
BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-Instituto de Ciencias

Posgrado en Ciencias Químicas

“Síntesis, estudios docking y evaluación promotora de crecimiento vegetal de compuestos esteroidales derivados de diosgenina”

Tesis presentada para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Químicas en el área de Química Orgánica

Presenta

QFB. Jorge Emmanuel Rodríguez Martínez

Director de tesis

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Asesor de tesis

Dra. María Guadalupe Hernández Linares

noviembre del 2020



Este trabajo de maestría fue desarrollado en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales y en el Laboratorio de Investigación del Jardín Botánico Universitario bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y la Dra. María Guadalupe Hernández Linares. Agradezco al CONACYT (No. de Becario: **921262**) por la beca otorgada para la realización de la presente tesis.





BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dr. Sara Montiel Smith, Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes y el Dr. José Luis Vega Báez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Síntesis, estudios docking y evaluación promotora de crecimiento vegetal de compuestos esteroidales derivados de diosgenina"**, que presenta el alumno **Jorge Emmanuel Rodríguez Martínez** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los trece días del mes de noviembre del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dra. Sara Montiel Smith

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes

Dr. José Luis Vega Báez

Partes de este trabajo de tesis de investigación fueron presentadas en los siguientes congresos:

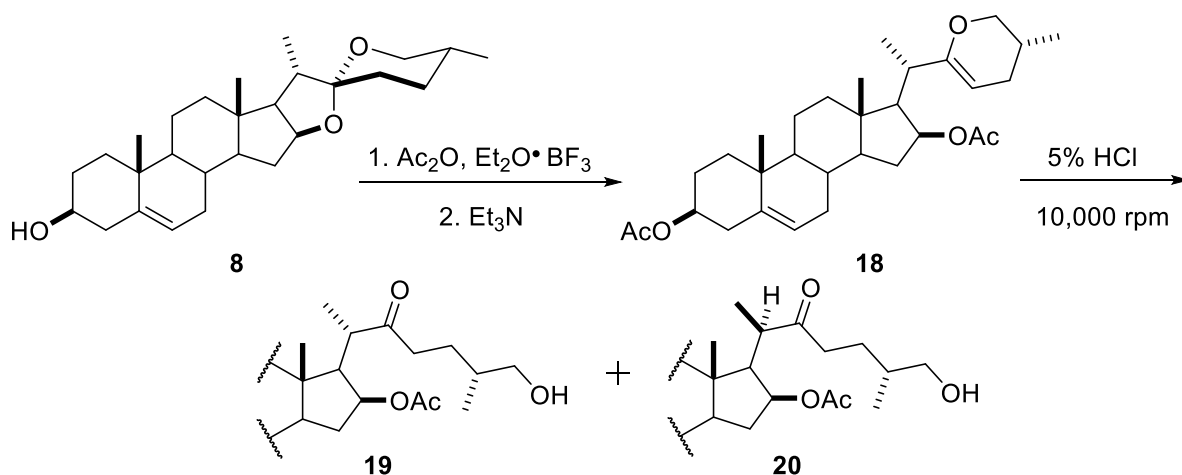
- XV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, con el cartel titulado: Síntesis de epímeros en C-20, de 22-oxocolestanos. Promisoria actividad como promotores de crecimiento vegetal, Cuernavaca, Morelos del 8 al 12 de abril de 2019.
- 54° Congreso Mexicano de Química, con el cartel titulado: Síntesis y actividad biológica de 22-oxocolestanos epimerizados en C-20, Puebla, Puebla del 30 de septiembre al 3 de octubre de 2019.

Resumen

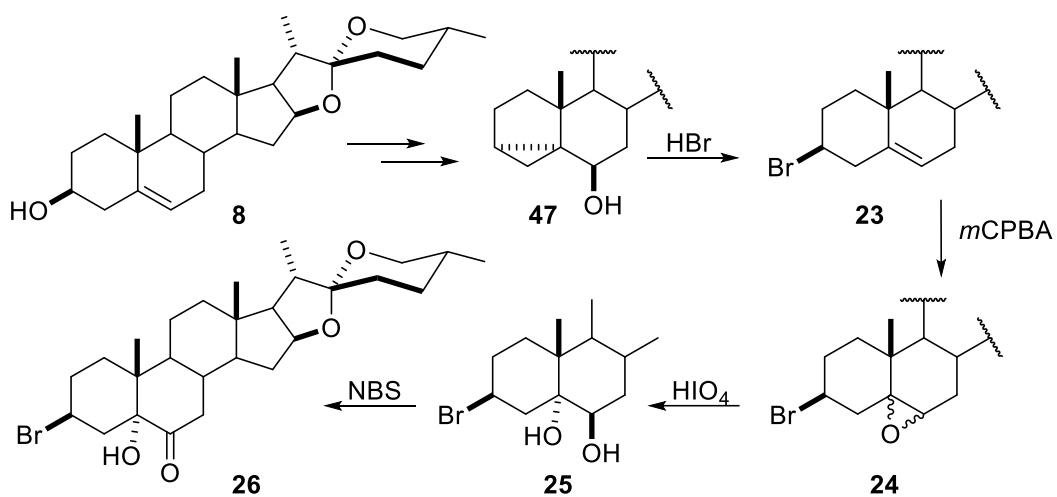
El presente trabajo se divide en tres capítulos, la primera describe el incremento del rendimiento del epímero **20** de estructura (20*R*)-22-oxocolestánica, a partir del compuesto **18**, mediante creación de emulsiones que contienen nano gotas, promovidas por el uso de agitadores de alto cizallamiento a temperatura y presión ambiente, reduciendo tiempo, costos y sin la presencia de auxiliares quirales (**Esquema A**).

El segundo capítulo presenta la obtención de una nueva familia de compuestos espirostánicos bromados en C-3 (**23-26**, **Esquema B**), mediante la formación del *i*-diosgenina **47**.

En el tercer capítulo se presenta la relación estructura-actividad de los compuestos **19**, **20** y **23-26**, como promotores de crecimiento vegetal, con base en estudios *in vivo* en cebolla y estudios docking con las proteínas BRI1 (clave 3RGZ) y BRI1-BAK1 (clave 4M7E) (**Figura A**).



Esquema A. Síntesis de los epímeros 22-oxocolestánicos **19** y **20**, a partir de diosgenina (**8**)



Esquema B. Metodología para la obtención de compuestos espirostánicos con bromo en posición C-3 β .

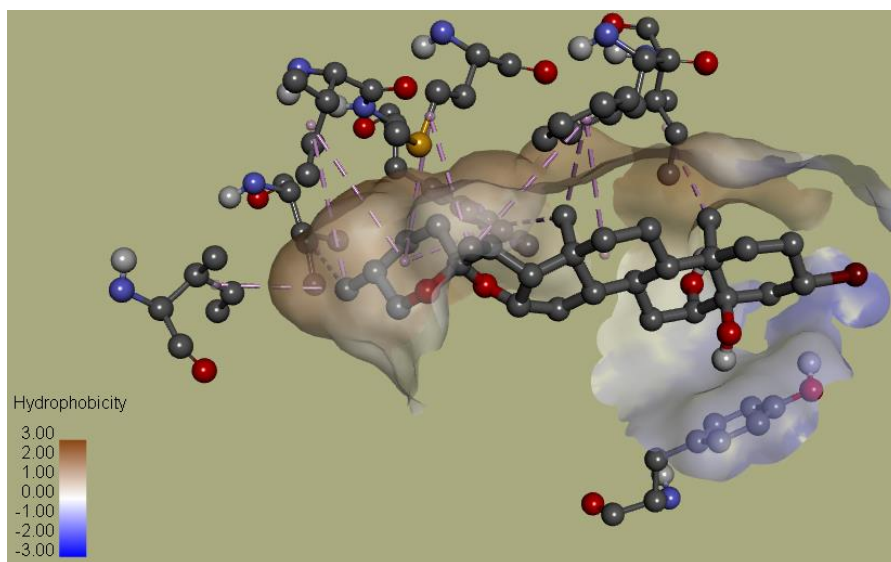


Figura A. Diagrama 3D de las interacciones del compuesto 25 en el sitio activo de la proteína BRI1.

Abstract

The thesis is divided into three chapters. In the first, the description of a new methodology to increase the formation of the 22-oxocholestane 20*R* epimer **20** is described. For this transformation, the dihydropyrane **18** was chosen as the starting material. To improve the yield of **20** the formation of a nanodroplets emulsion was provoked with the aid of a high shear mixer, at room temperature and atmospheric pressure, reducing time; no chiral auxiliaries were needed (see **Esquema A**).

In the second chapter, the production of some new spirostanes containing a bromine atom at position C-3 (**23-26**) is described; the synthetic pathway was performed from the *i*-steroid compound **47** by an HBr treatment, to produce compound **23** (see **Esquema B**).

The third chapter describes the structure-activity relationship of epimers **19** and **20** as vegetable growth promoters, based on *in vivo* studies on onion cultures and docking studies using BR11 (code: 3RGZ) and BR11-BAK1 (code: 4M7E) (see **Figura A**).

Contenido

Lista de abreviaturas	9
Lista de figuras y esquemas	10
Lista de tablas y gráficas	12
Lista espectros de RMN	13
Introducción	14
Capítulo I	17
Uso de agitadores de alto cizallamiento para la síntesis del epímero C-20R de estructura 22-oxocolestánica (20) con actividad antiviral y promotora de crecimiento vegetal	17
Antecedentes	18
Objetivos	23
Materiales y métodos	24
Resultados y discusión	27
Conclusiones	37
Capítulo II	38
Síntesis del compuesto acetato de (20R,25R)-3β-bromo-5,26-dihidroxi-6,22-dioxo-5α-colestan-16β-ilo (22) con promisorio actividad antiviral y promotora de crecimiento vegetal	38
Antecedentes	39
Objetivos	45
Materiales y métodos	46
Resultados y discusión	53
Conclusiones	71
Capítulo III	72
Estudios de acoplamiento molecular y evaluación de la actividad promotora de crecimiento vegetal ..	72
Antecedentes	73
Objetivos	74
Materiales y métodos	75
Resultados y discusión	77
Conclusiones	94
Bibliografía	95

Lista de abreviaturas

<i>m</i> CPBA	Ácido meta-cloroperbenzoico
TMSBr	Bromuro de tetrametilsilano
PCC	Clorocromato de piridinio
TsCl	Cloruro de tosilo
MsCl	Cloruro de mesilo
HSQC	Correlación cuántica heteronuclear simple
HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear
CCF	Cromatografía en capa fina
PDC	Dicromato de piridinio
COSY	Espectroscopia de correlaciones
Hex	Hexano
NBS	N-bromosuccinimida
pm	Peso molecular
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón

Lista de figuras y esquemas

Figura 1. Numeración del ciclopenta[α]fenantreno según la IUPAC.	14
Figura 2. Ejemplos de compuestos que contienen en su estructura el núcleo del ciclopenta[α]fenantreno.	15
Figura 3. Hidrólisis de la dioscina (7) para la obtención de diosgenina (8).	15
Figura 4. Estructuras básicas de diferentes fitohormonas.	18
Figura 5. Ejemplos de brasinoesteroides naturales.	19
Esquema 1. Ruta sintética para la obtención de 2 estructuras 22-oxocolestánicas epiméricas en C-20.	20
Figura 6. Crecimiento de maíz criollo a los 90 días de exposición con los compuestos 15 , 19 y 20	20
Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de mezclas epiméricas de C-20, a partir de alcoholes alílicos.	22
Figura 7. Derivados 22-oxocolestánicas con actividad mimetizadora de brasinoesteroide.	27
Esquema 3. Mecanismo de reacción para la formación de estructuras 22-oxocolestánicas.	28
Esquema 4. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 20	28
Figura 8. Estado de transición necesario para la formación de la mezcla enantiomérica en el C-20.	29
Figura 9. Conformación de mínima energía de la molécula <i>ii</i> (30.7 kcal/mol) y <i>iii</i> (28.9 kcal/mol).	30
Figura 10. Adición enantioespecífica de H ⁺ en C-20 del tautómero Z-enólico 23	30
Figura 11. Diagrama hipotético en la conversión del compuesto 19 al compuesto 20	36
Figura 12. Diseño del compuesto 22 con los farmacóforos FA (rojo), FB (azul) y FC (verde).	40
Esquema 5. Ruta retrosintética para la obtención del compuesto 22	40
Esquema 6. Metodologías para la obtención de C-3 β -bromo en esteroides.	41
Esquema 7. Metodología para la formación de epóxidos a partir del doble enlace de los compuestos 8 y 21	41
Esquema 8. Metodologías para la obtención de 5,6-dioles trans a partir de esteroides.	42
Esquema 9. Metodologías de oxidación del alcohol del C-6 con diferentes derivados de diosgenina.	43
Esquema 10. Metodologías de oxidación del alcohol del C-6 con diferentes derivados del colesterol.	43
Esquema 11. Oxidación selectiva del alcohol en C-6 con NBS.	44
Esquema 12. Ruta sintética para obtener el compuesto bromado 22	47
Figura 13. Mecanismo de reacción de la adición diastereoespecífica.	61
Figura 14. Adición diastereoselectiva de <i>m</i> CPBA en la diosgenina a partir del alcohol homoalílico.	61
Figura 15. Mecanismo de reacción de apertura del α -epóxido con HIO ₄	64
Figura 16. Conformación de mínima energía del compuesto 26 (27.3 kcal/mol) y 25 (29.36 kcal/mol).	70
Esquema 13. Proceso semicontinuo para la obtención del compuesto 26	71
Figura 17. Re-docking del compuesto 14 (púrpura) y del ligando cocrystalizado (azul) en el heterodímero A-C con un RMSD de 0.889 \pm 0.051 Å.	80
Figura 18. Modos de unión de todos los compuestos en el sitio activo del heterodímero A-C.	80
Figura 19. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 14	83
Figura 20. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 15	83
Figura 21. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 19	83
Figura 22. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 20	84
Figura 23. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 23	84
Figura 24. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 24	84
Figura 25. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 25	85
Figura 26. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto 26	85
Figura 27. Re-docking del compuesto 14 y del ligando cocrystalizado de las proteínas BRI1-W y BRI1- con un RMSD de 0.505 Å y 0.609 Å, respectivamente.	86
Figura 28. Modos de unión de todos los compuestos en el sitio activo de la proteína BRI1-W.	87
Figura 29. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto 14 con las proteínas BRI1-W y BRI1-.	87
Figura 30. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto 19 con las proteínas BRI1-W y BRI1-.	88

Figura 31. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto 20 con las proteínas BRI1-W y BRI1-.....	88
Figura 32. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto 23 con las proteínas BRI1-W y BRI1-.....	88
Figura 33. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto 24 con las proteínas BRI1-W y BRI1-.....	89
Figura 34. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto 25 con las proteínas BRI1-W y BRI1-.....	89
Figura 35. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto 26 con las proteínas BRI1-W y BRI1-.....	89
Figura 36. Internalización e interacción hidrofóbica de los compuestos 23 a 26 con el sitio activo de la proteína BRI1-.....	92
Figura 37. Pequeña internalización e interacción hidrofóbica del compuesto 14 con el sitio activo de la proteína BRI1-.....	92
Figura 38. Compuestos seleccionados por estudios <i>in silico</i> basados en estudios de detección y acoplamiento dentro de los sitios activos de los receptores BRI1 y BRI1-BAK1.	93

Lista de tablas y gráficas

Tabla 1. Resultados de la mezcla epimérica en C-20, obtenida por Houhua y colaboradores a partir de alcoholes alílicos con diferentes sustituyentes arilo en posición 20 con la ayuda de auxiliares quirales de Ir	22
Tabla 2. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de ambos epímeros de C-20.....	31
Tabla 3. Resultados de diferentes experimentos de la relación obtenida de C20S:C20R.	34
Tabla 4. Condiciones de reacción de la oxidación del C-6 con NBS.	68
Tabla 5. Resultados de crecimiento vegetal de tallo y raíz en cm a los 5 días de tratamiento.	78
Gráfica 1. Actividad de los compuestos (media \pm error estándar) en tallo a los 5 días de exposición.	79
Gráfica 2. Actividad de los compuestos (media \pm error estándar) en raíz a los 5 días de exposición	79
Tabla 6. Estructuras y energías de acoplamiento de los compuestos evaluados en el heterodímero A-C.	82
Tabla 7. Interacciones de los compuestos con los residuos del heterodímero A-C.	85
Tabla 8. Estructuras y energías de acoplamiento de los compuestos evaluados con las proteínas BRI1	90
Tabla 9. Comparación de las interacciones de los compuestos con los residuos de las proteínas BRI1.....	91

Lista espectros de RMN

Espectro 1. RMN de ^1H a 500 MHz de ambos epímeros de C-20 en CDCl_3	32
Espectro 2. RMN de ^{13}C a 500 MHz de ambos epímeros de C-20 en CDCl_3	33
Espectro 3. RMN de ^1H a 300 MHz de la mezcla 19 y 20 en CDCl_3 en diferentes experimentos.	35
Espectro 4. RMN de ^1H a 500 MHz de la mezcla de los compuestos 19 y 20 en CDCl_3 en el experimento 4.....	36
Espectro 5. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto 8 en CDCl_3	54
Espectro 6. RMN de ^{13}C a 500 MHz del compuesto 8 en CDCl_3	54
Espectro 7. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto 38 en CDCl_3	55
Espectro 8. RMN de ^{13}C a 500 MHz del compuesto 38 en CDCl_3	56
Espectro 9. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto 47 en CDCl_3	57
Espectro 10. RMN de ^{13}C a 500 MHz del compuesto 47 en CDCl_3	57
Espectro 11. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto 23 en CDCl_3	59
Espectro 12. Experimento COSY a 500 MHz del compuesto 23 en CDCl_3	59
Espectro 13. RMN de ^{13}C a 500 MHz del compuesto 23 en CDCl_3	60
Espectro 14. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto 24 en CDCl_3	62
Espectro 15. Experimento COSY a 500 MHz del compuesto 24 en CDCl_3	63
Espectro 16. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto 25 en CDCl_3	65
Espectro 17. Experimento HSQC a 500 MHz del compuesto 25 en CDCl_3	65
Espectro 18. Experimento HMBC a 500 MHz del compuesto 25 en CDCl_3	66
Espectro 18.1. Ampliación del experimento HMBC a 500 MHz del compuesto 25 en CDCl_3	66
Espectro 19. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto 26 en CDCl_3	68
Espectro 20. Experimento HMBC a 500 MHz del compuesto 26 en CDCl_3	68
Espectro 21. Experimento HSQC a 500 MHz del compuesto 26 en CDCl_3	69
Espectro 21.1. Ampliación del experimento HSQC a 500 MHz del compuesto 26 en CDCl_3	69

Introducción

Los seres vivos poseen la capacidad de sintetizar un gran número de moléculas, denominados productos naturales, los cuales se clasifican como metabolitos primarios y secundarios; los primeros se caracterizan por ser esenciales para el funcionamiento vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción; mientras que los metabolitos secundarios cumplen funciones ecológicas [1]. La mayoría de los productos naturales o derivados, han fomentado el desarrollo y fortalecimiento de las industrias químicas que están destinadas a la obtención de fármacos, plaguicidas, fertilizantes, colorantes, entre otros [2].

Dentro de los productos naturales, destaca la familia de los esteroides que están presentes en todos los seres vivos ejerciendo diferentes actividades fisiológicas muy importantes para mantener la homeostasis de los seres vivos [3]. Esta familia tiene en común de poseer un núcleo derivado del ciclopenta[α]fenantreno, el cual es constituido por cuatro anillos fusionados, tres de ellos son ciclohexanos y un ciclopentano, denominados A, B, C y D, respectivamente. La fusión de dichos anillos por lo general son *trans*, aunque en algunas ocasiones ocurren fusiones *cis*. La determinación del núcleo principal de los esteroides se debe fundamentalmente al trabajo realizado por Windaus y Diels; la numeración está dada por las reglas de la IUPAC (**Figura 1**). Dicho núcleo se puede encontrar con grupos metilo sobre los carbonos C-10, C-13 y una cadena hidrocarbonada sobre el C-17 [5].

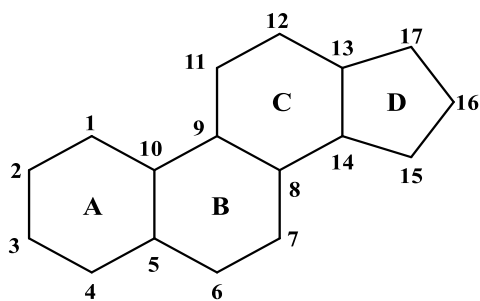


Figura 1. Numeración del ciclopenta[α]fenantreno según la IUPAC.

Una gran diversidad de esteroides han sido aislados de diferentes organismos que presentan gran interés en la comunidad científica y médica, ejemplos de ellos son: esteroides, saponinas, glicósidos cardioactivos, ácidos biliares, corticosteroides, vitaminas D, hormonas sexuales, brasinoesteroides, entre otros [6] (**Figura 2**).

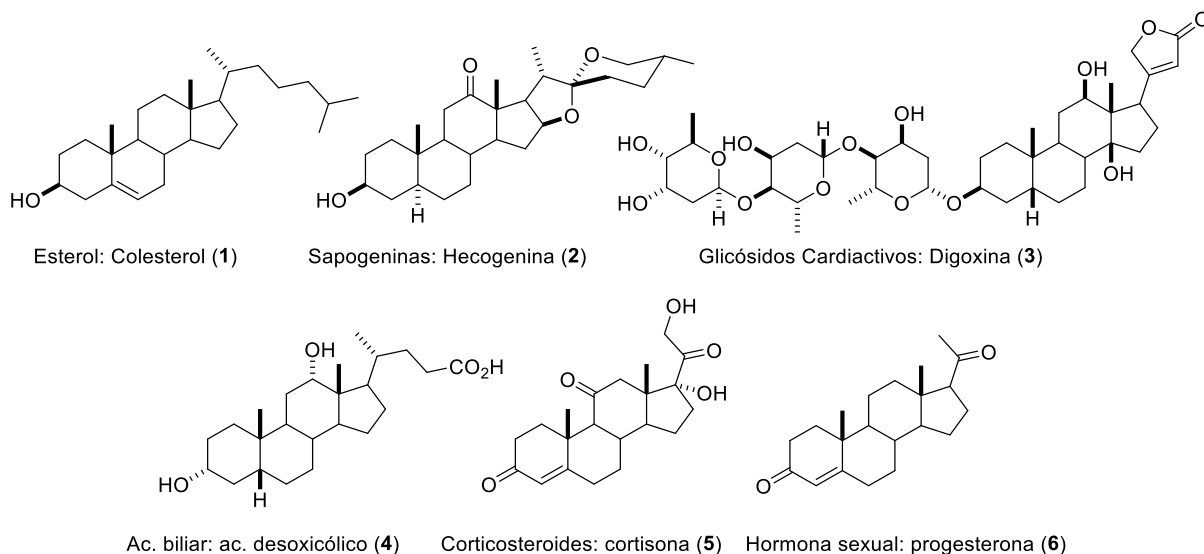


Figura 2. Ejemplos de compuestos que contienen en su estructura el núcleo del ciclopenta[α]fenantreno.

Un grupo muy importante de esteroides son las saponinas que se caracterizan por presentar una estructura anfipática, de la cual se puede degradar mediante hidrólisis ácida o enzimática, obteniéndose así un componente hidrofóbico denominado saponina y un componente hidrofílico constituido por unidades de monosacáridos [7] (**Figura 3**).

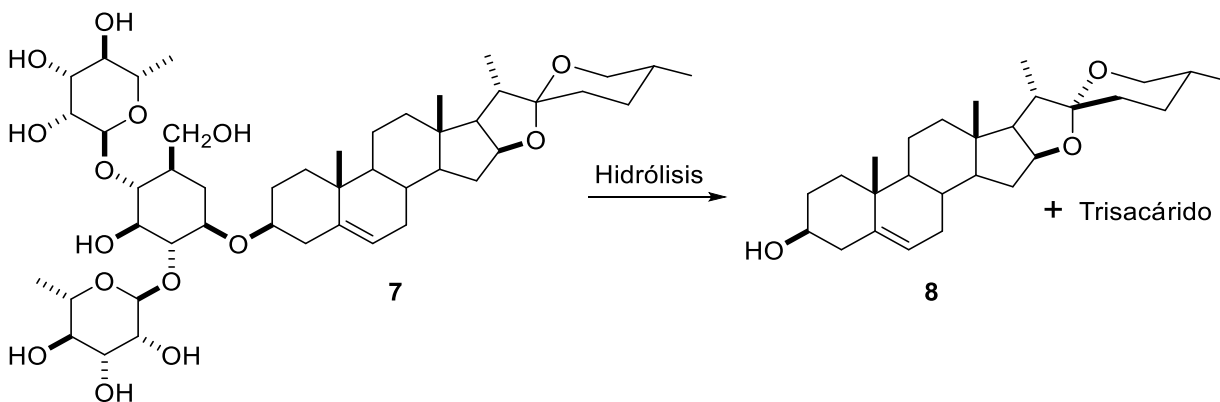


Figura 3. Hidrólisis de la dioscina (7) para la obtención de diosgenina (8).

Las saponinas se encuentran por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son las agaváceas, liláceas y dioscoreáceas; estas últimas en los años 40 tuvieron una gran importancia en México, debido al descubrimiento por el Dr. Russell Marker de la diosgenina (**8**) en el barbasco (*Dioscorea composita*), misma que se utilizó en la síntesis industrial de la progesterona [8].

A partir de este descubrimiento, la investigación en México sobre el estudio de sapogeninas como materias primas tuvo un gran interés y relevancia para la obtención de nuevos compuestos con actividades biológicas, algunas aplicaciones de estas transformaciones se han llevado a cabo en la síntesis de compuestos con actividad promotora de crecimiento vegetal. En el presente trabajo de tesis se transformaron químicamente los anillos A, B, E y F de la diosgenina con el objetivo de generar compuestos de interés químico y biológico.

Capítulo I

Uso de agitadores de alto cizallamiento para la síntesis del epímero C-20R de estructura 22-oxocolestánica (**20**) con actividad antiviral y promotora de crecimiento vegetal.

Antecedentes

Las plantas tienen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de compuestos, los cuales regulan diferentes procesos fisiológicos vitales, estas sustancias son denominadas hormonas vegetales o fitohormonas. Actualmente se conocen cinco tipos de familias de fitohormonas, las cuales son las auxinas (**9**), ácido abscísico (**10**), citoquininas (**11**), giberelinas (**12**) y otros compuestos, como lo son el etileno o el ácido jasmónico (**13**) [9] (**Figura 4**).

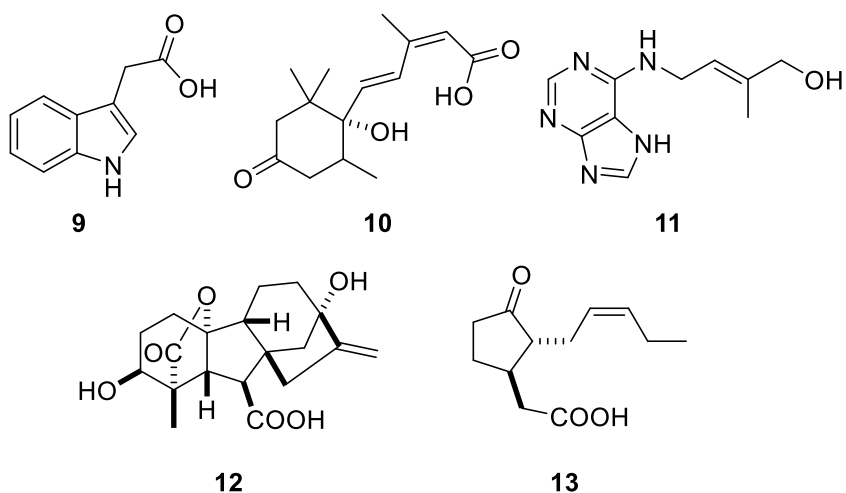


Figura 4. Estructuras básicas de diferentes fitohormonas.

En 1970 Mitchell y colaboradores aislaron una sustancia a partir de un extracto lipídico obtenido del polen *Brassica napus L.* la cual mostraba una increíble actividad estimuladora de crecimiento vegetal y resultaba ser una molécula esteroidea. Este nuevo compuesto fue denominado brasinólida (**14**) y junto a otras moléculas aisladas con características estructural y actividad semejantes, conforman la sexta familia de fitohormonas llamada brasinoesteroides [10] (**Figura 5**).

Los brasinoesteroides al igual que otras fitohormonas participan en los procesos de crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas. Particularmente los brasinoesteroides estimulan el crecimiento vegetal, aumentan la producción de su biomasa, aceleran la maduración de frutos y atenúan los efectos de estrés ambiental biótico y abiótico, tales como la resistencia a temperaturas extremas, sequías, salinidad, presencia de xenobióticos y patógenos, entre otros [11].

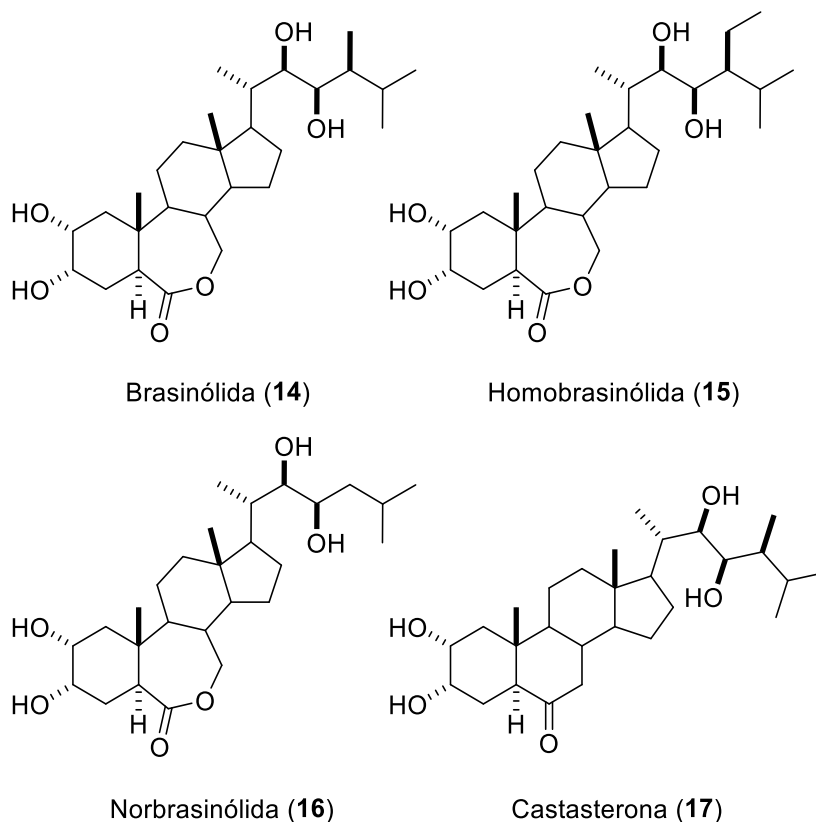
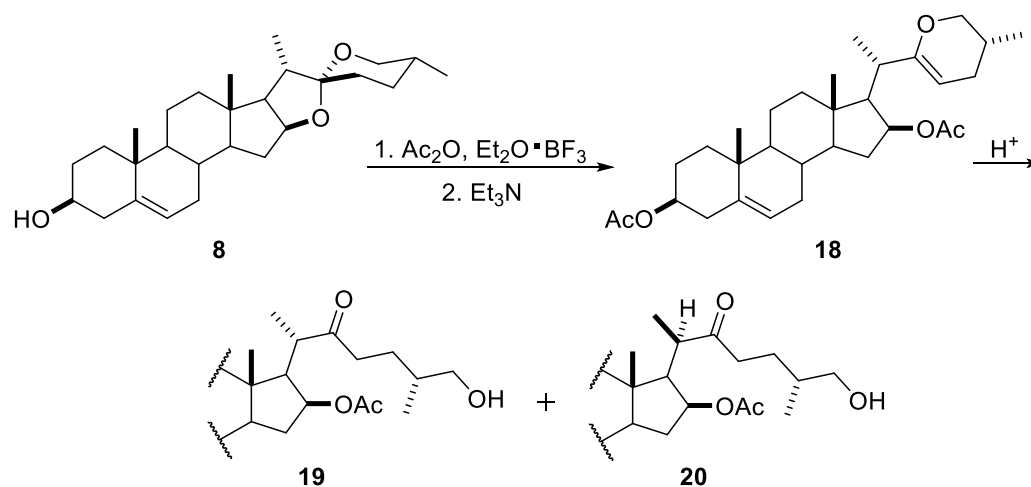


Figura 5. Ejemplos de brasinoesteroides naturales.

