



# **BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

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

**Posgrado en Ciencias Químicas**

## **“Diseño, síntesis y evaluación de 22-oxocolestánicos modificados en C-26, como promotores de crecimiento vegetal”**

Tesis para obtener el título de  
**Maestra en Ciencias Químicas**  
en el área de **Química Orgánica**

presenta:

**I.Q. Guiee Niza López Castillo**

Director de tesis:  
Dra. Ma. Laura A. Orea Flores

Codirector de tesis:  
Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Puebla, marzo 2024.





La presente investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, bajo la dirección de la Dra. María Laura Asunción Orea Flores y el Dr. Jesús Sandoval Ramírez, con la beca 826153-03877 otorgada por el CONAHCYT en el periodo enero 2022-diciembre 2023.





# BUAP

## A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Joel Luis Terán Vázquez, Dr. Alan Carrasco Carballo, Dra. Lourdes Millán Pérez Peña y el Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Diseño, síntesis y evaluación de 22-oxocolestánicos modificados en C-26, como promotores de crecimiento vegetal”**, que presenta la alumna **Guiee Niza López Castillo** para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintiséis días del mes de febrero del año dos mil veinticuatro.

**ATENTAMENTE**

Dr. Joel Luis Terán Vázquez

Dr. Alan Carrasco Carballo

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón



## DEDICATORIA

*Por suerte estás tú.  
Que, sin importar los huracanes,  
siempre, siempre serás mi calma.*

*A mi madre, Romelia Castillo Montero,  
la tercera será la vencida.*

*Mi motor en esta vida, de ti todo deriva. Por la comprensión, el tiempo  
a mi lado y el apoyo. Me enseñaste bien, gracias por darme el valor  
de volar alto.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación, de orientarme y enseñarme cosas nuevas de este mundo que es la investigación. Es, y siempre será una inspiración para mí.

A la Dra. Laura Orea Flores, gracias por permitirme continuar con mi formación, por el apoyo a lo largo de esta etapa y por el cariño que me brindó.

A la comisión revisora por sus aportaciones y el tiempo brindado para la mejora de este trabajo de tesis de maestría.

Al Dr. Joel Luis Terán Vázquez, gracias por la orientación a través de esta etapa y por ser un modelo que seguir.

Al Dr. Alan Carrasco Carballo, por confiar en mí, por saber lo mucho que soy capaz de hacer y recordármelo cuando es necesario. No hay palabras que logren demostrar lo agradecida que estoy contigo, pero puedo continuar trabajando bien y con ganas para que este orgulloso de mí. Algún día seré una nube.

A mi familia, gracias por la comprensión de mi ausencia y aún así siempre estar orgullosos y felices por mí.

Marco Antonio Anaya García, Ana Laura Palacios Cepeda. Mundos distintos, pero un cariño igual de inmenso. Aún en la distancia, siempre están conmigo.

A los maestros en ciencias, Jesús Alberto Rojas Morales, Daniel Francisco Mendoza Lara y David Antonio Mora Martínez. En la investigación no solo se forman colegas, también amistades eternas, gracias por su amistad, el cariño que siempre me han dado, el apoyo en todo momento, los oídos eternos y sobre todo su presencia en mi vida. Espero siempre estar a la altura.

A Juan Alex Hernández Rivera, gracias por la paciencia en mi aprendizaje de enseñar, por brindarme tu amistad y por llevar a Esmeralda Aquino Miguel a mi vida. Los quiero mucho.

A mis Biomes coyuqueños favoritos, Ricardo Alonso Galeana Ascencio y Roberto Ángel Galeana Ascencio, gracias por llegar a mi vida y permanecer. Han sido un gran apoyo y fuente de risas, gracias infinitas. A mi Biome jarocho, Ana Giovanna Cortes Torres, hermana, te quiero. Por último, pero no menos importante, al Lic. en biomedicina Eduardo de Jesús Suárez Gonzáles, niño, fuiste parte de este desarrollo gracias por las risas.

Finalmente, quiero agradecer a todos los que conforman LESQO, no terminaría de enlistar a todos los que han sido parte de mi desarrollo, a quienes he tenido la oportunidad de enseñar, quienes me han enseñado cosas nuevas, a todos ustedes gracias.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. OBJETIVOS.....	13
CAPITULO 1. Estudios <i>in silico</i> .....	14
1.1 Antecedentes de estudios <i>in silico</i> para fitohormonas.....	15
1.1.1 BRI1 .....	17
1.1.2 BRI1-BAK1 .....	18
1.1.3 BRI1-SERK1 .....	21
1.2 Discusión de resultados .....	24
1.2.1 Elección de compuestos.....	24
1.3 Metodología.....	49
CAPITULO 2. Síntesis y caracterización.....	51
2.1 Antecedentes.....	52
2.1.1 Aperturas del espiroacetal espiroestánico .....	52
2.1.2 Síntesis de compuestos 22-oxocolestánicos .....	57
2.2 Discusión de resultados .....	61
2.3 Metodología.....	81
2.3.1 Equipos y técnicas. ....	81
2.3.2 Caracterización espectroscópica.....	82
CAPITULO 3. Evaluación biológica.....	87
3.1 Antecedentes de evaluación de fitohormonas .....	88
3.1.1 Antecedentes de esteroides evaluados .....	92
3.1.2 22-oxocolestanos como promotores de crecimiento vegetal.....	94
3.2 Evaluación biológica de compuestos 22-oxocolestanos como promotores de crecimiento vegetal.....	96
3.3 Metodología.....	102
3. CONCLUSIONES .....	103
4. BIBLIOGRAFÍA.....	104

## ABREVIATURAS

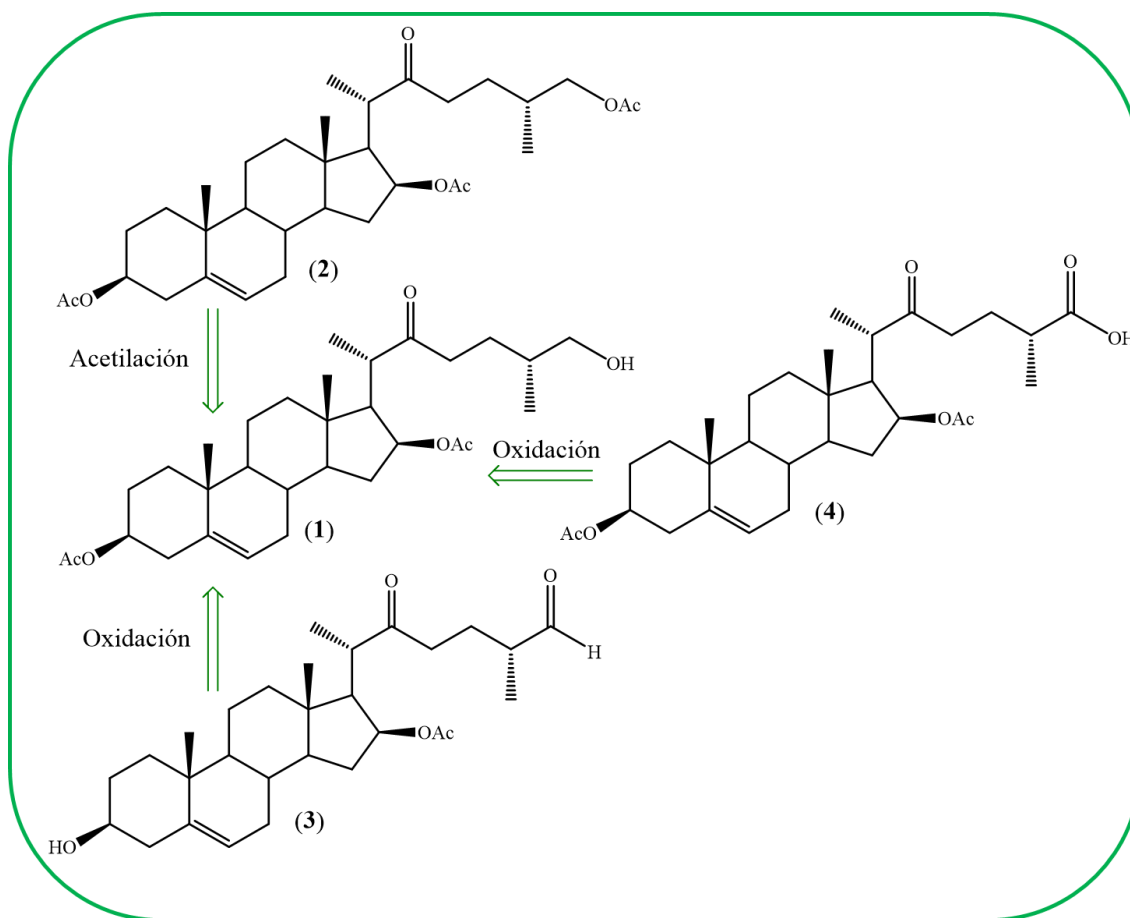
## CONCEPTO

AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
BL	Brasinólida
BR	Brasinoesteroide
COSY	COrrrelation SpectroscopY
EA	Energía de acoplamiento
GA	Giberelinas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
JAs	Jasmonatos
RMN	Resonancia magnética nuclear
SLs	Estrigolactonas
SP	Espirostano
PECV	Promotor esteroideal de crecimiento vegetal

## RESUMEN

El presente trabajo se divide en tres secciones; la primera detalla el estudio *in silico* de acoplamiento molecular de 1247 derivados 22-oxocolestánicos con el receptor BRI1 y los complejos BRI1-BAK1 y BRI1-SERK1 con lo que se determinó su potencial como promotores de crecimiento vegetal.

En la segunda sección se describe la síntesis de 4 compuestos 22-oxocolesténicos, seleccionados por el estudio *in silico*. Los derivados diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxoespirost-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**1**), triacetato de (25*R*)-22-oxoespirost-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo (**2**), diacetato de (25*R*)-22,26-dioxoespirost-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**3**) y el ácido (25*R*)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxi-22-oxoespirost-5-ene-26-carboxílico (**4**), fueron caracterizados física y espectroscópicamente.

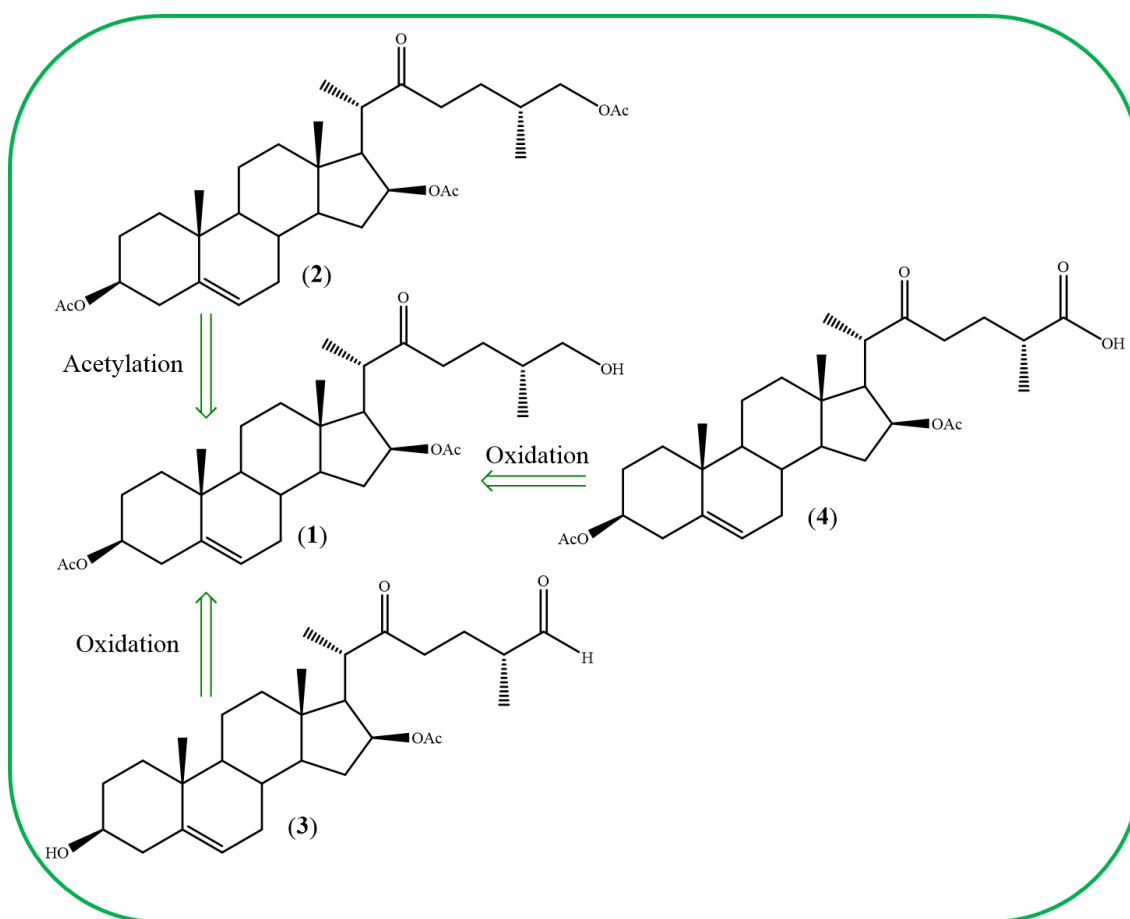


En la tercera sección se presentan los resultados de la evaluación biológica como promotores de crecimiento vegetal de **1-4**, a nivel experimental, utilizando como modelo el ensayo de elongación de plántulas de lechuga orejona, a una concentración de 0.1 mg/L, y los resultados en condiciones de campo para **2** a una concentración de 0.5 mg/L.

## ABSTRACT

The present work is divided into 3 parts, the first consisted of the *in silico* study by molecular docking of 1247 22-oxocholestane derivatives over the BRI1 receptor and the BRI1-BAK1 and BRI1-SERK1 complexes. Their potential as steroidal plant growth promoters were determined.

In the second stage, the synthesis of the 4 *in silico* selected 22-oxocholestane compounds was carried out. The derivatives (25*R*)-26-hydroxy-22-oxospirost-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diyl diacetate (**1**), (25*R*)-22-oxospirost-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triyl triacetate (**2**), (25*R*)-22,26-dioxospirost-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diyl diacetate (**3**) and (25*R*)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxy-22-oxospirost-5-ene-26-carboxylic acid (**4**) were characterized physically and spectroscopically.



The results of biological evaluation as plant growth promoters of **1-4** at experimental level are presented in the third section, using the elongation test of orejona lettuce seedlings at a concentration of 0.1 mg/L at lab level, and at 0.5 mg/L for field conditions for compound **2**.

## 1. INTRODUCCIÓN

La definición de fitohormona es descrita, por primera vez, en 1937 por Kenneth V. Thimann en su libro *Phytohormones*, generando un campo de estudio sobre el mecanismo por el cual funcionan; sin embargo, el uso de materiales que fueron empleados para mejorar los cultivos data de los tiempos de los fenicios, con el uso de extractos ricos en auxinas y leptinas [1].

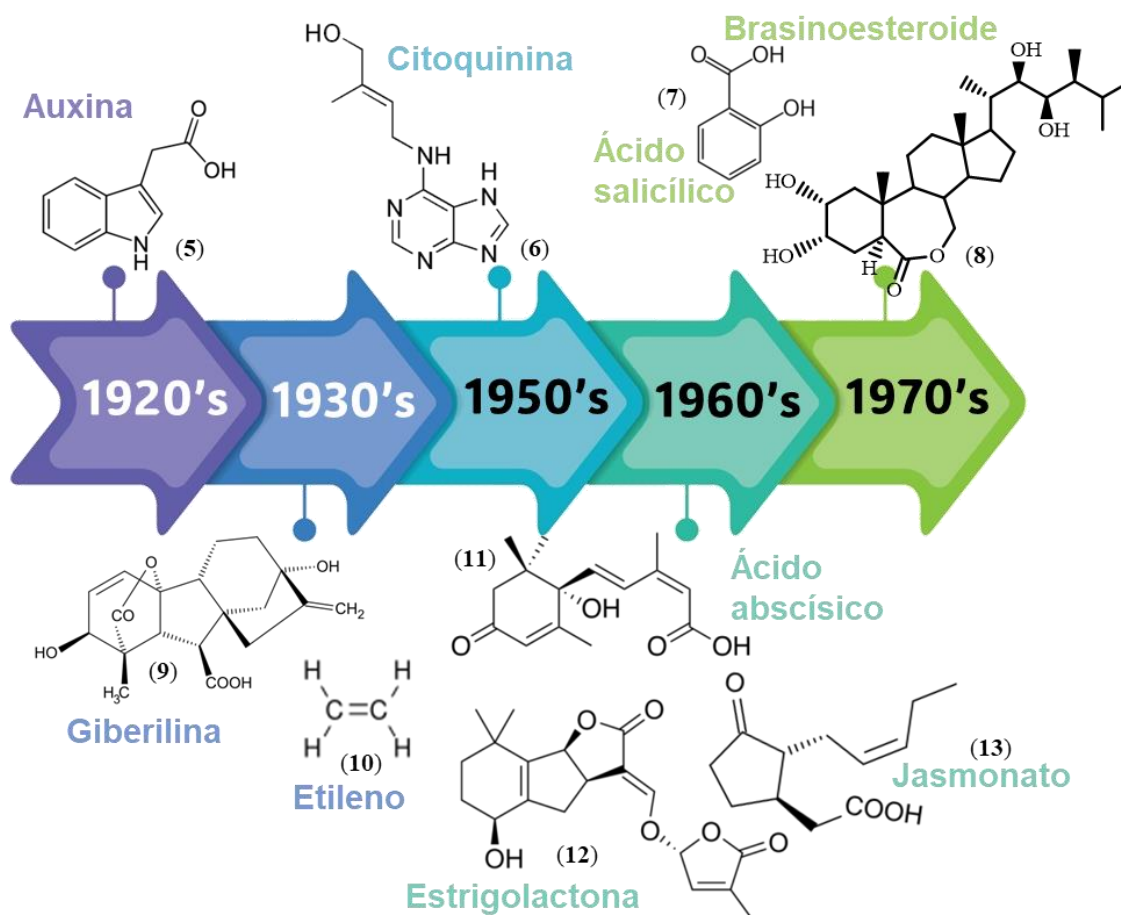
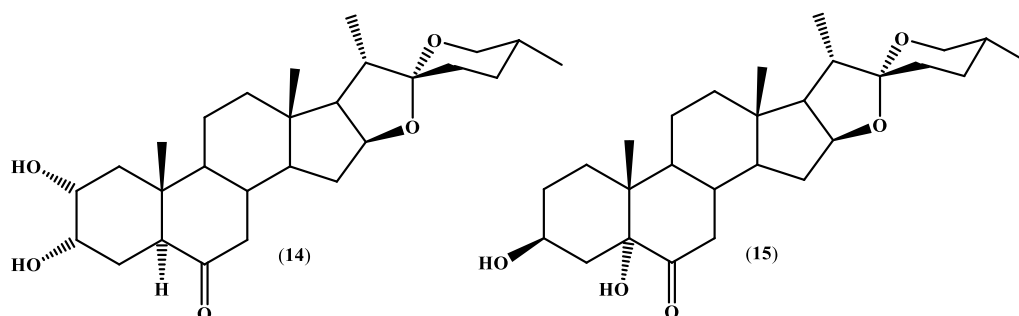


Figura 1. Evolución en el descubrimiento de fitohormonas.

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas en ser descubiertas, en 1928, por Frits W. Went y fue Thimann en 1935 quien logró su caracterización, siendo la más relevante el ácido indol-3-acético (AIA, **5**); las primeras auxinas sintéticas (1939) fueron el ácido 1-naftalenacético (ANA) y el ácido indol-3-butírico (AIB). Este último se aisló años más tarde, de hojas y semillas de maíz. La clasificación de las fitohormonas se realizó hasta finales de 1970; sin embargo, aún se siguen encontrando estructuras de interés (Figura 1) [1], [2], [3].

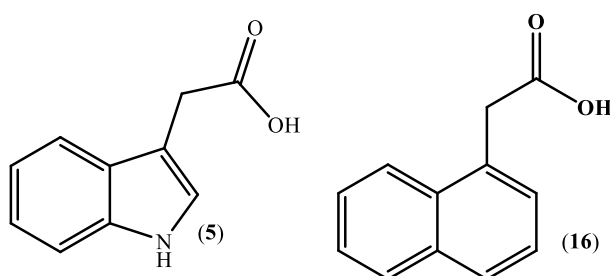
La aplicación de promotores de crecimiento vegetal a los cultivos para incrementar la calidad y sus rendimientos es un aspecto de gran interés debido a los beneficios económicos y sociales que representa. La evaluación exógena de fitohormonas naturales y sintéticas ha demostrado un efecto positivo en la producción agrícola, lo que ha impulsado la búsqueda de

nuevos derivados sintéticos. En Cuba se ha desarrollado, la formulación de productos con efecto promotor de crecimiento vegetal, como el Biobras-6 **14** o el Biobras-16 **15** (Figura 2) que poseen una alta actividad biológica y han sido evaluados en campos agrícolas sobre cultivos de maíz, frijol y arroz mediante aplicación foliar a bajas concentraciones, del orden mM, logrando la mejora del rendimiento en las cosechas y en la calidad de los cultivos [4], [5], [6].



**Figura 2. Biobras-6 (14) y Biobras-16 (15), fitohormonas sintéticas.**

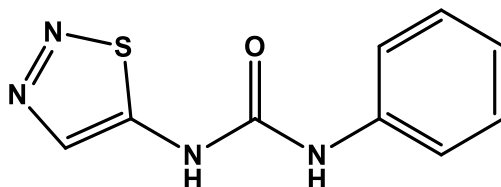
El ANA fue de los primeros análogos sintéticos de las auxinas producidos a nivel laboratorio y que fue escalado a nivel industrial debido a su amplio uso en la agricultura; su función depende de la dosis y etapa del cultivo en que se aplique. Algunos efectos son el favorecer el enraizamiento y evitar la caída prematura del fruto; sin embargo, a concentraciones altas presenta actividad inhibitoria del crecimiento. El melón es una hortaliza de alto consumo a nivel mundial; desde 1990 Venezuela se ha dedicado a la producción de melones para exportación y por ello necesita que sus cosechas cumplan con ciertos parámetros relacionados a la calidad del fruto, en este ámbito la investigación agrícola se ha enfocado en evaluar la aplicación exógena de ANA **16** y AIA **5** (Figura 3) en diferentes concentraciones y etapas del cultivo, donde la aplicación de ANA a 50 y 100 mg/L a los 7 días de la floración mejoraron considerablemente el volumen del melón lo que ha permitido a los productores venezolanos ser exportadores competitivos de este fruto [7].



**Figura 3. Ácido 3-indolacético (5) y ácido 1-naftalenacético (16).**

El uso de tidiazuron (TDZ, **17**, Figura 4) ha demostrado tener respuestas fisiológicas en las plantas que son similares al de las citoquininas, por lo que es considerado un análogo de este

grupo de fitohormonas. Su síntesis y uso como promotor de crecimiento fue patentado a principios de 1980 por la farmacéutica alemana Schering AG y en la agricultura se usa para acelerar el proceso de maduración, prevenir que las hojas se marchiten y prolongar la vida de los frutos cortados; a dosis altas funge como herbicida. Debido a que hacía falta su evaluación ambiental y sanitaria, la Unión Europea en 2008 lo eliminó del mercado, pero en Estados Unidos, Australia y México se continúa utilizando [8], [9], [10].



**Figura 4. Tidiazuron (17).**

Algunas de las limitantes para el uso de fitohormonas naturales es su bajo rendimiento de extracción, ya que sus concentraciones en las plantas son mínimas; obtenerlas mediante síntesis involucra múltiples etapas de reacción lo que disminuye los rendimientos. El diseño de derivados con estructuras similares puede asegurar que éstas presenten actividad al mismo nivel. Una alternativa para optimizar el uso de estos recursos es mediante estudios bioinformáticos, que permiten realizar predicciones y determinar el potencial teórico de su bioactividad. Además, una gran ventaja de los medios bioinformáticos es que permiten evaluar un gran número de derivados y hacer una selección puntual de candidatos a síntesis para su evaluación biológica, disminuyendo los costos y el tiempo que conlleva un estudio experimental.

Con la finalidad de determinar la analogía de la bioactividad entre compuestos sintéticos y fitohormonas naturales, se pueden realizar estudios bioinformáticos donde se utilizan los receptores o enzimas asociadas al mecanismo a través del cual se activa la vía de interés. En 2022 Yang y colaboradores utilizaron una base de datos de fármacos con la finalidad de encontrar un grupo funcional o una serie de derivados que presentaran afinidad por el receptor de auxinas, TIR1, por lo que se acotaron al diseño y síntesis de una serie de *N*-{(benzo[d][1'',3'']dioxolano)-5'-il}-2-benciltio acetamidas (Figura 5) de los cuales, el que presentó mejor acoplamiento con la proteína también resultó con excelente actividad promotora en el crecimiento de la raíz [11].

La leucina de la proteína BRI1 está involucrada en la transducción de la señal que provoca la brasinólida. Aunque BAK1 y BRI1 se localizan en la membrana plasmática, cuando BAK1 y BRI1 se coexpresan, el heterodímero BAK1/BRI1 que forman se localiza en el endosoma.

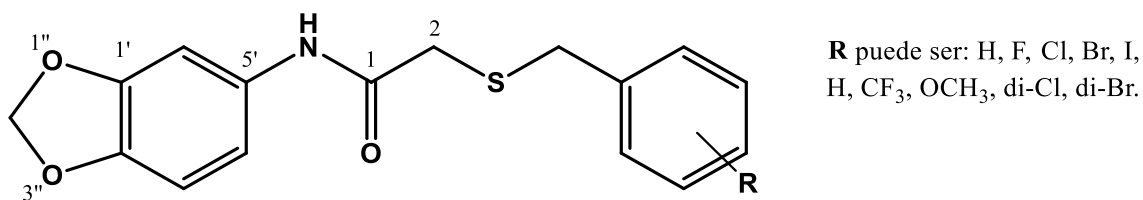


Figura 5. Serie de N-(benzo[d] [1'',3'']dioxolano-5'-il)-2-benciltio acetamidas.

La proteína BRI1 es el más utilizado para evaluar la potencialidad de los brasinoesteroides (BRs) en estudios de acoplamiento molecular. Se han estudiado diferentes derivados de BRs naturales, con modificaciones en el anillo B y en la cadena lateral, y la actividad de esos derivados fue evaluada con diferentes bioensayos como la germinación, inhibición de guisantes, sensibilidad a BRs y producción de etileno [12], [13], [14]. Los BRs son fitohormonas involucradas en el crecimiento y correcto desarrollo de las plantas, además de su intervención en el proceso de adaptación a cambios del medio ambiente, que activan el proceso de resistencia a condiciones de estrés abióticas. Gracias a diversos estudios en la búsqueda de compuestos estructuralmente similares a los BRs se ha logrado encontrar una correlación de estructura-actividad con respecto a la brasinólida **8** [15].

La castasterona (BR natural, **18**), se diferencia de la BL por contener una ciclohexanona en el anillo B en lugar de la lactona característica de BL; ha demostrado tener una gran actividad promotora de crecimiento. En México, el grupo de investigación de Sandoval-Ramírez ha realizado la síntesis de compuestos 22-oxocolestánicos, derivados de diosgenina (como **19**), hecogenina y sarsasapogenina, los cuales desplegaron una gran bioactividad promotora de crecimiento vegetal, generando con ello una gran familia de PECV. Adicionalmente, en Cuba se ha conseguido la patente de los productos espirostánicos Biobras-6 **14** y Biobras-16 **15**, cuya actividad se ha probado a nivel de campo.

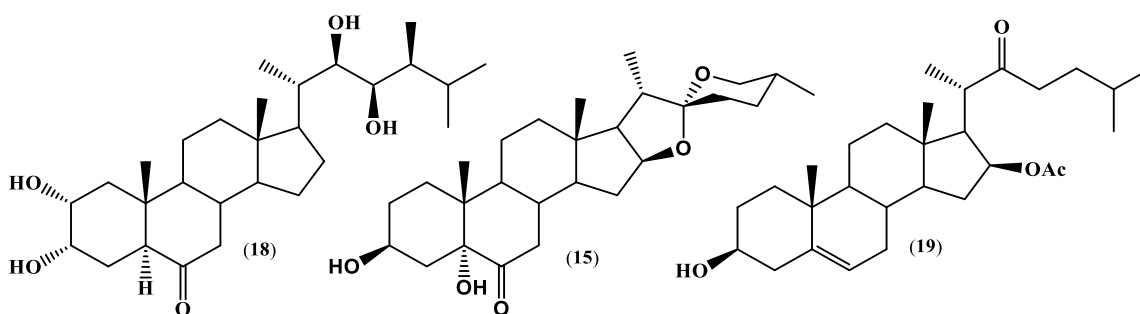


Figura 6. Castasterona (18), Biobras-16 (15) y derivado 22-oxocolestánico (19).

En el presente proyecto se integran fases de diseño bioinformático, síntesis dirigida y evaluación a nivel de invernadero, así como evaluación en campo de los compuestos 22-oxocolestánicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 General

Diseñar, sintetizar y evaluar la actividad promotora de crecimiento vegetal de compuestos 22-oxocolestánicos con modificaciones en C-26.

### 2.2 Específicos

- Diseñar y analizar el acoplamiento molecular de compuestos 22-oxocolestánicos modificados en C-26 y los receptores BRI1, BRI1-BAK1 y BRI1-SERK1 relacionados al crecimiento vegetal.
- Sintetizar y caracterizar espectroscópicamente los compuestos 22-oxocolestánicos seleccionados mediante experimentos *in silico*.
- Evaluar la actividad promotora de crecimiento vegetal en *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* de los compuestos 22-oxocolestánicos seleccionados.
- Evaluar el efecto promotor de producción y pastura de SPGP4 en campos agrícolas de la región del Istmo de Tehuantepec del estado de Oaxaca, México.

## CAPITULO 1. Estudios *in silico*

## 1.1 Antecedentes de estudios *in silico* para fitohormonas

Para diseñar moléculas bioactivas mediante herramientas bioinformáticas es necesario conocer un modelo biológico adecuado; particularmente, para el diseño de fitohormonas se debe saber cómo actúan y específicamente qué receptores se activan. Las giberelinas (GAs) en las plantas regulan varios procesos de crecimiento y desarrollo, como la estimulación de germinación de semillas, alargamiento de tallo, floración, y estimula la partenocarpia y desarrollo de tricomas; asimismo, regulan la expresión diferencial de genes. A la fecha se han identificado 126 GAs en plantas, hongos y bacterias, pero solo algunas son biológicamente activas, por ejemplo, GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> **9**, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>. La búsqueda de análogos de este grupo de fitohormonas es de gran interés, debido a su potencial como promotores del crecimiento; sin embargo, el tiempo y los costos que representa el proceso completo son altos. Por esto, las herramientas bioinformáticas han sido de gran ayuda y son un campo de gran valor aún por explotar. El receptor de GAs, el Gibberellin-Insensitive Dwarf1 (GID1) se caracterizó a partir de arroz y lechuga, y con este se han realizado estudios de acoplamiento molecular para predecir el potencial de diferentes compuestos que participan en la vía del crecimiento de las plantas [16].

El uso de *trichoderma* en la agricultura para el control de plagas es amplio; uno de los metabolitos producidos por el hongo es la gliotoxina, establecido como el componente activo de esta función. Las GAs son responsables de la protección de la planta ante plagas. El uso de herramientas computacionales permite determinar el potencial activo que una molécula puede presentar y se refleja en el estudio que Bezuidenhout y colaboradores reportaron en 2012, en el que evaluaron el acoplamiento de la gliotoxina en el sitio activo del receptor de GAs. La energía de acoplamiento (EA) de la gliotoxina se posicionó al nivel que el de GA<sub>3</sub> (ligando endógeno) y la interacción fue en el mismo sitio que el ligando endógeno de este receptor; lo que permitió explicar que induce respuestas biológicas similares a las giberelinas [16], [17].

Las estrigolactonas (SL) se asocian a procesos de gran relevancia agrícola; estos inician una simbiosis entre plantas y hongos micorrícicos arbusculares dando paso a la germinación parásita e inhibiendo la ramificación de brotes vasculares. Al igual que las demás hormonas, la concentración a la que se pueden obtener a estos compuestos es muy baja, a partir de extractos naturales y los análogos sintéticos son difíciles de obtener debido a su inestabilidad. Por estos motivos, el empleo de los estudios de acoplamiento molecular es de gran ayuda en este campo. Para poder realizar estos estudios es necesario establecer las proteínas o enzimas que desencadenan las respuestas fisiológicas de las SL. En relación a este punto es que Burguer y colaboradores realizaron un estudio de 20 SL y su interacción con 9 receptores de la planta parásita *Striga hermonthica*, concluyendo que la especie ha desarrollado receptores poco selectivos para todos los compuestos probados, así como específicos a SL de ciertas plantas lo que permite modular respuestas específicas del huésped [18].

Enfocado al valor de las SL en la agricultura para combatir la germinación de plantas parásitas Kang y colaboradores propusieron el diseño y síntesis de una nueva serie de análogos derivados

de dihidroflavonoides, cuyo potencial *in silico* fue evaluado mediante su interacción con la proteína receptora de SL HTL7 la cual correlacionó con su evaluación *in vivo* mediante estudios de detección por fluorescencia, los cuales ayudaron a determinar la vía de acción sobre la que SL expresaba su función [19].

Otra opción es el estudio del proceso de inhibición, y si este resulta en beneficio de la planta. Tal es el caso del receptor dual D14 (DWARF14) cuya función es regular la señalización de SL y también está relacionada a las plantas parásitas. Takeuchi y colaboradores en 2018 sintetizaron nuevos antagonistas de D14 y sus resultados de acoplamiento molecular proponen que estas moléculas bloquean la interacción de la proteína por lo que inhiben la hidrólisis del sustrato [20].

Las citoquinas regulan una amplia gama de procesos esenciales en las plantas, y también se puede enfocar al estudio de su inhibición. El ejemplo más importante es el que emplea tiazuron (TDZ), utilizado en la agricultura como defoliante del algodón ya que actúa como inhibidor de la citocina oxidasa/deshidrogenasa (CKX) que se encarga de degradar las citoquininas y, por tanto, aumenta la vida útil de las fitohormonas. Nisler y colaboradores diseñaron, sintetizaron y evaluaron el potencial de nuevos derivados de TDZ. De 20 candidatos, seleccionaron a dos para su estudio *in vivo* que presentaron alta selectividad y mejores energías de interacción con las isoformas de la enzima. [21].

Por otra parte, los brasinoesteroides (BRs) son fitohormonas de tipo esteroidal que se encargan de diversos procesos de desarrollo, reproducción y resistencia en las plantas. El descubrimiento de la brasinólida se remonta a finales de la década de 1970 y posteriormente la investigación de este grupo de hormonas ha permitido determinar procesos fisiológicos en los que interviene como la división y crecimiento celular, senescencia, desarrollo de polen, maduración del fruto, la resistencia y adaptación a diversos factores del medio ambiente. Para la década de 1990 la ruta de biosíntesis de BRs ya se encontraba mejor descrita gracias a diversos estudios realizados en varios cultivos, en particular con el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*. Está demostrado que los BR en la planta se incorporan en la superficie celular por acción del BRI1 (Brassinosteroid Insensitive-1, del inglés), el cual forma parte de la familia de LRR-RLKs (leucine-rich repeat receptor-like kinases por sus siglas en inglés), y cuya presencia es necesaria para la percepción de los BRs y con ello el desarrollo de la planta [22], [23].

BRI1 existe en la membrana vegetal de forma independiente como un homodímero y puede ser estabilizado por la unión con los BRs; sin embargo, para que esta vía de señalización (Figura 7) se exprese completamente es necesaria la heterooligomerización entre BRI1 y miembros de la subfamilia de LRR-RLKs, como SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase). Este proceso se inicia cuando se une un ligando BR a BRI1, permitiendo el vínculo con los correceptores para formar complejos que generan el incremento de la parte catalítica, creando interfaces de unión con otros componentes del dominio dando paso a la cascada de señalización.

Dependiendo del correceptor al que se una el BRI1 será la ruta que siga y por ende la respuesta, por mencionar algunos, se puede formar el complejo BRI1-BAK1 (Associated Receptor Kinase-1

del inglés). También se ha encontrado la presencia de BRI1 en complejo con SERK1 que está implicado en el proceso de embriogénesis. Otras interacciones que puede establecer es con las fosfatasa como BSU1 (BRI1 SUPPRESSOR1 complejo que inactiva al regulador negativo BIN2 (Brassinosteroid Insensitive-2) que activa a los factores de transcripción de resistencia cuando hay ausencia de BR, dos proteínas más encontradas en *Arabidopsis* son TTL (Transthyretin-like protein) y TRIP1 (un homólogo de TGFb-receptor-interacting protein 1) [22], [23], [24], [25], [26].

Si bien, las uniones que pueden establecerse en la biogénesis de los brasinoesteroides son muy amplias, solo se han mencionado los receptores que en la actualidad presentan más estudios que respaldan su participación. Es de especial interés realizar el análisis dirigido a la señalización de la ruta de los receptores de embriogénesis por lo que se han seleccionado como receptores a BAK1 y SERK1 para la formación de los complejos con BRI1.

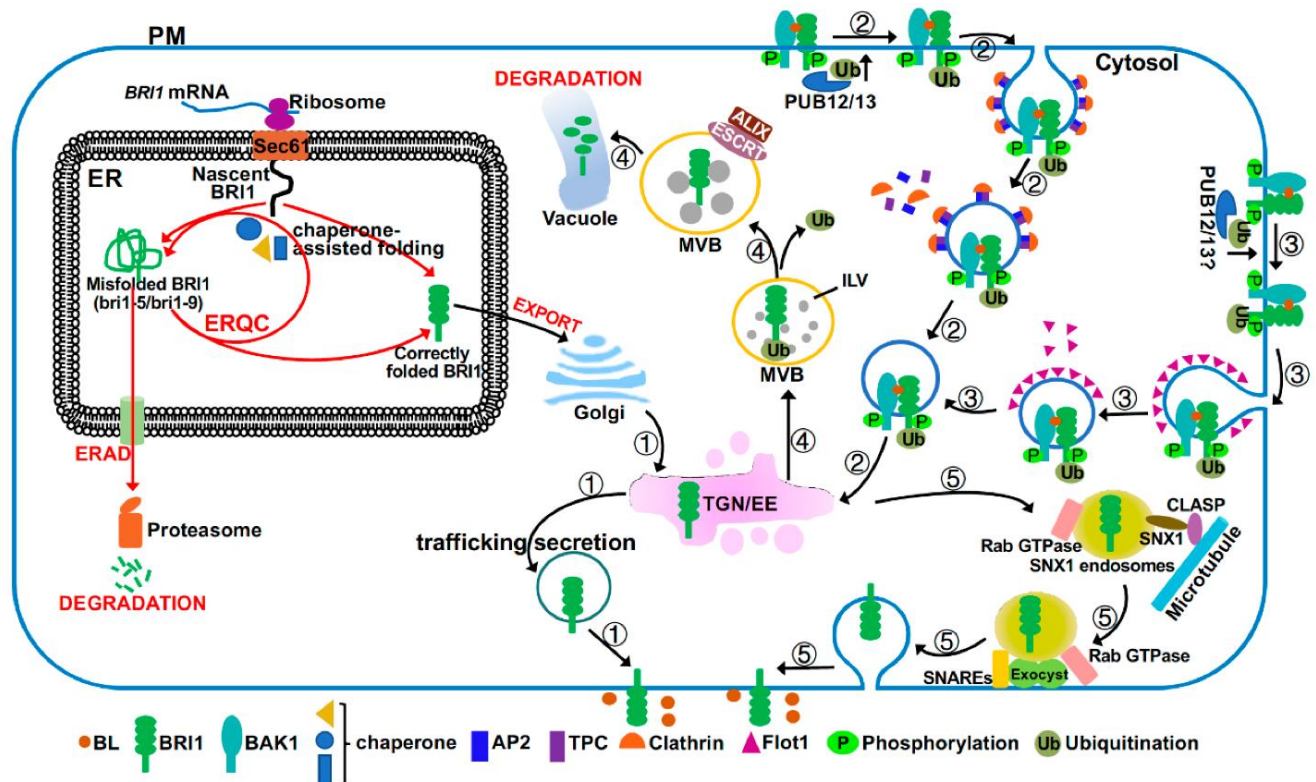
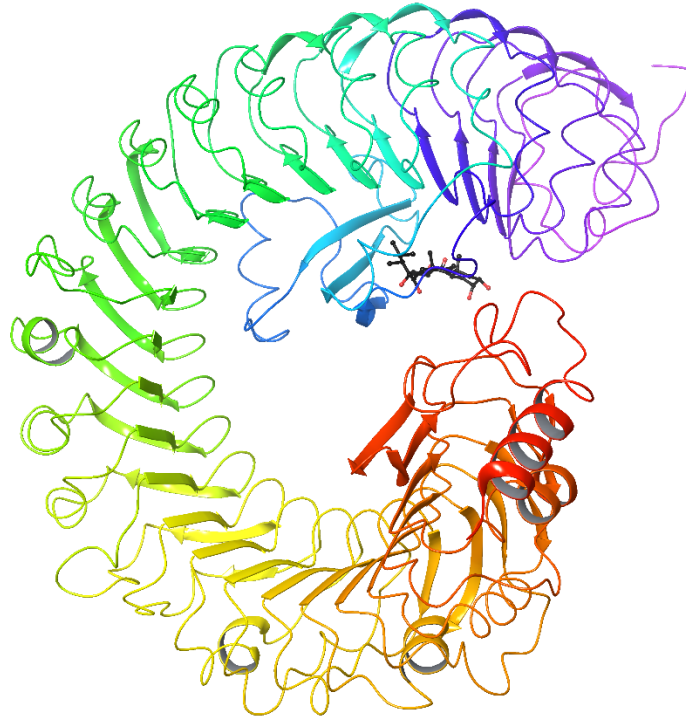


Figura 7. Modelo de regulación de BRI1 en la membrana plasmática, tomado de [27].

### 1.1.1 BRI1

El mecanismo de activación de los receptores de BRs comienza por la unión entre el receptor BRI1 (Figura 8) y su ligando endógeno (brasinólida, BL). Esto se ha logrado caracterizar a través de estudios con los cuales se determinó el sitio activo de la proteína. La estructura del dominio de

unión al ligando BRI1 se ha determinado con una resolución de 2.5 Å, además de los procesos de transformación que se desencadenan (fosforilaciones, por ejemplo) y las posibilidades de interacción que pueden ocurrir posteriores a la unión con los correceptores. De manera general, los estudios realizados son el aislamiento y caracterización de los receptores y estudio de las mutaciones con supresión de genes para determinar su importancia en la cascada de señalización de BRs [27], [28], [29], [30], [31].



**Figura 8. Estructura 3D del Brassinosteroid Insensitive-1, BRI1 (3RGZ) [28].**

### 1.1.2 BRI1-BAK1

Una vez realizado el acoplamiento entre BR-BRI1 se permite la formación del complejo BRI1-BR-BAK1 (Figura 9). Hasta la fecha, en los estudios *in silico* realizados se reportan ambas interacciones para poder determinar la estabilidad de formación del primer acoplamiento y el potencial de formación del segundo; Mao y Li [27] analizaron la vía de señalización de los brasinoesteroides regulada por quinasas clave, como se observa en la Figura 10 al estar disponible la brasinólida se da la unión con BRI1 y posteriormente con BAK1 que desencadena en la activación de BSU1 cuya función se encuentra relacionada con la inmunidad de las plantas [32], vía que no se activa en ausencia de BR, esta ruta es representada en el lado izquierdo de la figura 10.

