



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA QUÍMICA ORGÁNICA

TESIS

DISEÑO *IN SILICO*, SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN
Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS
1-ESTEROIDALES ESPIROSTÁNICOS Y
22-OXOCOLESTÁNICOS.

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

MC ALAN CARRASCO CARBALLO

DIRECTOR

DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ

ASESOR

DRA. MA. GUADALUPE HERNÁNDEZ LINARES



ABRIL 2022



El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr Jesús Sandoval Ramírez y asesoría de la Dra Ma. Guadalupe Hernández Linares con apoyo de la beca Conacyt con numero de cvu asignado 698207 y condujo a las siguientes publicaciones.

1. Carrasco-Carballo, A.*; Mendoza-Lara, D.F.; Rojas-Morales J.A.; Alatríste V.; Merino-Montiel, P.; Luna, F.; Sandoval-Ramírez, J. In Silico Study of Coumarins Derivatives with Potencial Use in Systemic Diseases. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **2022**, 12 (2), aceptado.
2. Lopez-Castillo, G. N.; Alatríste, V.; Sandoval-Ramírez, J.; Luna, F.; Carrasco-Carballo, A.* Molecular Docking Studies of Spirostans As MAPK14 (P38 α) Inhibitors and Their Potential Use Against Cancer. *Journal of Molecular Docking*, **2021**, 1(2), 59-67. <https://doi.org/10.33084/jmd.v1i2.2904>
3. Carrasco-Carballo, A.*, Marín-Merino, E. , Merino-Montiel, P. , Colin-Lozano, B. , Hilerio, S. , Hilario-Martínez, J. and Sandoval-Ramírez, J. (2021) Steroidal Plant Growth Promoters vs. Phytopathogens, via Enzymatic Regulation; An in Silico Approach. *Advances in Enzyme Research*, **2021**, 9, 55-71. <https://doi.org/10.4236/aer.2021.94006>
4. Carrasco-Carballo, A., Hernández-Linares, M. G., Cárdenas-García, M., Sandoval-Ramírez, J. Synthesis and biological in vitro evaluation of the effect of hydroxyimino steroidal derivatives on breast cancer cells. *Steroids*, **2021**, 166, 108787. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108787>.



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Jorge R. Juárez Posadas, Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León, Dra. Penélope Merino Montiel, Dr. Armando Ariza Castolo y el Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Diseño in silico, síntesis, caracterización y evaluación biológica de derivados i-esteroidales espiroestánicos y 22-oxocolestánicos”**, que presenta el alumno **M.C. Alán Carrasco Carballo** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintiocho días del mes de marzo del año dos mil veintidós.

ATENTAMENTE

Dr. Jorge R. Juárez Posadas

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Dra. Penélope Merino Montiel

Dr. Armando Ariza Castolo

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

DEDICATORIA

A la familia Carrasco-Carballo en especial a José Ángel Carrasco Carballo que nunca te detengas hasta conseguir todo lo que te propongas.

A todos los integrantes del Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr, Jesús Sandoval Ramírez, por ser un mentor, un guía, por todos los conocimientos vertidos no solo en ciencias, sino en cultura y política para formar un conocimiento integral, pero sobre todo por la confianza que he ha otorgado en todo este proceso y en todos los proyecto y libertad de proponer, retroalimentar y discutir nuevos caminos posible en la ciencia.

Al M en C Felix Luna Morales por todo el conocimiento que ha compartido, por todas las explicaciones de bioquímica que siempre me compartió y por apoyarme en todo este y otros proyectos.

Al comité tutorial y comisión revisora, Dr Armando Ariza Castolo, Dra. Penélope Merino Montiel, Dr. J. Jesús Martin Torres Valencia, Dr I. Daniel Limón Pérez de León y Dr Jorge R. Juárez Posada, por todas las revisiones, comentarios, retroalimentaciones y paciencia otorgada en el desarrollo y culminación de este trabajo y sobre todo por siempre estar dispuestos a apoyarme en las dudas que surgían.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por abrirme las puertas y convertirse en mi casa de estudio e investigación.

A todo el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica por acompañarme en este proyecto y todos los que se realizan en el laboratorio.

A Guiee Niza, por ser mi amiga, hermana, confidente estar conmigo siempre, incluso cuando solo son mis ideas locas.

A los estudiantes de Posgrado LESQO y amigos, Alberto, Mónica, Daniel y David que me acompañaron en todo este proyecto.

Índice General

Abreviaturas.....	XII
Resumen	XIII
Abstract.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	7
Objetivo General.....	8
Objetivos Particulares.....	8
CAPÍTULO 1. POTENCIAL IN SILICO	9
1.1 Antecedentes	10
1.2 Metodología.....	15
1.2.1 Determinación de potencial estructural	15
1.2.2 Docking Molecular	16
1.2.3 Análisis ADMET	17
1.3 Potencial estructural mediante análisis de STP y PASS Online	18
1.4 Potencial por docking molecular	24
1.4.1 Potencial anticancerígeno	24
1.4.2 Potencial antiinfeccioso.....	30
1.4.3 Potencial contra enfermedades sistémicas.....	36
1.4.4 Potencial contra enfermedades neurodegenerativas	39
1.4.5 Potencial promotor de crecimiento vegetal	42
1.5 Propiedades ADMETx.....	43
1.6 Productos secundarios.....	46
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN Y MECANISMOS	51
2.1 Antecedentes	52
2.2 Metodología.....	56
2.2.7 Apertura de las sapogeninas esteroidales.	61
2.3 Derivados i-esteroidales espiroestánicos	63
2.4 Derivados i-esteroides 22-oxocolestánicos.....	81
2.5 Subproductos de reacción	87
CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA	91

3.1	Efecto promotor de crecimiento vegetal	94
3.1.1	Antecedentes.....	94
3.1.2	Metodología.....	96
3.1.3	Efecto PCV	98
3.2	Efecto antibiótico y antifúngico.....	101
3.2.1	Antecedentes.....	101
3.2.2	Metodología.....	104
3.2.3	Efecto ATB y antifúngico.....	105
3.3	Efecto anticancerígeno.....	107
3.3.1	Antecedentes.....	107
3.3.2	Metodología.....	110
3.3.3	Efecto antiproliferativo.....	111
	CONCLUSIONES.....	113
	ANEXOS	116
	BIBLIOGRAFÍA	119

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de reacción para determinar el potencial de los i-esteroides	XIV
Figura 2. Reaction scheme to determine the potential of i-steroids.	1
Figura 3. Primeras estructuras esteroidales aisladas.....	3
Figura 4. Esteroides con actividad biológica en los diversos reinos.	4
Figura 5. Ejemplos de esteroides comúnmente descritos en la literatura.	5
Figura 6. Obtención y aplicación de derivados i-esteroidales.	5
Figura 7. Proceso de diseño de un fármaco con el uso de herramientas bioinformáticas. ...	10
Figura 8. Estructuras analizadas in silico e in vivo con efecto contra el SARS-CoV-2.....	11
Figura 9. Plataformas y Software de mayor uso en el diseño dirigido de fármacos.	12
Figura 10. Análisis interaccional y estudio in silico.....	12
Figura 11. Moléculas diseñadas in silico con efecto benéfico en plantas.	14
Figura 12. Etapas críticas del estudio in silico de los derivados i-esteroidales.	15
Figura 13. Modificaciones estructurales de los anillos A y B para su estudio in silico.	18
Figura 14. Diagrama de frecuencia porcentual de las estructuras diseñadas.	18
Figura 15. Diagramas de frecuencia de interacción clasificados por su función en C-3.....	19
Figura 16. Frecuencia parcial para los derivados i-esteroidales 22-Oxocolestanicos en STP.	20
Figura 17. Dianas con Pa promedio > 0.2, como conjunto de moléculas.	21
Figura 18. Diagrama de potencial comparado de actividad biológica.	23
Figura 19. Grupos de blancos moleculares por clase ATC utilizados para docking molecular.	24
Figura 20. Diagramas de interacción 2D comparativo de los i-esteroides vs $3\beta\Delta 5$ en CA9 y PDGFR.	26
Figura 21. Diagrama 2D de interacción de la CYP11A1 y la CA9.....	27
Figura 22. Análisis 3D de sitios activos: a) CYP11A1, b) CYP21A2, c) CA9, d) CA12, e) FR y f) FGFR.....	28
Figura 23. Interacciones 2D de moléculas selectivas con su respectiva proteína.	29
Figura 24. Diagrama 2D de interacción en la integrasa HIV.	31
Figura 25. Diagrama 2D de interacción en la transcriptasa HIV	32
Figura 26. Interacciones 2D y 3D con la Pseudomonas aeruginosa Penicillin-Binding Protein 3.....	33
Figura 27. Interacciones 2D con la CYP51 de Candida A.	34
Figura 28. Interacciones 2D de moléculas multifuncionales con su respectiva proteína.	36
Figura 29. Diagrama 2D de interacción en el receptor de mineralocorticoides.	37
Figura 30. Diagrama 2D de interacción de estructuras con potencial contra enfermedades sistémicas.....	38
Figura 31. Análisis de interacciones 2D en la quinona reductasa tipo 1.	40
Figura 32. Análisis de interacciones 2D en la acetilcolinesterasa.	40
Figura 33. Diagrama 2D de estructuras multifuncionales esteroidales.	41
Figura 34. Diagrama 2D de interacción con potencial promotor de crecimiento vegetal. ...	43
Figura 35. Predicciones de toxicidad por PASS Online.....	44

Figura 36. Esquema de productos secundarios obtenidos.	46
Figura 37. Blancos moleculares específicos de los productos secundarios.	47
Figura 38. Diagrama 2D de moléculas con potencial anticancerígeno	49
Figura 39. Diagrama 2D de moléculas con potencial antiinfeccioso.	50
Figura 40. Diagrama 2D de moléculas con potencial promotor de crecimiento vegetal	50
Figura 41. Esquema general de la obtención de i-esteroides.	52
Figura 42. Esquema de modificaciones del ergosterol vía i-esteroides.	53
Figura 43. Esquema de modificaciones del pseudocolesterol 60	53
Figura 44. Esquema de obtención de desmosterol a partir de estigmasterol	54
Figura 45. Esquema obtención de 24-epibrasinólida a partir de ergosterol vía i-esteroides	55
Figura 46. Esquema de reacción del uso de los i-esteroides como intermediarios protectores.	55
Figura 47. Esquema de síntesis de análogos 7-oxigenados esteroidales de Brasinoesteroides.	56
Figura 48. Estructuras utilizadas como materias primas.	58
Figura 49. Esquema de reacción de tosilación en C-3.	58
Figura 50. Esquema de formación de i-esteroides en C-3.	59
Figura 51. Esquema de oxidación en C-6.	59
Figura 52. Estructura del subproducto de la oxidación de 3d.	60
Figura 53. Reacción de apertura del espiroacetal de i-esteroides.	60
Figura 54. Subproductos de la apertura de 4.	61
Figura 55. Reacción de apertura del espiroacetal.	61
Figura 56. Esquema de protección oxidación desprotección.	62
Figura 57. Subproducto de la oxidación de 7d	62
Figura 58. Esquema de obtención de derivados i-esteroidales.	63
Figura 59. Espectros de RMN- ¹ H a 500 MHz de las estructuras 1a-d	65
Figura 60. Espectros de RMN- ¹³ C a 125 MHz de las estructuras 1a-d	66
Figura 61. Expansiones de espectros de HMBC y HSQC característicos de 1a y 1c	67
Figura 62. Espectro HMBC y HSQC de 1b y 1d	68
Figura 63. Esquema de reacción de tosilación de espirostanos.	69
Figura 64. Espectros de RMN- ¹ H de 500 MHz de tosilatos espirostánicos.	70
Figura 65. Esquema de formación del i-esteroide.	71
Figura 66. Mecanismo de reacción de formación de i-esteroides.	72
Figura 67. Diagrama energético de avance de reacción para la formación de i-esteroides. ..	72
Figura 68. Espectro de RMN- ¹ H a 500 MHz de derivados i-esteroidales.	74
Figura 69. Expansión de HSQC del derivado 3a	75
Figura 70. Expansión de HMBC del derivado 3a	76
Figura 71. Expansión de HMBC del derivado 3a	77
Figura 72. Esquema de oxidación en C-6 de i-esteroides.	77
Figura 73. Espectros de RMN- ¹ H a 500 MHz de los derivados 4a-d	79
Figura 74. Expansiones de HSQC de derivados 4a	80
Figura 75. Expansión de HMBC del 4a	80
Figura 76. Esquema de reacción de apertura de espirostanos 1a-d	81

Figura 77. Espectros de RMN de RMN- ¹ H a 500 MHz de 5a-c	82
Figura 78. Espectro HSQC de 5a	83
Figura 79. Espectro HMBC de 5d	83
Figura 80. Esquema de reacción de apertura de espirostanos 4a-d	84
Figura 81. Espectros de RMN- ¹ H a 500 MHz de 8a-d	85
Figura 82. Esquema de ruta alternativa para la síntesis de 8a-d	86
Figura 83. Esquema de oxidación de 3d	87
Figura 84. Comparación de espectros de RMN- ¹ H a 500 MHz de 4d y 9d	88
Figura 85. Esquema de apertura de derivados 8a-d	88
Figura 86. Espectros de RMN- ¹ H de 10a	89
Figura 87. Espectro de RMN- ¹ H a 500 MHz de 11d	89
Figura 88. Espectro de RMN- ¹ H a 500 MHz de 9d	90
Figura 89. Esquema de reacción con subproductos principales obtenidos.....	92
Figura 90. Prueba de estabilidad en función del pH a dos tiempos de exposición.....	92
Figura 91. Equilibrio tautomérico 8d - 12d y 4d - 9d	93
Figura 92. Efecto en la estabilidad de la temperatura.....	93
Figura 93. Principales tipos de fitohormonas.....	94
Figura 94. Síntesis de los análogos 104, 105, 108 y 109 de la brasinólida.....	95
Figura 95. Esquema de síntesis de análogos de BS con la cadera fluorada.....	95
Figura 96. Ejemplos de modificaciones con efecto anti-estrés en plantas.....	96
Figura 97. Estructuras seleccionadas para evaluación promotora de crecimiento vegetal... ..	98
Figura 98. Efecto en la velocidad de germinación de los PCV.....	100
Figura 99. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides en bacterias y hongos.....	101
Figura 100. Esteroides antibióticos catiónicos.....	102
Figura 101. Corticoesteroides utilizados como antibióticos.....	102
Figura 102. Sales de imidazol esteroidales antifúngicas y antibióticas.....	103
Figura 103. Esteroides modificados en C-21 con efecto contra fitopatógenos.....	103
Figura 104. Saponinas con efecto antifúngico.....	104
Figura 105. Estructuras seleccionadas para evaluación antifúngica y antibacteriana.....	105
Figura 106. Síntesis de glucolaxogenina con actividad anticancerígena.....	108
Figura 107. Derivados de estradiol con actividad anticancerígena en cáncer de mama. ...	108
Figura 108. Derivados esteroidales azufrados y nitrogenados con actividad anticancerígena	109
Figura 109. Síntesis de compuestos furosténicos anticancerígenos.....	109
Figura 110. Fármacos anti-estrogénicos contra el cáncer.....	110
Figura 111. Estructuras evaluadas como anticancerígenos.....	111