Debido a la baja concentración de brasinoesteroides encontrados en las plantas, en algunas ocasiones en el orden de nanogramos, hacen que la única fuente viable de estos compuestos de gran interés es mediante la modificación química de materias primas esteroideas, dicho esto, diversos grupos de investigación han buscado el diseño y síntesis de moléculas con actividad igual o mayor a los brasinoesteroides con el objetivo de aumentar la producción agrícola para resolver un problema actual de crecimiento demográfico y de demanda alimentaria.

En nuestro grupo de investigación de síntesis y modificación de productos naturales, ha desarrollado satisfactoriamente metodologías para efectuar la apertura selectiva de anillos espirostánicos de sapogeninas esteroideas [12] [13]. Un ejemplo de ello es a partir de la diosgenina (**8**), para la obtención de estructuras 22-oxocolestánicas de gran interés debido a su diversa actividad biológica (**Esquema 1**). Uno de los resultados más interesantes es la conversión de configuración del C-20S (**19**) a C-20R (**20**) y su evaluación promotora de

crecimiento vegetal en maíz criollo (**Figura 6**), tales compuestos fueron reportados en una tesis de maestría [14]. Así mismo, el compuesto **20** en una tesis de licenciatura con clave molecular **aBSS18**, presentó un efecto protector contra la infección del virus del jaspeado del tabaco [15]. El compuesto **20** exhibe de tener una gran actividad con respecto a su epímero **20S** y a la homobrasinólida (**15**) que es un brasinoesteroide natural muy potente, pero una de las limitantes es su rendimiento inferior al 5%, por lo que la búsqueda de nuevas metodologías para incrementar la obtención de dicho compuesto es de gran importancia para emplearse en pruebas biológicas a mayor escala.



Esquema 1. Ruta sintética para la obtención de 2 estructuras 22-oxocolestánicas con diferente configuración en el C-20 a partir de la diosgenina con configuración C-20S.

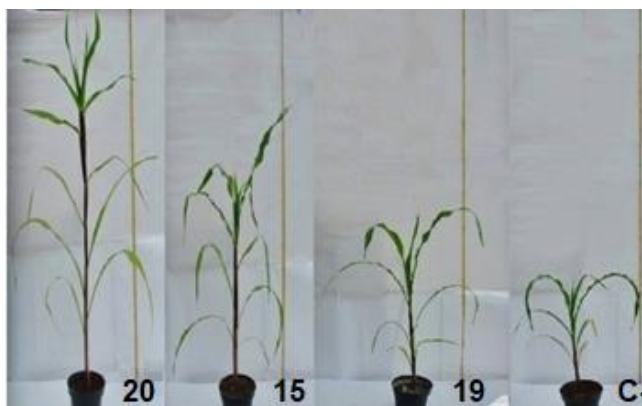
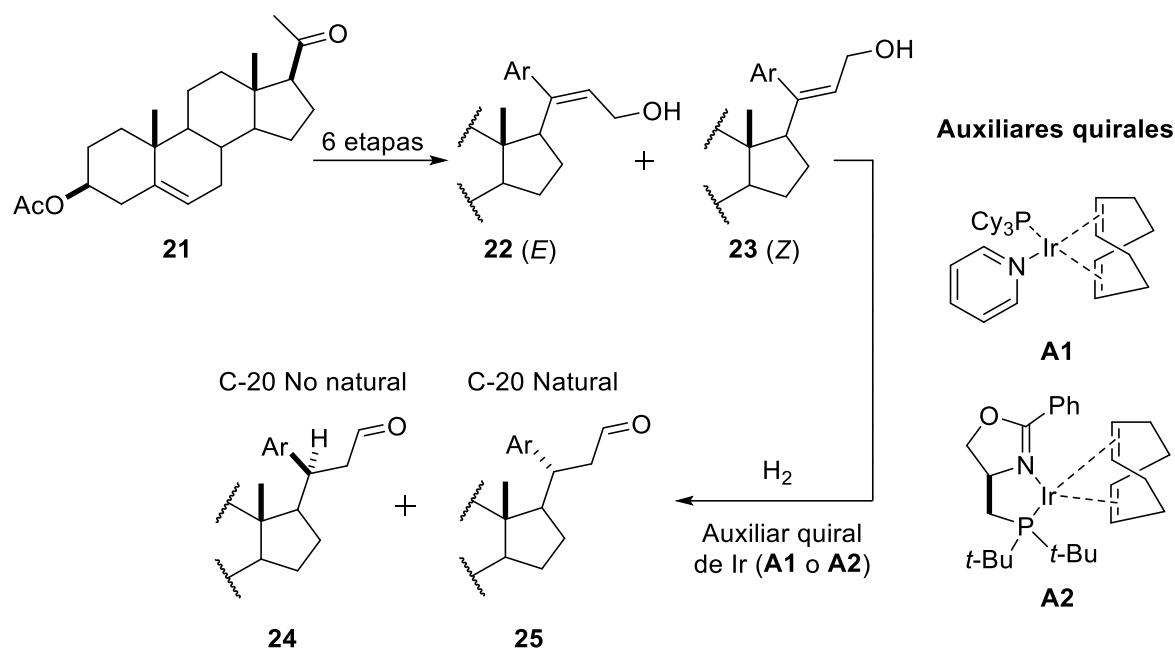


Figura 6. Crecimiento de maíz criollo a los 90 días de exposición con los compuestos **20**, **15** y **19** a una concentración de 0.01 mg/l y control negativo (mezcla de agua y acetona).

Hasta el momento, la gran parte de los esteroides con actividad biológica poseen generalmente la llamada configuración natural C-20R. Estas moléculas de origen natural o análogos sintéticos presentan diferentes actividades biológicas, desde propiedades antiinflamatorias hasta antitumorales, mientras que los esteroides con la configuración epimérica no natural de C-20 (generalmente S) son mucho más raros, pero se distinguen por presentar mayor actividad [16]. En el **Esquema 2**, se presenta una metodología empleada de Houhua y colaboradores en el año 2015, que consiste en la reducción de alcoholes alílicos E y Z (**22** y **23**) para la obtención de mezclas epiméricas en C-20 (**24** y **25**) con la ayuda de un auxiliar quirral de iridio [17]. En la **Tabla 2**, se observan algunos resultados de la ruta sintética de Houhua, en donde la reducción del alcohol alílico Z con el auxiliar quirral **A2** produce de manera enantioselectiva al compuesto **24**, mientras que las demás condiciones siempre favorecen al epímero de C-20 de configuración natural. En consecuencia, dicho proceso es difícil de replicar en otros esteroides por el gran número de etapas de reacción y de variables a considerar. Actualmente, el empleo de auxiliares quirales es una limitante en la producción a mayor escala debido a su alto costo en la síntesis de compuestos orgánicos de interés químico y farmacéutico. Dicho esto, en el presente capítulo se ha planteado buscar una condición de reacción económica, rápida y amigable con el ambiente para incrementar la síntesis del compuesto 3,16-diacetato de (20R,25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (**20**), la cual presenta una gran aplicación agronómica.



Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de mezclas epiméricas de C-20 a partir de alcoholes alílicos con diferentes sustituyentes arilo.

Tabla 1. Resultados de la mezcla epimérica en C-20, obtenida por Houhua y colaboradores a partir de alcoholes alílicos con diferentes sustituyentes arilo en posición 20 con la ayuda de auxiliares quirales de Ir

Auxiliar quiral [Ir]	Alcohol alílico	Sustituyente Ar	Rendimiento de la mezcla epimérica de C-20 (%)	Relación (24:25)
A1	22		76	1:29
	23		72	1:1.4
A2	22		70	1:>50
	23		49	50:1
A1	22		81	1:42
	23		74	1:2
A2	22		55	1:>50
	23		44	50:1
A1	22		69	1:20
	23		13	1:2.2
A2	22		51	1:>50
	23		40	50:1

Objetivos

Objetivo general:

- Epimerizar C-20 de una cadena 22-oxocolestánica para obtener el compuesto 3,16-diacetato de (20*R*,25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (**20**).

Objetivo particulares:

- Optimizar las condiciones de reacción empleando agitadores de alto cizallamiento a temperatura y presión constante con ausencia de catalizadores y auxiliares quirales.
- Caracterizar espectroscópicamente por RMN cada uno de los compuestos obtenidos.
- Determinar la proporción del compuesto **20**, mediante RMN de ^1H a partir de la mezcla de reacción de ambos epímeros **19** y **20**.

Materiales y métodos

Equipos, software y técnicas utilizadas

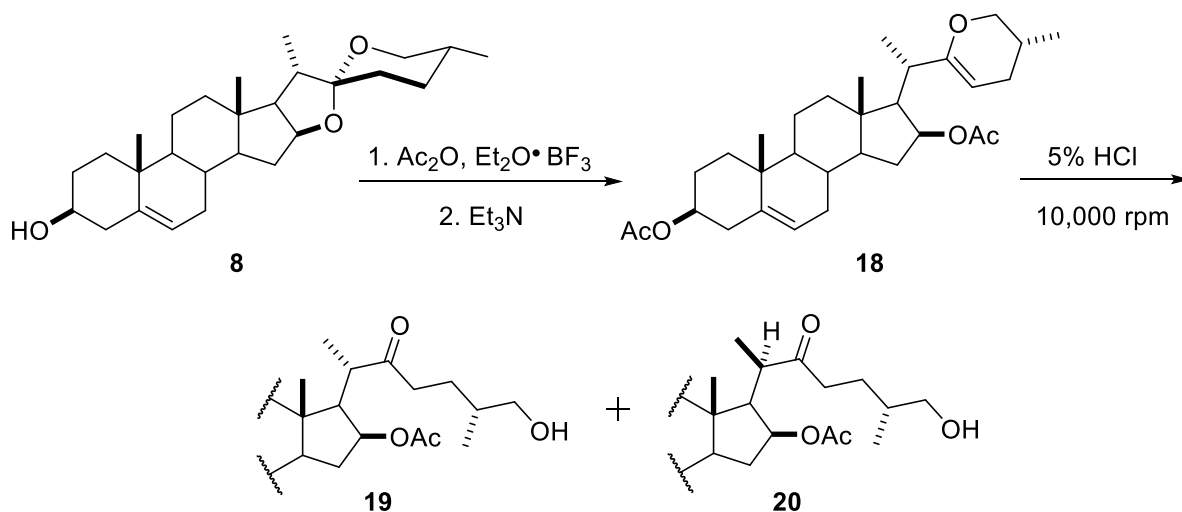
Los experimentos de RMN se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III de 500 MHz equipado con una sonda de gradiente QCI de 5 mm enfriada criogénicamente y utilizando como disolvente cloroformo deuterado conteniendo tetrametilsilano como referencia interna. El manejo de los FIDs se procesó en el software MestReNova con versión 12. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz) y la multiplicidad de las señales de los espectros de ^1H está referida como: s para una señal simple, d para una señal doble, dd para una señal doble de dobles, ddd para una señal doble de doble de dobles, dc para una señal doble de cuartetos y m para una señal múltiple.

Los experimentos de agitación de alto cizallamiento se realizaron con el equipo digital IKA ULTRA-TURRAX® T 18, que consiste en un rotor que gira a alta velocidad dentro de un estator estacionario cortando mecánicamente la mezcla de reacción. Los cálculos de las conformaciones de mínima energía de los compuestos, se evaluaron con el programa Chem3D Ultra 13.0 con el modelo MM₂.

Cada reacción química se monitorea mediante cromatografía en capa fina (CCF) con placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor que contienen indicador de fluorescencia (F254). La detección de los compuestos en las placas se realizó mediante el revelado por inmersión y por calcinación en una disolución reveladora de molibdato. Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas de vidrio las cuales fueron empacadas con gel de sílice grado 60 y utilizando diferentes sistemas de elución. Los reactivos y los disolventes empleados se purificaron y se secaron de acuerdo con las técnicas publicadas en la literatura [18]. Los rendimientos porcentuales de cada reacción química, se obtuvieron a partir de la siguiente relación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{rendimiento real}}{\text{rendimiento teórico}} \times 100\%$$

Síntesis de la mezcla epimérica (20S:20R) de 3,16-diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo



Se disolvió 1 g (2.4 mmol) de diosgenina (**8**) en 7 mL de CH_2Cl_2 y se agregó una disolución de 2.3 mL (24 mmol) de Ac_2O con 3 mL (24 mmol) de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 25 min a 0°C , posteriormente se disminuyó la temperatura de la mezcla de reacción a -20°C y se adiciono gota a gota 6.7 mL (48 mmol) de Et_3N durante 15 min. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con salmuera (2x20 mL), disolución sobresaturada de NaHCO_3 (4x20 mL) y agua destilada (2x20 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se percoló al vacío con sílice y un sistema Hex:AcOEt 98:2. Se obtuvo un sólido color blanco con un rendimiento del 66% que corresponde al producto dihidropiránico (**18**). Se disolvió 0.79 g del compuesto **18** con 5 mL de CH_2Cl_2 y 3.8 mL de una disolución acuosa de HCl al 5%. La mezcla de reacción se agitó a una velocidad de 10,000 rpm durante 9 h, empleando un agitador de alto cizallamiento. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con salmuera (2x20 mL), disolución sobresaturada de NaHCO_3 (4x20 mL) y agua destilada (2x20 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna con un sistema Hex:AcOEt 9:1. La mezcla epimérica **19:20** se obtuvo en un rendimiento del 96% en una relación 60:40, mediante la cuantificación por RMN de las señales de ^1H de las posiciones 16 y 26 de cada uno de los compuestos.

- 3,16-diacetato de (20*S*,25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (**19**)

RMN ¹H (500 MHz, δ): 5.35 (1H, *d*, $J_{6,7ec} = 4.8$, H-6), 4.96 (1H, *m*, H-16), 4.58 (1H, *m*, H-3), 3.41 (2H, *d*, $J_{26,25} = 5.8$, H-26), 2.94 (1H, *dq*, $J_{20,17} = 14.0$, $J_{20,21} = 7.1$, H-20), 2.62 (1H, *m*, H-23_a), 2.39 (1H, *m*, H-15_a), 2.35 (1H, *m*, H-23_b), 2.30 (2H, *m*, H-4_{ec} y H-4_{ax}), 2.02 (3H, *s*, CH₃CO₂-3), 1.95 (3H, *s*, CH₃CO₂-16), 1.13 (3H, *d*, $J_{21,20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 1.01 (3H, *s*, CH₃-18), 0.90 (3H, *d*, $J_{27,25} = 6.7$, CH₃-27), 0.85 (3H, *s*, CH₃-19).

RMN ¹³C (125 MHz, δ): 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 (CH₃CO₂-3), 170.5 (CH₃CO₂-16), 21.4 (CH₃CO₂-3), 21.1 (CH₃CO₂-16).

- 3,16-diacetato de (20*R*,25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (**20**).

RMN ¹H (500 MHz, δ): 5.33 (1H, *d*, $J_{6,7ec} = 4.8$, H-6), 5.15 (1H, *m*, H-16), 4.56 (1H, *m*, H-3), 3.44 (2H, *d*, $J_{26,25} = 6.0$, H-26), 2.87 (1H, *dq*, $J_{20,17} = 11.3$, $J_{20,21} = 6.7$, H-20), 2.67 (1H, *m*, H-23_a), 2.49 (1H, *m*, H-15_a), 2.42 (1H, *m*, H-23_b), 2.29 (2H, *m*, H-4_{ec} y H-4_{ax}), 2.02 (3H, *s*, CH₃CO₂-3), 2.00 (3H, *s*, CH₃CO₂-16), 0.99 (3H, *d*, CH₃-21), 0.97 (3H, *s*, CH₃-18), 0.90 (3H, *d*, $J_{27,25} = 6.4$, CH₃-27), 0.87 (3H, *s*, CH₃-19).

RMN ¹³C (125 MHz, δ): 36.8 (C-1), 27.7 (C-2), 75.2 (C-3), 38.0 (C-4), 139.6 (C-5), 122.1 (C-6), 31.4 (C-7), 31.3 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.5 (C-11), 39.2 (C-12), 42.0 (C-13), 54.2 (C-14), 35.0 (C-15), 73.8 (C-16), 56.2 (C-17), 19.2 (C-18), 13.3 (C-19), 42.8 (C-20), 16.5 (C-21), 214.6 (C-22), 38.5 (C-23), 26.2 (C-24), 35.2 (C-25), 67.6 (C-26), 16.7 (C-27), 170.5 (CH₃CO₂-3 y CH₃CO₂-16), 21.4 (CH₃CO₂-3), 21.2 (CH₃CO₂-16).

Resultados y discusión

Actualmente, es de suma importancia aplicar nuevas estrategias biotecnológicas que permitan aumentar la productividad, la calidad y el valor nutricional de los productos agrícolas, debido a la alta demanda alimentaria que hay a nivel mundial. Una de las limitantes de usar brasinoesteroides es su alto costo, por mencionar un ejemplo de ello, 10 mg de brasinólida tiene un costo en el mercado de \$7521.00 [19].

Por esta razón, la adquisición de moléculas que mimeticen la actividad de los brasinoesteroides con el empleo de metodologías novedosas es de gran relevancia, por lo que el uso de agitadores de alto cizallamiento permitirá la obtención de tales moléculas en cortas etapas de reacción, minimizando así tiempo y costos.

Como se comentó anteriormente, la síntesis de epímeros en C-20 de la molécula 3,16-diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo, son de gran interés ya que han sido evaluados biológicamente y han presentado actividad como promotores de crecimiento vegetal, en especial el compuesto **20** (Figura 7).

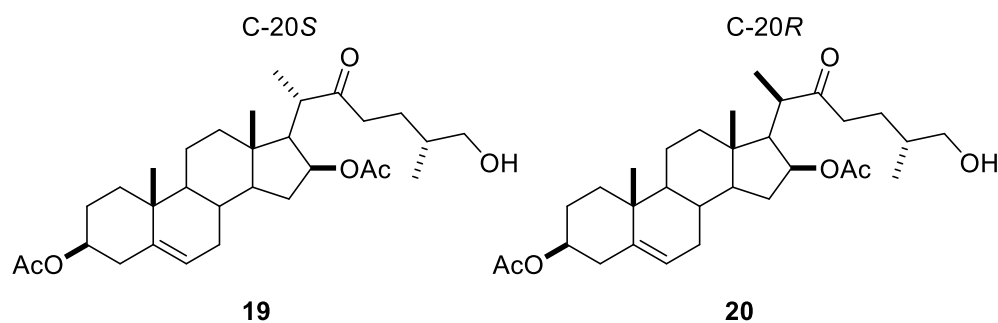
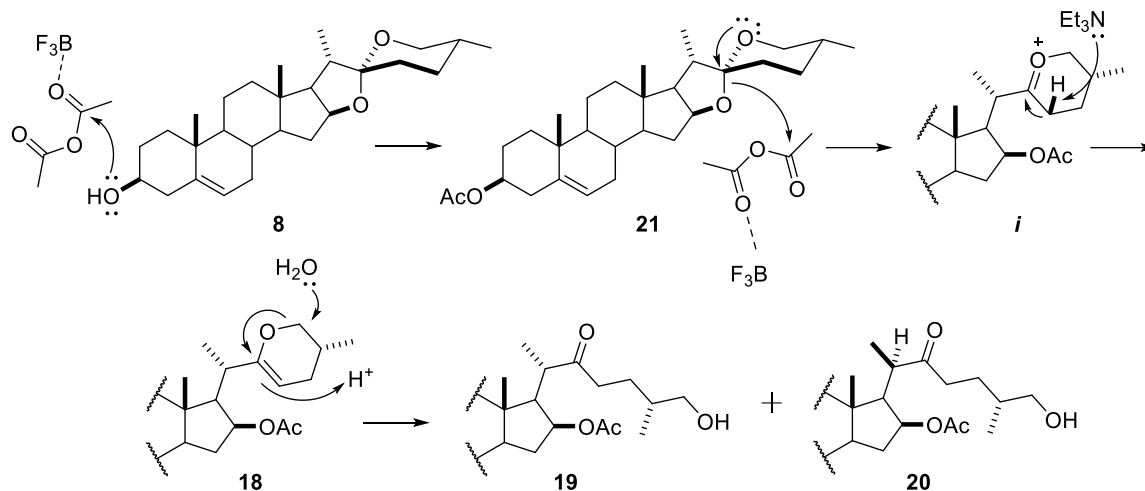


Figura 7. Derivados esteroidales de estructuras 22-oxocolestánicas con actividad mimetizadora de brasinoesteroides.

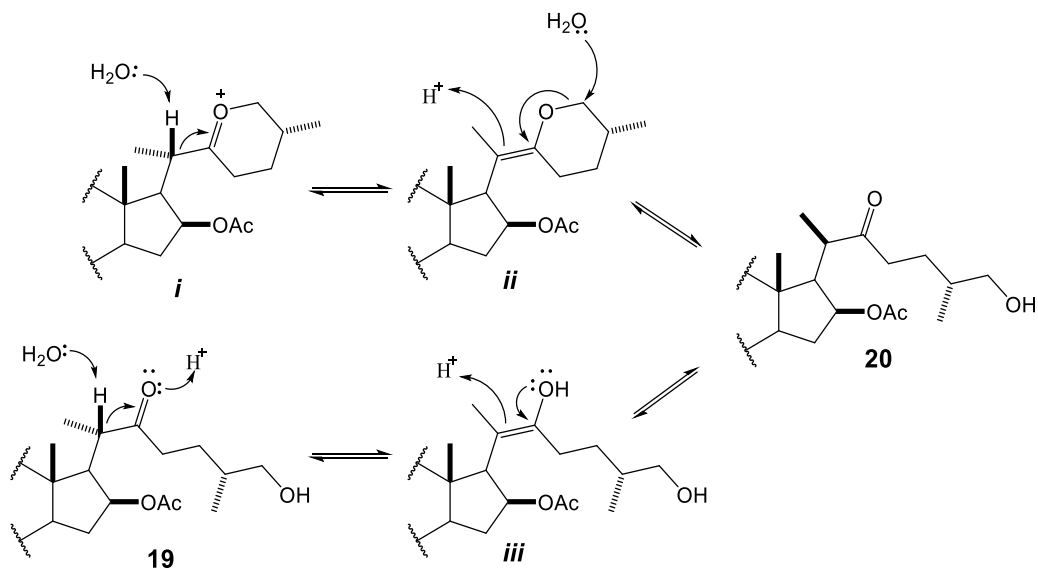
La síntesis de los compuestos **19** y **20** se ha obtenido a partir de la apertura regioselectiva de los anillos E y F del acetato de diosgenina (**21**) a partir del ataque nucleofílico del oxígeno del C-16 sobre el anhídrido acético de la cual fue previamente activado su carbonilo con un ácido de Lewis. De esta manera se obtiene un intermediario de ión oxonio de una estructura tetrahidropiránica (*i*) y mediante el empleo de una base voluminosa como lo es la Et₃N, extrae el protón axial del C-23 para dar lugar a una estructura dihidropiránica (**18**) y finalmente existe

un ataque nucleofílico de una molécula de H₂O sobre el C-26 y una adición de protón en el C-23, dando así, como producto las estructuras 26-hidroxi-22-oxocolestánicas (**Esquema 3**).



Esquema 3. Mecanismo de reacción para la formación de estructuras 22-oxocolestánicas.

Cabe mencionar que la descripción del mecanismo de reacción previamente descrito, se ajusta mejor para la obtención del compuesto **19**, mientras que en el **Esquema 4**, se representan los dos posibles mecanismos de reacción para el compuesto **20**.



Esquema 4. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto **20**.

Uno de ellos puede ser a partir de la estructura *i* y la desprotonación del C-20, para posteriormente formar una estructura oxánica con doble enlace exocíclico (*ii*) y finalmente una molécula de H₂O ataca sobre el C-26. El otro intermediario que da origen al epímero es a partir del compuesto **19**, la cual el oxígeno del carbonilo se protona para que se presente la tautomería ceto-enol (*iii*) y finalmente se lleve la epimerización C-20*S* a C-20*R* (**Esquema 4**).

El estado de transición clave para la formación del epímero C-20*R*, es a partir del tautómero enol y/o enolato que forma parte del oxano. El C-20 es trigonal en el estado de transición por lo que presenta 2 caras enantiotópicas, *re* y *si*; por lo que la adición de un H⁺ en el C-20 en el transcurso de la formación del tautómero ceto dará como producto la mezcla enantiomérica (**Figura 8**).

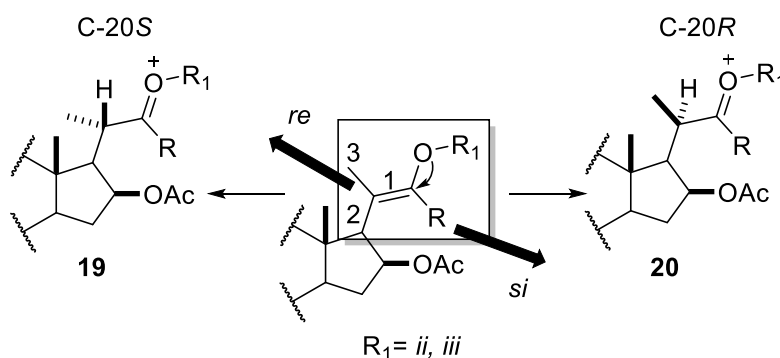


Figura 8. Estado de transición necesario para la formación de la mezcla enantiomérica en el C-20.

Los factores estéricos y electrónicos de los estados de transición de menor energía, son de gran relevancia para comprender la obtención preferente de dichos enantiómeros. Empleando el cálculo de minimización de energía (MM₂), la cual se obtiene la energía estérica total que suma las energías de estiramiento y torsión de enlace, interacciones 1-4 van der Waals y geometría y vibración molecular. Se observa que el estado de transición de la forma tautomérica enólica de cadena abierta (*iii*) es el de menor energía y no la forma oxánica (*ii*), eso mismo explica de manera experimental la conversión de manera gradual del epímero C-20*S* a C-20*R* ya que requiere menos estados de transición y presenta mayor entropía la forma colestánica.

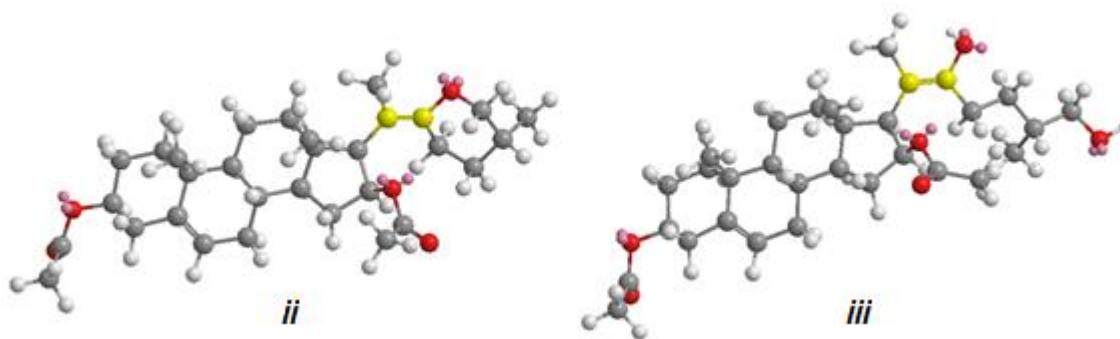


Figura 9. Conformación de mínima energía de la molécula **ii** (30.7 kcal/mol) y **iii** (28.9 kcal/mol).

En la **Figura 9**, se presenta la molécula colestánica con el tautómero *E*-enol (**iii**) la cual es la geometría de mayor energía con respecto al tautómero *Z*-enol que tiene una energía de 21.3346 kcal/mol, en la **Figura 10**, se observa el intermediario *Z*-enol-colestánico que evidencia la adición preferente de H^+ en la cara *Re* del doble enlace ya que los oxígenos del grupo acetilo forman puentes de hidrogeno y ejercen un efecto auxiliar en la adición de dichos H^+ por arriba del plano sobre el C-20. Esto podría explicar que el factor electrónico predomina más que el factor estérico en la obtención enantioespecífica del compuesto **19** en condiciones normales.

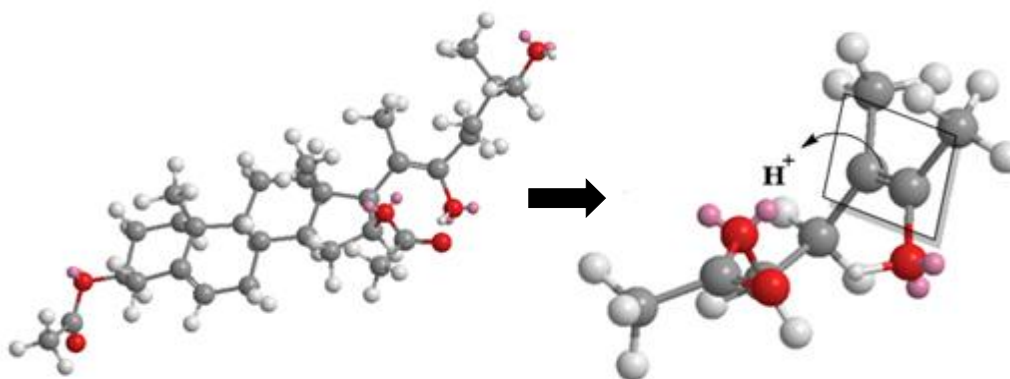


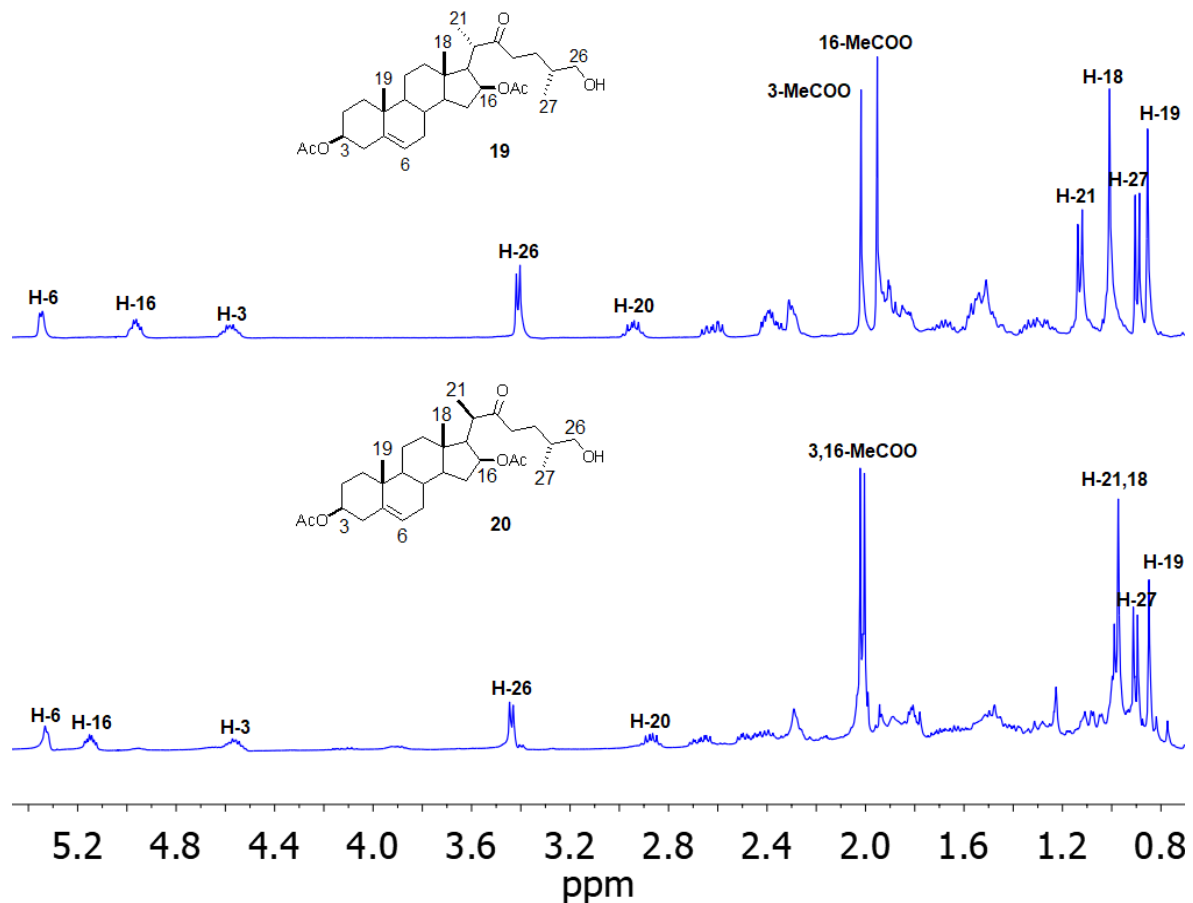
Figura 10. Adición regio- y estereoselectiva de H^+ en C-20 del tautómero *Z*-enol-colestánico.