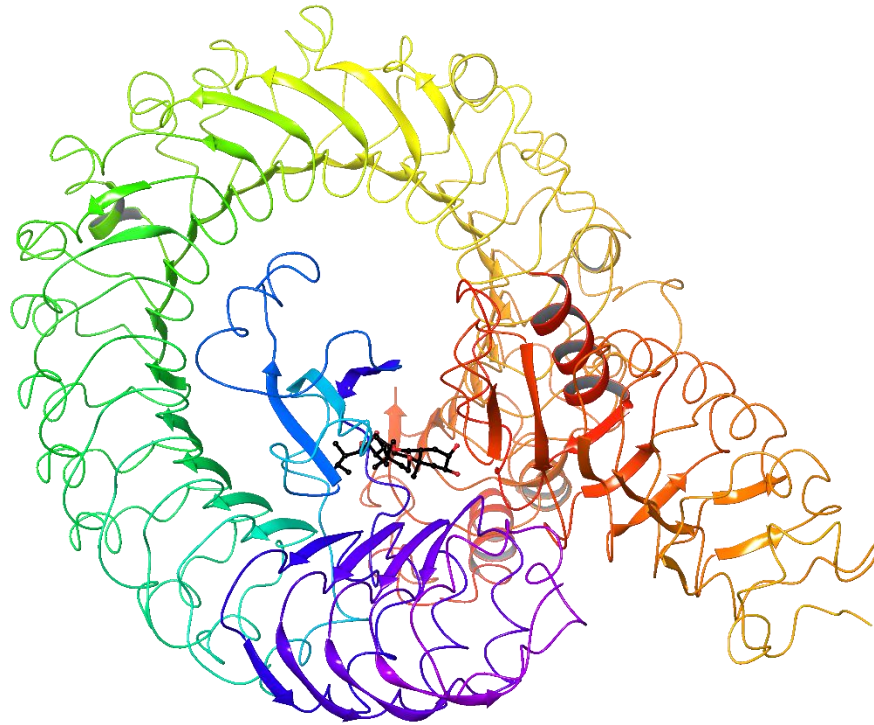


Figura 9. Complejo BRI1-BAK1 inducido por BL (4M7E) [28].

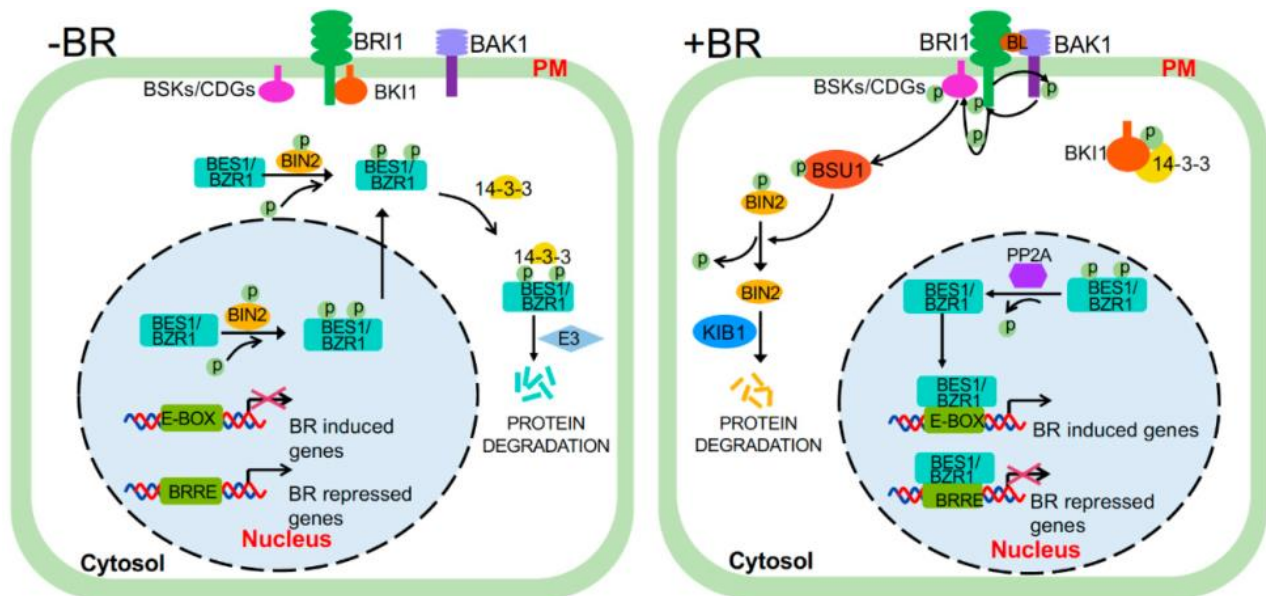
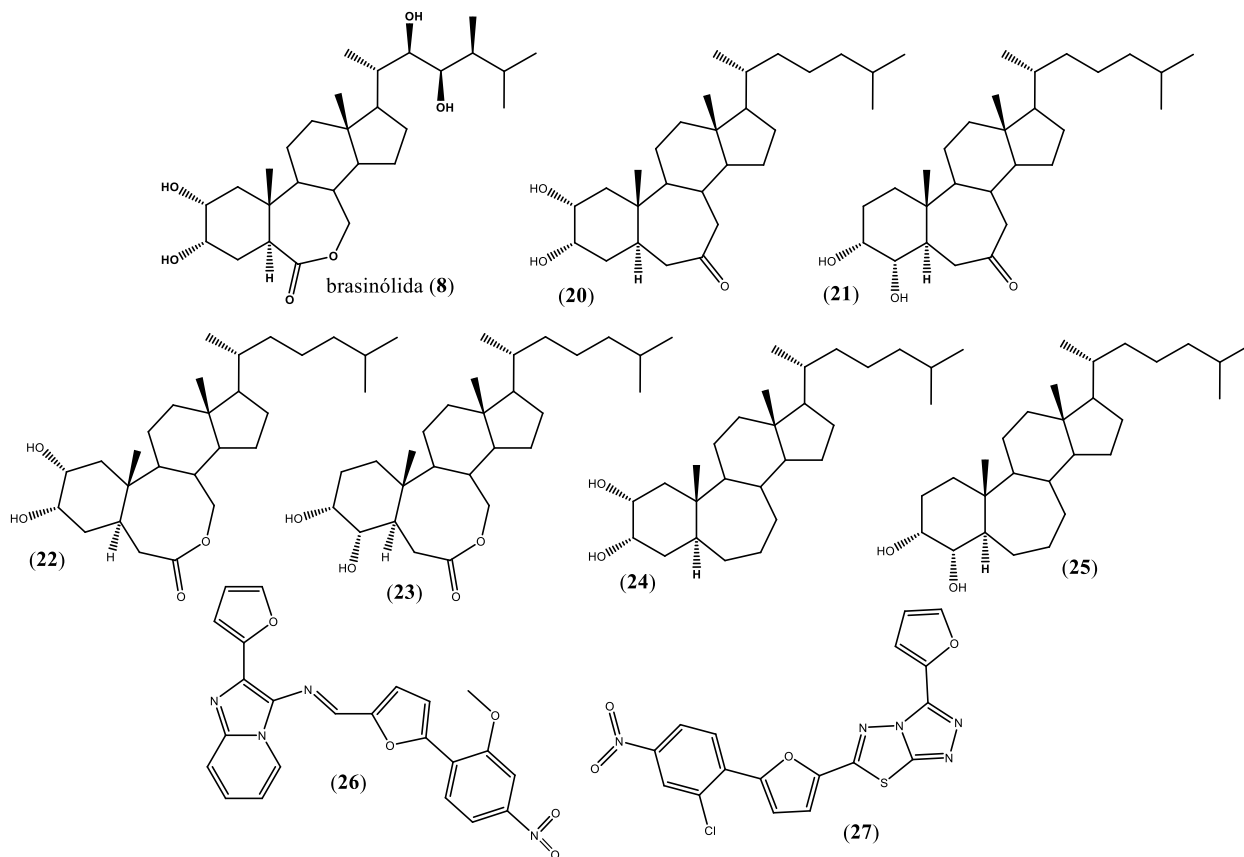


Figura 10. Modelo de la vía de transducción de señales BR con BAK1.

Beilei y colaboradores han desarrollado múltiples trabajos acerca de reguladores de crecimiento en la vía de brasinoesteroides. En 2015 reportaron el análisis estructura-actividad de 7 BRs (Figura 11) y la descripción de los residuos aminoacídicos claves de los receptores. De ello obtuvieron

bases para diseñar y desarrollar análogos de bajo costo y gran actividad. Estructuralmente, se destaca la interacción del carbonilo en el anillo B ya que mejora la energía de activación de BRI1, a diferencia de los compuestos **24** y **25** que no lo presentan. La presencia del hidroxilo en C23 fortaleció la actividad biológica ya que los compuestos que no presenta este sustituyente (**20-25**) no lograron superar las energías de la BL **8**. En cuanto al complejo BRI1-BAK1, la interacción entre los hidroxilos del anillo A con algunos aminoácidos de BRI1 (Arg640 y Tyr642) y con His61 y Val62 de BAK1 contribuyeron esencialmente a la afinidad [33].

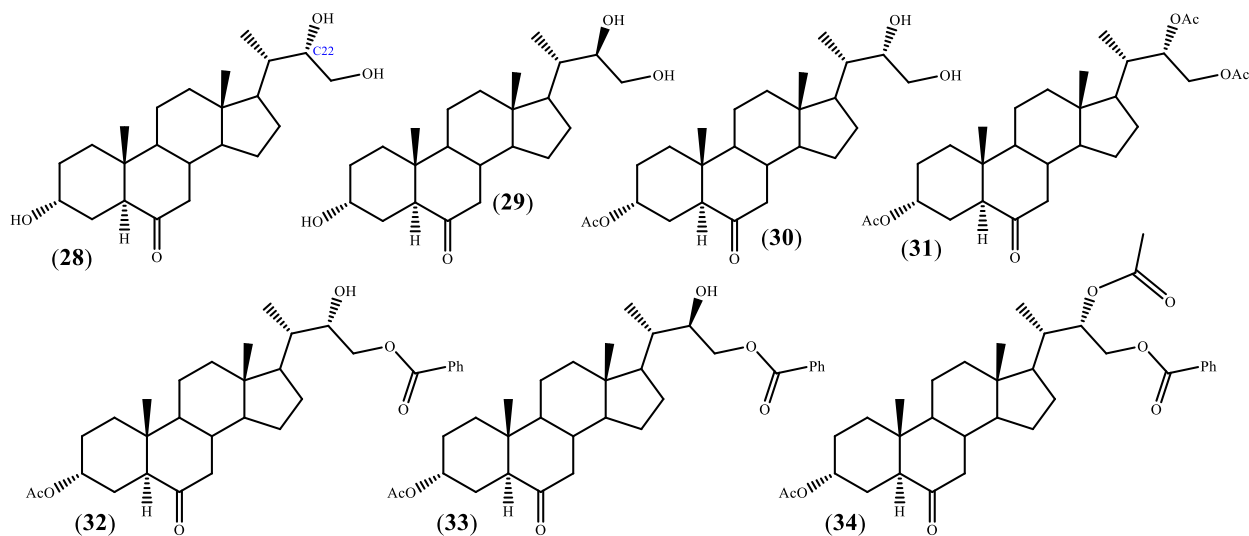


**Figura 11. Brasinoesteroides y derivados comerciales estudiados por Beilei y colaboradores.**

Considerando la gran importancia de los BRs, en otro estudio el mismo grupo de investigación se propuso como objetivo encontrar la manera de sintetizar derivados no esteroidales que lograran activar la vía de estas hormonas. Para esto estudiaron una base de datos de compuestos comerciales de uso variado y evaluaron su afinidad con el receptor BRI1 y el complejo BRI1-BAK1, así desarrollaron estructuras que fueron comparadas con los compuestos de la base de datos. Su primer criterio de selección fue que cumplieran con los requisitos de grupos funcionales o polaridades con lo que se seleccionaron 56 candidatos; estos fueron evaluados por acoplamiento molecular con el receptor y el complejo, excluyendo aquellos que no interaccionaron con el sitio activo de cada proteína con lo que disminuyó la base de datos a 20 candidatos y finalmente criterios de los tipos

de interacciones que presentaban en el acoplamiento. Además, este estudio sugirió que un requisito fundamental fue la formación de puentes de hidrógeno con residuos de BAK1, lo que permitió la selección de dos derivados comerciales **26** y **27**, que en su evaluación biológica presentaron buenos resultados [34].

A partir del estudio de acoplamiento molecular realizado a una serie de derivados 24-norcolánicos (Figura 12), diseñados como análogos de BRs, Díaz y colaboradores propusieron a dos de estos compuestos como potenciales candidatos para su evaluación agrícola ya que presentaron energías de acoplamiento mejores a las de la BL con el complejo BRI1-BAK1. En este estudio se analizaron diferencias a nivel energético, donde el derivado que destacó fue el **28**. Otro aspecto estudiado fueron las interacciones de los sustituyentes; se pudo observar que para los derivados benzoilados **32-34**, este grupo funcional favorece las interacciones con los receptores y que a pesar de no poseer el grupo hidroxilo terminal en la cadena 24-norcolánica presentó un nivel energético similar. También se observaron las interacciones con His61 y Val62, residuos de BAK1 indicados como importantes en estudios previos [35].



**Figura 12. Derivados 24-norcolánicos evaluados.**

### 1.1.3 BRI1-SERK1

Con el fin de describir la vía de señalización completa de los BRs y sabiendo la importancia de formar el complejo con BAK1 (también conocido como SERK3), resulta de interés conocer mejor el funcionamiento de esta subfamilia y su relevancia en los procesos de desarrollo de las plantas (Figura 13). Para ello se realizaron diversos estudios de aislamiento y caracterización de dicho receptor a partir de especies con mutaciones. Esto resultó ser de gran ayuda en la investigación vegetal *in silico*, ya que amplía el panorama para el diseño dirigido de nuevos derivados con actividad promotora de crecimiento con efecto específico en el proceso de embriogénesis [36].

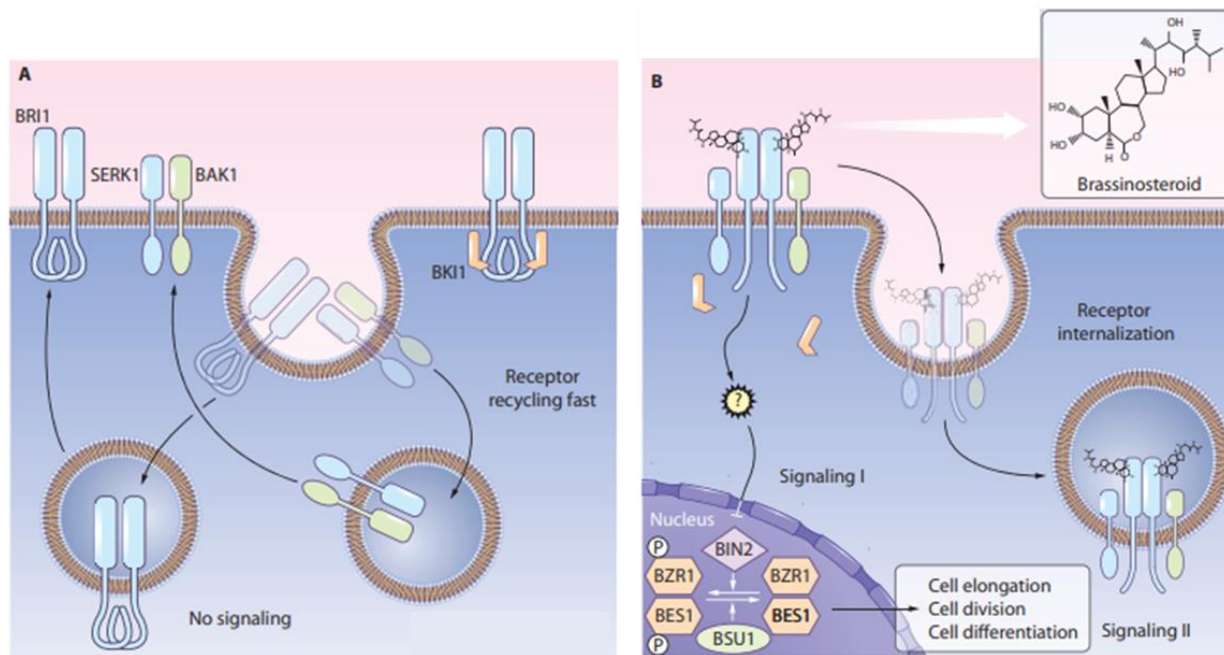


Figura 13. Modelo de la vía de transducción de señales BR con SERK1 [37].

Para realizar estudios de acoplamiento molecular se emplea el cristal obtenido por Santiago y colaboradores, quienes en 2013 reportaron el aislamiento del complejo BRI1-BL-SERK1 (Figura 14) y sugirieron a la brasinólida como ligando endógeno [38]. Bojar y colaborades haciendo uso de herramientas bioinformáticas reportaron el análisis de la vía de interacción para la formación de los complejos entre BRI1 y algunos correceptores de la familia SERK, la actividad catalítica que se desencadena y cuáles son los residuos importantes para que esto se lleve a cabo [39].

Un estudio reciente de correlación entre ciencia básica y aplicada a nivel laboratorio fue el reportado por Nishikawa y colaboradores en 2023, donde reportan la evaluación de la capacidad de germinación de lechuga y arroz con 6 BRs (Figura 15). Posteriormente, relacionaron los resultados biológicos con la evaluación *in silico* de acoplamiento con el complejo BRI1-SERK1 para *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* los cuales presentaron una correlación lineal, es decir, que existe proporcionalidad entre los estudios *in silico* e *in vivo* [40].

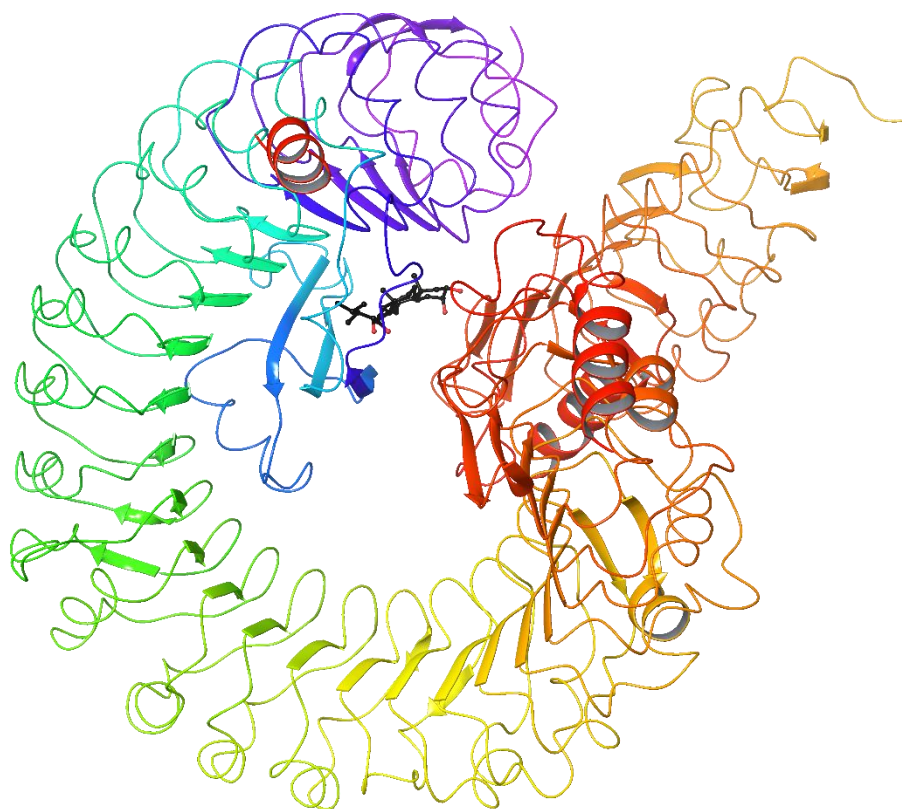


Figura 14. Receptor de esteroides vegetales unido a brasinólida y al correceptor SERK1 (4LSX) [38].

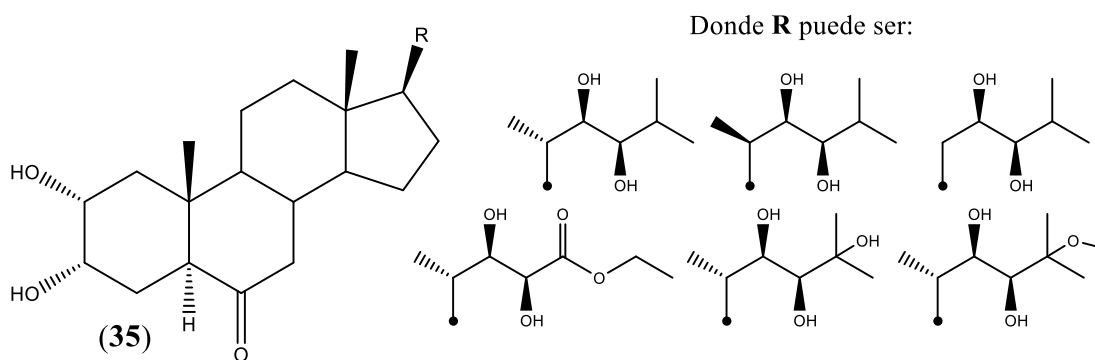


Figura 15. Brasinoesteroides evaluados con el complejo BRI1-SERK1.

## 1.2 Discusión de resultados

### 1.2.1 Elección de compuestos

Basados en el potencial *in silico* de los colestanos previamente abordados se diseñó un conjunto de 1247 derivados que fueron construidos mediante variaciones seleccionadas con el análisis general de un 22-oxocolestano que se puede obtener con la apertura del espiroacetal en un espirostano, ya que esto propicia la formación de la cadena lateral 22-oxo-26-hidroxilada y con lo que surgió el interés de estudiar el efecto de variar el grupo funcional en C-26 el cual puede oxidarse a aldehído y ácido carboxílico, o esterificarse dejando un total de 4 sustituyentes posibles, variable asignada como R<sub>7</sub> (Figura 16). Otra de las variaciones fue la estereoquímica de C-25 (R<sub>6</sub>) la cual puede estar en configuración *R* o *S*, esta variación, así como las otras 5 están relacionados a la naturaleza de los SP. Aquí consideramos a aquellos con o sin hidroxilo en C-2 (R<sub>1</sub>) y/o C-3 (R<sub>2</sub>). Para los sustituyentes R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> en los átomos de carbono C-5, C-6 y C-12, también se toma en cuenta la orientación de los mismos.

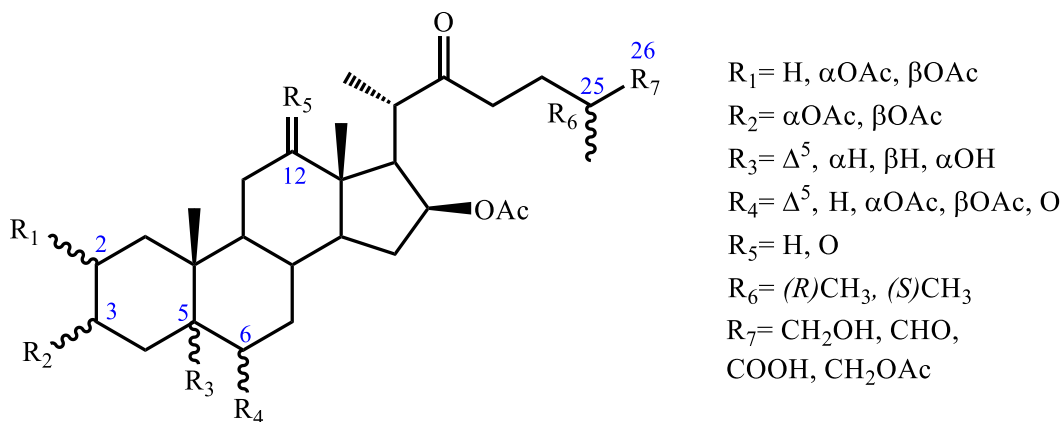


Figura 16. Estructura general de los compuestos 22-oxocolestánicos diseñados.

Para determinar la prioridad y el efecto de cada uno de los sustituyentes empleados en la construcción de moléculas, se realizó el análisis estadístico de las EA agrupadas por sustituyente. Primero, se determinó que los datos no seguían una distribución normal empleando la prueba Anderson-Darling [41]. Posteriormente, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en cada variable (R<sub>1</sub>-R<sub>7</sub>), para cada diana evaluada. En la Tabla 1 podemos ver que en todas las posiciones existe una diferencia de su efecto sobre las EA para la interacción con el receptor BRI1.

En este diseño orientado al PECV con potencial de actividad sobre la vía de activación de BRI1, presentaron mejores valores de energía aquellos que en C-2 no tienen sustituyente. El efecto de la estereoquímica de C-25 permitió determinar que el grupo de compuestos 22-oxocolestánicos de mejor energía son los que presentan configuración *R*. Finalmente, para la proteína asociada al gen BRI1 fue posible corroborar que estadísticamente los derivados 26-ácido y 26-aldehído son los que se favorecen en esta interacción (Tabla 1).

**Tabla 1. Interacciones de derivados 22-oxocolestánicos con BRI1. Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).**

Posición	Mejor EA		
	→		
C-2	$\alpha$ OAc	$\beta$ OAc	H
C-3	$\alpha$ OAc		$\beta$ OAc
C-5	$\Delta^5, H\alpha$		$\alpha$ OH, H
C-6	$\alpha$ OAc	H	$\beta$ OAc, O
C-12	H		O
C-25	S		R
C-26	OAc	OH	COOH, CHO

Del análisis estadístico para las energías de acoplamiento de formación del complejo BRI1-BAK1 (Tabla 2), relacionado a la resistencia a factores de estrés del medio ambiente [32], destacaron dos puntos: primero, que los derivados 26-ácido y 26-aldehído presentan la mejor EA, esto resulta importante ya que este nivel de análisis nos permite observar clasificaciones que únicamente por perspectiva de los valores no podemos determinar. El otro punto fue determinar los sustituyentes más importantes en la estructura para favorecer la interacción con este complejo. De la Tabla 2 podemos observar que los sustituyentes en C-5 y la estereoquímica de C-25 no fueron significativos a diferencia de lo obtenido para BRI1.

En contraste con el análisis para BRI1, donde la presencia del grupo acetilo o cetona en C-6 son las de mejor energía de acoplamiento, en el complejo BRI1-BAK1 en el mismo carbono la presencia de protones o que sea un carbonilo son las que presentaron mejor EA. Siendo que ambos sustituyentes son estadísticamente mejores para la EA en su respectiva diana, al haber una similitud con un grupo (cetona) y una diferencia entre los otros sustituyentes (acetilo y protones) esto permitirá diseñar compuestos específicos para promover el alargamiento, por la activación de BRI1; para beneficiar el proceso de resistencia a estrés, por la activación de BRI1-BAK1, o tener actividad dual, cuando en C-6 sea base de carbonilo.

**Tabla 2. Interacciones de derivados 22-oxocolestánicos con BRI1-BAK1. Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).**

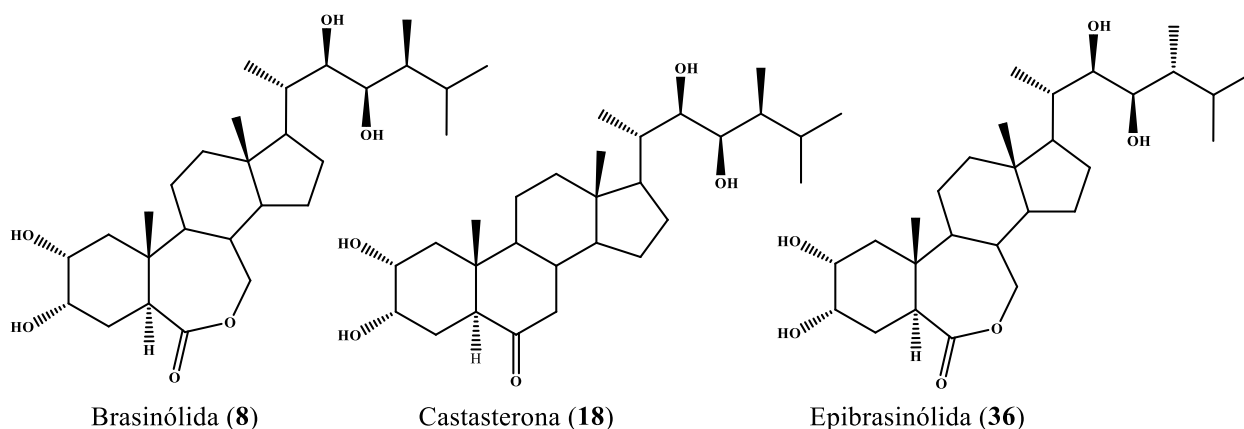
Posición	Mejor EA	
	→	
C-2	$\alpha$ OAc, $\beta$ OAc	H
C-3	$\alpha$ OAc	$\beta$ OAc
C-5	No hay diferencia significativa	
C-6	$\alpha$ OAc, $\beta$ OAc	H, O
C-12	O	H
C-25	No hay diferencia significativa	
C-26	OAc	COOH, CHO, OH

Para promover la activación del complejo BRI1-SERK1, que está relacionado a la germinación [38], se pudo seleccionar a los derivados con insaturación en C-5 y protones en C-12 (Tabla 3) como compuestos dirigidos para la activación de esta vía.

**Tabla 3. Interacciones de derivados 22-oxocolestánicos con BRI1-SERK1. Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).**

Posición	Mejor EA		
	→		
C-2	$\alpha$ OAc, $\beta$ OAc	H	
C-3	$\alpha$ OAc	$\beta$ OAc	
C-5	H $\beta$	H $\alpha$ , OH $\alpha$	$\Delta^5$
C-6	$\alpha$ OAc, $\beta$ OAc	H, O	
C-12	O	H	
C-25	No hay diferencia significativa		
C-26	OAc, OH, COOH	COOH, OH, CHO	

Otro de los parámetros de análisis para el diseño de nuevos PECV fue la EA, ésta se obtuvo para cada derivado 22-oxocolestánico, con las 3 dianas evaluadas y representan el potencial de interacción que pueden tener los derivados como promotores de crecimiento vegetal. El criterio de selección para el nivel de homología energética se estableció por comparativa con las EA de BRs naturales con BRI1 y los complejos BRI1-BAK1 o BRI1-SERK1 (Tabla 4); para este análisis se utilizaron como referencia la BL (**8**), la epibrasinólida (**36**, ampliamente utilizado en la agricultura) y la castasterona (**18**, BR con mayor similitud estructural a los colestanos y de gran actividad) (Figura 17).



**Figura 17. Brasinoesteroides naturales empleados como referencias para el estudio *in silico*.**

**Tabla 4. Energías de acoplamiento de brasinoesteroides, en kcal/mol.**

<b>BR<sub>ref</sub></b>	<b>BRI1</b>	<b>BRI1-BAK1</b>	<b>BRI1-SERK1</b>
Epibrasinólida	-5.976	-10.522	-10.428
Brasinólida	-6.469	-12.017	-10.556
Castasterona	-7.572	-11.857	-11.091

El efecto promotor de crecimiento en las plantas sobre la vía de brasinoesteroides se atribuye a la interacción con el receptor BRI1; en este caso, para la quimioteca de compuestos 22-oxocolestánicos diseñados se encontró que el 18% (229 derivados) presentan una EA igual o mejor que el de los BR de referencia. De estos, 125 son mejores que la epibrasinólida, pero no que la BL, 98 son mejores que esta última, pero no que la castasterona y 6 superan la EA de la castasterona (Figura 18). De estos 229 derivados el 31.4% son ácidos carboxílicos, 33.6% corresponden a aldehídos, derivados hidroxilados son el 20.1% y el 14.8% restante son derivados 26-OAc.

Para explorar derivados con efecto de resistencia a condiciones de estrés se analizaron las energías de acoplamiento con el complejo BRI1-BAK1. En comparación con el número de 22-oxocolestanos que presentaron energías con BRI1 al nivel de las referencias, para el complejo BRI1-BAK1 disminuyeron drásticamente; contrario a ser una desventaja este resultado es relevante para el diseño dirigido al PECV enfocados a la resistencia a estrés. A pesar de que ninguno de los derivados diseñados logró alcanzar el nivel energético de la brasinólida o de la castasterona, 10 derivados sí lograron EA similares e incluso superiores que la epibrasinólida (Figura 19), lo que es buen indicativo ya que ésta fue ampliamente utilizada en la agricultura hace algunos años. De estos ligandos que superan a la referencia, la mitad tienen como grupo funcional hidroxilo en C-26, 3 son derivados acetilados y los otros dos restantes son ácidos carboxílicos.

Como se mencionó previamente, la germinación por la vía de brasinoesteroides está asociada a la activación del complejo BRI1-SERK1. Energéticamente, de los derivados con EA dentro del intervalo de los BR naturales dos son ácidos carboxílicos y dos son aldehídos, 3 superaron a la BL, y solo uno, un aldehído, tuvo mejor EA que la castasterona (Figura 20). De esto fue posible señalar a los compuestos 22-oxocolestanos de mayor grado de oxidación como posibles PECV específicos para la germinación.

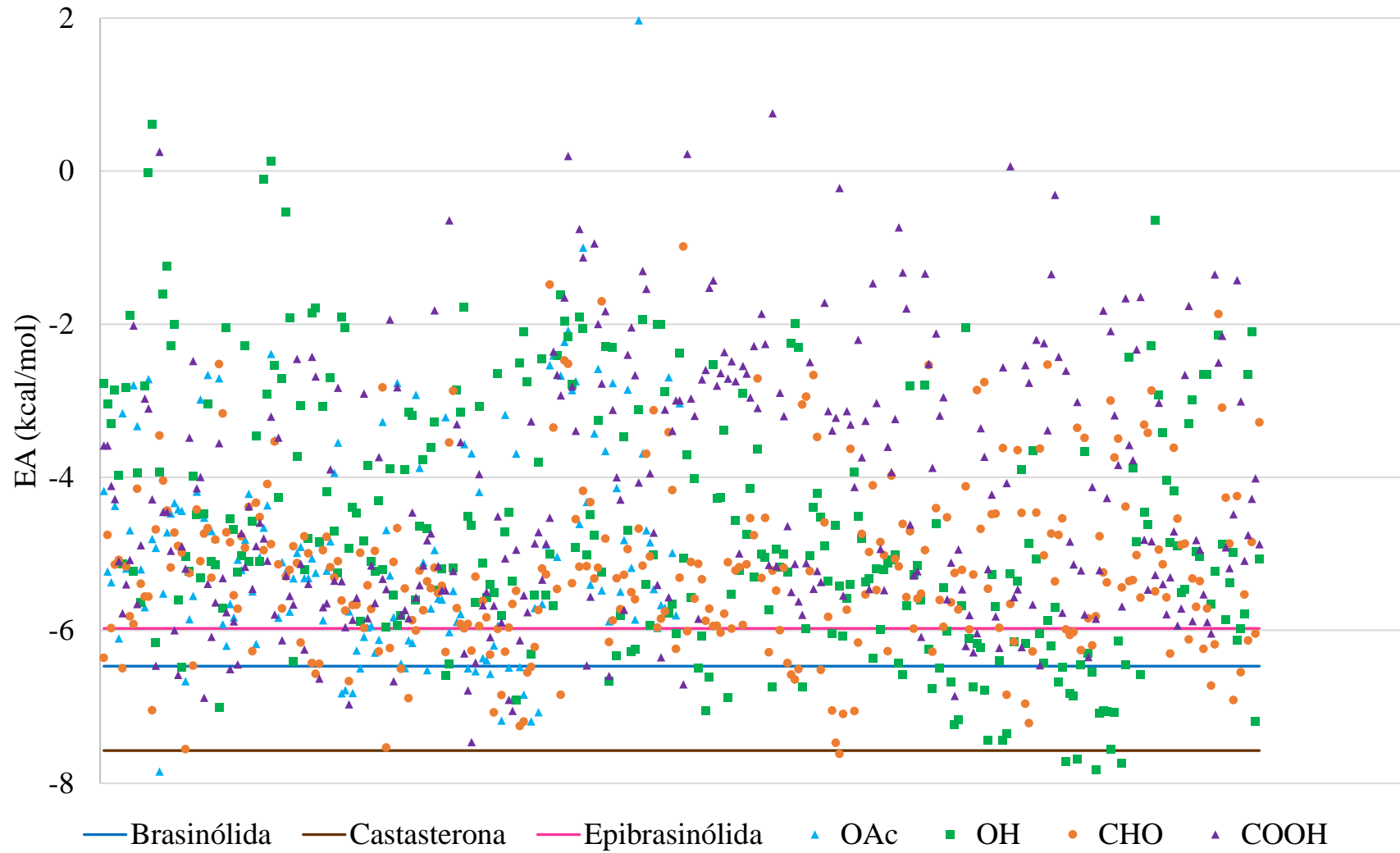


Figura 18. Gráfica de energías de acoplamiento con BRI1.

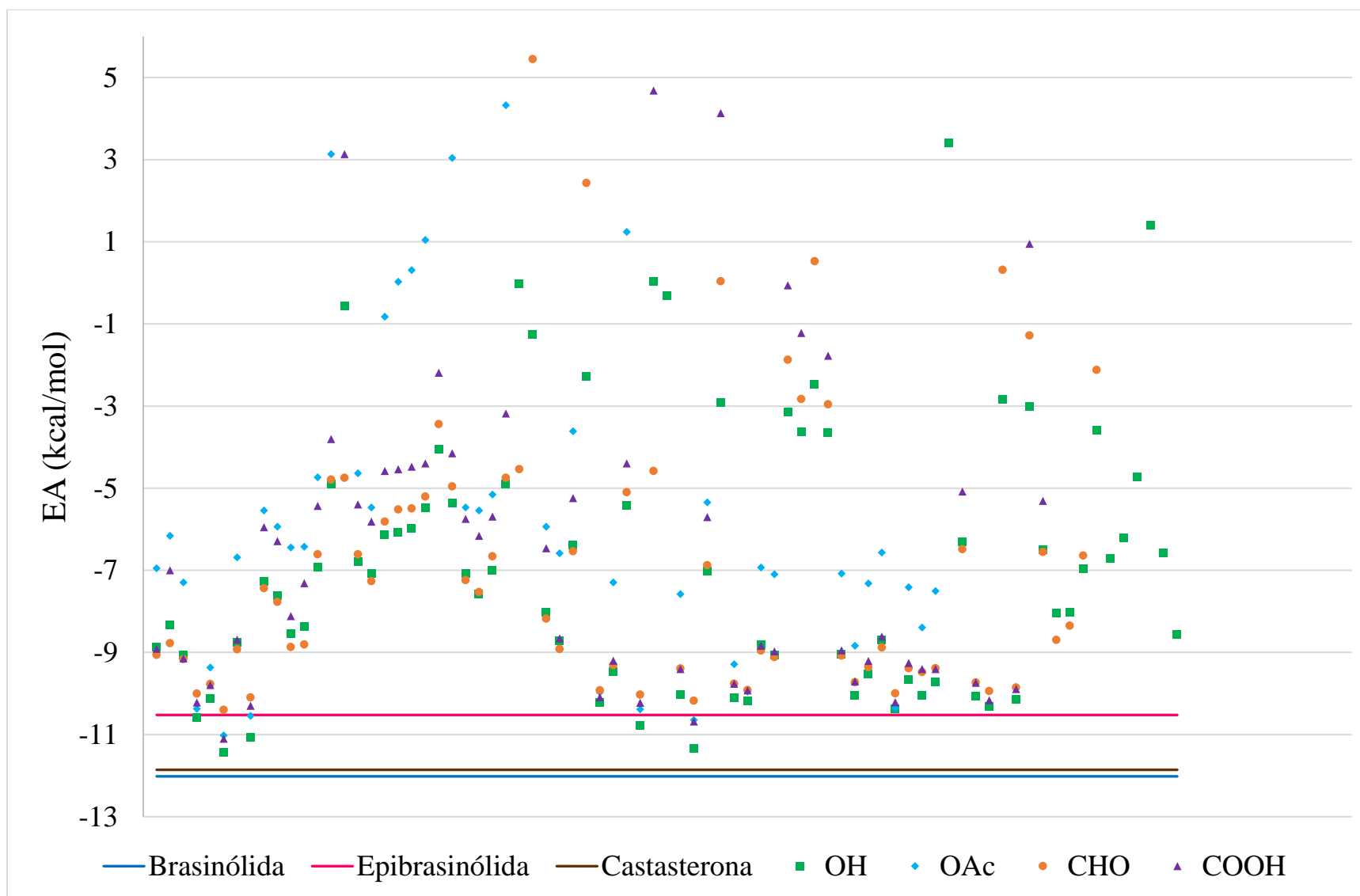


Figura 19. Gráfica de energías de acoplamiento con BRI1-BAK1.