Índice de tablas

Tabla 1. Derivados esteroidales diseñados in silico y su efecto biológico.....	13
Tabla 2. Prueba Mann-Whitney de selectividad de dianas objetivas	19
Tabla 3. Análisis estadístico de actividad clasificada por grupos de moléculas, por PassOnline.	22
Tabla 4. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Kruskal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia con blanco molecular anticancerígenos.	25
Tabla 5. Moléculas con mayor EA que los fármacos, ligandos, sustratos o inhibidores de referencia.	28
Tabla 6. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Krukal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia contra blancos moleculares antiinfecciosos.	30
Tabla 7. Moléculas con potencial antiviral.....	32
Tabla 8. Moléculas con potencial antifúngico y antibiótico.....	35
Tabla 9. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Krukal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia con cada blanco molecular contra enfermedades sistémicas.	37
Tabla 10. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Krukal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia con cada blanco molecular contra enfermedades neurodegenerativas.	39
Tabla 11. Estructuras con efecto contra enfermedades neurodegenerativas.	41
Tabla 12. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Krukal Wallis, comparados con ligando y promotor de referencia.....	42
Tabla 13. Análisis de comparación por KW de parámetros ADMETx por Qikprop	45
Tabla 14. Nuevo potencial in silico de docking molecular de productos secundarios.	48
Tabla 15. Efecto del disolvente, tiempo y base en la tosilación en C-3.	69
Tabla 16. Análisis del efecto en el rendimiento de la base utilizada en la formación de i-esteroides.	73
Tabla 17. Análisis del oxidante y tiempo de oxidación en C-6 de i-esteroides.....	78
Tabla 18. Rendimiento de obtención de 22-oxocolestano i-esteroidal.....	84
Tabla 19. Análisis de rendimiento de obtención de derivados 8 vía ruta alterna.	87
Tabla 20. Análisis de resultados del efecto de la inclinación de la lámina de arroz.	98
Tabla 21. Efecto en el alargamiento del segundo entrenudo de frijol	99
Tabla 22. Efecto de relación inhibitoria para bacterias de los compuestos evaluados comparado con los fármacos de referencia.....	106
Tabla 23. Efecto antifúngico de las moléculas de estudio comparadas con el fluconazol.	107
Tabla 24. IC ₅₀ (μg/mL) de los compuestos evaluados en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino.	112

Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
PCV	Promotor de crecimiento vegetal	STP	Swiss Target Prediction
ATB	Efecto antibiótico	ADMET	Administración, distribución metabolismo, excreción y toxicidad
CA9	Anhidrasa Carbónica 9	CA12	Anhidrasa Carbónica 12
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana	PAPB	Proteína de unión a penicilinas de <i>P. aeurogenosa</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear	KW	Kruskall Wallis
IC₅₀	Concentración inhibitoria media	EC₅₀	Concentración de inhibición enzimática media
SOP	Síndrome de Ovario Poliquístico	KPC2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase-2
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship	AFB5	auxin F-Box 5
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media	MANOVA	Análisis multivariante de la varianza
PDGFR	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	p110α	The phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
SaFab	Integrina Staphylococcus aureus	NMDA	N-metil D-Aspartato
QNR1	Quinona Reductasa tipo 1	MAOA	Monoamino oxidasa A
AChE	Acetil Colinesterasa	HERG	Human Ether-à-go-go-Related Gene
TFFA	Anhidrido trifluoroacetico	NBS	N-Bromo Succimida
MdM-2	Murine doble minute 2	BACE1	β -secreteasa tipo 1
AIA	Ácido indolacetico	GA3	Ácido giberilínico 3

Resumen

La investigación de los derivados *i*-esteroidales se han enfocado principalmente a su aplicación como intermediarios de reacción para la adición de nucleófilos en C-6 o la modificación del grupo en C-3, pero no hacia su actividad biológica. Por lo que representa un campo de investigación. El uso de herramientas bioinformáticas (SwissTargetPrediction, PASS online, QikProp y Docking molecular) permitió determinar potencial biológico, en particular en 5 áreas: (1) como anticancerígenos los derivados *i*-esteroidales espiroestánicos (**4a-d**) presentaron buena actividad; (2) contra enfermedades neurodegenerativas los 3 β -espirostanoles (**1**, **3** y **4**) exhibieron bioactividad; (3) contra tres tipos de enfermedades infecciosas se demostró potencial actividad; para enfermedades virales los derivados 22-oxocolestánicos *i*-esteroidales (**3**, **4** y **8**) resultaron tener mayor potencial, mientras que para enfermedades de infección bacteriana y fúngica, los derivados *i*-esteroidales presentaron mejor energía de acoplamiento sin relevancia de la cadena lateral, vía inhibición de la CYP51 y la KPC2, (4) contra enfermedades sistémicas como el SOP y síndrome metabólico destacando los derivados espirostanicos. Finalmente, (5) como promotores de crecimiento vegetal (PCV) fueron los 22-oxocolestanos (**5**, **7**, **8** y **10**) los de mayor potencial vía activación del gen BRI1 y el receptor de jasmonatos, con base a los excelentes resultados *in silico*, se procedió a sintetizar los derivados seleccionados (Figura 1).

Las dos rutas propuestas condujeron a los productos **9d**, **10a-d**, **11d** y **12d** cuya bioactividad fue evaluada *in silico* e *in vivo*, encontrando que el derivado **7a** es dos veces más potente como PCV que las fitohormonas utilizadas como referencia. Los resultados de los ensayos como agentes antiinfecciosos de los compuestos *i*-esteroidales **4a**, **4b**, **8a** y **8b** mostraron valores de la magnitud del fluconazol y la amoxicilina, mientras que en los ensayos antiproliferativos frente a células cancerosas de mama y de cervix los derivados *i*-esteroidal 22-oxocolestánicos **3b**, **10b** y **10d** presentaron valores de IC₅₀ menores a la del cisplatino. Estos datos ponen de manifiesto el gran potencial biológico de los *i*-esteroides. Las rutas sintéticas permitieron acceder a los compuestos con potencial biológico predicho *in silico*, encontrando relación directa entre los cálculos teóricos y la actividad biológica, es decir, los derivados *i*-esteroidales son un campo nuevo para el diseño de nuevos agentes biológicamente activos.

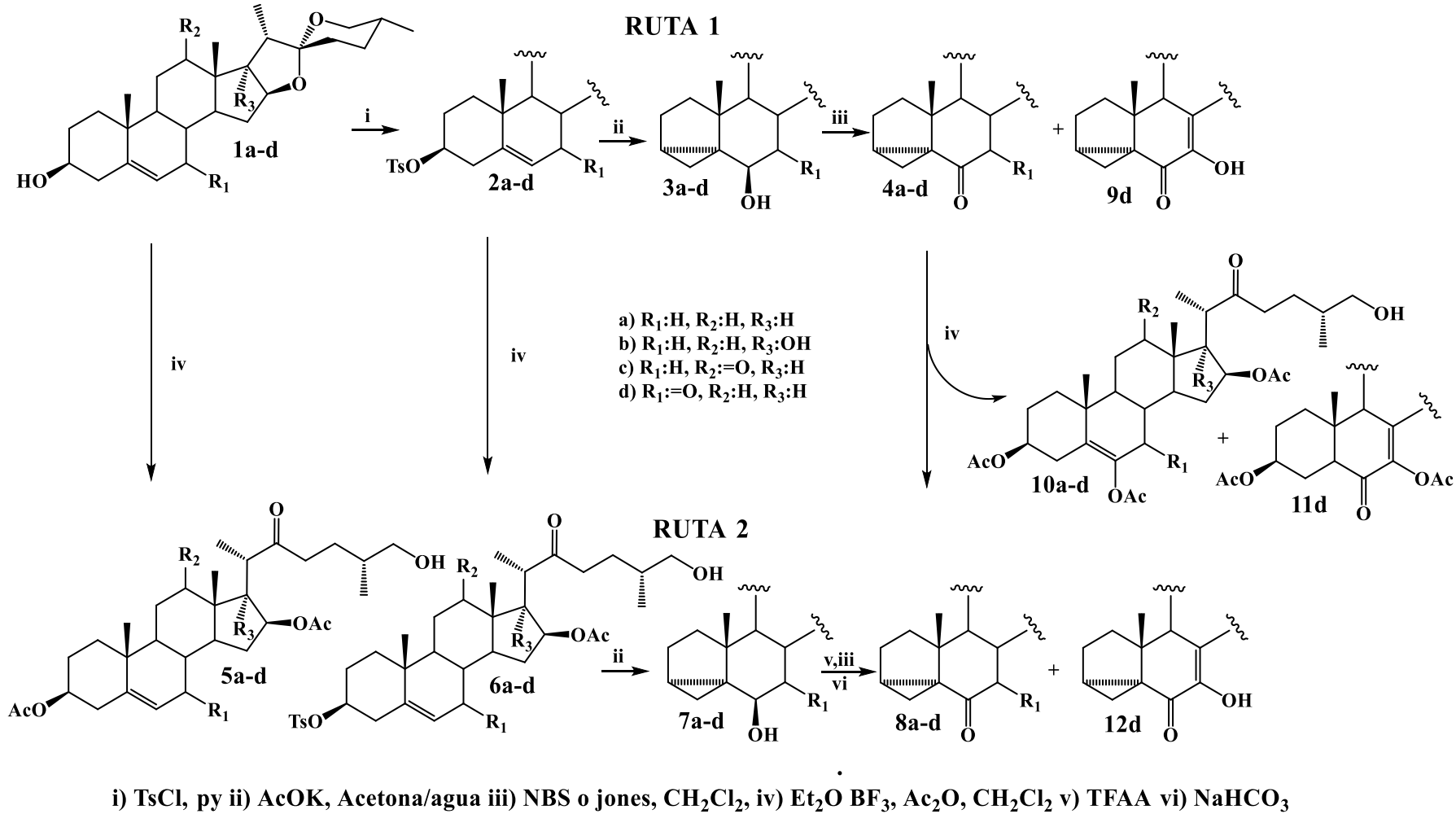


Figura 1. Esquema de reacción para determinar el potencial de los i-esteroides

Abstract

Research on *i*-steroidal derivatives has focused mainly on their application as reaction intermediates for nucleophile addition at C-6 or group modification at C-3, but not on their biological activity. So it represents a field of research. The use of bioinformatic tools (SwissTargetPrediction, PASS online, QikProp and Molecular Docking) made it possible to determine biological potential, particularly in 5 areas: (1) *i*-steroidal spirostane derivatives (4a-d) had good anticancer activity; (2) against neurodegenerative diseases the 3 β -spirostanols (1, 3 and 4) exhibited bioactivity; (3) against three types of infectious diseases, potential activity was demonstrated; for viral diseases, the *i*-steroidal 22-oxocholestan derivatives (3, 4 and 8) turned out to have greater potential, while for bacterial and fungal infection diseases, the *i*-steroidal derivatives presented better coupling energy without relevance of the side chain, via inhibition of CYP51 and KPC2, (4) against systemic diseases such as PCOS and metabolic syndrome, highlighting spirostane derivatives. Finally, (5) as plant growth promoters (PCV) were the 22-oxocholestanes (5, 7, 8 and 10) the ones with the greatest potential via activation of the BRI1 gene and the jasmonate receptor, based on the excellent *in silico* results, the selected derivatives were synthesized (Figure 2).

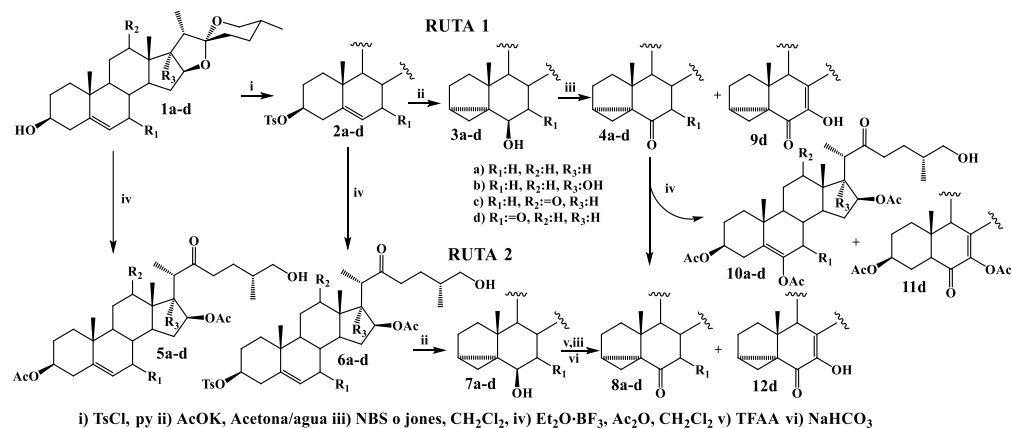


Figure 2. Reaction scheme to determine the potential of *i*-steroids.