Los compuestos **19** y **20**, han sido aislados y caracterizados por separado, las cuales presentan el mismo número de señales pero con desplazamientos ligeramente diferentes (**Tabla 2**) [14]. En el **Espectro 1** de 1H del compuesto **19**, se observa la señal del protón vinílico del C-6 como una señal *dd* en 5.36 ppm, de igual manera se observan 2 señales *m* en 4.9 ppm y 4.6 ppm que corresponde a H-16 y H-3, respectivamente. La señal de los 2 protones H-26 se

presenta como un doblete con constante de acoplamiento $J_{25,26} = 5.8$ Hz; en principio debería observarse un doble de dobletes porque son protones diastereotópicos, pero los δ y J son muy similares. Los protones de los metilos que pertenecen a los grupos acetatos en las posiciones de C-3 y C-16 se observan como señales *s* en 2.0 y 1.9 ppm, respectivamente, mientras que los metilos 21 y 27 se observan como señales *d* en 1.14 y 0.92 ppm, ya que están unidos a un grupo metino cada uno de ellos. En 1.02 y 0.86 ppm se observan 2 señales *s* que corresponden a los metilos 19 y 18, respectivamente. En 2.94 ppm se observa una señal doble de cuádruples, con constantes de acoplamiento $J_{20,21}=7.1$ y $J_{20,17}= 14.0$ que pertenece al protón H-20 la cual se desplaza a frecuencias altas, debido a que dicho protón corresponde a un carbono α del carbonilo de la posición 22 y a su vez se encuentra dentro del cono de desapantallamiento del campo electromagnético que ejerce el mencionado grupo funcional. Así mismo, los protones H-21 aparecen como una señal *d* con una constante de acoplamiento $J_{20,21}=7.1$, la cual se desplaza a mayores frecuencias, debido a que corresponden al carbono β con respecto al carbonilo.

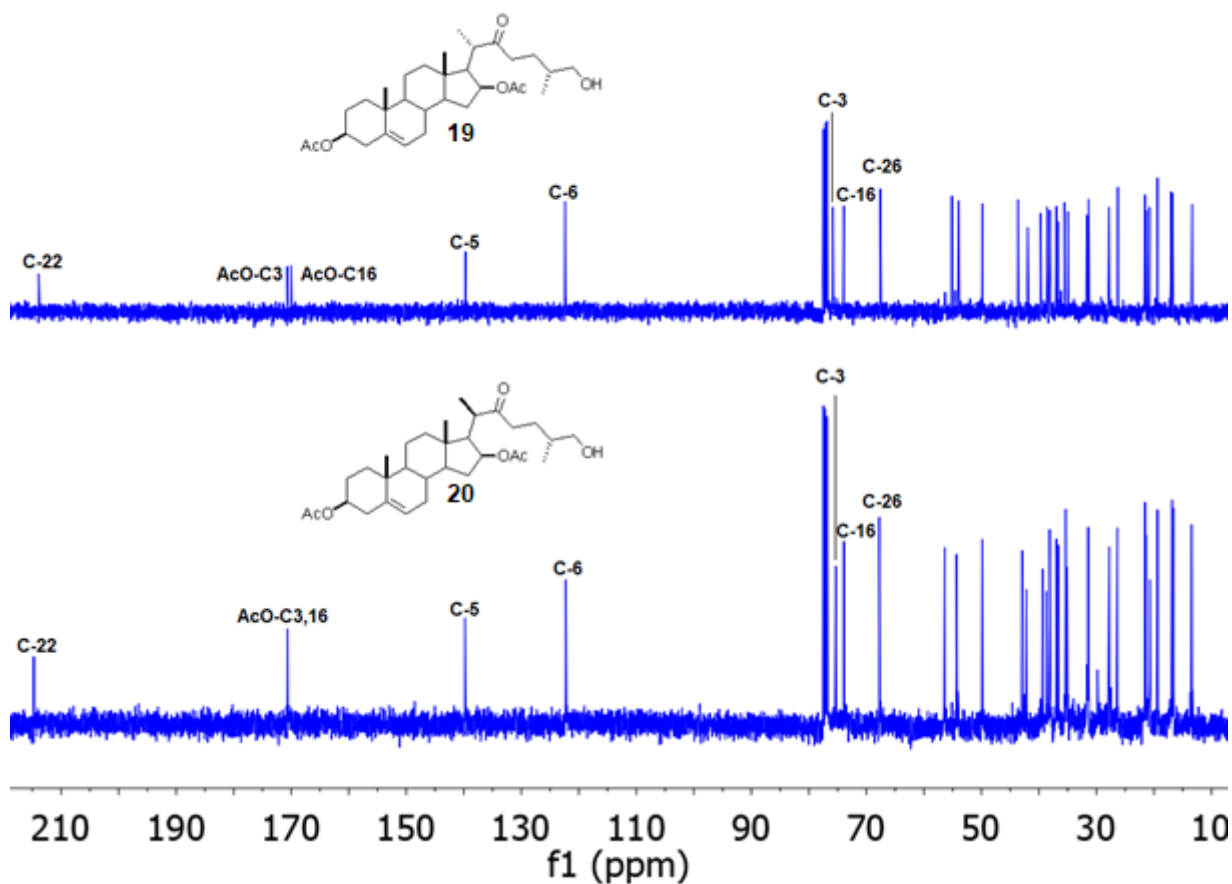
Tabla 2. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de ambos epímeros de C-20.

Señal de ^1H	(19) δ ppm	(20) δ ppm	Señal de ^{13}C	(19) δ ppm	(20) δ ppm
3	4.58	4.56	3	75.7	75.2
6	5.35	5.33	6	122.2	122.1
16	4.96	5.15	16	73.8	73.08
18	1.01	0.97	18	19.3	19.2
19	0.85	0.87	19	13.2	13.3
20	2.94	2.87	20	43.5	42.8
21	1.13	0.99	21	16.8	16.5
22	-	-	22	213.7	214.6
23	2.62, 2.35	2.42, 2.42	23	38.5	38.5
26	3.41	3.44	26	67.4	67.6
27	0.90	0.90	27	16.6	16.7
MeCO₂-3	2.01	2.02	MeCO₂-3	169.9	170.5
MeCO₂-16	1.95	2.00	MeCO₂-16	170.5	170.5



Espectro 1. RMN de ¹H a 500 MHz de ambos epímeros de C-20 en CDCl₃.

En el **Espectro 2** de ¹³C de ambos compuestos **19** y **20**, se observan desplazamientos mínimamente diferentes entre sí, por mencionar algunas señales importantes, se encuentran 3 señales a frecuencias altas correspondientes de carbonilos; en ≈170 ppm se observan 2 señales pertenecientes de acetilos y en ≈214 ppm de una cetona en C-22, la cual confirma su oxidación mediante la apertura del anillo E. En el rango de 115-135 ppm se encuentran los 2 carbonos vinílicos y en el rango de 73-76 ppm se confirmó la acetilación de los hidroxilos de C-3 y C-16, desplazando así a dichos carbonos debido al efecto que ejercen tales grupos funcionales. La señal más representativa de la diosgenina es la de 110 ppm que es característica del estirostano, en la **Figura 12** no se observa dicha señal, la cual confirma la apertura del anillo E y F para dar lugar a una molécula colestánica.



Espectro 2. RMN de ¹³C a 125 MHz de ambos epímeros de C-20 en CDCl₃.

Con la finalidad de incrementar la síntesis del compuesto (20*R*) **20**, se procedió a emplear la formación de emulsiones promovidas por mezcladores de alto cizallamiento, las cuales han sido reportados como un método novedoso y viable en la producción de biodiesel y en algunas reacciones químicas de rutina, debido a la formación de nanogotas que minimizan el volumen del sistema de reacción aumentando así el número de colisiones (incremento de la entropía (ΔS)) por lo que se disminuye la energía de activación (ΔG^\ddagger) de las reacciones químicas [20] [21], esto permite llegar en un menor tiempo a un sistema en equilibrio.

En la síntesis de la mezcla epimérica **19:20**, se estudiaron diferentes tiempos de reacción y concentraciones de HCl_{aq} a temperatura y presión ambiente. En la **Tabla 3**, se muestran dichos resultados, los cuales fueron obtenidos a partir de la cuantificación por RMN de ¹H mediante la relación que presentan las señales de ambos epímeros en los protones H-16 y H-26 (**Espectro 3**

y 4). En los experimentos **1** y **5**, se observa que la agitación convencional y el porcentaje de HCl_{aq} no tienen ningún impacto positivo en la obtención del epímero **20**. En el experimento **6**, se observa incremento considerable, pero con un rendimiento de la mezcla epimérica muy baja en comparación con los demás experimentos, esto debido a la formación de otros productos observados por CCF.

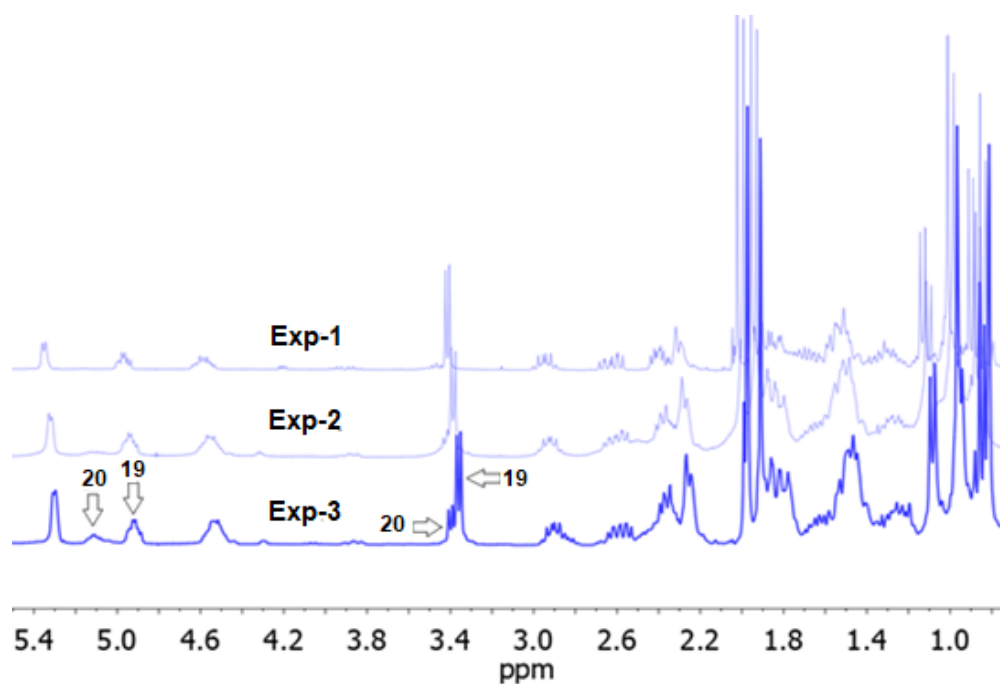
En los experimentos **2-4**, se observa que la relación **19:20** se van igualando de manera gradual a 10,000 rpm haciendo al experimento **4** como la mayor relación obtenida ya que en tiempos mayores de 9 horas, no se observa ningún incremento en la relación epimérica y sí la formación de otros compuestos que no fueron identificados.

Tabla 3. Resultados de diferentes experimentos de la relación obtenida de 20S:20R.

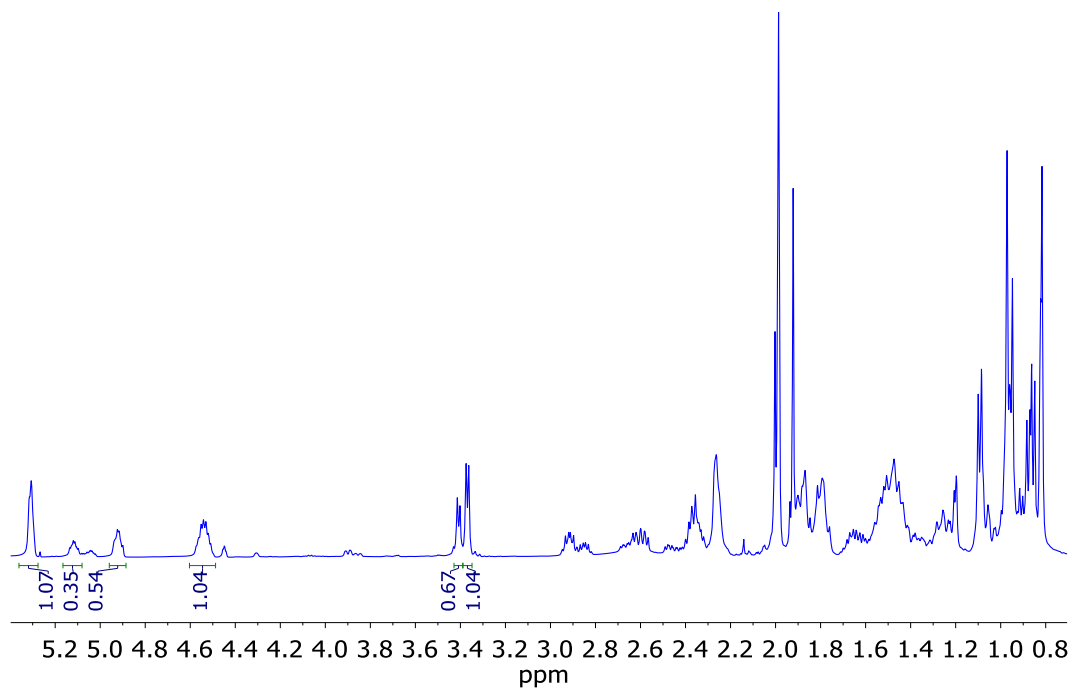
Exp	Velocidad de agitación (rpm)	% HCl_{aq}	Tiempo (h)	Rendimiento de mezcla (%)	(19:20)
1	300	5	18	97	95:5
2	10,000	5	3	96	85:15
3	10,000	5	6	"	72:28
4	10,000	5	9	"	60:40
5	300	15	18	95	97:3
6	10,000	15	3	72	70:30

Para explicar dichos resultados experimentales, se optó por evaluar las conformaciones de mínima energía de ambos epímeros, mediante cálculos teóricos computacionales (ChemBioDraw Ultra 13.0). La conformación de mínima energía del compuesto **20** es de 28.1 kcal/mol, mientras que la del compuesto **19** es 23.9 kcal/mol, esta diferencia energética se puede atribuir a la tensión estérica entre CH_3 -18 y CH_3 -21 en el compuesto **20**; dicho esto, la entalpía de formación (ΔH°) del compuesto **19** no debe ser diferente, con respecto a la del compuesto **20** dado que ΔH se valora a partir de los enlaces que se rompen y forman en una reacción; por tanto la valoración de la energía de formación del producto depende del cambio de la entropía. En la **Figura 11**, se representa un diagrama energético hipotético con base a los cálculos teóricos y resultados experimentales en la conversión del compuesto **19** a **20**, ya que la expresión

matemática de $\Delta G^\ddagger = \Delta H - t\Delta S$, solamente se ve afectado por ΔS ya que la temperatura (t) y entalpia (ΔH) se mantuvieron constantes bajo las condiciones del experimento 4. Cabe destacar que estos cálculos teóricos no sustituyen experimentos calorimétricos para la determinación de ΔH y ΔG , pero en primera instancia pueden llegar a suponer resultados obtenidos en la síntesis de compuestos.



Espectro 3. RMN de ¹H a 300 MHz de la mezcla de los compuestos **19** y **20** en CDCl₃ en diferentes experimentos.



Espectro 4. RMN de ^1H a 500 MHz de la mezcla de los compuestos **19** y **20** en CDCl_3 en el experimento 4.

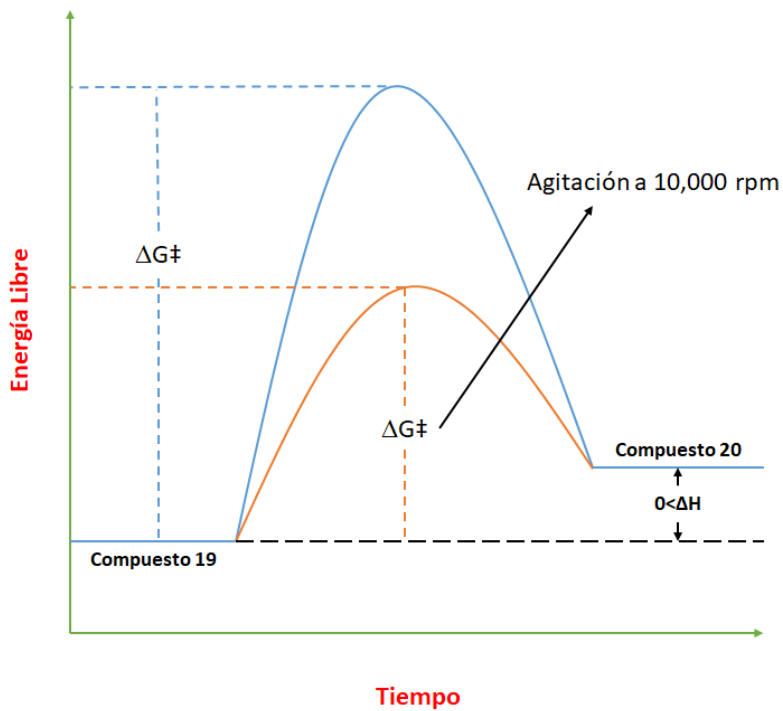


Figura 11. Diagrama hipotético en la conversión del compuesto **19** al compuesto **20**.

Conclusiones

- Se incrementó el rendimiento en la síntesis del compuesto 3,16-diacetato de (20*R*,25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (**20**) a un 38.4 % con respecto a lo reportado en la tesis de maestría del año 2014 [14].
- Se propone un mecanismo de reacción para explicar la síntesis del compuesto **20** con base en cálculos teóricos computacionales (ChemBioDraw Ultra 13.0) y datos experimentales.
- El uso de agitadores de alto cizallamiento optimizó la síntesis del compuesto **20** a temperatura y presión ambiente, reduciendo tiempo y costos. El equilibrio se incrementa hasta que en un tiempo de 4 horas se obtiene una relación **19:20** de **60:40**.
- Se calculó el rendimiento del compuesto **20**, mediante la relación epimérica (**19** y **20**) de cada uno de los experimentos por RMN de ^1H .
- Se caracterizó cada uno de los compuestos mediante RMN de ^1H y ^{13}C .

Capítulo II

Síntesis del compuesto acetato de (20*R*,25*R*)-3β-bromo-5,26-dihidroxi-6,22-dioxo-5α-colestan-16β-ilo (**22**) con promisorio actividad antiviral y promotora de crecimiento vegetal.

Antecedentes

Los brasinoesteroides, actualmente están conformados por más de 60 miembros, las cuales se definen químicamente como esteroides oxigenados en C-3 de estructuras (20 β)-5 α -colestán-22 α ,23 α -dioles o sus compuestos derivados aislados de plantas, que llevan sustituyentes alquilo u oxígeno adicionales [22]. Actualmente, se conoce la relación estructura-actividad de los brasinoesteroides, las cuales han proporcionado información para el diseño y síntesis de nuevos análogos sintéticos para su empleo y evaluación a nivel invernadero y campo. Existen investigaciones que reportan que la fracción 5 α -hidroxi-6-oxo (**FA**) de estructuras espirostánicas, presentan mediana actividad promotora de crecimiento vegetal, además de ser fáciles de preparar con materias primas de menor costo y mayor accesibilidad a comparación de la síntesis total de brasinoesteroides [23] [24]. Mientras que la fracción 3 β -bromo-5 α -hidroxi-6-oxo (**FB**) de estructuras estigmastánicas, presenta actividad antiviral frente a diferentes tipos de virus [25]. Así mismo en el capítulo anterior se mencionó la alta actividad promotora de crecimiento vegetal y actividad protectora contra la infección viral del virus del jaspeado de tabaco del compuesto **20** que tiene la configuración C-20R de estructura 22 oxocolestánica (**FC**). Dicho esto, en el presente capítulo se propone la síntesis de la molécula acetato de (20R,25R)-3 β -bromo-5,26-dihidroxi-6,22-dioxo-5 α -colestán-16 β -ilo (**22**), la cual presenta los farmacóforos previamente mencionados (**FA**, **FB** y **FC**) con el objetivo de desarrollar una estructura con alta actividad antiviral y promotora de crecimiento vegetal con respecto a los ya existentes (**Figura 12**). De esta manera, el diseño de fármacos dirigidos simultáneamente a múltiples blancos terapéuticos es llamado polifarmacología, la cual se conoce como el diseño multiobjetivo que consiste en diseñar una “llave maestra molecular” que se una selectivamente a una serie de dianas terapéuticas que produzcan una actividad en particular, en el caso del compuesto **22** es la protección, desarrollo y crecimiento de plantas [26].

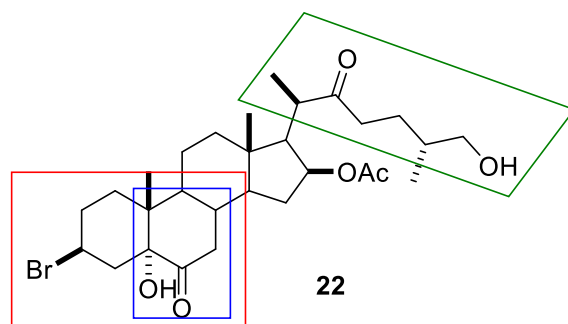
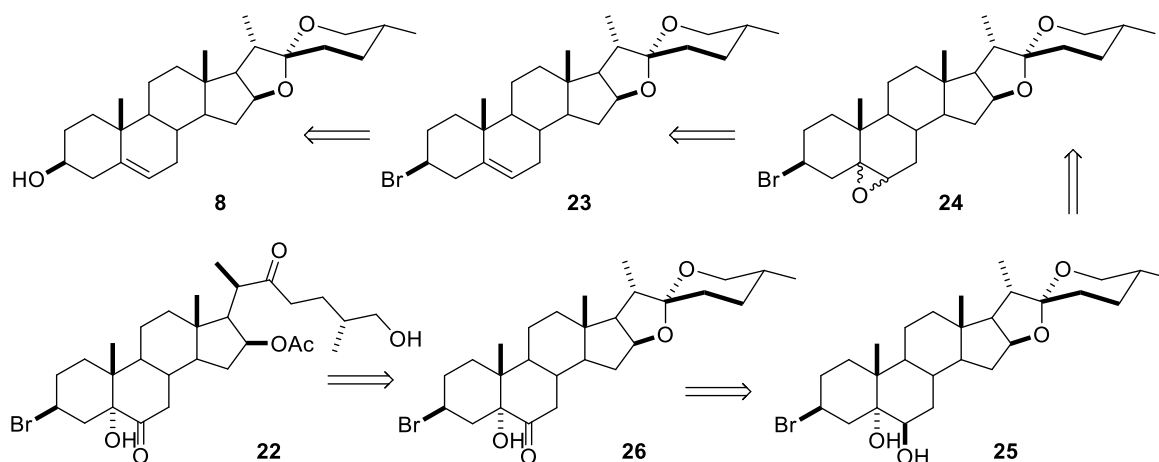


Figura 12. Diseño del compuesto **22** con los farmacóforos **FA** (rojo), **FB** (azul) y **FC** (verde).

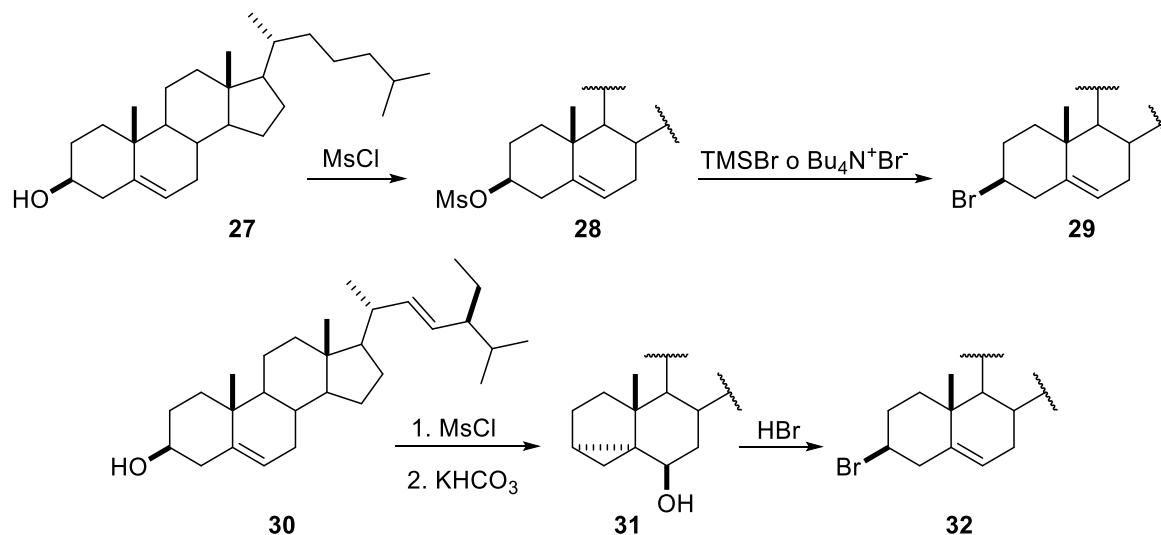
En el **Esquema 5**, se muestra la ruta retrosintética, la cual fue diseñada con base en su quimioselectividad para la obtención de la molécula **22** a partir de la diosgenina (**8**).



Esquema 5. Ruta retrosintética para la obtención del compuesto **22**.

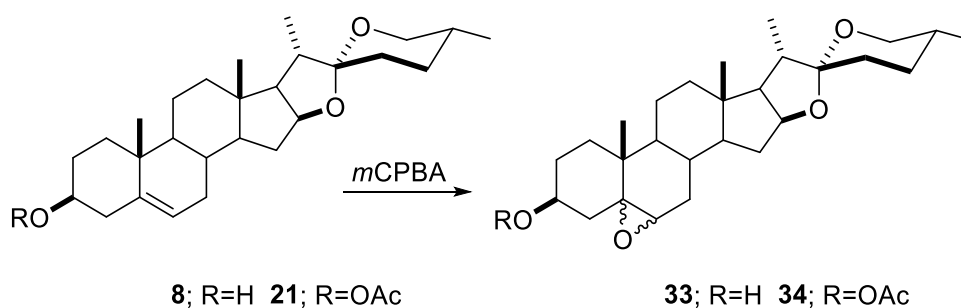
En la literatura se han reportado las mismas modificaciones químicas del **Esquema 5** pero a partir de diferentes materias primas esteroideas. En el caso de la incorporación de bromación en C-3, Qi Sun y colaboradores, reportaron la bromación en C-3 del colesterol (**27**) a partir de la conversión del alcohol a un grupo mesilo (**28**) para posteriormente adicionar bromotrimetilsilano (TMSBr) o bromuro de tetrabutilamonio ($\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Br}^-$), ambas reacciones son catalizadas con BF_3OEt_2 , obteniendo así al compuesto **29** [27]. Por otro lado, Wachsmann y colaboradores proponen la misma bromación a partir del *i*-esteroide del estigmasterol (**31**) con HBr_{aq} [28] (**Esquema 6**). Dentro de nuestro laboratorio, se ha empleado la síntesis del *i*-

esteroide de la diosgenina, metodología más viable para evitar formación de productos no deseados ya que la apertura de los anillos E y F de estrostanos, ocurre en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$.



Esquema 6. Metodologías para la obtención de C-3β-bromo en esteroides.

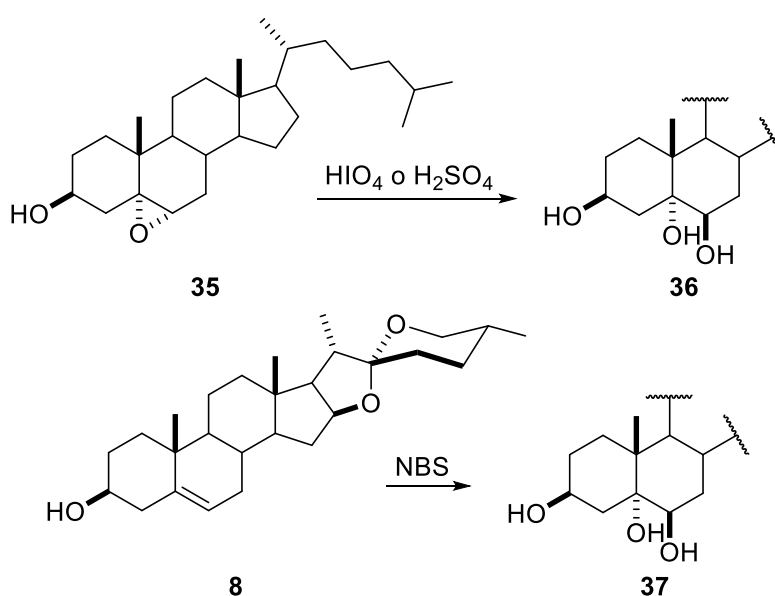
Se ha reportado la epoxidación del doble enlace de la diosgenina (**8**) y del acetato de diosgenina (**21**), a partir del ácido *meta*-cloroperbenzoico (*m*CPBA), dicha metodología es de gran accesibilidad debido a que ocurre a temperatura ambiente en menos de 60 min [29] (**Esquema 7**).



Esquema 7. Metodología para la formación de epóxidos a partir del doble enlace de los compuestos **8** y **21**.

