiga masculina (VT), mientras que los estadios reproductivos comienzan con la aparición de estigmas (R1) y finalizan con la madurez fisiológica (Cuadro 1 y Figura 7). Las diferentes etapas de la etapa vegetativa son designadas numéricamente y cada estado es definido por la hoja superior cuyo cuello es visible.

Cuadro 4. Descripción de estadios vegetativos y reproductivos más representativos del desarrollo del maíz.

Estadio	Descripción
<b>VE</b>	El coleóptilo emerge del suelo, comienza la elongación radicular, con dos hojas visibles el final (V2). En esta etapa la planta se mantiene con las reservas de almidón en el endospermo, pasando después por una transición en la que depende del endospermo como de la fotosíntesis.
<b>V3</b>	Es visible el cuello de la tercera hoja, en esta etapa la planta presenta crecimiento vigoroso originado del meristemo apical, las partes vegetativas y reproductivas del tallo inician su formación.
<b>V6</b>	Es visible el cuello de la sexta hoja, los entrenudos empiezan a elongarse, es una etapa de rápido crecimiento y la etapa de mayor requerimiento de nutrientes.
<b>V18</b>	Es visible el cuello de la décimo octava hoja, aparecen los estambres provenientes de los óvulos basales. En

	esta etapa la planta alcanza su máxima altura.
<b>VT</b>	Es visible la última rama de la inflorescencia masculina (espiga).
<b>R1</b>	Los estigmas son visibles, en el 50% de las plantas.
<b>R2</b>	Los granos están llenos de un líquido claro que permite ver el embrión, el almidón se ha empezado a acumular.
<b>R5</b>	Los granos tienen un 55% de humedad y la parte superior está llena de almidón sólido.
<b>Madurez fisiológica</b>	En esta etapa es visible una capa negra en la base del grano, la humedad es del 35%.

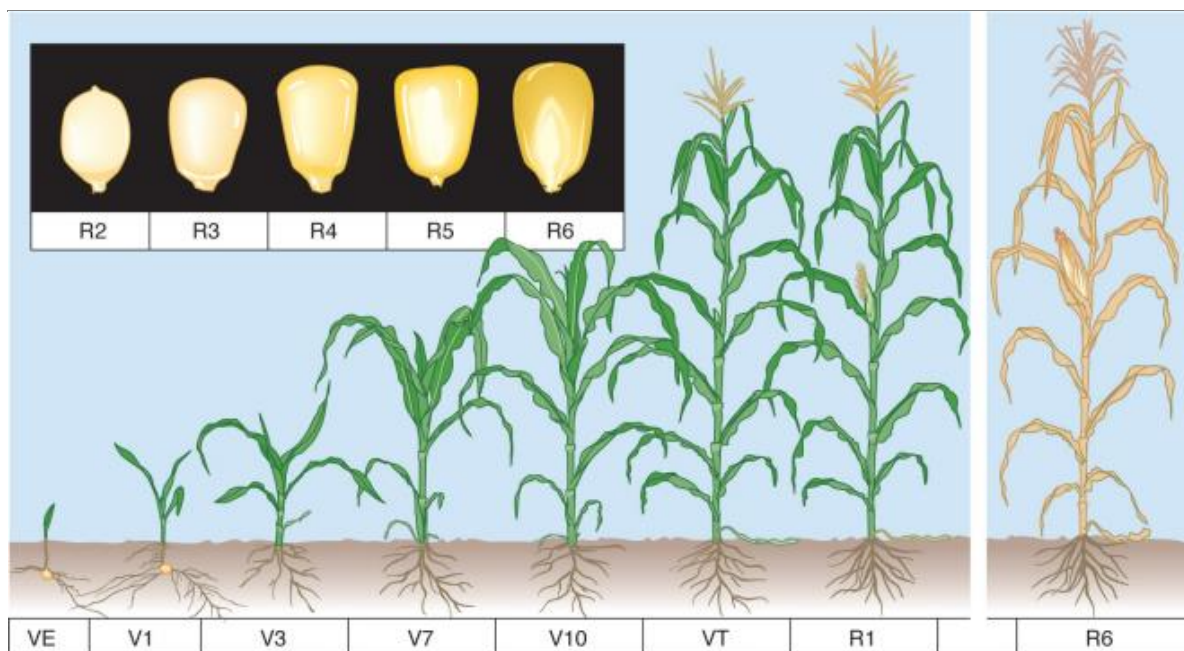


Figura 7. Estadios vegetativos y reproductivos del maíz (Tomada de Illinois Agronomy Handbook, 2009)

- Frijol

*Phaseolus vulgaris* es una especie herbácea de tallos delgados y débiles, cuadrangulares, con hojas trifoliadas, ápice acuminado, alcanza una altura de 50 a 70 cm con una raíz principal pivotante, la semilla es exalbuminosa, las reservas nutricionales se concentran en los cotiledones, la forma de la semilla puede ser cilíndrica, en forma de riñón o esférica, la testa corresponde a la capa secundina del ovulo, el hilum es dejado por el funículo que conecta la semilla con la placenta, el micropilo es una abertura cercana al hilum, que permite la absorción de agua, la rafe proviene de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del ovulo campilótropo, internamente la semilla contiene al embrión que está formado por la plúmula, dos hojas primarias, el hipocótilo, la radícula y los dos cotiledones (Figura 8) (Debouck & Hidalgo, 1985).

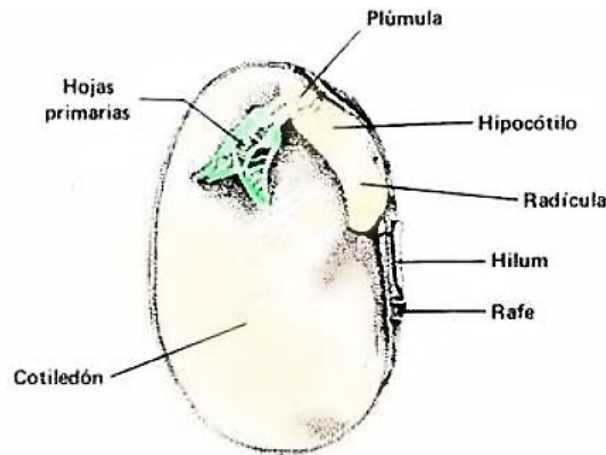


Figura 8. Composición interna de la semilla de frijol (Tomada de morfología de la planta de frijol, Debouck Debouck & Hidalgo, 1985).

El desarrollo de la planta de frijol comprende dos etapas sucesivas, la vegetativa (V) que inicia cuando la semilla tiene condiciones favorables para su germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales; la etapa reproductiva (R) inicia con la aparición de los primeros racimos florales y termina cuando el grano madura (Cuadro 2, Figura 9).

Cuadro 5. Descripción de estadios vegetativos y reproductivos más representativos del desarrollo del frijol.

Estadio	Descripción
---------	-------------

<b>V0</b>	La semilla está en condiciones favorables para iniciar la germinación, emerge la radícula.
<b>V2</b>	Inicia cuando el 50% de las hojas primarias están desplegadas, y se colocan en posición horizontal, ya se puede distinguir la yema terminal.
<b>V3</b>	En esta etapa empieza a desplegarse la hoja trifoliada en el 50% de las plantas, los cotiledones han empezado a secarse.
<b>V4</b>	Inicia cuando el 50% de las plantas he desplegado su tercera hoja trifoliada.
<b>R5</b>	Inicia cuando aparecen los primeros botones florales.
<b>R7</b>	Después de la fecundación de la flor, la corola se marchita y la vaina empieza a crecer.
<b>R9</b>	Inicia cuando el 50% de las vainas han cambiado de color verde a amarillo pigmentado, al igual que todas las partes de la planta que empiezan a secarse, las semillas tornan a su color final cuando la humedad baje hasta el 15%.

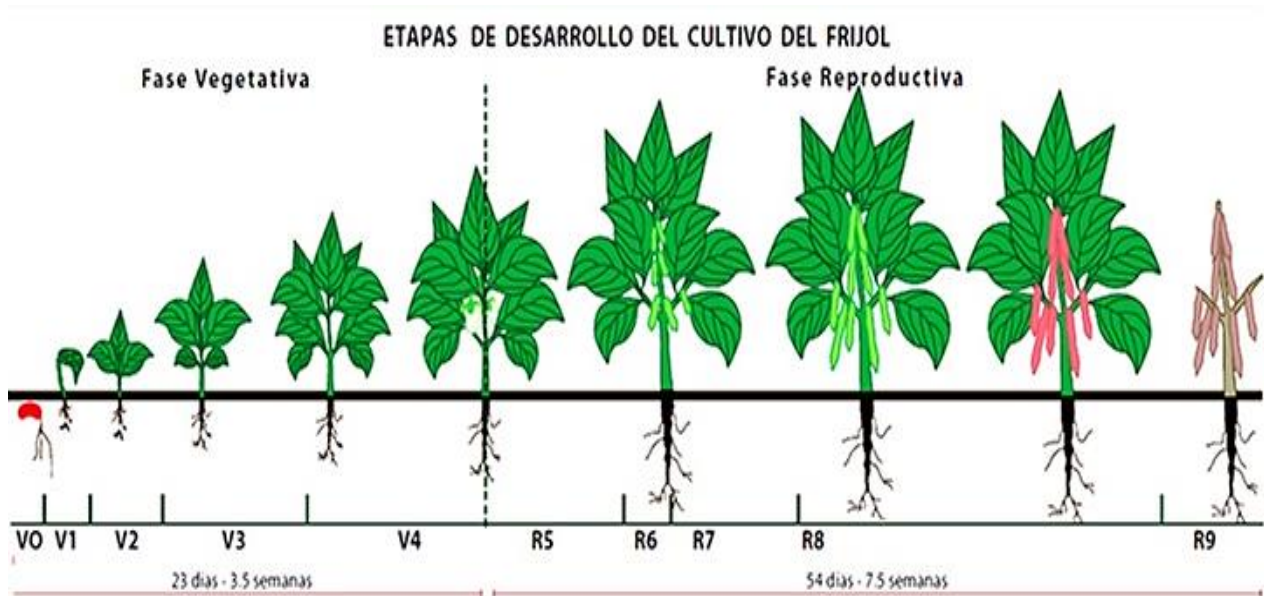


Figura 9. Estadios vegetativos y reproductivos del frijol (Tomada de Polanía, 2011)

- Rábano

*Raphanus sativus* es una especie herbácea anual o bianual alógama, de rápida maduración, cuyo producto comestible es la raíz (Gómez, 2011), presenta tallo liso, glabro ampliamente ramificado con hojas de hasta 24 cm de largo, las espatuladas u obovadas, pinnatifidas hasta pinnatisectas, presentan un lóbulo terminal grande y ancho, con lóbulos laterales más pequeños ovados u oblongos, presentan hojas caulinares, inflorescencia en racimo terminal con flores violáceas, rosadas o blancas, los frutos son indehiscentes, presenta semillas globosas o casi globosas, rosadas o castaño-claras opacas, reticuladas de 3 a 3.5 mm de diámetro (Rollins, 1993).

El código fenológico está basado en la escala BBCH (Basch - Bayer – Ciba – Hoechst) en la que los estadios principales son diez iniciando con la germinación (estado 0) y finalizando con la muerte o inicio de latencia (estadio 9), el desarrollo vegetativo corresponde a dos macroestadios, correspondientes al desarrollo de las hojas (estadio 1) y brotes (estadio 3), desarrollo de flores (estadio 5), floración (estadio 6) y el desarrollo del fruto (estadio 7). Los estadios secundarios también se numeran del cero al nueve e indican fases cortas del desarrollo (Cuadro 3) (Cruz, Armas & Guateque, 2015).

Cuadro 6. Descripción de estadios más representativos del desarrollo del rábano.

<b>Estadio</b>	<b>Descripción</b>
<b>00</b>	Semilla seca.
<b>05</b>	La radícula emerge de la semilla.
<b>08</b>	Emergencia: los cotiledones salen a la superficie del suelo.
<b>10</b>	Cotiledones completamente desplegados.
<b>11</b>	Primera hoja verdadera desplegada.
<b>13</b>	Tercera hoja verdadera desplegada
<b>43</b>	Bulbos o tubérculos comienzan a aumentar de diámetro.
<b>55</b>	Primeras flores individuales son &visibles en la inflorescencia principal (se encuentran cerradas).
<b>61</b>	Comienzo de la floración.
<b>71</b>	Primeros frutos formados.
<b>81</b>	Comienza la maduración de frutos y semillas.
<b>89</b>	Madurez completa: semillas de toda la planta con color y dureza típicos.
<b>90</b>	Comienza la senescencia.

## **SÍNTESIS QUÍMICA**

Con el propósito de generar nuevas familias miméticas a los brasinoesteroides, primero se purificó la materia prima (diosgenina) y posteriormente se llevó a cabo la apertura selectiva de los anillos E y F dando lugar a derivados 22-oxocolestásicos con modificaciones en la cantidad de grupos acetilo e hidroxilo.

## PURIFICACIÓN DE DIOSGENINA

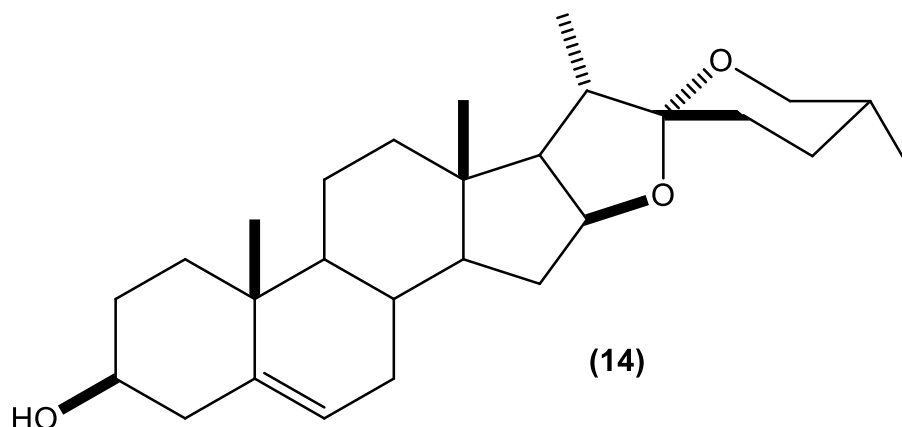
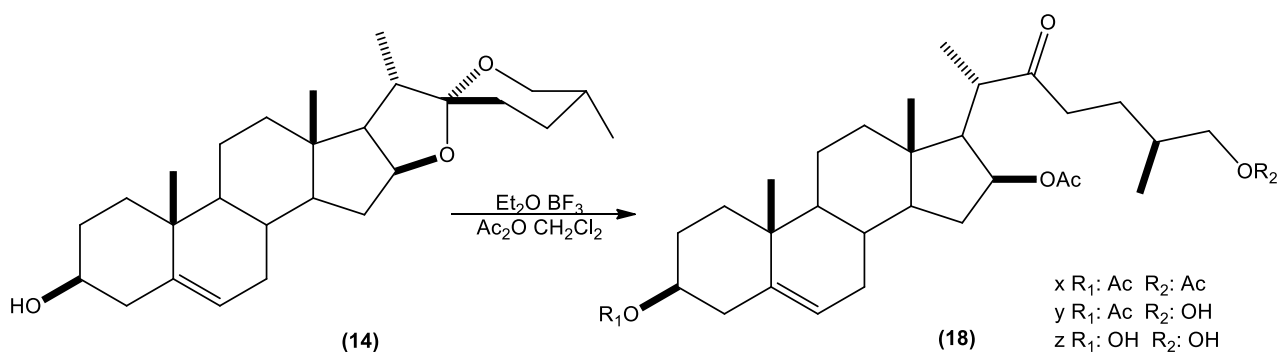


Figura 5. Estructura de la diosgenina.