The two proposed routes led to products 9d, 10a-d, 11d and 12d whose bioactivity was evaluated *in silico* and *in vivo*, finding that derivative 7a is twice as potent as PCV than the phytohormones used as reference. The results of the tests as anti-infective agents of the *i*-steroidal compounds 4a, 4b, 8a and 8b showed values IC₅₀ of the magnitude of fluconazole and amoxicillin, while in the antiproliferative tests against breast and cervix cancer cells the derivatives *i*-steroidal 22-oxocholestanes 3b, 10b and 10d presented IC₅₀ values lower than that of cisplatin. These data highlight the great biological potential of *i*-steroids. Synthetic routes allowed access to compounds with biological potential predicted *in silico*, finding a direct relationship between theoretical calculations and biological activity, that is, *i*-steroidal derivatives are a new field for the design of new biologically active agents.

INTRODUCCIÓN

Los esteroides ha sido objeto de estudio desde el siglo XVIII al ser identificados en grasas no saponificables de tejido animal y en la bilis animal y humana, aunque ese momento no se logró elucidarlos estructuralmente. Así se aisló por primera vez al colesterol (**13**) y a los ácidos biliares **14-16** (Figura 3). El proceso de identificación fue difícil principalmente por la falta de técnicas adecuadas de caracterización, pero finalmente con las investigaciones de Dorothy Crowfoot en cristalografía, se llegó a elucidar totalmente las primeras estructuras esteroideas y, en particular, establecer la estereoquímica del núcleo base el ciclopenta(α)fenantreno. Louis Fieser-Mary Fieser [1–3] analizaron y organizaron la información sobre esteroides en la primera mitad del siglo XX. Posteriormente se publicó una revisión sobre la información sobre esteroides en 1970 y 1971 [4,5]. La IUPAC publicó en 1989 reglas de nomenclatura para esteroides [6] y con ello se suprimió la costumbre de dar nombres triviales a los compuestos.

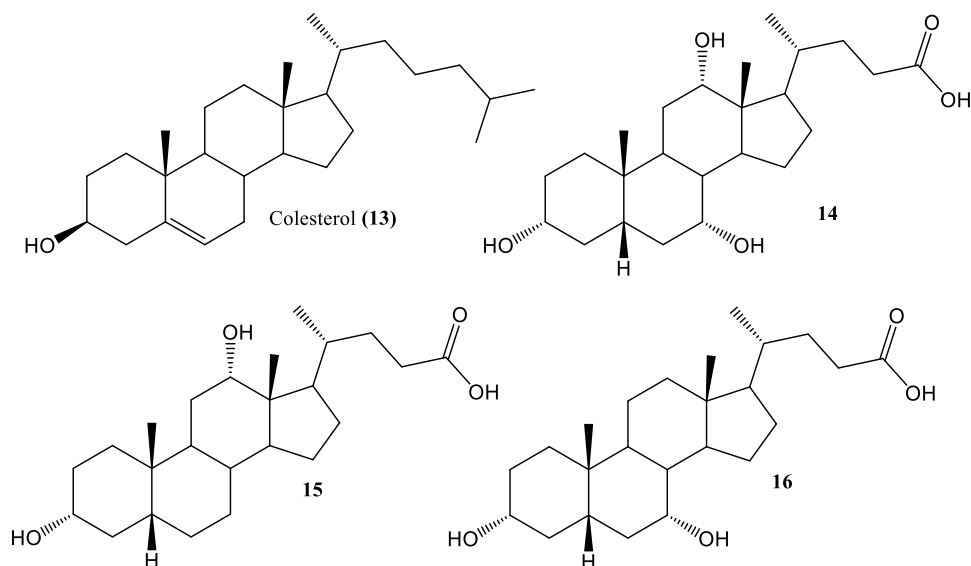


Figura 3. Primeras estructuras esteroideas aisladas.

Como es de esperarse, los esteroides se encuentran en todo el reino animal, a nivel estructural en la pared celular, como estructura de los liposomas, así como a nivel funcional, destacando el sistema endocrino principalmente en el sistema esteroideogénico. Los esteroides no son exclusivos del reino animal, también están presentes en el reino *fungi*, en donde predomina la estructura del ergosterol en la pared celular; similar función muestra el ergosterol en las bacterias. Los esteroides también están presentes en el reino *plantae*, aunque en estos últimos su función es más compleja y se les encuentra en la estructura del tejido vegetal, en hormonas de crecimiento, en la diferenciación o elongación celular. Dentro de las diversas funciones que realizan, está la defensa contra plagas y contra otros tipos de estrés biótico y abiótico. Se encuentran ampliamente distribuidas en este reino, adquiriendo grandes cambios estructurales según la especie e inclusive entre variedades de éstas. Además de tener

funciones específicas en los organismos vegetales, éstos han demostrado tener actividad biológica contra patologías humanas. Los esteroides en la especie humana tienen diversas funciones, contra enfermedades cardíacas, anticancerígenos, antibióticos, anti-inflamatorios, (Figura 4) lo que deja en claro el gran potencial de los esteroides como objeto de estudio y aplicación [7–14].

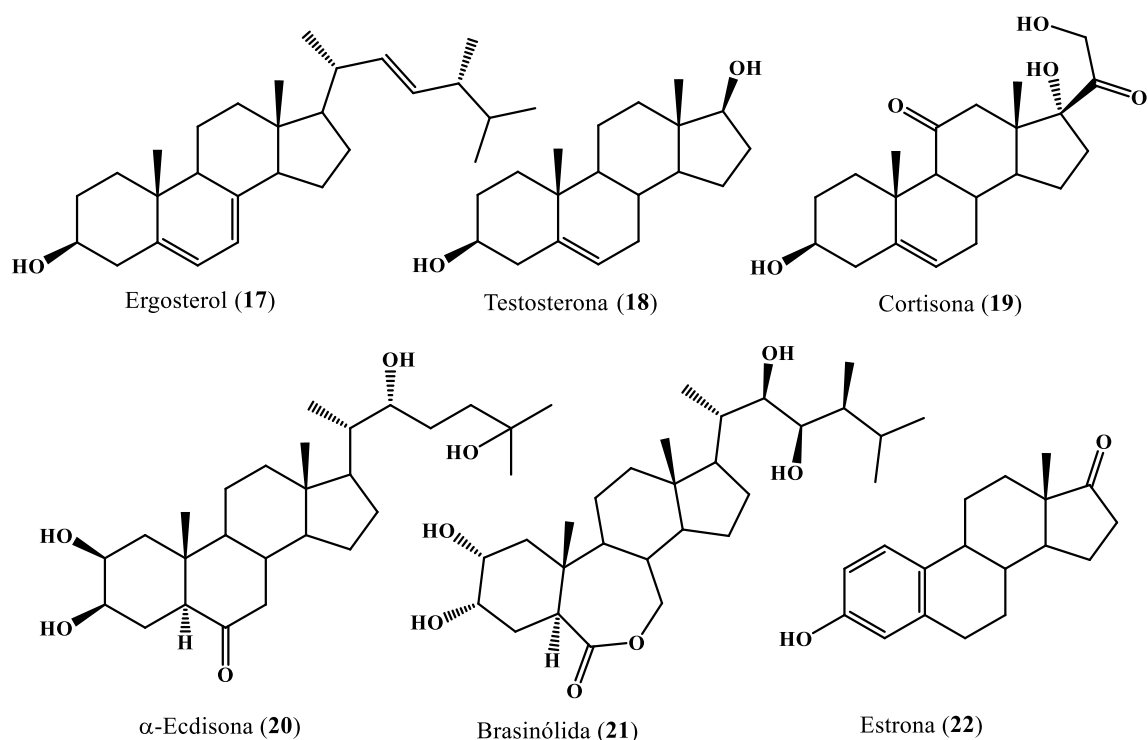


Figura 4. Esteroides con actividad biológica en los diversos reinos.

Aun con la gran relevancia de los esteroides no existe una clasificación específica de ellos, dado que el origen es multivariado e inclusive algunas estructuras se encuentran en diversos reinos, con función diferente. A nivel estructural, en principio se les ha clasificado tomando en cuenta el esqueleto tetracíclico y la estructura de la posible cadena lateral, pero derivado de la definición establecida en la regla 3S-1.0 [6], se toman en cuenta modificaciones por adición, eliminación o ruptura de enlaces, como se aprecia en los compuestos mostrados en la Figura 5.

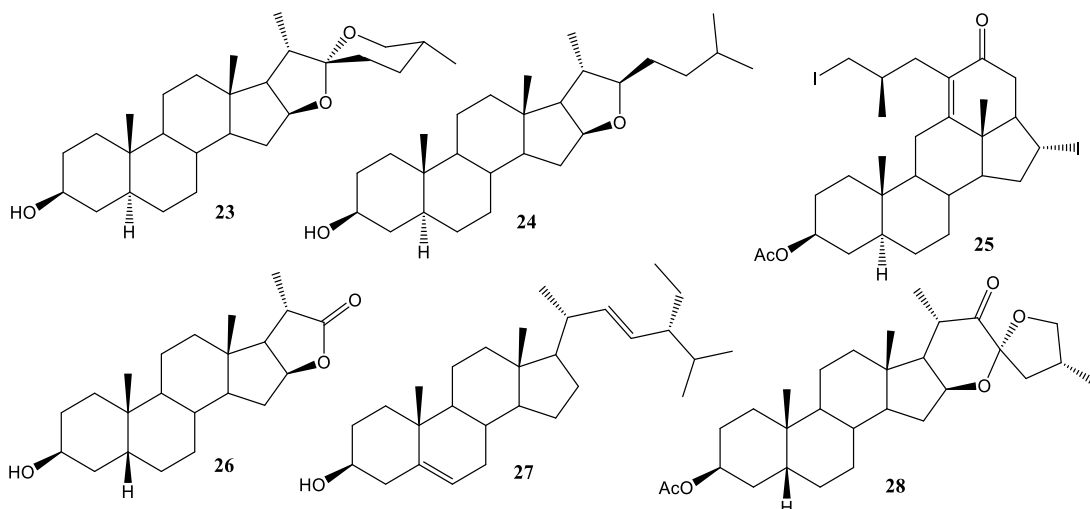


Figura 5. Ejemplos de esteroides comúnmente descritos en la literatura.

Dentro de toda gran variedad existe un grupo de esteroides particular que ha sido utilizado únicamente como intermediario sintético, los *i*-esteroides. Éstos se caracterizan por la formación de un enlace entre C-3 y C-5, dando a la formación de un biciclo [3.1.0], biciclo bastante estable a pesar de que se le asigna una gran tensión en el anillo ciclopropanico. A los *i*-esteroides se les ha sintetizado por diversas rutas, principalmente partiendo de estructuras que contienen un grupo tosilato en la posición 3β y un doble enlace Δ^5 . En la práctica, el anillo ciclopropanico tiene un comportamiento que semeja a un doble enlace y por tanto es posible realizarle adiciones en medio ácido. Así, es factible también la obtención de *i*-esteroides que contienen un grupo nucleófilo en C-6, como aminas, alcoholes, éteres, azidas, nitrilos, entre otros (Figura 6) [15–17].

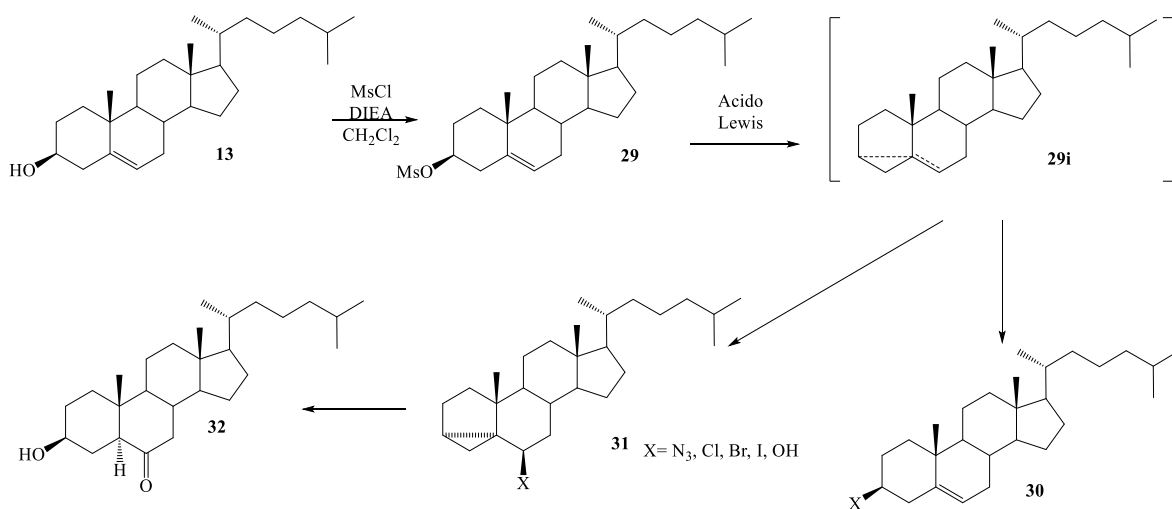


Figura 6. Obtención y aplicación de derivados *i*-esteroidales.

Si bien su potencial sintético es destacable, de su potencial o efecto biológico hasta nuestro conocimiento, no existen reportes en la bibliografía, lo cual se podría deber que en condiciones fisiológicas no es estable o únicamente se han empleado como intermediarios sintéticos. De ello surge un tema de investigación para determinar su efecto biológico, pero el estudiar biológicamente un compuesto así como llevar a cabo su síntesis son procesos que involucran el consumo de recursos, así como el uso de material biológico que requiere considerar las reglas bioéticas, por lo que en este caso las herramientas bioinformáticas surgen como alternativa en el diseño experimental, con el fin de optimizar los recursos al momento de estudiar una línea de investigación, siendo el enfoque del presenta trabajo, hacia el uso de herramientas bioinformáticas para determinar el potencial teórico de los i-esteroides y proceder a una síntesis y caracterización dirigida, continuando con una evaluación biológica en modelos adecuados y finalmente el estudio de correlación entre las tres etapas (estudio *in silico*, síntesis y evaluación biológica) .