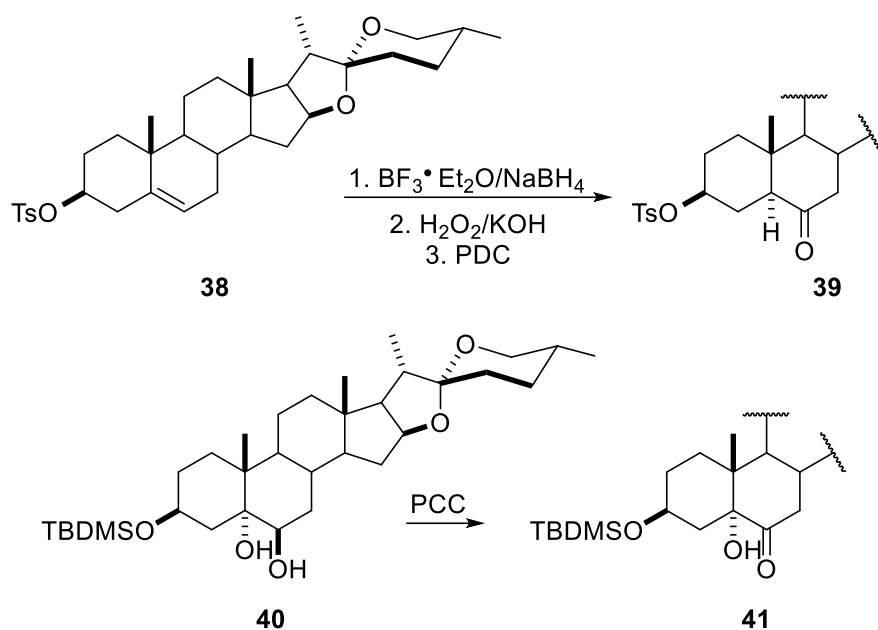
El gran interés de diversos autores en estudiar la apertura de epóxidos para la formación de $5\alpha,6\beta$ -transdioles de estructuras colestánicas y estrostanicas, han sido ampliamente

descritas, un ejemplo de ello es en el año 2013 en donde Chunbao Li y colaboradores a partir del epóxido de colesterol (**35**) y el empleo de arena de politetrafluoroetileno (PTFE) y catalizada con H_2SO_4 , obtuvieron el compuesto 5α -colestano- $3\beta,5,6\beta$ -triol (**36**) [30]. De igual manera, Louis Fieser y colaboradores, obtuvieron el mismo compuesto, utilizando ácido peryódico (HIO_4), ambas investigaciones obtuvieron rendimientos superiores al 90% [31]. Por otro lado en el año 1980, Naturforsch y colaboradores, a partir de una suspensión de diosgenina (**8**) en acetona:agua y tratada con N-bromosuccinimida (NBS) y ac. acético, consiguieron obtener la estructura 5α -espirosta- $3\beta,5,6\beta$ -triol (**37**) [32] (**Esquema 8**).

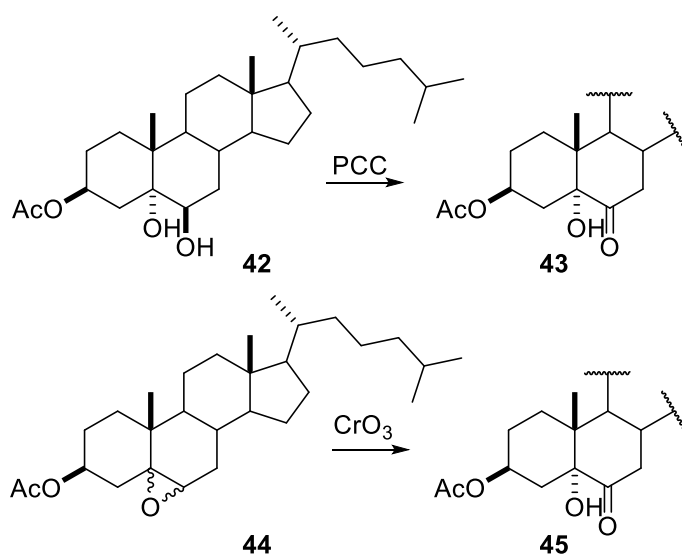


Esquema 8. Metodologías para la obtención de 5,6-transdiolos a partir de esteroides.

Actualmente, la mayoría de oxidaciones del alcohol en C-6 se emplean agentes oxidantes de Cr para la obtención de análogos de brasinoesteroides (**Esquema 9**). Algunos trabajos como el de Sandoval-Ramírez en el año 2017 y Daniel Rivera en 2006, a partir de derivados de diosgenina han oxidado dicho alcohol con dicromato de piridinio (PDC) y clorocromato de piridinio (PCC), respectivamente [13] [33]. Así mismo, Stiver en el año 1987 e Iglesias-Arteaga en el 2012, obtuvieron estructuras 5-hidroxi- 5α -colestano-6-ona a partir de derivados del colesterol, este primero utilizó PCC a partir del $5\alpha,6\beta$ -transdiol (**42**), mientras que el grupo de Iglesias-Arteaga fue a partir del epóxido (**44**) y el uso de CrO_3/H_2O [34] [35] (**Esquema 10**).



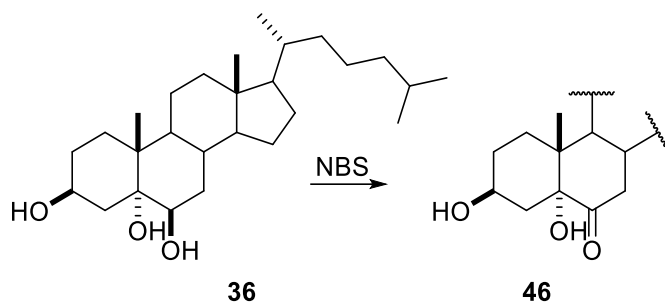
Esquema 9. Metodologías de oxidación del alcohol del C-6 con diferentes derivados de diosgenina.



Esquema 10. Metodologías de oxidación del alcohol del C-6 con diferentes derivados del colesterol.

Sin embargo, en el trabajo de Louis Fieser del año 1949, oxidó de manera selectiva el alcohol de C-6 con NBS a partir del compuesto 5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol con rendimientos del 93% (**Esquema 11**). Cabe mencionar, que el agente oxidante NBS a comparación de los

oxidantes de metales pesados, es más barato y genera residuos que se consideran amigables con el medio ambiente y no presentan riesgos para la salud humana, por lo que lo hace un candidato viable en la oxidación de alcoholes a nivel industrial [36].



Esquema 11. Oxidación selectiva del alcohol en C-6 con NBS.

Finalmente, la apertura selectiva del anillo espiroestánico y la conversión de configuración de C-20 S a C-20 R del compuesto **26**, se implementara la metodología previamente descrita en el capítulo anterior de la apertura selectiva de los anillos E y F del acetato de diosgenina y la respectiva epimerización de C-20 de estructuras 22-oxocolestánicas.

Objetivos

Objetivo general:

- Sintetizar el compuesto acetato de (20*R*,25*R*)-3β-bromo-5,26-dihidroxi-6,22-dioxo-5α-colestan-16β-ilo (**22**) con promisorio actividad promotora de crecimiento vegetal.

Objetivos particulares:

- Caracterizar espectroscópicamente por RMN cada uno de los compuestos obtenidos, mediante experimentos de 1D y 2D.
- Evaluar la actividad promotora de crecimiento vegetal de cada uno de los nuevos compuestos sintetizados sobre plantas *Allium cepa* L. (Capítulo III).

Materiales y métodos

Equipos, software y técnicas utilizadas

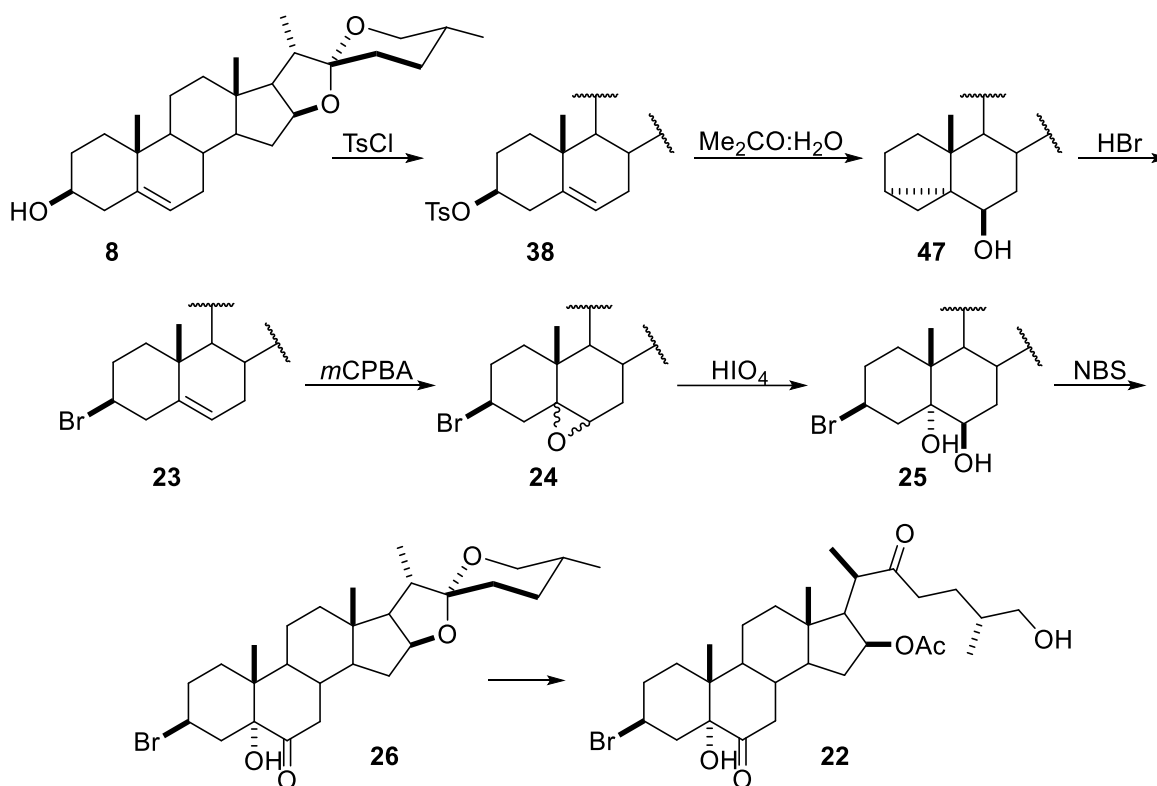
Los experimentos de RMN se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III de 500 MHz equipado con una sonda de gradiente QCI de 5 mm enfriada criogénicamente y utilizando como disolvente cloroformo deuterado conteniendo tetrametilsilano como referencia interna. El manejo de los FIDs se procesó en el software MestReNova con versión 12. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz) y la multiplicidad de las señales de los espectros de ^1H está referida como: s para una señal simple, d para una señal doble, dd para una señal doble de dobles, ddd para una señal doble de doble de dobles, dc para una señal doble de cuartetos y m para una señal múltiple. Los cálculos de las conformaciones de mínima energía de los compuestos, se evaluaron con el programa Chem3D Ultra 13.0 con el modelo MM₂.

Cada reacción química se monitoreo mediante cromatografía en capa fina (CCF) con placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor que contienen indicador de fluorescencia (F₂₅₄). La detección de los compuestos en las placas se realizó mediante el revelado por inmersión y por calcinación en una disolución reveladora de molibdato. Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas de vidrio las cuales fueron empacadas con gel de sílice grado 60 y utilizando diferentes sistemas de elución. Los reactivos y los disolventes empleados se purificaron y se secaron de acuerdo con las técnicas publicadas en la literatura [18]. Los rendimientos porcentuales de cada reacción química, se obtuvieron a partir de la siguiente relación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{rendimiento real}}{\text{rendimiento teórico}} \times 100\%$$

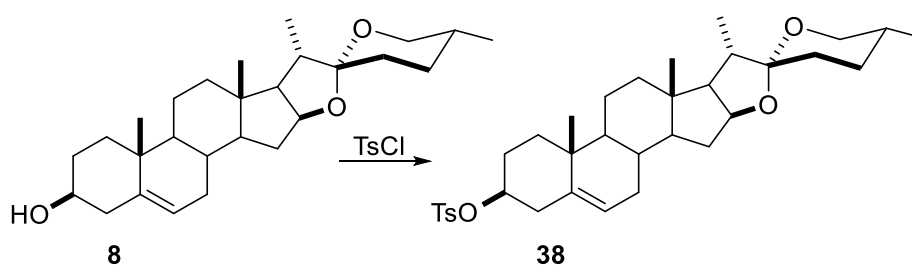
En el **Esquema 12**, se muestra la ruta sintética para la obtención del compuesto **22**, cabe señalar que los compuestos **22**, **23**, **24**, **25** y **26** no han sido reportados por la comunidad científica ya que no se encuentran en los resultados de búsqueda de estructuras químicas en la

página de SciFinder [38]. Así mismo, dichos compuestos serán evaluados en actividad promotora de crecimiento vegetal



Esquema 12. Ruta sintética para obtener el compuesto 22.

- **Tosilato de diosgenina (38)**



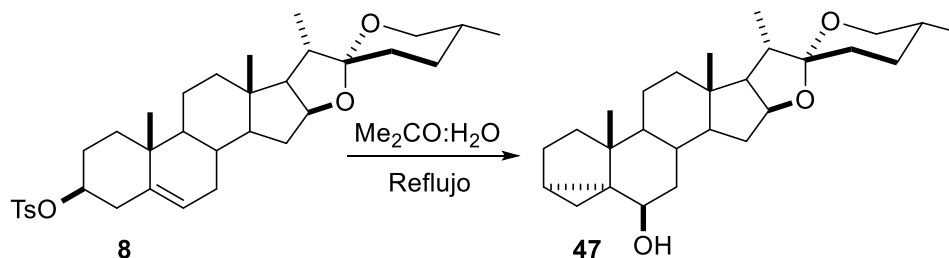
Se disolvieron 1 g (2.4 mmol) de diosgenina (**8**) en una mezcla de 10 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_3\text{N}$ 1:1 y se agregaron 2 g (10.8 mmol) de TsCl . Se mantuvo 6 h en agitación constante a temperatura

ambiente, la mezcla de disolvente fue evaporada a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con una disolución sobresaturada de NaHCO_3 hasta pH neutro y agua destilada (2x20 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se percoló al vacío con sílice y un sistema Hex:AcOEt 99:1. Se obtuvo un polvo blanco con un rendimiento del 91 % que corresponde al compuesto **38**.

RMN ^1H (500 MHz, δ): 7.81 (2H, *d*, $J_{m,o}$ =8.32 Hz, *mH*-Ar-3), 7.35 (2H, *d*, $J_{o,m}$ =8.32 Hz, *mH*-Ar-3), 5.31 (1H, *m*, H-6), 4.41 (1H, *m*, H-16), 4.32 (1H, *dddd*, $J_{3,2ax}=J_{3,4ax}=11.5$ Hz, $J_{3,2ec}=J_{3,4ec}=4.74$ Hz, H-3), 3.49 (1H, *dd*, $J_{26ec-26ax}=10.9$ Hz, $J_{26ec,25}=5.6$ Hz, H-26ec), 3.38 (1H, *dd*, $J_{26ax,26ec}=10.9$ Hz, $J_{26ax,25}=6.5$ Hz, H-26ax), 2.49 (3H, *s*, *p*CH₃Ar-3), 2.43 (1H, *m*, H-4ax), 2.29 (1H, *ddd*, $J_{gem}=13.76$ Hz, $J_{4ec,3}=4.74$ Hz, $J_{4ec,2ec}=2.1$ Hz, H-4ec), 1.08 (3H, *d*, $J_{21,20}=7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, *d*, $J_{27,25}=6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, *s*, CH₃-18), 0.82 (3H, *s*, CH₃-19).

RMN ^{13}C (125 MHz, δ): 144.1 (*p*Ar-3), 134.6 (*i*Ar-3), 129.8 (*o*Ar-3), 127.6 (*m*Ar-3), 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 80.7 (C-3), 42.2 (C-4), 138.8 (C-5), 123.3 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 82.0 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.14 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

- **(25*R*)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6 β -ol (47)**



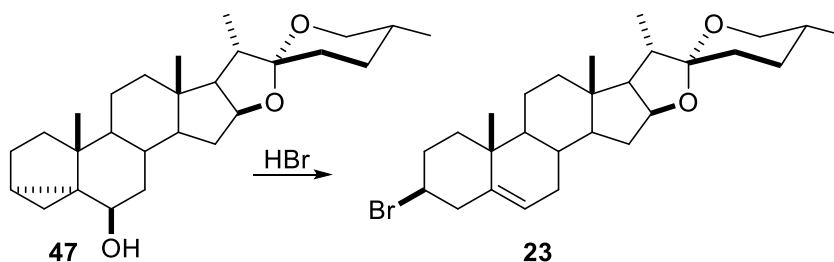
Se disolvieron 1.24 g (2.18 mmol) del compuesto **38** en 15 mL de acetona:agua 8:2 y se agregaron 546 mg (6.5 mmol) de NaHCO_3 . Se mantuvo 2 h en agitación constante a reflujo, la mezcla de disolvente se evaporó a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 (2x20 mL) se lavó con una disolución de 5% HCl_{aq} hasta pH neutro y agua destilada (2x20 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por

cromatografía de columna con un sistema de Hex:AcOEt 9:1. Se obtuvo un polvo blanco con un rendimiento del 85% que corresponde al compuesto **47**.

RMN ¹H (500 MHz, δ): 4.33 (1H, *m*, H-16), 3.41 (1H, *dd*, $J_{26ec,26ax}=10.9$ Hz, $J_{26ec,25} = 5.6$ Hz, H-26ec), 3.32 (1H, *dd*, $J_{26ax,26ec} = 10.9$ Hz, $J_{26ax,25} = 6.5$ Hz, H-26ax), 3.20 (1H, *t*, $J_{6,7}=2.91$ Hz, H-6), 1.95 (1H, *m*, H-4ec), 1.08 (3H, *d*, $J_{21,20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, *d*, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, *s*, CH₃-18), 0.82 (3H, *s*, CH₃-19), 0.73 (1H, *dd*, $J_{4ax,4ec} = J_{4ax,3} = 4.8$, H-4ax).

RMN ¹³C (125 MHz, δ): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 45.8 (C-3), 42.2 (C-4), 42.5 (C-5), 74.0 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 81.5 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.5 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

• **(25R)-3β-bromo-espirostan-5-eno (23)**

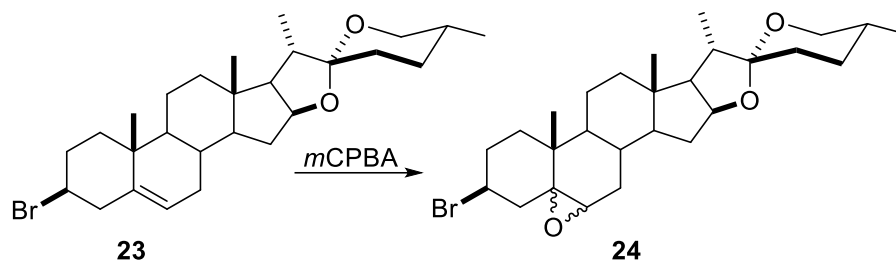


Se disolvieron 769 mg (1.85 mmol) del compuesto **47** en 7 mL de ciclohexano y se adicionaron 10 mL de 47% HBr_{aq}. Se mantuvo 9 h en agitación constante a temperatura ambiente, la mezcla se evaporó a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3x20 mL) se lavó con una disolución sobresaturada de NaHCO₃ hasta pH neutro, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía de columna con un sistema de Hex:AcOEt 85:15. Se obtuvo un sólido cristalino con un rendimiento del 87% que corresponde al compuesto **23**.

RMN ¹H (500 MHz, δ): 5.36 (1H, *m*, H-6), 4.41 (1H, *m*, H-16), 3.91 (1H, *dddd*, $J_{3,2ax}=J_{3,4ax}=12.2$ Hz, $J_{3,2ec} = J_{3,4ec} = 4.4$ Hz, H-3), 3.47 (1H, *dd*, $J_{26ec-26ax}=10.9$ Hz, $J_{26ec,25} = 4.4$ Hz, H-26ec), 3.37 (1H, *dd*, $J_{26ax,26ec} = 10.9$ Hz, $J_{26ax,25} = 2.1$ Hz, H-26ax), 2.74 (1H, *m*, H-4ax), 2.58 (1H, *ddd*, $J_{gem} = 13.5$ Hz, $J_{4ec,3} = 4.7$ Hz, $J_{4ec,2ec} = 2.3$ Hz, H-4ec), 0.97 (3H, *d*, $J_{21,20} = 0.97$ Hz, CH₃-21), 0.78 (3H, *d*, $J_{27,25} = 5.94$ Hz, CH₃-27), 1.28 (3H, *s*, CH₃-18), 1.05 (3H, *s*, CH₃-19).

RMN ¹³C (125 MHz, δ): 37.0 (C-1), 31.4 (C-2), 52.5 (C-3), 44.37 (C-4), 141.6 (C-5), 122.2 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.2 (C-9), 34.4 (C-10), 20.7 (C-11), 39.8 (C-12), 40.3 (C-13), 56.5 (C-14), 31.9 (C-15), 80.9 (C-16), 62.1 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.7 (C-20), 14.6 (C-21), 109.4 (C-22), 31.3 (C-23), 29.0 (C-24), 30.3 (C-25), 67.1 (C-26), 17.3 (C-27).

- **(25*R*)-3β-bromo-5,6α-epoxi-5α-espiroetano (24)**

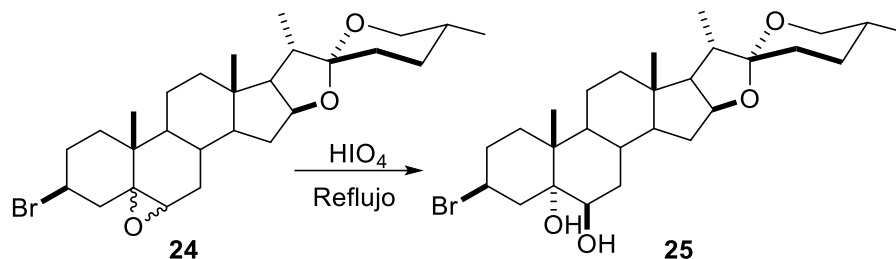


Se disolvieron 771 mg (1.61 mmol) del compuesto **23** en 5 mL de CH₂Cl₂ y se adicionaron 416 mg (2.41 mmol) de *m*CPBA. Se mantuvo en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3x20 mL) se lavó con una disolución sobresaturada de NaHCO₃ hasta pH neutro, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía de columna con un sistema de Hex:AcOEt 85:15. Se obtuvo un sólido cristalino con un rendimiento del 97% que corresponde al compuesto **24**.

RMN ¹H (500 MHz, δ): 2.91 (1H, *d*, $J_{6-7}=4.4$ Hz, H-6), 4.37 (1H, *m*, H-16), 4.21 (1H, *dddd*, $J_{3,2ax}=J_{3,4ax}=12.3$ Hz, $J_{3,2ec}=J_{3,4ec}=4.6$ Hz, H-3), 3.45 (1H, *dd*, $J_{26ec-26ax}=10.8$ Hz, $J_{26e,25}=4.3$ Hz, H-26ec), 3.34 (1H, *dd*, H-26ax), 2.54 (1H, *m*, H-4ax), 2.24 (1H, *m*, H-7ec), 0.94 (3H, *d*, $J_{21,20}=7.0$ Hz, CH₃-21), 0.77 (3H, *d*, $J_{27,25}=6.3$ Hz, CH₃-27), 1.1 (3H, *s*, CH₃-18), 0.7(3H, *s*, CH₃-19).

RMN ¹³C (125 MHz, δ): 35.0 (C-1), 31.5 (C-2), 48.5 (C-3), 42.4 (C-4), 66.6 (C-5), 59.4 (C-6), 33.8 (C-7), 31.7 (C-8), 39.4 (C-9), 33.8 (C-10), 20.4 (C-11), 31.7 (C-12), 35.4 (C-13), 56.7 (C-14), 33.8 (C-15), 80.7 (C-16), 62.0 (C-17), 16.0 (C-18), 17.3 (C-19), 41.7 (C-20), 14.6 (C-21), 109.3 (C-22), 30.4 (C-23), 28.9 (C-24), 29.0 (C-25), 67.0 (C-26), 16.4 (C-27).

- **(25R)-3β-bromo-5α-espiroetano-5,6β-diol (25)**

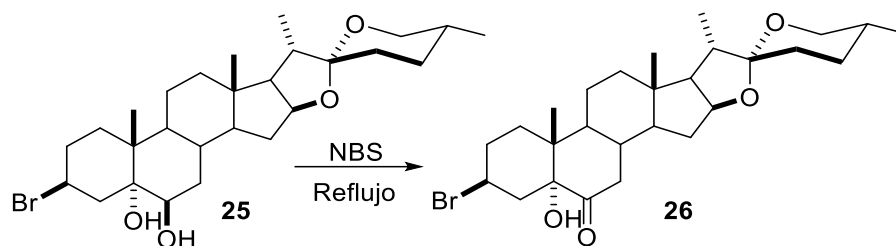


Se disolvieron 773 mg (1.56 mmol) del compuesto **24** en una mezcla de 10 mL de acetona:agua 7:3 y se adicionaron 480 mg (2.5 mmol) de HIO₄. Se mantuvo en agitación durante 1 h a reflujo, la mezcla de disolvente se evaporó a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3x20 mL) se lavó con una disolución sobresaturada de NaHCO₃ hasta pH neutro, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía de columna con un sistema Hex:AcOEt 8:2. Se obtuvo un polvo blanco con un rendimiento del 92% que corresponde al compuesto **25**.

RMN ¹H (500 MHz, δ): 3.51 (1H, *d*, $J_{6-7}=3.0$ Hz, H-6), 4.38 (1H, *m*, H-16), 4.47 (1H, *dddd*, $J_{3,2ax}=J_{3,4ax}=12.3$ Hz, $J_{3,2ec}=J_{3,4ec}=5.1$ Hz, H-3), 3.46 (1H, *dd*, $J_{26ec-26ax}=10.9$ Hz, $J_{26e,25}=4.4$ Hz, H-26ec), 3.35 (1H, *dd*, H-26ax), 2.65 (1H, *m*, H-4ax), 0.95 (3H, *d*, $J_{21,20}=6.9$ Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, *d*, $J_{27,25}=6.3$ Hz, CH₃-27), 1.22 (3H, *s*, CH₃-18), 0.76 (3H, *s*, CH₃-19).

RMN ¹³C (125 MHz, δ): 30.3 (C-1), 35.0 (C-2), 49.4 (C-3), 38.4 (C-4), 76.9 (C-5), 75.8 (C-6), 33.4 (C-7), 31.7 (C-8), 41.7 (C-9), 35.1 (C-10), 16.3 (C-11), 40.0 (C-12), 40.8 (C-13), 43.5 (C-14), 31.4 (C-15), 80.9 (C-16), 46.0 (C-17), 16.7 (C-18), (C-19), 40.8 (C-20), 14.6 (C-21), 109.5 (C-22), 28.9 (C-23), 20.9 (C-24), 29.9 (C-25), 67.0 (C-26), 16.9 (C-27).

- **(25R)-3β-bromo-5-hidroxi-5α-espirostan-6-ona (26)**



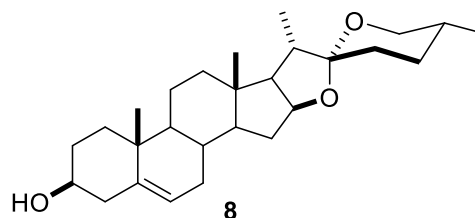
Se disolvieron 737 mg (1.44 mmol) del compuesto **25** en una mezcla de dioxano:agua 9:1 y se adicionaron 205 mg (1.152 mmol) de NBS. Se mantuvo en agitación durante 20 min a reflujo, la mezcla de disolvente se evaporó a presión reducida. La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3x20 mL) se lavó con una disolución sobresaturada de NaHCO₃ hasta pH neutro, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía de columna con un sistema Hex:AcOEt 9:1. Se obtuvo un polvo blanco con un rendimiento del 80% que corresponde al compuesto **26**.

RMN ¹H (500 MHz, δ): 4.4 (1H, *m*, H-16), 4.31 (1H, *m*, H-3), 3.46 (1H, *m*, H-26ec), 3.36 (1H, *dd*, H-26ax), 2.71 (1H, *m*, H-7), 2.34 (1H, *m*, H-4), 0.94 (3H, *d*, *J*_{21,20} = 6.9 Hz, CH₃-21), 0.75 (3H, *d*, *J*_{27,25} = 6.4 Hz, CH₃-27), 1.22 (3H, *s*, CH₃-18), 0.87 (3H, *s*, CH₃-19).

RMN ¹³C (125 MHz, δ): 36.8 (C-1), 32.9 (C-2), 56.25 (C-3), 39.0 (C-4), 81.1 (C-5), 210.9 (C-6), 41.7 (C-7), 31.6 (C-8), 47.7 (C-9), 21.2 (C-11), 39.6 (C-12), 42.1 (C-13), 56.3 (C-14), 32.2 (C-15), 80.6 (C-16), 62.2 (C-17), 14.6 (C-18), 21.2 (C-19), 42.4 (C-20), 14.3 (C-21), 109.5 (C-22), 30.4 (C-23), 28.9 (C-24), 31.4 (C-25), 67.1 (C-26), 16.6 (C-27).

Resultados y discusión

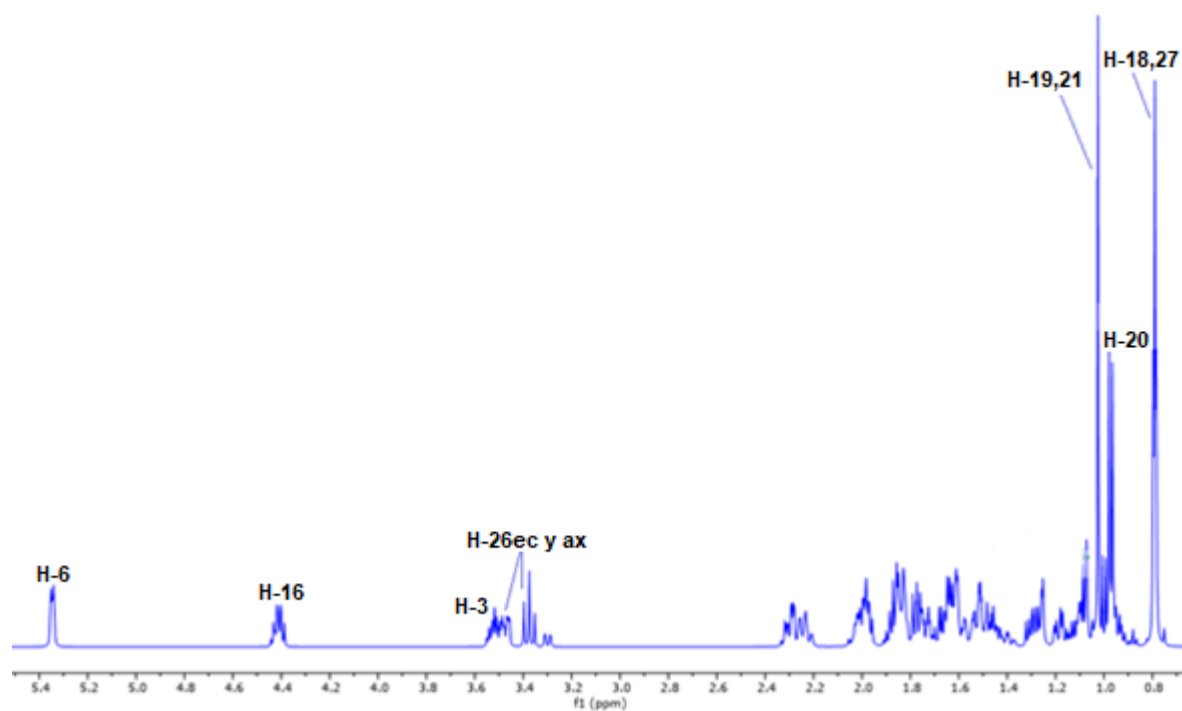
- **Diosgenina (8)**



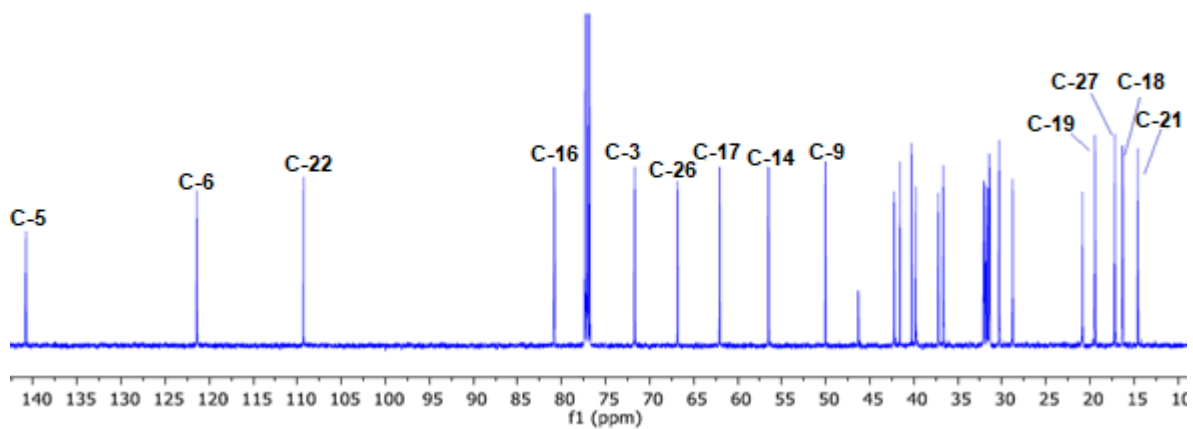
La materia prima seleccionada para la ruta sintética fue la diosgenina (**8**), la cual se encuentra comercialmente con una pureza del 92% por lo que fue necesaria su purificación con el objetivo de evitar la formación de productos no deseados, posteriormente se procedió a la caracterización de la diosgenina, lo cual ayudó en la interpretación de los espectros de las siguientes modificaciones químicas.