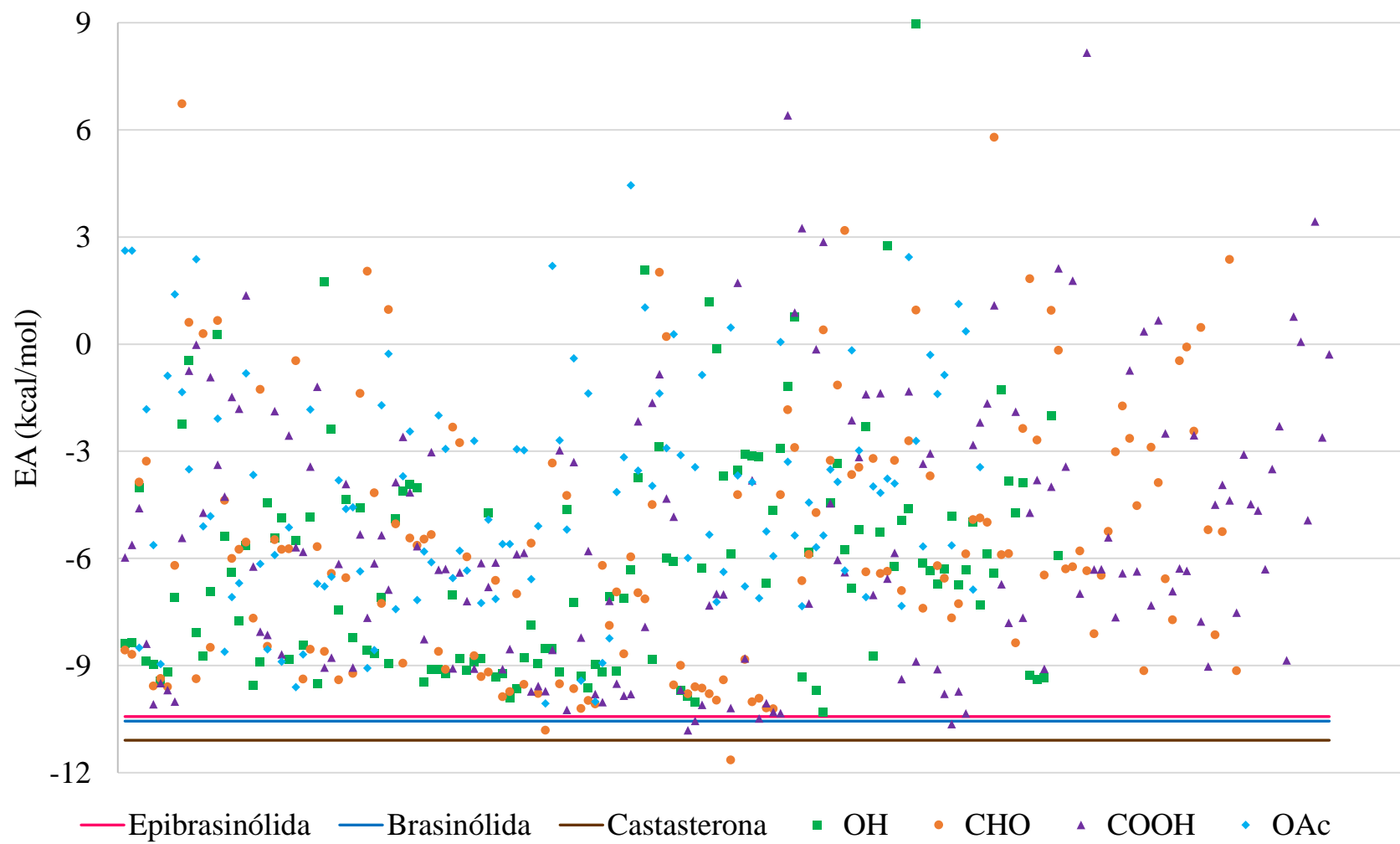
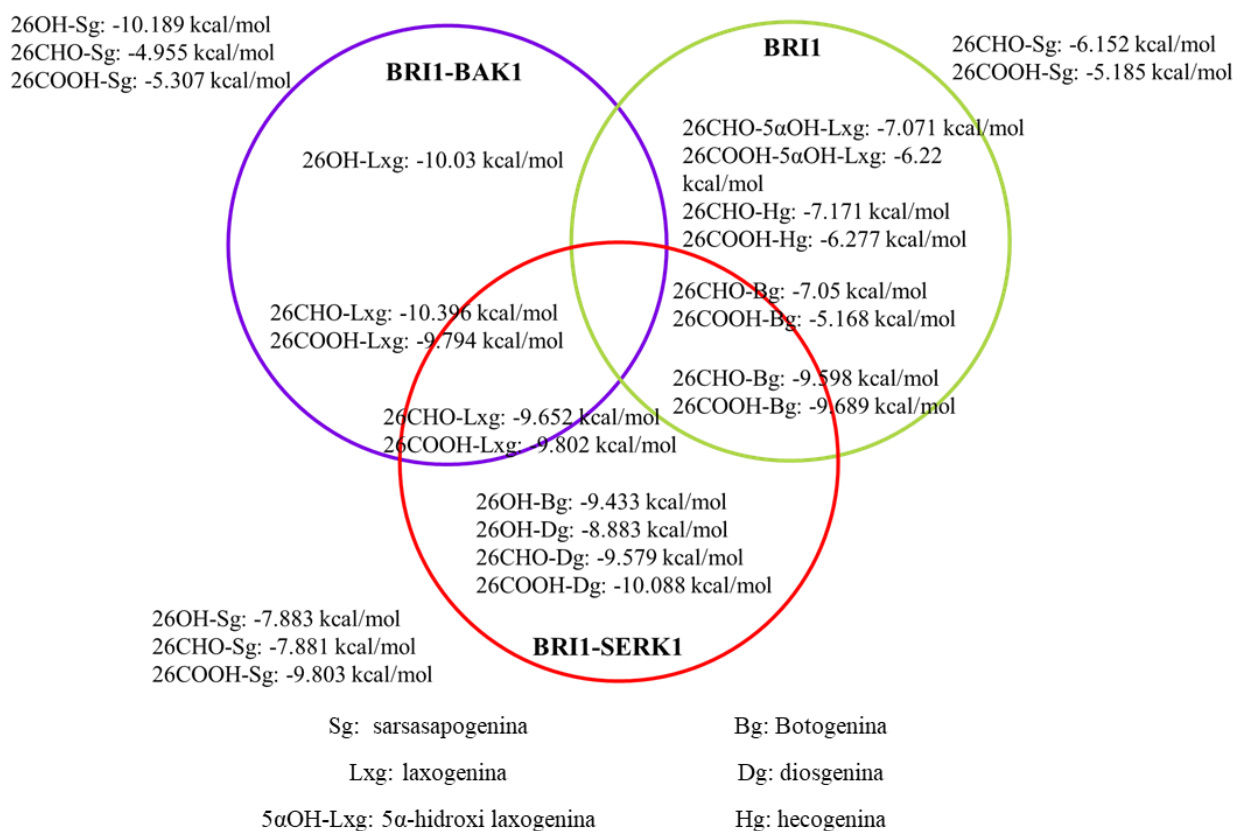
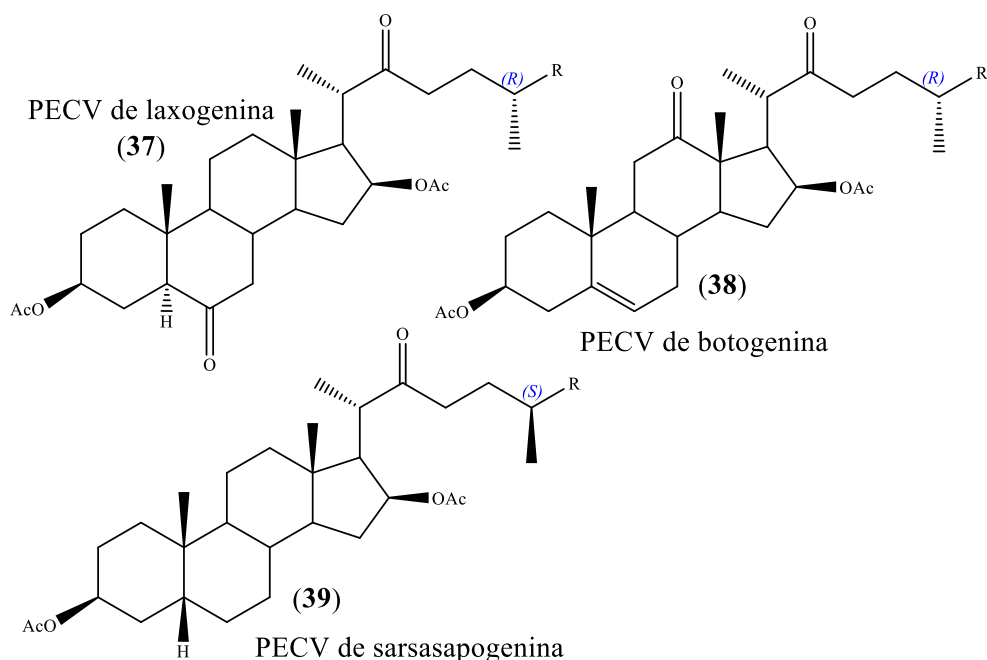


Figura 20. Gráfica de energías de acoplamiento con BRI1-SERK1.

Con los resultados del análisis energético y estadístico se establecieron clasificaciones de los grupos de derivados 22-oxocolestánicos asociados a cada una de las dianas y también aquellos que podrían presentar una actividad dual. Esto se resume en el diagrama de Venn en la Figura 21. Los derivados de laxogenina **37** (Figura 22) se clasificaron con potencial actividad dual para la formación del complejo BRI1-BAK1 y BRI1-SERK1, es decir, su diseño se enfoca a PECV de resistencia a estrés y germinación. De la misma forma los derivados de botogenina **38** son propuestos como potenciales PECV con efecto dual en las etapas de germinación y elongación vegetal. Como un control negativo se seleccionan a los derivados de sarsasapogenina **39** ya que algo muy característico de éstos es la configuración *S* en C-25, que a partir de los estudios estadísticos no mejoró el acoplamiento con el receptor, ni con los complejos.

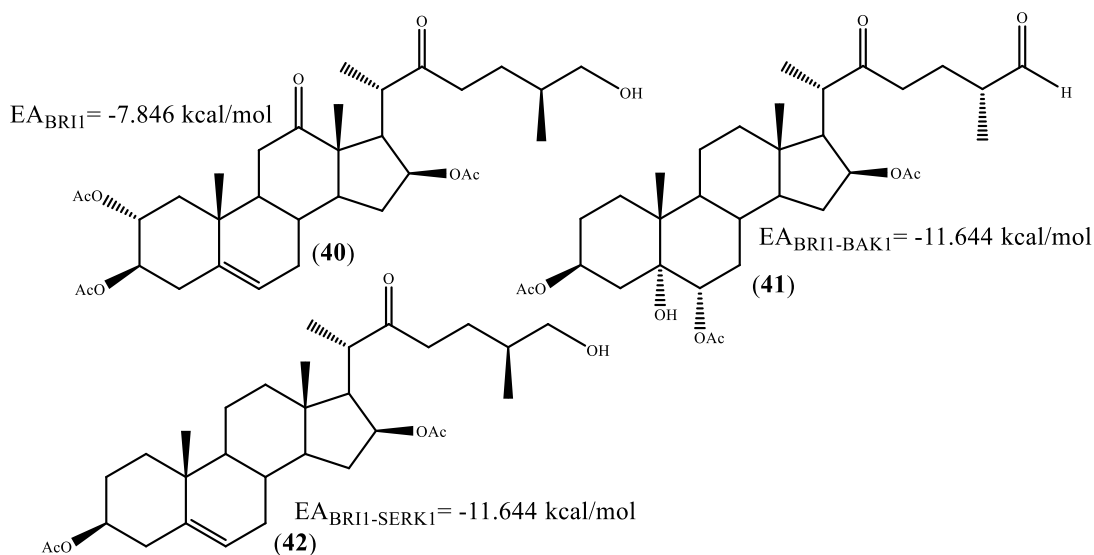


**Figura 21. Diagrama de Venn de ligandos específicos para cada diana.**



**Figura 22. Derivados 22-oxocolestánicos de laxogenina, botogenina y sarsasapogenina.**

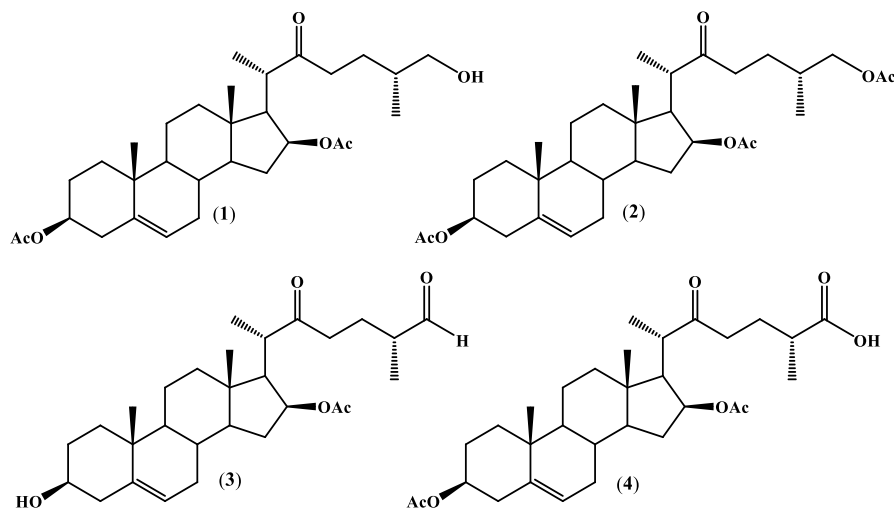
Energéticamente, los mejores PECV para cada uno de los receptores resultaron ser los compuestos **40** para BRI1, **41** para BRI1-BAK1, y **42** para BRI1-SERK1 (Figura 23).



**Figura 23. PECV con mejor energía de acoplamiento con BRI1, BRI1-BAK1 y BRI1-SERK1.**

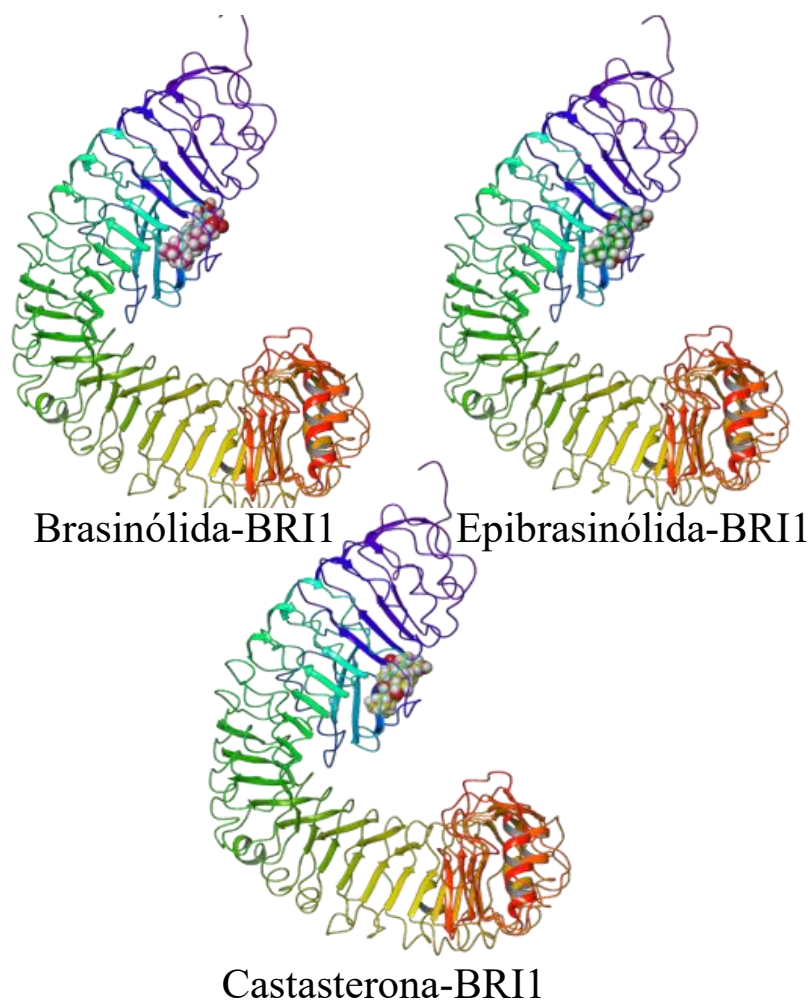
Para determinar la correlación entre los resultados *in silico* y la actividad biológica fue necesaria la síntesis de derivados 22-oxocolestánicos para su evaluación. Como se puede observar en las estructuras de los candidatos seleccionados, esta etapa requiere la funcionalización de algunas posiciones. Un esteroide de interés es la diosgenina que tiene una insaturación en C-5, como se requiere para la interacción con BRI1 y la formación del complejo BRI1-SERK1; además, también

se encuentra presente en los derivados con mejor energía previamente descritos. Esta serie de PECV que pueden obtenerse a partir de diosgenina tienen configuración  $25R$ , y orientación  $3\beta$  en el grupo OAc. Además, cubre la ventaja de disponibilidad por su mayor abundancia y accesibilidad lo que permitió trabajar sin restricciones las modificaciones necesarias para la obtención de los 4 derivados en C-26 mostrados en la figura 24. Además, al trabajar con este SP será más accesible desarrollar un modelo que permita extrapolar las metodologías de síntesis a otros esteroides y su optimización podría ser un área de interés, por estos motivos se realizó el análisis a detalle de las interacciones de los 4 derivados de diosgenina con cada una de las dianas evaluadas.



**Figura 24. Derivados 22-oxocholestanicos a partir de diosgenina.**

Para establecer el sitio en que los derivados 22-oxocholestanicos interactúan y determinar las interacciones que se producen con los residuos en cada una de las dianas, BRI1 y los complejos formados con BAK1 y SERK1, se estableció el sitio de unión de los brasinoesteroides de referencia. En la Figura 25 se presenta la interacción en 3D de los ligandos endógenos con BRI1, que como se puede observar, es el mismo y con esto se define la zona de interacción. Sin embargo, visualmente puede ocasionar confusiones, para detallar mejor este sitio de unión es necesario realizar el análisis de las interacciones de los residuos aminoacídicos entre el receptor y los ligandos.



**Figura 25. Diagramas de interacción 3D de BRI1 con brasinoesteroides naturales.**

Para delimitar el sitio activo de BRI1 se determinaron los aminoácidos y el tipo de interacciones que se presentan con los BR de referencia; así se estableció el parámetro de comparativa al momento de analizar los ligandos. En la Figura 26 se muestra el diagrama de interacciones 2D de la BL; en su estructura contiene 4 grupos hidroxilos, de los cuales dos forman puente de hidrógeno, el de la cadena colestánica en C-23 con el OH de la SER647 de BRI1; el otro, en C-3, que interactúa con un grupo hidroxilo, pero ahora de la THR729, ambos aminoácidos polares sin carga. En cambio, el hidroxilo de C-2 interactúa con la LYS601 la cual tiene carga positiva y se establece un puente con los electrones libres del OH. Las interacciones se pueden considerar distribuidas de manera homogénea; podría indicarse una ligera tendencia en que la cadena colestánica se encuentra rodeada por un mayor número de aminoácidos alifáticos. De forma general, la conformación con la que BL entra en el sitio activo de BRI1 no presenta una tendencia hacia alguna zona de la estructura.

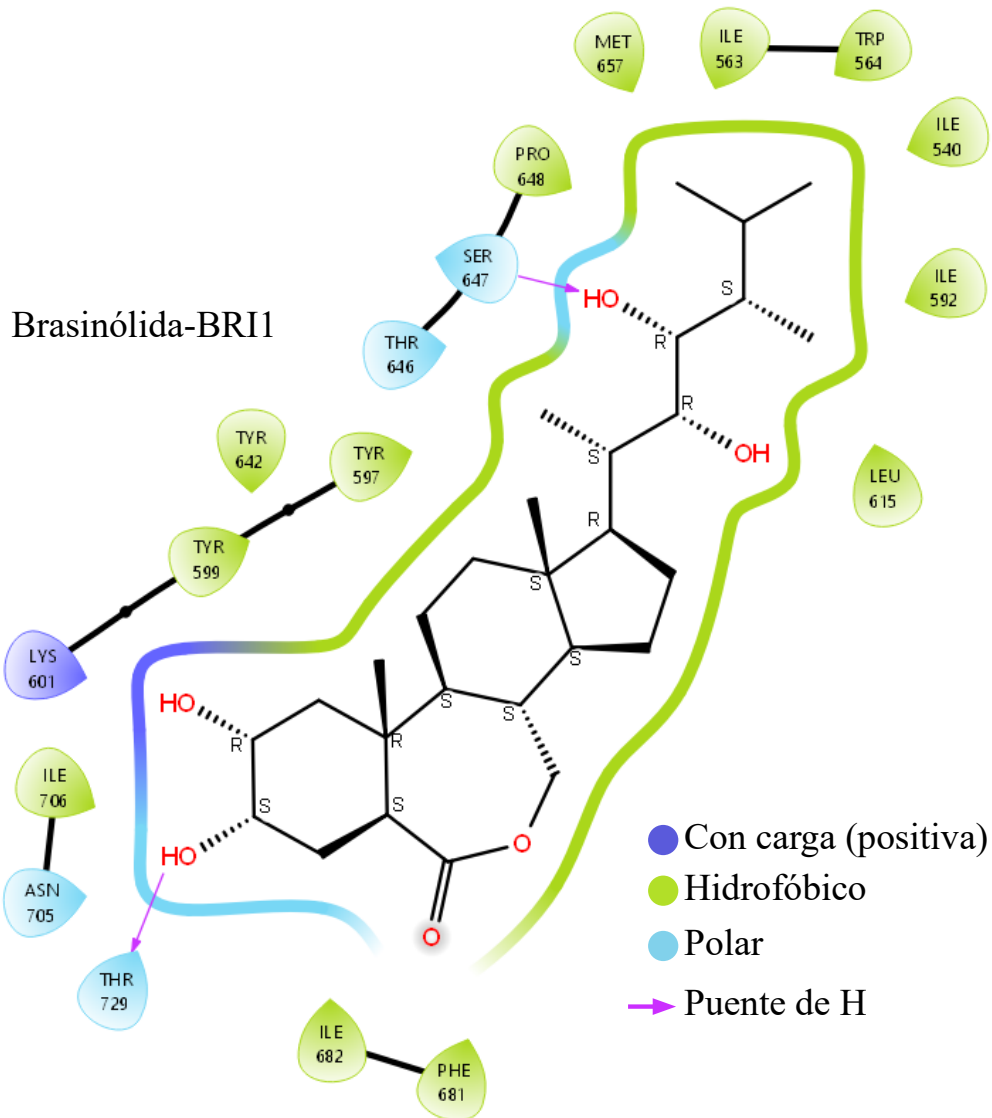


Figura 26. Diagrama de interacción 2D de brasinólida-BRI1.

La epibrasinólida y la brasinólida sólo se diferencian por la estereoquímica en el C-24, la primera presenta configuración *R*, que desde una perspectiva visual se puede considerar un cambio no importante; sin embargo, al analizar las interacciones en el diagrama 2D de este brasinoesteroide podemos observar (Figura 27) que si hay un cambio notable en la forma de interacción entre la estructura y los residuos del receptor; la cadena colestánica que anteriormente estaba rodeada de aminoácidos alifáticos, ahora, con el cambio de configuración no muestra interacciones puntuales aunque sigue siendo una zona hidrofóbica. Por la manera en que están distribuidos estos aminoácidos la molécula se acomoda de forma contraria (como en espejo) en comparación con la BL, el único puente de hidrógeno que forma epibrasinólida es con el OH de TYR642; la configuración en C-24 favoreció que la interacción con LYS601 fuera con el oxígeno del carbonilo

en el anillo B. En general, se observa una mayor interacción de la cara alfa del brasinoesteroide con los aminoácidos.

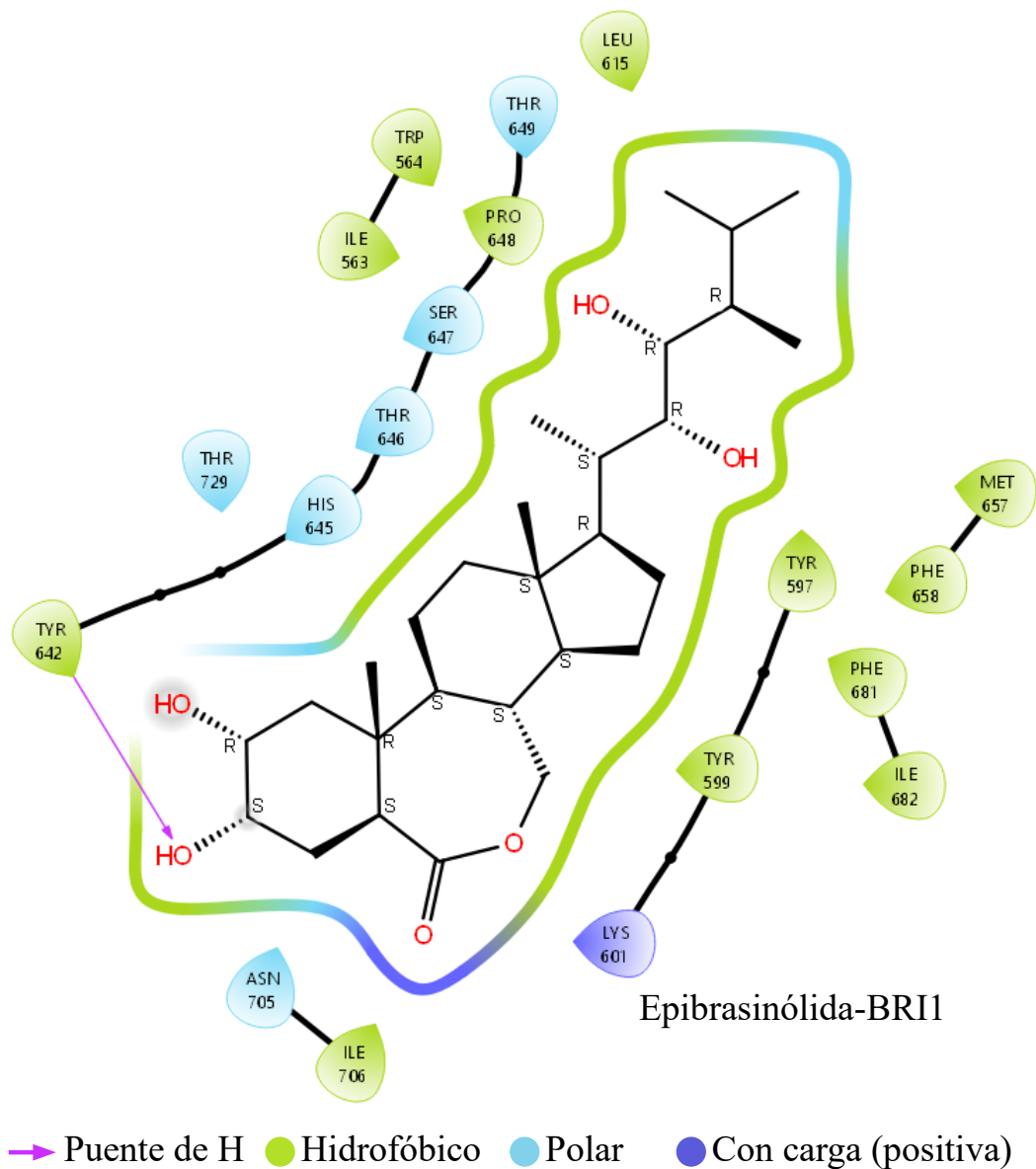
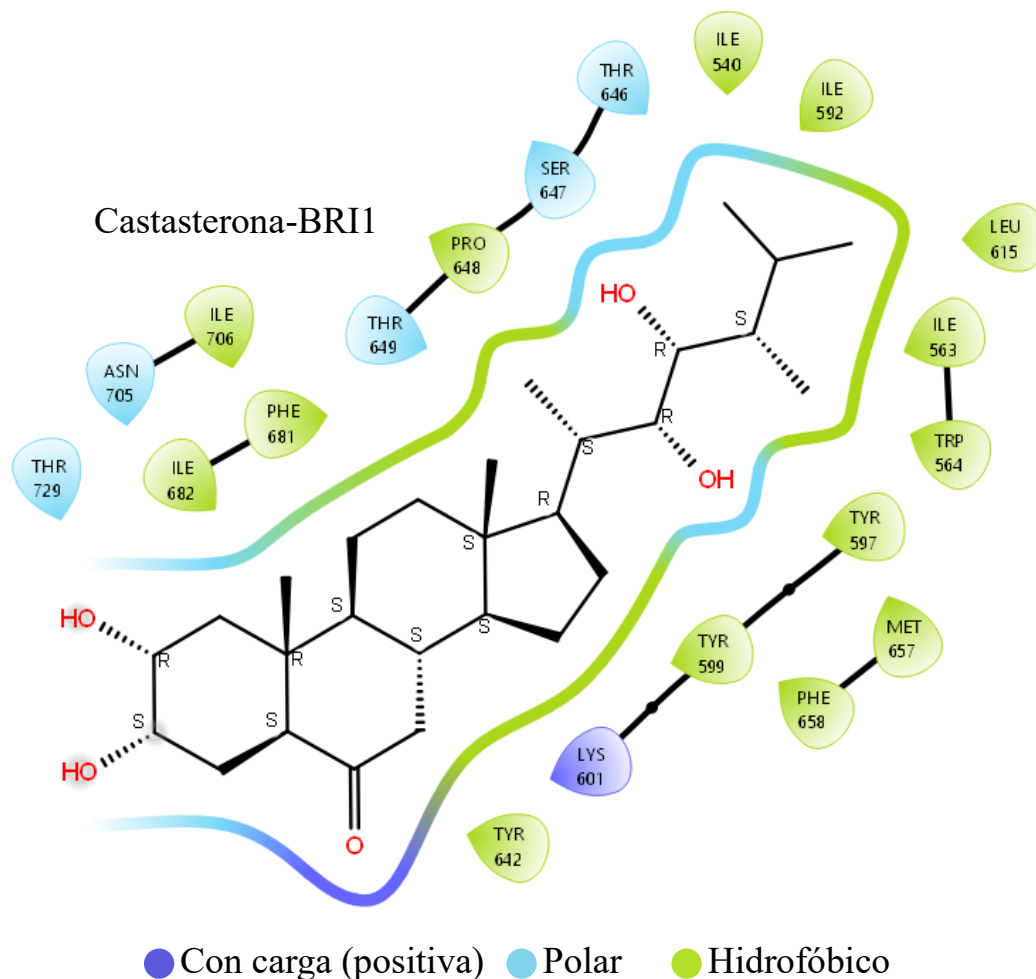


Figura 27. Diagrama de interacción 2D de epibrasinólida-BRI1

Finalmente, la cadena colestánica de la castasterona, igual a la de la BL, posee también una distribución homogénea (Figura 28), sólo que, en contraste con ésta, el tipo de interacción de sus hidroxilos es polar y las interacciones hidrofóbicas se cargan hacia la parte alifática de la estructura. Curiosamente, a pesar de que la castasterona presenta una EA mayor que la BL, ésta no forma puentes de hidrógeno con el receptor, la carga positiva se mantiene con el oxígeno del

carbonilo en el anillo B, como en la epibrasinólida, lo que puede indicar que este átomo entre los carbonos C-6 y C-7 en el BR anterior no genera tanta influencia en la interacción.



**Figura 28. Diagrama de interacción 2D de castasterona-BRI1**

Para obtener la similitud entre los derivados 22-oxocolestánicos con los BR de referencia se compararon el número de aminoácidos clave, que son aquellos que se presentan en las 3 referencias, tanto por número de residuos como por tipo de interacción, en la

Tabla 5 se muestra el resumen de este análisis, indicados en rojo los aminoácidos clave, con 11 presenta interacción hidrofóbica, 2 son interacciones polares con THR646 y ASN705, y uno de carga positiva con LYS601.

El sitio de unión de los ligandos endógenos propicia la formación del complejo BRI1-BAK1. La Figura 29 muestra sobreposición de los tres BRs de referencia (brasinólida, epibrasinólida y castasterona) en el sitio activo. Para detallar el sitio se realizó el análisis de interacciones con los diagramas 2D de estos tres brasinoesteroides de referencia.

Tabla 5. Aminoácidos de BRI1 que interactúan con los BRs de referencia.

Compuesto	Tipo de interacción					
	Hidrofóbicos			Polar	Con carga positiva	Puente de H
Brasinólida	MET657 ILE540 TRP564 ILE563 PRO648	ILE682 ILE706 TYR599 TYR597	TYR642 PHE681 LEU615 ILE592	THR646 ASN705	LYS601	SER647 THR729
Epibrasinólida	PHE681 ILE682 ILE706 ILE563	PHE658 MET657 LEU615 TRP564	PRO648 TYR599 TYR597	THR649 SER647 THR646 ASN705 HIS645 THR729	LYS601	TYR642
Castasterona	PHE681 ILE682 ILE706 TYR597 TYR642	PHE658 MET657 LEU615 TRP564 ILE563	ILE540 ILE592 PRO648 TYR599	THR649 SER647 THR646 ASN705 THR729	LYS601	

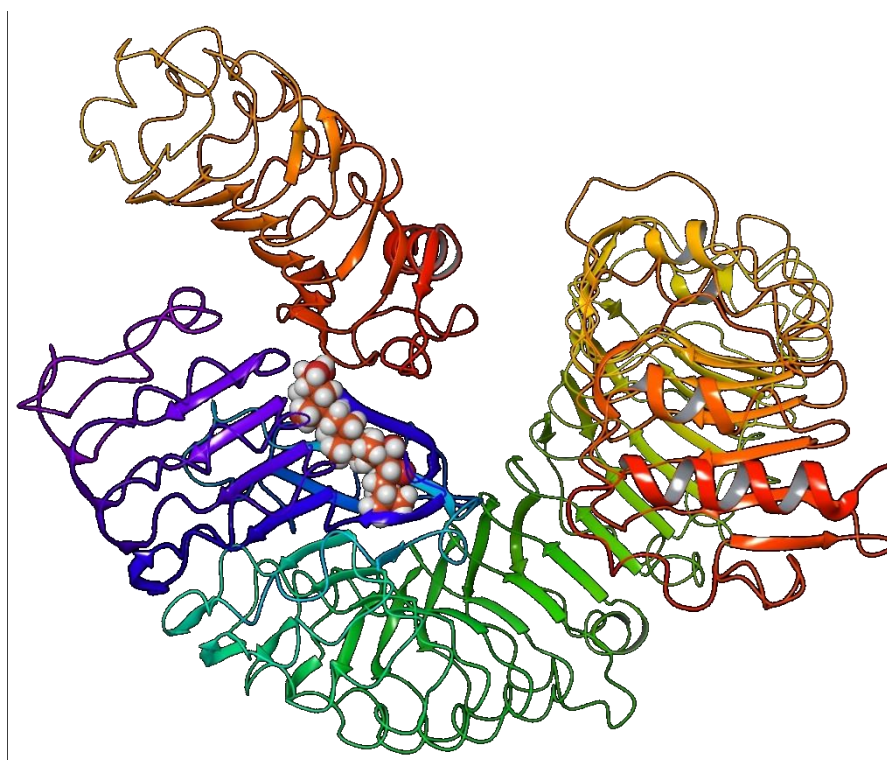


Figura 29. Diagramas de interacción 3D de BRI1-BAK1 con BRs de referencia.

La presencia de los grupos hidroxilo facilitan la formación de puentes de hidrógeno entre los BR de referencia y el complejo. La distribución de las interacciones hidrofóbicas es homogénea con toda la parte alifática de la estructura, pero se observó una mayor tendencia de interacción polar y formación de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos en el anillo A y de la cadena lateral con algunos residuos, por ejemplo, con histidina y asparagina que son aminoácidos con carga (Figura 30).

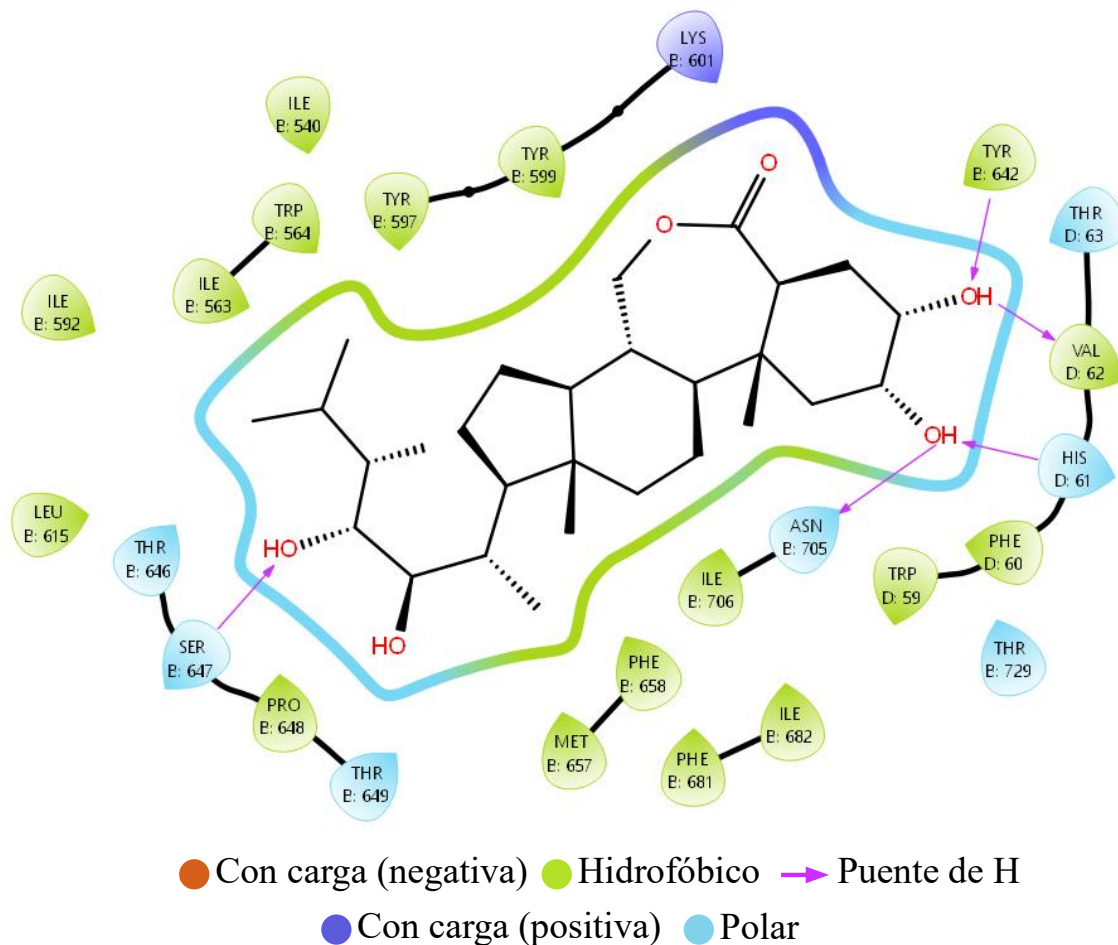


Figura 30. Diagrama 2D de interacciones entre BRI1-BL-BAK1.

Los tres brasinoesteroides presentaron interacción con los mismos residuos, la diferencia mayor fue que brasinólida formó un mayor número de puentes de hidrógeno. Los residuos de aminoácidos clave para la formación de este complejo (Tabla 6) son 15 de tipo hidrofóbico; 4 son polares manteniéndose la THR646 del acoplamiento solo con BRI1, aquí todas las interacciones de este tipo fueron con treoninas. También se mantiene la interacción con LYS601 con carga positiva, y se adicionó a la lista de residuos clave dos interacciones de puente de hidrógeno con SER647 y TYR642 que se espera estén presentes en compuestos relacionados a la respuesta a estrés.

Tabla 6. Aminoácidos de BRI1-BAK1 que interactúan con los BRs de referencia.

Compuesto	Tipo de interacción					
	Hidrofóbicos			Polar	Con carga positiva	Puente de H
Brasinólida	PHE681 ILE682 TRP59 PHE60 ILE706	PHE658 MET657 LEU615 TRP564 ILE563	ILE540 ILE592 PRO648 TYR599 TYR597	THR646 THR649 THR729 THR63	LYS601	VAL62 TYR642 HIS61 ASN705 SER647
Epibrasinólida	PHE681 ILE682 TRP59 PHE60 ILE706	PHE658 MET657 LEU615 TRP564 ILE563	ILE540 ILE592 PRO648 TYR599 TYR597	THR646 THR649 ASN705 THR729 THR63 HIS61	LYS601	SER647 VAL62 TYR642
Castasterona	PHE681 ILE682 TRP59 PHE60 ILE706 VAL62	PHE658 MET657 LEU615 TRP564 ILE563	ILE540 ILE592 PRO648 TYR599 TYR597	THR646 THR649 THR729 THR63	LYS601	SER647 ASN705 HIS61 TYR642



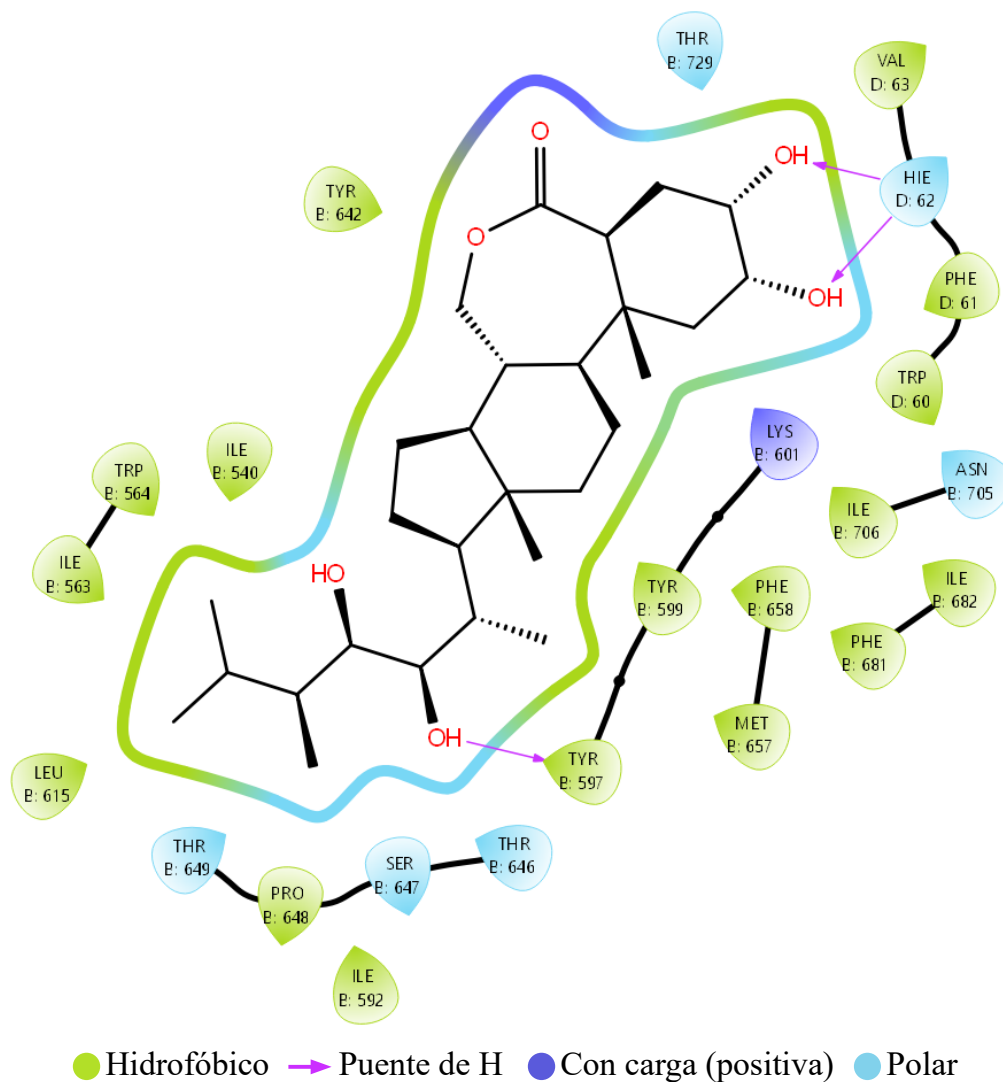
Figura 31. Diagrama de interacción 3D de BRI1-BR-SERK1.

Del análisis de las referencias para el complejo BRI1-BR-SERK1 el sitio de unión para los tres coincide, como se puede observar en la representación en 3D del acoplamiento (Figura 31); éste se define como el sitio de interés para que los ligandos diseñados 22-oxocolestánicos interactúen y produzcan un efecto positivo en la germinación. Para delimitar mejor esta zona se buscó (de la misma manera que con los receptores anteriores) a los residuos en común para las tres referencias y se seleccionó a los aminoácidos clave que se encuentran resumidos en la Tabla 7. Una interacción considerada importante para esta vía es la HIE62 (HIS62 protonada) ya que ésta únicamente se presentó al analizar este complejo.