OBJETIVOS

Objetivo General

Diseñar *in silico*, sintetizar, caracterizar y evaluar biológicamente derivados i-esteroidales espirostánicos y 22-oxocolestánicos, para determinar su aplicación biológica.

Objetivos Particulares

1. Determinar *in silico* el potencial de los derivados i-esteroidales espirostánicos y 22-oxocolestánicos mediante STP y PASS online.
2. Evaluar la energía de acoplamiento, interacciones y selectividad de los derivados i-esteroidales en dianas asociadas a sistema animal, vegetal, bacteriológico y fúngico.
3. Sintetizar y caracterizar física y espectroscópicamente los derivados i-esteroidales espirostánicos y 22-oxocolestánicos.
4. Analizar y proponer los mecanismos de reacción que expliquen la obtención de los derivados i-esteroidales y subproductos para la optimización de reacción.
5. Evaluar el efecto biológico sobre modelo de cáncer, antifúngico, antibiótico y promotor de crecimiento vegetal de derivados seleccionados en la fase *in silico*.
6. Establecer una correlación entre la actividad biológica y los resultados obtenidos de acoplamiento molecular con respecto a la estructura.

CAPÍTULO 1. POTENCIAL IN SILICO

1.1 Antecedentes

En la última década las herramientas bioinformáticas han sido objeto de estudio y aplicación con la finalidad de explicar interacciones moleculares como enzimas/sustratos, ligandos/receptores, proteína/proteína e inclusive proteína/ácidos nucleicos, esto a fin de obtener información de los procesos bioquímicos desde nivel celular hasta nivel sistémico, para explicar fenómenos de cascadas de señalización, rutas metabólicas e inclusive mecanismo de acción de fármaco [18,19]. Pero esta herramienta no solo se limita a la explicación de mecanismo, recientemente se ha utilizado para el diseño orientado de fármacos, proceso que ha revolucionado completamente la ruta normal de diseño, investigación y evaluación de un candidato a fármaco (Figura 7) [20–22].

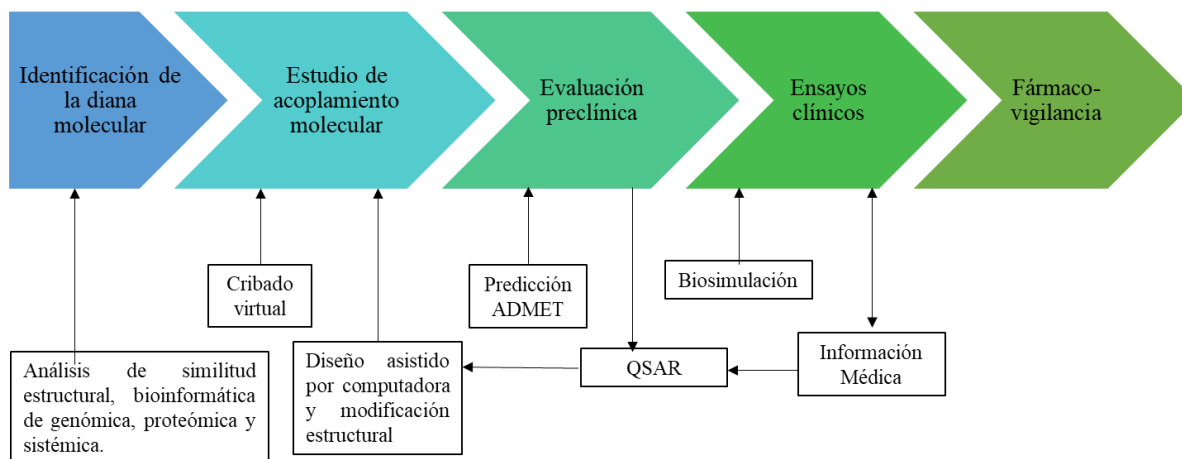


Figura 7. Proceso de diseño de un fármaco con el uso de herramientas bioinformáticas.

Un ejemplo claro en la actualidad es referente al SARS-CoV-2, virus que ha originado la pandemia actual. Se ha estudiado tanto el mecanismo de proliferación viral como el proceso de unión/invasión de este y se han encontrado una gran cantidad de blancos moleculares para el diseño y reposicionamiento de fármacos. Un ejemplo claro es mediante el diseño de inhibidores de la proteasa M^{PTO} del virus, la cual se encarga del proceso de replicación viral. Utilizando una base de datos de productos naturales, se encontró que flavonoides (33, 34), triterpenos, esteroides y sesquiterpenos (35) (Figura 8) presentan potencial inhibidor, y mediante estudios *in vitro* se encontró una inhibición a bajas dosis ($EC_{50} < 10 \mu\text{M}$) corroborando lo obtenido *in silico*; esto ha llevado al uso de inteligencia artificial a fin de encontrar farmacóforos específicos para el diseño de nuevos candidatos. Aunque no es diseño de *novo*, el reposicionamiento de fármacos también ha mostrado resultados prometedores contra el sistema de acoplamiento Spike/ACE2 encargado de la invasión viral, destacando casos como la cloroquina, la ribavirina, la amodiaquina y la digoxina (Figura 8), con un

efecto inhibitor con $EC_{50} < 5 \mu M$, con la ventaja de que cuenta ya con estudios clínicos de toxicidad [23–26].

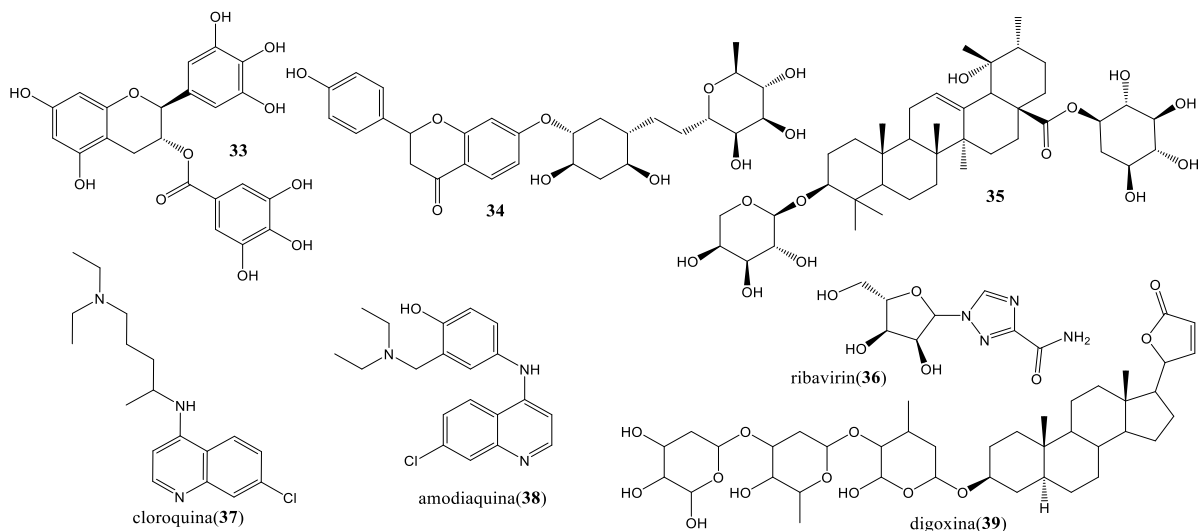


Figura 8. Estructuras analizadas *in silico* e *in vivo* con efecto contra el SARS-CoV-2.

Cabe destacar que el uso de las herramientas bioinformáticas no solo se ha utilizado contra el SARSCoV2. En la literatura utilizando como buscador “*in silico drugs design*” en ACS Publications, en ScienceDirect y en Google académico se presenta una gran cantidad de trabajos, los cuales datan desde 1978, aunque con un notable incremento en los últimos 5 años, principalmente contra enfermedades como cáncer, disfunción endotelial, neurodegenerativas, infecciones parasitarias y bacterianas, fúngicas y virales, dando lugar a nuevas terapias y/o a la eliminación de estas debido al descubrimiento teórico de efectos secundarios [27–31]. El gran potencial y uso de estas herramientas ha dado lugar a diversas plataformas y programas con el fin de facilitar el estudio y poner a disposición bases de datos de estructuras para estudio (Figura 9). Estos se pueden dividir en varios grupos; el primero que se dedica a la determinación de potencial biológico por similitud estructural. Estos analizan fragmentos de la estructura propuesta y devuelve una lista de posibles dianas de interacción, así como posibles efectos secundarios dado dicha similitud estructural o presencia de farmacóforos, destacando las plataformas PassOnline de Way2Drug y SwissTargetPrediction del SIB, que cuentan con una amplia gama de blancos moleculares [32,33].



Figura 9. Plataformas y Software de mayor uso en el diseño dirigido de fármacos.

El segundo grupo de interés son los programas de modelado molecular. Estos pueden funcionar a nivel estructural, prediciendo propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (SwissADME, ADMETx), determinación de interacción entre proteína/molécula (autodockvina, MOE, Schrödinger), esto derivado del cálculo de energías de acoplamiento hasta el cálculo de interacciones particulares y dinámica molecular en cortos periodos de tiempo [20,32,34,35] y finalmente, un tercer grupo que se centraliza en el uso de datos biológicos, para encontrar relación con la estructura (QSAR), a fin de presentar una retroalimentación entre los cálculos teóricos y la actividad biológica encontrada, todo en relación al conjunto de estructuras evaluadas (Figura 10) [36,37].

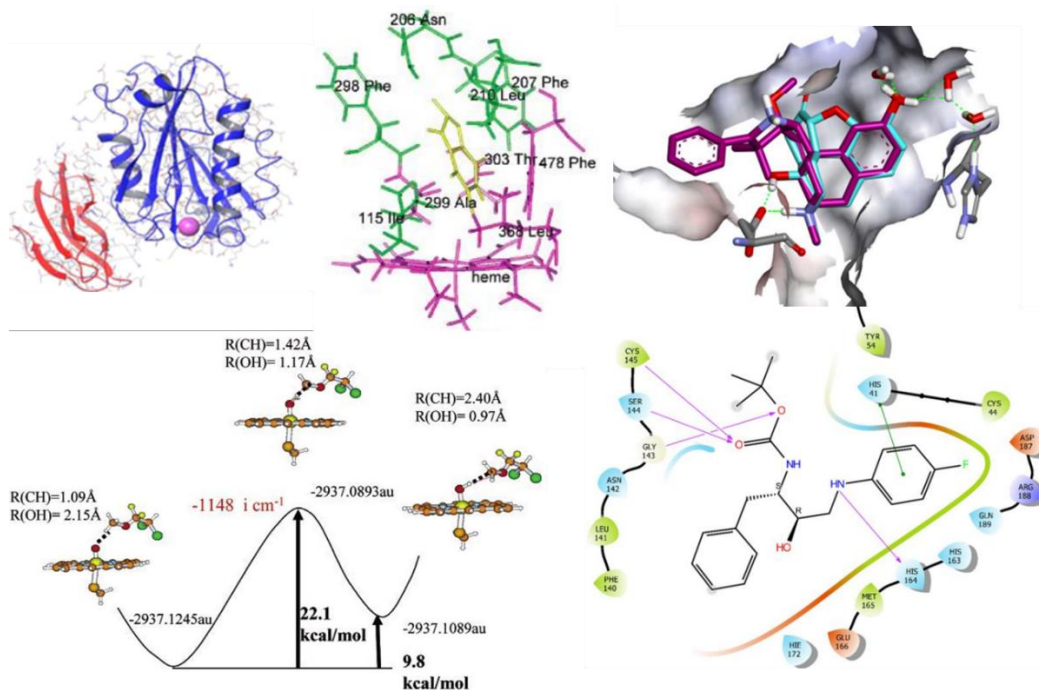


Figura 10. Análisis interaccional y estudio in silico.

Los esteroides no han estado exentos del uso de herramientas bioinformáticas (Figura 10) para el diseño de candidatos biológicamente activos, principalmente para incrementar el

valor de los mismo o seleccionar los candidatos a síntesis y evaluación biológica. En la tabla 1 podemos observar un resumen de estas estructuras, destacando su uso contra el cáncer desde diversos enfoques, principalmente en cáncer de tipo hormona dependiente. Dado la similitud de los anillos A-D con las hormonas esteroidales endógenas, los derivados evaluados presentan un alto potencial latente mediante la inhibición de las enzimas CYP17A1 y CYP19A1. También pueden obtenerse previsiones contra osteosarcoma y cáncer hepático, inhibiendo el ciclo celular; de igual manera los esteroides se han utilizado como plantillas para estudios contra Alzheimer, Parkinson, cardiopatías, enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Tabla 1. Derivados esteroidales diseñados in silico y su efecto biológico.