En el experimento de ^1H (**Espectro 5**) del compuesto **8**, se observan las señales características de su estructura, por destacar alguna de ellas, se encuentra la señal de 5.35 ppm correspondiente al protón vinílico en H-6, de igual manera podemos observar la señal en 4.41 ppm correspondiente al protón de H-16 y a menor frecuencia en la región de 3.57-3.42 ppm podemos observar 2 señales solapadas correspondientes al H-3 y a H-26ec, respectivamente, de igual manera la señal de 3.37 ppm corresponde al H-26ax.

En el espectro de ^{13}C (**Espectro 6**) se puede observar 2 señales una en 141 ppm y en 122 ppm que corresponden a carbonos vinílicos que son C-5 y C-6, respectivamente. De igual manera otras señales características del compuesto **8** son en 109 ppm que corresponde al C-22 espirocetal, en 81 ppm que corresponde al C-16 que es característico de la presencia del anillo E, en las cercanías de esta señal se encuentra C-3 en 72 ppm y C-26 en 67 ppm, confirmando así la estructura química de la materia prima e identificando los sitios a modificar en la ruta sintética.

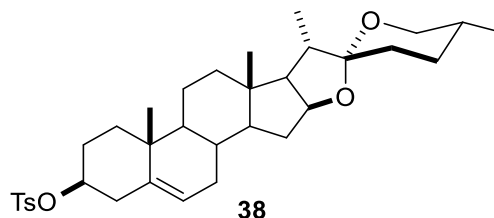


Espectro 5. RMN de ¹H a 500 MHz del compuesto **8** en CDCl₃.

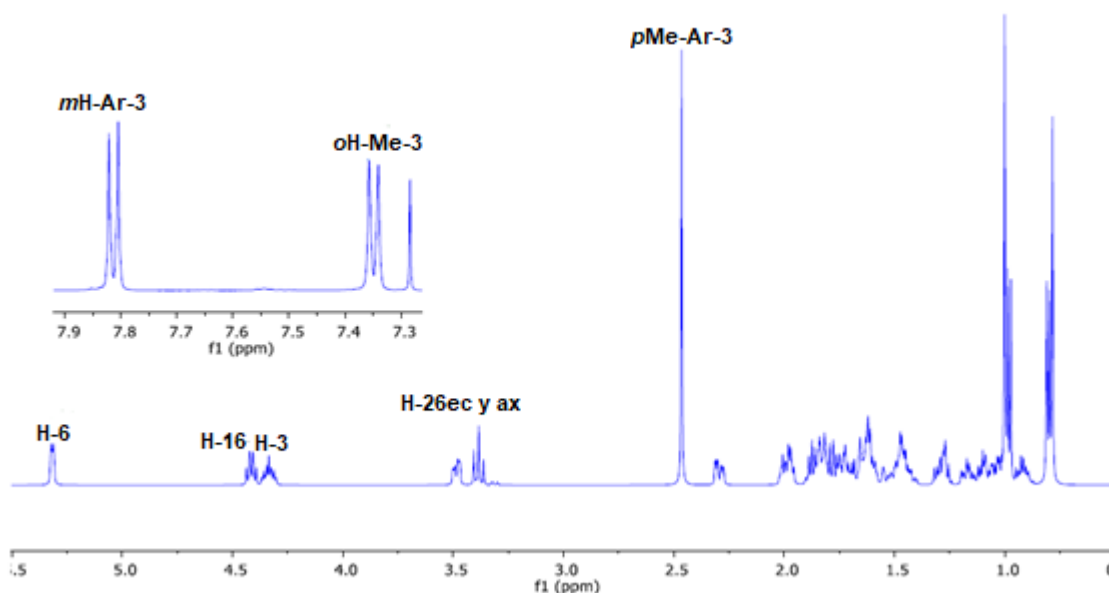


Espectro 6. RMN de ¹³C a 125 MHz del compuesto **8** en CDCl₃.

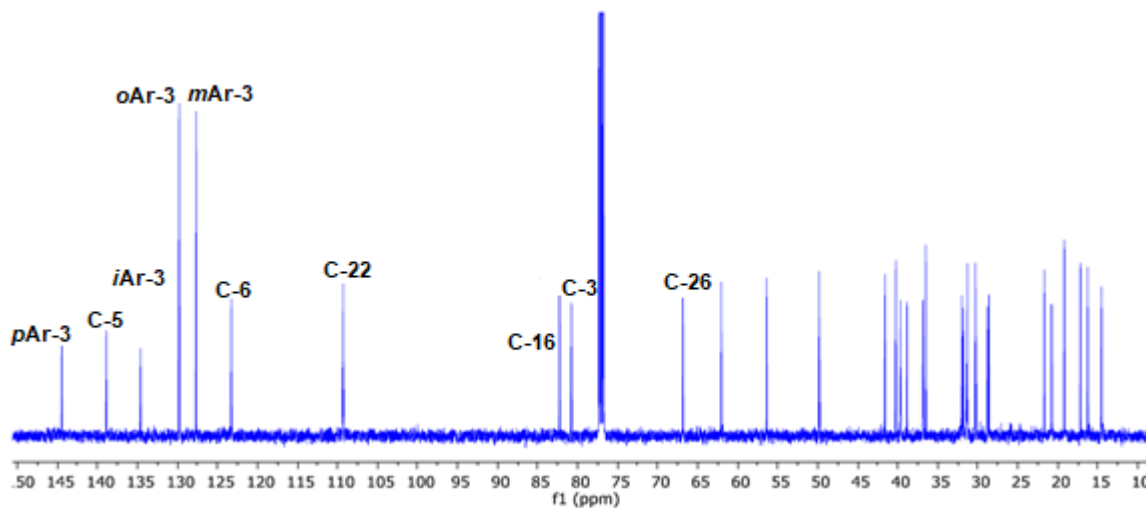
- **Tosilato de diosgenina (38)**



La obtención del compuesto **38**, se procedió mediante la esterificación del grupo hidroxilo del C-3 con TsCl. Por mencionar algunas señales características en el **Espectro 7** de ^1H es posible observar la aparición de señales en la región de los aromáticos como 2 señales dobles; por otra parte se observa un desplazamiento a frecuencias altas en 4.3 ppm correspondiente al H-3 debido al efecto desprotector que ejerce el grupo tosilo. De la misma manera en el **Espectro 8** de ^{13}C se pueden distinguir algunos cambios importantes, como lo es la aparición de señales de C-aromáticos y el desplazamiento del C-3 a frecuencias altas en 82.5 ppm.

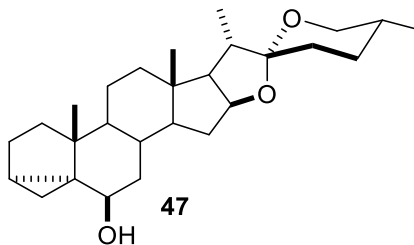


Espectro 7. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto **38** en CDCl_3 .

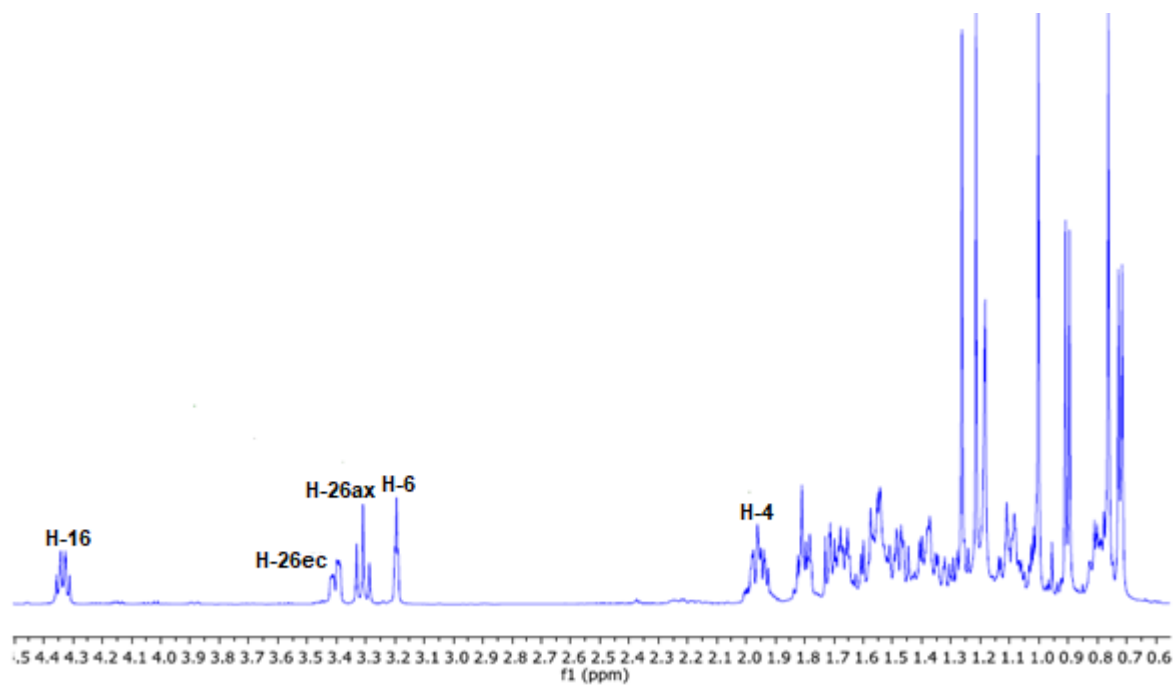


Espectro 8. RMN de ^{13}C a 125 MHz del compuesto **38** en CDCl_3 .

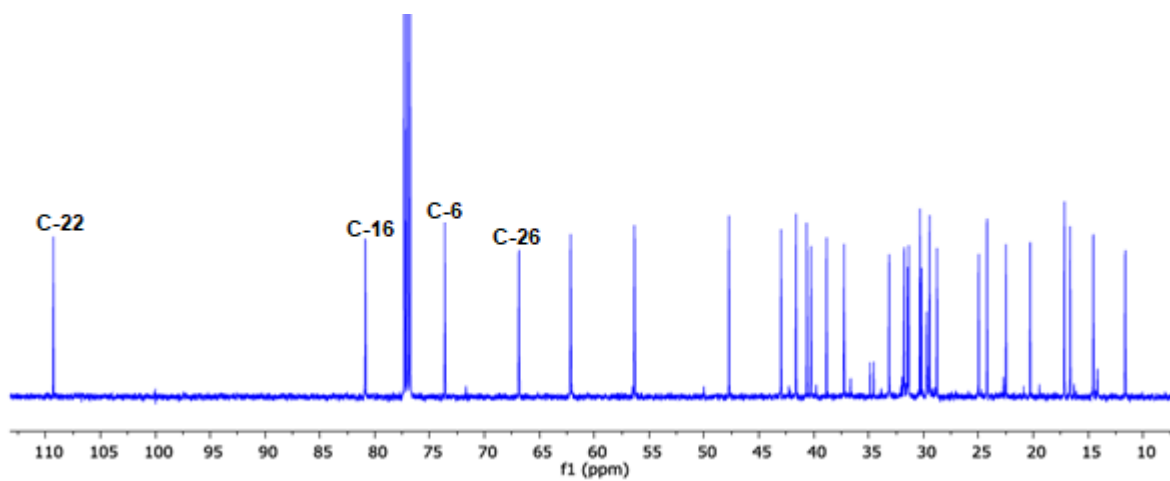
- **(25R)-3 α ,5-ciclo-5 α -espirostan-6 β -ol (47)**



En el **Espectro 9** de RMN de ^1H del compuesto **47**, se presenta la señal de H-6 en 3.19 ppm la cual nos indica la desaparición del protón vinílico y la formación del alcohol en el C-6. Por otro lado, en el **Espectro 10** de ^{13}C , presenta similitud con el compuesto **38** ya que se presentan las mismas señales de 110 ppm, 81.5 ppm y 67.3 ppm que corresponden a los C-22, C-16 y C-26, respectivamente. Una de las diferencias notables es la aparición de una señal en 74 ppm que corresponde al C-6 base de oxígeno. Las señales de los C-3 y C-5 se encuentran en frecuencias más bajas, esto debido a su nuevo ambiente químico.

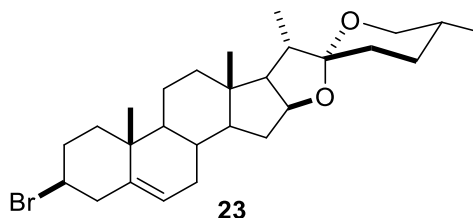


Espectro 9. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto **47** en CDCl_3 .



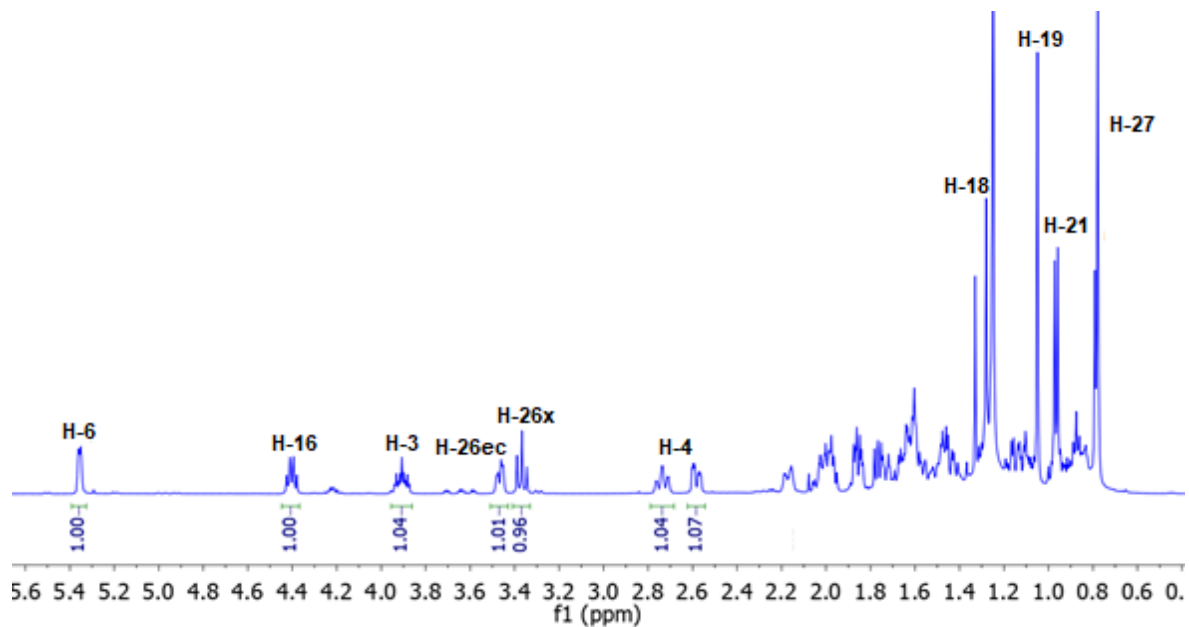
Espectro 10. RMN de ^{13}C a 125 MHz del compuesto **47** en CDCl_3 .

- **(25R)-3β-bromo-espirostan-5-eno (23)**

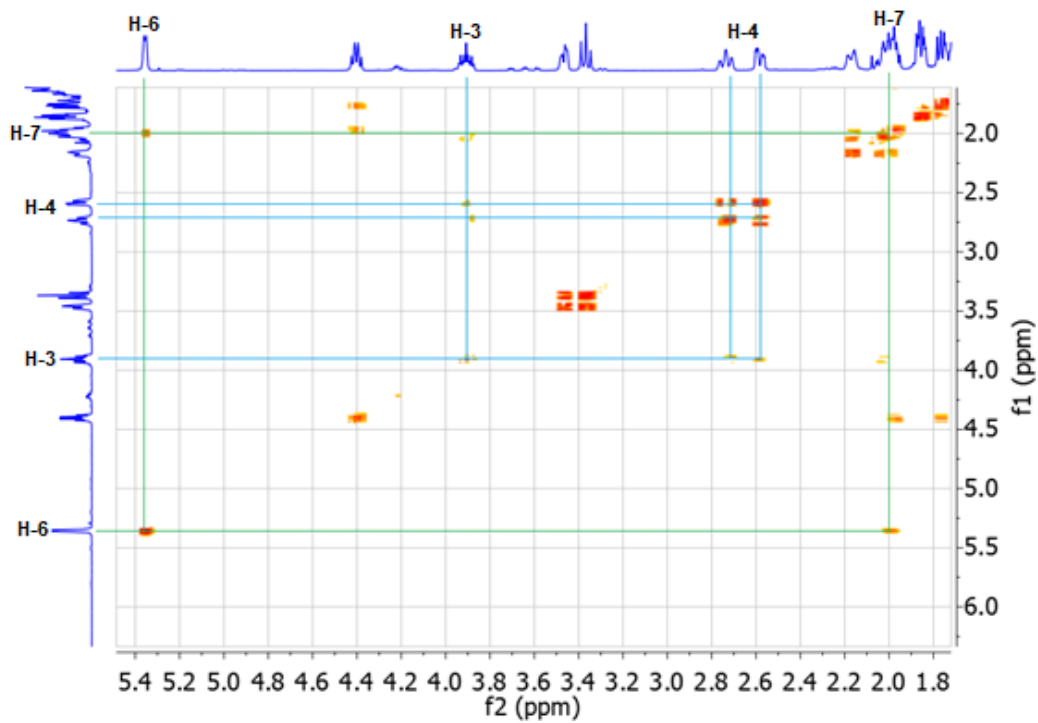


La caracterización del compuesto **23**, presenta el bromo en la misma posición que el grupo hidroxilo de la diosgenina; su caracterización se basó en primera instancia en compararlo con el **Espectro 5**, el cual los cambios son mínimos pero significativos. En el **Espectro 11** de RMN de ^1H se observa una señal múltiple en 3.91 ppm que corresponde al H-3 base del bromo, debido al efecto de desprotección ejercido por el halógeno en vez del hidroxilo, haciendo que esta señal se desplace a frecuencias altas. De igual manera se observa la regeneración del protón vinílico del C-6; por otro lado para la asignación y confirmación de los protones H-4 y H-7 se utilizó el experimento COSY (**Espectro 12**) para ver la correlación entre el protón H-3 y los protones H-4 de naturaleza diasterotópica, las cuales presentan desplazamientos muy cercanos entre sí, así mismo, la señal del protón vinílico H-6 sirvió para identificar los protones H-7 que se traslapan con las demás señales del cuerpo esteroideal.

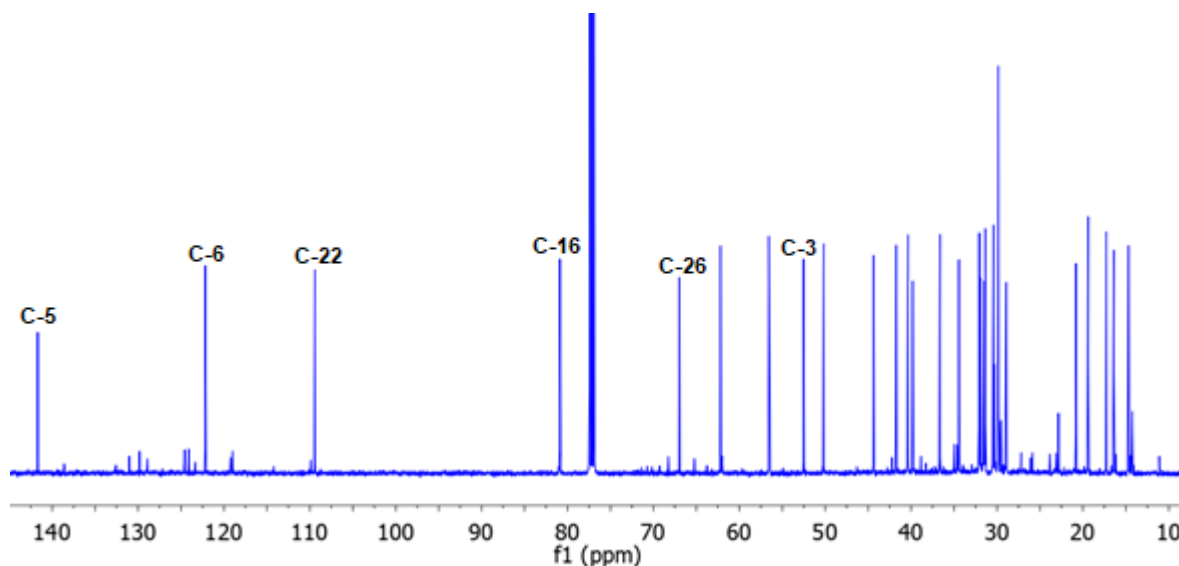
Por otra parte en el **Espectro 13** de ^{13}C , de manera análoga existe una gran similitud con el espectro de la diosgenina, excepto el cambio en la señal correspondiente al C-3 disminuyendo su desplazamiento en 52.53 ppm, como resultado del cambio de grupo en este carbono.



Espectro 11. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto **23** en CDCl_3 .

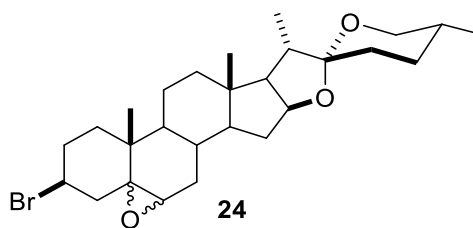


Espectro 12. Experimento COSY a 500 MHz del compuesto **23** en CDCl_3 .



Espectro 13. RMN de ^{13}C a 125 MHz del compuesto **23** en CDCl_3 .

- **(25R)-3 β -bromo-5,6 α -epoxi-5 α -espiroetano (**24**)**



La formación del epóxido del compuesto **24**, se obtuvo con *m*CPBA, la cual de manera diastereoselectiva se obtiene el epóxido α , debido a la disposición espacial de esta cara al momento de llevarse la adición de *m*CPBA que no se encuentra impedida por el metilo angular del C-10 (**Figura 13**).

La caracterización del compuesto **24** y principalmente para confirmar la formación mayoritaria del epóxido α , en el **Espectro 14** de ^1H se presentan un juego de señales correspondientes al H-3, una en 4.21 y otra a menores frecuencias en 3.95 ppm, esta última corresponde al epóxido β ya que no ejerce ningún efecto directo sobre el protón H-3, en cambio cuando es α el epóxido existe un efecto electrónico a través del espacio, generando un desplazamiento en 4.21 ppm del protón H-3; así mismo se observa como la señal del protón

vinílico del compuesto 5 correspondiente al H-6 cambia su desplazamiento a bajas frecuencias, esto debido al cambio de hibridación, dando un juego de señales en 2.91 y 3.06 producto de la mezcla de epóxidos α y β , respectivamente. De igual manera se observa en el espectro de ^1H el epóxido α con una pureza del 97%, esto posiblemente debido a la ausencia de grupos donadores o aceptores de protones en el C-3, ya que en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, se ha observado que cuando existe un grupo acetilo o un grupo hidroxilo da como producto la epoxidación con *m*CPBA una mezcla diastereoisomérica α : β en una relación aproximada 8:2, esto se debe al efecto direccional de los grupos vecinos, reactividad que ha sido cuidadosamente estudiada en epoxidaciones de alcoholes alílicos y que actualmente hay pocos estudios en alcoholes homoalílicos (**Figura 14**).

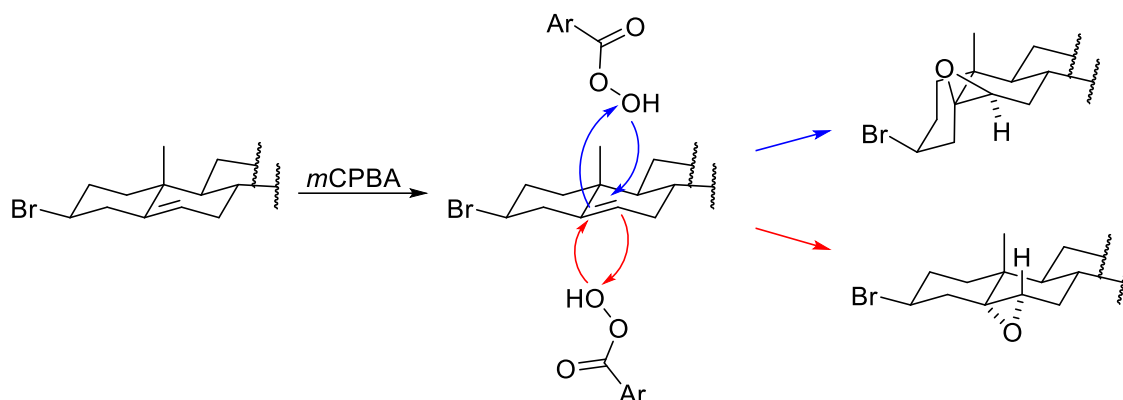


Figura 13. Mecanismo de reacción de la adición diastereoespecífica.

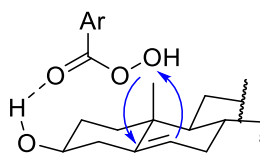
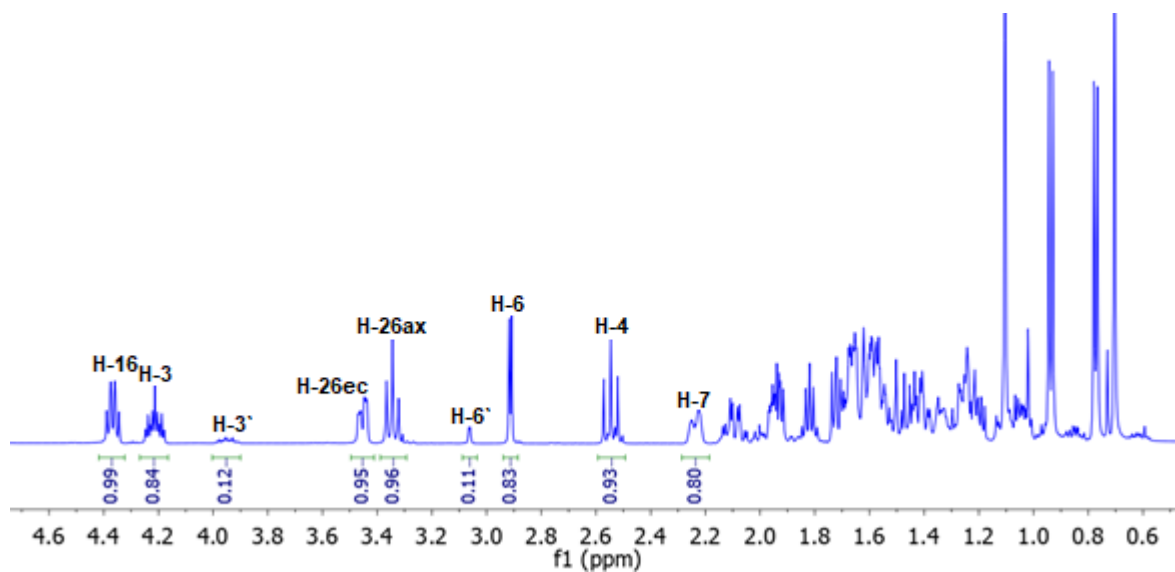


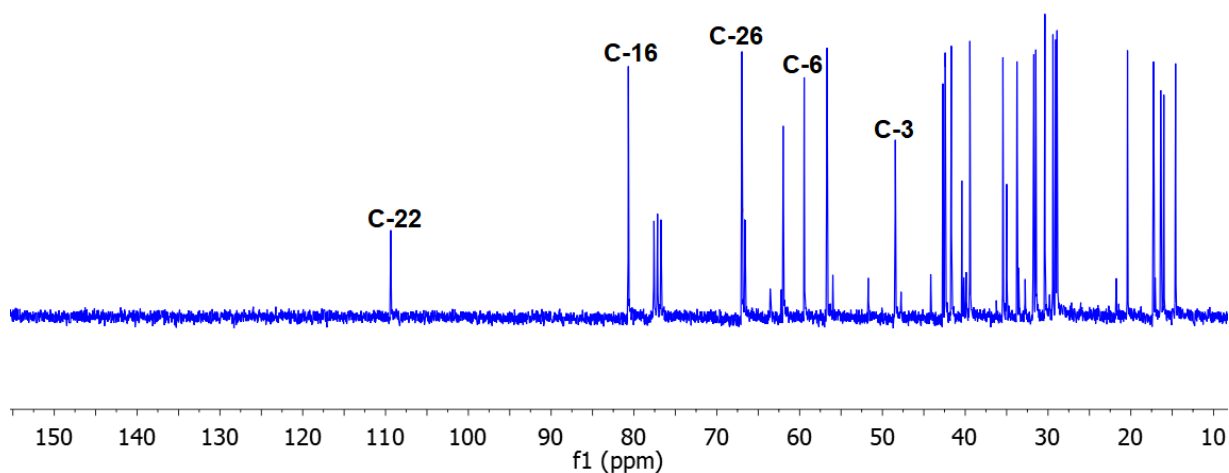
Figura 14. Adición diastereoselectiva de *m*CPBA en la diosgenina a partir del alcohol homoalílico.