Se purificó diosgenina (14) (Figura 5) comercial marca Química Meyer (pureza del  $\geq 92\%$ ) por cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente un sistema 9:1 hexano: acetato de etilo. La pureza del compuesto se verificó por cromatografía en capa fina y por resonancia magnética nuclear, comparando los espectros con los reportados en la literatura (Sandoval *et al.*, 1999).

## APERTURA DE DIOSGENINA

La apertura selectiva de los anillos E y F se realizó empleando un medio ácido de Lewis y atrapando el grupo hidroxilo en C-16 con la formación de un grupo acetilo, para evitar la recomposición del anillo E.



Esquema 3. Apertura de diosgenina (14).

En un matraz de fondo redondo se disolvió 1.0 g (2.4 mmol) del esteroide (14) en 10 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y la solución se enfrió a 0 °C. Por otro lado, se preparó una solución

de 2.3 ml (24 mmol) de anhídrido acético y 3 ml (24 mmol) de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  y se enfrió a 0 °C; esta solución se agregó a la que contiene la diosgenina (14). La reacción se mantuvo en agitación durante 15 min y después se vertió sobre agua con hielo y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml). La fase orgánica se colocó en un embudo de separación, se lavó con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (4x50 ml), posteriormente con salmuera (2x50 ml) y finalmente con agua destilada (2x50 ml). La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida. Se llevó a cabo con cromatografía de columna flash, utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente sistemas 95:5, 9:1 y 85:15 (hexano: acetato de etilo).

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ESTUDIO BIOLÓGICO

Debido a que estos compuestos presentan una baja solubilidad en agua es necesario disolver los compuestos en acetona. Para generar una solución madre [100 mg/L] se disolvieron 10 mg del compuesto en 2 mL de la solución de acetona y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Posteriormente se hicieron diluciones seriadas para obtener las tres diferentes concentraciones utilizadas en este trabajo; tomando una alícuota de 10 mL de la solución madre y 90 mL de agua destilada se obtuvo la concentración de 1.0 mg /L, este proceso se repitió dos veces más para obtener las concentraciones 0.1 mg /L y 0.01mg /L.

## PRUEBAS BIOLÓGICAS

### HOMOGENIZACIÓN DE SEMILLAS

Debido a la variación en los pesos de las semillas de los lotes adquiridos, fue necesario calcular el intervalo de peso para cada especie, aplicando la regla de Sturges.

Para ello se obtuvieron los pesos de una muestra aleatoria de cien semillas, obteniendo peso promedio, máximo y mínimo, posteriormente se aplicó la regla de Sturges.

$$a = \frac{P_{\max} - P_{\min}}{K * \log_{10} N}$$

Figura 11. Fórmula de Sturges.  $P_{\max}$  representa el peso máximo,  $P_{\min}$  el peso mínimo,  $k$  es el número de clases,  $N$  el tamaño de la muestra.

Con lo cual se obtuvo los siguientes rangos de peso: Maíz = 0.2980-0.3518 g, Frijol = 0.2741-0.3075 g, Rábano = 0.0063-0.0077 g, todas las semillas empleadas en este trabajo tienen un peso dentro de estos rangos.

## DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Se diseñaron y estandarizaron protocolos específicos para la esterilización de las semillas (Cuadro 4).

Cabe resaltar que, entre cada paso de la siguiente metodología, se hacen tres lavados con agua destilada estéril.

Cuadro 7. Protocolos de desinfección de semillas aplicado a cada especie.

Maíz	Frijol	Rábano
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 minutos en agua con jabón.</li> <li>• 3: 30 h en solución de captan al 2%.</li> <li>• 12 minutos en solución de 3 gotas de microdyn y 25mL de hipoclorito de sodio al 10%.</li> <li>• 10 minutos en solución de alcohol al 30%.</li> <li>• 8 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 20%.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 minutos agua con jabón.</li> <li>• 40 minutos en solución de captan al 2%.</li> <li>• 10 minutos en solución con tres gotas de microdyn y tres gotas de hipoclorito de sodio al 100%</li> <li>• 10 minutos en solución de alcohol al 70%.</li> <li>• 15 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 25%.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 minutos agua con jabón.</li> <li>• 10 minutos en solución con tres gotas de microdyn.</li> <li>• 5 minutos en 15mL de hipoclorito de sodio al 20%.</li> <li>• 2 minutos en solución de peróxido de hidrógeno al 10%.</li> </ul>

- 
- 10 minutos en solución de peróxido de hidrógeno al 0.7%.
  - 8 minutos en solución de peróxido de hidrógeno al 0.7%.
- 

Nota: Hipoclorito de sodio marca Cloralex®.  
Alcohol etílico al 96%

## TIEMPOS DE IMBIBICIÓN

Estos tiempos de imbibición se determinaron con base en un estudio de absorción de semillas realizado por Rodríguez y colaboradores, donde determinaron para Maíz: 5 horas, Frijol: 3 horas y Rábano: 1.5 horas (Rodríguez, 2008).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo se evaluaron tres compuestos con posible actividad promotora del crecimiento vegetal, en semillas de maíz, frijol y rábano que fueron germinadas en cultivo *in vitro*, bajo condiciones de laboratorio controladas.

Se probaron semillas que se siembran en el estado de Puebla, maíz híbrido (variedad TL05B), frijol negro (variedad Jamapa) y rábano (champion itsco).

Las semillas se cultivaron en medio de cultivo agar-agua (agar bacteriológico al 6%, marca MCD LAB) y se aplicaron los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1. Medio agar agua, con semillas colocadas en imbibición en una solución con el compuesto **Ac-Ac** a tres diferentes concentraciones ([0.01 mg/L], [0.1 mg/L], [1.0 mg/L]).
- Tratamiento 2. Medio agar agua, con semillas colocadas en imbibición en una solución con el compuesto **Ac-OH** a tres diferentes concentraciones ([0.01 mg/L], [0.1 mg/L], [1.0 mg/L]).
- Tratamiento 3. Medio agar agua, con semillas colocadas en imbibición en una solución con el compuesto **OH-OH** a tres diferentes concentraciones ([0.01 mg/L], [0.1 mg/L], [1.0 mg/L]).
- Control. Medio Agar- agua, semillas colocadas en imbibición con agua.

Cada tratamiento tuvo 15 repeticiones, dando un total de 180 semillas para cada especie ( $4 \times 3 \times 15 = 180$ ). Este diseño experimental se repitió para cada especie, por lo que se evaluaron 540 semillas ( $180 \times 3 = 540$ ).

Se tomaron datos de variables morfológicas, peso fresco y peso seco a los 13, 14 y 20 días para frijol, maíz y rábano respectivamente, que en maíz representa la etapa V2, para frijol la etapa V3 y para rábano el estadio 11.

## PRUEBAS IN VITRO

La siembra de las semillas se llevó a cabo en frascos de vidrio con 40 mL de medio agar- agua con pH ajustado a  $5.7 \pm 0.1$ , esterilizados por quince minutos a  $121^\circ\text{C}$  y 15 libras de presión en autoclave; una vez que pasaron la prueba de esterilidad de tres días, se llevaron a una campana de flujo laminar en donde se sembró una semilla por frasco. Después de la siembra, se colocaron en una incubadora a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  para el caso de las semillas de maíz y frijol, y a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  para el caso de las semillas de rábano en un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con un 50% de humedad relativa fuera del frasco a 750 lux.

La germinación es un proceso por el cual partir del embrión se desarrollan estructuras indispensables para el desarrollo de plantas, comprende tres fases: 1) imbibición, 2) reinicio de los procesos metabólicos y 3) emergencia de la radícula o eje embrionario, por lo que en este trabajo la germinación fue considerada a partir de la emergencia de la radícula o eje embrionario (Bewley & Black, 1982; Qu et al., 2019).

La variable velocidad de germinación se define como el tiempo que necesitan las semillas para germinar (Côme, 1970). En este caso se determina la proporción de semillas germinadas hasta el día 13, 14, 20 para frijol, maíz y rábano respectivamente.

Supervivencia in vitro de las especies

Para determinar el número de días de siembra, se hicieron ensayos previos sin tratamientos y se consultó la fenología de cada especie; se tomaron datos durante la etapa vegetativa (V) de cada especie, en el caso del maíz se tomaron los datos al día 14 después de la siembra, ya que en este día la planta llegaba a la etapa V3; para el frijol se tomaron datos el día 13 en la etapa V2 y para el rábano en el estadio once.

#### Acoplamiento molecular

Es un método computacional cuyo objetivo es proponer un modelo de unión entre dos moléculas, para predecir la afinidad entre un ligando (en este caso los compuestos sintetizados) y el sitio de unión de una proteína (Prieto-Martínez, Arciniega, Medina-Franco, 2019). Para este estudio se utilizaron las proteínas asociadas a genes involucrados en la germinación, como GAI que es crucial para la señalización de giberelinas, ABI5 que es un regulador positivo de ácido abscísico y el gen BR1 que es el principal receptor de los brasinoesteroides (Rajjou et al., 2012; Hayat et al., 2019).

#### Preparación de los ligandos

Los compuestos se construyeron en el programa Chem3D y mediante optimización por métodos MM2 se encontró el conformero más estable para cada uno de los compuestos.

Usando el programa AutoDock Tools 1.5.4, los átomos de hidrogeno no polares se fusionaron al carbono al que estaban unidos y se detectaron automáticamente los centros de torsión, así como los enlaces rotables, posteriormente se generaron los ligandos en formato .pdbqt para su empleo en acoplamiento molecular.

#### Preparación de las proteínas

A partir de la base de datos PDBank se obtuvo la proteína correspondiente (Cuadro 5), con el programa Chimera se procesó, la proteína, asignando las cargas por el método de Geister, posteriormente con la función de preparación para docking se minimizo la energía de las proteínas para su empleo, guardando la proteína en formato .pdb para conservar las cargas asignadas, posteriormente con el programa

AutoDock Tools 1.5.4 se generaron los formatos .pdbqt para el acoplamiento molecular con el programa vina.

Cuadro 5. Proteínas evaluadas con código de Protein Data Bank.

<b>Proteína</b>	<b>Código</b>	<b>Cristalizada con</b>	<b>Solvatación</b>
<b>Receptor BRI1</b>	3RJ0	Brasinolida	No
<b>Proteína de unión a fitohormonas</b>	4Q0K	Ácido giberilico	No
<b>ABA simulando al ligando quinabactin</b>	4LG5	Receptor ABA PYL2 y PP2C HAB1	No

Con el programa AutoDock Tools 1.5.4, se generaron las mallas de la búsqueda (grid) las cuales se posicionaron en el centro de la interfaz de las proteínas abarcando al sitio activo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Región búsqueda de cada malla y coordenadas correspondientes.

<b>Código</b>	<b>Malla</b>	<b>Coordenadas</b>
<b>3RJ0</b>	70*70*70	X= 27.57 Y= -8.64 Z= 74.22
<b>4Q0K</b>	70*70*70	X= 5.82 Y= -15.58 Z= 28.32
<b>4LG5</b>	70*70*70	X= 5.82 Y= -15.58 Z= 1.78

La búsqueda de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó usando el programa vina, se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables de acuerdo con la energía de afinidad obtenida.

#### Obtención de datos de variables morfológicas

Las variables largo y ancho de vástago y raíz fueron tomadas con vernier digital (GlowGeek modelo CD-6-150 con precisión de  $\pm 0.02\text{mm}$ ). Los pesos secos y frescos para determinar la biomasa fueron tomados con balanza analítica (Witeg modelo 3200 con una precisión de  $0.0001\text{g}$ ).

Para tomar los pesos frescos, se lavaron las plántulas con agua suficiente para retirar el medio de cultivo, se seccionó la raíz del vástago además de que retiró las testa y el endospermo excedente para las tres especies. Para evitar la sobreestimación en peso, en el caso de frijol se retiró con bisturí el cotiledón, ya que solo se tomaron las medidas del vástago y raíz.

Para tomar los pesos secos las plántulas seccionadas se colocaron en bolsas de papel y se etiquetaron, posteriormente se colocaron en una estufa (Witeg modelo ThermoStable ON-32) a temperatura entre  $65^{\circ}\text{C}$  por dos días para las plántulas de rábano y tres días para las plántulas de maíz y frijol.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar el efecto de los compuestos y las diferentes concentraciones sobre la velocidad de germinación se utilizó un modelo lineal generalizado con distribución quasibinomial, seguido de un ajuste de curvas teóricas a regresiones no lineales, teniendo como variable de respuesta el porcentaje de germinación y como variable explicativa los tres diferentes compuestos y concentraciones. El efecto en las variables morfológicas se analizó con modelos lineales generalizados con distribución gamma, seguido de una tabla de contrastes del modelo lineal generalizado, teniendo como variables de respuesta el largo, ancho de vástago y raíz respectivamente y como variable explicativa los tres diferentes compuestos y concentraciones, para la biomasa de vástago y raíz, se analizó con modelos lineales generalizados con distribución quasibinomial y como variable explicativa los tres

diferentes compuestos y concentraciones, para todos los resultados se consideró un valor de probabilidad  $P \leq 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico R (v.3.6.1), utilizando los siguientes paquetes: “lsmmeans”(Lenth, 2016), “drc” (Ritz, Pipper & Streibig, 2013), “tidyverse” (Wickham, 2017), “ggplot2” (Wickham, 2016), “dplyr” (Wickham et al., 2018), “tidyr”( Wickham & Henry, 2016), “multcomp” (Hothorn, 2019), “magrittr” (Bache & Wickham, 2016), “vegan” (Oksanen et al., 2010), “clustering” (Kaufman & Rousseeuw, 1990).

## RESULTADOS

### APERTURA DE DIOSGENINA

Se logró la obtención de siete compuestos diferentes a partir de una vía sintética de un solo paso, los cuales fueron aislados, purificados y caracterizados, siendo tres los productos mayoritarios de la reacción (Figura 12), con rendimientos de 22.5% para el compuesto con sustituyentes **Ac-Ac**, 42.6% para **Ac-OH** y 11.8% para **OH-OH**.