Blancos moleculares <i>in silico</i>	Efecto Biológico	Fármacos	Referencias
Anhidrasa Carbónica II	Osteoporosis, Glaucoma, edemas.	Furosemida, brinzolamida	[38]
Anhidrasa Carbónica III	Daño neuromuscular y carcinoma hepatocelular	Clortalidona	[39,40]
Anhidrasa Carbónica IX	Hipoxia, inducción de proliferación en tumores	Indapamida, clortalidona	[41,42]
Receptor de estrógenos α	Cáncer, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares	Raloxifeno, tamoxifeno fulvestran	[43,44]
Receptor β de estrógenos	Cáncer de ovario y próstata	Bazedoxifeno	[44]
Acetilcolinesterasa	Alzheimer	Galantamina, rivastigmina y neostigmina	[45,46]
Quinona reductasa-1	Alzheimer	Dicumarol	[47,48]
Monoamina oxidasa	Parkinson y Alzheimer	Clorogilina, moclobemida, lazabemida	[49,50]
CYP51	Infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias	Tetrazoles	[51–55]
BRI1	Promoción de crecimiento vegetal	Brasinólida	[56]
Receptor de auxinas	Proceso de germinación, etiolación y enraizamiento	Ácido indol acético	[57]

Pero los estudios *in silico* y los esteroides no solo están limitados al diseño de compuestos bioactivos contra patologías humanas o animales; también se les ha utilizado para el diseño de fitohormonas. Con respecto esto último, se destaca la vía de los brasinoesteroides con la

activación del gen *BRI1*. A partir de la estructura de la brasinólida, ha sido posible diseñar, sintetizar y evaluar biológicamente nuevos compuestos activos (Figura 11). Un dato importante que se ha obtenido es que se prevé que esteroides conteniendo un grupo carbonilo en C-6 en lugar de la lactona en el anillo B, son compuestos con mucha potencialidad biológica. Además, de que los esteroides cetónicos conteniendo cadenas laterales diferentes a la de la brasinólida tienen igualmente un amplio porvenir. Esto permitió diseñar estructuras bioisósteras, como **43**, aun sin poseer un núcleo esteroidal [56,58,59].

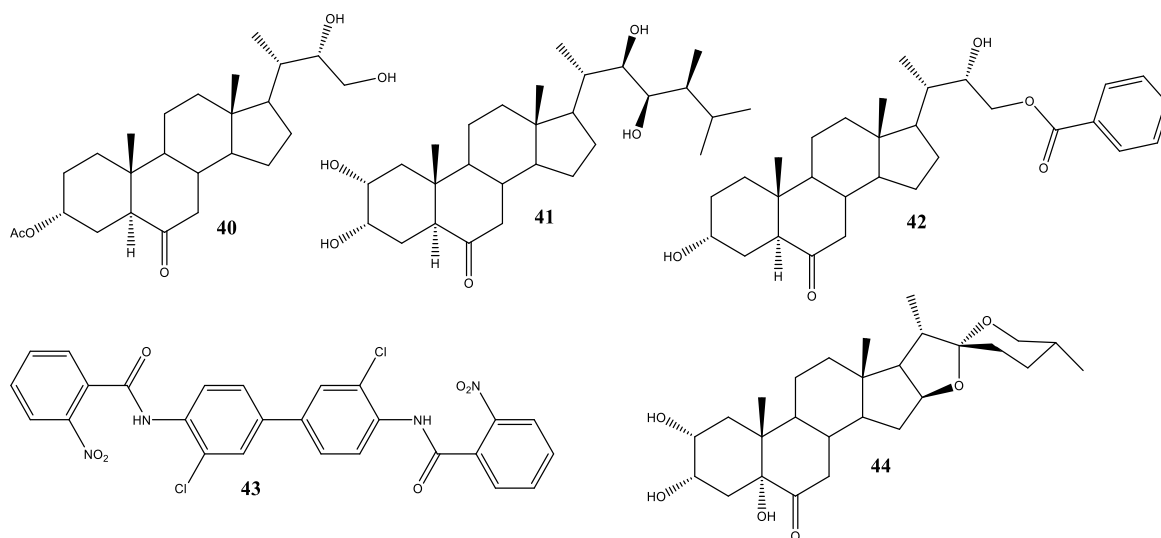


Figura 11. Moléculas diseñadas *in silico* con efecto benéfico en plantas.

Sin embargo, los estudios *in silico* no se centran únicamente en esta vía, también se ha reportado en otras, destacando la de las auxinas, asociadas a la ligasa ubiquitina *TIR1*, encargada de la regulación del receptor auxínico, lo que derivó en la optimización de la cadena ácida del núcleo base para incrementar el efecto promotor de la germinación y de la elongación celular, también con estas herramientas se logró el diseño de auxinas con efecto sobre *TIR1* sin efecto sobre *AFB5* (auxin F-Box 5, asociado a efecto herbicida), logrando un efecto promotor específico mediante el cambio del grupo ácido por un grupo tetrazol, ya que el grupo ácido es fundamental para la activación de la vía *AFB5*. Para obtener acción en la vía *TIR1* el grupo ácido puede ser sustituido por el tetrazol y ello no disminuye la actividad promotora de germinación [57,60,61]. Aunque en los ámbitos de la salud y agropecuario los esteroides han demostrado potencial *in silico* y biológico, los *i*-esteroides no se han encontrado reportes en ninguno, si bien han sido intermediarios en investigaciones con estudios teóricos. Por tanto, se reafirma que los *i*-esteroides contienen un grupo interesante con el cual se pueden sintetizar compuestos valiosos desde el punto de vista biológico.

1.2 Metodología

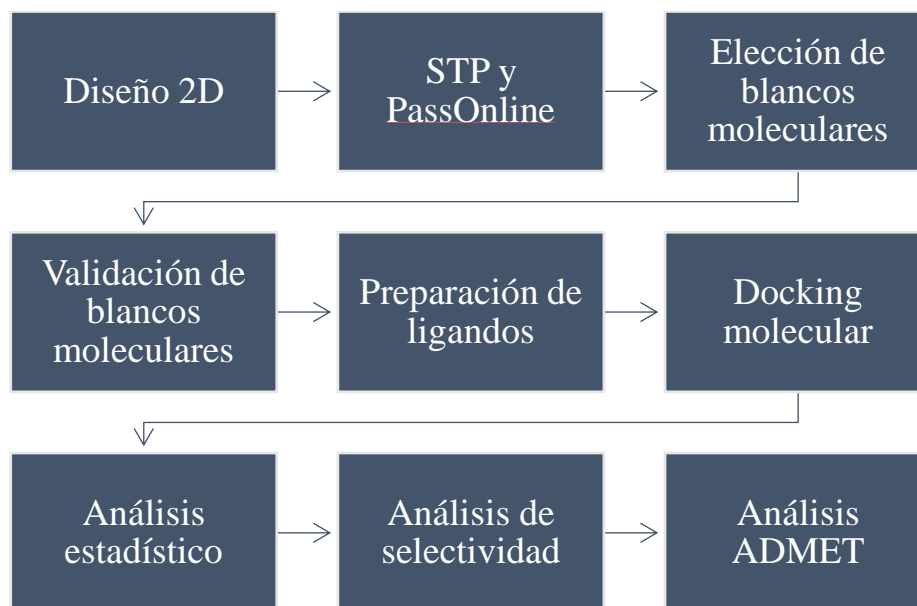


Figura 12. Etapas críticas del estudio *in silico* de los derivados *i*-esteroidales.

El estudio del potencial *in silico* de los derivados *i*-esteroidales se dividió en tres fases, la primera (Figura 12) enfocada al potencial por similitud estructural para determinar dianas primarias y secundarias. En la segunda etapa se construyeron los modelos 3D y validaron las proteínas de interés para proceder al estudio de docking molecular y analizar estadísticamente el efecto de los grupos de estudio y finalmente determinar la posibilidad de selectividad teórica o las estructuras presentaran efectos multidianas; en la última etapa con las moléculas seleccionadas se procedió al estudio de las propiedades de Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad.

1.2.1 Determinación de potencial estructural

➤ Diseño 2D

Las moléculas obtenidas como subproductos se dibujaron en el módulo 2D-Sketcher, analizando estereoquímica y estabilidad de cargas para exportar el archivo SMILE (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

➤ STP y PASS Online

Se introdujeron los códigos SMILE en la plataforma STP [32] y PASS Online [33] y se seleccionó como modelo *homo sapiens*. Se introdujo el criterio de $pa > 0.7$ para obtener los archivos *csv* en ambos casos para su análisis.

➤ Elección de blancos moleculares

Con los datos obtenidos de STP y PASS Online, en ambos casos se obtuvo el diagrama de frecuencia interaccional, por grupo de estudio, para determinar las dianas principales y secundarias; se considera primaria con una frecuencia mayor a 50% y secundaria mayor a 25%. Con la lista de dianas obtenidas, se revisó la presencia y calidad de cristal en el “*Protein Data Bank*” para ser seleccionada, así como la actividad biológica relacionada, y se agregó las asociadas a desarrollo vegetal al no estar presentes en las plataformas consultadas.

1.2.2 Docking Molecular

➤ Validación de Blancos moleculares

A partir de los cristales obtenidos en el PDBank, se limitó a resoluciones de 2 a 3 Å para garantizar definición en los mismos; se eliminaron co-cristales y medios de cristalización, determinando únicamente moléculas de agua con interacción reportada o menor a 3.0 Å en el sitio catalítico de cada proteína, en el módulo “Protein preparation wizard” utilizando como parámetros pH:7.4 (considerado fisiológico), se revisó la estabilidad del modelo con su diagrama de Ramachandran para proceder a minimizar la energía con el campo de fuerza OPLS4 con un gradiente de RMSD <0.3 Å [62], finalmente se utilizó el co-cristal para el proceso de re-docking con el módulo Glide [63] y la aceptación se definió a RMSD<2.0 Å.

➤ Preparación de ligandos

Los ligandos de referencia (sustratos, inhibidores, ligandos endógenos y bloqueadores) se obtuvieron como co-cristal en las proteínas. Los derivados i-esteroidales previamente dibujados se convirtieron a su forma 3D más estable, mediante minimización con nivel OPLS4 y PRCG en el módulo Macromodel [64]. Para el acoplamiento molecular, los ligandos se prepararon utilizando LigPrep de Schrödinger Suite [65], mediante el campo de fuerza OPLS4. Todos los posibles centros protonados y estados de ionización se calcularon para cada estructura usando Ionizer a pH de 7,4. Los estereoisómeros se retuvieron de acuerdo con sus estructuras originales limitadas a 32 isómeros para cada ligando. Se generaron estados tautoméricos para cada grupo y se seleccionaron los conformadores con la energía más baja para cada ligando [65].

➤ Docking Molecular

El acoplamiento molecular entre los sitios de unión del receptor y los ligandos se realizó usando el módulo Glide [63] de Maestro 12.7 y la rejilla del receptor para cada diana se preparó usando el OPLS4. Cada cuadro de cuadrícula se construyó sobre la base de inhibidores o ligandos de referencia del co-cristal. El “*softening*” de las partes no polares de los receptores se llevó a cabo escalando los radios de van der Waals en un factor de 0,08. Los átomos se consideraron no polares si se determinaba que su carga atómica parcial absoluta era $<0,25$. En flexibilidad, se permitieron rotaciones de ligando adicionales para los grupos hidroxilo en Ser, Thr y Tyr, y el grupo tiol en los residuos Cys. Además, se mantuvo la posición de unión de energía más baja de cada ligando. Las puntuaciones de acoplamiento de deslizamiento se realizaron en tres modos de detección virtual de alto rendimiento (HTVS), precisión estándar (SP) y precisión adicional (XP). En primer lugar, se realizó el acoplamiento con moléculas de referencia de las respectivas proteínas dianas para validar el protocolo de acoplamiento.

➤ Análisis estadístico

Dada la variabilidad amplia de datos según la proteína de estudio se normalizaron los datos para realizar un estudio multivariable MANOVA dividido por vías y prueba de Kruskal Wallis para datos no normales, de acuerdo con las funciones estructurales en el software minitab 18.0.

➤ Análisis de selectividad

Para comparar entre compuestos y grupos de estos entre dos o más proteínas y establecer una selectividad teórica, se utilizó como parámetro una relación mínima de 1.1 entre la contante de complejo del compuesto vs el ligando/inhibidor/sustrato de referencia, posterior a cumplir este requisito se manejó una diferencia mínima para una $p < 0.05$ entre dos proteínas de comparación, normalizado a la energía de acoplamiento de referencia.

1.2.3 Análisis ADMET

Las estructuras 3D minimizadas y optimizadas a pH fisiológico se corrieron en el programa QikProp [34], para obtener los 50 parámetros predichos [66] para comparar entre los grupos de estudio a nivel estadístico y seleccionar los candidatos a evaluación biológica.

1.3 Potencial estructural mediante análisis de STP y PASS Online

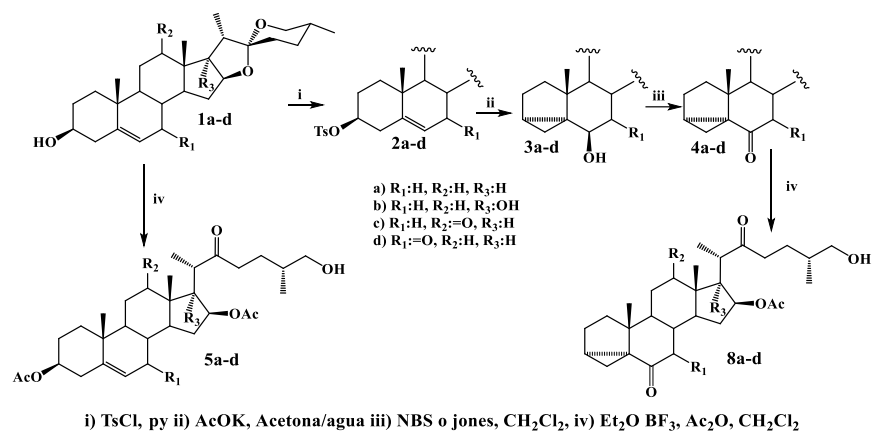


Figura 13. Modificaciones estructurales de los anillos A y B para su estudio in silico.

Swiss blanco molecular prediction (STP) y PassOnline, son plataformas de comparación estructural que permitieron observar el potencial biológico de las moléculas de diseño original (Figura 13). Particularmente para en STP se encontró un total de 340 proteínas con las que al menos una de las estructuras podría presentar interacción, lo que a priori deja tanto un amplio potencial, como una baja selectividad, pero el 50 % presenta interacción con solo una molécula y solo 33 proteínas presentan una interacción mayor al 20 % de frecuencia porcentual, es decir que exista una correlación entre el conjunto de estructuras y los blancos moleculares presentados (Figura 14), destacando a la deshidrogenasa 11β-hidroxiesteroideal 1, que es la única que presenta una frecuencia mayor al 50 %, lo que indica que su actividad se debe al núcleo base del esteroide y no a la función en la cadena lateral o anillo E y F.