**Tabla 7. Aminoácidos clave para la interacción de BRI1-SERK1 con los BRs de referencia.**

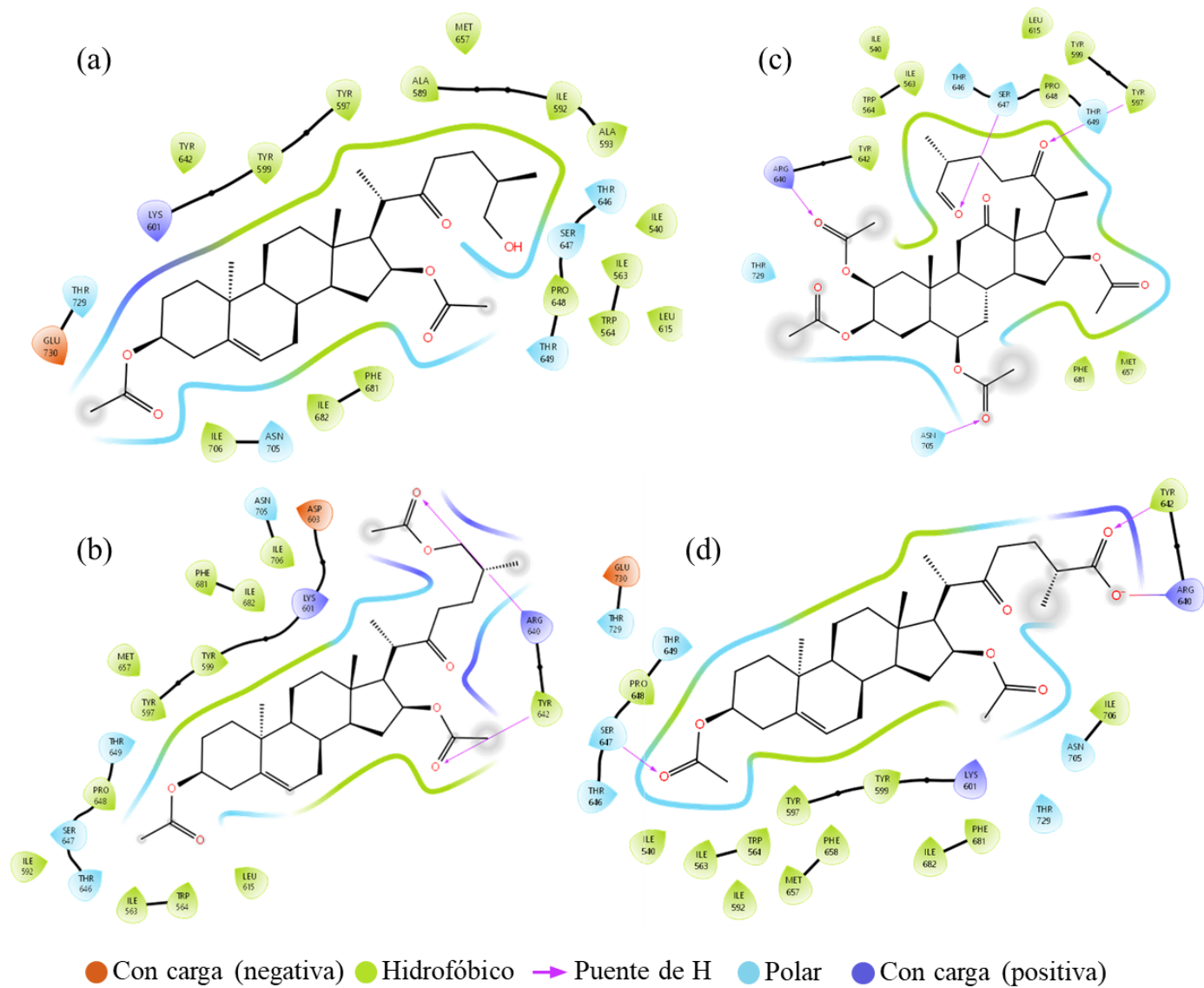
Compuesto	Tipo de interacción					
	Hidrofóbicos			Polar	Con carga positiva	Puente de H
Brasinólida	VAL63 PHE61 TRP60 ILE706 ILE682 PHE681	ILE540 TRP564 ILE563 LEU615 ILE592 TYR599	TYR642 PRO648 PHE658 MET657	THR729 ASN705 THR649 SER647 THR646	LYS601	HIE62 TYR597
Epibrasinólida	VAL63 PHE61 TRP60 ILE682 PHE681 ILE563 TRP564	PHE658 ILE706 TRP60 PHE61 LEU615 ILE540	PRO648 TYR597 TYR599 TYR642 MET657 ILE592	ASN705 THR729 THR649 THR646	LYS601	SER647 HIE62
Castasterona	ILE540 ILE592 PRO648 TRP564 ILE563	ILE682 TRP60 PHE61 VAL63 PHE 681	ILE706 PHE658 LEU615 MET657	THR646 HIS645 THR729 ASN705 THR649	LYS601	HIE 62 SER 647

En la interacción del complejo con SERK1 los brasinoesteroides tomaron una orientación que favoreció que la estructura se rodeara en general de residuos mediante interacción hidrofóbica. Las regiones donde se encuentran los hidroxilos (anillo A y cadena colestánica) se rodearon de zonas de interacción polar debido a la densidad electrónica que aportan los átomos de oxígeno presentes y alrededor del anillo lactónico se observó interacción con carga positiva (Figura 32).



**Figura 32. Diagrama 2D de interacción entre BRI1-BL-SERK1.**

Una vez definidos los residuos clave de cada una de las dianas evaluadas se analizaron las interacciones de los 4 PECV 22-oxocolestánicos derivados de diosgenina, donde se observó la formación de casi todas las 11 interacciones hidrofóbicas que deben tener para activar la proteína asociada al receptor BRI1 como lo hacen los BRs de referencia. Únicamente el derivado 26-ácido no completa las cuatro interacciones polares haciéndole falta la correspondiente con SER647 y se puede observar (Figura 33) que en los derivados **1** (26-OH) y **3** (26-CHO) estas interacciones son con la cadena 22-oxocolestánica, y en el derivado **2** (26-acetilado) y **4** (26-ácido) estas interacciones se presentan con los grupos acetilo en C-3 y C-16 en ambos casos.



**Figura 33. Diagrama de interacción 2D de BRI1 con a) 26-OH (1), b) 26-CHO (3), c) 26-OAc (2) y d) 26-COOH (4).**

En la Tabla 8 se presentan a detalle los residuos aminoacídicos con los que interaccionaron los derivados de diosgenina, así como su clasificación según el tipo; en verde se presentan aquellas que coinciden con los aminoácidos seleccionados como clave de los de referencia (en rojo). De este análisis se destacó que los cuatro 22-oxocolestanos derivados de diosgenina son muy similares a los BRs naturales pues se unen en el mismo sitio, y en específico por los residuos a los que se unen, aumenta su posibilidad de actuar como PECV enfocados a resistencia a condiciones de estrés por la vía de activación de BRI1.

**Tabla 8. Resumen de aminoácidos de los derivados de diosgenina con BRI1.**

Compuesto	Tipo de interacción						
	Hidrofóbicos			Polares	Cargados +	Cargados -	Puente de H
Residuos clave de las referencias	MET657 TRP564 ILE563 PRO648	ILE682 ILE706 TYR599 TYR597	TYR642 PHE681 LEU615	THR646 ASN705	LYS601	NP	NP
26OH-Dg 11/11 2/2 1/1	TYR 599 TYR 597 TYR 642 ILE 682 PHE 681 PRO 648	ILE 706 ALA 589 PHE 658 MET 657 ILE 592 ILE 563	ILE 540 ALA 539 TRP 564 ALA 593 LEU 615	THR 729 ASN 705 THR 649 SER 647 THR 646	ARG 640 LYS 601	GLU 730	
26CHO-Dg 11/11 2/2 0/1	TYR 642 TYR 599 TYR 597 LEU 615 PHE 658 MET 657	ILE 706 PRO 648 ILE 682 PHE 681 ALA 589 ILE 540	ILE 592 ALA 593 TRP 564 ILE 563 ALA 589 ALA 589	THR 649 SER 647 THR 646 ASN 705 THR 729	ARG 640	GLU 730	
26COOH-Dg 10/11 2/2 1/1	ILE 706 ILE 682 PHE 681 TYR 599 TYR 597	ALA 589 PRO 648 TRP 564 ILE 540 ILE 563	PHE 658 MET 657 ALA 593 LEU 615 ILE 592	THR 729 ASN 705 THR 649 THR 646	LYS 601	GLU 730	TYR 642 ARG 640 SER 647
26OAc-Dg 10/11 2/2 1/1	TYR 599 TYR 597 ILE 706 ILE 682 PHE 681	ILE 592 ALA 589 ILE 540 TRP 564 ILE 563	MET 657 PRO 648 ALA 593 PHE 658 LEU 615	THR 729 SER 639 ASN 705 THR 649 SER 647 THR 646	LYS 601	GLU 730 ASP 603	ARG 640 TYR 642

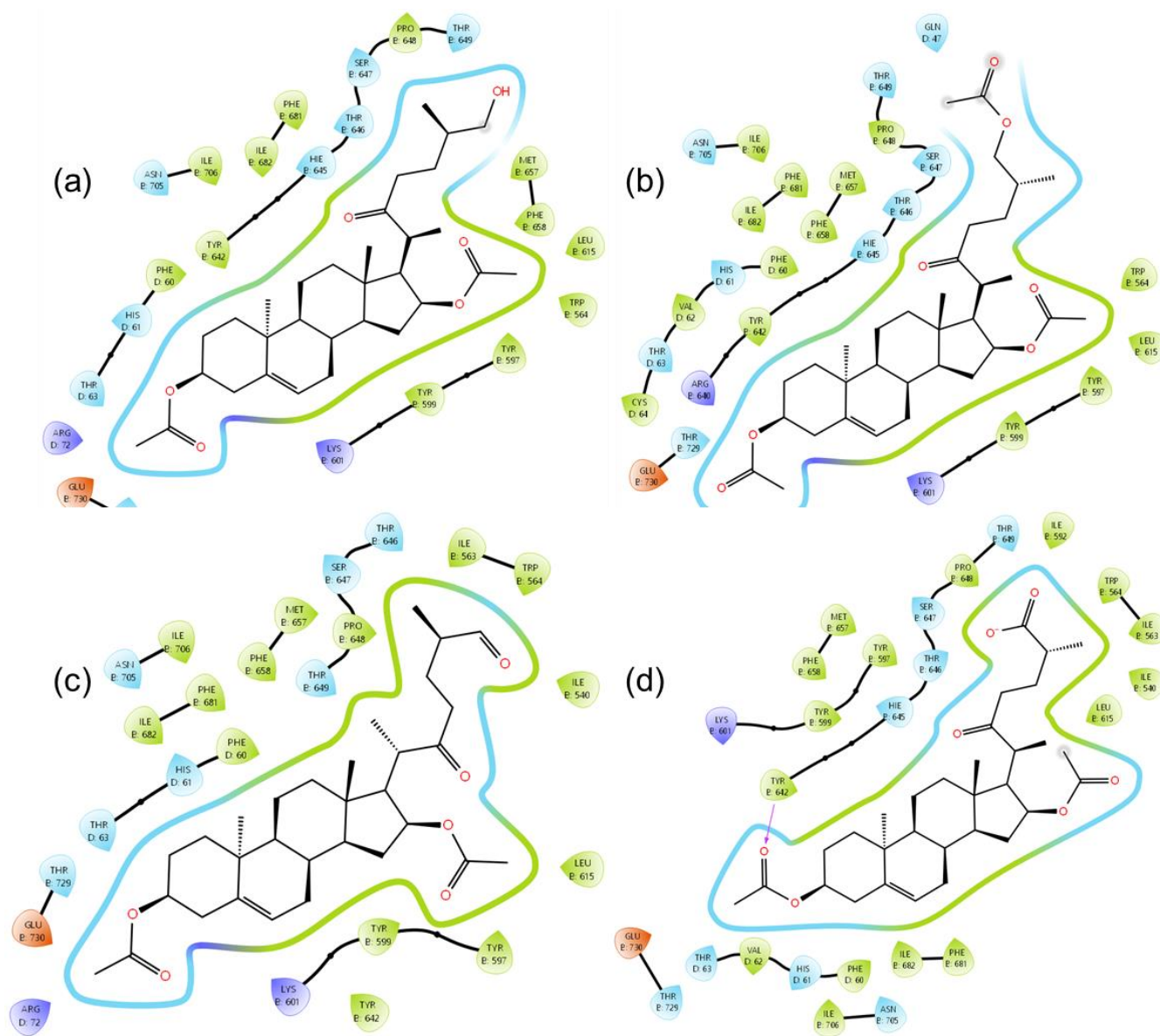


Figura 34. Diagramas de interacción 2D de BRI1-BAK1 con a) 26-OH (1), b) 26-OAc (2), c) 26-CHO (3) y d) 26-COOH (4).

El análisis estadístico determinó que la peor EA la presentaron los derivados 26-acetilados. Para el análisis de la serie derivada de diosgenina en las interacciones con los residuos se observó esa misma tendencia, ya que del total de aminoácidos clave (22 interacciones) este derivado, el acetilado en C-26, es el que presentó el menor número (Tabla 9). En los derivados 26-OH, 26-OAc y 26-CHO se resalta la interacción con LYS601 en la zona de los anillos A y B de las moléculas, en específico entre el acetilo beta en C-3 y la insaturación en C-5; para estos mismos compuestos su cadena 22-oxocolestánica y en la cara beta de los tres primeros anillos se aglomeraron las interacciones polares e hidrofóbicas (Figura 34). En el derivado 26-ácido se concentraron más las interacciones polares e hidrofóbicas al final de la cadena, es decir, cerca de C-25, C-26 y la zona que abarca C-3, C-5 y C-6, únicamente este derivado presentó uno de los puentes de hidrógeno entre TYR642 y el carbonilo del acetato en C-3.

**Tabla 9. Resumen de aminoácidos de los derivados de diosgenina con BRI1-BAK1.**

Compuesto	Tipo de interacción							
	Hidrofóbicos			Polares		Cargados +	Cargados -	Puente de H
Residuos clave de las referencias	PHE681 ILE682 TRP59 PHE60 ILE706	PHE658 MET657 LEU615 TRP564 ILE563	ILE540 ILE592 PRO648 TYR599 TYR597	THR646 THR649 THR729 THR63		LYS601	NP	TYR642 SER647
26OH-Dg 14/15 3/4 1/1 0/2	ILE706 ILE682 PHE681 PHE60	PHE658 MET657 LEU615 PRO648	TYR599 TRP564 TYR597 TYR 642	ASN705 THR63 HIS61 THR649	THR646 HIE645 SER647	LYS601 ARG72	GLU730	
26CHO-Dg 13/15 3/4 1/1 0/2	ILE706 ILE682 PHE681 PHE60 PHE658	TYR599 TYR642 LEU615 TYR597 MET657	PRO648 ILE540 TRP564 ILE563	ASN705 THR63 HIS61	SER647 THR646 THR649	LYS601 ARG72	GLU730	
26COOH-Dg 14/15 4/4 1/1 1/2	ILE540 LEU615 PHE658 MET657 TYR599	PHE60 VAL62 TYR597 TRP564 ILE563	ILE592 PRO648 PHE681 ILE682 ILE706	THR729 THR63 HIS61 ASN705	SE647 THR649 HIE645 THR646	LYS601	GLU730	TYR642
26OAc-Dg 10/15 4/4 1/1 0/2	CYS64 VAL62 PHE60 PHE658 MET657	TYR597 PHE681 LEU615 TRP564 TYR599	ILE682 ILE706 CYS64 TYR642	ASN705 THR63 HIS61 GLN47 THR649	SER647 THR646 HIE645 THR729	ARG640 LYS601	GLU730	

Del análisis del complejo BRI1-SERK1 la interacción con HIE62 fue seleccionada como importante ya que solo se presentó entre las referencias y esta diana, sin embargo, en ninguno de los derivados de diosgenina estuvo presente (Tabla 10). Esto significa que la serie derivada de diosgenina no es conveniente para el proceso de germinación, pero se debe hacer resaltar que el análisis estadístico indicó que tener un doble enlace entre C-5 y C-6 fue el sustituyente que mejoraba la energía de acoplamiento, en el diagrama de interacción 2D (Figura 35) podemos observar que cerca de C-5 se presentan en su mayoría interacciones de tipo polar e hidrofóbicas.

**Tabla 10. Aminoácidos de BRI1-SERK1 que interactúan con los derivados de diosgenina.**

Compuesto	Aminoácidos hidrofóbicos			Polares	Cargados positivamente	Puente de H
Residuos clave de las referencias	VAL63 PHE61 TRP60 PHE681	TRP564 ILE563 LEU615 ILE592	PRO648 PHE658 MET657	THR729 ASN705 THR649 THR646	LYS601	HIE62
26OH-Dg 10/14 4/4 1/1 0/1	ILE 706 VAL 63 PHE 61 PHE 681 ILE 682 PRO 648	LEU 615 ILE 540 TRP 564 ILE 563 TYR 642 TYR 599	PHE 658 MET 657 TYR 597 ILE 592 ALA 593	THR 729 THR 64 HIE 62 ASN 705 THR 649 THR 646	LYS 601	SER 647
26CHO-Dg 9/14 4/4 1/1 0/1	TYR 642 TYR 599 LEU 615 PHE 658 TYR 597	ILE 563 ILE 540 TRP 564 PRO 648 ILE 682	ILE 592 ILE 706 PHE 681 PHE 61 MET 657	THR 649 SER 647 THR 646 ASN 705 HIE 62 THR 64 THR 729	LYS 601	
26COOH-Dg 10/14 4/4 1/1 0/1	TYR 642 TYR 599 LEU 615 PHE 658 TYR 597 MET 657	ILE 563 TRP 564 ILE 592 PRO 648 PHE 681 ILE 682	PHE 61 ILE 706 VAL 63 ILE 540	THR 649 THR 646 ASN 705 HIE 62 THR 64 THR 729	LYS 601	SER 647
26OAc-Dg 9/14 4/4 1/1 0/1	TRP 516 LEU 615 ILE 540 ILE 592 TRP 564 ILE 563	PRO 648 ILE 682 PHE 681 PHE 61 ILE 706	TYR 597 TYR 642 PHE 658 MET 657 TYR 599	THR 646 SER 647 THR 649 HIE 62 ASN 705 THR 64 THR 729	LYS 601	

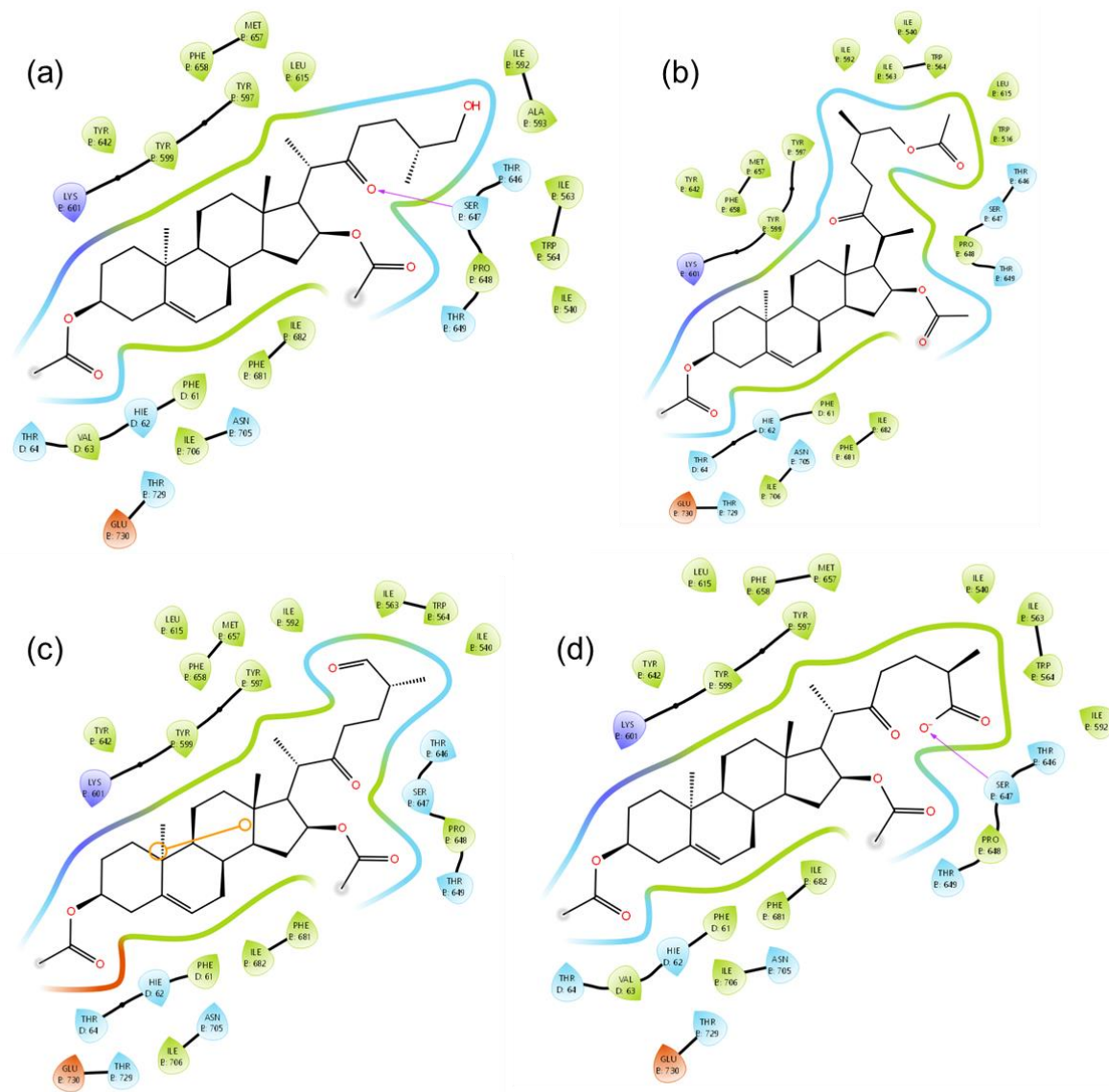


Figura 35. Diagrama de interacción 2D de BRI1-SERK1 con a) 26-OH, b) 26-OAc, c) 26-CHO y d) 26-COOH.

## 1.3 Metodología

### 1.3.1 Diseño teórico de derivados 22-oxocolestánicos

Para el análisis *in silico* se diseñó una base de compuestos a partir de la estructura base de los derivados 22-oxocolestánicos previamente evaluados en el grupo de investigación de Sandoval y colaboradores [42] [43]. Se seleccionó una serie de sustituyentes en 7 posiciones del esqueleto base con determinada estereoquímica (Figura 36).

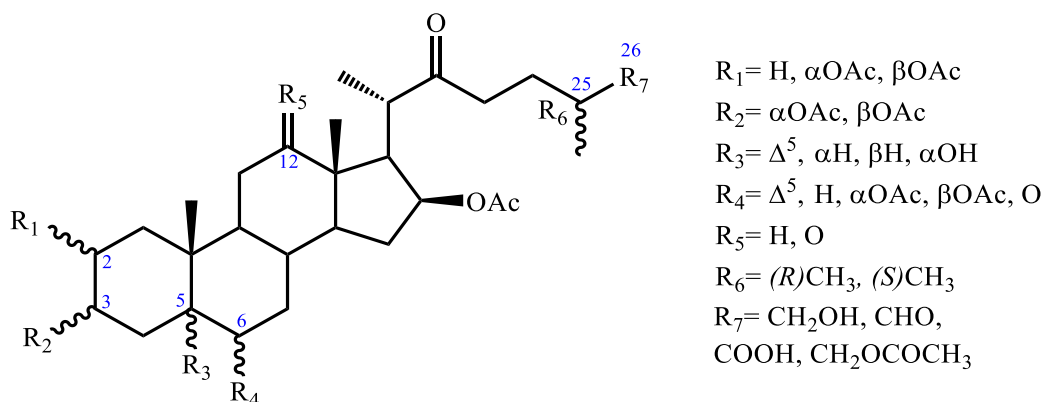


Figura 36. Estructuras 22-oxocolestánicas seleccionadas para realizar el diseño de nuevos PCVE.

### 1.3.2 Preparación de ligandos de acoplamiento

Las estructuras de los ligandos fueron construidas en 2D con el software Schrödinger Maestro [44] y se prepararon con el módulo LigPrep, mediante la minimización de energía con el campo de fuerzas OPLS4 [45]. Los estados de protonación de los compuestos modelados fueron ajustados al pH fisiológico de plantas (pH 6.5), mediante las rutinas Epik [46] y Glide v.XX [47], de la suite de Schrödinger.

### 1.3.3 Preparación de receptores

Los receptores seleccionados BRI1, BRI1-BAK1 y BRI1-SERK1 (códigos PDB: 3RGZ [28], 4M7E y 4LSX [38], respectivamente) [48] fueron preparadas con ayuda del módulo “Protein Preparation Wizard” [49], para preparar los receptores se eliminó el agua, se indicaron condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

### 1.3.4 Estudios de acoplamiento molecular

Se evaluaron *in silico* 1247 estructuras 22-oxocolestánicas, los cálculos de las energías de acoplamiento molecular (EA, en kcal/mol) entre ligando-proteína fueron realizados utilizando el programa Glide [47]. Los resultados de interacciones espaciales y particulares, con residuos aminoacídicos de cada proteína, se visualizaron empleando la plataforma Schrödinger Maestro [44].

### 1.3.5 Análisis de energías de acoplamiento

Se determinó la importancia de cada descriptor evaluado mediante análisis estadístico. Se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis [50], dada la no normalidad de los datos determinada con la prueba Anderson-Darling [41]. Se comparó el nivel energético de los ligandos 22-oxocolestánicos asociados al receptor BRI1, y a los complejos BRI1-BAK1 y BRI1-SERK1. Se determinó si los ligandos son análogos de brasinoesteroides (BR) al examinar el sitio de unión y las interacciones con los residuos aminoacídicos. Los BR de referencia fueron brasinólida, epibrasinólida y castasterona.

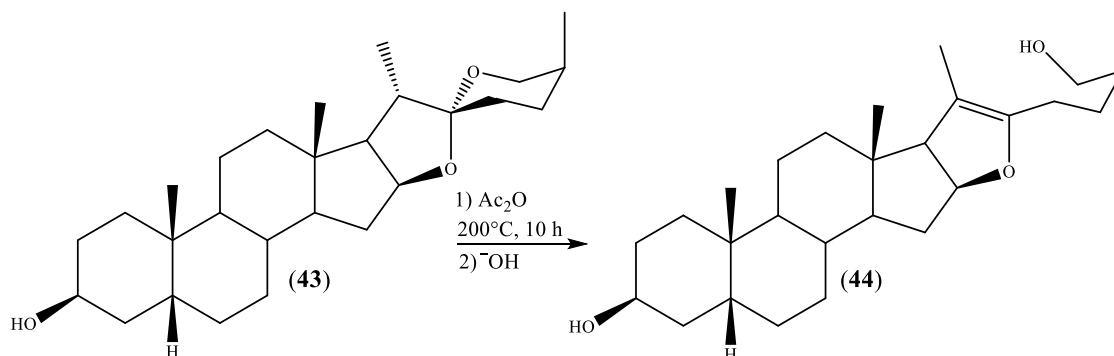
## CAPITULO 2. Síntesis y caracterización

## 2.1 Antecedentes

### 2.1.1 Aperturas del espiroacetal espirostánico

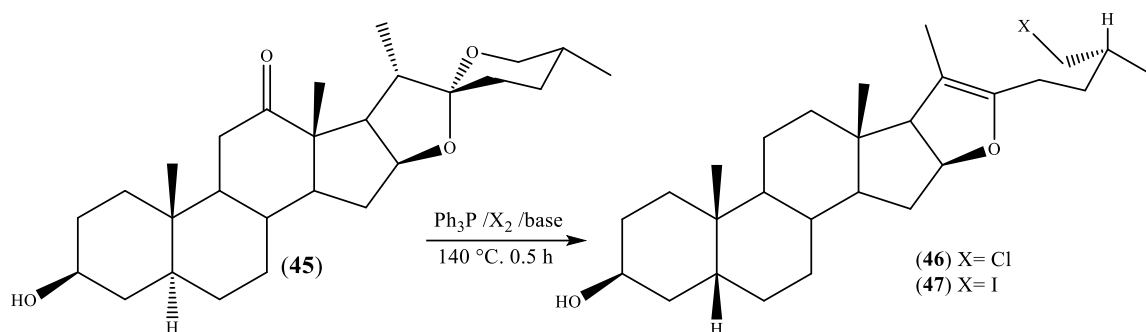
Llevar a cabo una síntesis sin ninguna idea de sí el cambio es benéfico o no para lograr actividad biológica no es aconsejable. En la actualidad es posible disminuir esta incertidumbre con el empleo de herramientas bioinformáticas que permiten predecir el potencial de ligandos con una diana de interés [51]. El análisis de moléculas con actividad anticancerígena muy potente conllevó a determinar que introducir un grupo carbonilo en C-22 de una estructura colestánica es relevante. Así, en nuestro grupo de investigación se han sintetizado diversas estructuras 22-oxocolestánicas que han tenido alta actividad como anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatorios y otros, concluyendo que un grupo carbonílico en compuestos colestánicos deviene un farmacóforo importante [52], [53].

Dentro de los primeros estudios realizados por Marker estaba la búsqueda de rutas de síntesis que derivaran en progesterona, en este camino, reportó la obtención del intermediario pseudosarsasapogenina **44** al tratar sarsasapogenina **43** con anhídrido acético a 200°C, con un rendimiento del 70% como se muestra en el Esquema 1 [54].



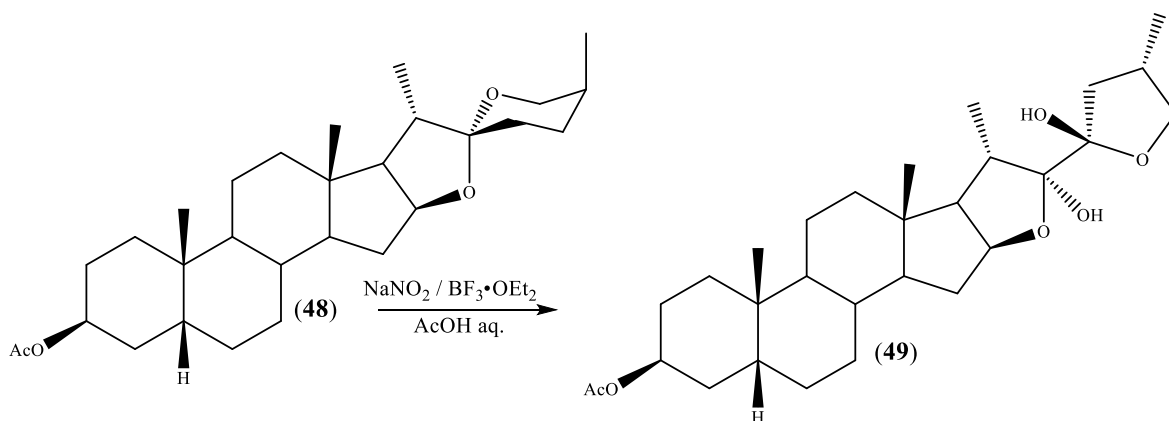
Esquema 1. Transformación de sarsasapogenina.

Una vez lograda la síntesis de progesterona, fue de gran interés para otros investigadores optimizar la apertura regioselectiva del anillo F, el incremento del rendimiento de esta reacción no se logró, pero si obtenerla a menor temperatura, a 130 °C sin emplear presiones elevadas. Una alternativa de esta metodología fue la obtención de estructuras pseudosapogenínicas con un halógeno en carbono 26, el derivado clorado **45** se obtuvo con 93% de rendimiento mientras que el yodado **46** solo con 50% [55], [56], a una temperatura de 140°C (Esquema 2).



**Esquema 2. Formación de pseudosapogeninas halogenadas en C-26.**

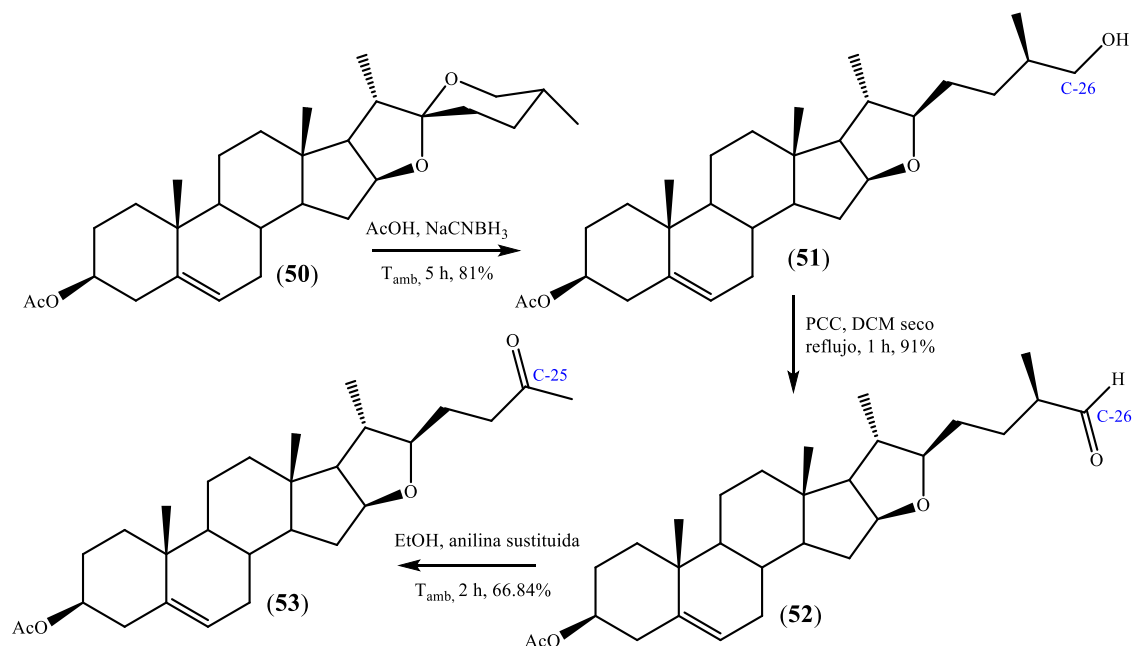
En 2006, López y colaboradores reportaron la apertura selectiva del anillo F de acetato de sarsasapogenina **48** (Esquema 3), el cual se logró con el tratamiento oxidativo de **48** para poder introducir una cetona en el carbono 23 que en medio ácido propició dicha apertura, finalmente con una ciclación interna se obtuvo un sistema bifuránico **49** hidroxilado en C-22 y C-23 [57].



**Esquema 3. Formación de cadena lateral bifuránica.**

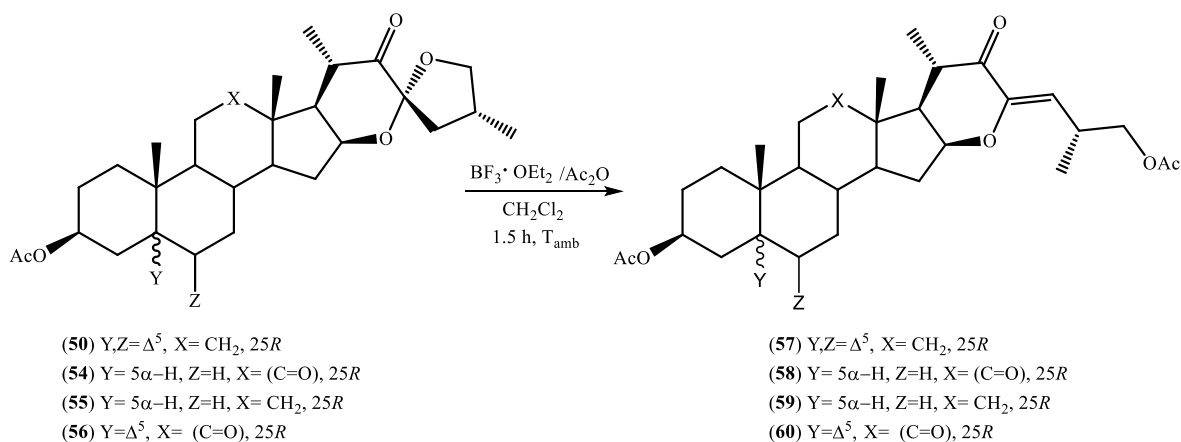
Hamid y colaboradores realizaron la apertura del anillo F (espiroacetal) de acetato de diosgenina **50**, la cual primero fue acetilada en C3 para evitar que esta tuviera alguna modificación no deseada; la apertura se realizó en medio ácido para obtener una cadena colestánica con el alcohol terminal (C-26) el cual se oxidó a su aldehído correspondiente y posteriormente mediante una ruptura oxidativa se obtuvo la cetona en C-25 (Esquema 4). Los compuestos fueron evaluados en líneas de cáncer y demostraron una alta actividad, en especial el derivado **51** con la inducción de apoptosis. También fueron evaluados *in silico*, estudio para el cual se emplearon como dianas la caspasa-3 y caspasa-9 relacionadas a la vía

de apoptosis. Finalmente reportaron la toxicidad de **51** que a 1000 mg/kg no presentaron efecto tóxico [58].



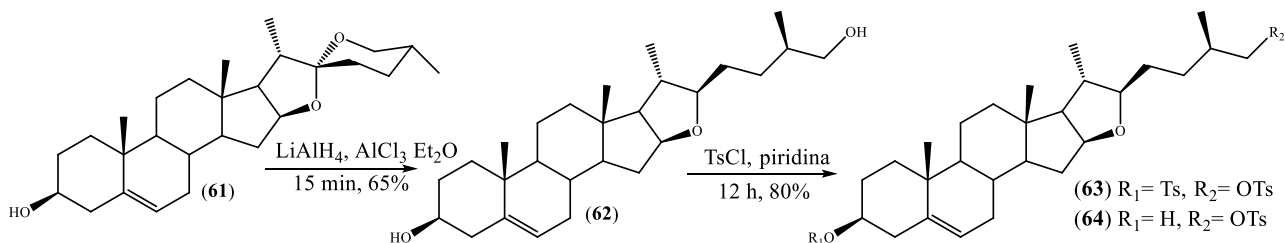
**Esquema 4. Ruta de síntesis de nuevos agentes anticancerígenos vía de apertura del espiroacetal de diosgenina 55.**

Generalmente en investigación los grupos tienen líneas específicas de trabajo, actualmente se presenta más la diversificación sobre todo en campos de aplicación, y esto es algo que se ha destacado principalmente en este capítulo con las metodologías reportadas de apertura de espiroacetales. Considerando lo anterior, se retomaron varios estudios, iniciamos con el trabajo de investigación de Morzycki y colaboradores, quienes en 2015 reportaron la apertura regio y estereoselectiva de esteroides 22-oxo-23-espiroacetálicos mediante reacciones catalizadas con BF<sub>3</sub>•OEt<sub>2</sub> y en otro estudio con TiCl<sub>4</sub>. Trabajaron con los derivados de acetato de diosgenina **50**, hecogenina **54**, tigogenina **55** y botogenina **56**, para la etapa de apertura de la piranona (los 22-oxo-23-espiroacetálicos) utilizaron anhídrido acético, BF<sub>3</sub>•OEt<sub>2</sub> como catalizador, DCM a temperatura ambiente (Esquema 5) para dar con los derivados con el anillo F abierto en rendimientos del 61-82% [59], [60].



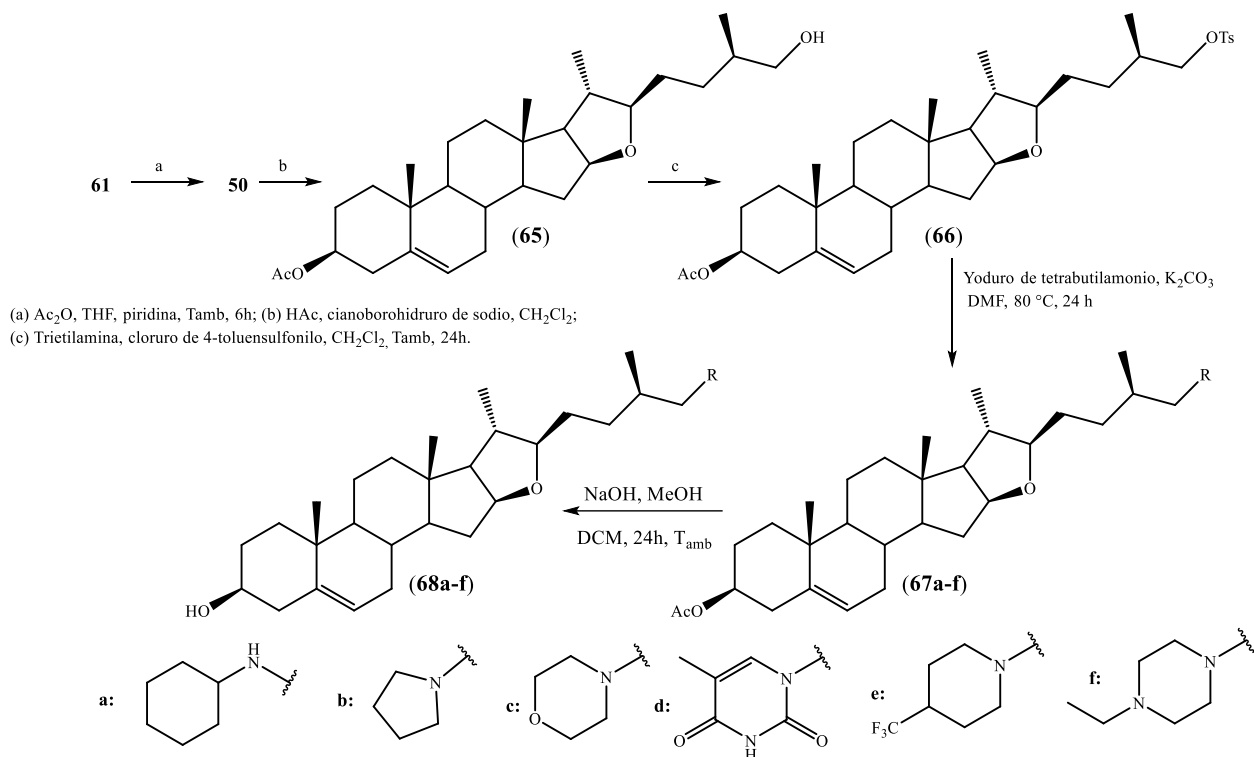
**Esquema 5. Apertura regioselectiva de esteroides 22-oxo-23-espiroacetálicos.**

Los derivados esteroidales espiroestánicos han demostrado un gran potencial biológico, por lo tanto, en el grupo de Erdagi y Yildiz en 2022, sintetizaron compuestos de este tipo que contenían átomos de nitrógeno en su estructura y evaluaron la viabilidad celular y la actividad antiproliferativa en células de cáncer de pulmón y mama. Ellos utilizaron como materia prima la diosgenina **61** y con la apertura reductiva del anillo F obtuvieron el derivado **62**. Posteriormente, el OH de la cadena colestánica lo tosilaron para generar un buen grupo saliente y favorecer la inserción del nitrógeno (Esquema 6) [61].



**Esquema 6. Síntesis de furostanos modificados en el anillo F.**

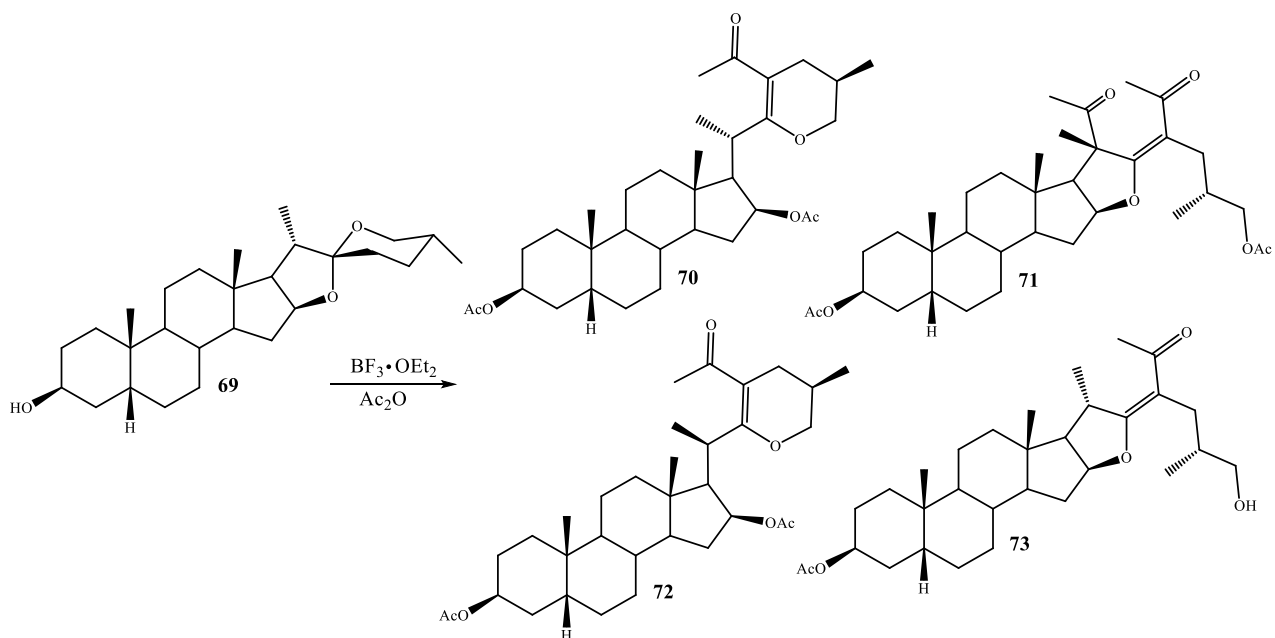
Zhang y colaboradores en 2022 realizaron un estudio de diseño y síntesis de nuevos derivados a partir de la apertura del espiroacetal de diosgenina, incluyendo 24 compuestos acetilados y 8 nitrogenados, este trabajo resultó relevante en cuanto a la aplicación, ya que el diseño se fundamentó en el potencial de los compuestos esteroidales de cadena abierta obtenidos por Erdagi; primero acetilaron el C-3 de diosgenina **61** para evitar subproductos que no eran de interés, posteriormente generaron el alcohol terminal **65** reportado por Erdagi (sin la previa acetilación en C-3), utilizando cianoborohidruro de sodio en medio ácido, después fue tosulado para obtener **66**, a éste le insertaron heterociclos y cadenas que contenían nitrógeno, derivados **67a-f** que con hidrólisis en medio básico regresaron a tener OH en C-3 **68a-f** (Esquema 7) y fueron evaluados como potenciales antiinflamatorios [62].