Por otro lado, en el experimento de ^{13}C (**Espectro 15**) de este producto podemos apreciar que en la región de 120-150 ppm han desaparecido las señales correspondientes al doble enlace del compuesto **23** lo que confirma la formación del producto, así mismo junto con el experimento HSQC (**Espectro 16**) se observan 2 nuevas señales de ^{13}C , las cuales corresponden al C-5 que no presenta ningún acoplamiento heteronuclear a un enlace por lo que se confirma

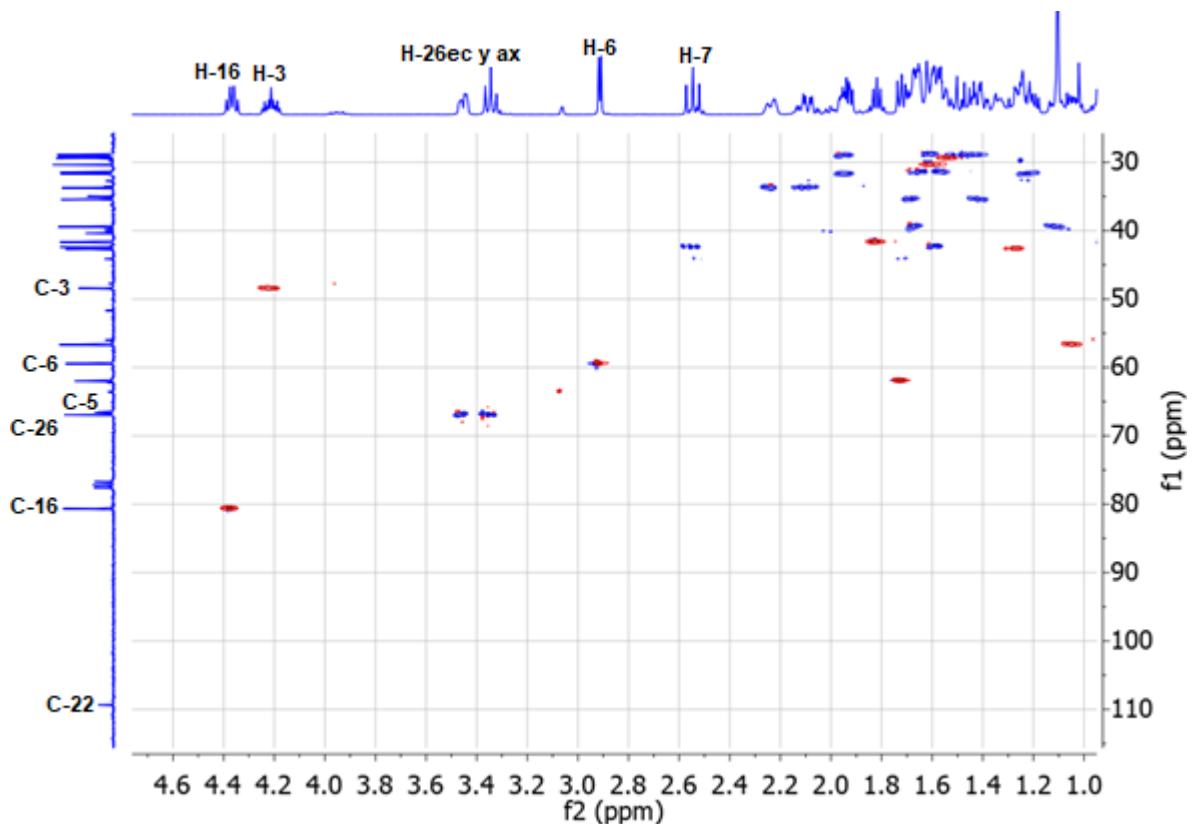
su naturaleza cuaternaria, mientras que el C-6 sí presenta dicho acoplamiento, tales señales se encuentran en 66.63 ppm y 59.52 ppm, respectivamente.



Espectro 14. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto **24** en CDCl_3 .

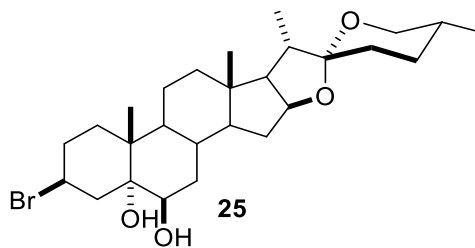


Espectro 15. Experimento de ^{13}C a 125 MHz del compuesto **24** en CDCl_3 .



Espectro 16. Experimento HSQC a 500 MHz del compuesto **24** en CDCl_3 .

- **(25R)-3 β -bromo-5 α -espiroetano-5,6 β -diol (**25**)**



La apertura del epóxido del compuesto **24** se intentó con diferentes condiciones mediante la hidrólisis clásica de epóxidos con NaOH , H_2SO_4 y HCl a temperatura ambiente y a reflujo, las cuales no consumían la materia prima para la formación del producto **25**; el mejor método para obtenerlo fue utilizando HIO_4 a reflujo obteniendo un rendimiento del 92%, en la **Figura 15**, se muestra el mecanismo propuesto para la obtención de dicho compuesto, la posible formación del epóxido β se debe a su evidencia en cromatografía de capa fina en donde se

observa una mancha con el mismo Rf a la que se obtiene en la epoxidación del compuesto **24** con *m*CPBA para dar la mezcla diastereoisomérica $\alpha:\beta$.

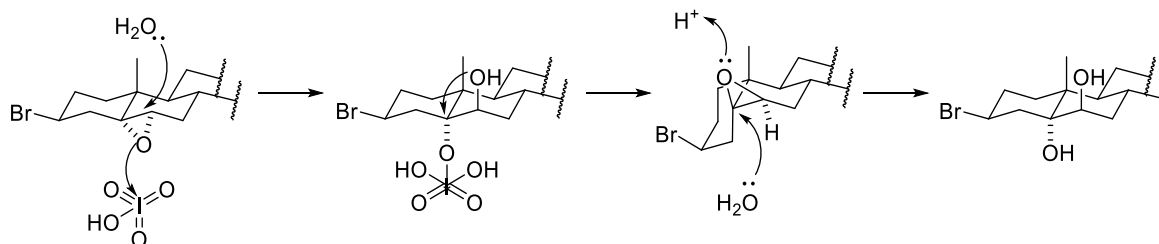
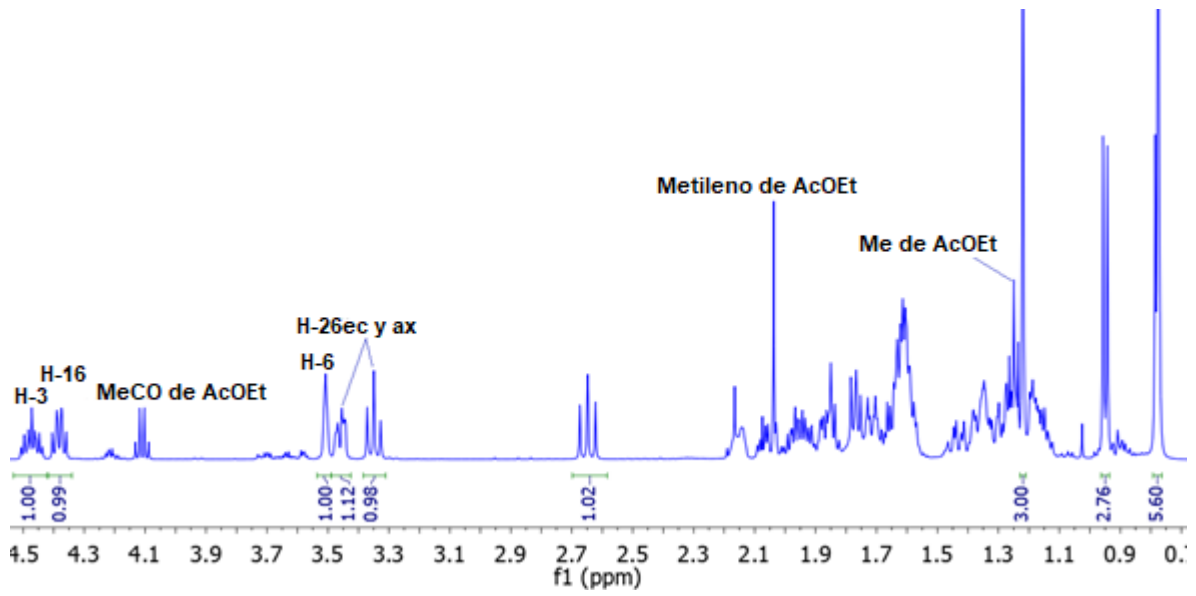
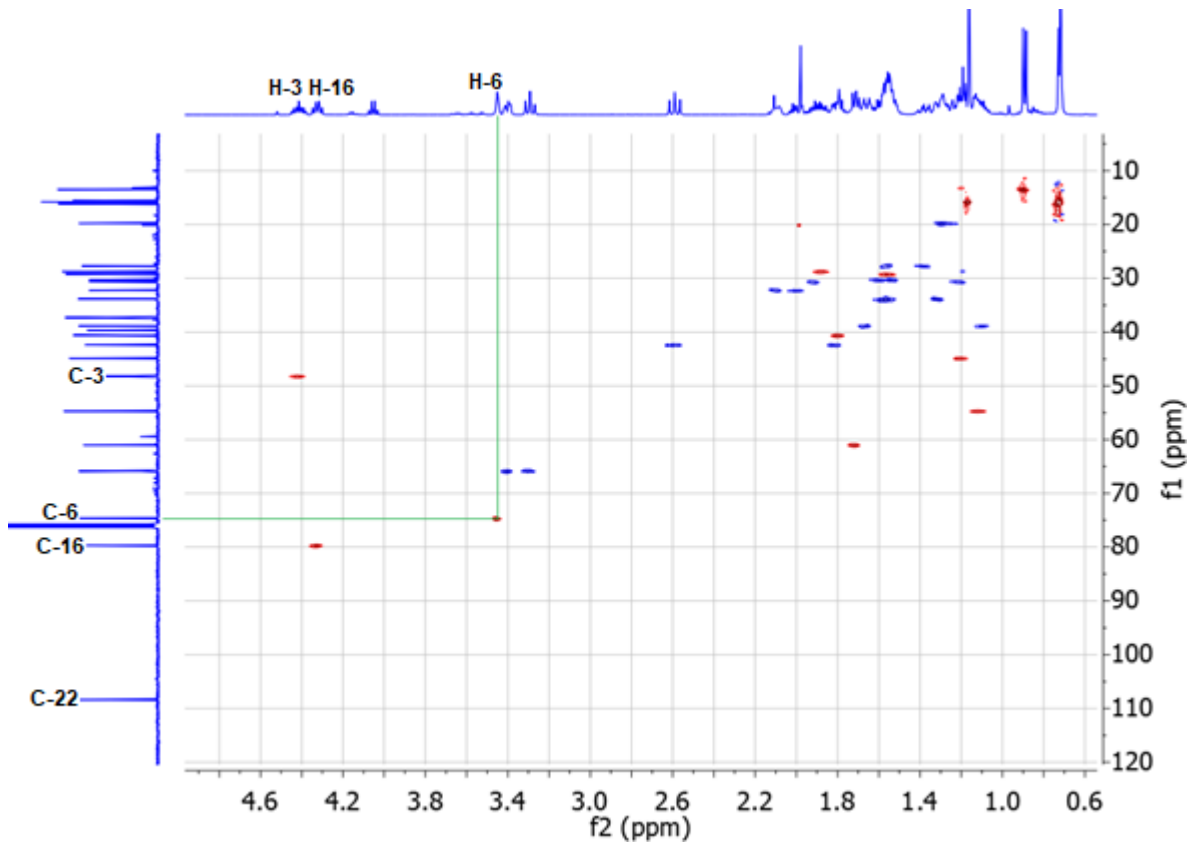


Figura 15. Mecanismo de reacción de apertura del α -epóxido con HIO_4 .

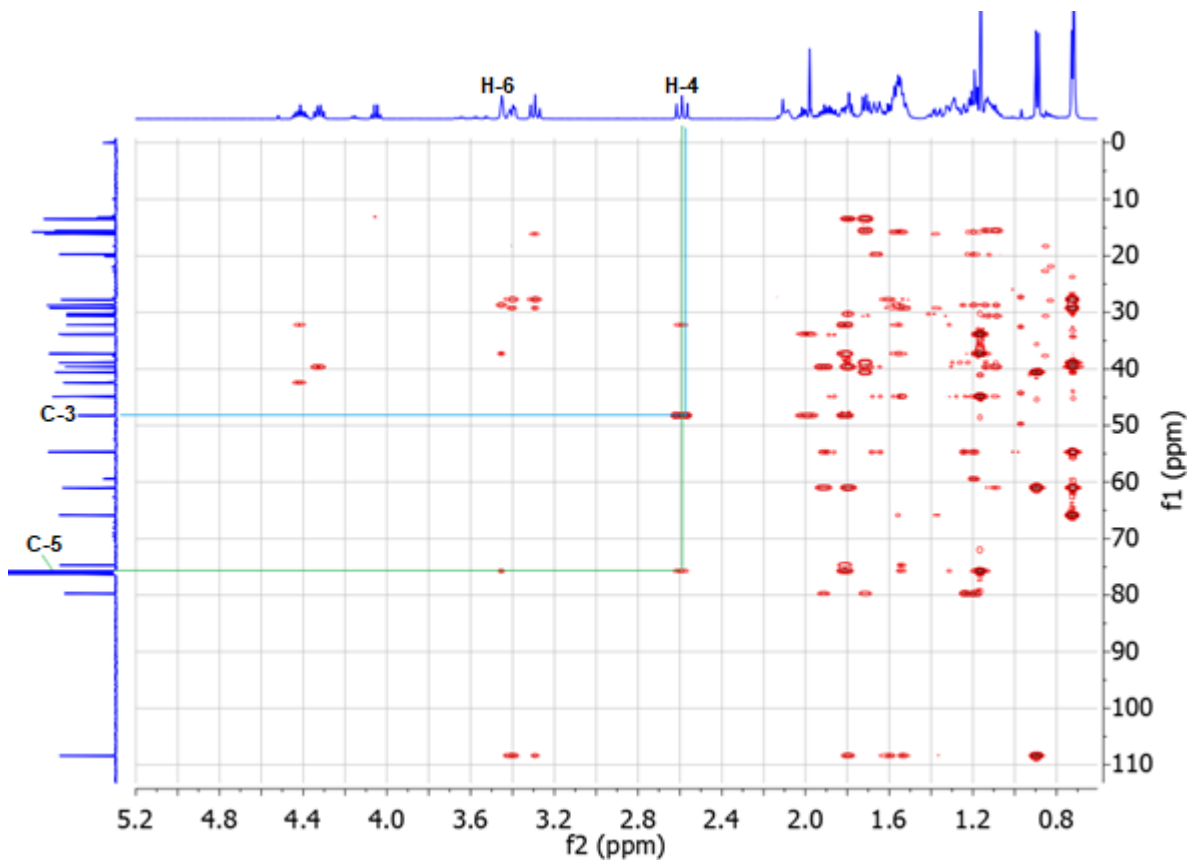
En el **Espectro 17** de ^1H del compuesto **25**, muestra una similitud con el compuesto **24**, pero con algunos cambios particulares; una de ellas es la señal del H-3, la cual se desplaza ligeramente a frecuencias altas en 4.47 ppm, esto debido al efecto del grupo hidroxilo del C-5 que ejerce un efecto electrónico a través del espacio. De igual manera el H-6 se desplaza a frecuencias altas en 3.51 ppm, esto debido a la pérdida de tensión angular que generaba el epóxido con su respectivo protón base. En el **Espectro 18** del experimento de HSQC de este compuesto, podemos apreciar que se han desplazado la señales de C correspondientes al epóxido de la materia prima a frecuencias altas, apareciendo la señal de C-6 en 74.68 ppm y la señal de C-5 a 76.86 ppm, esta última solapándose con la señal de CDCl_3 , por otro lado para la confirmación de esta señal se utilizó el **Espectro 19** y el **Espectro 19.1** del experimento HMBC, la cual se observa el acoplamiento con H-6, misma que sirvió para identificar la señal de H-4 en 2.65 ppm, misma que se acopla al C-3.



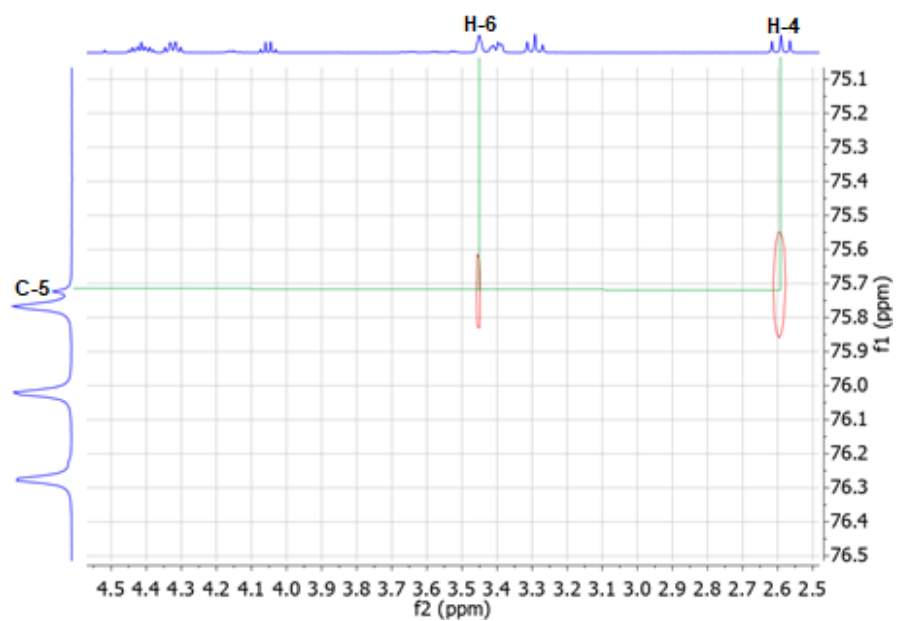
Espectro 17. RMN de ¹H a 500 MHz del compuesto **25** en CDCl₃.



Espectro 18. Experimento HSQC a 500 MHz del compuesto **25** en CDCl₃.

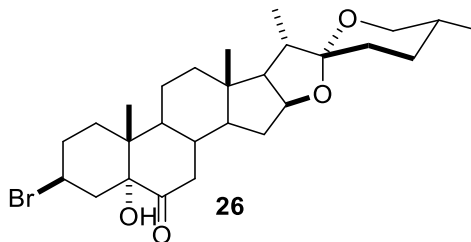


Espectro 19. Experimento HMBC a 500 MHz del compuesto **25** en CDCl_3 .



Espectro 19.1. Ampliación del experimento HMBC a 500 MHz del compuesto **25** en CDCl_3 .

- (25*R*)-3β-bromo-5-hidroxi-5α-espirostan-6-ona (**26**)

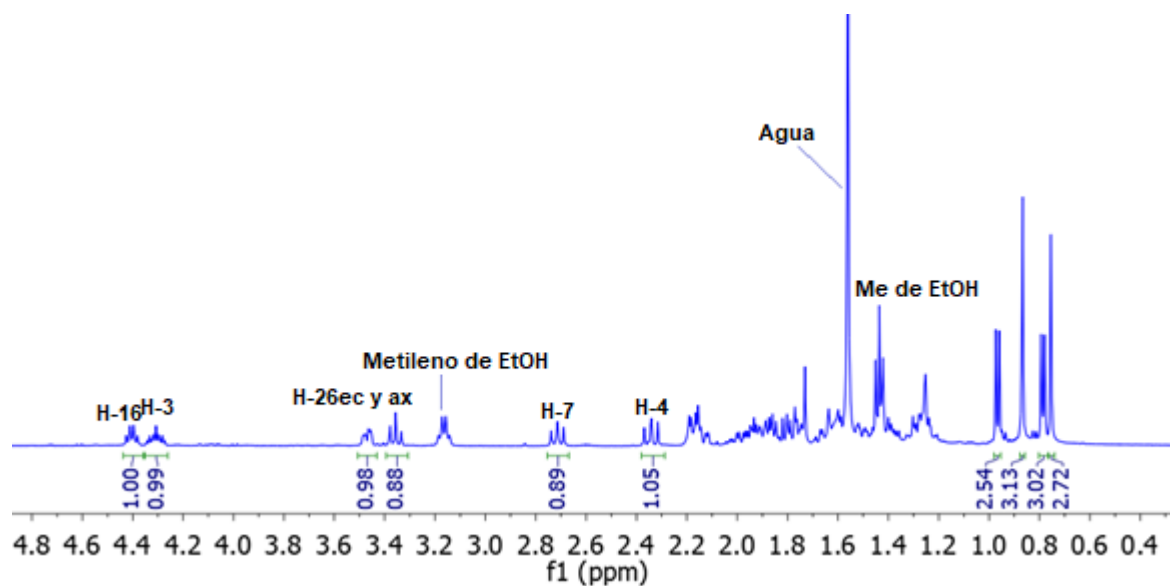


Para la oxidación del C-6 se utilizó NBS, la cual es un agente oxidante que actualmente se considera ideal para la oxidación de alcoholes secundarios. En la **Tabla 4**, se observa que la mejor condición de reacción es el experimento 3 debido a que el porcentaje residual corresponde al compuesto **25**, ya que en el experimento 1 y 2, se obtiene otro producto que posiblemente se deba a la bromación del C-7 del compuesto **26**, dicho compuesto no pudo aislarse ya que tiene un Rf muy cercano al compuesto 7, de igual manera se calculó el LogP_{o/w} con el modelo iLog P usando el programa informático SwissADME (versión 2017) de ambos compuestos [38], presentando así una diferencia de 0.29, la cual explica los valores cercanos de Rf.

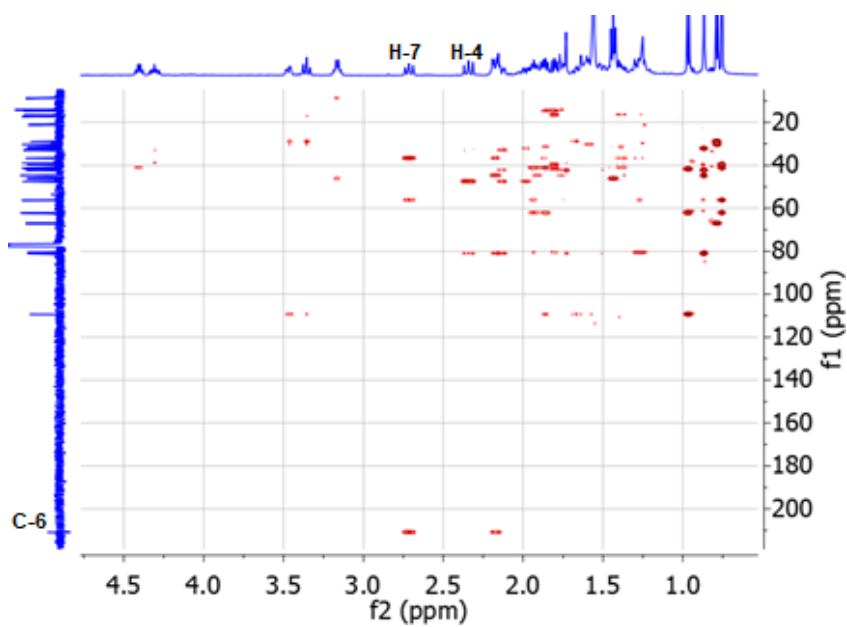
En la caracterización del compuesto **26**, en el **Espectro 20** de ¹H se observa la desaparición de la señal de protón H-6, debido a la oxidación de este carbono, así mismo se observa el desplazamiento de protones H-7 de carácter diastereotópico a frecuencias altas, esto mismo se confirmó con ayuda del **Espectro 21** del experimento HMBC, en donde estos dos protones se acoplan con una señal de carbonilo perteneciente al C-6 en 210.9 ppm. Mientras que en el **Espectro 22** del experimento HSQC, se pudo correlacionar los carbonos y los protones correspondientes a las posiciones 3, 16 y 26. De la misma manera se identificaron los carbonos cuaternarios con la ayuda del **Espectro 22** y la ampliación de este (**Espectro 22.1**) en donde se observan dos señales de carbono sin acoplamiento a protón en 109.5 y 81.5 que corresponde a los C-22 y C-5, respectivamente. Cabe mencionar que la señal de 109.5 ppm del C-22 es característica de estructuras espiroestánicas, la cual confirma que los anillos E y F no han sufrido apertura o modificaciones químicas.

Tabla 4. Condiciones de reacción de la oxidación del C-6 con NBS.

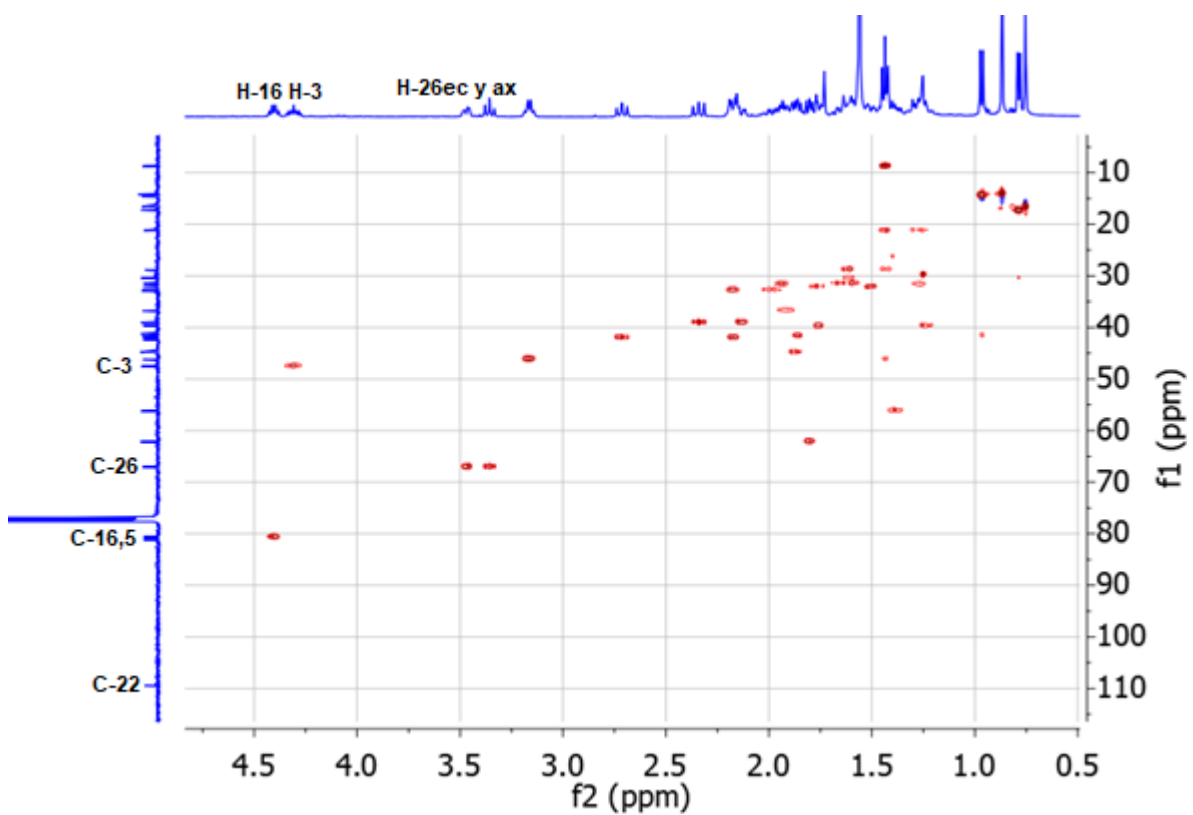
Experimento	Equivalentes	Tiempo (min)	Rendimiento %
1	1.3	40	48
2	1.0	30	64
3	0.80	20	80



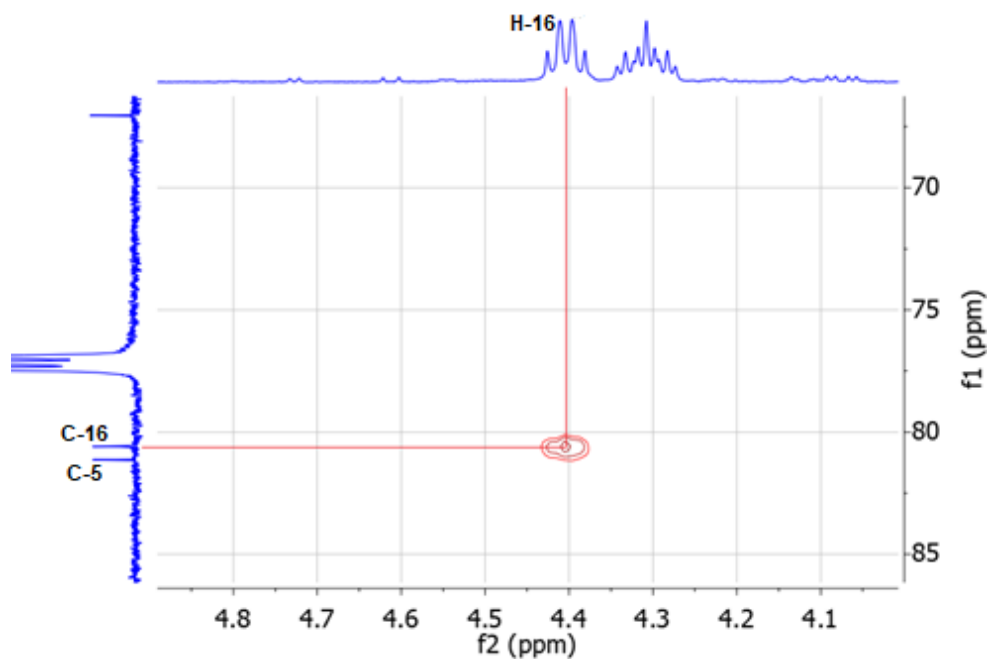
Espectro 20. RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto **26** en CDCl_3 .



Espectro 21. Experimento HMBC a 500 MHz del compuesto **26** en CDCl_3 .



Espectro 22. Experimento HSQC a 500 MHz del compuesto **26** en CDCl_3 .



Espectro 22.1. Ampliación del experimento HSQC a 500 MHz del compuesto **26** en CDCl_3 .

Se calculó la conformación de mínima energía de los compuestos **25** y **26** (Figura 16), obteniéndose así que el compuesto **25** es el de mayor energía, lo cual explica su reactividad y el corto tiempo de reacción necesario para la formación del compuesto **26**, ya que este último no presenta interacciones 1, 3-dipolar entre el grupo hidroxilo del C-6 y el grupo metilo del C-10.

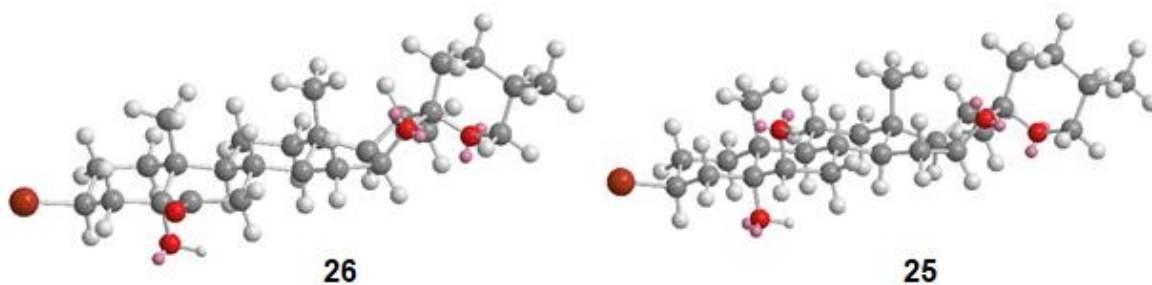
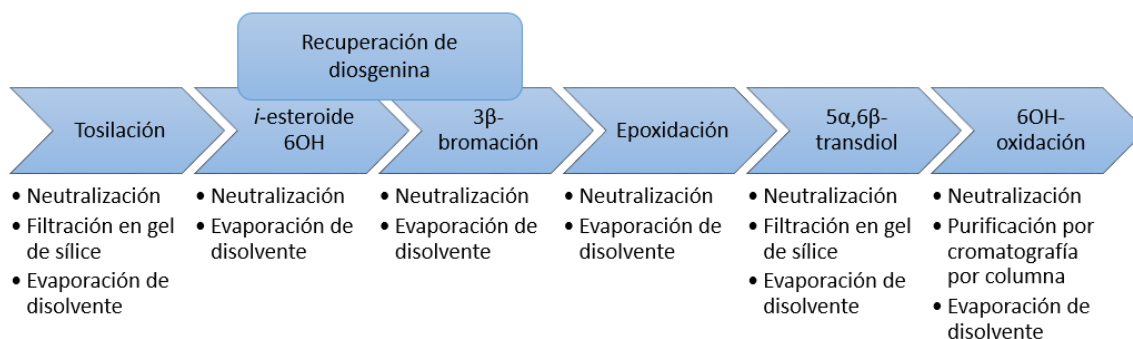


Figura 16. Conformación de mínima energía del compuesto **26** (27.3 kcal/mol) y **25** (29.36 kcal/mol).