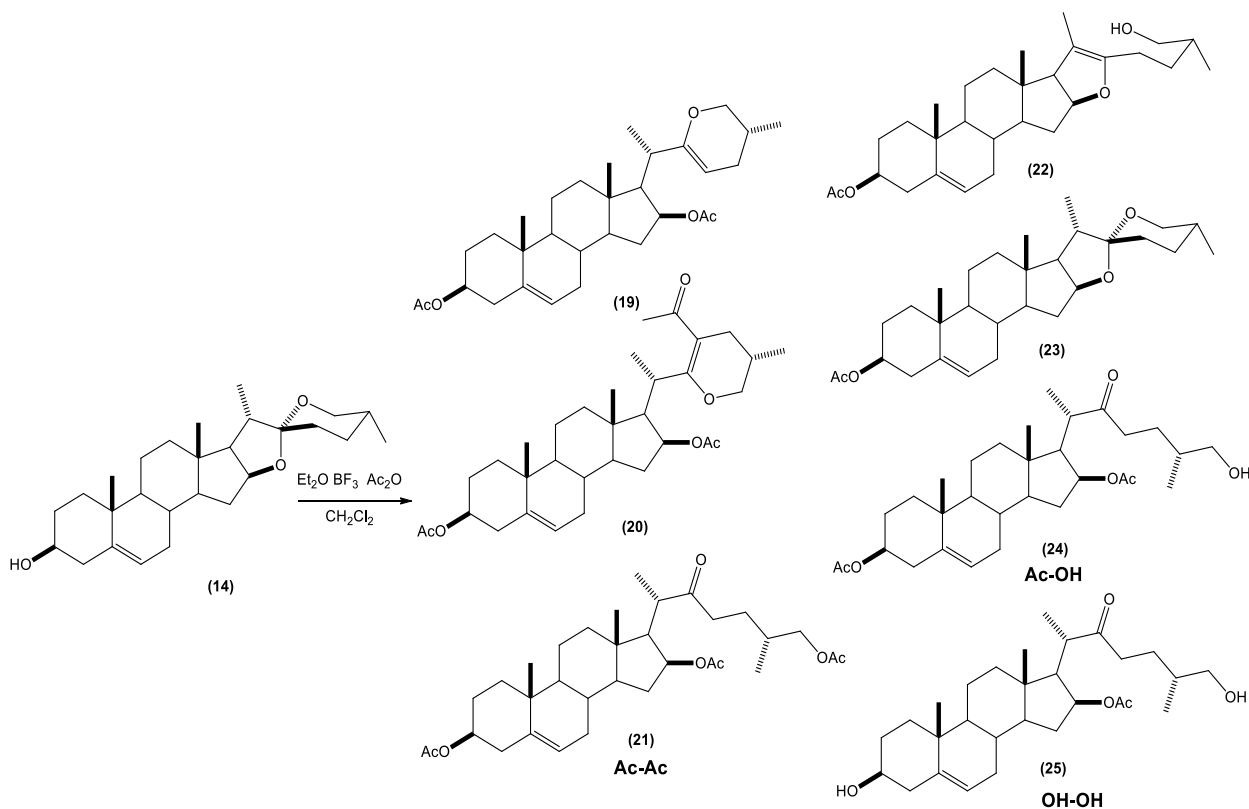


Figura 12. Productos de la reacción.

El compuesto con sustituyentes **Ac-Ac** se obtuvo como sólido blanco que presentó un punto de fusión de 146-148°C.

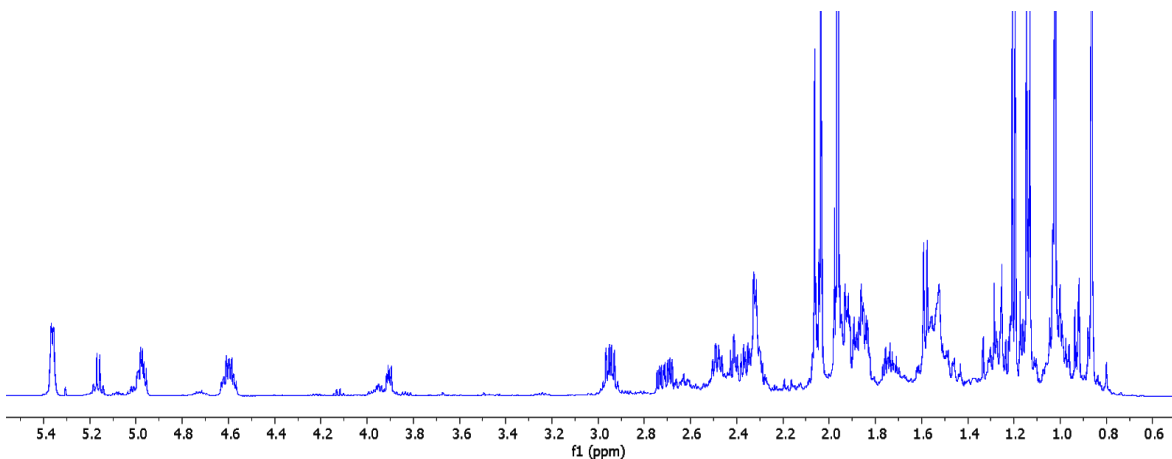


Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a 500 MHz, de Ac-Ac.

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\delta$ ):** 5.35 (1H, *d*,  $J_{6,7e} = 5.2$ , H-6), 4.97 (1H, *m*, H-16), 4.58 (1H, *m*, H-3), 3.89 (1H, *d*,  $J_{26a,25} = 6.4$ , H-26a), 3.88 (1H, *d*,  $J_{26b,25} = 6.0$ , H-26b), 2.94 (1H, *dc*,  $J_{20,21} = 6.8$ ,  $J_{20,17} = 4.0$ , H-20), 2.62, (1H, *m*, H-23a), 2.40 (1H, *m*, H-15), 2.33 (1H, *m*, H-23b), 2.32 (1H, *m*, H-4ec), 2.05 (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -3), 2.03 (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -16), 1.95 (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -26), 1.14 (3H, *d*,  $J_{21,20} = 6.8$ ,  $\text{CH}_3$ -21), 1.02 (3H, *s*,  $\text{CH}_3$ -18), 0.92 (3H, *d*,  $J_{27,25} = 6.8$ ,  $\text{CH}_3$ -27), 0.87 (3H, *s*,  $\text{CH}_3$ -19) (Figura 13).

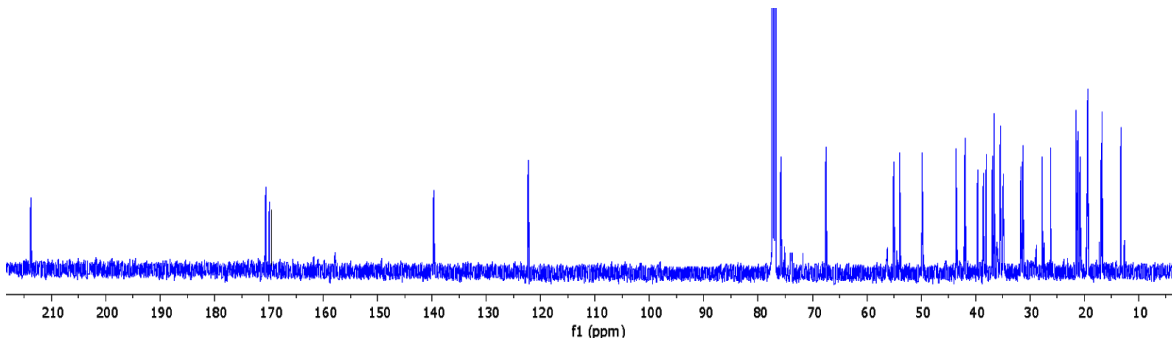


Figura 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a 125 MHz, de Ac-Ac.

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\delta$ ):** 36.9 (C-1), 27.8 (C-2), 73.8 (C-3), 38.1 (C-4), 139.4 (C-5), 122.1 (C-6), 31.6 (C-7), 31.3 (C-8), 49.8 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.6 (C-12), 41.9 (C-13), 53.9 (C-14), 34.9 (C-15), 75.6 (C-16), 55.0 (C-17), 19.4 (C-18), 13.3 (C-19), 43.6 (C-20), 16.9 (C-21), 212.3 (C-22), 38.3 (C-23), 26.8 (C-24), 32.2 (C-25), 68.8 (C-26), 16.7 (C-27), 169.4 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -3), 170.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -16), 170.2 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -26), 21.0 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -3), 21.2 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -16), 20.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -26). **IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2936 (CH, alifático), 1728 (C=O, acetato), 1708 (C=O, cetona), 1597 (C=C) (Figura 14).

El compuesto con sustituyentes **Ac-OH** se obtuvo como sólido blanco que presentó un punto de fusión de 152-154 °C.

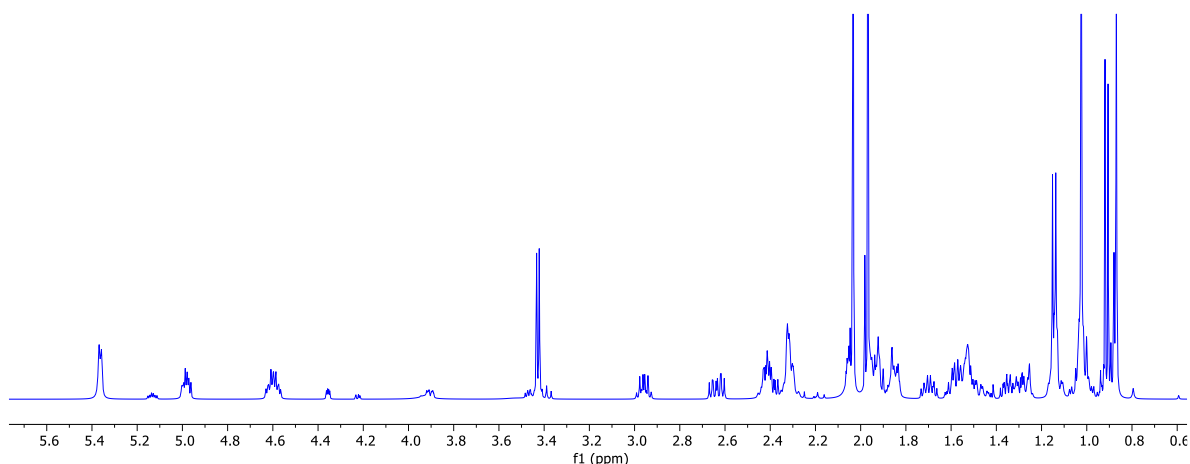


Figura 15. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a 500 MHz, de Ac-OH.

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$ ):** 5.35 (1H, d, H-6), 4.96 (1H, m, H-16), 4.58 (1H, m, H-3), 3.41 (2H, d, H-26), 2.94 (1H, dc, H-20), 2.62 (1H, ddd, H-23<sub>a</sub>), 2.39 (1H, m, H-15<sub>a</sub>), 2.35 (1H, m, H-23<sub>b</sub>), 2.30 (2H, m, H-4<sub>ec</sub> y H-4<sub>ax</sub>), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 1.95 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 1.13 (3H, d, CH<sub>3</sub>-21), 1.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 0.90 (3H, d, CH<sub>3</sub>-27), 0.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19) (Figura 15).

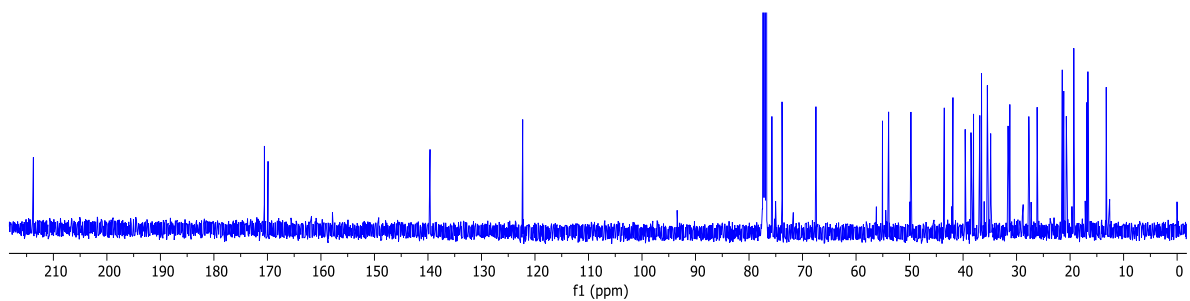


Figura 16. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz de Ac-OH.

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\delta$ ):** 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 139.5 (C-5), 122.2 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 213.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25), 67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 169.9 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 170.5 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 21.4 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 21.1 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16). **IR (cm<sup>-1</sup>):** 3460 (OH), 2935 (CH, alifático), 1723 (C=O, acetato), 1708 (C=O, cetona) (Figura 16).

El compuesto con sustituyentes **OH-OH** se obtuvo como sólido blanco que presentó un punto de fusión de 212-214°C.

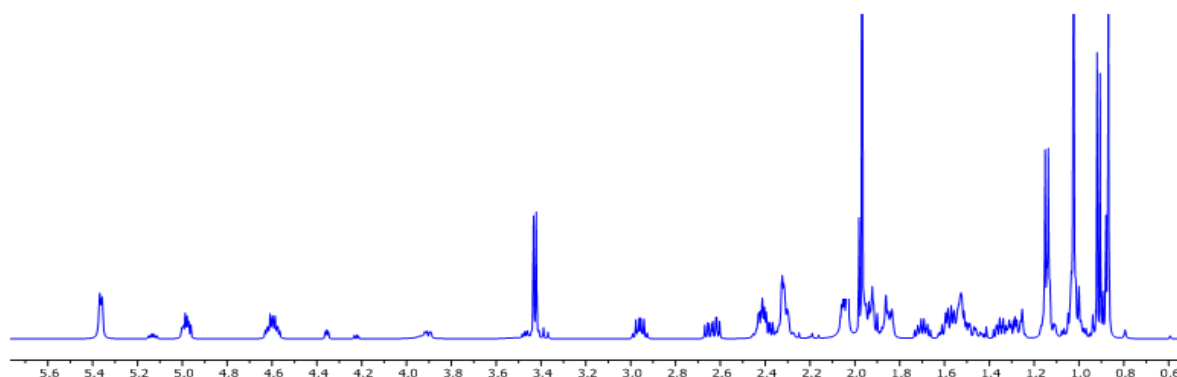


Figura 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a 500 MHz, de OH-OH.

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$ ):** 5.35 (1H, d,  $J_{6,7ec} = 4.8$ , H-6), 4.96 (1H, m, H-16), 3.01 (1H, m, H-3), 3.41 (2H, d,  $J_{26,25} = 5.8$ , H-26), 2.94 (1H, dc,  $J_{20,21} = 14.0$ ,  $J_{20,17} = 7.0$ , H-20), 2.62 (1H, ddd,  $J_{23a,24} = 6.7$  y  $8.4$ ,  $J_{gem} = 18.0$ , H-23a), 2.39 (1H, m, H-15a), 2.35 (1H, m, H-23b), 2.30 (2H, m, H-4ec y H-4ax), 1.95 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -16), 1.13 (3H, d,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.01 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0.90 (3H, d,  $J_{27,25} = 6.7$ ,  $\text{CH}_3$ -27), 0.85 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19) (Figura 17).

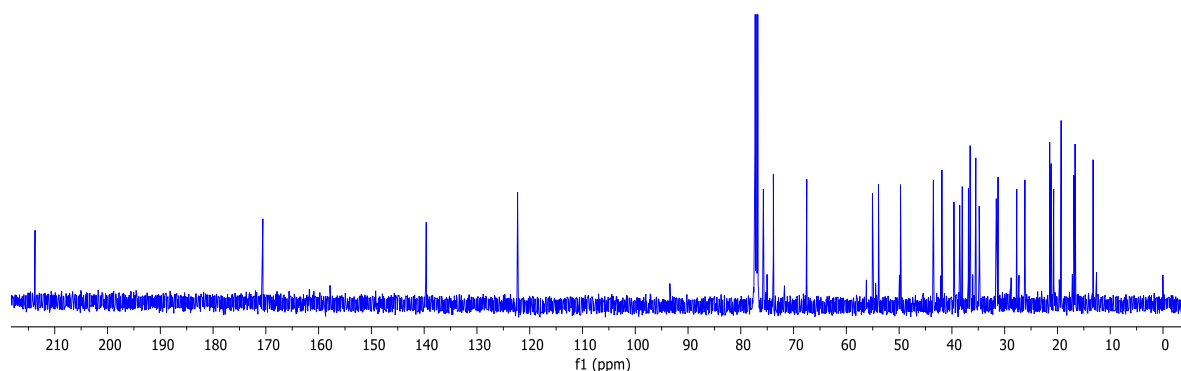


Figura 18. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a 125 MHz, de OH-OH.