**Esquema 7. Ruta de síntesis de derivados de diosgenina.**

Como se ha descrito en este capítulo la regioselectividad de apertura del espiroacetal varía dependiendo del ácido de Lewis utilizado, lo mismo ocurre al abrir el anillo E en conjunto con el F, esto ha sido un área de interés para los grupos de investigación de Santillán y Sandoval-Ramírez, quienes han reportado esta apertura en sapogeninas de la serie  $25R$  y  $25S$ , por ejemplo, cuando utilizaron  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en medio ácido con diosgenina y hecogenina (de la serie  $25R$ ) se favoreció la formación de los derivados epoxicolestenos con alta estereoselectividad, en cambio con sarsasapogenina ( $25S$ ) los productos fueron una mezcla de epoxicolesteno y furosteno [63], [64].

Con el objetivo de ampliar la aplicación de estas reacciones en sapogeninas, Santillán reportó a inicios de este año la apertura de esmilagenina **69** (Esquema 8) de la que se obtuvo en mayor rendimiento el epoxicolesteno **70**, dos derivados furosténicos: el diacetilado en C-20 y C-23 **71** con un rendimiento del 20%, y en mucha menor proporción (trazas) el furosteno **72** acetilado solo en C-23, con este trabajo también reportaron la identificación de un nuevo derivado, el **73** caracterizado como epoxicolesteno  $\beta$ -orientado ( $20R$ ) [65].



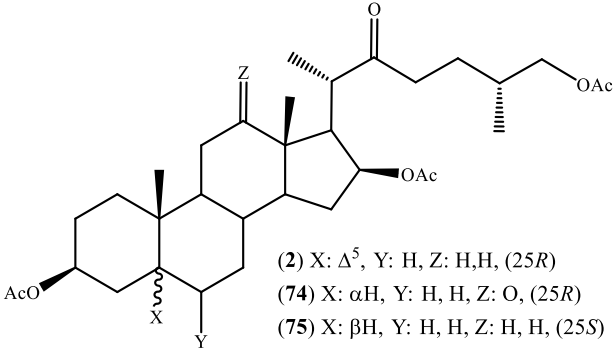
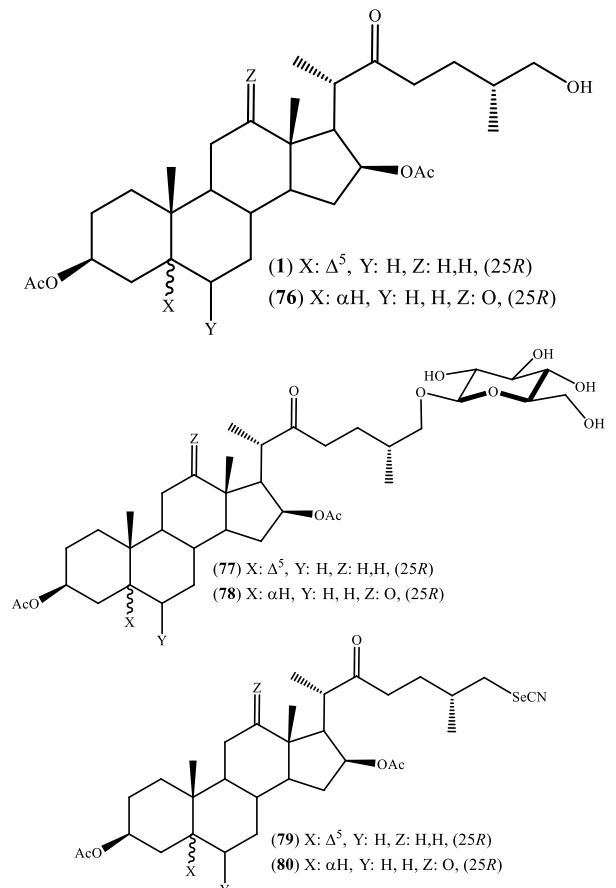
**Esquema 8. Apertura de anillos E y F en esmilagenina.**

### 2.1.2 Síntesis de compuestos 22-oxocolestánicos

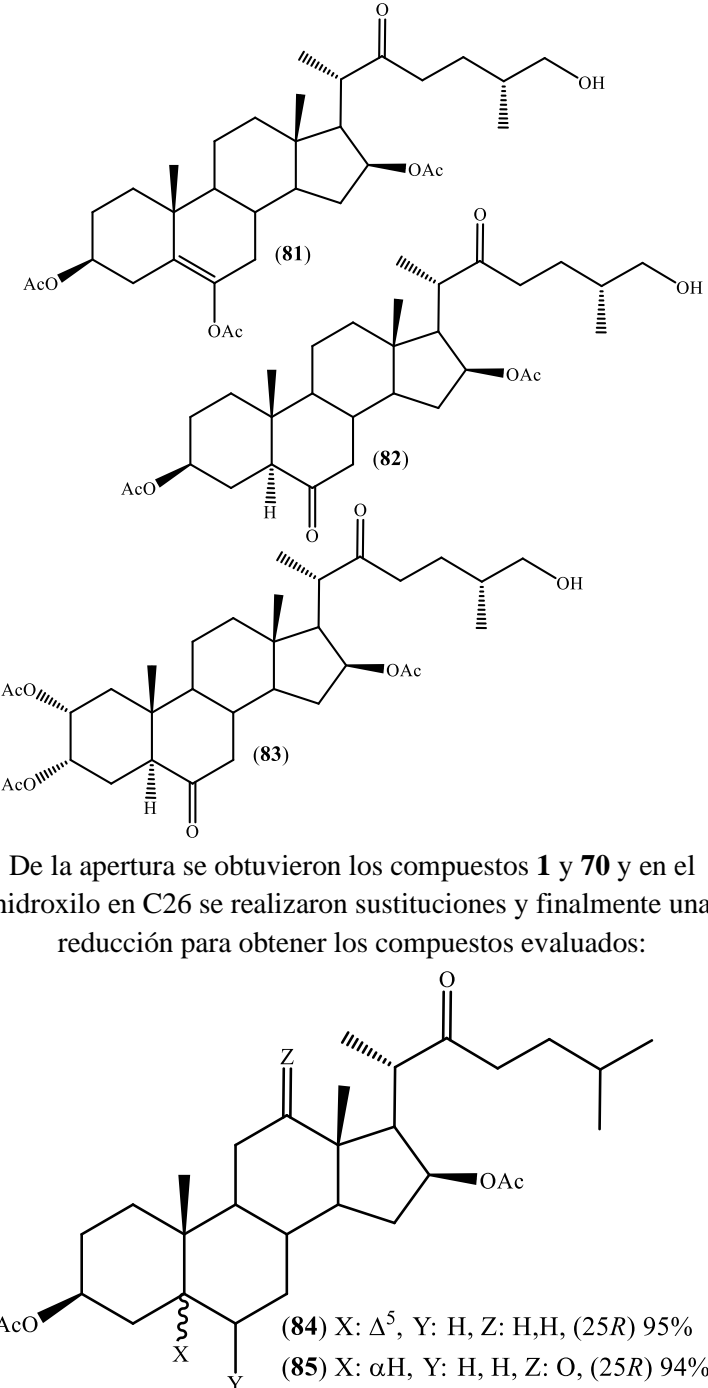
Tomando en cuenta condiciones específicas la metodología anterior se ha reportado para la obtención de derivados 22-oxocolestánicos de diferentes sapogeninas, actualmente se pueden encontrar múltiples reportes de grupos de investigación abordados anteriormente, la diferencia entre ellos radica en los tiempos de reacción, la temperatura a la cual se lleva a cabo o la relación molar entre la mezcla de  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$  con la sapogenina de estudio.

Existen también múltiples aplicaciones de actividad biológica para los 22-oxocolestanos, en algunos casos resultan como intermediarios de rutas de síntesis de otros derivados de interés biológico. A continuación, se presentan las estructuras reportadas y las características que se reportan en diferentes metodologías (Tabla 11).

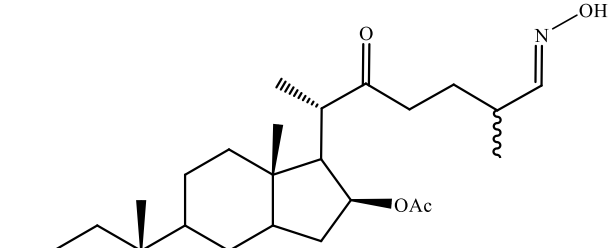
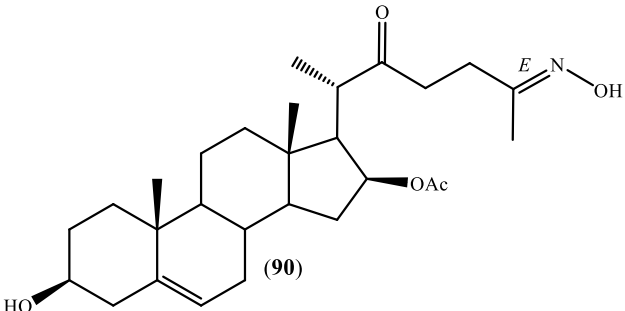
**Tabla 11. Resumen de derivados 22-oxocholestánicos como productos de interés para evaluación biológica o intermediarios.**

Derivado 22-oxocholestaniano	Condiciones de reacción	Actividad biológica
 <p>(2) X: <math>\Delta^5</math>, Y: H, Z: H,H, (25R)            (74) X: <math>\alpha</math>H, Y: H, H, Z: O, (25R)            (75) X: <math>\beta</math>H, Y: H, H, Z: H, H, (25S)</p>	<p>Ac<sub>2</sub>O,            Et<sub>2</sub>O•BF<sub>3</sub>            De 0 a -5°C            70-87% [66]</p>	<p>Fueron diseñados como análogos del anticancerígeno OSW-1</p>
 <p>(1) X: <math>\Delta^5</math>, Y: H, Z: H,H, (25R)            (76) X: <math>\alpha</math>H, Y: H, H, Z: O, (25R)</p> <p>(77) X: <math>\Delta^5</math>, Y: H, Z: H,H, (25R)            (78) X: <math>\alpha</math>H, Y: H, H, Z: O, (25R)</p> <p>(79) X: <math>\Delta^5</math>, Y: H, Z: H,H, (25R)            (80) X: <math>\alpha</math>H, Y: H, H, Z: O, (25R)</p>	<p>Ac<sub>2</sub>O,            Et<sub>2</sub>O•BF<sub>3</sub>            a 0 °C            86% [52],            [67], [68],            [69]</p>	<p>Intermediario para anticancerígeno en líneas de cáncer cervicouterino: HeLa, CaSki y ViBo</p>

Continuación Tabla 11. Resumen de derivados 22-oxocholesterol como productos de interés para evaluación biológica o intermediarios.

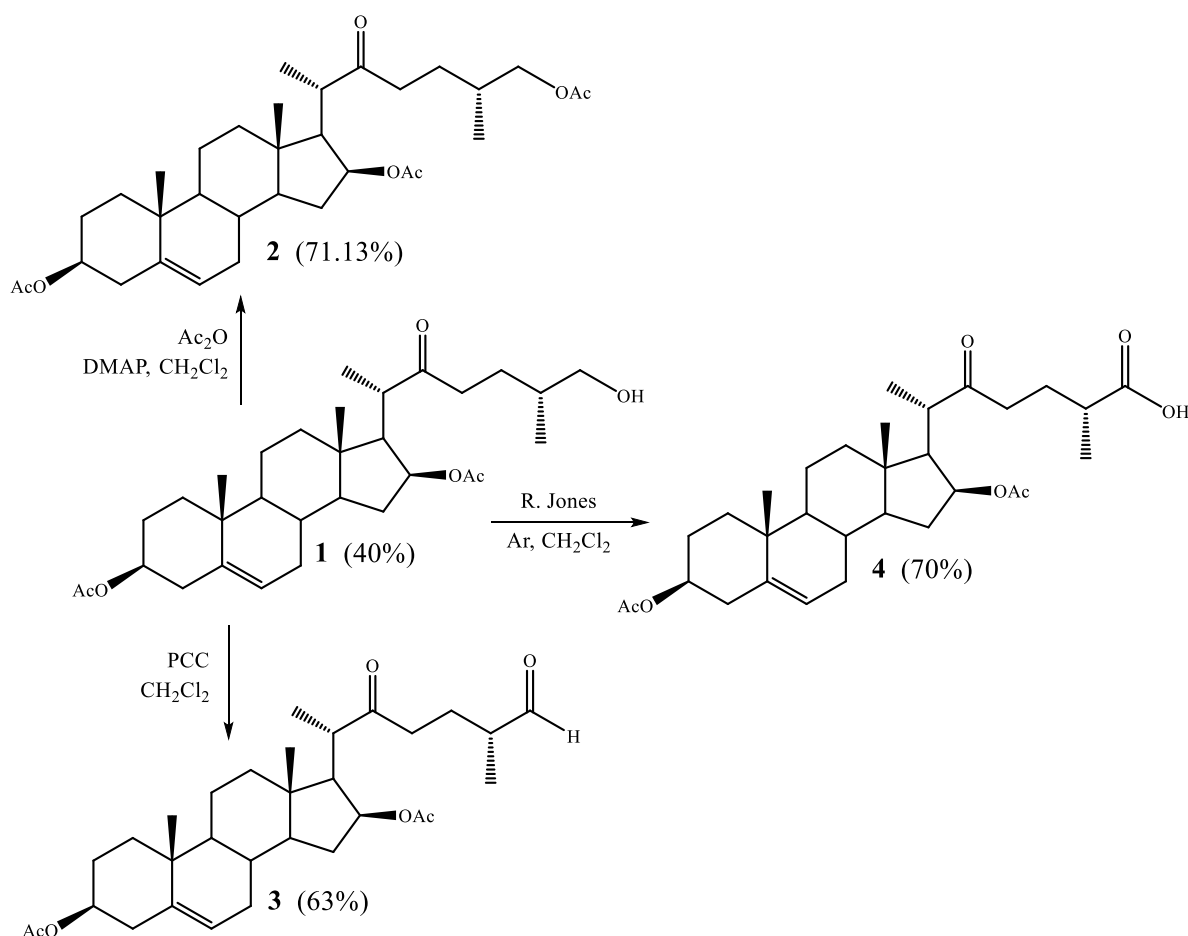
Derivado 22-oxocholesterol	Condiciones de reacción	Actividad biológica
 <p>(81)</p> <p>(82)</p> <p>(83)</p> <p>De la apertura se obtuvieron los compuestos <b>1</b> y <b>70</b> y en el hidroxilo en C26 se realizaron sustituciones y finalmente una reducción para obtener los compuestos evaluados:</p> <p>(84) X: <math>\Delta^5</math>, Y: H, Z: H,H, (25R) 95%  (85) X: <math>\alpha</math>H, Y: H, H, Z: O, (25R) 94%</p>	<p>Ac<sub>2</sub>O,  Et<sub>2</sub>O•BF<sub>3</sub>  a 0 °C  85%, 83% y  66%  [42], [43]</p>	<p>Promotor de crecimiento vegetal en var. de arroz mexicano, usando la prueba de inclinación de lámina de arroz</p>

Continuación Tabla 11. Resumen de derivados 22-oxocolestánicos como productos de interés para evaluación biológica o intermediarios.

Derivado 22-oxocolestano	Condiciones de reacción	Actividad biológica
<p>Compuesto 1</p> <p>Del que se pueden obtener las oximas siguientes:</p>  <p>(86) R: OAc, 25<i>R</i>            (87) R: OAc, 25<i>S</i>            (88) R: OH, 25<i>R</i>            (89) R: OH, 25<i>S</i></p>  <p>(90)</p>	<p>Ac<sub>2</sub>O,            Et<sub>2</sub>O•BF<sub>3</sub>            a 0 °C            [53]</p>	<p>Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> en modelo de inflamación de oreja de ratón</p>

## 2.2 Discusión de resultados

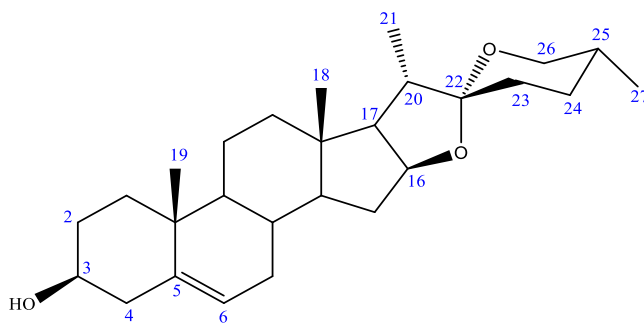
La obtención de los candidatos 22-oxocolestánicos se llevó a cabo mediante metodologías diseñadas por análisis de retro-síntesis. Se partió del producto de interés y así se seleccionó a las materias primas pertinentes y las modificaciones necesarias. En la Esquema 9 se presenta el esquema de reacción de los derivados a evaluar, teniendo como base al derivado **1** 26 hidroxilado para la obtención del 26 acetilado **2**, 26 aldehído **3** y 26 ácido **4**.



Esquema 9. Esquema de reacción para la obtención de los derivados de diosgenina.

Existe una gran variedad de esteroides espiroestánicos naturales a partir de los cuales se pueden obtener esta serie de derivados 22-oxocolestánicos, entre ellos la diosgenina, ha sido ampliamente utilizada y modificada con la finalidad de incrementar su potencial biológico. En el capítulo de estudio *in silico* se abordó a los derivados de diosgenina, considerando en primera instancia la funcionalidad y su facilidad para modificarla, y de esta forma obtener promotores de crecimiento vegetal.

## Obtención de diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo



**Figura 37. Estructura de diosgenina 61.**

Se seleccionó diosgenina (Figura 37) como materia prima para la obtención del derivado 26 hidroxilado **1**. Las reacciones realizadas generaron cambios puntuales en la estructura, las cuales fueron debidamente caracterizadas. Para diosgenina la mayoría de las señales en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se ubican entre 1.0 y 2.0 ppm y resultan de gran interés los protones cercanos a grupos electronegativos.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 38), a 5.35 ppm, se observa la señal a mayor frecuencia como un *dt* con dos constantes de acoplamiento iguales, por lo que en realidad es un *ddd* correspondiente al protón vinílico H-6 (Figura 39a) que interacciona con los protones de C-7 y el H-4<sub>eq</sub> debido a la cercanía de estos por el doble enlace en C5, a 4.41 ppm se encuentra la señal de H-16 como un *ddd* debido a las interacciones con el protón de C-17 y los dos de C-15. En 3.53 ppm se observa una señal *dtd* correspondiente a H-3 (Figura 39b), seguido de las señales de los protones diastereotópicos de C-26 en 3.47 y 3.38 ppm de H-26<sub>eq</sub> y H-26<sub>ax</sub> respectivamente, estas últimas tres señales se encuentran ligeramente traslapadas debido al ambiente químico similar en el que se encuentran estos protones (Figura 39c). A regiones menores se observa la señal de H-4<sub>ax</sub> y H-4<sub>eq</sub> a 2.30 y 2.23 ppm respectivamente, a 1.86 ppm H-20, la señal de H-25 se observa a 1.59 ppm como una señal múltiple ya que se encuentra traslapada con la señal de otros protones. Otras señales importantes debido a los cambios puntuales a realizarse son las de los protones de 2, 7, 17, 23 y 24 que se encuentran traslapadas en el intervalo de 1.1 a 2.0 ppm (Figura 39d).

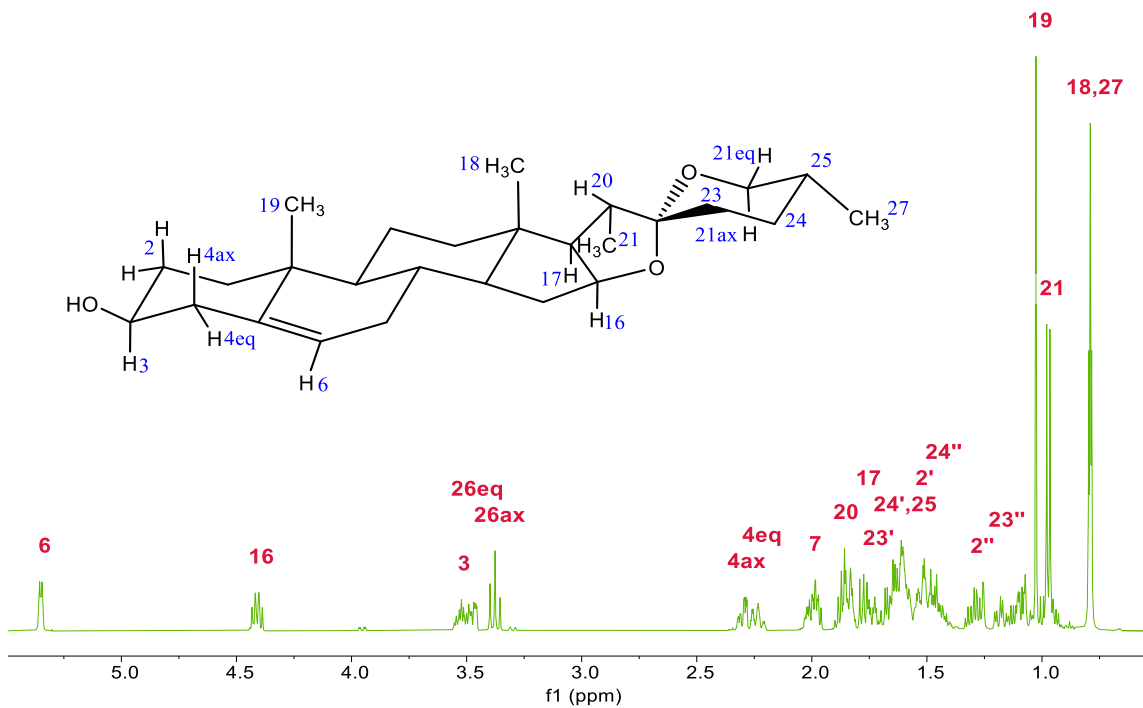


Figura 38. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de diosgenina (50) a 500 MHz.

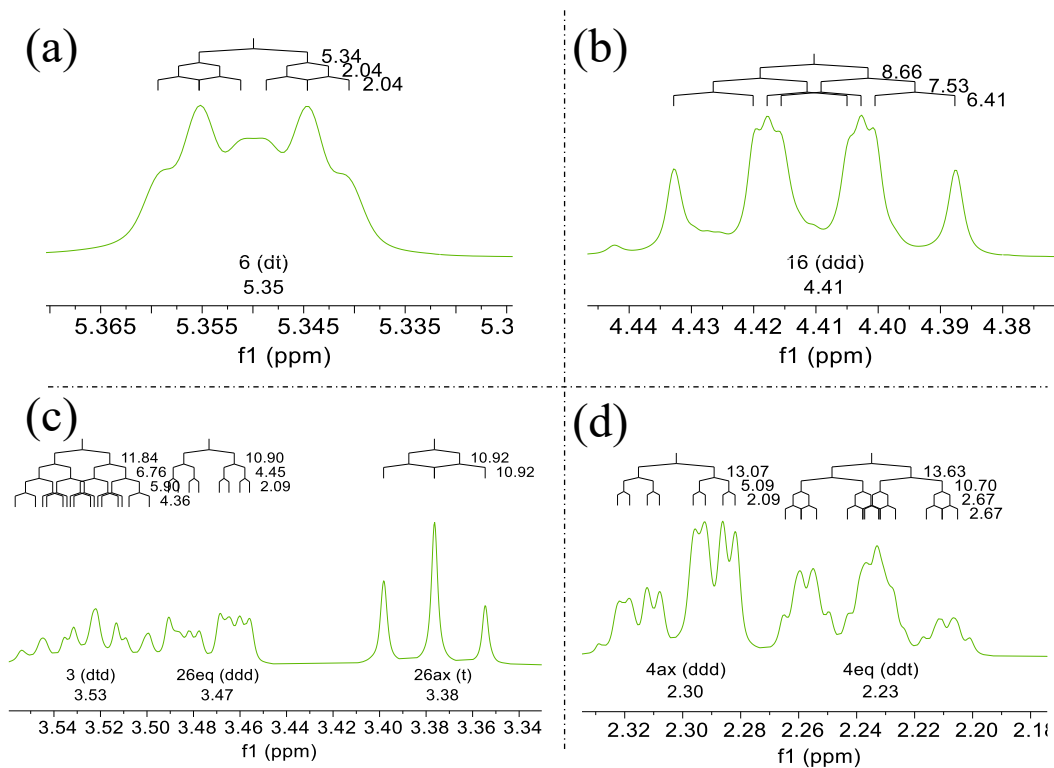
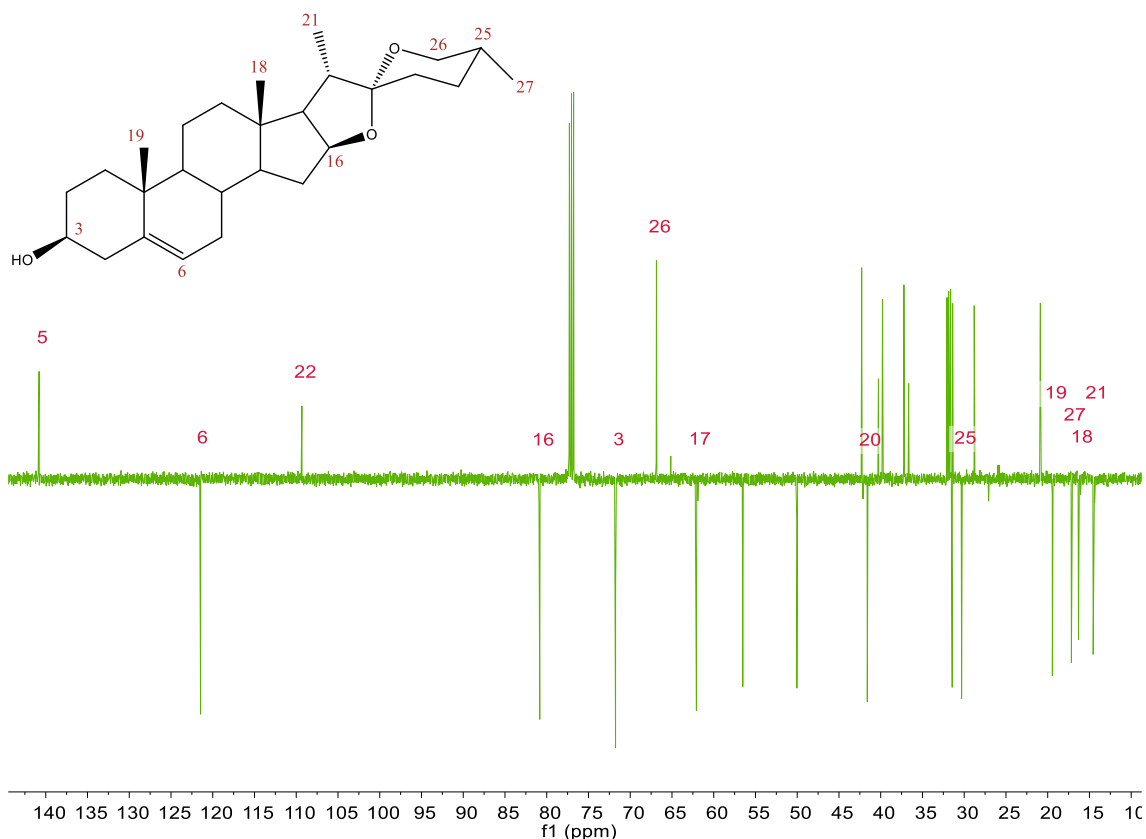


Figura 39. Expansiones de señales de interés del espectro de  $^1\text{H}$ .

Para corroborar las modificaciones, también se utilizó el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Figura 40), en el cual se observan las 27 señales de carbonos que contiene la molécula, siendo las de referencia las correspondientes al carbono cuaternario C-5 en 140.8 ppm que debido a la presencia del doble enlace aparece a frecuencia alta seguido de la señal del carbono vecino, C-6, en 121.4 ppm. En 109.3 ppm se observa la señal que corresponde a C-22 espiroacetálico, esta señal sirvió para corroborar la apertura del espiroacetal en las modificaciones posteriores. Las señales de C-16, C-3 y C-26 se observaron en 80.8, 71.7 y 66.8 ppm respectivamente, todos bases de oxígeno. A 41.6 ppm se observa la señal de C-20, el cual se encuentra cercano al anillo espiroestánico y la señal de C-25 que se encuentra dentro de este anillo a 31 ppm. Finalmente, en la región de 14 a 20 ppm se pueden apreciar las señales de los metilos de C-19, C-27, C-18 y C-21 en 19.4, 17.1, 16.2 y 14.5 ppm respectivamente.



**Figura 40. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de 61 a 125 MHz.**

Los protones 4ax, 4eq y de 7 se asignaron a través de su correlación con H-6 que se puede observar en la expansión del HMBC (Figura 41), se aprovechó la diferencia entre los protones de 4 (ax, eq) y 7 que, aunque ambos correlacionan con H-6 no correlacionan entre ellos y ya que los dos protones de 7 son equivalentes no hubo interacción entre orientaciones como es el caso de H-4, que presenta la correlación entre H-4ax y H-4eq.

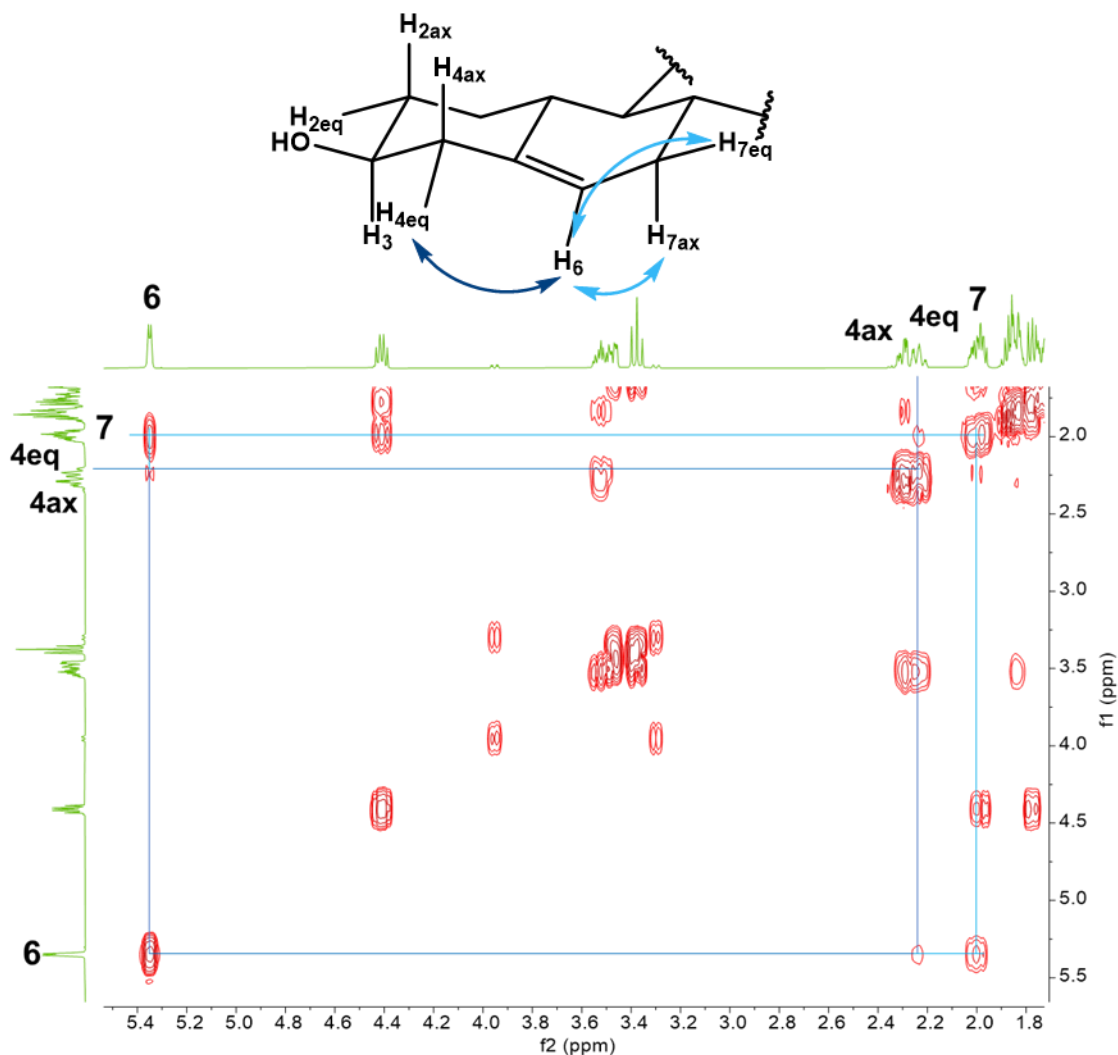


Figura 41. Expansión del espectro de RMN HMBC de diosgenina.

En la Figura 42 se presenta la expansión del espectro HMBC con la cual se asignaron las regiones del protón de 20, los de 21 se corroboró que fuera esa su señal; otra región asignada fue de 1.55 a 1.7 ppm donde se encuentran los dos protones H-23 y los H-24 designadas a través de su correlación con C-22 base de carbonilo, que como se describió previamente se desplaza a mayores frecuencias. Con ayuda de las correlaciones para C-17 se corroboró la asignación de H-20 a 1.85 ppm ya que se encuentran a dos enlaces de distancia.

Una vez definidos los protones mencionados anteriormente, con ayuda de una expansión del espectro de HSQC (Figura 43) se asignaron sus carbonos correspondientes, con lo que se regresó al espectro HMBC y se buscaron las correlaciones para C-26 y C-24 y así encontrar que la región que contiene H-25 es a 1.5 ppm y con esto correlacionar al C desplazado a 31 ppm.

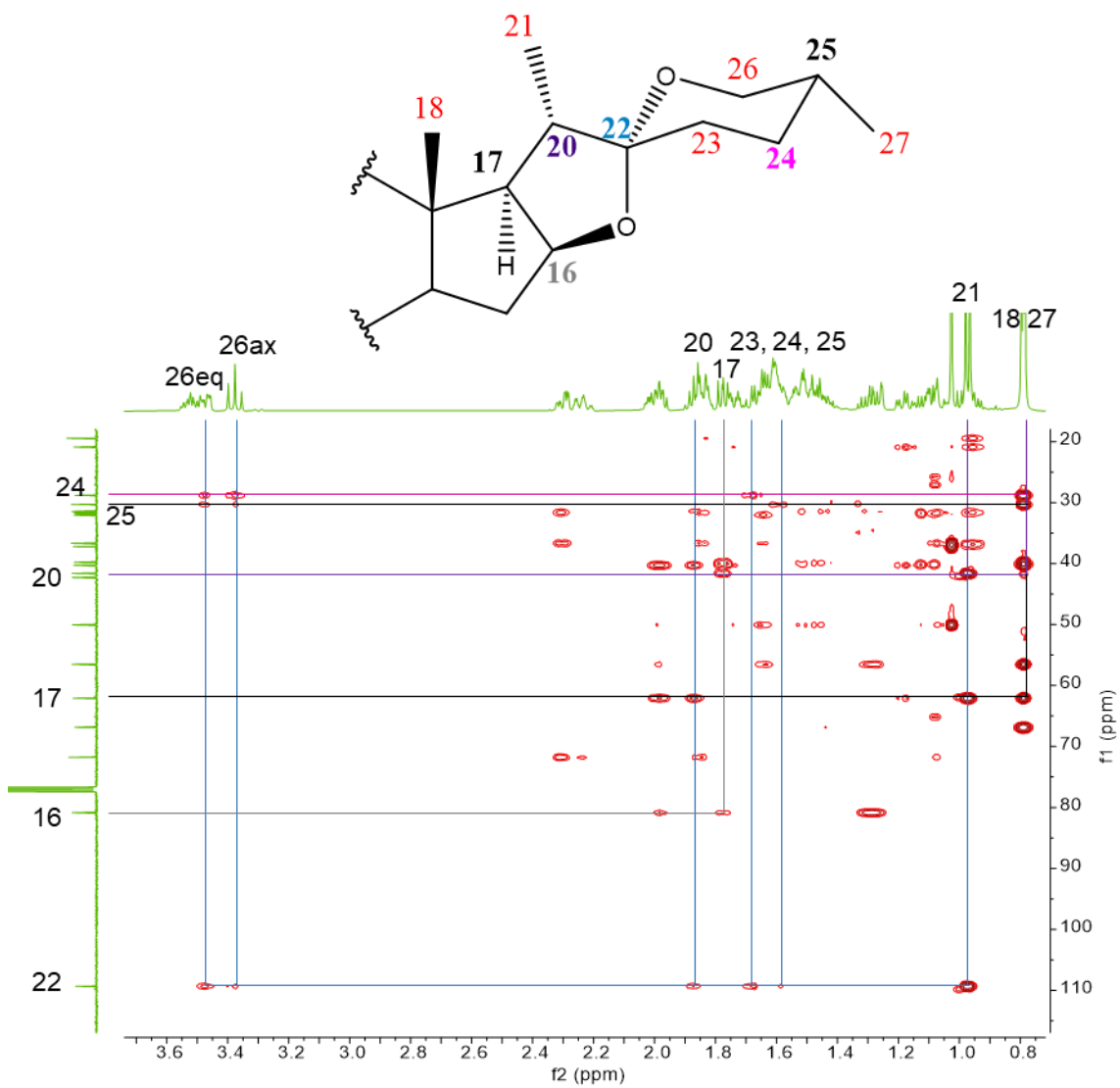


Figura 42. Expansión del espectro de RMN HMBC de diosgenina.

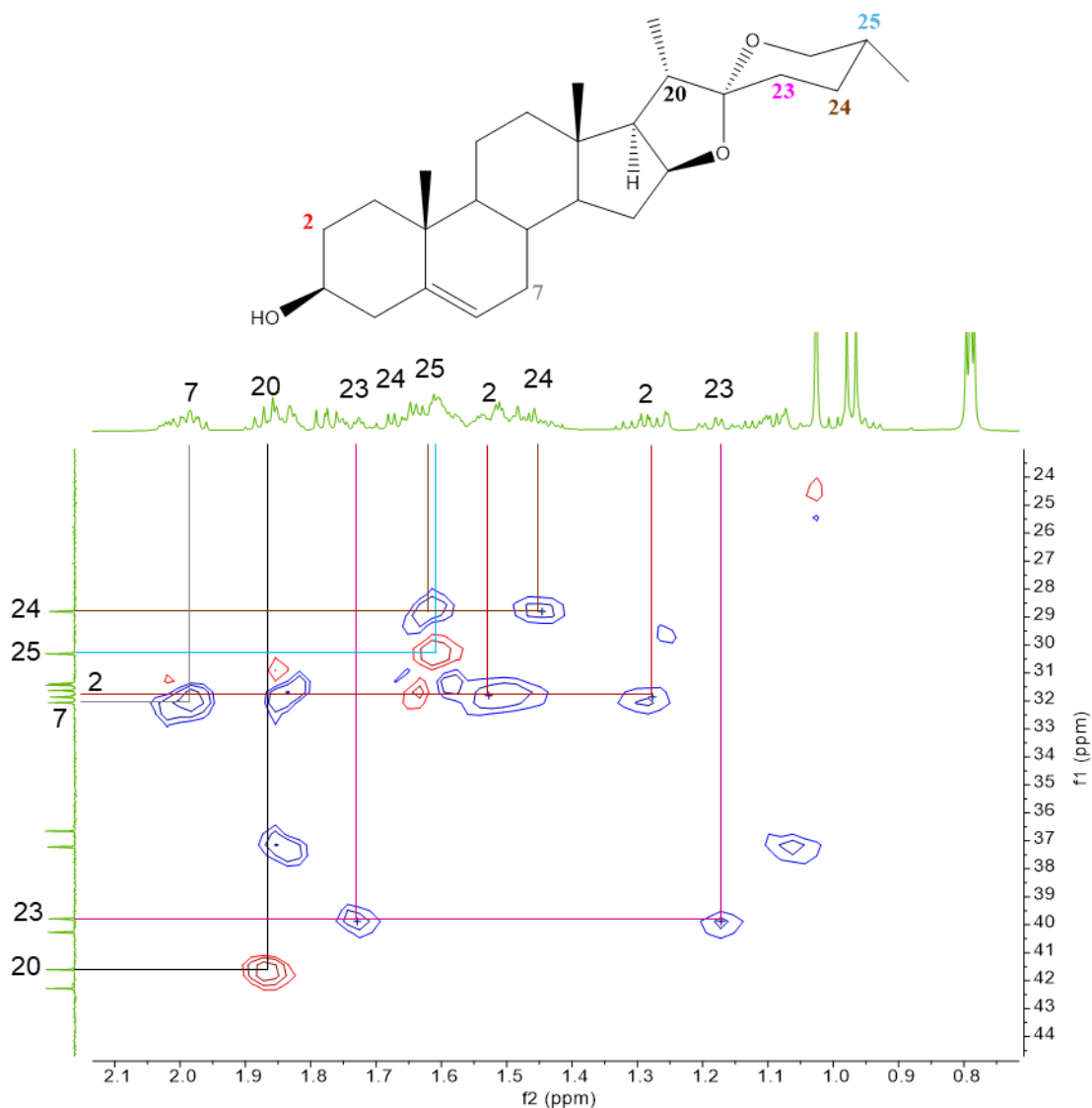
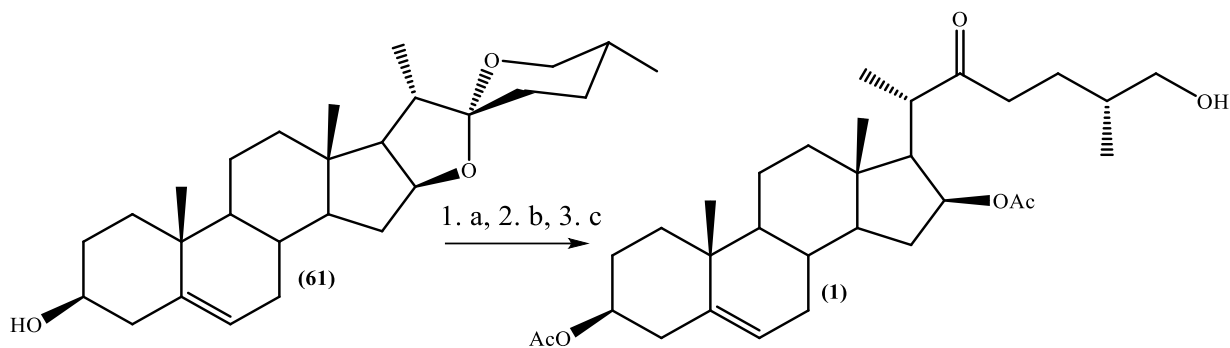


Figura 43. Expansión del espectro de RMN HSQC de diosgenina.