Actualmente, la mayor parte de la industria química se basa en una producción continua que consiste en fabricar materiales sin ninguna interrupción pasando por una serie de eventos en constante movimiento (reacciones químicas, tratamiento mecánico o térmico y purificación) [39]. Sin embargo, en un laboratorio de investigación, dicha producción no se puede aplicar ya que en algunas ocasiones no se cuenta con los recursos ni la infraestructura para llevarlo a cabo y lo más importante es que la mayoría de las veces se requiere de la purificación de los compuestos de cada una de las etapas de reacción para evitar productos no deseados. Es así, que surge la necesidad de implementar procesos semicontinuos, los cuales se caracterizan por tener arranques y paradas periódicas [40]. La ruta sintética (**Esquema 5**) para acceder al compuesto **26**, se pudo obtener en un proceso semicontinuo con un rendimiento global inferior al proceso convencional de -17%, sin embargo, tiene la ventaja de reducir tiempo y costos. En el **Esquema 13**, se observa el diagrama de operaciones del proceso semicontinuo la cual evita las etapas de purificación de cada compuesto y solamente se procede en cada una de ellas a la eliminación de disolvente y neutralización del crudo de reacción. Además, en dos etapas de reacción se recupera la diosgenina como subproducto, por lo que esta misma puede ser reutilizada para el mismo proceso o para la obtención de otros compuestos de interés.



Esquema 13. Proceso semicontinuo para la obtención del compuesto **26**.

Cabe señalar, que no se pudo acceder a la síntesis del compuesto **22**, debido a la situación de contingencia del presente año, pero actualmente se conocen las condiciones de reacción en la apertura selectiva de los anillos E y F de compuestos espirostánicos, por lo que dicho compuesto deberá ser objeto de estudio en trabajos posteriores.

Conclusiones

- Se logró acceder a cada uno de los compuestos (**23**, **24**, **25**, **26**, **38** y **47**) con rendimientos superiores al 80 %.
- Se caracterizó espectroscópicamente por RMN cada uno de los compuestos con experimentos de 1D y 2D.
- Se implementó una metodología para la bromación y retención de la configuración del C-3 de la diosgenina por vía *i*-esteroide.
- Se sintetizó una nueva familia de compuestos espirostánicos bromados en posición 3 derivados de diosgenina.
- Se diseñó una metodología para la reacción quimioselectiva de NBS para la oxidación del grupo hidroxilo en posición 6 del compuesto **25**.
- Se desarrolló un proceso semicontinuo para la obtención del compuesto **26**, reduciendo tiempos y costos pero con un rendimiento menor al proceso convencional de -17%.

Capítulo III

Estudios de acoplamiento molecular y evaluación de la actividad promotora de crecimiento vegetal.

Antecedentes

Actualmente, el desarrollo de fármacos depende de gran medida de uso de técnicas computacionales (*in silico*) que permiten procesar grandes cantidades de información con gran precisión empleando diferentes modelos teóricos que contribuyen a comprender los mecanismos de acción de principios activos o a mejorar las propiedades de los mismos [26]. Una de las diferentes herramientas de estudios *in silico*, son los estudios de acoplamiento molecular o docking, que tiene como objetivo la estimación energética de un modelo de unión entre dos moléculas que generalmente consiste en interacciones proteína-ligando, dichas predicciones deben de ser complementadas con pruebas biofísicas o biológicas [41]. Sin embargo, los estudios docking han tenido éxito en el desarrollo de nuevos fármacos, por mencionar algunos ejemplos, se encuentra el fármaco Crizotinib que fue desarrollado por Pfizer y ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón, de la misma manera el fármaco Rilpivirina con aplicación antiviral con el virus de VIH, la cual fue desarrollado por Janssen Pharmaceuticals [42] [43].

En el presente capítulo, se evaluó la actividad promotora de crecimiento vegetal *in vivo* y el acoplamiento molecular de los nuevos compuestos sintetizados (**23-26** y mezcla epimérica **19:20**) y la homobrasinólida (**15**), con el fin de ampliar la relación estructura-actividad de moléculas análogas de brasinoesteroides. El estudio docking de estos compuestos se realizó sobre los sitios activos de las proteínas Brassinosteroid Insensitive I (BRI1)-ligand-BRI1-Associated Receptor Kinase 1 (BAK1) y Brassinosteroid Insensitive I (BRI1). La selección de tales receptores biológicos, es debido al mecanismo de activación que ocurre en dos pasos. Primeramente, es la unión de brasinoesteroides a un surco superficial hidrófobo del receptor BRI1 y posteriormente el complejo BRI1-brasinoesteroide induce la heterodimerización con BAK1, por lo que la formación de este complejo (BRI1-brasinoesteroide-BAK1) conduce a la activación de una cascada de señalización que desencadena el crecimiento y la diferenciación de las plantas [44] [45]. Por otro lado, se evaluó la promoción de crecimiento vegetal en plantas de *Allium cepa L.* comúnmente conocida como cebolla, midiendo tallo y raíz [46].

Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar la actividad promotora de crecimiento vegetal y estudios de acoplamiento molecular de los nuevos compuestos **23-26** y la mezcla epimérica **19:20** para establecer una relación estructura-actividad de análogos de brasinoesteroides.

Objetivos particulares:

- Evaluar la actividad de los compuestos en plantas *Allium cepa L* con una concentración de 0.1 mg/l.
- Calcular las energías de acoplamiento de los compuestos con los sitios activos de las proteínas (BRI1-BAK1 y BRI1) con el programa informático AutodockVina (versión 1.1.2).

Materiales y métodos

- **Elongación de tallo y raíz de *Allium cepa* L.**

Para medir la actividad promotora de crecimiento vegetal, se utilizaron plantas de cebolla, a las cuales se les cortó el tallo y raíz. Cada cebolla se colocó sobre diferentes disoluciones de los compuestos a prueba a una concentración de 0.1 mg/l en acetona y agua. Se emplearon dos muestras control, las cuales fueron control negativo (C-) y control positivo (C+). El C- se preparó solamente con acetona y agua, mientras que el C+ se preparó con una concentración de 0.1 mg/l de homobrasinólida (**15**). Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento vegetal a una temperatura de 25 ± 1 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con una humedad relativa de 50-60% durante 5 días, transcurrido el tiempo se midieron tallo y raíz de cada planta. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (ES) y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SigmaPlot 12. Para comparar diferencias significativas entre tratamientos, se llevó a cabo un análisis ANOVA con la prueba de Tukey, la cual se consideró como valores significativos de p-valor < 0.05 .

- **Estudios Docking**

Para las estructuras bidimensionales de los ligandos para el estudio, se empleó usando ChemDraw Ultra 13 (Perkin Elmer, Waltham, Ma, USA). Las coordenadas 3D de las estructuras fueron generados y optimizados con MM₂ implementado en Chem3D Ultra 13. Todos los ligandos fueron convertidos en formato PDBQT (entrada para AutoDock Vina). Las cargas en los átomos de los ligandos, se generaron utilizando el modelo Gasteiger, los hidrógenos no polares se fusionaron y los enlaces rotativos predeterminados se conservaron utilizando la utilidad TORSDOF en AutoDock Tools 1.5.6 [47] [48].

Las proteínas BRI1 (Brassinosteroids Insensitive I) y BRI1 (Brassinosteroids insensitive I) con BAK1 (BRI1-Associated Receptor kinase 1) tienen una resolución de 2.28 Å y 3.60 Å de estructura cristalográfica de rayos X con clave 3RGZ y 4M7E, respectivamente. Las estructuras fueron optimizadas, utilizando el campo de fuerza PARSE y un estado de protonación de los grupos ionizables a pH 7 por el método PROPKA, usando Chimera 1.14 y el servidor

PDB2PQR. El tamaño de la caja de lectura para ambos, fue de $x=40$, $y=40$, $z=40$ con el ligando natural (**14**) cocrystalizado en el centro de la caja de simulación.

Las simulaciones de acoplamiento molecular, se realizó utilizando el programa AutoDockVina [49]. Los sitios activos de las proteínas se mantuvieron rígidos y sin flexión. El programa AutoDockVina predice la conformación adoptada de los ligandos con la unión de las proteínas (kcal/mol). Se seleccionó el modo de unión más representativo de cada ligando a partir de 25 corridas con base a la pose con mayor disposición espacial cercana al ligando cocrystalizado. La validación de los estudios, se realizó por el método redocking del ligando natural con el mismo ligando cocrystalizado de la proteína, utilizando el Root Mean Square Deviation (RMSD) de tres corridas. Las representaciones 2D de las interacciones proteína-ligando se prepararon con el programa Discovery Studio 2019.

Resultados y discusión

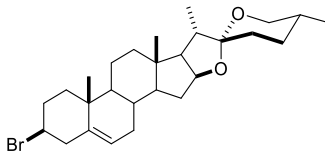
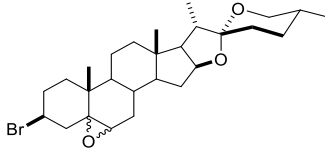
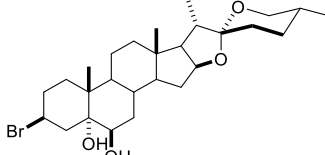
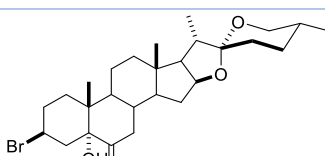
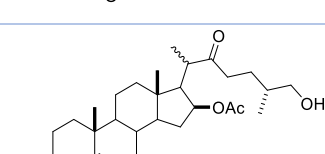
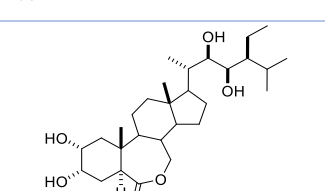
- **Estudios biológicos de promoción de crecimiento vegetal**

Se evaluaron los compuestos **23-26** y la mezcla epimérica **19:20** en una relación 60:40, la cual se obtiene por la metodología reportada en el capítulo uno. Desde un punto de vista práctico, el uso de mezclas en lugar de compuestos puros implica importantes ahorros en costos y esfuerzos sintéticos, ya que los pasos de separación no serían necesarios y la mezcla podría ser empleada directamente.

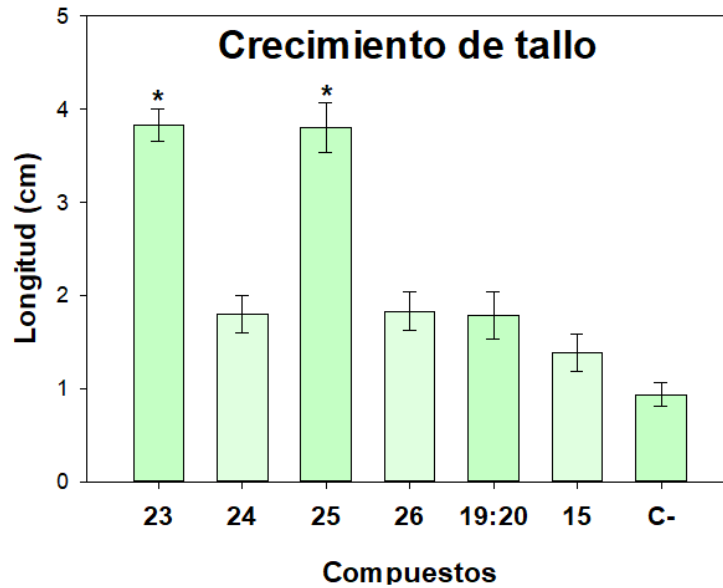
En la **Tabla 5**, se observa el crecimiento promedio (tallo y raíz) por cada una de las disoluciones de los compuestos a los 5 días de exposición, dichos resultados son analizados y representados en gráficas por cada tejido, tomando como referencia la homobrasinólida (**15**) para ver si estos presentan diferencias significativas en la actividad promotora de crecimiento vegetal.

En la **Gráfica 1**, se observa la actividad de crecimiento de tallo en cm de cada experimento, en donde los compuestos **23** y **25** presentan mayor actividad con diferencias significativas con respecto a la homobrasinólida (**15**), mientras que el resto de los compuestos presentan mayor actividad pero no son significativas. En la **Gráfica 2**, se observa que todos los compuestos poseen una menor actividad en la raíz con respecto al compuesto **15** (significativa para el compuesto **24**) a excepción del compuesto **25** que exhibe mayor actividad pero su diferencia no es significativa. Cabe destacar que sorpresivamente el compuesto **25** resultó ser el mejor de todos ya que promueve el crecimiento en tallo y raíz en *Allium cepa L.* Actualmente, no existen análogos espirostánicos de brasinoesteroides que contengan bromo en C-3 por lo cual se procedió a realizar estudios de acoplamiento molecular para comprender y explicar la actividad biológica con base en simulaciones de energías de modos de unión con dos receptores biológicos de brasinoesteroides (BRI1 y BRI1-BAK1).

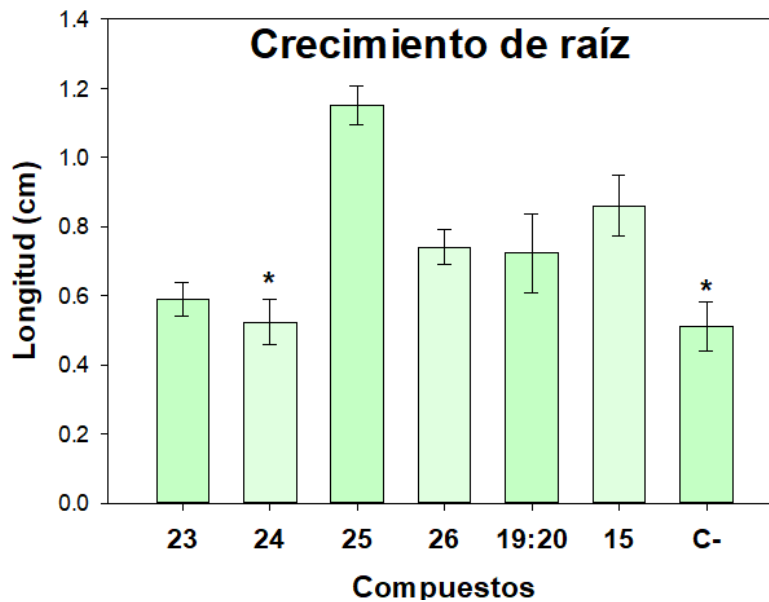
Tabla 5. Resultados de crecimiento vegetal de tallo y raíz en cm a los 5 días de tratamiento.

Clave	Compuesto	Tallo (cm)	Raíz (cm)
23		3.82	0.60
24		1.80	0.52
25		3.8	1.15
26		1.82	0.74
19:20		1.78	0.72
15		1.37	0.86
C-		0.93	0.51

Gráfica 1. Actividad de los compuestos (media \pm error estándar) en tallo a los 5 días de exposición. Las barras con * presentan diferencias significativas con respecto al compuesto 15.



Gráfica 2. Actividad de los compuestos (media \pm error estándar) en raíz a los 5 días de exposición. Las barras con * presentan diferencias significativas con respecto al compuesto 15.



- **Estudios docking con la proteína BRI1-BAK1 con clave 4M7E**

La proteína BRI1-BAK1 está conformada por dos heterodímeros (A-C y B-D), los estudios docking se realizaron con cada compuesto y con el heterodímero A-C. El primer paso fue la validación de los parámetros mediante el re-docking con el promedio de los RMSDs de las mejores poses del ligando natural (**14**) con la mejor energía de acoplamiento con respecto al ligando cocrystalizado, obteniendo así un RMSD de $0.889 \pm 0.051 \text{ \AA}$ (**Figura 17**). Este resultado indica que los parámetros son adecuados para analizar los acoplamientos de los compuestos **15**, **19**, **20** y **23-26**. En la **Figura 18**, se observan los modos de unión de todos los compuestos en el sitio activo del heterodímero A-C en donde se aprecia que tienen una distribución espacial igual a la del ligando cocrystalizado.

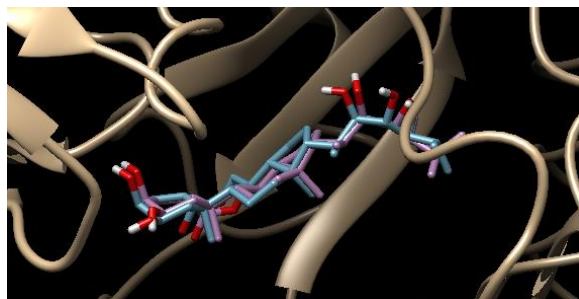


Figura 17. Redocking del compuesto **14** (púrpura) y del ligando cocrystalizado (azul) en el heterodímero A-C con un RMSD de $0.889 \pm 0.051 \text{ \AA}$.

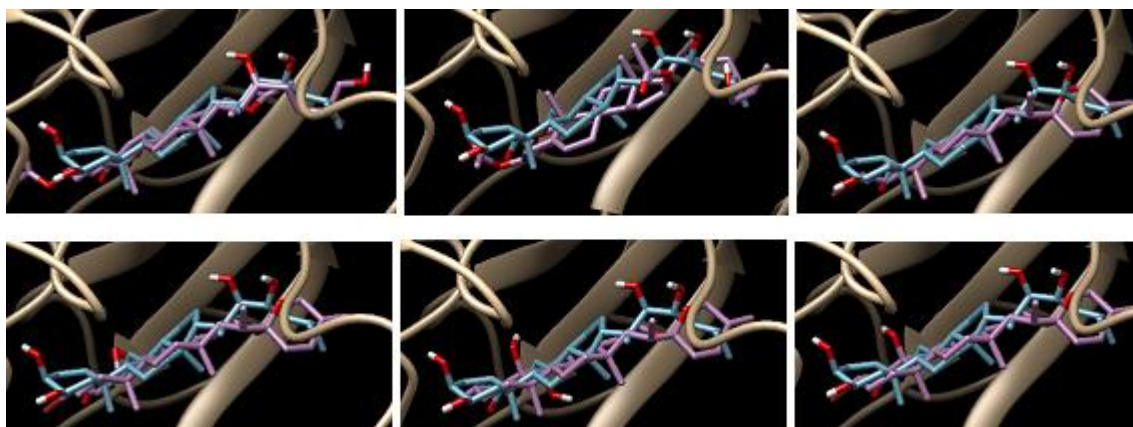


Figura 18. Modos de unión de todos los compuestos en el sitio activo del heterodímero A-C.

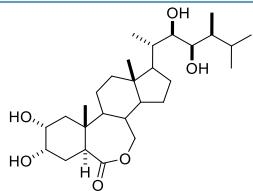
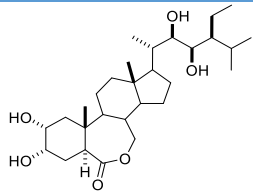
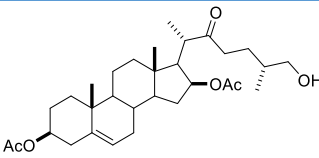
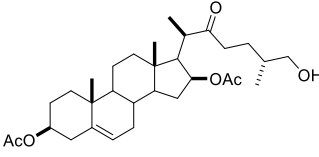
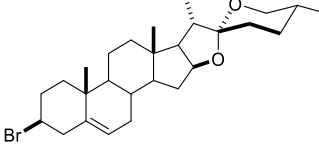
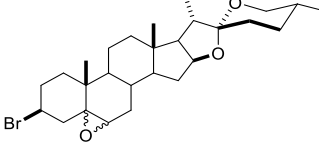
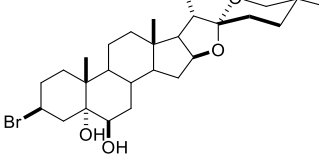
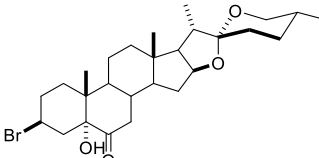
En la **Tabla 6**, se encuentran las mejores energías de acoplamiento (kcal/mol) de las interacciones proteína-ligando de los compuestos **14, 15, 19, 20** y **23-26**. Las representaciones 2D de dichas interacciones, se representan en las **Figuras 19** a **26**. Actualmente, existe información que menciona que los aminoácidos Tyr597, Trp564, Ser647, His61 y Val62 son forzosamente importantes para el reconocimiento de brasinoesteroides y análogos con la proteína BRI1-BAK1 [47].

En la **Tabla 7**, se observan que compuestos presentan contacto con los aminoácidos previamente mencionados y como era de esperarse los brasinoesteroides naturales (**14** y **15**) cumplen con lo anteriormente señalado, mientras que los compuestos **19, 20** y **23** tienen de 0 a 1 interacción importante.

Sin embargo los compuestos **24** a **26** presentan dos de las cinco interacciones principales, estos resultados no coinciden con la actividad promotora de crecimiento vegetal en las cebollas ya que el compuesto **25** tiene mayor actividad con respecto a la homobrasinólida.

Es importante comprender que los compuestos probados en el docking se están uniendo al heterodímero ya formado (BRI1-BAK1) cuando en realidad la unión del complejo BRI1-brasinoesteroide es lo que induce su formación, es así que se optó por evaluar las energías de acoplamiento de los compuestos con la proteína BRI1 con la clave 3RGZ.

Tabla 6. Estructuras y energías de acoplamiento de los compuestos evaluados en el heterodímero A-C.

Clave	Estructura	Energía de acoplamiento (kcal/mol)
14		-13.3
15		-12
19		-10.7
20		-11
23		-12.5
24		-11
25		-10.6
26		-10.5

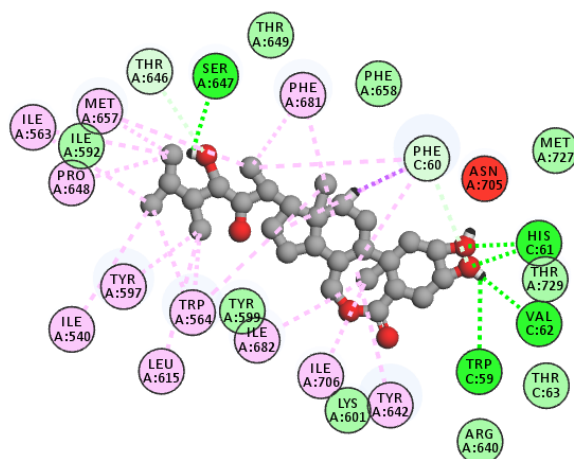


Figura 19. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **14**.

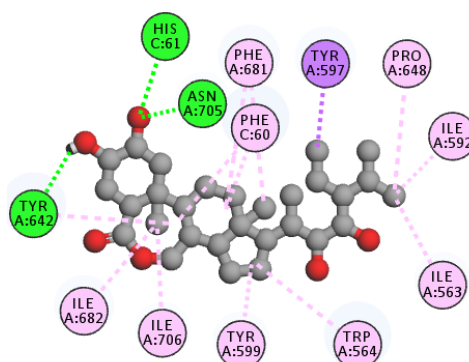


Figura 20. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **15**.

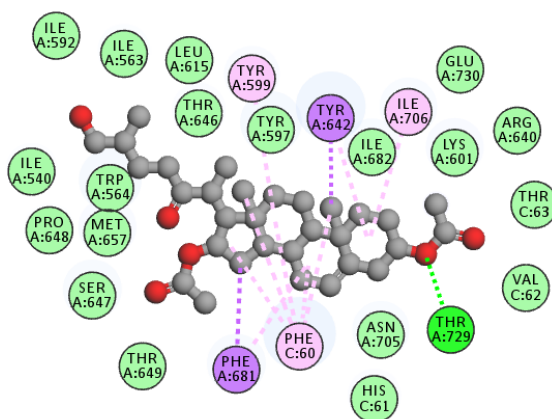


Figura 21. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **19**.

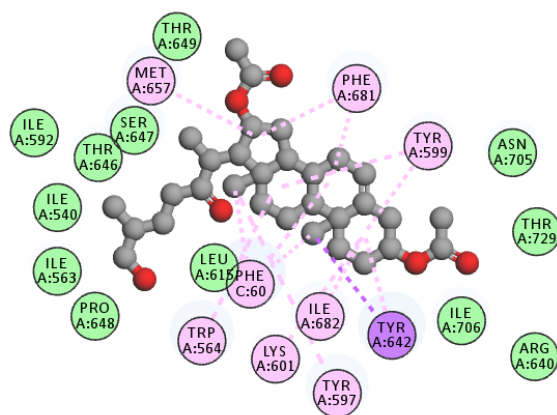


Figura 22. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **20**.

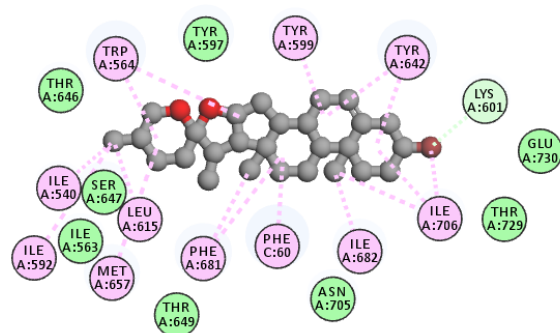


Figura 23. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **23**.

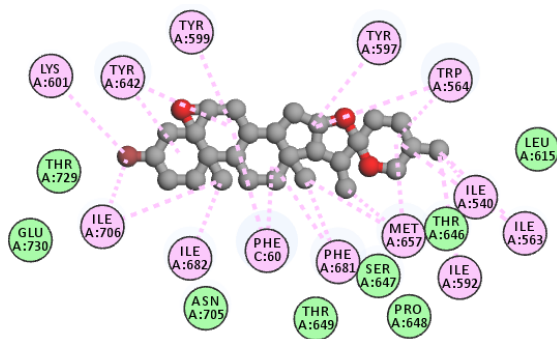


Figura 24. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **24**.

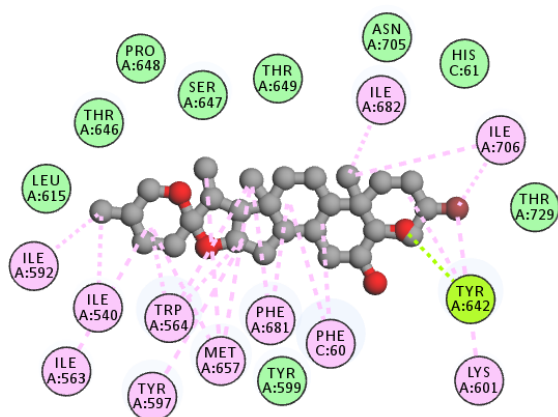


Figura 25. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **25**.

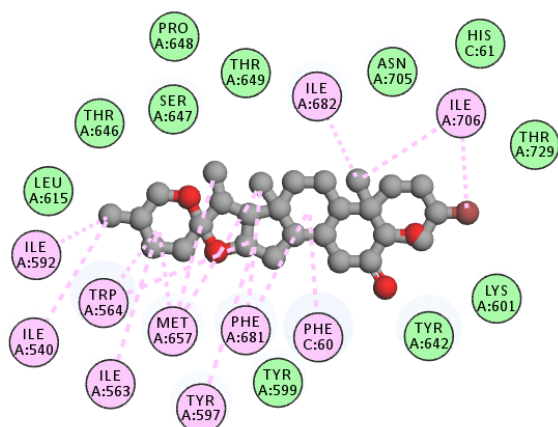


Figura 26. Diagrama de 2D de las interacciones del complejo BRI1-BAK1 con el compuesto **26**.

Tabla 7. Interacciones de los compuestos con los residuos del heterodímero A-C.

Compuesto	Heterodímero	Tyr597	Trp564	Ser647	His61	Val62
14	A-C	Si	Si	Si	Si	Si
15	A-C	Si	Si	Si	Si	Si
19	A-C	No	No	No	No	No
20	A-C	No	Si	No	No	No
23	A-C	No	Si	No	No	No
24	A-C	Si	Si	No	No	No
25	A-C	Si	Si	No	No	No
26	A-C	Si	Si	No	No	No

- **Estudios docking con la proteína BRI1 con la clave 3RGZ**

La proteína BRI1 es un monómero que cuenta con un surco hidrófobo que permite el reconocimiento de brasinoesteroides con un dominio de 70 residuos (587-656) que son indispensables para dicha unión, así mismo en la proteína cristalizada se encuentran moléculas de agua que establecen puentes de hidrogeno entre la brasinólida cocrystalizada y los aminoácidos Hist645, Ser647, Tyr597 y Tyr599 [50]. Los estudios docking se realizaron sobre dos proteínas preparadas, las cuales en una de ellas, se conservan las moléculas de agua (**BRI1-W**) y en la otra fueron eliminadas (**BRI1-**) con el objetivo de observar el efecto ejercido de tales moléculas sobre los compuestos de estudio. Al igual que la proteína BRI1-BAK1, se validaron los parámetros mediante el re-docking de las proteínas **BRI1-W** y **BRI1-**, obteniendo un RMSD de 0.505 ± 0.061 Å y 0.609 ± 0.050 Å, respectivamente (**Figura 27**). En la **Figura 28**, se observan los modos de unión de todos los compuestos en el sitio activo de la proteína **BRI1-** con una distribución espacial igual a la del ligando cocrystalizado.

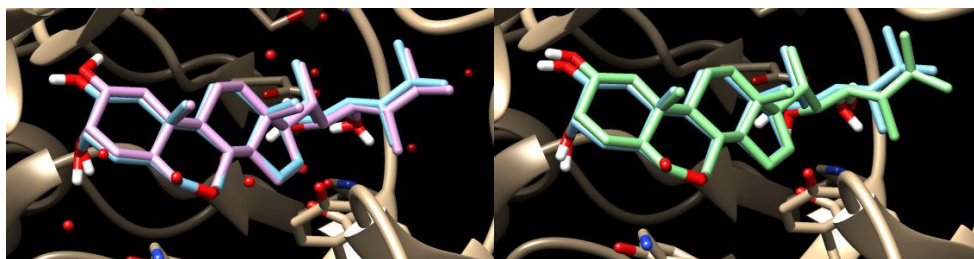


Figura 27. Redocking del compuesto **14** y del ligando cocrystalizado de las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha) con un RMSD de 0.505 Å y 0.609 Å, respectivamente.

Los aminoácidos más importantes de la proteína BRI1 para la unión de la brasinólida (brasinoesteroide natural con la mayor actividad biológica) están identificados en todo el cuerpo esteroideal. En el núcleo derivado del ciclopenta[α]fenantreno, el anillo A hace contacto ligero con la superficie, mientras que los anillos B y C-D interaccionan con Tyr642 y Phe681-Tyr599, respectivamente. Así mismo, el grupo hidroxilo del C-6 forma un puente de H con Lys601 a través de una molécula de agua intermedia. En el caso de la región de la cadena hidrocarbonada de C-17, las interacciones más importantes son el puente de H del grupo hidroxilo del C-23 con Ser647 y la internalización del resto de la cadena en un bolsillo hidrofóbico [50]. En la **Figura 29**, se observan las interacciones previamente señaladas en 2D de la brasinólida (**14**) con las

proteínas preparadas **BRI1-W** y **BRI1-**. Las energías de acoplamiento son de -10.9 kcal/mol para **BRI1-W** y -9.7 kcal/mol para **BRI1-**, está diferencia energética podría ser atribuida por las interacciones de puentes de H de las moléculas de agua. Esto mismo, se ve reflejado con el resto de los compuestos en las **Figuras 30 a 35** (Diagramas 2D) y en la **Tabla 8** (Energías de acoplamiento).