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\delta$ ):** 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 139.5 (C-5), 122.2 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 213.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25),

67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 170.5 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 21.1 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16). IR (cm<sup>-1</sup>): 3460 (OH), 2935 (CH, alifático), 1723 (C=O, acetato), 1708 (C=O, cetona) (Figura 18).

En resumen, los tres derivados comparten una acetilación en la posición 16, el compuesto **Ac-Ac** presenta un grupo acetato en la posición C-3 y C-26, mientras que el compuesto **Ac-OH** presenta un grupo acetato en posición C-3 y un grupo hidroxilo en C-26, el compuesto **OH-OH** presenta dos grupos hidroxilo en C-3 y C26, podemos observar la presencia de señales de protones de acetatos alrededor de 2.0 ppm, en el caso de **Ac-Ac** se encuentran tres señales, para **Ac-OH** se encuentran dos señales y para **OH-OH** una señal, en la resonancia magnética nuclear de protón (Figura 19).

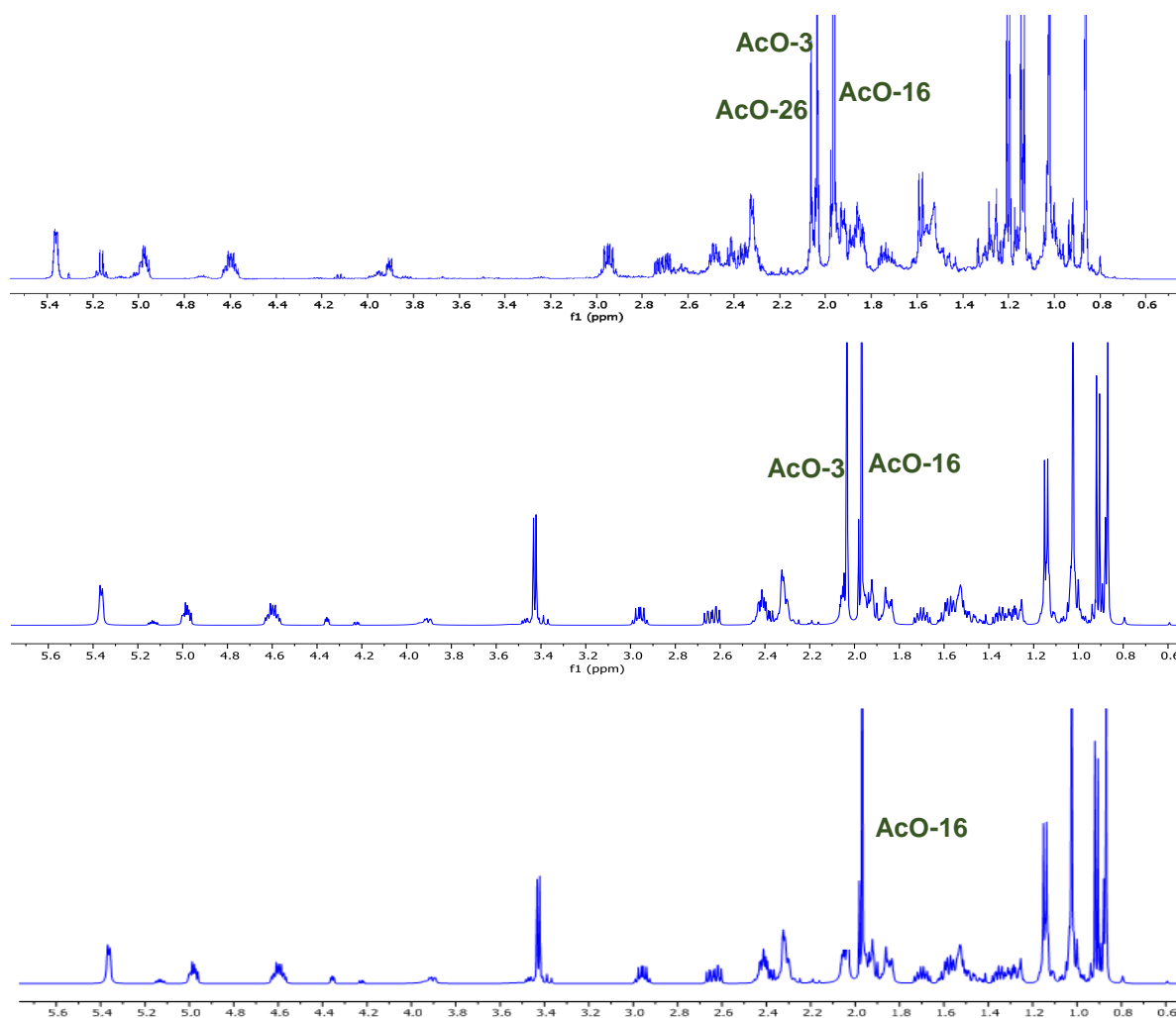


Figura 19. Comparación de espectros de RMN de 1H a 500 MHz de Ac-Ac, Ac-OH y OH-OH.

En la espectroscopia de Carbono-13, se confirman dichos cambios, observando señales en la región de 170 ppm un numero decreciente de señales al disminuir el número de grupos acetilos, así mismo las espectroscopias muestran la ausencia de impurezas orgánicas debido a la calidad del espectro, e inorgánicas por la ausencia en las pruebas de solubilidad (Figura 20).

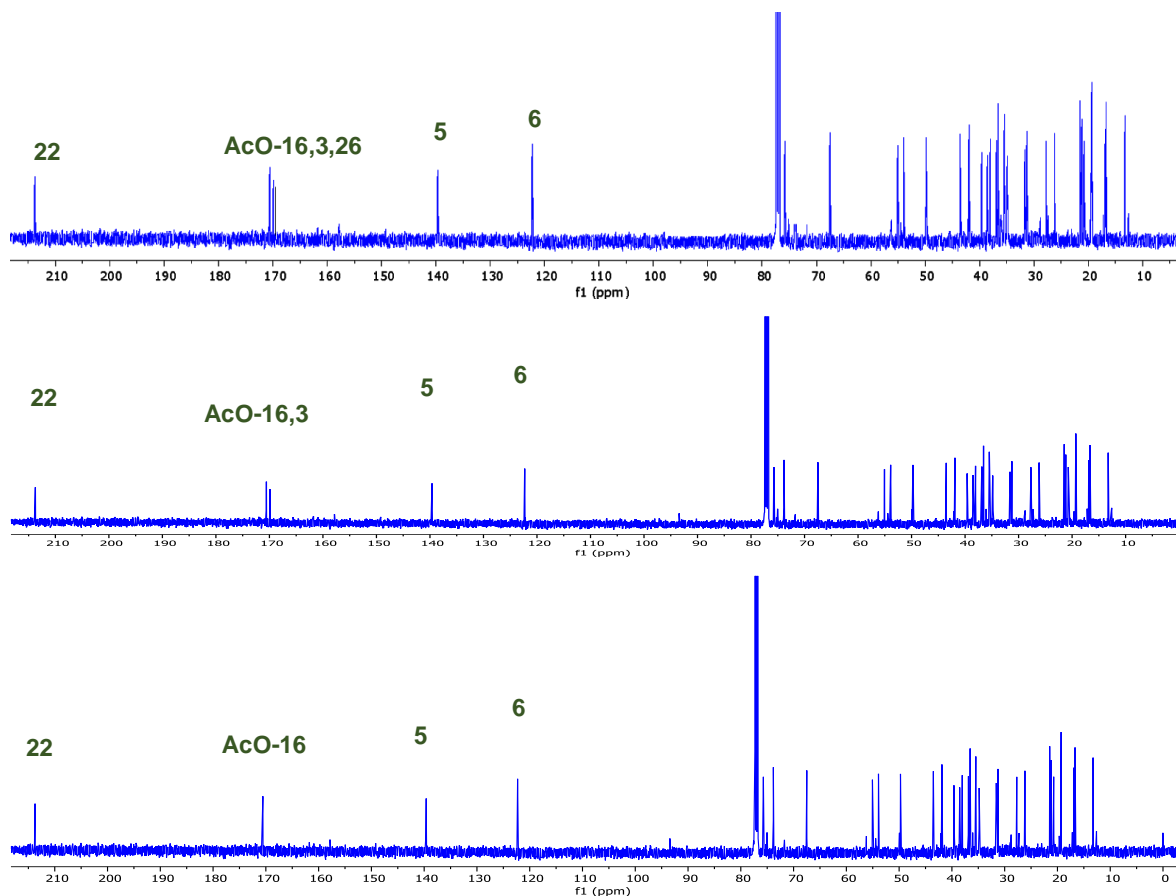


Figura 20. Comparación de espectros de RMN de <sup>13</sup>C a 125 MHz de Ac-Ac, Ac-OH y OH-

OH.

## VELOCIDAD DE GERMINACIÓN

➤ Maíz (*Zea mays*)

El análisis muestra que hay diferencias significativas y por tanto hay efecto del día en la velocidad de germinación, al igual que por el compuesto y la concentración. Asimismo, hay efecto de la interacción dada por el día y compuesto (Cuadro 5).

Cuadro 7. Valores de devianza para maíz.

Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	P
Día	1	51.66	66.80	< <b>0.001</b>
Compuesto	3	5.955	7.70	< <b>0.001</b>
Concentración	2	0.733	0.95	< <b>0.05</b>
Día:Compuesto	3	1.076	1.39	< <b>0.05</b>
Día:Concentración	2	0.112	0.14	NS
Compuesto:Concentración	4	0.746	0.96	NS
Día:Compuesto:Concentración	4	0.269	0.35	NS
Error	148	16.779	21.70	
Total	167	77.33		

En el caso del maíz se encontró que el compuesto con los sustituyentes **OH-OH** tiene la capacidad de acelerar la germinación en un 25.47% respecto al control, de igual forma se encontró que el compuesto con los sustituyentes **Ac-OH** retrasa la germinación en un 35.75% respecto al control (Figura 19).

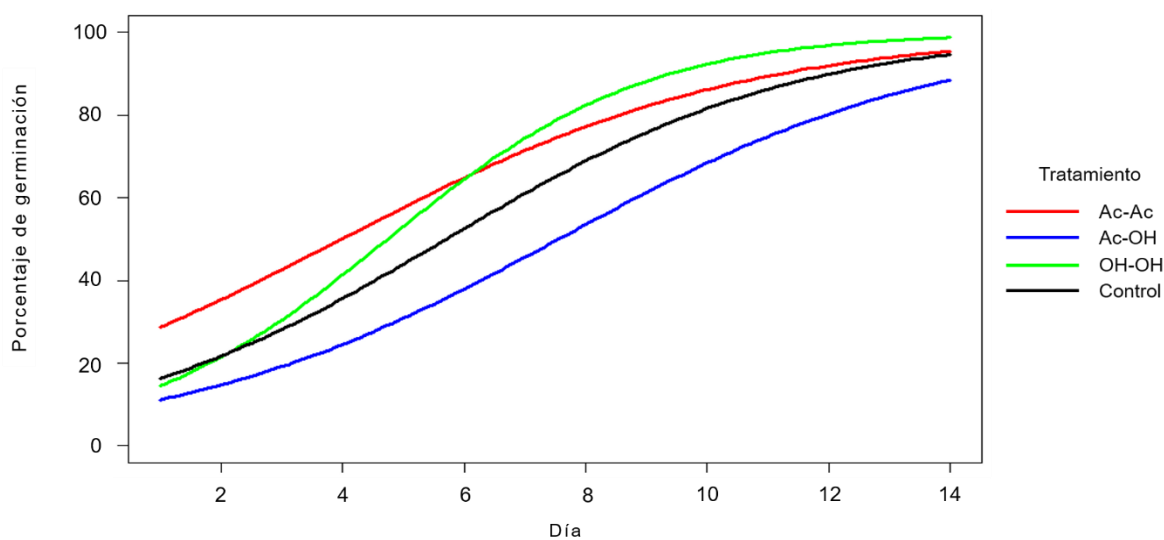


Figura 39. Velocidad de germinación, el valor de *k* para Ac-Ac es de 6.75, Ac-OH 10.29, OH-OH 5.65 y el control 7.58.

➤ Frijol (*Phaseolus vulgaris*)

El análisis muestra que hay diferencias significativas entre los compuestos evaluados, además del efecto de la interacción entre el día, compuesto y concentración causada por el control (Cuadro 6).

Cuadro 8. Valores de devianza para frijol.

Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	P
Día	1	55.233	72.98	< <b>0.001</b>
Compuesto	3	2.515	3.32	< <b>0.001</b>
Concentración	2	0.527	0.70	NS
Día:Compuesto	3	0.606	0.80	NS
Día:Concentración	2	0.377	0.50	NS
Compuesto:Concentración	4	1.421	1.88	< <b>0.01</b>
Día:Compuesto:Concentración	4	1.335	1.76	< <b>0.01</b>
Error	136	13.666	18.06	
Total	155	75.68		

En el frijol se encontró la misma tendencia que en maíz, el compuesto con los sustituyentes **OH-OH** acelera la velocidad de germinación en un 8.62% respecto al control, mientras que **Ac-OH** retrasa la germinación en un 41.8% respecto al control (Figura 20).

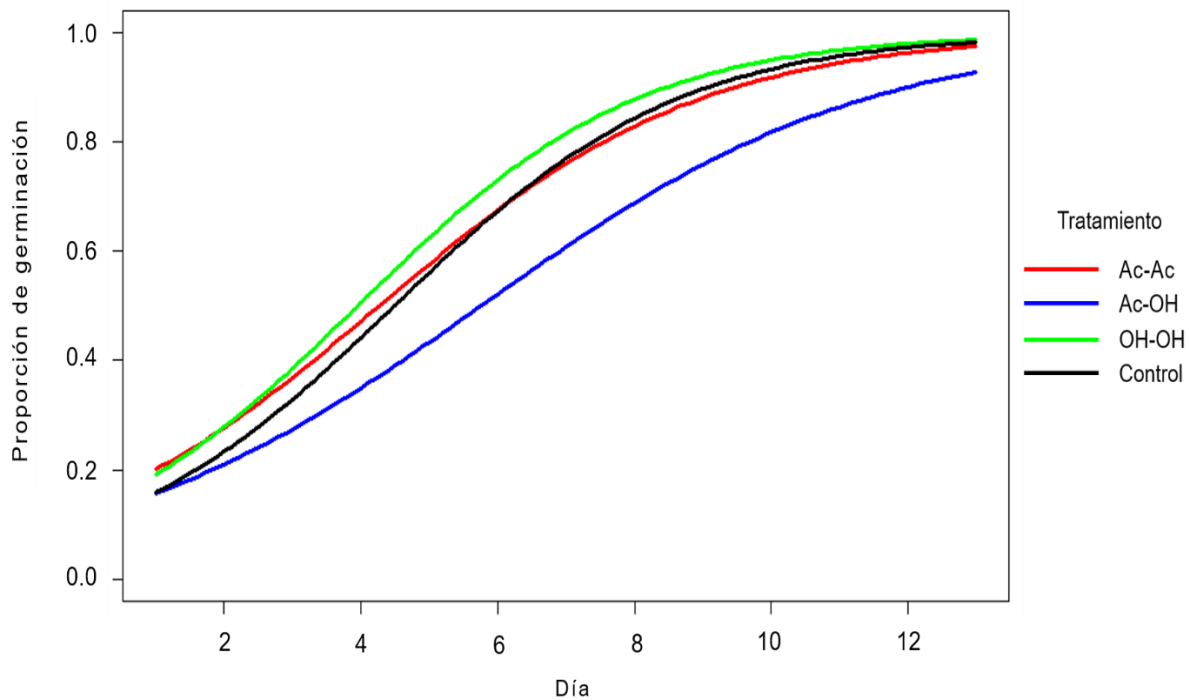


Figura 40. Velocidad de germinación, el valor de k para Ac-Ac es de 5.63, Ac-OH 7.7, OH-OH 4.98 y el control 5.45.