En el Esquema 10 se observa la formación de **1** que se obtuvo mediante la apertura del anillo E y el espiroacetal de diosgenina **61**, la cual se llevó a cabo utilizando un ácido de Lewis ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) que cataliza la formación del ión oxonio y esto da lugar a la protección del oxígeno en C-16 con un grupo acetato, al igual que con el grupo hidroxilo en C-3. Posteriormente se adicionó  $\text{Et}_3\text{N}$  a la reacción dando pie a la formación del anillo dihidropirano que se le realizó in situ hidrólisis en medio ácido con HCl al 10% para la apertura de este anillo y obtener la cadena 22-oxocolestánica-26-hidroxilada. Sin embargo, **1** no es el producto mayoritario (40%) pues se presentan ciertas desventajas que afectan el rendimiento de la reacción y también se obtiene el derivado sustituido con acetato en C-26 en buena proporción, esto por la presencia de anhídrido acético en el medio, cuyos C base de carbonilo son susceptibles a un ataque por parte del alcohol en C-26. Otro factor en su

rendimiento es la conversión de **61** en la molécula con el ión oxonio. Es por esto, que al no ser un producto único fue necesaria su purificación en columna de cromatografía, la cual se realizó empleando como fase móvil sistema hexanos/acetato de etilo con incrementos de polaridad con la finalidad de aislar **1** del crudo de reacción, el cual fue analizado con RMN para determinar su pureza y corroborar la obtención del producto deseado.



(a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0-5 °C, 15 minutos; (b) trietilamina, -20°C, 20 minutos; (c) hidróxido de amonio, Tamb.

#### Esquema 10. Síntesis para la obtención de **1** a partir de diosgenina.

La obtención de **1** se corroboró por elucidación por comparativa con la caracterización de **61** tomando las señales de referencia antes descritas. Al realizar la apertura del espiroacetal y generar la cadena lateral les confiere mayor libertad a los protones, esto ocurre con los H-26 que se pueden observar en la expansión del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en la Figura 45 como una sola señal a 3.43 ppm que al tener libre giro se detectan como uno mismo, tras la modificación C-3 ahora es base de acetato así como C-16 cambiando su ambiente químico por lo que la señal de sus protones se desplazan a frecuencias mayores por la deficiencia electrónica, H-3 a 4.60 ppm y H-16 a 4.99 ppm (Figura 44). Otra señal que se ve desplazada por el ambiente químico es H-20 a 2.96 ppm que paso de ser carbono vecino del espiroacetal a carbono vecino del carbonilo (C-22), el cual le retira mayor densidad electrónica causando una mayor desprotección, a pesar de la apertura del espiroacetal y que C-26 se encuentra sustituido por hidroxilo H-25 no se ve afectado por estos cambios conservando su señal en 1.59 ppm. Como se mencionó C-3 y C-6 presentan sustitución por grupo acetato, lo que implica la presencia de dos nuevas señales correspondientes a sus  $\text{CH}_3$  las cuales se observan como *s* que integran para 3H cada una, a 2.1 ppm y 1.97 ppm  $\text{CH}_3\text{-16''}$  y  $\text{CH}_3\text{-3''}$  respectivamente.

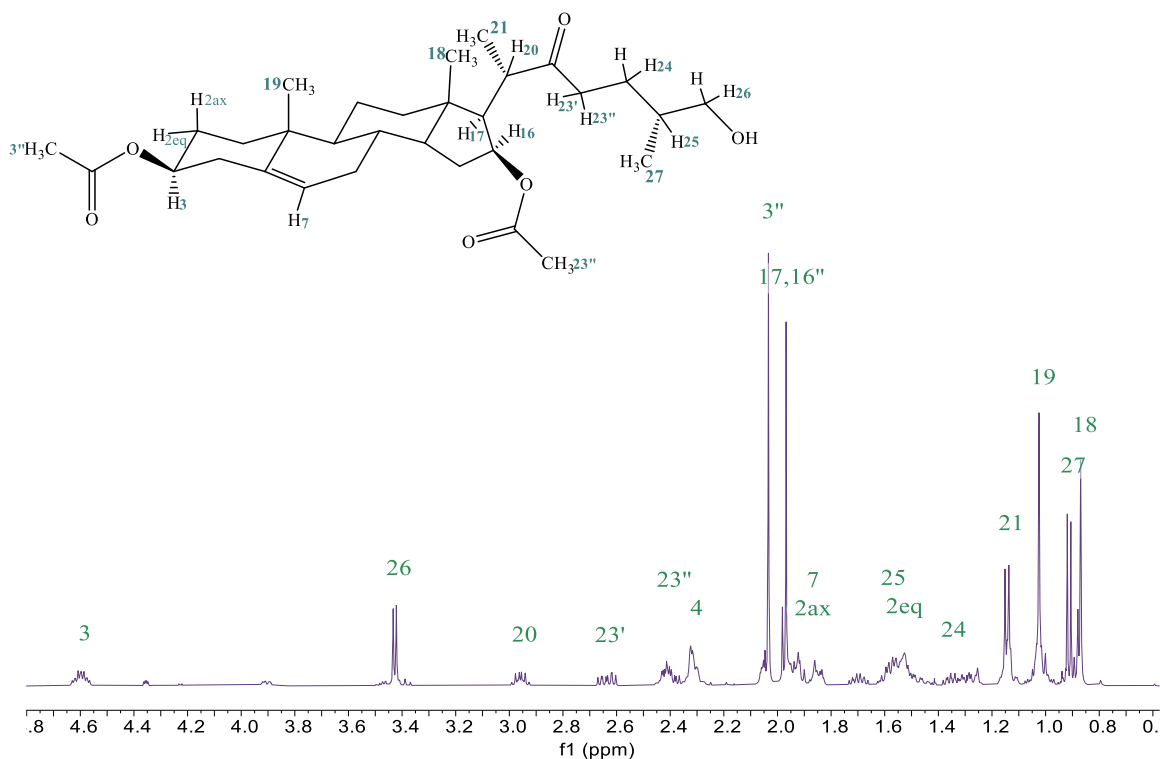


Figura 44. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1 a 500 MHz.

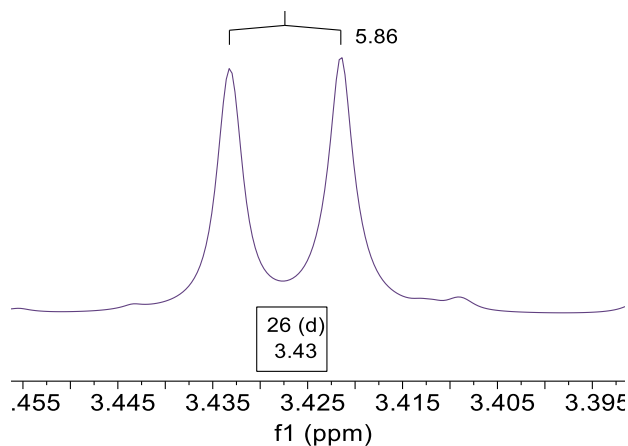
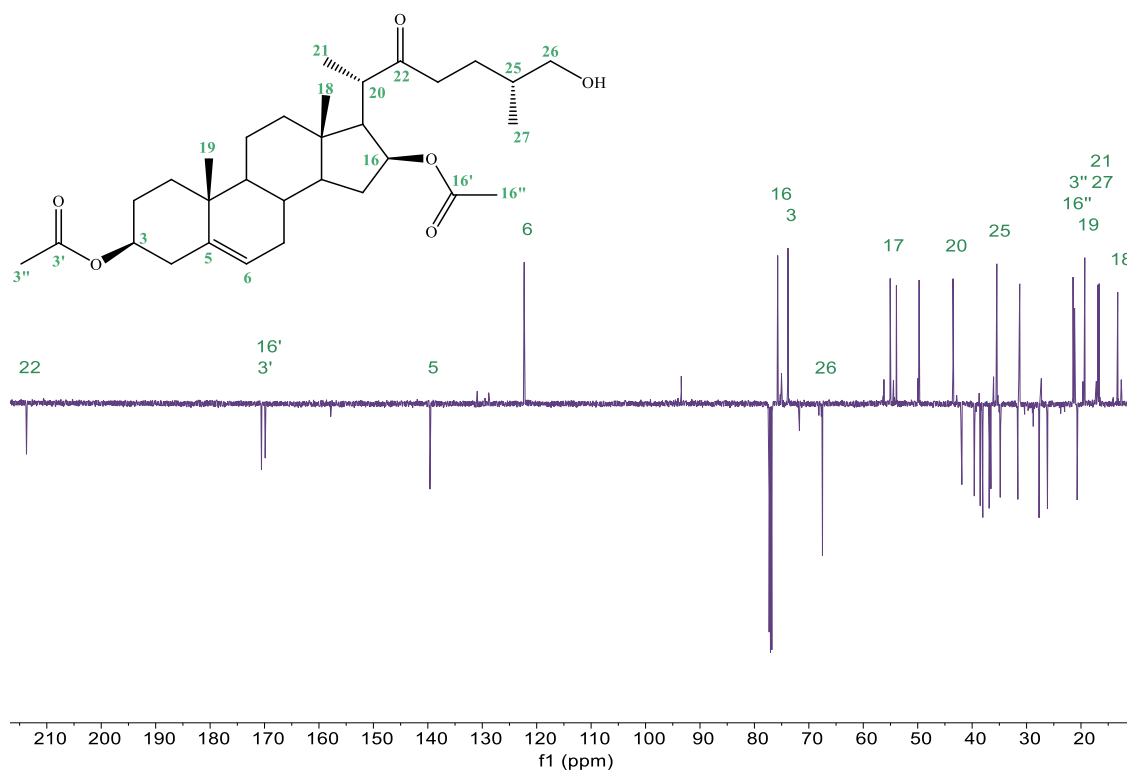


Figura 45. Expansión de la señal de H-26 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1.

En la estructura podemos observar que el doble enlace no se ve afectado y esto a través del espectro se corroboró con la señal del protón vinílico H-6 a 5.36 ppm el cual no presento desplazamiento con respecto al de su materia prima, a frecuencias menores podemos observar las señales de los grupos metilo cuyo desplazamiento es mínimo debido a la apertura del espiroacetal, CH3-19 en 1.02 ppm, CH3-21 en 1.14 ppm y CH3-18 en 0.87 ppm y CH3-27 en 0.97 ppm.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -ATP (Figura 46) podemos observar el desplazamiento de la señal de C-22 ahora base de carbonilo a una frecuencia mayor a 213.7 ppm, se observan 4 señales nuevas que corresponden a los carbonos de acetato, cada grupo posee uno base de carbonilo que se encuentra a frecuencias altas y uno de metilo a frecuencias menores, en 170.6 y 169.9 ppm se encuentran C-3' y C-16', en 21.5 y 21.2 ppm  $\text{CH}_3$ -16'' y  $\text{CH}_3$ -3'' respectivamente, además por la presencia de estos grupos C-16 y C-3 se ven ligeramente desplazados a 75.7 y 73.8 ppm. Con la apertura del espiroacetal C-20 ahora es vecino de un carbonilo por lo que tiene un ligero desplazamiento a 43.5 ppm, lo mismo ocurre con C-25 que se desplaza a 35.5 ppm. También podemos observar que los C-5 y C-6 vinílicos no presentan desplazamiento ya que no se ven afectados por las modificaciones dejando sus señales en 140 y 122 ppm. C-26 paso de ser  $\text{CH}_2$  dentro de un anillo a uno de cadena lineal lo que le confiere menor rigidez lo cual se ve reflejado en un desplazamiento mínimo, a 68 ppm. Finalmente, en el intervalo de 10 a 20 ppm se observan las señales de los metilos.

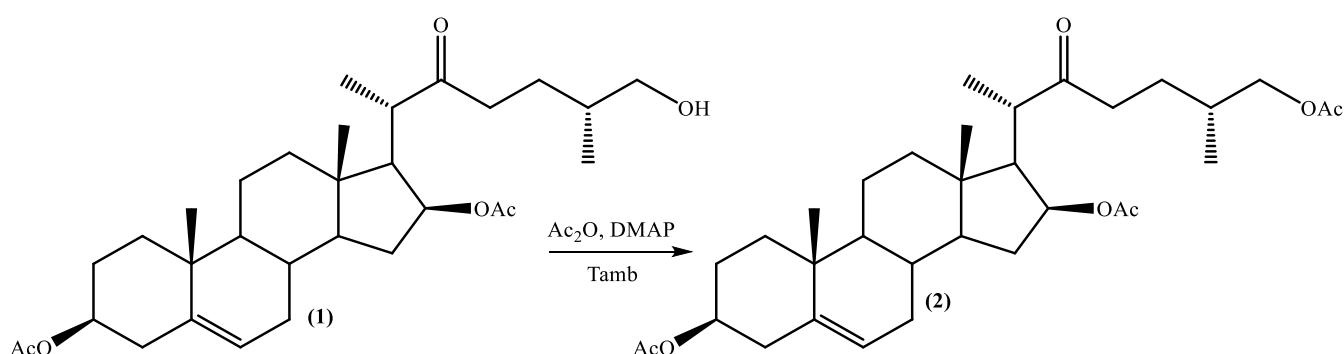


**Figura 46. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de 1 a 125 MHz.**

Al determinar que el derivado obtenido fue el esperado se realizaron las modificaciones pertinentes a partir de éste para obtener los potenciales PECV 1-4 de tipo 22-oxocolesténicos.

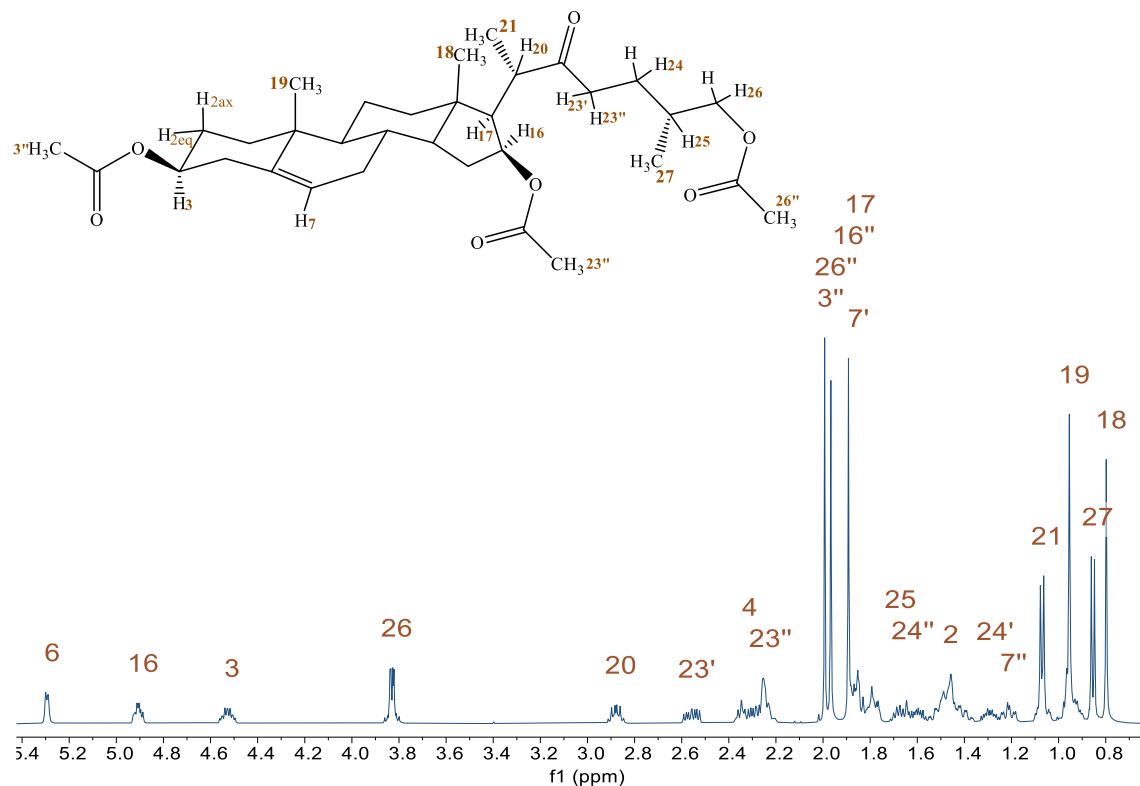
## Obtención de triacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ , 26-triilo

La obtención de un éster a partir de un alcohol se lleva a cabo a través de metodologías conocidas como esterificación, para la obtención específica de **2** se utiliza anhídrido acético ya que lo que se busca es adicionar un grupo acetilo y haciendo uso de DMAP como catalizador de este proceso (Esquema 11). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica usando sistema hexano/acetato de etilo como eluyente. El producto fue analizado por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para corroborar su pureza y caracterizado por comparativa con respecto a su materia prima **1**.



Esquema 11. Síntesis del PECV 2.

En la Figura 47 se observa el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2** donde solo la señal de los protones H-26 presentan un desplazamiento significativo ya que aparecen a 3.90 ppm debido al efecto del grupo éster, las señales de H-3 a 4.51 ppm y H-16 a 4.90 ppm se mantienen en la misma zona del espectro comparado con la materia prima de este producto ya que los grupos acetilo presentes no se ven alterados. Otra señal que no se ve desplazada por el ambiente químico es H-20 a 2.96 ppm y H-6 a 5.30 ppm de protón vinílico indicativo de la presencia del doble enlace entre C-5 y C-6. Las señales de los metilos presentes en **1** no se ven alteradas, pero si observamos la presencia de una nueva señal *s* en 1.95 ppm de los protones de metilo del acetilo del éster.



**Figura 47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2 a 500 MHz.**

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 48) se observa el desplazamiento de la señal de C-22 base de carbonilo a una frecuencia mayor a 213.7 ppm, dos señales nuevas, una en 171.5 ppm ubicada antes de los carbonilos de los acetatos en C-3 y C-6 (170.6 y 169.9 ppm) y que corresponde al del acetato que se forma en C-26, y la otra señal a frecuencias menores, en 21.5 ppm  $\text{CH}_3\text{-26''}$ . C-25 no sufre un desplazamiento significativo y se observa a 35.5 ppm. También podemos observar que los C-5 y C-6 vinílicos no presentan desplazamiento ya que no se ven afectados por las modificaciones dejando sus señales en 140 y 122 ppm. Finalmente, en el intervalo de 10 a 20 ppm se observan las señales de los metilos incluyendo el del metilo del éster en C-26.

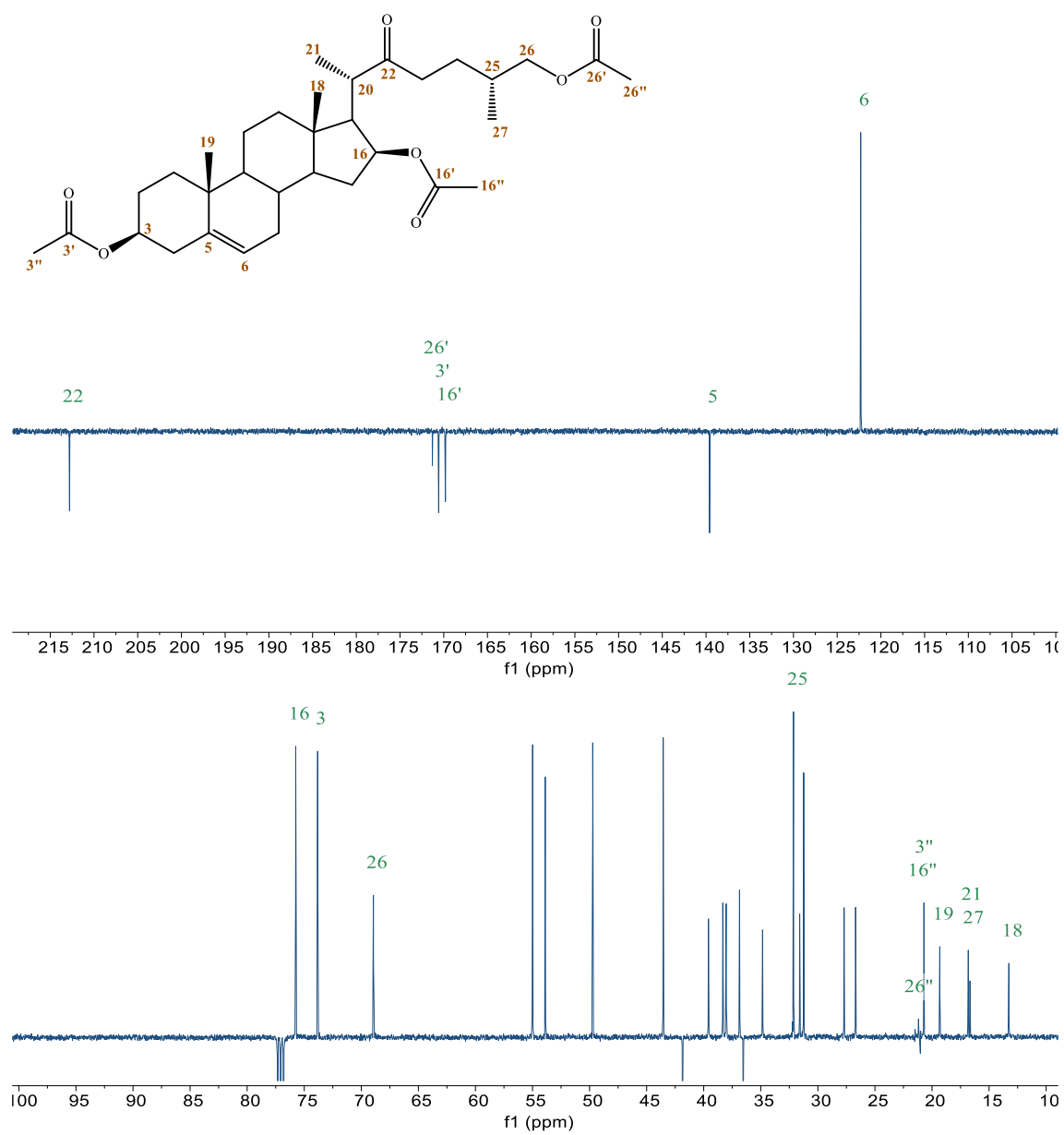
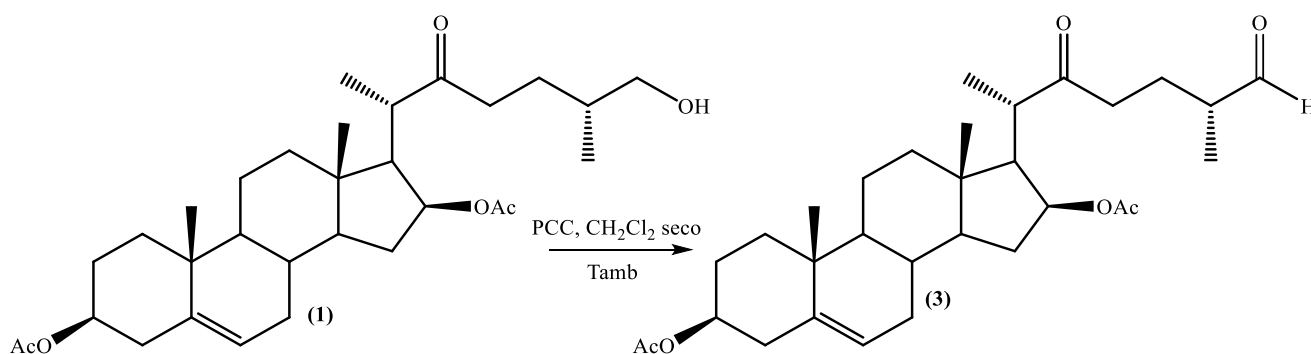


Figura 48. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de 2 a 125 MHz.

## Obtención de diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo

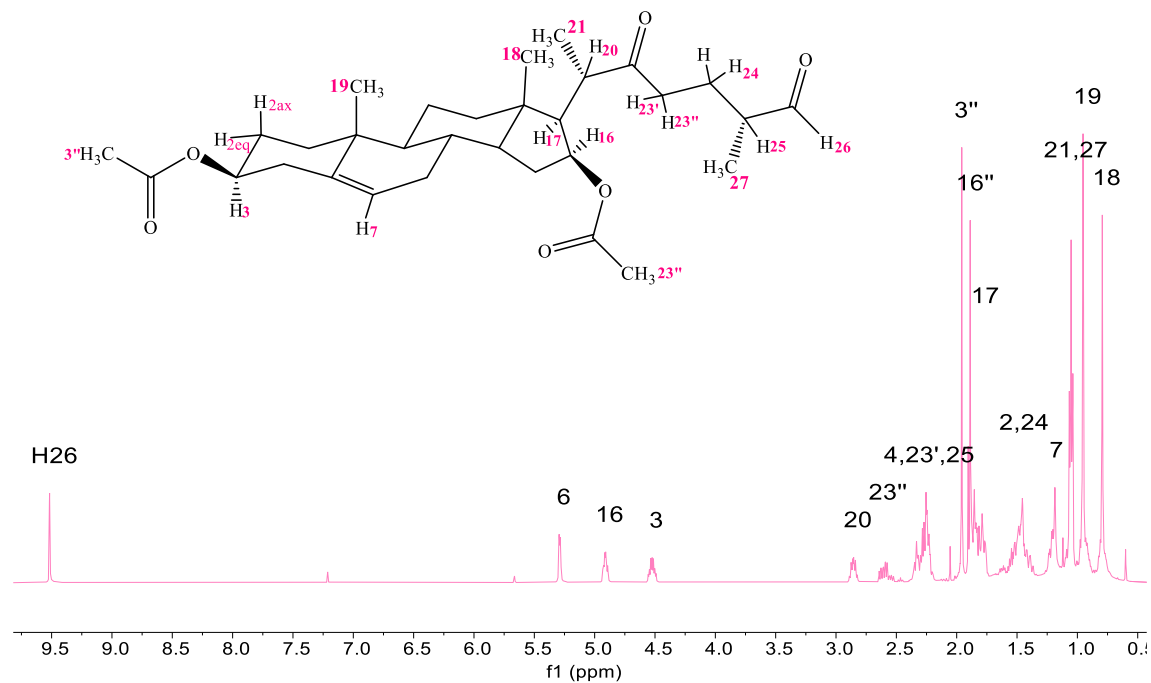


Esquema 12. Síntesis del PECV 3.

La oxidación de alcoholes es capítulo de la química orgánica que se encuentra ampliamente desarrollada, actualmente existen catálogos de agentes oxidantes que pueden ser empleados dependiendo de hasta qué punto se busca la oxidación del alcohol o la clasificación del mismo, algunas opciones de agentes de bajo poder oxidativo para la obtención de aldehídos son el dicromato de piridinio (PDC) y el TEMPO que al ser oxidantes débiles los alcoholes primarios son transformados a aldehídos únicamente. La desventaja de estos ante otra opción como el clorocromato de piridinio (PCC) son los costos, la adquisición de 5.0 g de PDC es equivalente a 25.0 g de PCC es por este motivo la selección del PCC como agente para la oxidación de **1** a **3** (Esquema 12).

La purificación del derivado se realizó en columna cromatográfica y como eluyente se utilizó sistema hexanos/acetato de etilo, la pureza de **3** se analizó mediante RMN y se realizó su caracterización por comparativa corroborando los cambios esperados en 25 y 26 ya que es donde se modifica la estructura de **1**.

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 49) se observa una señal simple a 9.52 ppm correspondiente a H-26 que corrobora la oxidación a aldehído, las señales a 4.60 y 4.99 ppm son de los protones H-3 y H-6 respectivamente que no sufren un desplazamiento significativo ya que éstas no se ven afectadas por el agente oxidante, así como las señales de los metilos de acetato de estas posiciones, 2.10 ppm para CH<sub>3</sub>-16'' y 1.97 ppm para CH<sub>3</sub>-3'', a 2.27 ppm se desplaza H-25 debido a la desprotección que le genera el grupo carbonilo de aldehído en C-26, las señales de los metilos CH<sub>3</sub>-18, CH<sub>3</sub>-19, CH<sub>3</sub>-21 y CH<sub>3</sub>-27 se encuentran en el intervalo de 0.7 a 1.3 ppm ya que solo el último se ven ligeramente desplazado por la presencia del aldehído. Finalmente, la señal de H-6 a 5.30 ppm permite asegurar que el doble enlace no sufrió cambio por el agente oxidante durante la reacción.



**Figura 49. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3 a 500 MHz.**

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Figura 50) se observa a poco más de 210 ppm C-22 el cual es base de carbonilo y permanece ya que se encuentra en su mayor grado de oxidación, a continuación se aprecia la señal de C-26 que se desplaza a una mayor frecuencia, ahora aparece alrededor de 205 ppm desplazamiento ocasionado por la desprotección de ser base de carbonilo de aldehído, cuyo efecto también modifica la señal de C-25 la cual se encuentra en 45.7 ppm ya que el carbonilo le retira densidad electrónica. Un indicativo más de que el doble enlace no se modificó con la oxidación es la presencia de la señal de C-5 en 140 ppm y C-6 en 122 ppm ambos carbonos vinílicos. Las señales de los grupos metilo de la estructura no se ven modificadas.

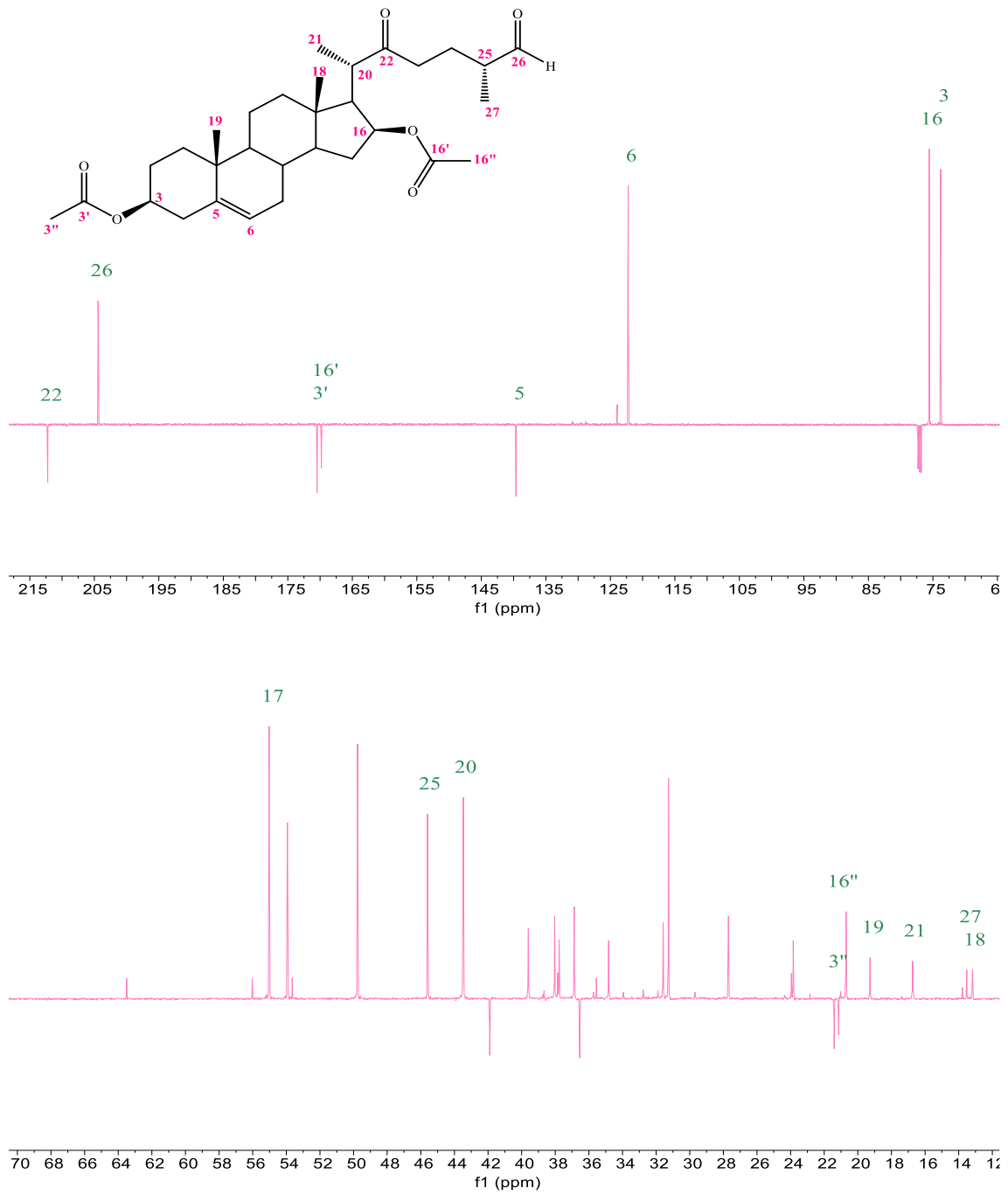
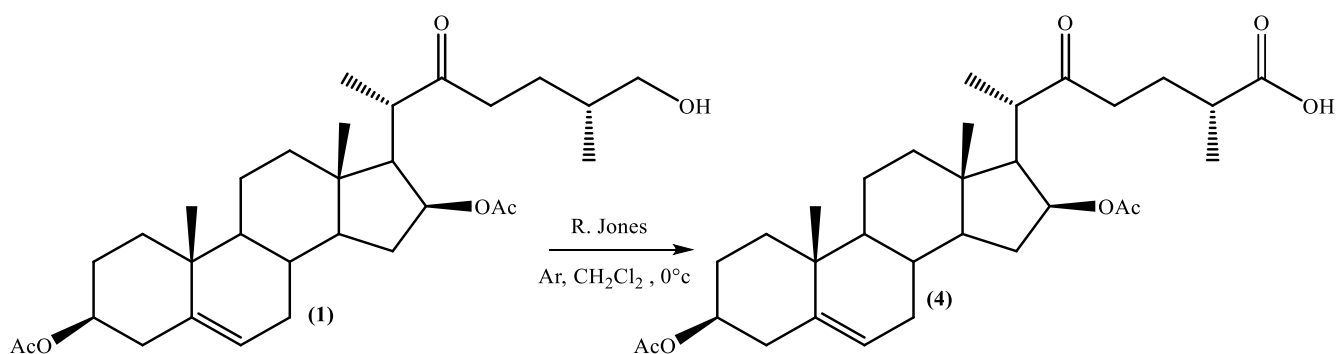


Figura 50. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de 3 a 125 MHz.

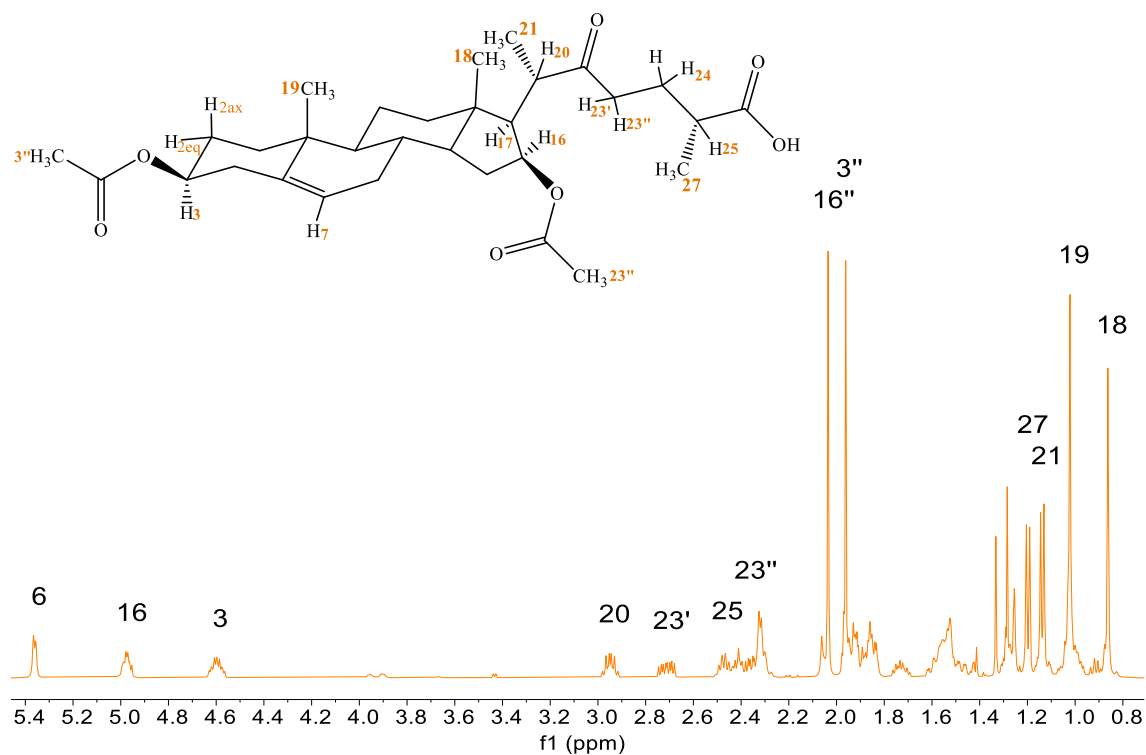
## Obtención de ácido (25*R*)-3β,16β-diacetoxi-22-oxocolest-5-en-26-oico



Esquema 13. Síntesis del PECV 4.

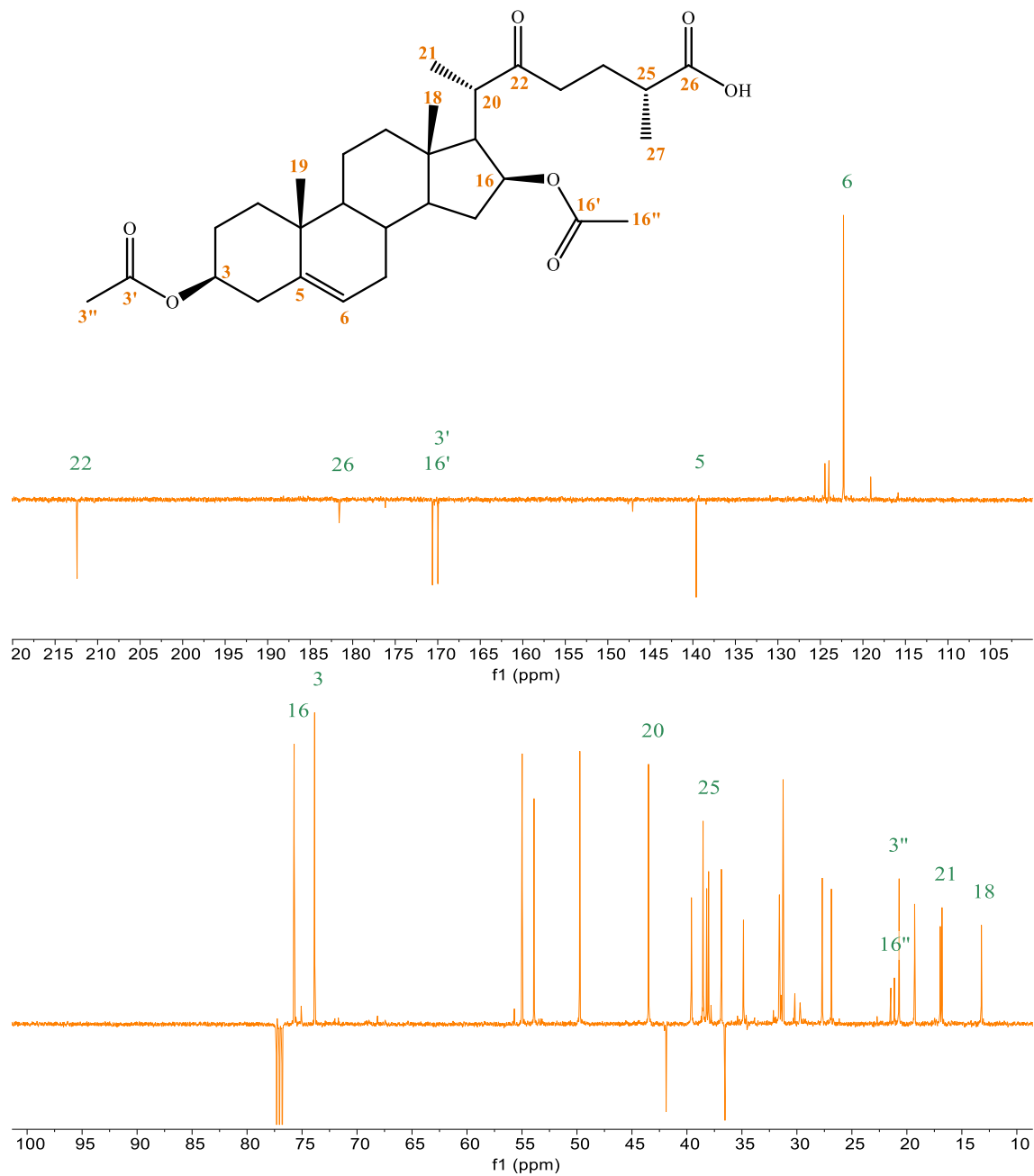
La obtención de ácidos carboxílicos a partir de alcoholes es un proceso ampliamente estudiado por la química orgánica, es por ello por lo que actualmente se cuenta con una gran variedad de reactivos con los que se pueden llevar a cabo oxidaciones, se busca que ésta sea selectiva, es decir que el agente oxidante únicamente lleve a cabo la oxidación del alcohol en este caso, y no afecte algún otro grupo de la estructura. Algunos de los agentes oxidantes mayormente empleados son el permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) pero también tiene la capacidad de alterar dobles enlaces, por este motivo se descartó su uso. Existe la posibilidad de realizar la oxidación a ácido con PDC empleando un disolvente que ayude al proceso, pero esto implica mayores costos. Finalmente, de entre las opciones consideradas tenemos al trióxido de cromo, el cual se emplea en disolución con ácido sulfúrico, lo que comúnmente se conoce como reactivo de Jones, el cual es un agente oxidante fuerte y logra la conversión deseada, no afecta al doble enlace presente en la molécula y estos reactivos son ampliamente utilizados tanto en laboratorios como en la industria. Por estos motivos la obtención del derivado **4** se realizó mediante la oxidación de **1** con reactivo de Jones (Esquema 13).

La purificación del derivado se realizó en columna cromatográfica y como eluyente se utilizó sistema hexanos/acetato de etilo con variación de polaridades, la cual se cambiaba con los resultados del seguimiento en CCF. La pureza de **4** se analizó mediante RMN y se realizó su caracterización que se puede observar en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H en la Figura 51.



**Figura 51. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4 a 500 MHz.**

La oxidación del alcohol **1** al ácido **4** estructuralmente solo cambia en que ahora C-26 es carbonilo de ácido carboxílico, en el espectro por la presencia de este grupo algunas señales presentan desplazamientos, como H-25 el cual en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa en 2.48 ppm ya que al estar a 2 enlaces de ese carbono le provoca desprotección moviendo su señal a frecuencias mayores. Al momento de oxidar C-26 este perdió sus protones por lo tanto su señal no se observa en el espectro, los acetatos de C-3 y C-16 no pueden ser oxidados a un grado mayor por ese motivo las señales de todos los carbonos que lo conforman no presentan desplazamiento. Una de las inquietudes al elegir el agente oxidante es que no debe afectar al doble enlace en C-5 y C-6, cuya permanencia se corrobora con la señal en 5.4 ppm correspondiente al protón vinílico. Así mismo podemos observar a las señales de los metilos de 0.8 a 1.2 ppm.



**Figura 52. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de 4 a 125 MHz.**

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 52) se observa a poco más de 210 ppm C-22 el cual es base de carbonilo y permanece ya que se encuentra en su mayor grado de oxidación; la señal de C-26 la cual se desplaza a una mayor frecuencia, ahora aparece alrededor de 180 ppm desplazamiento ocasionado por la desprotección de ser carbono de ácido, cuyo efecto también modifica la señal de C-25 la cual se encuentra en 38.5 ppm ya que el carbonilo le retira densidad electrónica. Un indicativo más de que el doble enlace no se modificó con la

oxidación es la presencia de la señal de C-5 en 140 ppm y C-6 en 120 ppm ambos carbonos vinílicos. Las señales de los grupos metilo de la estructura no se ven modificadas.

## 2.3 Metodología

### 2.3.1 Equipos y técnicas.

#### ❖ Punto de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo ESEVE, de placa.

#### ❖ Rotación óptica

La desviación óptica fue medida en un polarímetro PerkinElmer modelo 341 con celda de 10 cm de longitud y una longitud de emisión de 589 nm a temperatura constante de 25 °C, en solución con cloroformo y se presenta como rotación óptica específica.

#### ❖ Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 500 MHz se obtuvieron en el equipo Bruker para la obtención de experimentos de 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT) y 2D (COSY, HMBC, HSQC), utilizando cloroformo deuterado como disolvente con tetrametilsilano como referencia interna.