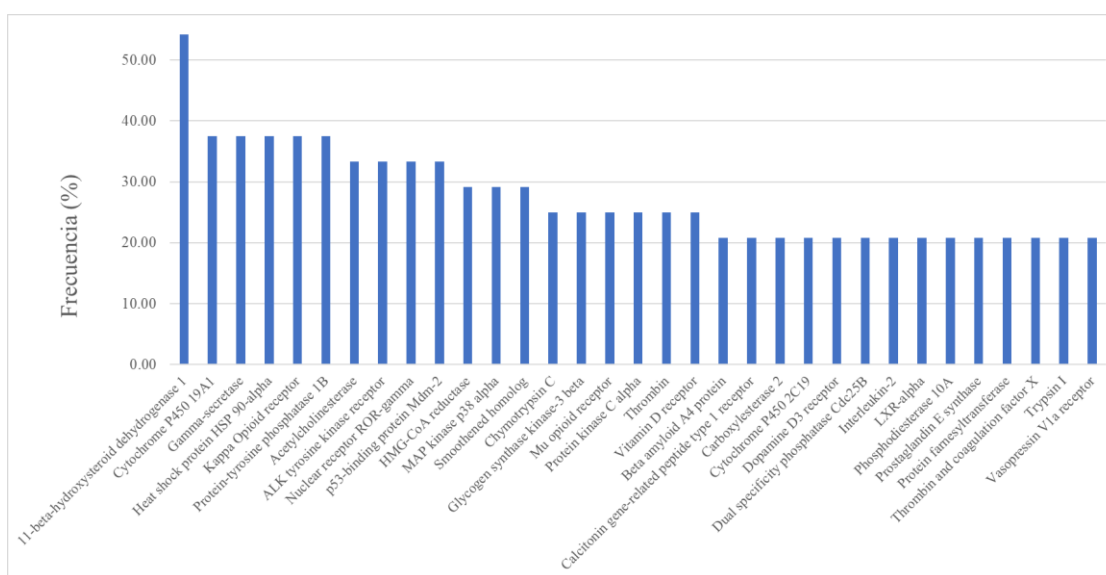


Figura 14. Diagrama de frecuencia porcentual de las estructuras diseñadas.

Pero al aislar a los *i*-esteroides de las $3\beta\Delta^5$, en estas se puede observar que interactúan con 309 proteínas mientras que los derivados *i*-esteroidales solo 62, lo que indica que la diferencia radica principalmente en la necesidad de interacción con un grupo electrodonador en C-3 y no en función del resto de la cadena (Figura 15), siendo la primera ventaja de los derivados *i*-esteroidales ya que al tener menor número de proteínas disminuye los efectos adversos por competencia.

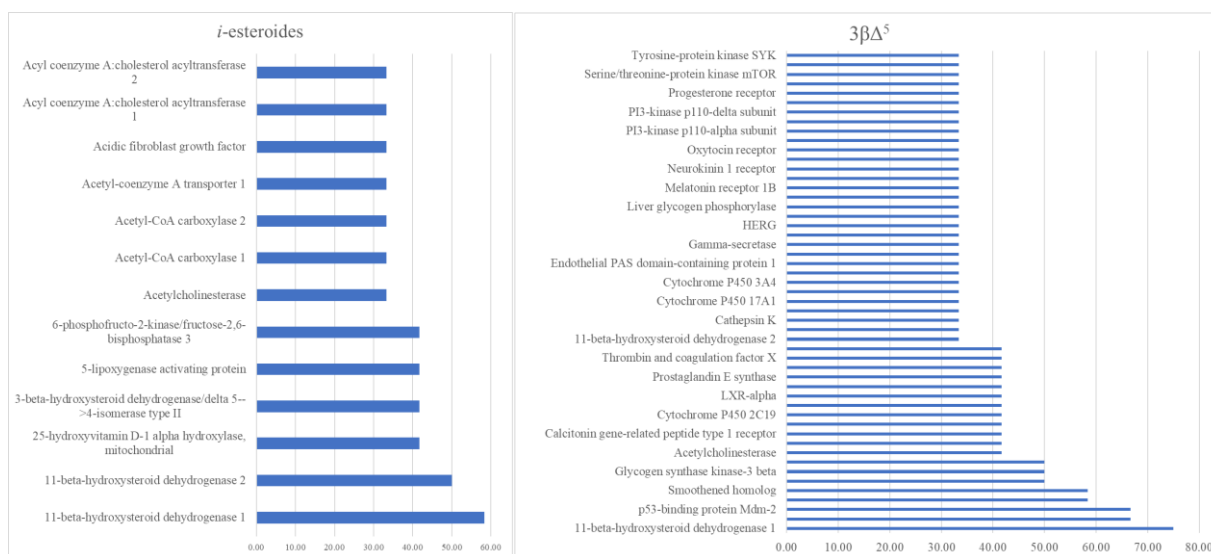


Figura 15. Diagramas de frecuencia de interacción clasificados por su función en C-3.

Se destaca la deshidrogenasa 11β -hidroxiesteroideal 1 en ambos grupos aparece con alta frecuencia, para los *i*-esteroides aparecen también proteínas asociadas al sistema nervioso central como la acetilcolinesterasa y las acetyl-CoA carboxilasas, también se destaca el factor de crecimiento ácido fibroblástico encargado de la regulación negativa del crecimiento de algunos tumores; estos últimos no presenta una frecuencia alta para el caso de los derivados $3\beta\Delta^5$, al comparar estadísticamente (Tabla 2) ambos grupos de proteínas encontramos que solo 7 blancos moleculares son exclusivos de los *i*-esteroides, siendo estos los factores ácidos y básicos de crecimiento de fibroblastos los receptores adrenérgicos y la anhidrasa carbónica IX, los cuales están asociados al cáncer, a enfermedades neurodegenerativas y la última específicamente a inducción de hipoxia en células de tumor sólido.

Tabla 2. Prueba Mann-Whitney de selectividad de dianas objetivas

Grupos	Numero de blancos moleculares	<i>p</i>
<i>i</i> -esteroides y $3\beta\Delta^5$	54	0.970
<i>i</i> -esteroides	7	0.004
$3\beta\Delta^5$	254	0.038

Por otro lado, al analizar las funciones en la cadena lateral (22-Oxocolestanica o espirostanica) para los espirostanos resulta un total de 283 proteínas potenciales y para los 22-Oxocolestanos solo 112 dan resultado de interacción, cabe destacar que de estas posibles interacciones se comparte 55 entre ambos grupos, por lo que exclusivos de los espirostanos son 228 proteínas y para los 22-Oxocolestanos 57 proteínas, pero para estos últimos se observa una especificidad hacia las rutas asociadas a la esteroidogénesis, lo cual se explica dado la similitud estructural de este grupo al colesterol y por ende podrían ser metabolizados y competir con los sustratos naturales de estas enzimas, generando un campo de metabolitos secundarios para efectos adversos, volviéndolos no idóneos para uso en la práctica médica de primera instancia, aunque los derivados *i*-esteroidales 22-oxocolestánicos se dividen en tres grupos (Figura 16), destacando además de las asociadas a la esteroidogénesis aparecen proteínas quinasas y las asociadas al sistema nervioso central, demostrando que la función *i*-esteroidal disminuye el número de interacciones aumentando la selectividad para el diseño de tratamientos dirigidos.

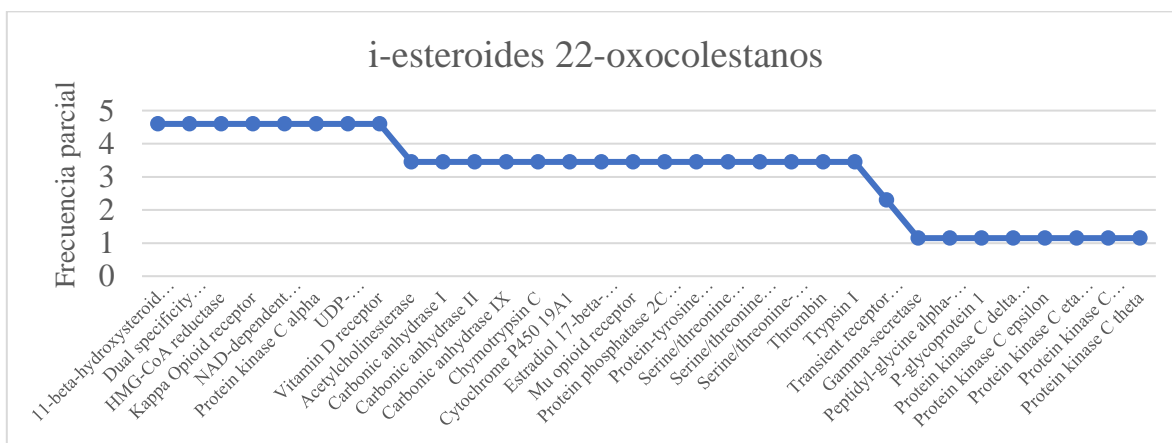


Figura 16. Frecuencia parcial para los derivados *i*-esteroidales 22-Oxocolestanicos en STP.

Los estudios en STP son específicos a proteínas asociadas a enfermedades en el ser humano, este no es el único enfoque de estudio, ya que existen patógenos externos que también alteran la salud humana, así como potencial contra otras especies o a favor (caso particular de promoción de crecimiento vegetal), al tener el primer grupo de proteínas de estudio se procedió a realizar un análisis de actividad por PASS Online además introduciendo la probabilidad de actividad en función de la estructura, se utilizó como límite inferior una probabilidad de $P_a > 0.7$ dado que se considera que valores inferiores a este los efectos adversos serán significativos versus el beneficio obtenido. Del análisis se obtuvieron un total de 48 actividades de interés de las cuales 3 (protector mucosa-membranosa, inhibidor de la hidrolasa acilcarnitina y contra enfermedades respiratorias analépticas) son exclusivas de los derivados *i*-esteroidales y 20 exclusivas de los derivados $3\beta\Delta^5$, volviendo a demostrar que la función *i*-esteroidal disminuye el número de actividades aumentando la selectividad.

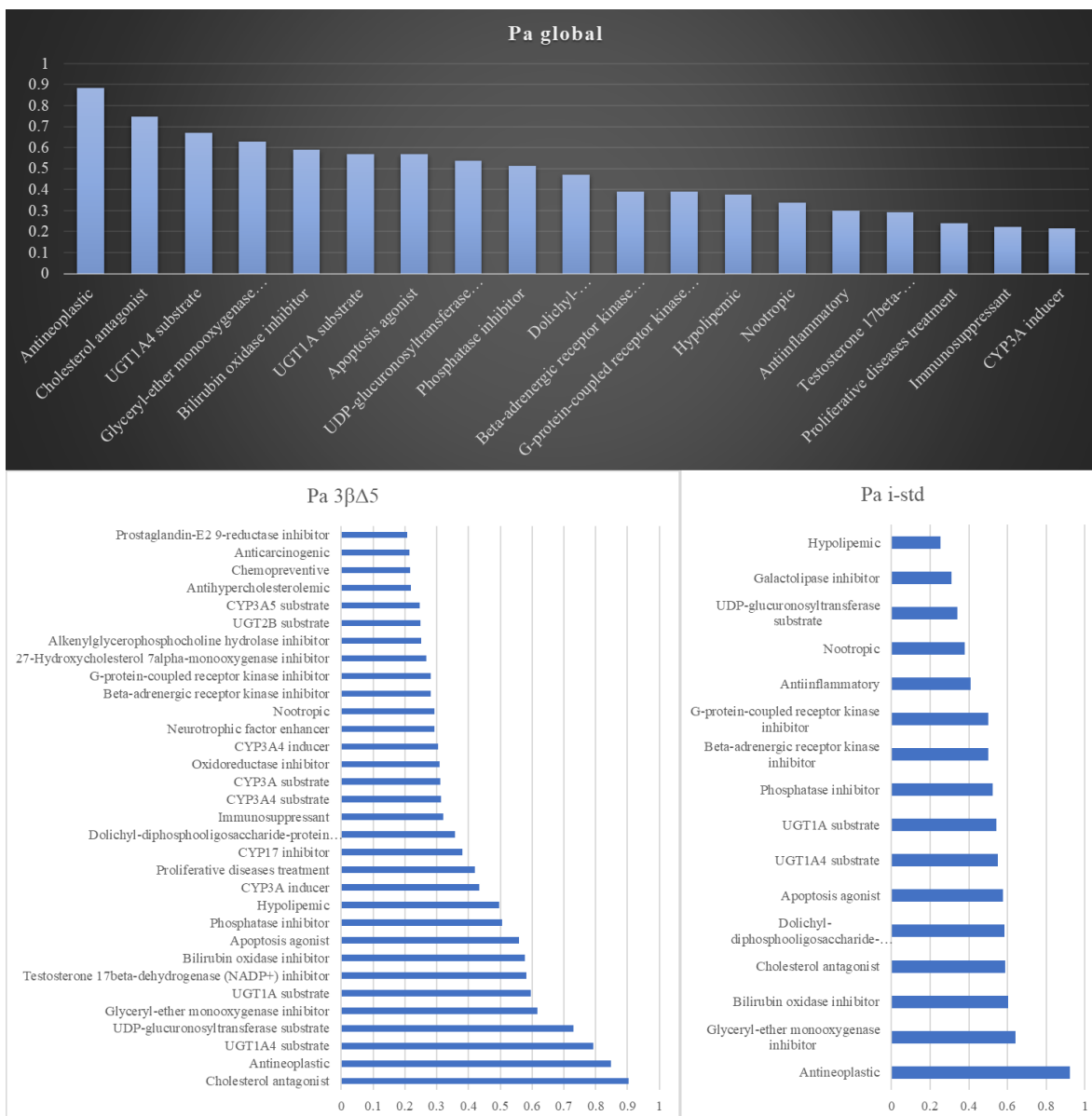


Figura 17. Dianas con Pa promedio > 0.2, como conjunto de moléculas.