➤ Rábano (*Raphanus sativus*)

El análisis muestra que hay diferencias significativas por efecto del día y compuesto, además de interacciones entre día, compuesto y concentración (Cuadro 7).

Cuadro 9. Valores de devianza para rábano

Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	P
Día	1	62.302	59.13	<0.001
Compuesto	3	1.785	2.31	<0.001
Concentración	2	0.005	0.01	NS
Día:Compuesto	3	16.553	21.41	<0.001
Día:Concentración	2	0.005	0.01	NS
Compuesto:Concentración	4	1.411	1.82	<0.001
Día:Compuesto:Concentración	4	11.041	14.28	<0.001
Error	220	12.266	15.86	
Total	239	105.368		

En el rábano se encontró que el compuesto con sustituyentes **Ac-Ac** acelera la germinación en un 7.87% respecto al control, a diferencia de las dos especies anteriores en las que el compuesto con sustituyentes **OH-OH** mostró mayor efectividad; el compuesto con sustituyentes **Ac-OH** muestra el mismo efecto que en las dos especies anteriores, retrasa la germinación en un 118.34% respecto al control (Figura 21).

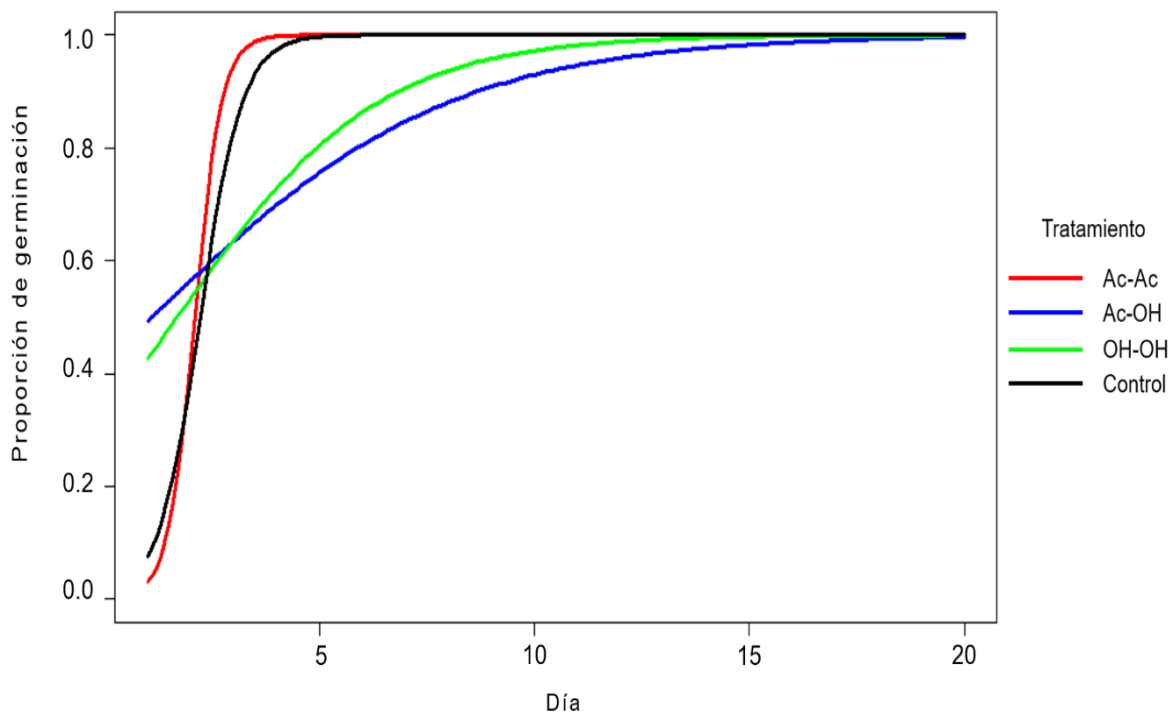


Figura 21. Velocidad de germinación, el valor de  $k$  para Ac-Ac es de 2.11, Ac-OH 5, OH-OH 3.88 y el control 2.29.

## ACLOPAMIENTO MOLECULAR

El estudio de acoplamiento molecular con las proteínas asociadas a genes implicados en la germinación mencionados previamente mostró que los compuestos no tienen efecto sobre las proteínas evaluadas para el caso de maíz y frijol (Cuadro 10).

Cuadro 10. Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos Ac-Ac, Ac-OH y OH-OH.

Compuesto	BRI1	ABI5	GAI
Ac-Ac	-10.1	-9.2	-9.5
Ac-OH	-8.5	-3.2	-8.3
OH-OH	-7.5	-7.8	-8.3
Homobrasinólida	-8.5	-6.2	-6

Para rábano dichas proteínas denotan que los compuestos sintetizados y la proteína relacionada a ABI5 mostraron un resultado menor en energía de acoplamiento, debido a mejores interacciones ligando-receptor con el compuesto **Ac-Ac**, tal como se reportó en la velocidad de germinación.

En el caso del compuesto con sustituyentes **Ac-OH** se encontraron valores menos selectivos, por lo que no se considera una afinidad por esta proteína, esto podría explicar su efecto retardante de la germinación (Figura 22).

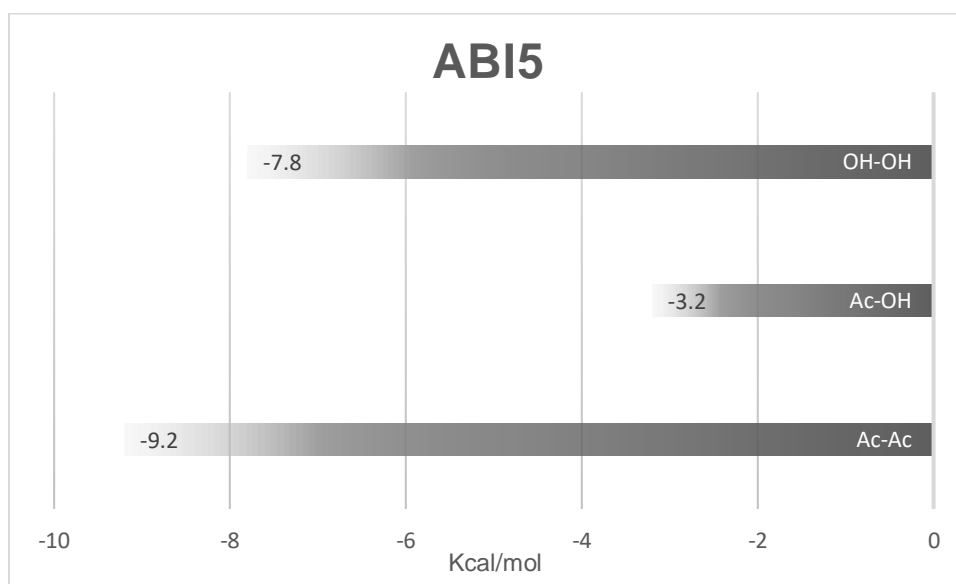


Figura 22.  $\Delta G$  de las uniones ligando- receptor.

## VARIABLES MORFOMÉTRICAS

### ➤ Maíz

Se encontró que las variables ancho y largo de la raíz, y largo del vástago no presentan diferencias significativas para esta especie (Cuadro 11).

Cuadro 11. Variables morfométricas como fuentes de variación que inciden en el maíz.

Variable morfométrica	<i>P</i>
Ancho de la raíz	NS
Ancho del vástago	<b>&lt;0.05</b>
Largo de la raíz	NS
Largo vástago	NS
Biomasa de la raíz	<b>&lt;0.05</b>
Biomasa del vástago	<b>&lt;0.01</b>

Al interior de los tratamientos el efecto de las concentraciones es inverso en algunos casos, lo que se puede observar con detalle en la concentración menor (0.01 ml/L) en donde en el sustituyente **Ac-OH** el efecto es menor respecto a **Ac-Ac** y **OH-OH**. En el ancho del vástago se encontraron diferencias significativas entre la interacción de tratamiento y concentraciones, dada por la variación entre controles, específicamente por el control del compuesto con sustituyentes **Ac-OH** (Cuadro 12, Figura 23).

Cuadro 12. Tabla de devianza para ancho del vástago de maíz. (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo.)

Ancho del vástago				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	<i>P</i>
Tratamiento	2	0.25	2.18	NS
Concentración	3	0.29	2.49	NS
Tratamiento:Concentración	6	0.83	7.16	<b>&lt;0.05</b>
Error	145	10.27	88.17	
Total	156	11.64		

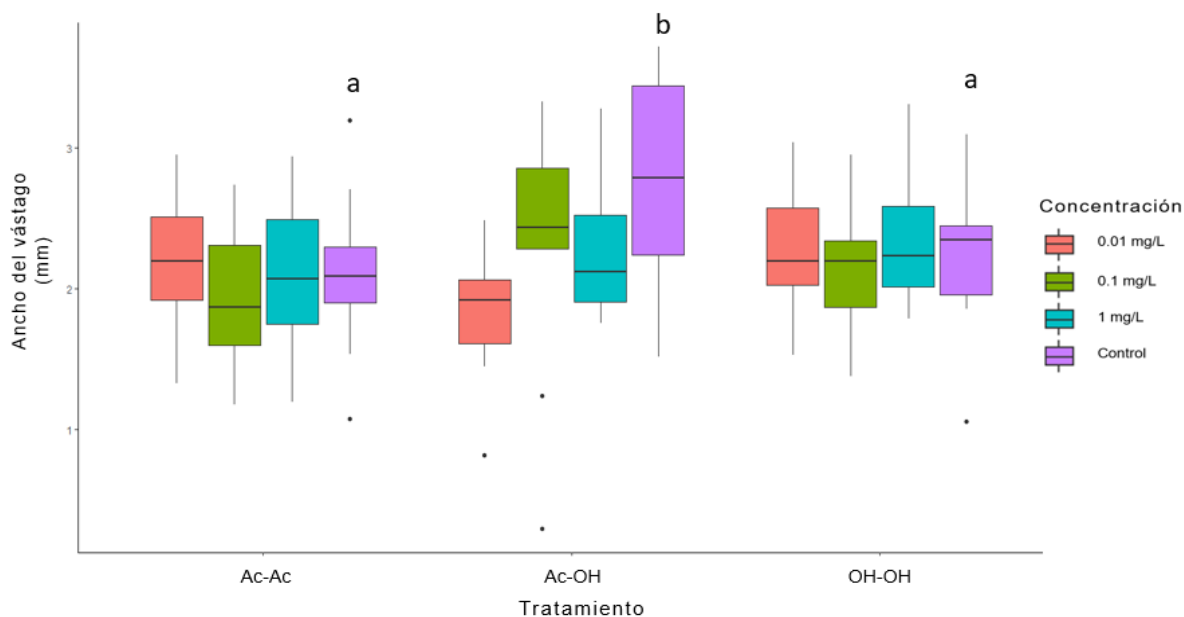


Figura 23. En concentraciones bajas, el ancho del vástago es menor en el sustituyente Ac-OH.

En la biomasa de la raíz se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones, logrando mejores resultados que la concentración [0.1mg/L] en donde la raíz tiene una mayor biomasa (Cuadro 13, Figura 24).

Cuadro 13. Tabla de devianza para biomasa de la raíz en maíz (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo).

Biomasa de la raíz				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	P
Tratamiento	2	0.14	3.30	NS
Concentración	3	0.27	6.38	<b>&lt;0.05</b>
Tratamiento:Concentración	6	0.22	5.12	NS
Error	145	3.64	85.21	
Total	156	4.27		

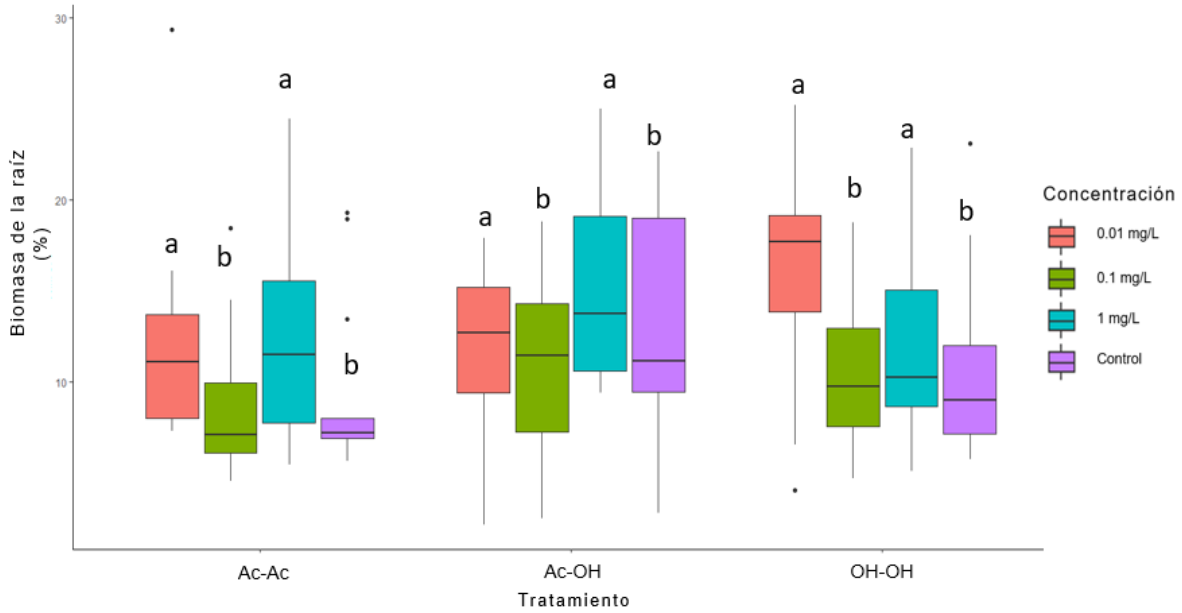


Figura 24. Independientemente de sustituyente, la menor concentración incide en una mayor biomasa de la raíz en el maíz.

Hay una mayor biomasa del vástago en el sustituyente **Ac-Ac** dado que se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, y el efecto contrario se observa en el sustituyente **Ac-OH** y **OH-OH**, donde se tienen vástagos con menor biomasa (Cuadro 14, Figura 25).

Cuadro 14. Tabla de devianza para biomasa del vástago en maíz (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo).