Los desplazamientos químicos se expresan en ppm ( $\delta$ ), las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hertz (Hz).

#### ❖ Espectroscopia de infrarrojo

Para la obtención de los espectros de IR se utilizó un equipo Agilent Cary 630 FTIR, con interfases ATR con punta de diamante para sólidos, la ubicación de las bandas de transmitancia se expresa en número de onda  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### ❖ Cromatografía en capa fina

Para la cromatografía analítica en capa fina (CCF) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> de Sigma-Aldrich, Alemania y como fase móvil sistemas de elución de hexano/ acetato de etilo. El revelado se realizó por tratamiento con ácido sulfúrico al 50% con posterior calcinación de las placas.

#### ❖ Cromatografía en columna

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, Alemania, de acuerdo con la técnica “flash” utilizando un sistema de eluyente de hexano/acetato de etilo con polaridad creciente.

### 2.3.2 Caracterización espectroscópica.

#### Diosgenina

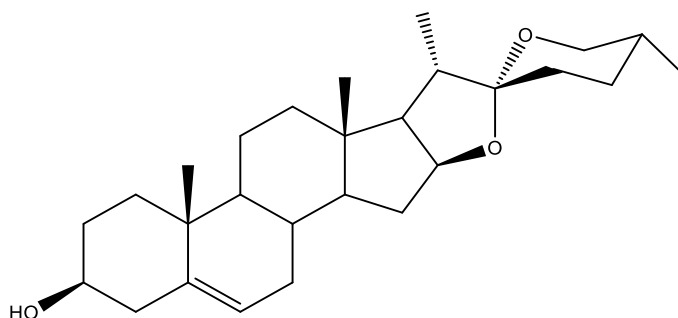


Figura 53. Estructura de 61.

Fórmula molecular:  $C_{27}H_{42}O_3$ , P.M.: 414.62, Polvo amorfo, p.f. 199-200 °C,  $\alpha_D = -126^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 1.0$ ), IR:  $3650\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $2869\text{ cm}^{-1}$  ( $CH_3$ , alifático),  $1374\text{ cm}^{-1}$  (C-O).

**RMN  $^1H$ :**  $\delta$ : 5.35 (1H, *dt*,  $J_{6-7} = 5.4$ ,  $J_{6-4} = J_{6-8} = 2.0$  Hz, H-6), 4.41 (1H, *ddd*,  $J_{16-15a} = 7.6$  Hz,  $J_{16-15e} = 6.4$  Hz,  $J_{16-17} = 8.7$ , H-16), 3.52 (1H, *m*, H-3), 3.48 (1H, *m*, H-26e), 3.37 (1H, *dd*,  $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8$  Hz, H-26a), 1.02 (3H, *s*,  $CH_3$ -19), 0.97 (3H, *d*,  $J_{21-20} = 7.2$  Hz,  $CH_3$ -21), 0.79 (3H, *d*,  $J_{27-25} = 6.4$  Hz,  $CH_3$ -27), 0.79 (3H, *s*,  $CH_3$ -18).

**RMN  $^{13}C$ :**  $\delta$ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (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), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

#### Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo.

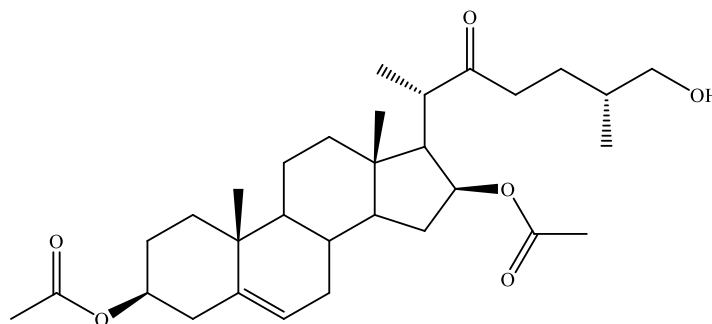


Figura 54. Estructura de 1.

A una solución de 1.0 g (2.41 mmol) de diosgenina **50** en 10 mL de  $CH_2Cl_2$  a 0 °C se adicionó una mezcla equimolar (24.33 mmol) de anhídrido acético (2.33 mL) y  $Et_2O \cdot BF_3$  (3.0 mL) a la misma temperatura y se dejó con agitación durante 10 minutos antes de adicionar  $Et_3N$  (4 mL, 28.70 mmol) a -30 °C, la agitación continuó por 20 minutos más (a 0 °C), finalmente se

adicionaron 2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La mezcla de reacción se pasó por percolativa con gel de sílice y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , el cual fue lavado con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2x25 mL) y posteriormente con agua destilada (3x25 mL). Se realizó hidrólisis con ácido clorhídrico 1.2 N durante 10 minutos en baño ultrasónico, se evaporó el disolvente a presión reducida. Se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice usando un sistema de hexano/acetato de etilo (7:3), se obtuvieron 480.70 mg (40%) de **1**.

### Caracterización

Fórmula molecular:  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ , P.M.: 216.72, Polvo amorfo, p.f. 178 °C,  $\alpha_D = +6.1^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c=1.0$ ), IR: 3450 (OH),  $2935\text{ cm}^{-1}$  (alifáticos)  $1725\text{ cm}^{-1}$  (C=O, carbonilos),  $1236\text{ cm}^{-1}$  (O=C-O, éster).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 5.29 (1H, *dd*,  $J_{6-7}=4.5\text{ Hz}$ ,  $J_{6-4}=2.7\text{ Hz}$ , H-6), 4.99 (1H, *dd*,  $J_{16-15a}=7.6\text{ Hz}$ ,  $J_{16-15e}=6.4\text{ Hz}$ ,  $J_{16-17}=8.7$ , H-16), 4.60 (1H, *m*, H-3), 3.43 (2H, *d*,  $J_{26-25}=5.9\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -26), 2.96 (1H, *dq*,  $J_{20-17}=11.0\text{ Hz}$ ,  $J_{20-21}=7.1\text{ Hz}$ , H-20), 2.03 (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -16), 1.97 (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -3), 1.54 (1H, *m*, H-25), 1.32 (1H, *m*, H-24), 1.14 (3H, *d*,  $J_{21-20}=7.2\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -21), 1.02 (3H, *s*,  $\text{CH}_3$ -19), 0.91 (3H, *d*,  $J_{27-25}=7.2\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -27), 0.87 (3H, *s*,  $\text{CH}_3$ -18).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 36.8 (C-1), 27.7 (C-2), 73.8 (C-3), 34.8 (C-4), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 39.6 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 36.9 (C-12), 41.9 (C-13), 53.9 (C-14), 31.6 (C-15), 75.7 (C-16), 55.0 (C-17), 13.3 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.9 (C-21), 213.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.2 (C-24), 35.6 (C-25), 67.5 (C-26), 16.7 (C-27), 170.6 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -3), 169.6 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -16), 21.2 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -3), 21.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ -16).

### Triacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ , 26-triilo

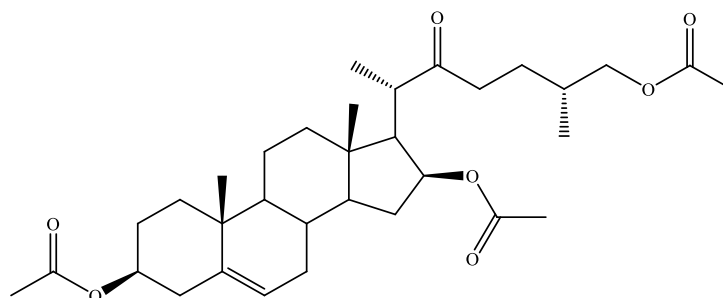


Figura 55. Estructura de **2**.

A una disolución del compuesto **1** (1 g, 1.94 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) se le adicionó anhídrido acético (5 mL, 52.89 mmol) en agitación a temperatura ambiente con DMAP en cantidades catalíticas, después de 2 horas la mezcla de reacción se lavó con agua destilada y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  que posteriormente se evaporó a presión reducida, se purificó en columna de cromatografía con gel de sílice usando hexano/acetato de etilo (9:1), se obtuvieron 770 mg del compuesto **2** (71.13 %).

## Caracterización

Fórmula molecular:  $C_{27}H_{42}O_3$ , P.M.: 558.76, Polvo amorfo, p.f. 156 °C,  $\alpha_D = +3.1^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 1.0$ ), IR: 2933  $cm^{-1}$  (alifáticos), 1732 y 1704  $cm^{-1}$  (C=O, carbonilos), 1224  $cm^{-1}$  (O=C-O, éster).

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 5.29 (1H, *dd*,  $J_{6-7eq} = 4.7$  Hz,  $J_{6-7ax} = 2.8$  Hz, H-6), 4.91 (1H, *td*,  $J_{16-17} = 8.2$  Hz,  $J_{16-7eq} = 7.0$  Hz,  $J_{16-17ax} = 3.4$  Hz, H-16), 4.53 (1H, *m*, H-3), 3.83 (2H, *dd*,  $J_{26-25} = 2.6$  Hz, H-26), 2.88 (1H, *dq*,  $J_{20-21} = 7.1$  Hz,  $J_{20-17} = 11.0$  Hz, H-20), 1.99 (3H, *s*,  $CH_3CO_2-3$ ), 1.97 (3H, *s*,  $CH_3CO_2-26$ ), 1.89 (3H, *s*,  $CH_3CO_2-16$ ), 1.48 (1H, *m*, H-25), 1.27 (1H, *m*, H-24), 1.07 (3H, *d*,  $J_{21-20} = 7.2$  Hz,  $CH_3-21$ ), 0.95 (3H, *s*,  $CH_3-19$ ), 0.85 (3H, *d*,  $J_{27-25} = 6.7$  Hz,  $CH_3-27$ ), 0.80 (3H, *s*,  $CH_3-18$ ).

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 36.9 (C-1), 27.8 (C-2), 73.8 (C-3), 38.1 (C-4), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 31.6 (C-7), 31.3 (C-8), 49.8 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.6 (C-12), 41.9 (C-13), 53.9 (C-14), 34.9 (C-15), 75.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.3 (C-18), 19.3 (C-19), 43.6 (C-20), 16.8 (C-21), 212.8 (C-22), 38.3 (C-23), 26.7 (C-24), 31.3 (C-25), 68.9 (C-26), 16.7 (C-27), 169.8 ( $CH_3CO_2-16$ ), 170.6 ( $CH_3CO_2-3$ ), 171.3 ( $CH_3CO_2-26$ ), 21.2 ( $CH_3CO_2-16$ ), 21.0 ( $CH_3CO_2-3$ ), 21.5 ( $CH_3CO_2-26$ ).

### Diacetato de (25*R*)-22,26-dioxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo

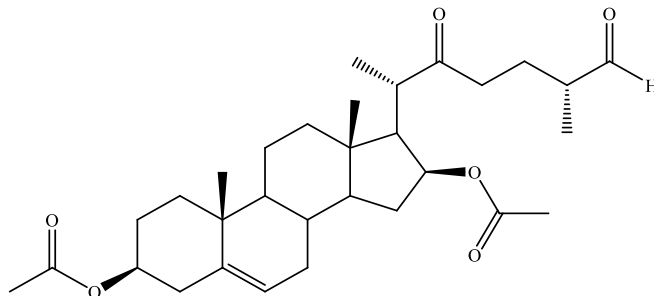


Figura 56. Estructura de 3.

Se disolvió el compuesto **1** (500 mg, 0.97 mmol) en 20 mL de  $CH_2Cl_2$  y se añadió PCC (625 mg, 2.90 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente se filtró en percolativa con gel de sílice, el disolvente se evaporó a presión reducida. Se purificó por columna de cromatografía en hexano/acetato de etilo (7:3), se obtuvieron 321 mg (63%) del compuesto **3**.

## Caracterización

Fórmula molecular:  $C_{27}H_{42}O_3$ , P.M.: 514.70, Polvo amorfo, p.f. 164 °C,  $\alpha_D = +1.2^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 1.0$ ), IR: 2933  $cm^{-1}$  (alifáticos), 2825  $cm^{-1}$  (CH, aldehído), 1726  $cm^{-1}$  (C=O, carbonilos), 1235  $cm^{-1}$  (O=C-O, éster).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 9.52 (1H, *d*,  $J_{26-25} = 1.8$  Hz, H-26), 5.29 (1H, *d*,  $J_{6-7} = 5.1$  Hz, H-6), 4.91 (1H, *td*,  $J_{16-25} = 8.2$  Hz,  $J_{16-25} = 7.9$  Hz,  $J_{16-25} = 3.7$  Hz, H-16), 4.52 (1H, *m*, H-3), 2.85 (1H, *ddd*,  $J_{20-17} = 39.8$  Hz,  $J_{20-21} = 7.0$  Hz,  $J_{20-25} = 2.6$  Hz, H-20), 2.61 (1H, *ddd*,  $J_{23a-23b} = 18.2$ , Hz,  $J_{23a-24a} = 8.6$  Hz,  $J_{23a-24b} = 6.3$  Hz, H-23a), 2.27 (1H, *m*, H-25), 1.89 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 1.96 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 1.05 (3H, *d*,  $J_{21-20} = 7.4$  Hz, CH<sub>3</sub>-21), 1.05 (3H, *d*,  $J_{27-25} = 7.4$  Hz, CH<sub>3</sub>-27), 0.95 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-19), 0.79 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-18).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ: 36.6 (C-1), 27.9 (C-2), 73.8 (C-3), 38.2 (C-4), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 31.8 (C-7), 31.5 (C-8), 49.9 (C-9), 36.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.1 (C-13), 54.1 (C-14), 34.8 (C-15), 75.8 (C-16), 55.2 (C-17), 13.3 (C-18), 19.3 (C-19), 43.6 (C-20), 16.8 (C-21), 212.8 (C-22), 37.8 (C-23), 26.3 (C-24), 45.7 (C-25), 204.4 (C-26), 13.5 (C-27), 169.8 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 170.6 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 21.1 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 21.4 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3).

#### Ácido (25*R*)-3β,16β-diacetoxi-22-oxocolest-5-en-26-oico

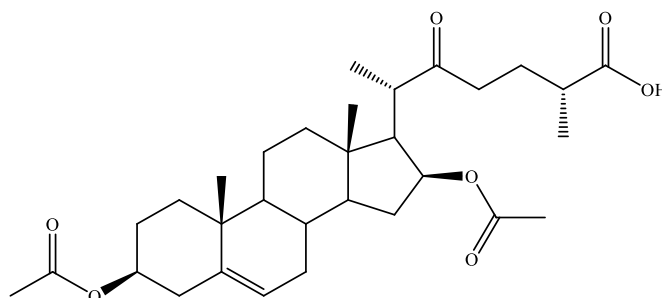


Figura 57. Estructura de 4.

Se disolvió en acetona (30 mL) 500.0 mg de **1** (0.968 mmol), se agitó a temperatura ambiente y en atmósfera inerte durante una hora. Se bajo la temperatura a 0 °C y se adicionó 1.25 mL de reactivo de Jones, la mezcla de reacción se dejó en agitación por 10 minutos, después se adicionaron 4 mL de isopropanol, el disolvente se evaporó a presión reducida, se extrajo con acetato de etilo y lavados de agua destilada. Se purifico en columna de cromatografía con gel de sílice y hexano/acetato de etilo (5:5), se obtuvieron 361.0 mg del compuesto **4** (70 %).

#### Caracterización

Fórmula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>, P.M.: 430.70, Polvo amorfo, p.f. 212 °C,  $\alpha_D = -5.2^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c = 1.0$ ), IR: 2934 cm<sup>-1</sup> (alifáticos), 1726 cm<sup>-1</sup> (C=O, carbonilos de éster), 1705 cm<sup>-1</sup> (C=O, carbonilo del carboxilato), 1236 cm<sup>-1</sup> (O=C-O, éster).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 5.36 (1H, *dd*,  $J_{6-4a} = 4.5$  Hz,  $J_{6-7} = 2.7$  Hz, H-6), 4.97 (1H, *td*,  $J_{16-17} = 8.2$  Hz,  $J_{16-15e} = 8.1$  Hz,  $J_{16-15a} = 4.3$  Hz, H-16), 4.60 (1H, *m*, H-3), 2.04 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 1.96 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 1.20 (3H, *d*,  $J_{27-25} = 6.9$  Hz, CH<sub>3</sub>-27), 1.14 (3H, *d*,  $J_{21-20} = 7.2$  Hz, CH<sub>3</sub>-21), 1.02 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-19), 0.86 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-18).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ: 36.8 (C-1), 27.7 (C-2), 73.9 (C-3), 169.9 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 21.1 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3), 38.0 (C-4), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 31.6 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.6 (C-12), 41.9 (C-13), 53.9 (C-14), 34.8 (C-15), 75.7 (C-16), 170.6

(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 21.6 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 55.1 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 212.4 (C-22), 38.0 (C-23), 26.2 (C-24), 35.5 (C-25), 181.6 (C-26), 17.0 (C-27).

## CAPITULO 3. Evaluación biológica

### 3.1 Antecedentes de evaluación de fitohormonas

Una hormona se puede definir como una molécula de señalización biosintetizada por una glándula específica, en el reino vegetal no existen glándulas para la secreción de hormonas sino señales para la producción de estos compuestos dentro de la misma planta en concentraciones extremadamente bajas y al ritmo en que se requieran, estas moléculas se denominan fitohormonas. La función de estos compuestos es mediar las respuestas fisiológicas, morfológicas y enzimáticas por lo que son importantes reguladores de procesos celulares específicos a través de su unión con ciertas dianas en el sitio activo y varían desde la zona donde se producen hasta a la que son transportados [70].

Existe una clasificación de las fitohormonas basada en el tipo de estructura que presentan, entre ellas podemos destacar a las auxinas, giberelinas, jasmonatos, citoquininas, estrigolactonas y brasinoesteroides (Figura 58). Actualmente se cuenta con amplia investigación sobre la producción de fitohormonas y la vía por la cual regulan los procesos de desarrollo así como de defensa en las plantas, por ejemplo, la germinación, alargamiento, diferenciación, senescencia y resistencia a estrés biótico y abiótico [71], [72].

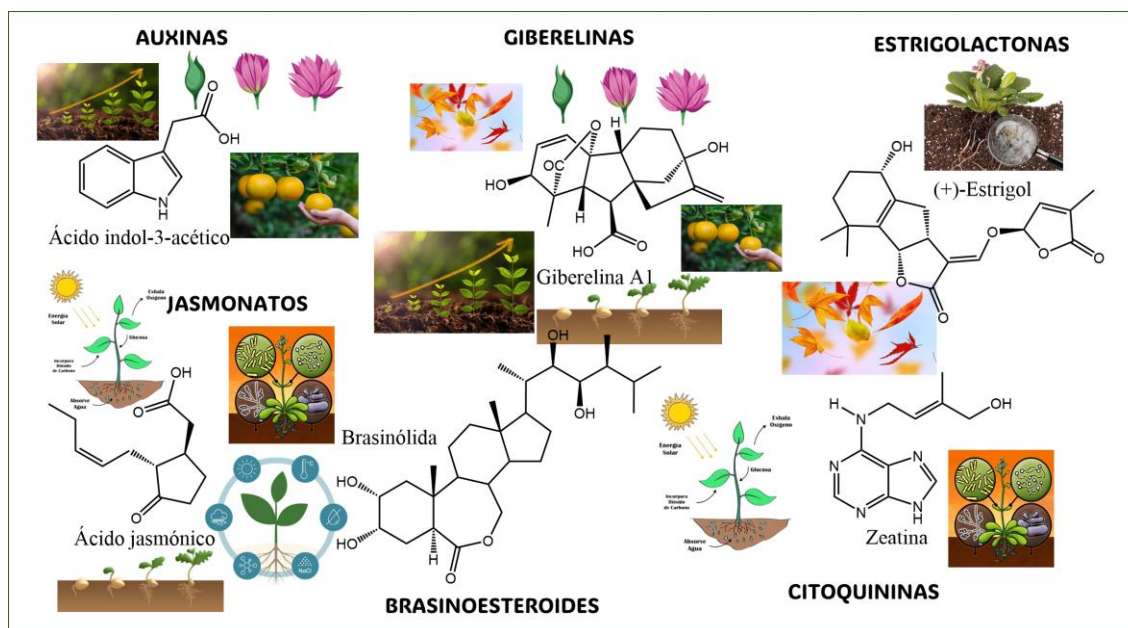


Figura 58. Fitohormonas y sus procesos relacionados en el desarrollo de las plantas.

Las auxinas fueron el primer grupo de fitohormonas en ser descubiertas, su producción está relacionada a los procesos de proliferación, alargamiento y diferenciación en diferentes tejidos y etapas del desarrollo, por esto en la agricultura son empleados para acelerar el crecimiento de las plantas, promover la iniciación de raíces adventicias, floración, maduración del fruto y evitar su caída prematura. El ácido indol-3-acético (AIA) que fue

aislado por primera vez en 1885 es la más común de las auxinas naturales y mayormente utilizada en estudios, otra auxina natural relevante es el ácido indol butírico (AIB) el cual es empleado para procesos de enraizamiento; el ácido 2,4-diclorofenoxiacético de origen sintético y ampliamente utilizado como herbicida. Las auxinas se encuentran bastante relacionadas con la rizobacteria y esta es una relación importante debido a la simbiosis que se genera entre ellos beneficiando el desarrollo vegetal [73], [74], [75], [76].

Estudios de evaluación exógena de auxinas han demostrado el efecto que éstas pueden tener sobre diferentes especies, en 2023 Solano y colaboradores evaluaron el efecto de la aplicación por aspersión foliar de AIA a diferentes concentraciones en 5 fechas distintas a plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.), de su estudio encontraron que aplicar exógenamente esta fitohormona resultó benéfico en la promoción de crecimiento y sobre todo en la calidad de la planta, en todas las concentraciones se incrementaron los fenoles totales, pero a 200 ppm se elevó la relación 1:6 con respecto al control, y para la menor concentración a 50 ppm se favoreció el desarrollo del bulbo de cebolla y aumentó su peso lo que podría aplicarse en diferentes cultivos hortícolas esperando resultados similares [77].

Las giberelinas (GAs) juegan un papel importante en incrementar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico (causado por condiciones ambientales extremas), incremento de alargamiento y división celular y en procesos de desarrollo de semillas. También tienen la capacidad de regular propiedades fotosintéticas como la conductancia estomática, eficiencia de la carboxilación y por ende la fotosíntesis neta. Se sabe que su aplicación exógena regula positivamente la biosíntesis de ácido salicílico elevando la respuesta de defensa al estrés abiótico. La GA de mayor actividad es el ácido giberélico denominado como GA<sub>3</sub> que ha demostrado incrementar la adaptación del alga marina en condiciones bajas de metales pesados como plomo y cadmio [78], [79], [80], [81].

Uno de los factores abióticos de estrés para las plantas es la temperatura, las alteraciones de esta variable pueden generar grandes repercusiones en el desarrollo y producción y por ende en el rendimiento del cultivo, Tianxhin Guo y colaboradores en 2022 evaluaron el efecto de aplicar por aspersión foliar GA<sub>3</sub> en 2 genotipos de tomate (Ahmar y Roma) después de 45 días a diferentes concentraciones, reportaron una dosis óptima de 75 mg/L en la variante Roma sometida a estrés con un incremento de temperatura a 45°C, también observaron el incremento de la biomasa de la raíz y el brote de la sección estresada, esto fue comparado contra un blanco sin aplicación de compuesto. La raíz y el brote incrementaron en longitud a condiciones de 25°C y también a 45 °C [82].

Para demostrar el efecto de aplicar GA<sub>3</sub> sobre la calidad del fruto de Kinnow (híbrido de mandarina) en 2020 Humna Talat y colaboradores evaluaron la aplicación foliar a diferentes concentraciones de esta fitohormona, reportaron mejores parámetros físicos a 65 ppm con un incremento aproximado del 40% en peso de la fruta, a dosis de 25 y 45 ppm se incrementó el contenido total de fenoles en el jugo y una mejor apariencia de la cáscara que se expresa como una mejor calidad del fruto [83].

Las estrigolactonas (SL) son hormonas derivadas de los carotenoides y presentan una función dual, la primera es que al ser una fitohormona endógena controla el desarrollo de las plantas; y la segunda como compuestos que al ser exudados por la raíz promueven la simbiosis entre planta-microbiota del suelo. Algunas funciones en las que intervienen son la germinación parasita y el crecimiento de hongos micorrízicos que responden a la deficiencia de fosfatos y nitratos para mejorar su consumo del suelo, fisiológicamente en el desarrollo su actividad se observa en la formación de nódulos, senescencia de las hojas y tolerancia a estrés como sequía, salinidad e inanición de nutrientes [84], [85].

En la evaluación de estas fitohormonas, son análogos sintéticos los que han sido descritos en la literatura, tal es el caso de lo reportado por el grupo de investigación de Zhang Chun-lei en 2020 cuyo objetivo fue demostrar la regulación en la arquitectura de la raíz, para esto evaluaron GR24 (Figura 59), que es de uso comercial, en semillas de colza (*B. napus* L.) a diferentes concentraciones, reportaron que a 0.18  $\mu\text{mol/L}$  se generó un incremento en el crecimiento de la raíz lateral y en los brotes, particularmente a 18  $\mu\text{mol/L}$  hubo decremento significativo en el peso seco con esto concluyeron que a bajas concentraciones de SL exógenas se promueve el crecimiento de raíces generando beneficios útiles en la productividad del cultivo [86].

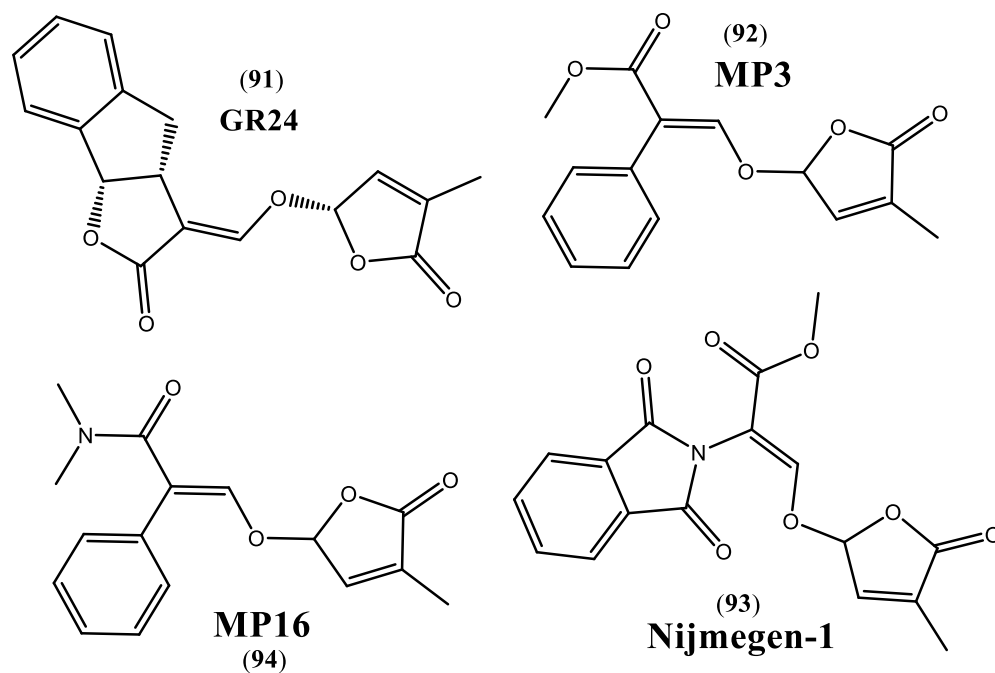


Figura 59. Análogos sintéticos de SL.

En la evaluación realizada por Muhammad Jamil y colaboradores en 2022 tuvieron como interés inhibir la producción de *Striga hermonthica* comúnmente conocida como hierba bruja púrpura, que es una planta hemiparásita que causa aproximadamente el 50% de pérdida del

rendimiento en cosechas de cereales en zonas agrícolas de África, para el trabajo evaluaron tres SL sintéticas (Figura 59), MP3, MP16 y Nijmegen-1, en condiciones de laboratorio, invernadero y de campo. En la primera etapa se usó como control positivo el análogo GR24 y fueron evaluados a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  demostrando un incremento del cereal de 20-22% para el MP3 y de 14% para los otros dos análogos. En invernadero MP3 nuevamente quedó al nivel del control incrementando al 73% el rendimiento del cultivo de cereal, mientras que Nijmegen-1 tuvo un rendimiento de 89% y MP16 del 97%. Finalmente, en la evaluación en condiciones de campo, el crecimiento de *Striga* disminuyó con todos los análogos en cultivo de maíz, incrementó el rendimiento del cereal entre 9-30% y se destacó a Nijmegen-1 ya que generó una disminución de la planta parásita en 43% en cultivo de maíz y de 60% en sorgo [87].

Por otro lado, encontramos a los jasmonatos (JAs) que son de origen lipídico y regulan procesos de crecimiento, fotosíntesis, desarrollo reproductivo como maduración del fruto y polen, germinación de semillas y crecimiento de la raíz. Son especialmente importantes para la defensa contra herbívoros y estrés por patógenos y algunas de estas fitohormonas pueden ser liberadas como compuestos orgánicos volátiles (COVs). Uno de los jasmonatos más representativos es el ácido jasmónico (AJ) y el jasmonato de metilo [88], [89].

Con el objetivo de evaluar el efecto a la tolerancia de sequía de dos variantes de trigo con la aplicación exógena de AJ y cinetina (una citoquinina sintética) a concentraciones de 0.1 mM y 0.5 mM respectivamente Abeed y colaboradores encontraron un incremento en la relación raíz/brote y en el contenido total de agua comparados con el control con estrés, una de las variantes fue incluso mejor que el blanco no estresado. En cuanto al peso, la aplicación de AJ representó una mejora al nivel del blanco sin estrés; el contenido de carbohidratos, proteína y el aminoácido prolina en hoja mejoraron con respecto al control con estrés, pero no superaron al blanco sin estrés [90].

Otro ejemplo del efecto positivo sobre condiciones de estrés es la que reportaron Noor y colaboradores en 2022 donde evaluaron el efecto sobre estrés salino en cultivos de soya, se aplicó AJ por aspersión foliar a una concentración de 100  $\mu\text{mol/L}$  en dos variantes de este cereal y se midió la respuesta morfo-fisiológica al estar sometidas a diferentes condiciones de salinidad (0, 40, 80, 120 mM), demostraron alivio del impacto negativo del estrés salino en el crecimiento y metabolismo en ambas variantes, con esta evaluación y la anterior se demuestra la función clave de los JAs en la señalización de plantas bajo condiciones de estrés [91].

Finalmente, las citoquininas, que son moléculas que derivan de la adenina con una cadena lateral unida al anillo purínico, esta cadena puede ser de tipo isoprenoide o aromática. Estas fitohormonas se caracterizan por promover la división y diferenciación celular, son fundamentales para el proceso de organogénesis, tolerancia y defensa a patógenos, además retrasa la senescencia mediante la descomposición de clorofilas, ácidos nucleicos y redistribuye aminoácidos, hormonas y sales por otras partes de la planta. En condiciones de

estrés, se sabe que la planta sometida a incrementos de temperatura eleva las especies reactivas de oxígeno (ROS) y esto hace que incremente la concentración de citoquininas para contrarrestar a las ROS; en estrés por frío el aumento de citoquininas interviene en el daño a la membrana [92], [93], [94]. En reportes de evaluación exógena, previamente se abordó el caso del estudio de Abeer y col., donde a la par de un JA se evaluó también una citoquinina sintética y los resultados fueron benéficos para condiciones de estrés [90].

Kaya y colaboradores en 2010 evaluaron cinetina (Figura 60) y AIA por aspersion foliar en hojas sometidas a estrés salino en condiciones de campo, se sabe que este tipo de estrés en cultivos de maíz reduce la materia total seca, rendimiento del grano, contenido de clorofila y de agua, por lo tanto, estas son las variables que estudiaron como respuesta en este trabajo. La aplicación de cinetina a 2 mM fue el tratamiento con mejor eficiencia ya que contrarrestó los efectos del estrés, pero no superó al blanco sin estrés, mejoró el rendimiento en peso de mazorca lo cual se correlacionó con lo descrito previamente sobre la función de esta fitohormona, y en el caso de la aplicación de AIA a la misma concentración se observó un incremento la producción de clorofilas a/b en comparación con las estresadas y disminuyó la fuga de electrolitos [95].

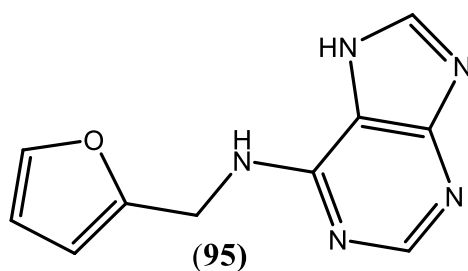


Figura 60. Cinetina, citoquinina de origen sintético.

Además de las moléculas mencionadas arriba, existen otras fitohormonas y compuestos producidos por el estrés biótico y abiótico, como el etileno, ácido abscísico, ácido salicílico, poliaminas, óxido nítrico y uno de los añadidos a la primera clasificación y que es de nuestro interés, los brasinoesteroides.

### 3.1.1 Antecedentes de esteroides evaluados

En 1979 se encontró una lactona esteroidal promotora de crecimiento vegetal denominada brasinólida **8** a partir del polen de colza (*Brassica napus* L.). A partir de esto, la investigación en el área se enfocó en aislar e identificar compuestos similares de diversas plantas, además de buscar la síntesis de esta fitohormona se produjeron modificaciones similares que presentaban un potencial similar al del natural. Estos derivados conforman otro de los grupos

de fitohormonas, los brasinoesteroides (BRs) y sus análogos sintéticos, actualmente los ensayos biológicos permiten evaluar compuestos esteroidales con actividad biológica similar al de la brasinólida en el crecimiento y desarrollo de plantas para así mejorar la productividad agrícola, también es importante destacar su capacidad de incrementar la tolerancia al estrés biótico y abiótico [96], [97]. Otro brasinoesteroide de gran estudio es la castasterona **18** que es de origen natural, de la cual se han logrado aislar análogos a partir de *L. viscaria* [98].

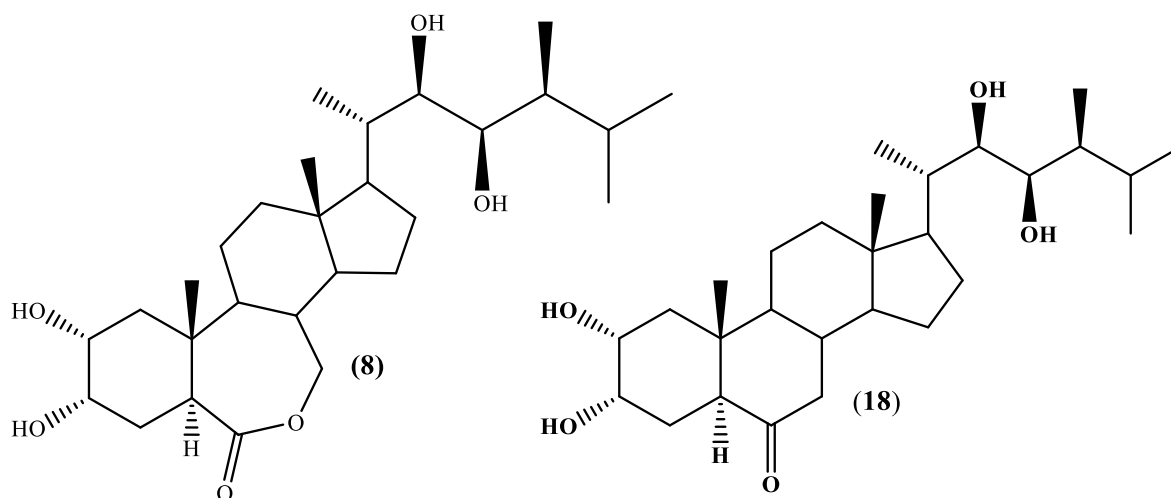
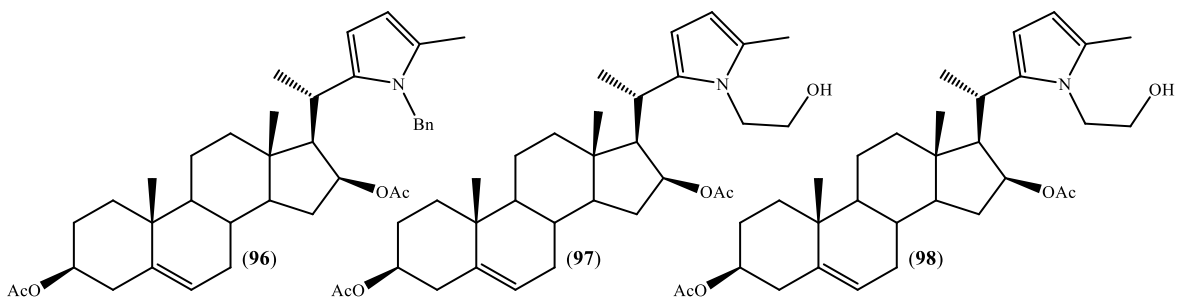


Figura 61. Estructura de brasinoesteroides de gran interés.

Otra serie de gran interés son tres derivados pirroles trisustituidos (Figura 62) obtenidos a partir de diosgenina, cuyo efecto sobre crecimiento fue evaluado en chiles habanero (*C. chinense*) en invernadero, los compuestos fueron aplicados por aspersión foliar y se utilizó Cystar como control positivo, que es un regulador de crecimiento comercial a base de citoquininas naturales con efecto estimulante sobre el desarrollo vegetal, este mejora la calidad del fruto y aumenta los rendimientos de cultivo. En altura y número de hojas no hubo un efecto de aumento comparado con el control, aquí lo que se destacó es que fueron del mismo nivel; del compuesto **98** reportaron un cambio considerable en la biomasa de la raíz seca lo que implica que comparado con el control hubo un incremento de grosor de las raíces secundarias o en su longitud, a partir de esos resultados se puede considerar a este derivado como potencial en la etapa de germinación o enraizamiento. La perspectiva del grupo de investigación con relación a este compuesto es buscar la dosis de mayor efecto. Esta serie de derivados tienen como valor extra su actividad acaricida que resultó mucho mejor que la del control, esta actividad dual es de gran potencial en agricultura ya que al mismo tiempo en que se controla una plaga puede mejorar la calidad y rendimientos del cultivo [99].



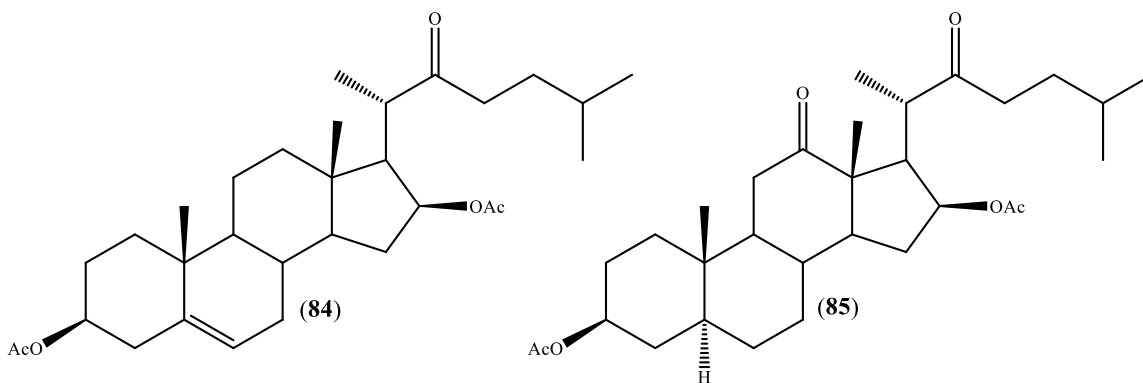
**Figura 62. Pirroles trisustituidos fusionados en una cadena lateral de norcolestano obtenida de diosgenina.**

La investigación de esteroides aplicados para la agricultura no va únicamente por la búsqueda de compuestos que promuevan el crecimiento, también es de interés evaluar el efecto de compuestos con actividad antifúngica como se marcó en el caso anterior. Se sabe que la vía de BRs involucra receptores relacionados a inmunidad, un estudio de aplicación de epibrasinólida en plántulas de té realizado por Zhang y colaboradores demostró que sí existe efecto de protección en contra del desarrollo del fitopatógeno *Colletotrichum fructicola* y es de gran interés ya que está relacionado a enfermedades vegetales como la antracnosis [100].

Los tipos de estrés a los que una planta puede estar sometida pueden ser biótico, que involucra microorganismos, insectos y herbívoros, y abiótico que engloba a las condiciones del medio ambiente como lluvias, temperaturas extremas, salinidad y sequías. Un estudio reciente reportó que aplicar un pretratamiento de epibrasinólida a  $0.4 \mu\text{M}$  a semillas de trigo redujo los efectos del estrés oxidativo causado por sequía en las plántulas, este efecto es posiblemente resultado de la modulación del sistema antioxidante [101].

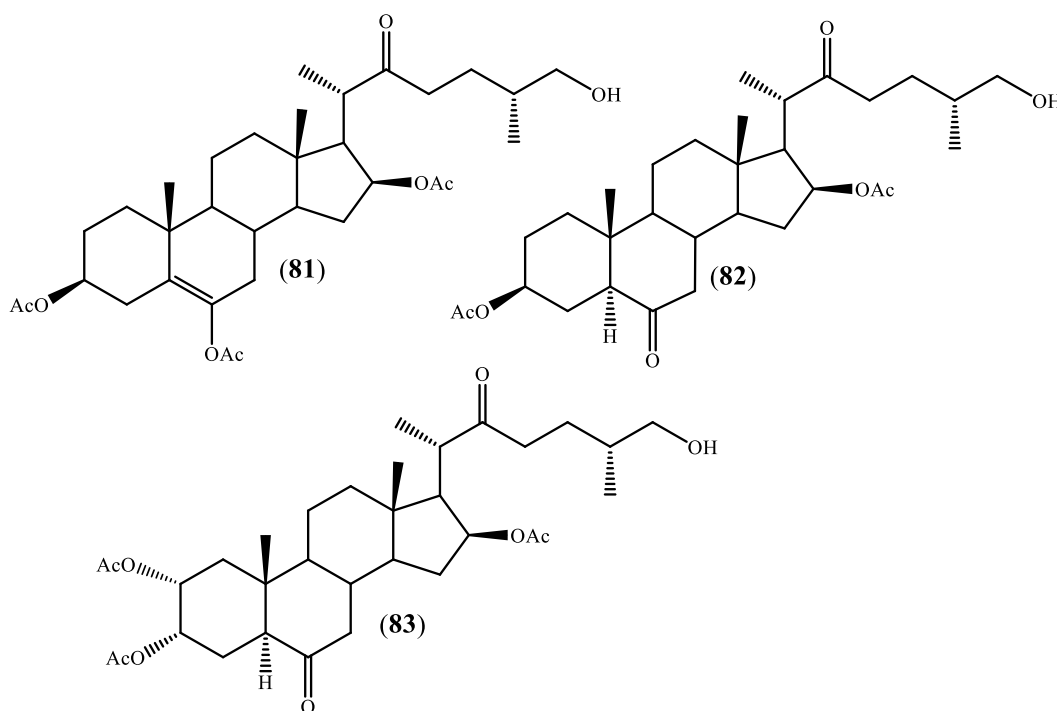
### 3.1.2 22-oxocolestanos como promotores de crecimiento vegetal

En el grupo de Sandoval y colaboradores partiendo de esteroides como la diosgenina y hecogenina se ha realizado modificación estructural para la obtención de derivados 22-oxocolestánicos (Figura 63) evaluados como promotores de crecimiento mediante ensayos de inclinación de la lámina de arroz demostrando actividad similar a nivel de la homobrasinólida a concentraciones de  $0.05 \mu\text{g/L}$  hasta  $0.05\text{mg/L}$  en la variedad de arroz Morelos A06 y hasta  $0.25 \text{mg/L}$  en la variedad A08 [42].