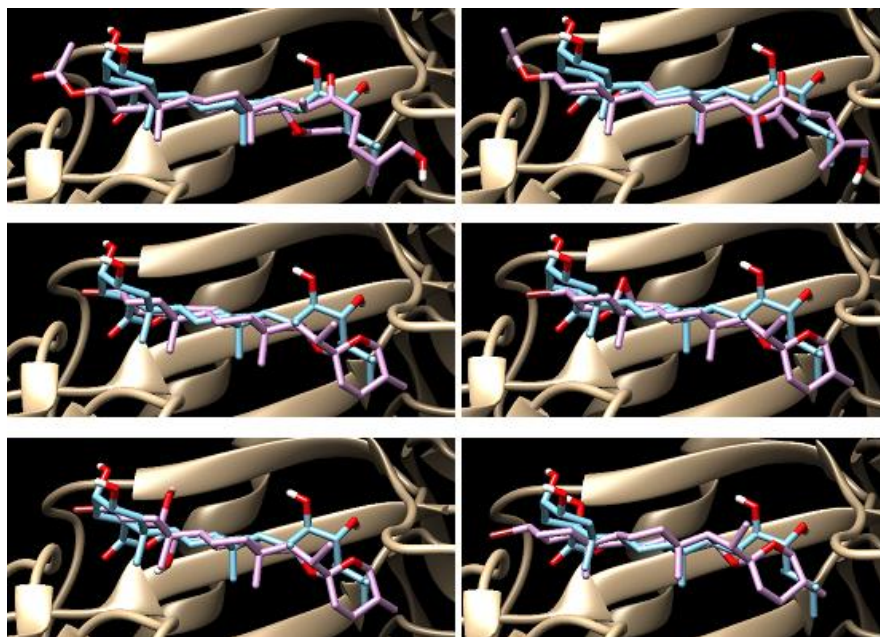


Figura 28. Modos de unión de todos los compuestos en el sitio activo de la proteína **BRI1-**.

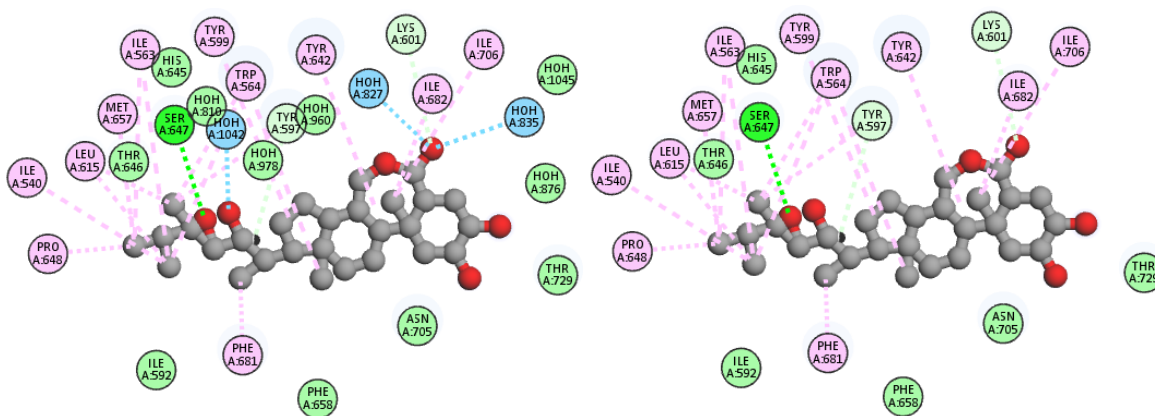


Figura 29. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto **14** con las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha).

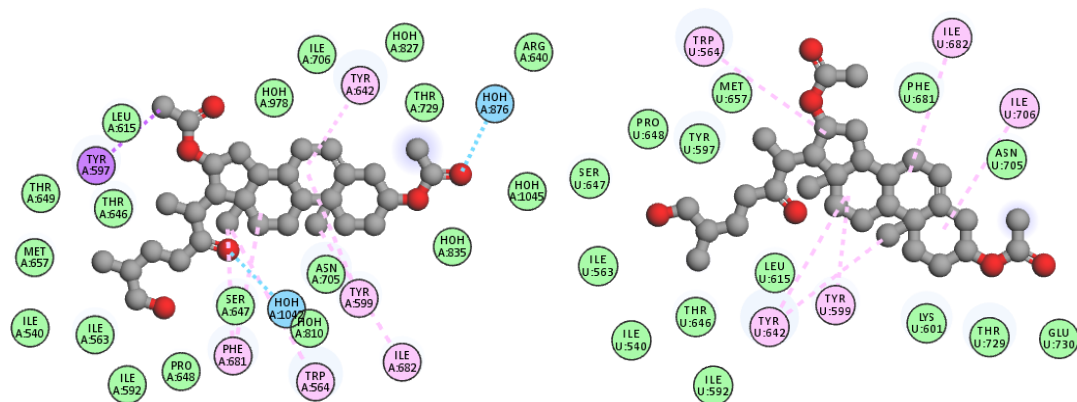


Figura 30. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto **19** con las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha).

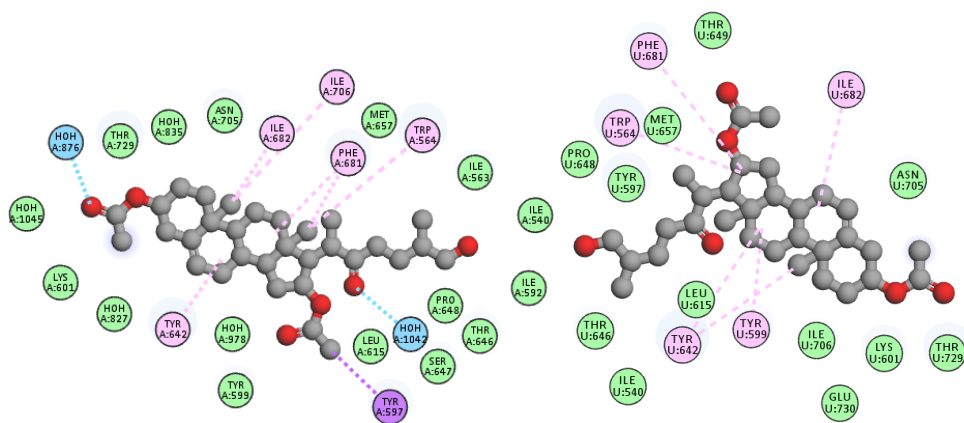


Figura 31. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto **20** con las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha).

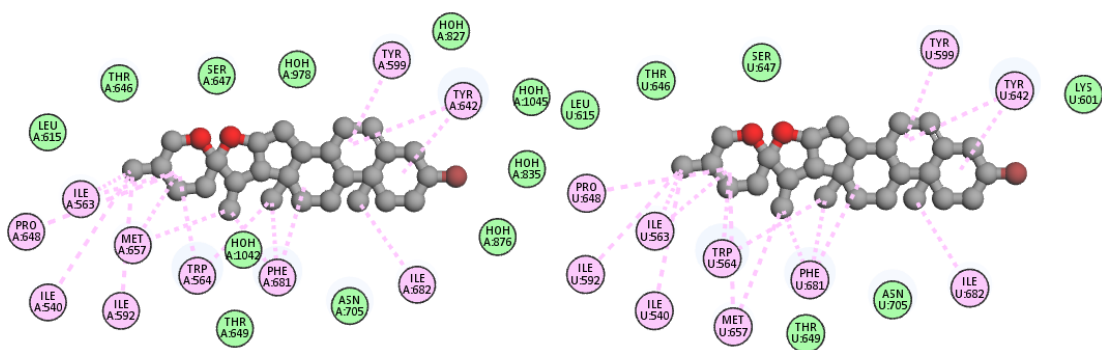


Figura 32. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto **23** con las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha).

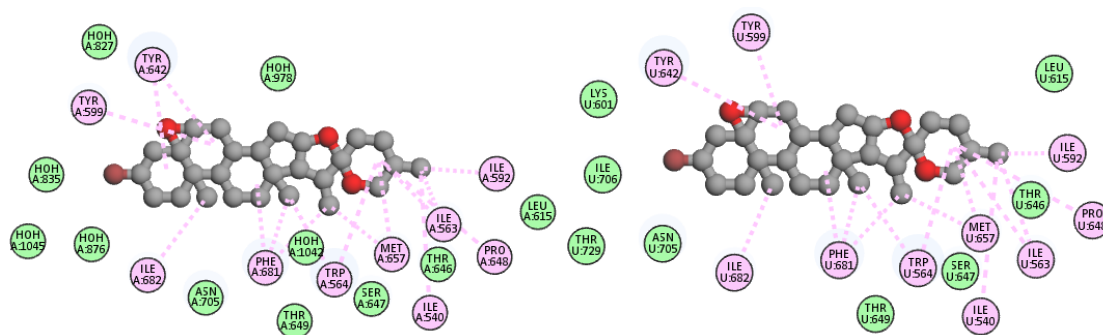


Figura 33. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto **24** con las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha).

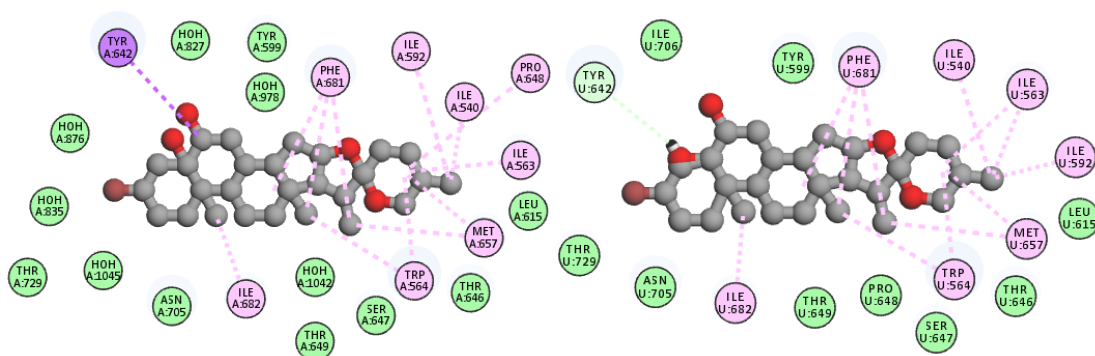


Figura 34. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto **25** con las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha).

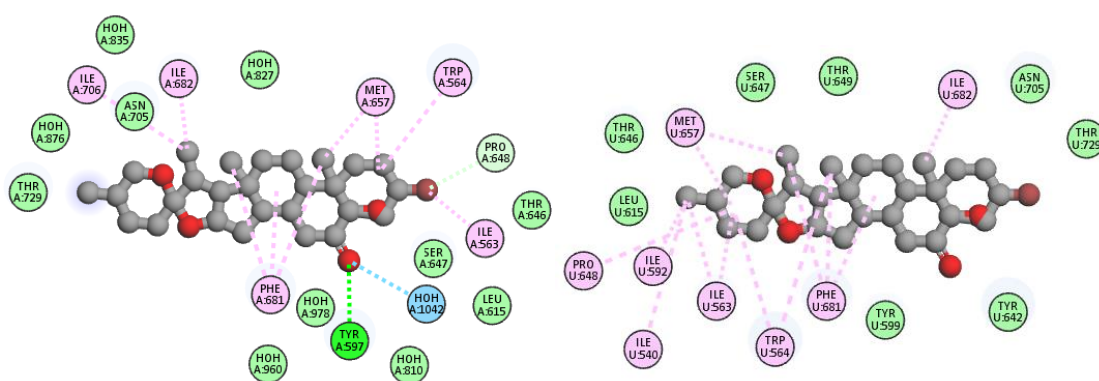
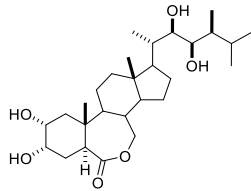
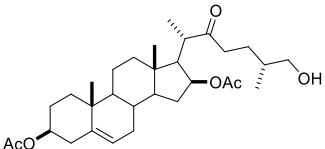
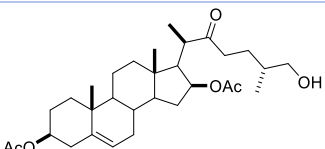
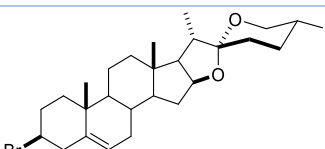
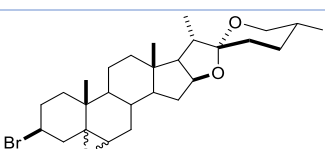
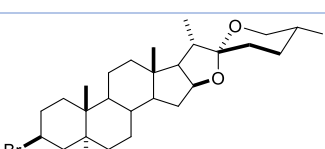
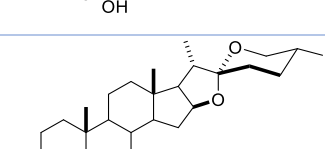


Figura 35. Diagrama de 2D de las interacciones del compuesto **26** con las proteínas **BRI1-W** (izquierda) y **BRI1-** (derecha).

Tabla 8. Estructuras y energías de acoplamiento de los compuestos evaluados con las proteínas **BRI1-W** y **BRI1**.

Clave	Estructura	Energía de acoplamiento (kcal/mol)	
		BRI1-	BRI1-W
14		-9.7	-10.9
19		-9.2	-9.5
20		-9.8	-9.9
23		-12	-11.6
24		-11.7	-11.2
25		-10.4	-10.6
26		-10.7	-10.5

En la **Tabla 9**, se resumen los diagramas 2D de las interacciones de los compuestos **19**, **20** y **23** a **26** con los aminoácidos atribuidos a la unión del compuesto **14**. En ella se observa que todos los compuestos presentan interacción con Ser647 pero no por puente de H, si no por interacciones de Van der Waals, este resultado coincide con la estructura química de los demás compuestos ya que no presentan un grupo donador de protones en posición 23. De la misma manera, existe una interacción nula o parcial (no forman puentes de H) con Lys601 ya que este aminoácido interacciona con el grupo hidroxilo de la lactona del compuesto **14**.

Tabla 9. Comparación de las interacciones de los compuestos con los residuos de las proteínas **BRI1-W** y **BRI1-**

Compuesto	Proteína	Tyr642	Phe681	Tyr599	Lys601 (-H)	Ser647 (-H)
14	BRI1-W	Si	Si	Si	Si	Si
	BRI1-	Si	Si	Si	Si	Si
19	BRI1-W	Si	Si	Si	X	±
	BRI1-	Si	Si	Si	X	±
20	BRI1-W	Si	Si	Si	X	±
	BRI1-	Si	Si	Si	±	±
23	BRI1-W	Si	Si	Si	X	±
	BRI1-	Si	Si	Si	±	±
24	BRI1-W	Si	Si	Si	X	±
	BRI1-	Si	Si	Si	±	±
25	BRI1-W	Si	Si	Si	X	±
	BRI1-	Si	Si	Si	X	±
26	BRI1-W	X	Si	X	X	±
	BRI1-	Si	Si	Si	X	±

Uno de los resultados más interesantes son las energías de acoplamiento de la proteína **BRI1-** con los compuestos **23** a **26** ya que estos a pesar de no presentar dos interacciones importantes por puentes de H con Lys601 y Ser647, si muestran más contactos con respecto al compuesto **14** en el dominio hidrófobo con los residuos de 587 a 656 que son indispensables para la actividad biológica de los brasinoesteroides [50]. Esto se debe al gran número de interacciones hidrofóbicas que presentan en el surco superficial que domina la hidrofobicidad, en la **Figura 36** se observa la internalización de dichos compuestos en el sitio activo de la proteína **BRI1-** mientras que en la **Figura 37** se visualiza el compuesto **14** que no presenta la misma internalización ni la misma cantidad de interacciones hidrofóbicas.

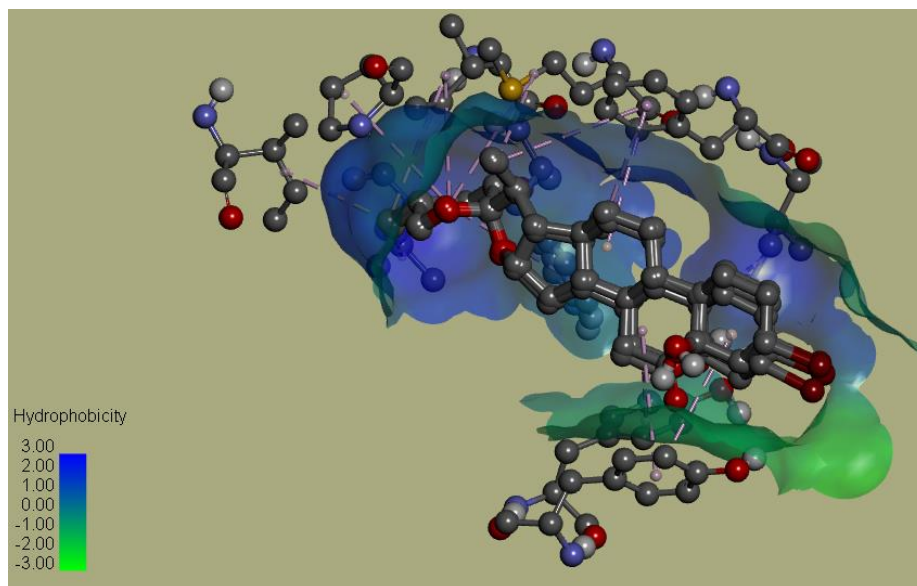


Figura 36. Internalización e interacción hidrofóbica (líneas punteadas) de los compuestos **23** a **26** con el sitio activo de la proteína **BRI1**-.

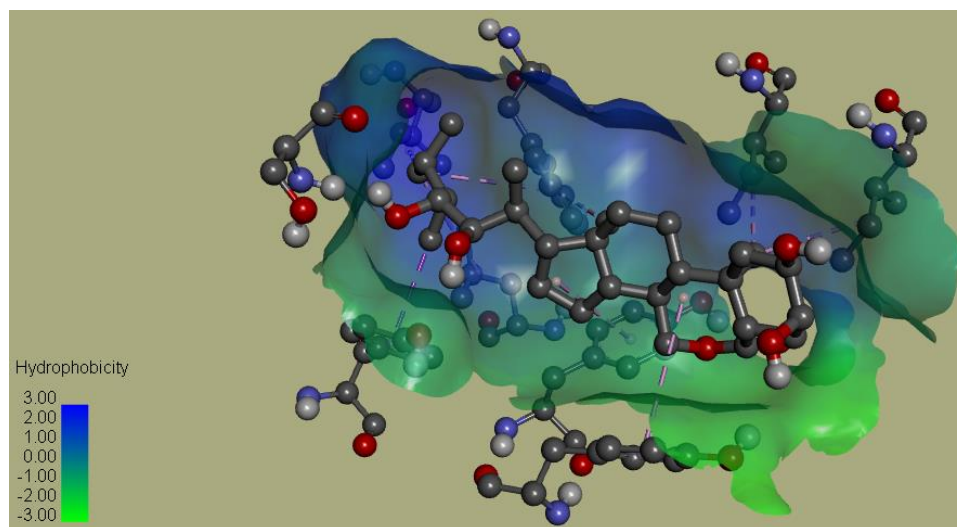


Figura 37. Pequeña internalización e interacción hidrofóbica (líneas punteadas) del compuesto **14** con el sitio activo de la proteína **BRI1**-.

Los compuestos **23** a **26**, muestran mayor actividad de crecimiento de tallo en cebollas a los cinco días de exposición con respecto a la homobrasinólida, estos compuestos presentan en común la presencia de un átomo de bromo en posición C-3 β por lo que surge la posibilidad que la ausencia de grupos hidroxilos en el anillo A puede ser compensada con grupos hidrofóbicos y rígidos sobre el anillo D como lo son los esteroestanos. Actualmente, existe información que respalda esta interpretación de resultados, en donde la relación estructura-actividad de derivados de brasinoesteroides se ve dependiente de la cadena lateral, por mencionar un ejemplo de ello, el acortamiento o introducción de grupos polares atenúa significativamente la actividad biológica [51] [52]. Así mismo, el grupo de investigación que reportó el cristal de rayos X de la proteína BRI1 con clave PDB: 3RGZ, sugiere el diseño racional de moléculas no esteroideas de naturaleza hidrofóbica que mimeticen la actividad biológica de brasinoesteroides [50]. En la **Figura 38**, se observan algunos compuestos comerciales que surgieron del desarrollo por cribado *in silico* que exhiben actividad promotora de crecimiento vegetal en bioensayos de elongación de hipocótilos de rábano [53].

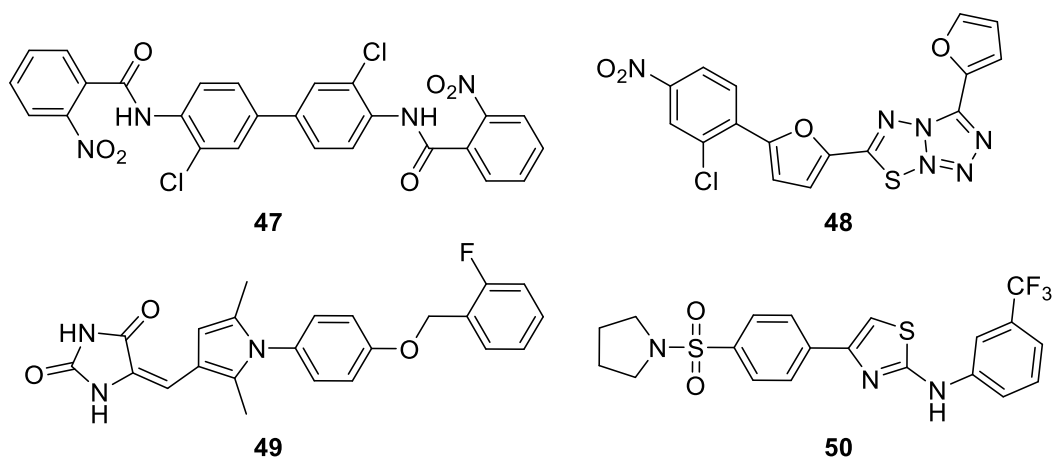


Figura 38. Compuestos seleccionados por estudios *in silico* basados en estudios de detección y acoplamiento dentro de los sitios activos de los receptores **BRI1** y **BRI1-BAK1**.

En el análisis general de los estudios docking con las proteínas **BRI1-**, **BRI1-W** y **BRI1-BAK1**, se observa que la primera presenta mayor relación con los resultados experimentales, por lo que dicha proteína debe ser considerada para el diseño dirigido de nuevos compuestos con actividad promotora de crecimiento vegetal.

Cabe destacar que los estudios docking empleados en el presente capítulo son a partir de los compuestos sintetizados en el laboratorio, los cuales pueden sufrir biotransformaciones y manifestar diferentes interacciones y comportamientos con la gran diversidad de receptores biológicos que exhiben las plantas [54]. Sin embargo, en las pruebas biológicas el compuesto **25** ostenta de una actividad superior a la homobrasinólida en la elongación del tejido vegetal en raíz y tallo en cebollas, por lo que dicho compuesto debe ser estudiado con otras especies de gran interés para ser candidato a estudios a nivel invernadero.

Conclusiones

- El compuesto **25** presenta mayor actividad con respecto a la homobrasinólida en el crecimiento de tallo y raíz en *Allium cepa L.* a una concentración de 0.1 mg/l.
- Los estudios docking de la proteína preparada **BRI1** exhibe mayor relación con las pruebas biológicas de crecimiento vegetal en *Allium cepa L.*
- Se amplió la relación estructura-actividad de promotores de crecimiento vegetal con base a estudios *in silico* de nuevas moléculas espiroestánicas, los cuales presentan un gran número de interacciones hidrofóbicas en el surco hidrófobo de la proteína **BRI1**.
- Los estudios *in vivo* e *in silico* de los compuestos **23** a **25**, revelan que la ausencia de grupos hidroxilos en el anillo A, puede ser compensada con grupos hidrofóbicos y rígidos sobre el anillo D en la actividad biológica de análogos de brasinoesteroides.

Bibliografía

1. Ringuélet, J; Viña, S. *Productos Naturales Vegetales*. Universidad Nacional de la Plata. **2013**.
2. Salgado-Garciglia, R.; Cortés-Rodríguez, M.A.; Del Río R.E. *Journal of Plant Physiology*. **1997**, 100, 710.
3. Khripach, V.; Zhabinskii, V.; Groot, A. *Annals of Botany*. **2000**, 86, 441-447.
4. Fieser, L.; Fieser, M. *Steroids*. Reinhold Publishig Corporation, **1959**.
5. Favre, H.; Powell, W. *Royal Society of Chemistry*. **2013**, 10, 1515-1542.
6. Klyne, W. *Química de los esteroides*. Compañía Editorial Continental, **1970**.
7. Dewick, P. *Medicinal Natural Products*. John Wiley & Sons, **1997**.
8. Marker, E.; R, Tsukamoto, T.; Turner, D. *Journal of the American Chemical Society*. **1940**, 62, 2525.
9. Fujioka, S.; Noguchi, T.; Takatsuto, S.; Yoshida, S. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1841- 1848.
10. Srivastava, L. *Annals of Botany*. **2002**, 141-152.
11. Takatsuto, S. *Journal of Chromatography A*. **1994**, 658, 3-15.
12. Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J.; Rodríguez-Acosta, M.; Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M. *Steroids*. **2015**, 98, 126-131.
13. Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J.; Rodríguez-Acosta, M.; Carrasco-Carballo, A.; Hernández-Linares, M.; Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M. *Steroids*. **2017**, 125, 20-26.
14. Hilario-Martínez, J. *Obtención del diacetato de (25R)-22,26-epoxicolestano-5,22-dieno-3 β ,16 β -diilo y su potencialidad sintética (Tesis de Maestría en Ciencias Químicas)*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. **2014**.
15. Santos-Cabrera, I. *Papel de compuestos promotores de crecimiento vegetal sobre plantas infectadas con virus (Tesis de Licenciatura en Biotecnología)*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. **2018**.
16. Binderup, L.; Latini, S.; Bretting, C.; Calverley, M.; Hansen, K. *Biochemical Pharmacology*. **1991**, 42, 1569-1575.
17. Houha, Li.; Clément, M. *Journal of the American Chemical Society*. **2015**, 137, 10720-10727.
18. Armarego, W.L.F.; Perrin, D. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth Heinemann. **2009**.
19. Sigma-Aldrich. www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b1439?lang=es®ion=MX. [consulta: junio de 2020].
20. Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J.; Sánchez-Cantú, M.; Fernández-Herrera, M.; Sandoval-Ramírez, J. *Green Chemistry*. **2019**, 21, 1417-1420.

21. Sánchez-Cantú, M.; Pérez-Díaz, L.; Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J.; Sandoval-Ramírez, J. *Renewable Energy*. **2019**, 130, 174-181.
22. Peres, A.; Soares, J.; Tavares, R.; Righetto, G.; Zullo, M.; Mandava, B.; Menossi, M. *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**, 20, 331.
23. Mohammad, A.; Muhammad, A.; Ahmand, P. *Journal of Plant Growth Regulation*. **2018**, 37, 1007-1024.
24. Jinna, L.; Zhang, D.; Sun, X.; Ding, T. *Steroids*. **2017**, 124, 1-17.
25. Brosa, C.; Soca, L.; Terricabras, E.; Ferrer, J. *Tetrahedron*. **1998**, 54, 12337-12348.
26. Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F.; Medina-Franco, J. *Educación Química*. **2017**, 28, 51-58.
27. Zhenbiao, X.; Shanshan, G.; Sun, Q. *Advanced Materials Research*. **2014**, 848, 199-202.
28. Wachsman, M.; Ramírez, J.; Talarico, J.; Galagovsly, L. *Current Medicinal Chemistry*. **2004**, 3, 163-179.
29. Soto-Castro, D.; Contreras, R.; Pina-Canseco, M.; Rincón, S. *Steroids*. **2017**, 126, 92-100.
30. Gonggong, H.; Bo, L.; Chunbao, L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61, 2913-2918.
31. Fieser, L.; Srinivasa R. *Journal of the American Chemical Society*. **1949**, 71, 3938-3941.
32. Dawidar, A.; Saleh, A.; Abdel-Malek, M. *Zeitschrift Naturforschung*. **1980**, 35, 102-106.
33. Rivera, D.; León, F.; Coll, F.; Davison, G. *Steroids*. **2006**, 71, 1-11.
34. Yates, P.; Stiver, S. *Canadian Journal of Chemistry*. **1987**, 65, 2203-2216.
35. Iglesias-Arteaga, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Dios-Bravo, G.; Rosado-Abón, A. *Steroids*. **2012**, 77, 461-466.
36. Fan, J.; Shan, Z.; Liang, J.; Liu, X.; Yang, L. *Journal of Physical Organic Chemistry*. **2008**, 21, 945-953.
37. Sigma-Aldrich. www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b1439?lang=es®ion=MX. [consulta: junio de 2020].
38. Antoine-D.; Michielin, O.; Zoete, V. *Scientific Reports*. **2017**, 7, 42727.
39. Orbán-Mihálykó, É.; Béla, G. *Computer and Chemical Engineering*. **2004**, 28, 2493-2508.
40. Knopf, C.; Okos, M.; Reklaitis, V. *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development*. **1982**, 21, 79-86.
41. Prieto-Martínez, F.; Arciniega, M.; Medina-Franco, J. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. **2018**, 21, 65-87.
42. Scior, T.; Bernard, P.; Medina-Franco, J.; Maggiora, G. *MiniReviews in Medicinal Chemistry*. **2007**, 7 (8), 851-860.

43. Talele, T.; Khedkar, S.; Rigby, A. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2010**, 10 (1), 127-141.
44. Hothorn, M.; Belkhadir, Y.; Dreux, M.; Dabi, T.; Noel, J.; Wilson, J.; Chory, J. *Nature*. **2011**, 474, 467-471.
45. Santiago, J.; Henzler, C.; Hothorn, M. *Science*. **2013**, 341, 889-892.
46. Fiskesjo, J. *Hereditas*. **1985**, 102, 99-112.
47. Díaz, K.; Espinoza, L.; Carvajal, R.; Conde-González, M.; Niebla, V.; Coll, Y. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21, 1832.
48. Moreno-Castillo, E.; Ramírez-Echemendía, D.; Hernández-Campoalegre, G.; Mesa-Tejeda, D.; Coll-Manchado, F.; Coll-García, Y. *Steroids*. **2018**, 138, 35-42.
49. Trott, O.; Olson, A. *Journal of Computational Chemistry*. **2010**, 31, 455-461.
50. She, J.; Han, Z.; Tae-Wuk, K.; Wang, J.; Cheng, W.; Chang, J.; Shi, S.; Jiawei, W.; Maojun, Y.; Zhi-Yong, W.; Chai, J. *Nature*. **2011**, 474, 472-477.
51. Back, T.; Pharis, R. *Journal of Plant Growth Regulation*. **2003**, 22, 350-361.
52. Zullo, M.; Adam, G. *Journal of Plant Physiology*. **2002**, 14, 143-181.
53. Beilei, L.; Ningjuan, H.; Xiaoxue, D.; Jiyuan, L.; Xiaojun, Y. *Molecular BioSystems*. **2017**, 13, 1364-1369.
54. She, J.; Han, Z.; Zhou, B.; Chai, J. *Protein and Cell*. **2013**, 4, 475-382.