Biomasa del vástago				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	<i>P</i>
Tratamiento	2	0.15	8.45	<b>&lt;0.01</b>
concentración	3	0.07	4.09	NS
Tratamiento:Concentración	6	0.04	2.24	NS
Error	145	1.56	85.22	
Total	156	1.83		

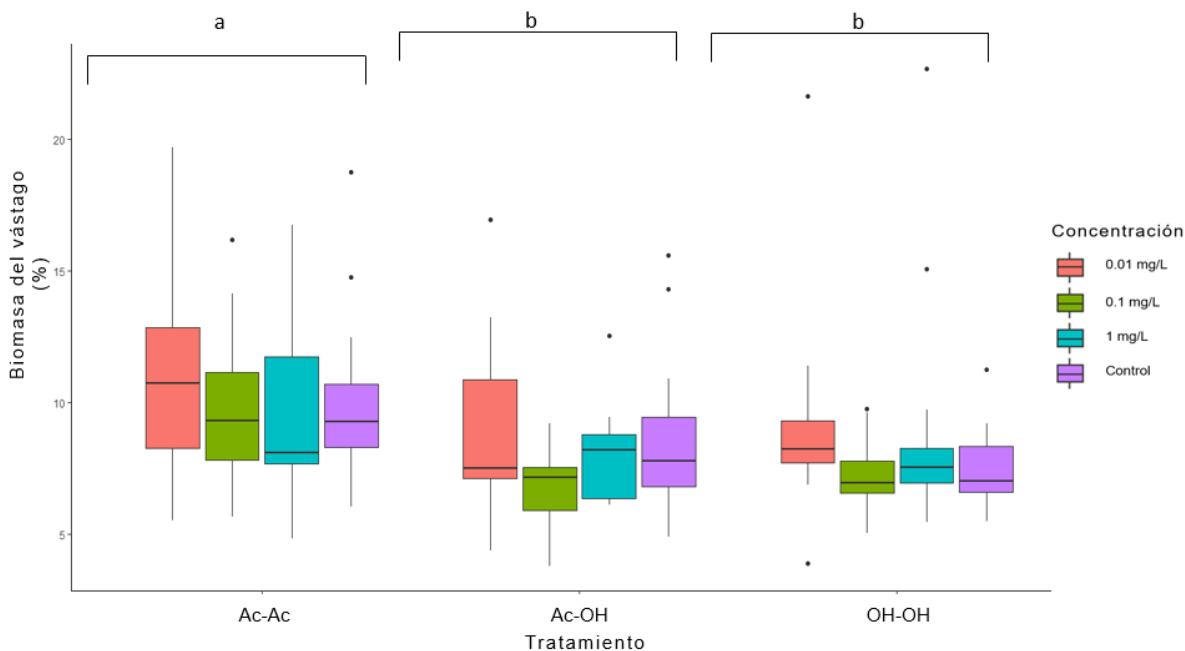


Figura 25. Todas las concentraciones del sustituyente Ac-Ac tienen un efecto positivo en la biomasa del vástago del maíz; en cambio en el tratamiento Ac-OH y OH-OH, hay una menor biomasa.

➤ Frijol

En el ancho de raíz, y biomasa del vástago no hay efecto de los sustituyentes ni de las concentraciones en *Phaseolus vulgaris* (Cuadro 15).

Cuadro 15. Variables morfométricas para frijol indicando el valor de probabilidad para las fuentes de variación en donde hay efecto (NS= no significativo).

Variable morfométrica	<i>P</i>
Ancho de la raíz	NS
Ancho del vástago	<b>&lt;0.0001</b>
Largo de la raíz	<b>&lt;0.05</b>
Largo vástago	<b>&lt;0.05</b>
Biomasa de la raíz	<b>&lt;0.001</b>
Biomasa del vástago	NS

Para el ancho del vástago de frijol, se encontró que para las concentraciones empleadas, el sustituyente **Ac-Ac** y **OH-OH** producen vástagos más anchos y el

compuesto con sustituyentes **Ac-OH** incide en que sean más delgados (Cuadro 16, Figura 26).

Cuadro 16. Tabla de devianza para ancho del vástago en frijol.

Ancho del vástago				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	<i>p</i>
Tratamiento	2	1.85	10.45	<b>&lt;0.0001</b>
Concentración	3	0.00	0.01	NS
Tratamiento:Concentración	6	0.73	4.13	NS
Error	155	15.11	85.41	
Total	166	17.69		

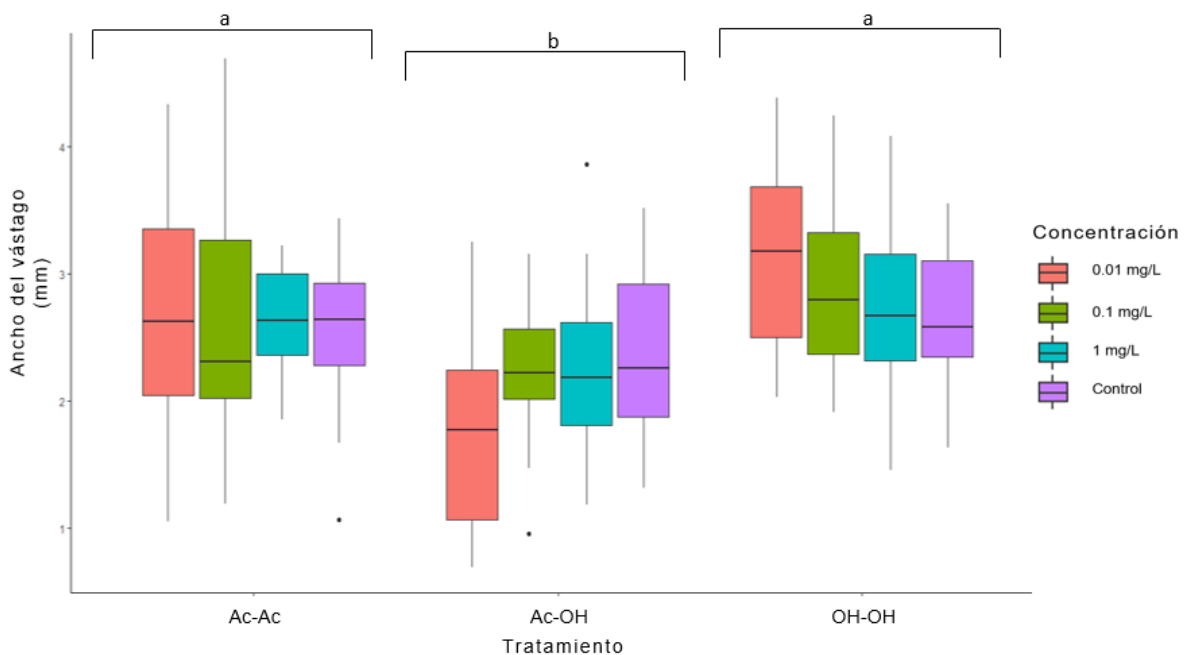


Figura 26. Ac-OH produce vástagos de frijol más delgados independientemente de la concentración empleada.

En el largo de la raíz de *Phaseolus vulgaris*, las concentraciones de cada sustituyente tienen efectos diferentes. Raíces pequeñas en concentración 0.1 mg/L y 1 mg/L del sustituyente **Ac-OH**. Para el sustituyente **Ac-Ac** se tienen raíces largas en las concentraciones de 0.1 mg/L y 1 mg/L y en **OH-OH** en las tres concentraciones se producen raíces más largas (Cuadro 17, Figura 27).

Cuadro 17. Tabla de devianza para el largo de la raíz en frijol (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo).

Largo de la raíz				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	<i>P</i>
Tratamiento	2	2.73	1.19	NS
Concentración	3	0.61	0.27	NS
Tratamiento:Concentración	6	21.31	9.27	<b>&lt;0.05</b>
Error	155	205.12	89.27	
Total	166	229.77		

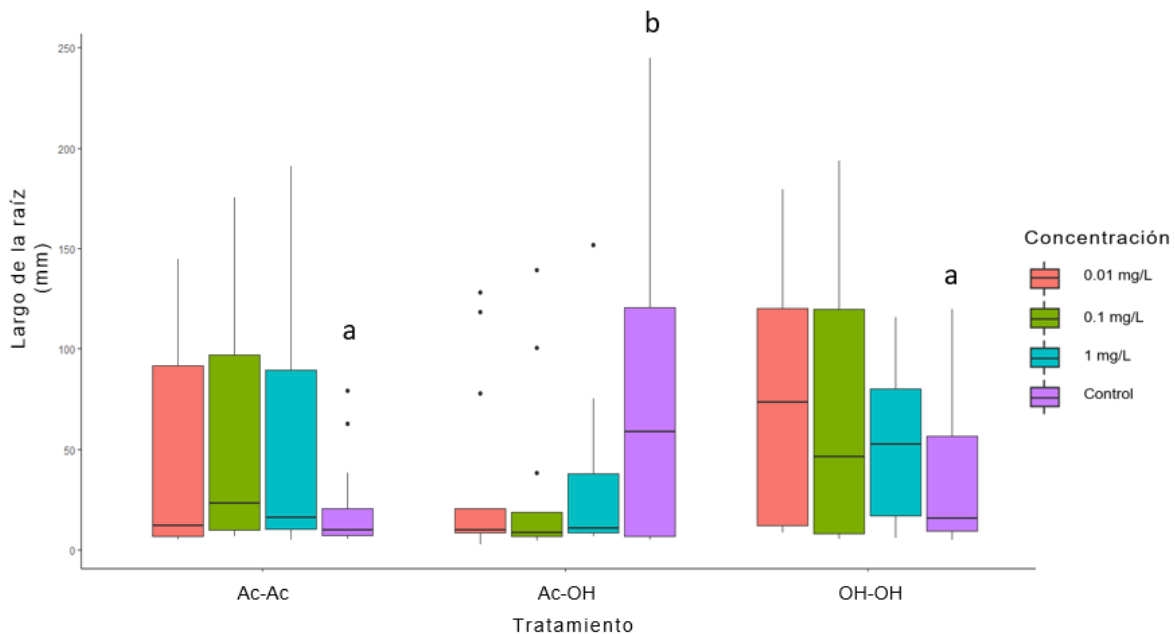


Figura 27. Con concentraciones de 0.1 mg/L y 1 mg/L del sustituyente Ac-OH se observan raíces más pequeñas de frijol, respecto a las otras concentraciones y sustituyentes.

En el largo del vástago de frijol, se encontró que vástagos largos se producen empleando cualquiera de las tres concentraciones de los sustituyentes **Ac-Ac** y **OH-OH**. Sin embargo, con las tres concentraciones de **Ac-OH** los vástagos son más pequeños. (Cuadro 18, Figura 28).

Cuadro 18. Tabla de devianza para el largo del vástago en frijol.

Largo del vástago				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	P
Tratamiento	2	3.91	2.06	NS
Concentración	3	1.48	0.78	NS
Tratamiento:Concentración	6	19.68	10.36	<b>&lt;0.05</b>
Error	155	164.78	86.79	
Total	166	189.85		

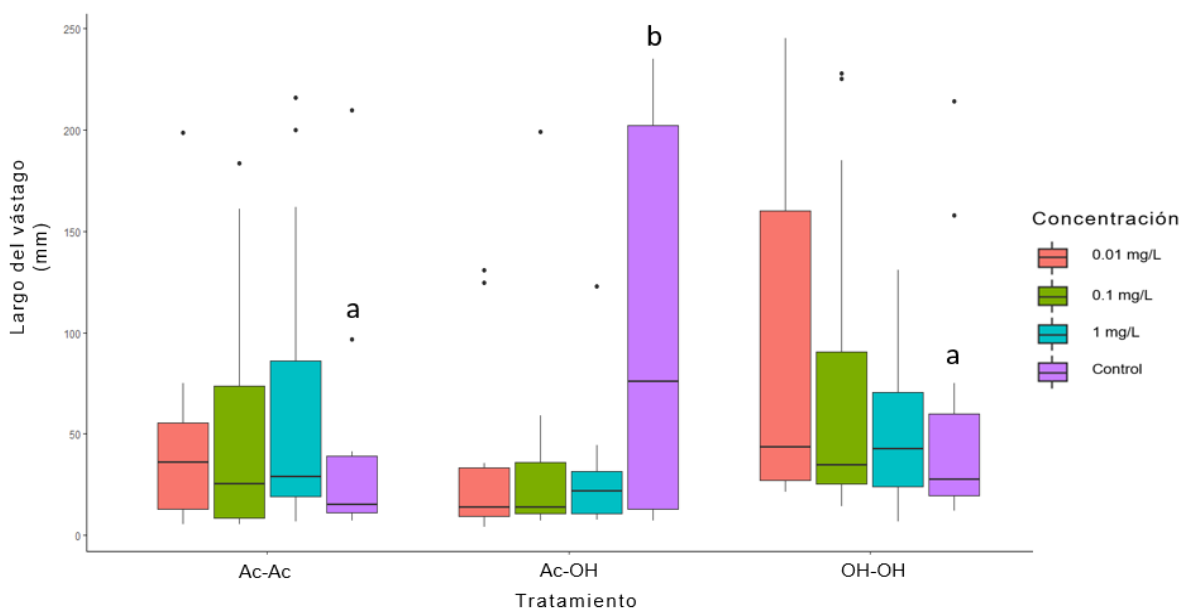


Figura 28. Se observan vástagos de frijol más pequeños con el sustituyente Ac-OH en sus tres concentraciones y que en el sustituyente Ac-Ac y OH-OH en las tres concentraciones se producen vástagos de mayor longitud.

En la biomasa de la raíz del frijol se encontró efecto de los tratamientos y concentraciones, ya que en la concentración 0.01 mg/L de los sustituyentes **Ac-Ac**, **Ac-OH** y **OH-OH** presentan mayor biomasa. Para la concentración 0.1 mg/L **Ac-OH** y **OH-OH** producen mayor biomasa, pero Ac-Ac menor biomasa y la concentración 1 mg/L para los sustituyentes **Ac-Ac** y **OH-OH** hay mayor biomasa y **Ac-Ac** produce menor biomasa (Cuadro 19, Figura 29).

Cuadro 19. Tabla de devianza para biomasa de la raíz en frijol (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo).

Biomasa de la raíz				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	P
Tratamiento	2	0.37	8.44	<b>&lt;0.001</b>
Concentración	3	0.24	5.57	<b>&lt;0.05</b>
Tratamiento:Concentración	6	0.13	3.03	NS
Error	155	3.64	82.96	
Total	166	4.38		

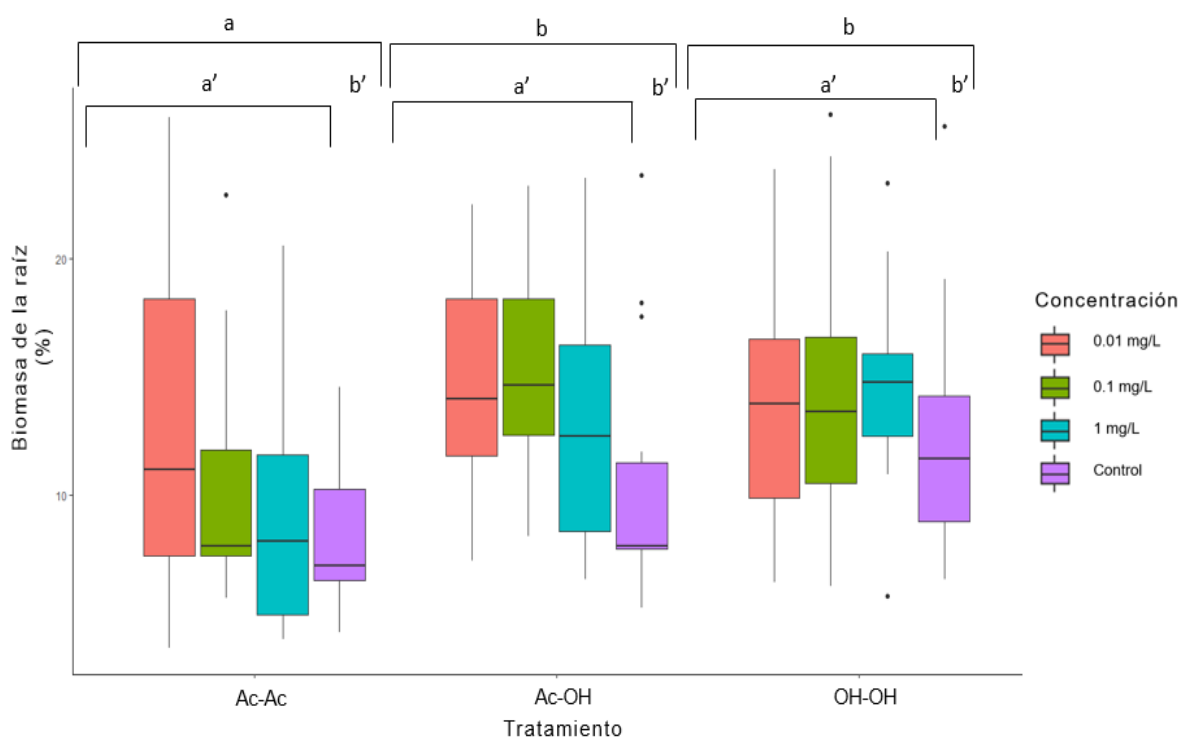


Figura 29. Diagrama de Caja-Bigotes de biomasa de la raíz en frijol.