**Figura 63. 22-oxocolestanos promotores decrecimiento vegetal.**

Además de la modificación en los anillos E y F de diosgenina para obtener los derivados 22-oxocolestánicos también se han realizado cambios estructurales en los anillos A y B, de todas estas modificaciones se obtuvieron los correspondientes compuestos hidroxilados en C-26 lo que ha incrementado el efecto promotor de estos derivados, superando los tres compuestos sintéticos (Figura 64) el nivel de la homobrasinólida a concentración de 0.05  $\mu\text{g/L}$  en Morelos A06 y manteniéndose al nivel de este control en Morelos A08 [43].



**Figura 64. 26-hidroxicolestan-22-oxo promotores de crecimiento vegetal.**

### 3.2 Evaluación biológica de compuestos 22-oxocolestanos como promotores de crecimiento vegetal

La soberanía alimentaria es uno de los principales retos en la actualidad, algunos obstáculos son los bajos rendimientos de cosecha por factores de estrés a los que están expuestos los cultivos que pueden repercutir en su pérdida parcial e inclusive total, actualmente en la agricultura se emplean diversos fertilizantes químicos y orgánicos que ayudan a mejorar el cultivo, su desventaja son las cantidades necesarias. Una alternativa implementada décadas atrás fue el uso exógeno de brasinoesteroides (BRs) naturales como la homobrasinólida y epibrasinólida que mejoraban al cultivo en peso y resistencia a estrés, pero sus costos son elevados y uno de ellos fue discontinuado del mercado nacional, actualmente se buscan análogos sintéticos con potencial igual o mejor al de BRs naturales, es por ello que se decidió trabajar con 4 derivados 22-oxocolestenos derivados de diosgenina (**1-4**) que demostraron gran potencial *in silico* por la vía de acción en BRI1, BRI1-BAK1 y BRI1-SERK1 (Figura 65), actividad que fue evaluada a nivel *in vitro* con el ensayo de alargamiento en lechuga orejona a una concentración 0.1 mg/L para cada PECV y en condiciones de campo para SPGP4 **2** a una concentración 0.5 mg/L.

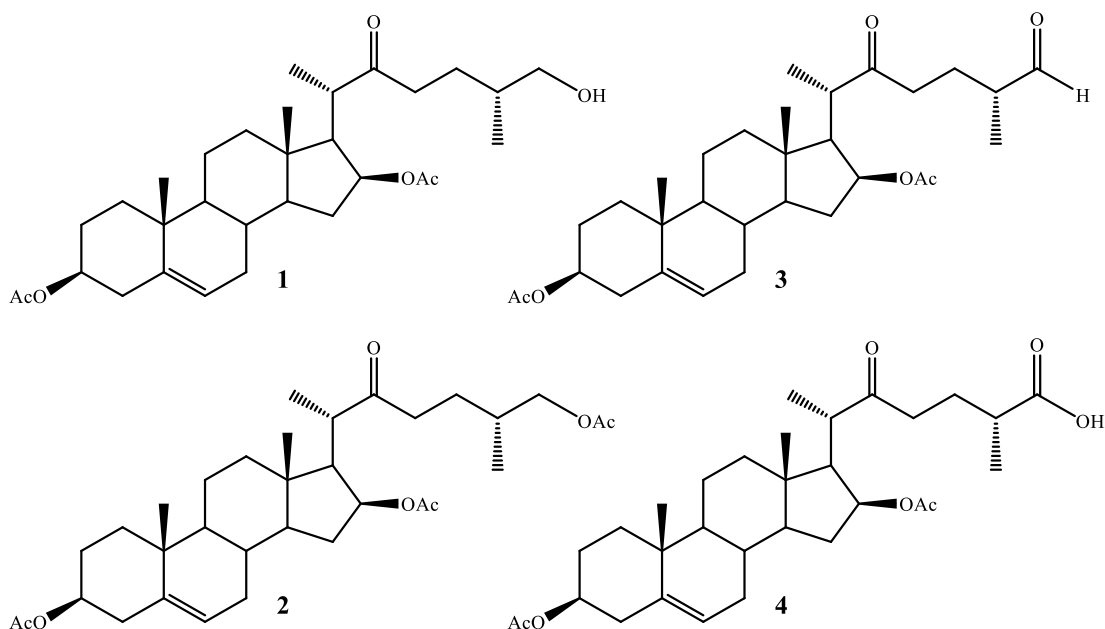


Figura 65. Estructuras PECV evaluadas *in vitro*.

### 3.2.1 Evaluación *in vitro*

Para la evaluación se realizaron 10 réplicas con bloques de 9 plántulas de lechuga para cada tratamiento, se adicionaron 20 mL de solución en cada uno en los bloques y se dejaron en oscuridad por 48 horas antes de realizar las mediciones de las variables: longitud del tallo, de la raíz y de hoja, grosor de tallo y de raíz. Para determinar si los tratamientos tuvieron un efecto significativo en cada variable se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Se observa en la Figura 66 y Figura 67 que para tallo y raíz ni en longitud ni en grosor hubo diferencia significativa con el blanco, cuyo tratamiento fue maleato ácido de potasio 2.5 mM a pH=6.5, que también se usó para preparar las disoluciones de los PECV 22-oxocolestenos.

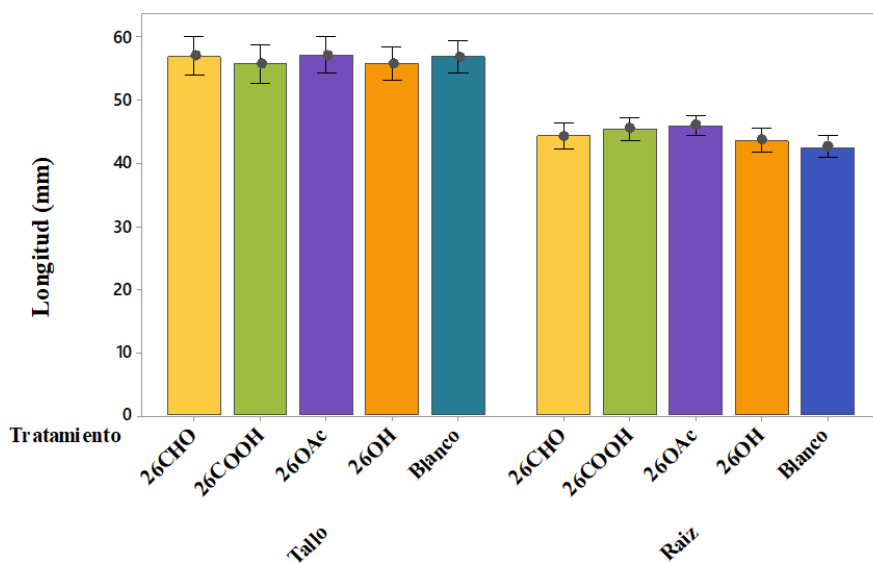


Figura 66. Gráfica de intervalos de longitud de tallo y raíz de plántulas de lechuga orejona.

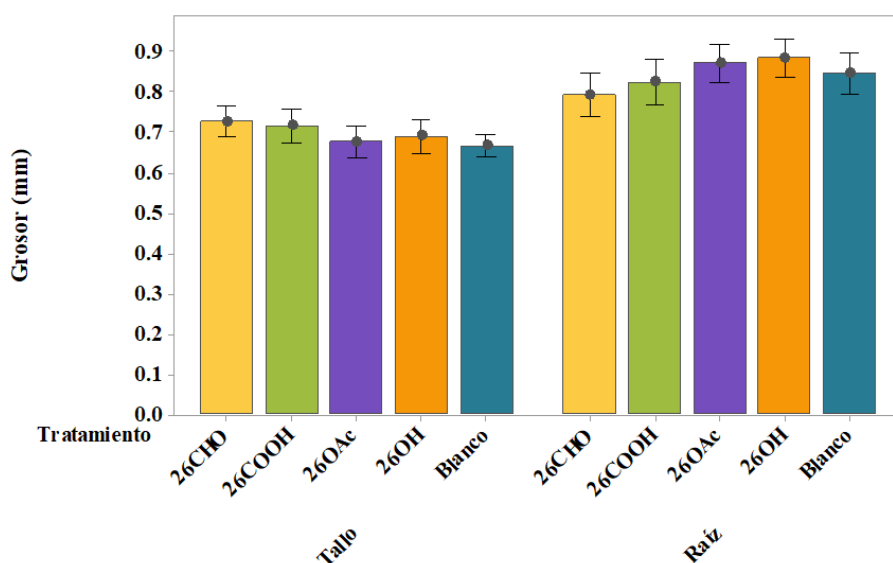


Figura 67. Gráfica de intervalos de grosor de tallo y raíz de plántulas de lechuga orejona.

Para el efecto sobre la longitud de hoja se observó un incremento en crecimiento al aplicar el PECV **4** que tiene como grupo en C-26 el ácido carboxílico (26COOH), estadísticamente existe una diferencia entre este tratamiento y el control por lo que se clasifican con letras distintas (Figura 68), así mismo hubo una mejora en la tendencia de la longitud de las hojas al utilizar el derivado 26 aldehídico **3** (26CHO) y el 26 acetilado **2** (26OAc). Los PECV **2**, **3** y **4** tuvieron la capacidad de incrementar el alargamiento de la hoja, esto puede ser aplicado en diversas especies de hortalizas y también puede ser empleado en cereales cuyas hojas se usan con otros fines como es el caso del maíz, que se emplea para pastura.

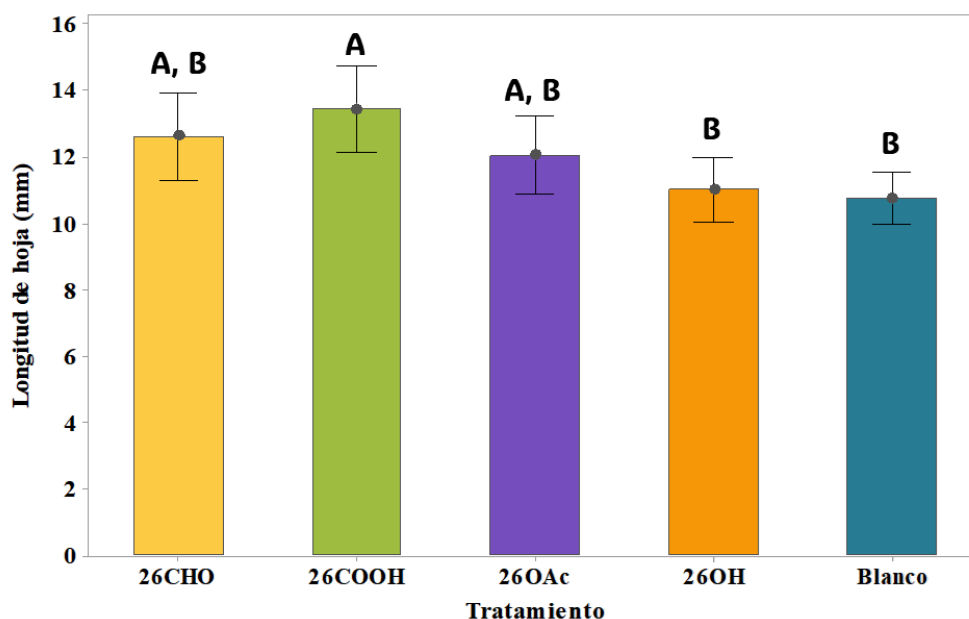


Figura 68. Gráfica de intervalos de longitudes de hojas de plántulas de lechuga orejona.

### 3.2.2 Evaluación en campo

Previamente se abordó el potencial *in silico* e *in vitro* del 22-oxocolesteno **2** nombrado como SPGP4, sin embargo, era necesario saber si su efecto es latente hasta la etapa de producción en campo; con estos antecedentes se estableció un diseño de experimentos con el objetivo de determinar el efecto a nivel de biomasa y producción en cultivos de maíz y frijol.

En la Tabla 12 se presentan los efectos en la producción agrícola dual de frijol y maíz, se observó un incremento en las tres parcelas con respecto al control que solo fue tratado con agua, además se resalta que el primer lote de terreno que es humedal y el tercer terreno con fuente de agua subterránea presentan la mayor producción, que concuerda con las necesidades de desarrollo del frijol, también hubo un incremento debido al tratamiento con SPGP4 en la producción de 0.15 y 0.16 ton/ha respectivamente. Las tierras del segundo

cultivo a pesar de que tuvieron la menor producción, dada la dependencia únicamente del agua de lluvia, también presentaron un aumento de 0.08 ton/ha.

**Tabla 12. Resultados de la producción agrícola de maíz y frijol criollo tratados con el compuesto 2.**

Cultivo/Tratamiento	Peso de frijol (Ton/ha)	Peso de maíz (Ton/ha)
1/Agua	0.52	5.22
1/2	0.67*	5.68
2/Agua	0.38	4.52
2/2	0.46*	5.53*
3/Agua	0.42	5.11
3/2	0.58*	6.77*

\* Estadísticamente diferente del blanco mediante la prueba de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

En el efecto en la producción por hectárea de maíz; dos de los tres campos de cultivo mostraron un aumento significativo de 22.3 y 32.5 % en la producción, mientras que en el campo de cultivo 1 se observó un ligero aumento de 8.8 % ya que para su incremento se requiere la activación tanto del receptor BRI1 que es el objetivo de estudio en este trabajo como la de auxinas y SLs [102].

Otras variables para tener en cuenta en el efecto sobre la producción fueron las morfológicas como la altura y diámetro de las plantas de maíz. En la Figura 69 se muestran las diferencias en el desarrollo de maíz sometido a un tratamiento con agua y otro con SPGP4 antes de la aspersión foliar, es decir del efecto de embeber las semillas antes de la siembra, y antes de la cosecha, es decir del efecto de la aspersión foliar.



**Figura 69. Efecto morfológico en plantas de maíz tratadas con y sin compuesto.**

En la Tabla 13 se presenta el efecto sobre la altura y diámetro del maíz en los tres lotes evaluados, podemos observar que nuevamente se presentó un incremento en todos los casos con respecto a su control con aumentos del 16.6%, 18.0% y 22.1% para la altura. En el caso del diámetro del tallo de maíz el tratamiento generó engrosamiento con aumentos significativos en las tres parcelas de 19.3%, 20.0% y 7.1% respectivamente, con esto se concluyó que el desarrollo del diámetro no es proporcional al aumento en la altura, pero sí que existe una relación entre la proliferación celular (diámetro) y el alargamiento (altura), reflejando una producción de plantas más resistentes a vientos fuertes.

**Tabla 13. Resultados morfológicos y de pastura de maíz nativo tratado con compuesto 2 (SPGP4).**

Cultivo/Tratamiento	Altura (m)	Diámetro (cm)	Peso de pastura fresca (Ton/ha)	Peso de pastura seca (Ton/ha)
1/Agua	1.87	7.18	12.91	4.01
1/1	2.18*	8.57*	15.32*	4.35
2/Agua	1.61	5.32	11.18	3.05
2/1	1.90*	6.39*	12.57*	3.32
3/Agua	1.63	7.01	13.98	4.51
3/1	1.99*	7.51*	17.01*	4.97*

\* Estadísticamente diferente del blanco mediante la prueba de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Como se mencionó previamente con los resultados *in vitro* el efecto del SPGP4 podría ayudar a incrementar la producción de pastura en cultivos de maíz, esto se observa en la Tabla 13 en el aumento de peso seco de pastura. Aunque solo existe diferencia significativa en la producción del terreno 3 y ya que este es el que mayor incremento presentó en altura puede atribuirse a que el alargamiento está relacionado directamente con el efecto de retención de agua y por tanto posiblemente con la activación del receptor BRI1.

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Evaluación *In vitro*

Se colocaron en placas Petri plántulas homogéneas de lechuga orejona en 20 mL de disolución de cada tratamiento durante 48 horas, luego se determinó con un vernier la longitud del tallo, de la raíz y de la hoja, el grosor de la raíz y del tallo. Los tratamientos fueron disoluciones de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** a 0.1 mg/L y maleato ácido de potasio 2.5 mM a pH fisiológico (6.5). Las evaluaciones se realizaron en bloques de 9 plántulas con 10 repeticiones.

#### 3.3.2 Evaluación en campo

Cultivo agrícola: La evaluación se realizó en 3 predios agrícolas ubicados en la región del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, con características específicas, el primero en terreno de humedal ubicado en las cercanías de un afluente de agua, el segundo en terreno árido dependiente de lluvias estacionales y el tercero siendo la humedad principal proveniente del manto acuífero. El cultivo se realizó mediante plantación simultánea de maíz y frijol. El cultivo se sembró en temporal, en el periodo mayo-noviembre, libre de agroquímicos.

Inmersión: Las semillas de frijol y maíz se embebieron en recipientes a razón de 1 kg de semilla por 3 litros de disolución de **2** a 0.5 mg/L durante 4 h, antes de la siembra.

Aspersión foliar: El compuesto se aplicó por aspersión foliar a razón de 200 L por hectárea con una concentración de 0.5 mg/L 45 días después de la aparición de las primeras plántulas.

Diseño experimental: El campo de cultivo se separó en hileras con una administración intercalada por grupos de 5 hileras de tratamiento de SPGP4 (**2**) y 5 hileras solo con agua. Para determinar las variables morfométricas y de producción se examinaron tramos de 10.0 m<sup>2</sup> para escalar a nivel de hectárea.

### 3. CONCLUSIONES

Se determinó el potencial de los derivados 22-oxocolestánicos como promotores de crecimiento vegetal a partir de su estudio *in silico* con acoplamiento molecular, a través del análisis de energías de acoplamiento y de las interacciones entre éstos y las dianas relacionadas a la actividad promotora.

La obtención de 4 derivados 22-oxocolestenos de diosgenina (**1-4**, ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se realizó con éxito, dejando un área de oportunidad en la optimización de sus metodologías.

El compuesto **4** fue el derivado que demostró un incremento significativo en el alargamiento de las hojas de plántulas de lechuga orejona; dos compuestos más, **2** y **3**, los derivados acetilado y aldehído mostraron una tendencia similar. La evaluación del compuesto **2** en campo mostró una marcada diferencia entre éste y el testigo, destacando así a este derivado 22-oxocolesténico como un promotor de crecimiento de gran actividad en beneficio de la agricultura.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. W. Went y K. V. Thimann, «Phytohormones.», *Phytohormones.*, 1937, Accedido: 6 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19381601765>
- [2] J. Ciura y J. Kruk, «Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance», *J. Plant Physiol.*, vol. 229, pp. 32-40, oct. 2018, doi: 10.1016/j.jplph.2018.06.013.
- [3] K. V. Thimann, «Fifty Years of Plant Hormone Research», *Plant Physiol.*, vol. 54, n.º 4, pp. 450-453, oct. 1974, doi: 10.1104/pp.54.4.450.
- [4] X. A. M. Lorenzo y M. Lorenzo, «Efecto de los bioestimulantes biobras 16 y quitomax sobre el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad delicias-364 en Aguada de pasajeros», 2018.
- [5] R. Morejón, «Efecto del análogo de brassinoesteroides biobras 6 en el rendimiento y otros caracteres. (*Oryza sativa* L.)», *Cultivos Tropicales*, vol. 25, n.º 1, 55-59, 2004.
- [6] J. C. Almenares, R. Cuñarro, R. Ravelo, E. Fitó, I. Moreno, y M. Nuñez, «Influencia de diferentes dosis y momentos de aplicación del Biobras-16 en el cultivo del maíz (*Zea mays*)», *Cultiv. Trop.*, vol. 20, n.º 3, Art. n.º 3, 1999.
- [7] N. J. M. Mata, «Efecto del ácido indol-3-acético y el ácido naftalenacético sobre el largo y ancho del fruto de melón (*Cucumis melo* L.) cultivar Edisto 47», *Rev UDO Agrícola*, vol. 9, n.º 3, 530-538, 2009.
- [8] PubChem, «Thidiazuron». Accedido: 6 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40087>
- [9] A. Ferrante, F. Tognoni, A. Mensuali-Sodi, y G. Serra, «Treatment with thidiazuron for preventing leaf yellowing in cut tulips and chrysanthemum», *Acta Hortic.*, n.º 624, pp. 357-363, sep. 2003, doi: 10.17660/ActaHortic.2003.624.49.
- [10] A. Ferrante, A. Mensuali-Sodi, y G. Serra, «Effect of thidiazuron and gibberellic acid on leaf yellowing of cut stock flowers», *Open Life Sci.*, vol. 4, n.º 4, pp. 461-468, dic. 2009, doi: 10.2478/s11535-009-0039-8.
- [11] Z. Yang *et al.*, «Design, Synthesis, and Action Mechanism of 1,3-Benzodioxole Derivatives as Potent Auxin Receptor Agonists and Root Growth Promoters», *Front. Plant Sci.*, vol. 13, p. 902902, jun. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.902902.
- [12] M. Kvasnica *et al.*, «Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain», *Org. Biomol. Chem.*, vol. 14, n.º 37, pp. 8691-8701, 2016, doi: 10.1039/C6OB01479H.
- [13] A. Nakamura *et al.*, «Molecular actions of two synthetic brassinosteroids, isocarbaBL and 6-deoxoBL, which cause altered physiological activities between *Arabidopsis* and rice», *PLOS ONE*, vol. 12, n.º 4, p. e0174015, abr. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0174015.
- [14] P. Korinkova, V. Bazgier, J. Oklestkova, L. Rarova, M. Strnad, y M. Kvasnica, «Synthesis of novel aryl brassinosteroids through alkene cross-metathesis and preliminary biological study», *Steroids*, vol. 127, pp. 46-55, nov. 2017, doi: 10.1016/j.steroids.2017.08.010.
- [15] E. H. Silva, «Brasinoesteroides en la agricultura. I\* Brassinosteroids in agriculture. I», *Rev. Mexicana cienc. agric.*, vol.7, n.º2, 441-450, 2016.

- [16] J. Bezuidenhout, L. V. Rensburg, y P. J. van Rensburg, «Molecular Similarity between Gibberellic Acid and Gliotoxin: Unravelling the Mechanism of Action for Plant Growth Promotion by *Trichoderma harzianum*», *J. Agric. Sci. Tech.*, B2, 703-712, 2012.
- [17] D. J. Hernández-Melchor, R. Ferrera-Cerrato, y A. Alarcón, «Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial», *Chil. J. Agric. Anim. Sci.*, n.º ahead, pp. 0-0, 2019, doi: 10.4067/S0719-38902019005000205.
- [18] M. Bürger y J. Chory, «In-silico analysis of the strigolactone ligand-receptor system», *Plant Direct*, vol. 4, n.º 9, p. e00263, sep. 2020, doi: 10.1002/pld3.263.
- [19] Y. Kang, Z. Pang, N. Xu, F. Chen, Z. Jin, y X. Xu, «Strigolactone Analogues Derived from Dihydroflavonoids as Potent Seed Germinators for the Broomrapes», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 68, n.º 40, pp. 11077-11087, oct. 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.9b08044.
- [20] J. Takeuchi *et al.*, «Rationally Designed Strigolactone Analogs as Antagonists of the D14 Receptor», *Plant Cell Physiol.*, vol. 59, n.º 8, pp. 1545-1554, ago. 2018, doi: 10.1093/pcp/pcy087.
- [21] J. Nisler *et al.*, «Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase», *Plant Mol. Biol.*, vol. 92, n.º 1-2, pp. 235-248, sep. 2016, doi: 10.1007/s11103-016-0509-0.
- [22] S. Wolf, «Deviating from the Beaten Track: New Twists in Brassinosteroid Receptor Function», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n.º 5, p. 1561, feb. 2020, doi: 10.3390/ijms21051561.
- [23] S. D. Clouse, «Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development», *Plant Cell*, vol. 23, n.º 4, pp. 1219-1230, abr. 2011, doi: 10.1105/tpc.111.084475.
- [24] E. Russinova *et al.*, «Heterodimerization and Endocytosis of Arabidopsis Brassinosteroid Receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1)», *Plant Cell*, vol. 16, n.º 12, pp. 3216-3229, dic. 2004, doi: 10.1105/tpc.104.025387.
- [25] J. Zhou *et al.*, «Regulation of *Arabidopsis* brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, n.º 8, feb. 2018, doi: 10.1073/pnas.1712251115.
- [26] J. Li y H. Jin, «Regulation of brassinosteroid signaling», *Trends Plant Sci.*, vol. 12, n.º 1, pp. 37-41, ene. 2007, doi: 10.1016/j.tplants.2006.11.002.
- [27] J. Mao y J. Li, «Regulation of Three Key Kinases of Brassinosteroid Signaling Pathway», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n.º 12, Art. n.º 12, ene. 2020, doi: 10.3390/ijms21124340.
- [28] J. She *et al.*, «Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1», *Nature*, vol. 474, n.º 7352, pp. 472-476, jun. 2011, doi: 10.1038/nature10178.
- [29] M. Hothorn *et al.*, «Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1», *Nature*, vol. 474, n.º 7352, pp. 467-471, jun. 2011, doi: 10.1038/nature10153.
- [30] J. Jiang, C. Zhang, y X. Wang, «Ligand Perception, Activation, and Early Signaling of Plant Steroid Receptor Brassinosteroid Insensitive 1», *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 55, n.º 12, pp. 1198-1211, dic. 2013, doi: 10.1111/jipb.12081.
- [31] G. W. Van Esse, S. Van Mourik, H. Stigter, C. A. Ten Hove, J. Molenaar, y S. C. De Vries, «A Mathematical Model for Brassinosteroid Insensitive1-Mediated Signaling in Root Growth and Hypocotyl Elongation», *Plant Physiol.*, vol. 160, n.º 1, pp. 523-532, sep. 2012, doi: 10.1104/pp.112.200105.

- [32] A. Heese *et al.*, «The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, n.º 29, pp. 12217-12222, jul. 2007, doi: 10.1073/pnas.0705306104.
- [33] B. Lei, J. Liu, y X. Yao, «Unveiling the molecular mechanism of brassinosteroids: Insights from structure-based molecular modeling studies», *Steroids*, vol. 104, pp. 111-117, dic. 2015, doi: 10.1016/j.steroids.2015.09.002.
- [34] B. Lei, N. Heng, X. Dang, J. Liu, X. Yao, y C. Zhang, «Structure based in silico identification of potentially non-steroidal brassinosteroids mimics», *Mol. Biosyst.*, vol. 13, n.º 7, pp. 1364-1369, 2017, doi: 10.1039/C7MB00214A.
- [35] K. Díaz *et al.*, «Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n.º 5, p. 1832, mar. 2020, doi: 10.3390/ijms21051832.
- [36] J. Liu, J. Li, y L. Shan, «SERKs», *Curr. Biol.*, vol. 30, n.º 7, pp. R293-R294, abr. 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.01.043.
- [37] R. Karlova y S. C. De Vries, «Advances in Understanding Brassinosteroid Signaling», *Sci. STKE*, vol. 2006, n.º 354, sep. 2006, doi: 10.1126/stke.3542006pe36.
- [38] J. Santiago, C. Henzler, y M. Hothorn, «Molecular Mechanism for Plant Steroid Receptor Activation by Somatic Embryogenesis Co-Receptor Kinases», *Science*, vol. 341, n.º 6148, pp. 889-892, ago. 2013, doi: 10.1126/science.1242468.
- [39] D. Bojar, J. Martinez, J. Santiago, V. Rybin, R. Bayliss, y M. Hothorn, «Crystal structures of the phosphorylated BRI 1 kinase domain and implications for brassinosteroid signal initiation», *Plant J.*, vol. 78, n.º 1, pp. 31-43, abr. 2014, doi: 10.1111/tpj.12445.
- [40] B. Nishikawa *et al.*, «Quantitative evaluation of the biological activity of various brassinosteroids using spiral root induction in rice seeds», *J. Pestic. Sci.*, vol. 48, n.º 4, pp. 218-224, nov. 2023, doi: 10.1584/jpestics.D23-044.
- [41] A. N. Pettitt, «Testing the Normality of Several Independent Samples Using the Anderson-Darling Statistic», *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.*, vol. 26, n.º 2, pp. 156-161, jun. 1977, doi: 10.2307/2347023.
- [42] R. Zeferino-Diaz, J. C. Hilario-Martinez, M. Rodriguez-Acosta, J. Sandoval-Ramirez, y M. A. Fernandez-Herrera, «22-Oxocholestanes as plant growth promoters», *Steroids*, vol. 98, pp. 126-131, jun. 2015, doi: 10.1016/j.steroids.2015.03.005.
- [43] R. Zeferino-Diaz *et al.*, «Mimicking natural phytohormones. 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as plant growth promoters», *Steroids*, vol. 125, pp. 20-26, sep. 2017, doi: 10.1016/j.steroids.2017.06.004.
- [44] «Schrödinger Release 2023-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.» New York, NY, 2023.
- [45] «Schrödinger Release 2023-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.»
- [46] «Schrödinger Release 2023-4: Epik, Schrödinger, LLC». New York, NY, 2023.
- [47] «Schrödinger Release 2023-3: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.»
- [48] «<https://www.rcsb.org/>».
- [49] «Schrödinger Release 2023-3: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.»
- [50] W. H. Kruskal y W. A. Wallis, «Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis», *J. Am. Stat. Assoc.*, vol. 47, n.º 260, pp. 583-621, dic. 1952, doi: 10.1080/01621459.1952.10483441.

- [51] «Molecular Docking Studies of Spirostans as MAPK14 (P38 $\alpha$ ) Inhibitors and Their Potential Use against Cancer | Journal of Molecular Docking». Accedido: 14 de septiembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://journal.umpr.ac.id/index.php/jmd/article/view/2904>
- [52] M. A. Fernández-Herrera *et al.*, «Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells», *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, n.º 7, pp. 2474-2484, abr. 2010, doi: 10.1016/j.bmc.2010.02.051.
- [53] R. Zeferino-Díaz *et al.*, «22-Oxocholestane oximes as potential anti-inflammatory drug candidates», *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 168, pp. 78-86, abr. 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.02.035.
- [54] R. E. Marker y E. Rohrmann, «Sterols. LXXXVIII. Pregnanediols from Sarsasapogenin», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 62, n.º 3, pp. 518-520, mar. 1940, doi: 10.1021/ja01860a017.
- [55] F. C. Uhle, «Reaction of Diosgenin Acetate with Hydrogen Chloride in Acetic Anhydride», *J. Org. Chem.*, vol. 27, n.º 2, pp. 656-658, feb. 1962, doi: 10.1021/jo01049a525.
- [56] T. G. LaCour y P. L. Fuchs, «Concurrent ring opening and halogenation of spiroketals», *Tetrahedron Lett.*, vol. 40, n.º 25, pp. 4655-4658, jun. 1999, doi: 10.1016/S0040-4039(99)00827-8.
- [57] Y. López, R. Santillan, y N. Farfán, «New bisfuran derivative from sarsasapogenin», *Steroids*, vol. 71, n.º 1, pp. 12-17, ene. 2006, doi: 10.1016/j.steroids.2005.07.009.
- [58] A. A. Hamid *et al.*, «Synthesis of novel anticancer agents through opening of spiroacetal ring of diosgenin», *Steroids*, vol. 87, pp. 108-118, sep. 2014, doi: 10.1016/j.steroids.2014.05.025.
- [59] A. C. Díaz *et al.*, «Regio- and stereoselective cleavage of steroidal 22-oxo-23-spiroketals catalyzed by BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O», *Steroids*, vol. 100, pp. 36-43, ago. 2015, doi: 10.1016/j.steroids.2015.04.004.
- [60] A. Corona-Díaz *et al.*, «TiCl<sub>4</sub> catalyzed cleavage of (25R)-22-oxo-23-spiroketals. Synthesis of sapogenins with furostanol and pyranone E rings on the side chain», *Steroids*, vol. 152, p. 108488, dic. 2019, doi: 10.1016/j.steroids.2019.108488.
- [61] S. I. Erdagi y U. Yildiz, «Synthesis, Structural Analysis and Antiproliferative Activity of Nitrogen-Containing Hetero Spirostan Derivatives: Oximes, Heterocyclic Ring-Fused and Furostanes», *ChemistrySelect*, vol. 7, n.º 24, p. e202200439, jun. 2022, doi: 10.1002/slct.202200439.
- [62] S.-N. Zhang *et al.*, «Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel diosgenin derivatives as anti-inflammatory agents», *Bioorganic Chem.*, vol. 127, p. 105908, oct. 2022, doi: 10.1016/j.bioorg.2022.105908.
- [63] J. Sandoval-Ramírez, A. Castro-Méndez, S. Meza-Reyes, F. Reyes-Vázquez, R. Santillán, y N. Farfán, «Preparation of 22,26-epoxycholest-22-ene steroids. Novel transformation of the side chain in sapogenins», *Tetrahedron Lett.*, vol. 40, n.º 28, pp. 5143-5146, jul. 1999, doi: 10.1016/S0040-4039(99)00884-9.
- [64] S. Rincón *et al.*, «A new route for the preparation of the 22,23-dioxocholestanic side chain from diosgenin and its application to the stereocontrolled construction of the 22R,23S-diol function», *Tetrahedron*, vol. 62, n.º 11, pp. 2594-2602, mar. 2006, doi: 10.1016/j.tet.2005.12.036.

- [65] J.-P. García-Merinos *et al.*, «Smilagenin Transformation Products Under Lewis Acid Catalysis in Acetic Anhydride and Synthesis of 23-Acetyl-Spirostanols», *Nat. Prod. Commun.*, vol. 18, n.º 11, p. 1934578X231212341, nov. 2023, doi: 10.1177/1934578X231212341.
- [66] M. A. Fernández-Herrera, J. Sandoval-Ramírez, S. Meza-Reyes, y S. Montiel-Smith, «Side-chain opening of steroidal saponin to form 22-oxocholestanic skeletons. An approach to analogues of the aglycone of the potent anticancer agent OSW-1», *J. Mex. Chem. Soc.*, vol. 53, n.º 3, jun. 2009, doi: 10.29356/jmcs.v53i3.993.
- [67] M. A. Fernández-Herrera *et al.*, «Synthesis of the steroidal glycoside (25R)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxy-12,22-dioxo-5 $\alpha$ -cholestan-26-yl  $\beta$ -D-glucopyranoside and its anti-cancer properties on cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo cells», *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, n.º 11, pp. 4827-4837, nov. 2010, doi: 10.1016/j.ejmech.2010.07.051.
- [68] M. A. Fernández-Herrera *et al.*, «Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxy-22-oxocholest-5-en-26-yl  $\beta$ -D-glucopyranoside: A selective anticancer agent in cervicouterine cell lines», *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, n.º 9, pp. 3877-3886, sep. 2011, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.05.058.
- [69] M. A. Fernández-Herrera, J. Sandoval-Ramírez, L. Sánchez-Sánchez, H. López-Muñoz, y M. L. Escobar-Sánchez, «Probing the selective antitumor activity of 22-oxo-26-selenocyanocholestan derivatives», *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 74, pp. 451-460, mar. 2014, doi: 10.1016/j.ejmech.2013.12.059.
- [70] A. Mukherjee *et al.*, «The bioactive potential of phytohormones: A review», *Biotechnol. Rep.*, vol. 35, p. e00748, sep. 2022, doi: 10.1016/j.btre.2022.e00748.
- [71] J. J. Ross, J. B. Reid, J. J. Ross, y J. B. Reid, «Evolution of growth-promoting plant hormones», *Funct. Plant Biol.*, vol. 37, n.º 9, pp. 795-805, ago. 2010, doi: 10.1071/FP10063.
- [72] «Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production | SpringerLink». Accedido: 14 de septiembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-015-9541-6>
- [73] C. Keswani *et al.*, «Auxins of microbial origin and their use in agriculture», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 104, n.º 20, pp. 8549-8565, oct. 2020, doi: 10.1007/s00253-020-10890-8.
- [74] L. L. B. Lobo, M. S. R. De Andrade Da Silva, T. C. L. Castellane, R. F. Carvalho, y E. C. Rigobelo, «Effect of Indole-3-Acetic Acid on Tomato Plant Growth», *Microorganisms*, vol. 10, n.º 11, p. 2212, nov. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10112212.
- [75] G. L. B. Gomes y K. C. Scortecci, «Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms», *Plant Biol.*, vol. 23, n.º 6, pp. 894-904, 2021, doi: 10.1111/plb.13303.
- [76] S. Roychoudhry y S. Kepinski, «Auxin in Root Development», *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 14, n.º 4, p. a039933, ene. 2022, doi: 10.1101/cshperspect.a039933.
- [77] C. Solano, A. Artola, R. Barrena, C. Ballardo, y A. Sánchez, «Effect of the Exogenous Application of Different Concentrations of Indole-3-Acetic Acid as a Growth Regulator on Onion (*Allium cepa* L.) Cultivation», *Agronomy*, vol. 13, n.º 9, p. 2204, ago. 2023, doi: 10.3390/agronomy13092204.
- [78] R. Castro-Camba, C. Sánchez, N. Vidal, y J. M. Vielba, «Plant Development and Crop Yield: The Role of Gibberellins», *Plants*, vol. 11, n.º 19, p. 2650, oct. 2022, doi: 10.3390/plants11192650.

- [79] J. He, P. Xin, X. Ma, J. Chu, y G. Wang, «Gibberellin Metabolism in Flowering Plants: An Update and Perspectives», *Front. Plant Sci.*, vol. 11, p. 532, may 2020, doi: 10.3389/fpls.2020.00532.
- [80] P. Bagale, S. Pandey, P. Regmi, y S. Bhusal, «Role of Plant Growth Regulator “Gibberellins” in Vegetable Production: An Overview», *Int. J. Hortic. Sci. Technol.*, vol. 9, n.º 3, sep. 2022, doi: 10.22059/ijhst.2021.329114.495.
- [81] N. S. H. Madani, M. Shamsaie Mehrgan, S. P. Hosseini Shekarabi, y N. Pourang, «Regulatory effect of gibberellic acid (GA3) on the biomass productivity and some metabolites of a marine microalga, *Isochrysis galbana*», *J. Appl. Phycol.*, vol. 33, n.º 1, pp. 255-262, feb. 2021, doi: 10.1007/s10811-020-02291-1.
- [82] T. Guo *et al.*, «Heat stress mitigation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) through foliar application of gibberellic acid», *Sci. Rep.*, vol. 12, n.º 1, p. 11324, jul. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-15590-z.
- [83] 1Institute of Horticultural Sciences, University of Agriculture, Faisalabad-38040, Pakistan, H. Talat, W. Shafqat, 2Horticultural Research Institute, Ayub Agricultural Research Institute, Faisalabad-38850, Pakistan., y M. A. Qureshi, «EFFECT OF GIBBERELIC ACID ON FRUIT QUALITY OF KINNOW MANDARIN», *J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci.*, vol. 8, n.º 3, pp. 59-63, jul. 2020, doi: 10.22194/JGIASS/8.901.
- [84] K. S. Siddiqi y A. Husen, «Plant response to strigolactones: Current developments and emerging trends», *Appl. Soil Ecol.*, vol. 120, pp. 247-253, nov. 2017, doi: 10.1016/j.apsoil.2017.08.020.
- [85] B. Aquino, J. M. Bradley, y S. Lumba, «On the outside looking in: roles of endogenous and exogenous strigolactones», *Plant J.*, vol. 105, n.º 2, pp. 322-334, ene. 2021, doi: 10.1111/tpj.15087.
- [86] N. Ma, L. Wan, W. Zhao, H. Liu, J. Li, y C. Zhang, «Exogenous strigolactones promote lateral root growth by reducing the endogenous auxin level in rapeseed», *J. Integr. Agric.*, vol. 19, n.º 2, pp. 465-482, feb. 2020, doi: 10.1016/S2095-3119(19)62810-8.
- [87] M. Jamil *et al.*, «*Striga hermonthica* Suicidal Germination Activity of Potent Strigolactone Analogs: Evaluation from Laboratory Bioassays to Field Trials», *Plants*, vol. 11, n.º 8, p. 1045, abr. 2022, doi: 10.3390/plants11081045.
- [88] C. Li, M. Xu, X. Cai, Z. Han, J. Si, y D. Chen, «Jasmonate Signaling Pathway Modulates Plant Defense, Growth, and Their Trade-Offs», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n.º 7, p. 3945, abr. 2022, doi: 10.3390/ijms23073945.
- [89] M. Ghorbel, F. Brini, A. Sharma, y M. Landi, «Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view», *Plant Cell Rep.*, vol. 40, n.º 8, pp. 1471-1494, ago. 2021, doi: 10.1007/s00299-021-02687-4.
- [90] A. H. A. Abeed, M. A. Eissa, y D. A. Abdel-Wahab, «Effect of Exogenously Applied Jasmonic Acid and Kinetin on Drought Tolerance of Wheat Cultivars Based on Morpho-Physiological Evaluation», *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, vol. 21, n.º 1, pp. 131-144, mar. 2021, doi: 10.1007/s42729-020-00348-1.
- [91] J. Noor *et al.*, «Effect of Jasmonic Acid Foliar Spray on the Morpho-Physiological Mechanism of Salt Stress Tolerance in Two Soybean Varieties (*Glycine max* L.)», *Plants*, vol. 11, n.º 5, p. 651, feb. 2022, doi: 10.3390/plants11050651.
- [92] G. Haberer y J. J. Kieber, «Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone», *Plant Physiol.*, vol. 128, n.º 2, pp. 354-362, feb. 2002, doi: 10.1104/pp.010773.

- [93] S. Liu *et al.*, «Cytokinin promotes growth cessation in the Arabidopsis root», *Curr. Biol.*, vol. 32, n.º 9, pp. 1974-1985.e3, may 2022, doi: 10.1016/j.cub.2022.03.019.
- [94] Y. Liu, M. Zhang, Z. Meng, B. Wang, y M. Chen, «Research Progress on the Roles of Cytokinin in Plant Response to Stress», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n.º 18, p. 6574, sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21186574.
- [95] C. Kaya, A. L. Tuna, y A. M. Okant, «Effect of foliar applied kinetin and indole acetic acid on maize plants grown under saline conditions», *Turk. J. Agric. For.*, ene. 2010, doi: 10.3906/tar-0906-173.
- [96] N. B. Mandava, «Plant Growth-Promoting Brassinosteroids».
- [97] G. J. Bishop y C. Koncz, «Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling», *Plant Cell*, vol. 14, n.º suppl 1, pp. S97-S110, may 2002, doi: 10.1105/tpc.001461.
- [98] A. Friebe, A. Volz, J. Schmidt, B. Voigt, G. Adam, y H. Schnabl, «24-Epi-secasterone and 24-epi-castasterone from *Lychnis viscaria* seeds», *Phytochemistry*, vol. 52, n.º 8, pp. 1607-1610, dic. 1999, doi: 10.1016/S0031-9422(99)00209-5.
- [99] M. G. De Los Santos *et al.*, «Fused Pyrroles in Cholestane and Norcholestane Side Chains: Acaricidal and Plant Growth-Promoting Effects», *Molecules*, vol. 27, n.º 23, p. 8466, dic. 2022, doi: 10.3390/molecules27238466.
- [100] L. Zhang *et al.*, «24-Epibrassinolide Enhances Resistance Against *Colletotrichum fructicola* by Promoting Lignin Biosynthesis in *Camellia sinensis* L.»., *J. Plant Growth Regul.*, vol. 42, n.º 3, pp. 1558-1566, mar. 2023, doi: 10.1007/s00344-022-10640-2.
- [101] A. Avalbaev, V. Fedyaev, A. Lubyanova, R. Yuldashev, y C. Allagulova, «24-Epibrassinolide Reduces Drought-Induced Oxidative Stress by Modulating the Antioxidant System and Respiration in Wheat Seedlings», *Plants*, vol. 13, n.º 2, p. 148, ene. 2024, doi: 10.3390/plants13020148.
- [102] L. Balbuena-Hernández, M. Miranda-Arámbula, P. Merino-Montiel, A. Carrasco-Carballo, y J. Sandoval-Ramírez, «22-Oxocholestanes SPGP4 and SPGP8: in Silico and in Vitro Study as Activators of Plant Growth Promotion», *Chem. Biodivers.*, vol. 20, n.º 5, p. e202201243, 2023, doi: 10.1002/cbdv.202201243.