Pero la selectividad no se da únicamente por la exclusividad, también se puede analizar según la probabilidad de interacción. En la Tabla 3, podemos observar la lista de actividades propuestas para todo el grupo y clasificados según el tipo de estructura, denotando que 30 actividades existen diferencia significativa entre los i-esteroides y los 3βΔ5, de las cuales 5 tienen una mayor selectividad hacia los i-esteroides. Estadísticamente se confirma el aumento de selectividad con esta función en el anillo A, debido a la necesidad de interacción con el grupo electrodonador en C-3. Con respecto a la función espiroestánica y 22-oxocolestánica se denota un mayor potencial biológico por los espirostanos, destacando anticancerígenos y asociados a infecciones, mientras que los 22-oxocolestanos se encuentran asociados a la esteroidogénesis como la “Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor” y con

enzimas asociadas al metabolismo de fármacos como la CYP3A tanto como inhibidor y como sustrato, es decir un sistema de inhibición competitiva.

Tabla 3. Análisis estadístico de actividad clasificada por grupos de moléculas, por PassOnline.

Actividad	Pa Total	Pa i-std	Pa 3βA5	Pa 22Oxo Colestano	Pa Espirostano
Antineoplastic	0.885	0.921	0.848	0.874	0.891
Cholesterol antagonist	0.747	0.590*	0.904	0.406	0.918 ⁺
UGT1A4 substrate	0.672	0.552*	0.792	0.277	0.869 ⁺
Glyceryl-ether monooxygenase inhibitor	0.629	0.642	0.617	0.091	0.899 ⁺
Bilirubin oxidase inhibitor	0.590	0.604	0.577	0.000	0.885 ⁺
UGT1A substrate	0.568	0.541	0.596	0.000	0.853 ⁺
Apoptosis agonist	0.567	0.576	0.558	0.000	0.851 ⁺
UDP-glucuronosyltransferase substrate	0.537	0.342*	0.731	0.299	0.655 ⁺
Phosphatase inhibitor	0.514	0.524	0.505	0.000	0.771 ⁺
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase inhibitor	0.472	0.586*	0.358	0.098	0.659 ⁺
Beta-adrenergic receptor kinase inhibitor	0.392	0.501*	0.283	0.000	0.588 ⁺
G-protein-coupled receptor kinase inhibitor	0.392	0.501*	0.283	0.000	0.588 ⁺
Hypolipemic	0.376	0.255	0.496	0.000	0.563 ⁺
Nootropic	0.337	0.380	0.294	0.000	0.505 ⁺
Antiinflammatory	0.300	0.410*	0.189	0.190	0.355
Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor	0.291	0.000*	0.583	0.387	0.244
Proliferative diseases treatment	0.240	0.060*	0.420	0.184	0.268
Immunosuppressant	0.222	0.124	0.320	0.386	0.140 ⁺
CYP3A inducer	0.217	0.000*	0.435	0.278	0.187
CYP17 inhibitor	0.191	0.000*	0.381	0.091	0.241 ⁺
Galactolipase inhibitor	0.186	0.311*	0.061	0.000	0.279 ⁺
Neurotrophic factor enhancer	0.176	0.059*	0.294	0.090	0.220 ⁺
CYP3A4 substrate	0.157	0.000*	0.315	0.185	0.144
Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor	0.156	0.061	0.251	0.278	0.095 ⁺
CYP3A substrate	0.156	0.000*	0.311	0.182	0.143
Oxidoreductase inhibitor	0.155	0.000*	0.310	0.192	0.136
CYP3A4 inducer	0.152	0.000*	0.304	0.277	0.090 ⁺
Chemopreventive	0.139	0.061	0.217	0.000	0.208 ⁺
27-Hydroxycholesterol 7alpha-monooxygenase inhibitor	0.134	0.000*	0.268	0.000	0.201 ⁺
UGT2B substrate	0.124	0.000*	0.248	0.372	0.000 ⁺
CYP3A5 substrate	0.123	0.000*	0.247	0.186	0.092 ⁺
Adenomatous polyposis treatment	0.121	0.119	0.123	0.363	0.000 ⁺
Antihypercholesterolemic	0.109	0.000*	0.219	0.328	0.000 ⁺
Anticarcinogenic	0.107	0.000*	0.214	0.000	0.160
Prostaglandin-E2 9-reductase inhibitor	0.104	0.000*	0.207	0.311	0.000 ⁺
Antiseborrheic	0.098	0.129	0.067	0.293	0.000 ⁺
DELTA14-sterol reductase inhibitor	0.094	0.000*	0.187	0.091	0.095
Membrane integrity antagonist	0.065	0.000*	0.131	0.196	0.000 ⁺
CYP2C substrate	0.065	0.000*	0.130	0.195	0.000 ⁺
Antineoplastic (breast cancer)	0.061	0.064	0.059	0.184	0.000 ⁺
Alkylacetylglucosphatase inhibitor	0.061	0.062	0.060	0.000	0.091
Antiprotozoal (Leishmania)	0.031	0.000*	0.062	0.000	0.046
Mucomembranous protector	0.031	0.061*	0.000	0.000	0.046
Acylcarnitine hydrolase inhibitor	0.030	0.061*	0.000	0.000	0.046
Antineoplastic (pancreatic cancer)	0.029	0.000*	0.059	0.000	0.044
Respiratory analeptic	0.029	0.059*	0.000	0.000	0.044
Antifungal	0.029	0.000*	0.059	0.000	0.044
Antipruritic	0.029	0.000	0.058	0.088	0.000

*Diferencia significativa entre i-std vs 3βA5 $p < 0.05$ prueba de Kruskal Wallis

⁺ Diferencia significativa entre 22-oxocolestano vs espirostando $p < 0.05$ prueba de Kruskal Wallis

Otra interrogante que surge al analizar el grupo de actividades por los tipos de moléculas es el potencial entre éstas; en la Figura 18 se puede observar que en las tres primeras las interacciones cruzadas de probabilidad de las actividades de mayor probabilidad, denotando

que existe una correlación directa entre el antagonismo al colesterol y el efecto antineoplásico (asociado a cáncer), con picos de probabilidad a alta función de sustrato de UGT14A, mientras que para la correlación entre las actividades inhibitorias de la gliceril éter mono-oxigenasa y la bilirrubina oxidasa independiente de la actividad como sustrato de la UGT14A. Sin embargo, para la función como agonista de la apoptosis, se necesita una actividad alta de inhibición de la fosfatasa al menos del 75%, lo cual sería indicativo para el diseño de anticancerígenos, tanto por la función antineoplásica y agonista de la apoptosis, aunque sí es posible una interacción de estas dos sin efecto como sustrato de la UDP-gluconosiltransferasa o antagonista del colesterol, esto último indica que se podría trabajar contra cáncer no hormona dependiente de manera selectiva sin alterar la esteroidogénesis, en función de la dosis y la selectividad específica obtenida contra cada proteína.

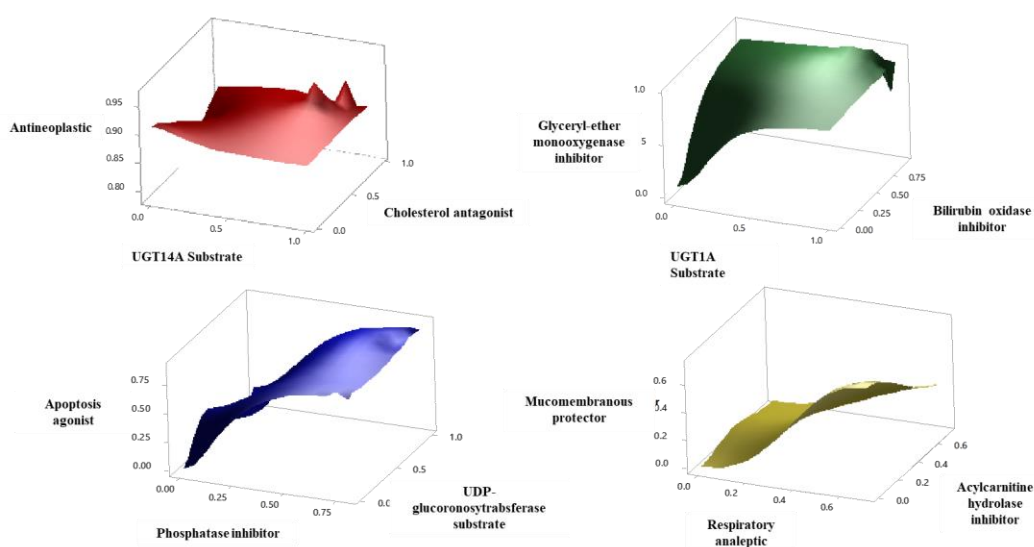


Figura 18. Diagrama de potencial comparado de actividad biológica.

Por otro lado, en el cuarto gráfico de la Figura 18 podemos observar la interacción triple de las actividades asociadas exclusivamente hacia los derivados i-esteroidales, donde se observa una baja selectividad entre estas tres actividades, ya que para tener probabilidades altas de cualquiera de las tres las otras dos presentan una prevalencia alta, la ventaja es que en presencia de analéptica respiratoria existe un efecto desprotector muco-membranoso, por lo que se puede pensar en un efecto dual. A través de las dos plataformas STP, que permite observar dianas de interacción tanto benéficas como perjudiciales a la salud, y PASS Online que permite observar actividades deseadas contra patologías generales, los derivados i-esteroidales presentan potencial biológico contra patologías como el cáncer, Alzheimer, broncorrespiratorias, hormonales, contra infecciones (bacterianas y fúngicas) con alta especificidad, pero estas probabilidades están delimitadas a similitud estructural por lo que es necesario un estudio más específico a la interacción contra proteínas específicas, mediante cálculos de docking molecular.

1.4 Potencial por docking molecular

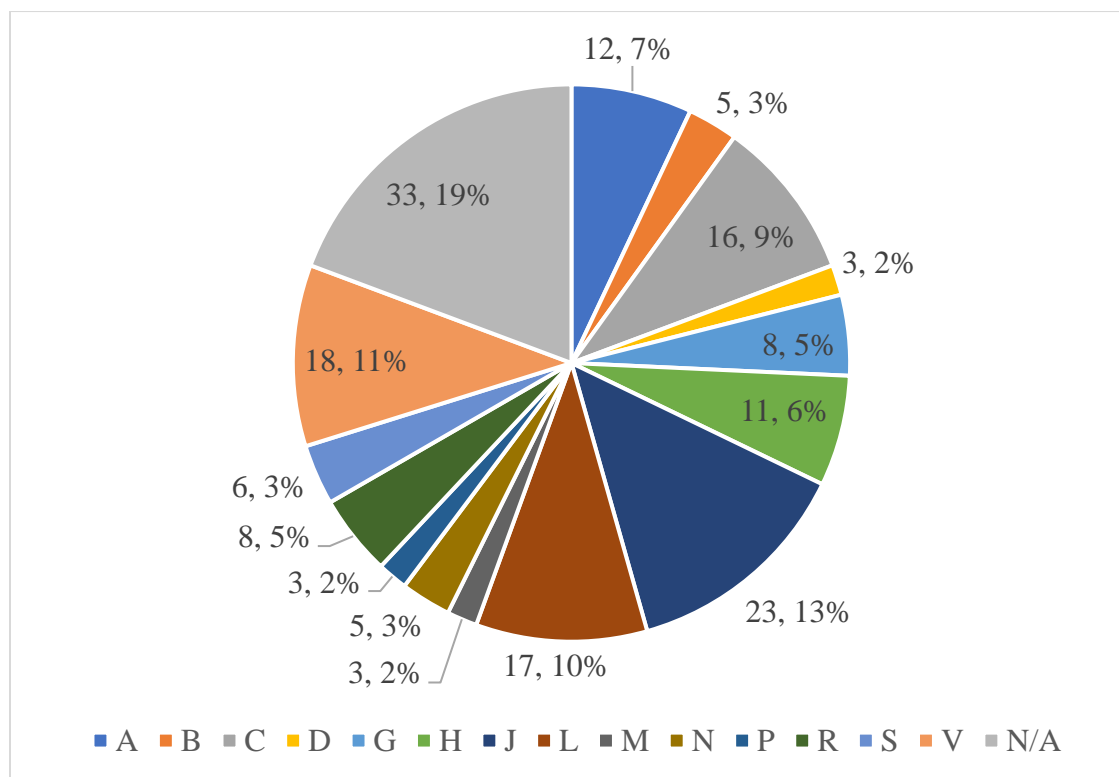


Figura 19. Grupos de blancos moleculares por clase ATC utilizados para docking molecular.

Al observar el potencial latente en varias líneas de investigación se decidió separar a los blancos moleculares en 5 grupos, relacionadas a sistema nervioso central, a cáncer (hormona y no hormona dependiente) a enfermedades sistémicas, a enfermedades infecciosas (virales, bacterianas y fúngicas) y a la promoción de crecimiento vegetal (Figura 19), para estudiar las dos hipótesis sobre la diferencia estadística en las funciones del anillo A y la cadena lateral.

1.4.1 Potencial anticancerígeno

Los blancos moleculares seleccionados dado su efecto anticancerígeno se pueden separar en dos grupos: aquellos relacionados a la regulación hormonal y/o al bloqueo de los receptores esteroidales y los relacionados a apoptosis o a cascadas de señalización asociadas al ciclo celular. En primera instancia en la Tabla 4 que los esteroides tienen potencial de interacción excepto en la CYP19A1, donde el sitio catalítico es de tamaño de los 4 anillos dado la estructura de la testosterona y la androstendiona, por lo que al presentar la cadena lateral imposibilita la interacción con esta, aunque a nivel comparación estructural previamente se

había predicho; para la CYP17A1 se observó un efecto similar aunque si algunos presentaron interacción no fueron suficientes para lograr un análisis estadístico. Para comparar los casos en los que sí existe una diferencia estadística entre los compuestos $3\beta\Delta 5$ e *i*-esteroidal, siendo únicamente la anhidrasa carbónica IX (CA9) y en el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) donde se observa esta diferencia y, en ambos casos con una mejor energía por los derivados *i*-esteroideos.