### ➤ Rábano

Las variables largo de raíz y vástago y biomasa del vástago no presentan diferencias significativas para esta especie (Cuadro 20).

Cuadro 20. Variables morfométricas en las que se muestra el efecto de las fuentes de variación evaluadas para el rábano, de acuerdo al valor de probabilidad (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo).

Variable morfométrica	<i>P</i>
Ancho de la raíz	<b>&lt;0.0001</b>
Ancho del vástago	<b>&lt;0.0001</b>
Largo de la raíz	NS
Largo vástago	NS
Biomasa de la raíz	<b>&lt;0.05</b>
Biomasa del vástago	NS

En el ancho de la raíz se encontró que en el compuesto con sustituyentes **Ac-Ac** produce un ancho de raíz mayor, comparado con los otros sustituyentes. (Cuadro 21, Figura 30).

Cuadro 21. Tabla de devianza para ancho de la raíz en rábano.

Fuente de variación	Ancho de la raíz			
	gl	$\chi^2$	%	<i>P</i>
Tratamiento	2	1.35	9.36	<b>&lt;0.0001</b>
Concentración	3	0.17	1.21	NS
Tratamiento:Concentración	6	0.23	1.58	NS
Error	165	12.64	87.85	
Total	176	14.39		

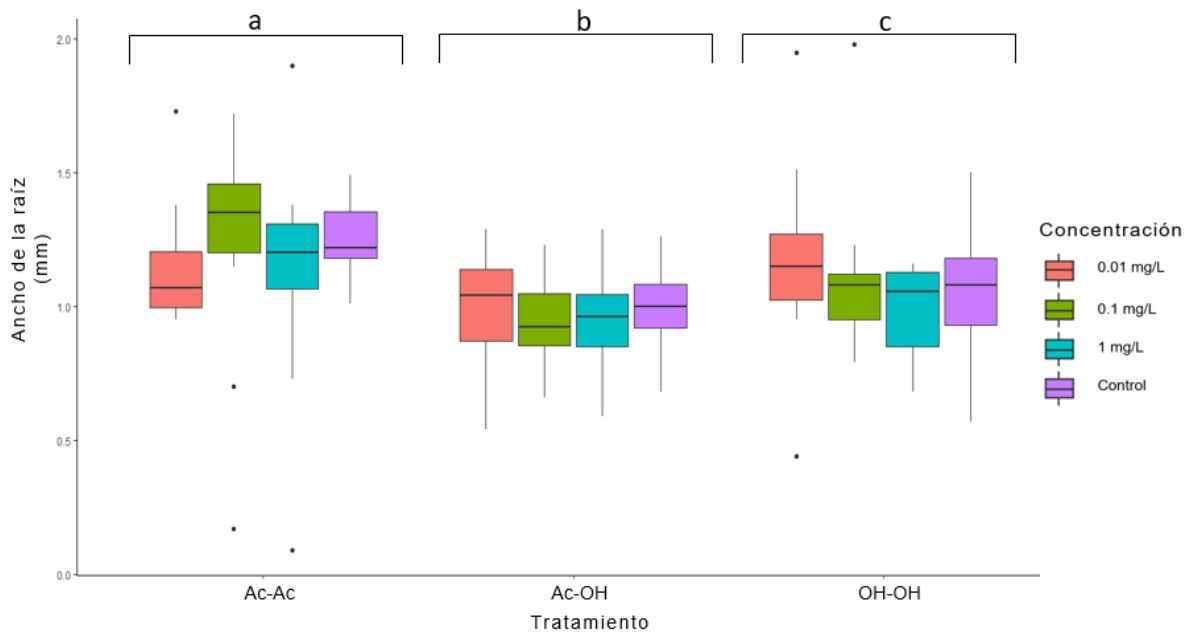


Figura 30. Se observa que el sustituyente Ac-Ac presenta un mayor ancho de raíz respecto a los demás sustituyentes.

Para el ancho del vástago, se encontró que el compuesto con sustituyentes **Ac-Ac** produce vástagos más anchos que **Ac-OH** y **OH-OH** (Cuadro 22, Figura 31).

Cuadro 22. Tabla de devianza para ancho del vástago en rábano (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo).

Ancho del vástago				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	P
Tratamiento	2	1.29	17.15	<b>&lt;0.001</b>
Concentración	3	0.17	2.19	NS
Tratamiento:Concentración	6	0.20	2.70	NS
Error	165	5.87	77.96	
Total	176	7.53		

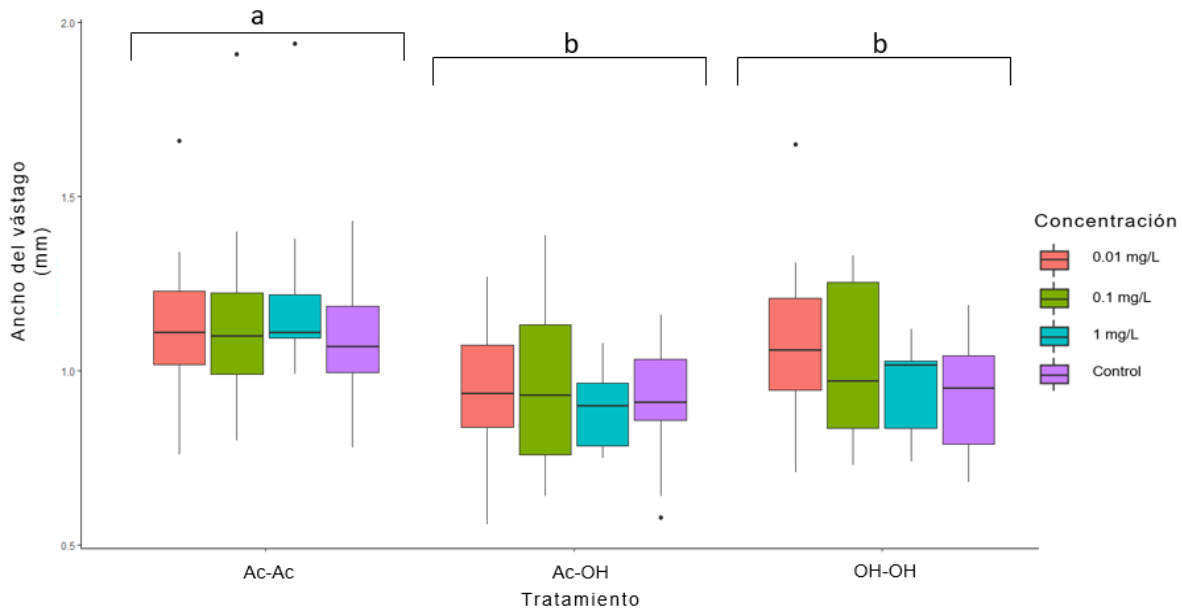


Figura 31. Se observa que el sustituyente Ac-Ac aumenta el ancho del vástago respecto a los demás tratamientos.

En la biomasa de la raíz el sustituyente **Ac-Ac** incide en producir mayor biomasa respecto a la biomasa de raíz producida por **Ac-OH** y **OH-OH**. (Cuadro 23, Figura 32).

Cuadro 23. Valores de devianza para biomasa de la raíz en rábano (% = porcentaje de explicación de la variable y NS= no significativo).

Biomasa de la raíz				
Fuente de variación	gl	$\chi^2$	%	<i>P</i>
Tratamiento	2	0.10	4.04	<b>&lt;0.05</b>
Concentración	3	0.05	1.90	NS
Tratamiento:Concentración	6	0.15	5.76	NS
Error	165	2.28	88.30	
Total	176	2.58		

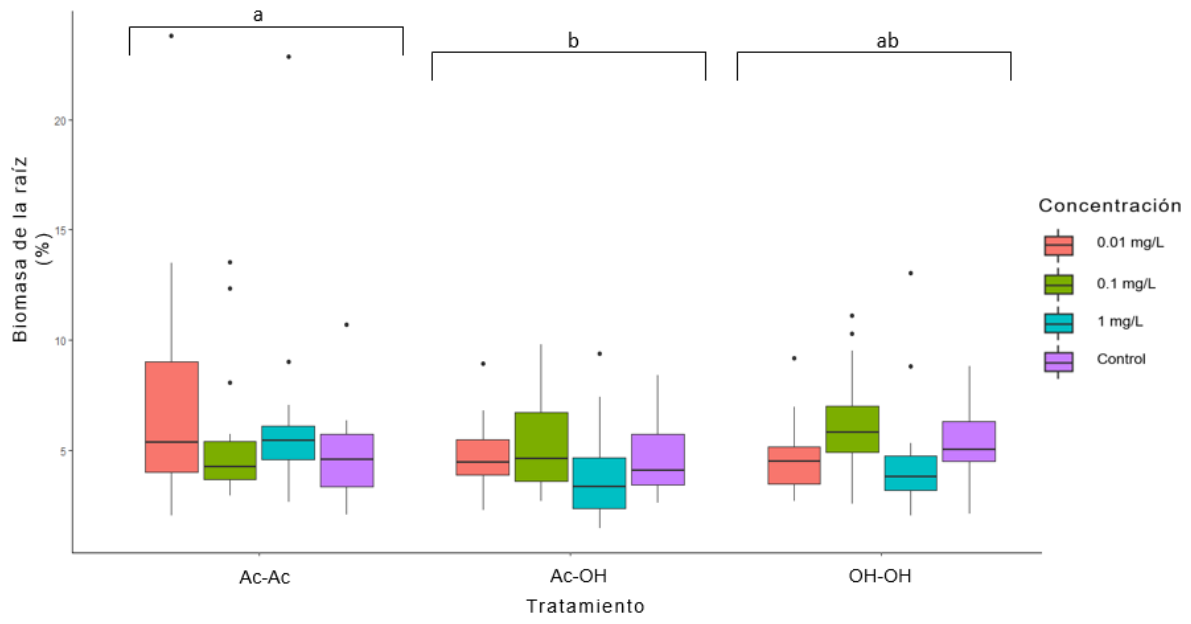


Figura 32. Se observa mayor biomasa en con el sustituyente Ac-Ac, respecto a Ac-OH y OH-OH.

## DISCUSIÓN

---

### EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Los compuestos **Ac-Ac**, **Ac-OH** y **OH-OH**, se evaluaron como promotores del crecimiento vegetal en semillas de interés económico para determinar su efecto sobre la velocidad de germinación y el crecimiento del vástago y raíz, considerando varios procesos biológicos y características morfológicas de las plántulas.

#### Velocidad de germinación

En el caso de maíz la aplicación del compuesto **OH-OH** aceleró la velocidad de germinación en un 25.47%, para frijol este compuesto tuvo el mismo efecto, aceleró la germinación en un 8.62% lo que coincide con lo encontrado por Liu y colaboradores (2005) donde evalúan la actividad de la brasinólida, un brasinoesteroide, que acelera la germinación de cacahuete al colocar la semilla en imbibición y aspersión foliar este compuesto a una concentración de 0.1mg/L; estos resultados se asemejan a lo reportado para un brasinoesteroide Por otra parte, los efectos también se presentaron en las tres diferentes concentraciones, por lo que se propone aplicar el compuesto a la concentración más baja evaluada (0.01mg/L) lo que confiere una ventaja respecto a otros análogos de brasinoesteroides como el Biobras 16 que se aplica a una concentración de 0.5 mg/L (Ayan, 2013). Falta resaltar la importancia de que este compuesto acelere la velocidad de germinación para estas especies (maíz y frijol)

Para el rábano el compuesto **Ac-Ac** aceleró la velocidad de germinación en un 7.87%, a diferencia de maíz y frijol, esto puede atribuirse a las diferencias en las semillas, ya que la semilla de rábano es más pequeña, contiene una menor cantidad de endospermo y tiene una testa más delgada lo que pudo aumentar la permeabilidad del compuesto hacia el interior de semilla a diferencia de las semillas de maíz y frijol

Tanto en el maíz, frijol y rábano, el compuesto **Ac-OH** disminuyó la velocidad de germinación, este efecto fue más intenso en rábano, ya que alcanzo un 118.34% que se puede atribuir a las características de la semilla mencionadas anteriormente,

otro efecto que se puede notar en maíz y frijol, es que disminuye el porcentaje de semillas germinadas. ¿cuales son las consecuencias de que afecte la velocidad de germinación éste sustituyente y que ventajas tendría su uso? Hace falta discutir este resultado.

Con el propósito de proponer un posible mecanismo de acción de los compuestos, se realizó un estudio de acoplamiento molecular de las proteínas asociadas a los genes BRI1, ABI5 y GAI implicados en la germinación, el compuesto **OH-OH** aumentó la velocidad de germinación, pero mostró resultados menos selectivos por las tres proteínas asociadas, por lo que se descarta su posible acción sobre estos genes. Para rábano, la proteína asociada al gen ABI5 se adapta a lo encontrado en la velocidad de germinación, **Ac-Ac** forma interacciones ligando receptor con valores bajos, mientras que **Ac-OH** no muestra afinidad. En el compuesto **Ac-Ac** los resultados del acoplamiento molecular muestran alta afinidad por el gen BRI1(Cuadro 8), ya que al contrastarlo con la homobrasinólida, un análogo de brasinoesteroide, se muestra mayor afinidad por el compuesto **Ac-Ac** (-10.1) indicando que es un compuesto que posiblemente es un brasinoesteroide, aunque es indispensable hacer más estudios moleculares para determinar el mecanismo de acción.

#### Variables morfométricas

De acuerdo a los resultados obtenidos, para el caso del maíz el compuesto **Ac-Ac** aumentó la biomasa del vástago, esto concuerda con lo reportado por Moreno (2009) quien concluye que este tipo de compuestos tienen efecto sobre el peso seco y fresco en maíz. Pérez (2010) también reporta el aumento de biomasa tanto en maíz como en frijol. En frijol, el compuesto **Ac-OH** disminuyó el ancho del vástago. Para la biomasa de la raíz, el compuesto **Ac-OH** aumenta esta variable a las concentraciones 0.1mg/L y 0.01mg/L, el compuesto **OH-OH** causa un efecto parecido aunque no tan marcado, estos resultados son similares a lo encontrado por Cué y colaboradores (2003) donde la aplicación de Biobras 16 en semillas de pepino favoreció el desarrollo de las raíces. En el largo del vástago y raíz no hay efecto del compuesto para maíz y frijol, esto se puede deber a varios factores que

no se evaluaron en este trabajo, como el área foliar, que pudo verse afectada positivamente, la humedad en el interior del frasco pudo ser muy alta y afectar el desarrollo de las plántulas o a luz fotosintéticamente activa (detallar el porque se cree que estas variables pudieran explicar efecto y citar trabajos de quienes respaldan la propuesta -o en su defecto indicar el proceso fisiológico que permita sustentar la propuesta de las variables area foliar, humedad relativa del cultivo in vitro o el PAR).

Para rábano, el compuesto **Ac-Ac** funcionó mejor a la concentración 0.1mg/L en la variable ancho de la raíz. Es más adecuado mencionar que las **raíces** fueron **más anchas**), lo que es bueno ya que es la parte comestible de la hortaliza. Para el ancho del vástago se encontraron diferencias entre los tratamientos, siendo Ac-Ac el sustituyente que genera mayor tamaño. En el largo de raíz y vástago no se encontraron diferencias, esto se puede deber a que las semillas presentan una reserva de nutrientes baja y el medio de cultivo no contenía los nutrientes necesarios, esto contrario a lo encontrado por Calero y colaboradores en 2019 donde la aplicación de Briobras 16 promovió el aumento de la altura de la planta de rábano.indicar la posible explicación de porque no se encuentra lo mismo que Calero y col.

Para las tres especies evaluadas las bajas concentraciones son las que muestran mejores resultados, los efectos son mas evidentes a la concentración 0.01mg/L, lo que concuerda con lo reportado por Pérez (2010), esto se debe a que los brasinoesteroides actúan mejor a bajas concentraciones. Además de que en diversos estudios, de brasinoesteroides y sus análogos, las concentraciones mayores a 1mg causan efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas (Liu et al.,2005)

## CONCLUSIÓN

---

Se sintetizaron siete compuestos a partir de diosgenina proponiendo la técnica de un solo paso, de los cuales, los tres mayoritarios **Ac-Ac**, **Ac-OH**, **OH-OH**, se evaluaron como promotores del crecimiento vegetal, debido a su parecido estructural con los brasinoesteroides.

El compuesto **OH-OH** aceleró la velocidad de germinación en semillas de maíz y frijol, mientras que en semillas de rábano el compuesto **Ac-Ac** aceleró la germinación, este efecto ocurrió independientemente de la concentración.

El compuesto **Ac-Ac** promovió un aumento de la biomasa del vástago en plántulas de maíz, mientras que en plántulas de rábano mejoró el ancho de vástago y raíz, el efecto fue similar entre las tres concentraciones evaluadas por lo que se sugiere hacer pruebas a la concentración más baja de 0.01mg/L; el compuesto **Ac-OH** aumentó la biomasa de la raíz en plántulas de frijol a la concentración 0.01mg/L.

Indicar si las predicciones planteadas para el estudio se cumplen o no. En cuales si hay concordancia con lo planteado y en cuales no se encontró lo predicho.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- 1) Abe, H. (1989). Advances in brassinosteroid research and prospects for its agricultural application. *Japan Pesticide Information*, 55:10-14.
- 2) Ahmed, S. (1998). Studies on conjugated heterodiene system and synthesis of some potential bioactive molecules. (Tesis de doctorado). Gauhati University, Jalukbari, India.
- 3) Antuna, O., Rincón, F., Gutiérrez, E., Ruiz, N., Bustamante, L. (2003). Componentes genéticos de caracteres agronómicos y de calidad fisiológica de semillas en líneas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26(1), 11-17.
- 4) Atilio, C., & Reyes, C. (2008). Guía técnica para el manejo de variedades de frijol. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.
- 5) Ayan, L., Martínez-González, L., Reyes, Y., & Núñez M. (2013). Resultados preliminares del efecto de la aplicación de Biobras-16 en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 34(3), 71-75.
- 6) Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona: McGraw-Hill Interamericana, 369-374.
- 7) Bache, S. M., & Wickham, H. (2014). magrittr: a forward-pipe operator for R. R Core Development Team, Vienna, Austria.
- 8) Baron, D. L., Luo, W., Janzen, L., Pharis, R. P., & Back, T. G. (1998). Structure–activity studies of brassinolide B-ring analogues. *Phytochemistry*, 49(7), 1849-1858.
- 9) Bewley, J. D. & Black, M. (2012). Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: volume 2: viability, dormancy, and environmental control. Springer Science & Business Media.
- 10) Brosa, C. (1994). Synthesis of new brassinosteroids with potential activity as antiecdysteroids. *Steroids*, 59(8), 463-467.

- 11) Brosa, C., Soca, L., Terricabras, E., Ferrer, J. C., & Alsina, A. (1998). New synthetic brassinosteroids: a 5 $\alpha$ -hydroxy-6-ketone analog with strong plant growth promoting activity. *Tetrahedron*, 54(40), 12337-12348.
- 12) Caldero A., Perez Y., Peña K., Quintero E. & Olivera D. (2019). Efecto de tres bioestimulantes en el comportamiento morfológico y productivo del cultivo del rábano (*Raphanus sativus* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 36 (1), 56-70.
- 13) Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo. (2006) Competitividad para la producción de maíz en los trópicos. Presentación elaborada por Luís Alberto Navarro. Disponible en [www.cimmyt.org](http://www.cimmyt.org) (consultada el 23 de septiembre de 2019).
- 14) Côme, D. (1970). Obstacles to germination. *Monographies de physiologie végétales*. 6.
- 15) Cruz, C., Armas, O. & Guateque, C. (2015). Codificación BBCH de los estadios fenológicos de desarrollo del rábano, (Tesis de licenciatura). Universidad de los Llanos, Barcelona, España.
- 16) Cruz, H. E. (2015). Efecto de una serie de análogos de brasinoesteroides en el desarrollo celular y crecimiento de mono y dicotiledóneas, (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- 17) Cue, J. L., Ferro, N., & Estévez, M. (2003). Efecto del Biobrás-16 sobre la germinación de las semillas y la morfología de las plántulas en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*, var. SS-5). *Centro Agrícola*, 30(4), 50-53.
- 18) Debouck, D. & Hidalgo, R. (1985). Morfología de la planta de frijol común Programa de las Naciones Unidas (PNUD); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 7-41.
- 19) Díaz A. (1993). Morfología y Fisiología del maíz en Colombia. En: IICA-Prociandino. Experiencia en el cultivo del maíz en el área Andina. Vol II. Ecuador: Prociandino. p. 56.

- 20) Fernández- Herrera, M.A. (2010). Síntesis de derivados esteroidales con actividad biológica: anticancerígenos y promotores del crecimiento vegetal, (Tesis de doctorado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- 21) Fernández, F., Gepts, P. & López, M. (1986). Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- 22) Food and Agriculture Organization. (2019). Crop Prospects and Food Situation - Quarterly Global Report no. 3. Rome, Italy. p. 6-7.
- 23) Foro Consultivo Científico y Tecnológico, A.C. (2008). Bases para una política de I&D e innovación de la cadena de valor del maíz. Distrito Federal, México, p. 14-17.
- 24) Galicia, M. L., (2014). Influencia del análogo del Brasinoesteroide aBSS4 en el desarrollo de plántulas de *Laelia anceps*, (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México.
- 25) Gómez, P. (2011). Evaluación del cultivo de rábano (*Raphanus sativus* L.) bajo diferentes condiciones de fertilización orgánica e inorgánica, (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México.
- 26) Gómez-Calvario, V., Arenas-González, A., Meza-Reyes, S., Montiel-Smith, S., Vega-Báez, J. L., Sandoval-Ramírez, J. & Hernández-Linares, M. G. (2013). Synthetic pathway to 22, 23-dioxocholestanic chain derivatives and their usefulness for obtaining brassinosteroid analogues. *Steroids*, 78(9), 902-908.
- 27) Hayat, S., Yusuf, M., Bhardwaj, R., & Bajguz, A. (2019). Brassinosteroids: Plant Growth and Development. Singapore: Springer, p.1-6.
- 28) He, Z., Wang, Z. Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., & Chory, J. (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science*, 288(5475), 2360-2363.
- 29) Hernández- Silva, E., & García-Martínez, I. (2016). Brasinoesteroides en la

- agricultura. II. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(2), 451-462.
- 30) Hernández, S. (2007). Estudio de la apertura del anillo espirocetálico de derivados sapogénicos (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México.
  - 31) Hilario-Martínez, J. C., Zeferino-Díaz, R., Muñoz-Hernández, M. A., Hernández-Linares, M. G., Cabellos, J. L., Merino, G. & Fernández-Herrera, M. A. (2016). Regioselective spirostan e-ring opening for the synthesis of dihydropyran steroidal frameworks. *Organic letters*, 18(8), 1772-1775.
  - 32) Hoseney, R. C. & Faubion, J. M. (1992). Physical properties of cereal grains. *Storage of cereal grains and their products*, 1-28.
  - 33) Kaufman, L. and Rousseeuw, P.J. (1990). Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis. Wiley, New York.
  - 34) Khripach, V., Zhabinskii, V. & de Groot, A. (2000). Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany*, 86(3), 441-447.
  - 35) León- Olivares, F. (2001). El origen de Syntex, una enseñanza histórica en el contexto de ciencia, tecnología y sociedad. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(2), 93-96.
  - 36) Lira- Saldívar, R. (2007). Fisiología vegetal. México: Editorial Trillas, p.195-198.
  - 37) Liu, W., wang, J. X., Yang, G. L., Lu, M., & Sui, B. F. (2005). Effect of Brassinolide on Peanut Young Plant. *Modern Agrochemicals*, 1.
  - 38) Llanos, C. Manuel. (1984). El maíz, su cultivo y aprovechamiento. España: Mundiprensa.
  - 39) López, J. I. G., Torres, N. A. R., Ricardo, H. L. S., Reyes, I. V. & Arguello, B. M. (2016). Técnicas para evaluar germinación, vigor y calidad fisiológica de semillas sometidas a dosis de nanopartículas, Agronano Tecnología. 129-134. Coahuila, México: Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA).

- 40) Mandava, N. B. (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 39(1), 23-52.
- 41) Matthews, S., Noli, E., Demir, I., Khajeh-Hosseini, M., & Wagner, M. H. (2012). Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. *Seed Science Research*, 22(S1), S69-S73.
- 42) Mazorra, L. M., & Núñez, M. (2008). Estado actual sobre el conocimiento de la biosíntesis y los mecanismos moleculares de acción de los brasinoesteroides en las plantas. *Cultivos tropicales*, 29(1), 91-105.
- 43) Mitchell, J. W., Mandava N. & Worley F. (1970). Brassins-a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* 225: 1065-1066.
- 44) Moreno, A., M. (2009). Efecto del análogo de Brasinoesteroide en diferentes variedades de Maíz (*Zea mays* L.) criollo. (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- 45) Muthuraman, P., & Srikumar, K. (2009). A comparative study on the effect of homobrassinolide and gibberellic acid on lipid peroxidation and antioxidant status in normal and diabetic rats. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24(5), 1122-1127.
- 46) Nafziger, E. (2009). Corn, Illinois agronomy handbook: 24th edition. Urbana, Illinois: University of Illinois at Urbana-Champaign, College of Agriculture, Cooperative Extension Service.
- 47) Nuñez, M. (1999). Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Cultivos Tropicales (Cuba)*. 20(3), 63-72.
- 48) Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., O'hara, R. B., Simpson, G. L. & Wagner, H. (2010). Vegan: community ecology package. <http://cran.r-project.org>.
- 49) Ortigoza, G.J. (2019). Guía técnica cultivo de maíz. San Lorenzo, Paraguay: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción.

- 50) Pérez B. F. (2010). Efecto de análogos de brasinoesteroides en monocotiledóneas y dicotiledóneas. (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- 51) Polanía, J. A. (2011). Identificación de características morfofisiológicas asociadas a la adaptación a sequía para ser usadas como criterios de selección en mejoramiento de frijol común: *Phaseolus vulgaris* L., (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- 52) Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2019). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(S1), 65-87.
- 53) Qu, C., Zhao, H., Chen, J., Zuo, Z., Sun, X., Huang, J. & Xu, Z. (2019). The transcriptional events and their relationship to physiological changes during poplar seed germination and post-germination. *BMC genomics*, 20(1), 801.
- 54) Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annual review of plant biology*, 63, 507-533.
- 55) Ramírez, J. C. R., & Rangel, I. B. E. U. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año*, 3(8).
- 56) Ramos Gamiño, F. (2013). Maíz, trigo y arroz: los cereales que alimentan al mundo. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. p. 23-27
- 57) Ritz, C., Pipper, C. B. & Streibig, J. C. (2013) Analysis of germination data from agricultural experiments, *European Journal of Agronomy*, 45, 1–6.
- 58) Rodríguez-Acosta M., Reyes D., Zeferino-Díaz, R., Fernández-Herrera, M. A., Sandoval-Ramírez, J., Meza S. & Montiel S. (2008). The response of maize (*Zea mays* L.) root to sintetic brassinosteroids. Memorias, Plant biology 2008. Yucatán, México.
- 59) Rojas, J. G. O. (2015). Manual técnico del cultivo de maíz bajo buenas prácticas agrícolas. Colombia: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

- 60) Rojas, L. H. Rodríguez, (2015). Influencia del análogo de brasinoesteroide BSS4 en el desarrollo de plántulas de *Epidendrum ciliare* (Orchidaceae), (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- 61) Rollins, R. C., 1993. The Cruciferae of Continental North America. California: Stanford University Press.
- 62) Ruíz, N. A. (2005). Efectos beneficiosos de una dieta rica en granos enteros. *Revista chilena de nutrición*, 32(3), 191-199.
- 63) Russell V. Lenth (2016) Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software*, 69(1), 1-33.
- 64) Salgado, R., Cortés, M. A. & Del Río, R. E. (2008). Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *México: Biológicas*, 10, 18-27.
- 65) Sandoval-Ramírez, J., Castro-Méndez, A., Meza-Reyes, S., Reyes-Vázquez, F., Santillán, R., & Farfán, N. (1999). Preparation of 22, 26-epoxycholest-22-ene steroids. Novel transformation of the side chain in sapogenins. *Tetrahedron letters*, 40(28), 5143-5146.
- 66) Sautour, M., Mitaine-Offer, A. C., & Lacaille-Dubois, M. A. (2007). The Dioscorea genus: a review of bioactive steroid saponins. *Journal of natural medicines*, 61(2), 91-101.
- 67) Seeta, S., Vidya, B., Sujatha, E. & Anuradha, S. 2002. Brassinosteroids- a new class of phytohormones. *Current Science*, 10(82):1239-1245.
- 68) Sosa, V., B. Schubert & A. Gómez-Pompa. 1987. Dioscoreaceae. Flora de Veracruz. Fascículo 53. México: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Instituto de Ecología, A.C. p.1-36.
- 69) Voigt, B., Schmidt, J., & Adam, G. (1996). Synthesis of 24-epiteasterone, 24-epityphasterol and their B-homo-6a-oxalactones from ergosterol. *Tetrahedron*, 52(6), 1997-2004.
- 70) Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York,

USA: Springer.

- 71) Wickham, H. (2017). The tidyverse. R package.
- 72) Wickham, H., & Henry, L. (2016). tidyr: Easily Tidy Data with 'spread ()'and 'gather ()'Functions. R package.
- 73) Wickham, H., Francois, R., Henry, L., & Müller, K. (2018). R: dplyr: a grammar of data manipulation. R package.
- 74) Xochihua, S. (2005). Síntesis de análogos de brasinoesteroides a partir de diosgenina (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- 75) Yokota, T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* 2:137-143.
- 76) Zeferino-Diaz, R., Hilario-Martínez, J. C., Rodríguez-Acosta, M., Carrasco-Carballo, A., Hernández-Linares, M. G., Sandoval-Ramírez, J., & Fernández-Herrera, M. A. (2017). Mimicking natural phytohormones. 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as plant growth promoters. *Steroids*, 125, 20-26.
- 77) Zeferino-Diaz, R., Hilario-Martínez, J. C., Rodríguez-Acosta, M., Sandoval-Ramírez, J., & Fernández-Herrera, M. A. (2015). 22-Oxocholestanes as plant growth promoters. *Steroids*, 98, 126-131.