Tabla 4. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Kruskal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia con blanco molecular anticancerígenos.

Target	PDB	Medianas EA (kcal/mol)			Medianas EA (kcal/mol)			Farmaco Ref	EA (kcal/mol)	Lig Ref	EA (kcal/mol)
		$3\beta\Delta 5$	<i>i</i> -esteroideos	KW	22Oxocolestano	espiroetano	KW				
5 α Reductasa	7BW1	-5.922	-5.645	0.686	-4.960	-5.903	0.003	Finasterida	-6.814	Testosterona	-6.756
AR	2AMA	-2.252	-2.434	0.843	-2.251	2.316	0.838	-	-	DHT	-11.129
CYP11A1	3N9Y	-7.151	-9.383	0.722	-4.913	-9.563	0.005	Ketoconazol	-8.554	Colesterol	-9.332
CYP17A1	6CHI	*	*	*	*	*	*	Abiraterona	-9.717	Progesterona	-7.702
CYP19A1	3EQM	&	&	&	&	&	&	Letrozol	-6.256	Testosterona	-10.383
CYP21A2	4Y8W	-6.088	-6.343	0.157	-6.243	-6.234	0.593	Aminoglutemida	-6.061	Progesterona	-9.393
CA2	3BL0	-2.590	-3.038	0.670	-1.851	-3.107	0.024	Brinzolamide	-4.136	-	-
CA9	4FL4	-3.005	-3.572	0.041	-4.450	-3.362	0.017	Indapamida	-5.999	-	-
CA12	4QJ0	-2.799	-2.468	0.056	-2.707	-2.702	0.606	Indapamida	-3.108	-	-
ER α	1A52	-2.864	-3.031	0.336	-2.899	-3.026	0.821	4hidroxitamoxifeno	-10.725	Estradiol	-10.665
ER β	5TOA	-2.997	-2.964	0.773	-3.317	-2.840	0.111	-	-	Estradiol	-10.013
FR	7D42	-2.075	-2.705	0.245	-2.471	-2.054	0.242	Tropifexor	-2.315	-	-
FGFR	6MZQ	-4.545	-3.509	0.057	-4.545	-3.835	0.270	Infgratinib	-4.498	-	-
EGFR	6GUK	-2.756	-2.856	0.705	*	*	*	Afatinib	-6.448	-	-
BCL2	4AQ3	-3.621	-4.046	0.644	-3.624	-4.023	0.156	Venetoclax	-6.675	-	-
mTOR	4JSX	-4.081	-3.796	0.356	-4.224	-3.931	0.540	17G	-8.888	-	-
p110 α	6OAC	-3.659	-4.280	0.119	-3.490	-4.327	0.050	MLJ	-7.781	-	-
PDL1	5NIU	-3.317	-2.981	0.326	-3.190	-3.010	0.391	8YZ	-7.191	-	-
PDGFR	5GRN	-4.381	-5.364	0.001	-4.622	-4.831	0.759	Crenolanib	-6.329	-	-

* No hay suficientes datos para un análisis estadístico

& Las estructuras no caben dentro del sitio activo.

Al analizar particularmente estas proteínas se puede explicar el por qué la función *i*-esteroidal presenta mayor energía de acoplamiento. Para el caso de la CA9 la contracción del anillo A incrementa el área de contacto con la parte hidrofílica y al tener el hidroxilo en C-3 se genera repulsión en esta región. Para PDGFR se observa un efecto similar como se observa en la Figura 20 la región inferior el hidrofóbica además que la función 6-oxo permite la formación de puentes de hidrógeno.

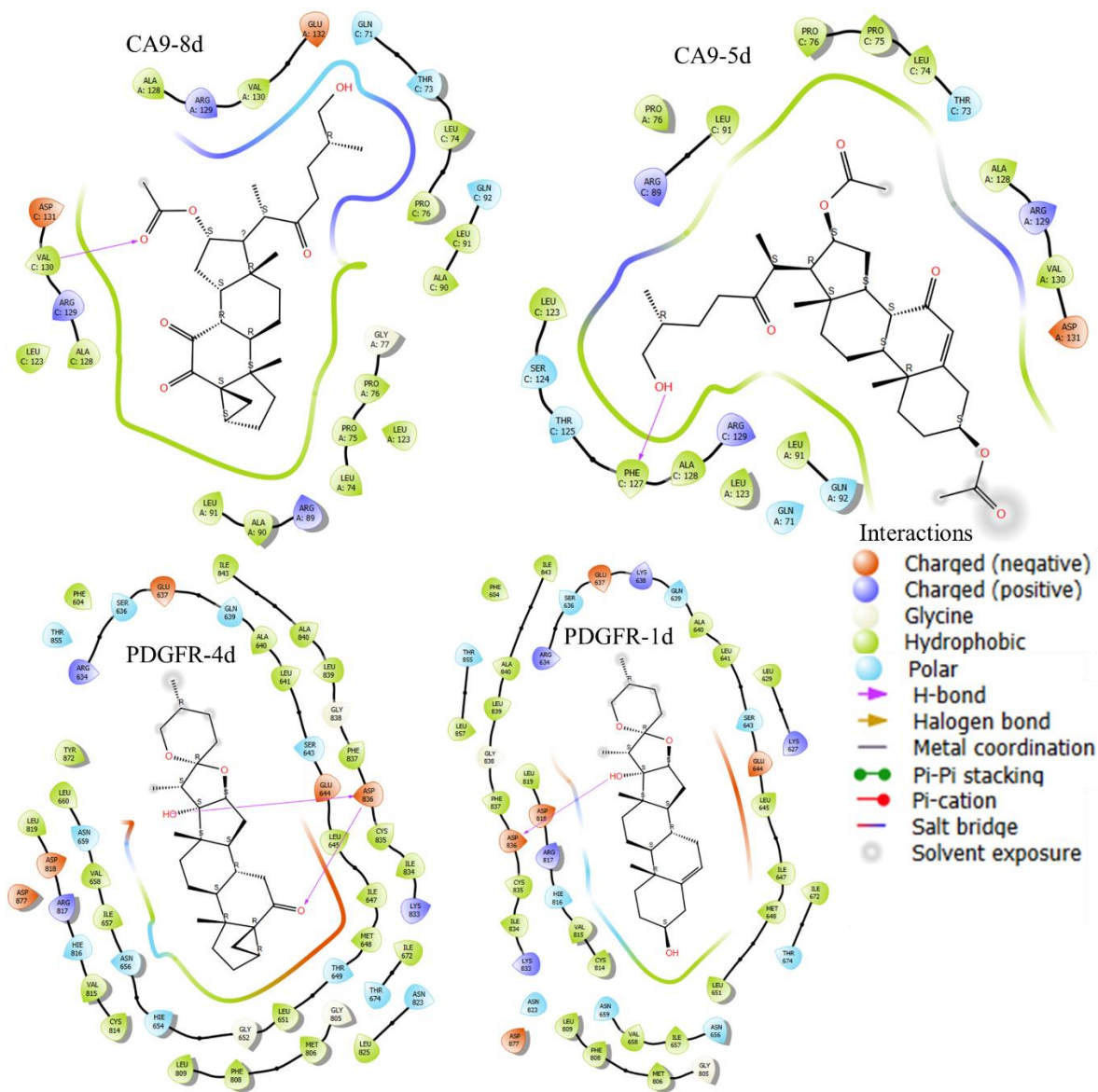


Figura 20. Diagramas de interacción 2D comparativo de los *i*-esteroides vs 3β A5 en CA9 y PDGFR.

Por otro lado, comparando las funciones en la cadena lateral, en la 5α -reductasa, la CYP11A1, la CA2 y p110 α se presenta mejor energía con los derivados estirostanos, mientras que para la CA9 presentan mayor energía los 22-oxocolestanos. Esto último está relacionado con la región polar en el sitio catalítico y la apertura del estirostano con hidroxilo en C-26 y acetato en C-16 incrementaron el área de interacción por lo que incrementó la EA, mientras que para la CYP11A1 la contracción de los anillos permite un acomodo espacial alrededor del sitio catalítico, en particular bloqueando la interacción con el grupo hemo, mientras que al abrir la cadena lateral se acomoda en la cara opuesta del sitio no tan expuesto al grupo hemo, lo que dificulta el potencial inhibitorio, efecto similar observado en la CA9

con respecto al átomo de Zn, para el caso de 5 α -reductasa, CA2 y p110 α la presencia del esteroide permite centralizar la parte hidrofóbica como fundamental para la interacción independiente de la función en C-3. Las cadenas 22-oxocolestánicas, al ser más polares, disminuyen la EA dado la hidrofobia generada por el acetato en C-16, como se aprecia en el análisis estadístico.

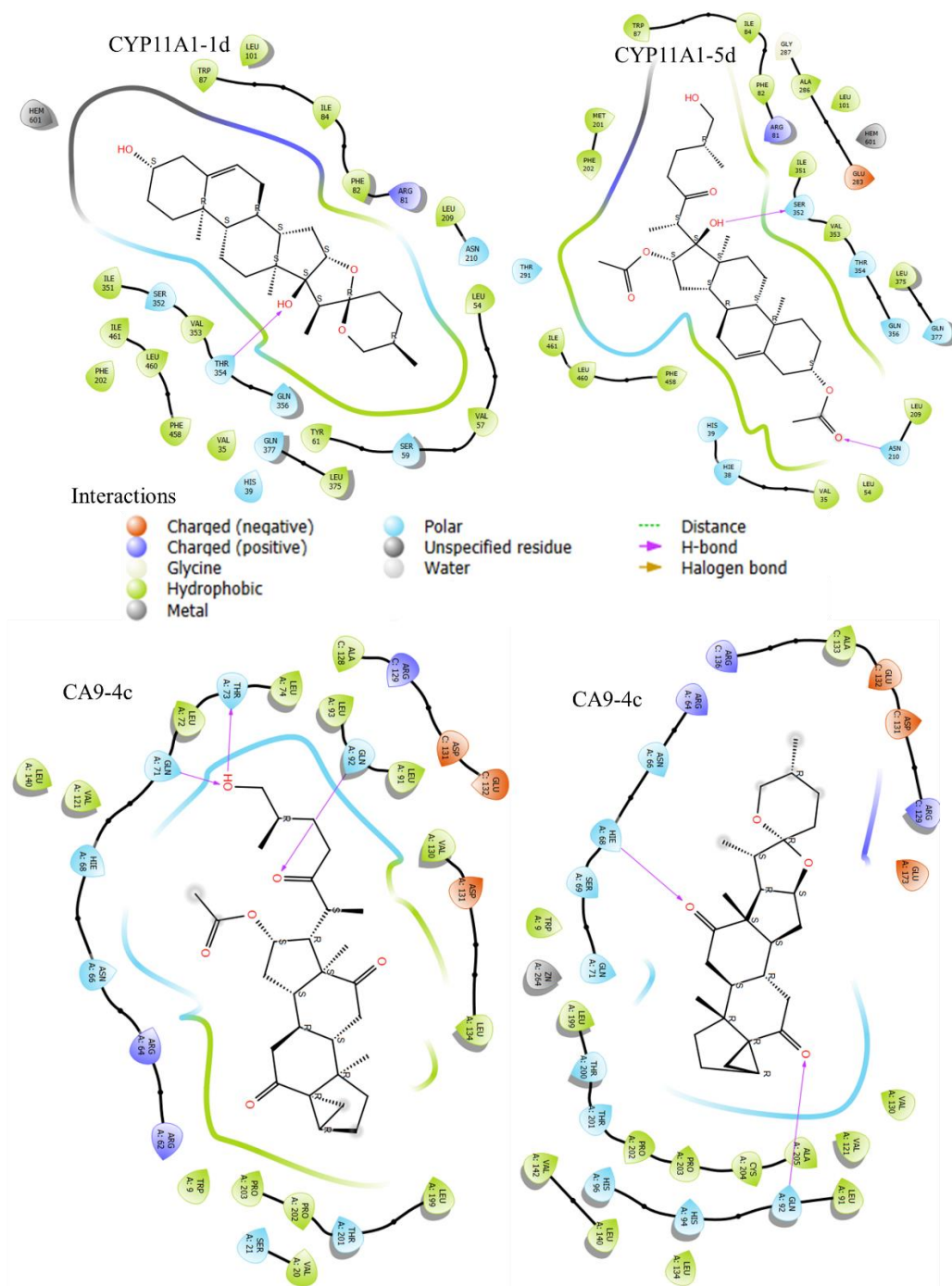


Figura 21. Diagrama 2D de interacción de la CYP11A1 y la CA9.

Tabla 5. Moléculas con mayor EA que los fármacos, ligandos, sustratos o inhibidores de referencia.

Diana/tipo	3 β Δ 5	<i>i</i> -esteroides
CY11A1	1a,1b,1c,1d	3a,3b,3c,3d,4a,4b,4d
CYP21A2	1a,1b,1d,2b,5c,5d	3a,3b,3c,4a,4b,4c,8b,8c,8d
CA9	-	8d
CA12	1a,1b,2a,2d	3b,3c
FR	1a,2b,5c	-
FGFR	1a,1b,1c,1d,5a,5c	8b,8c

Pero, aunque exista diferencia estadística ésta no es indicativa del potencial contra cada blanco molecular. Al estudiar individualmente cada molécula con cada diana de interés se obtiene potencial contra solo 6 blancos moleculares, y solo algunas moléculas presentan mayor energía que algún ligando, sustrato, inhibidor o fármaco de referencia (Tabla 5), donde podemos denotar que los *i*-esteroides tienen selectividad en la CA9 y los 3 β Δ 5 en el receptor farsenoide (FR), mientras que en las otras estructuras de ambas familias presentan mejor energía respecto a algún fármaco de referencia, aunque no solo depende de la EA sino también del sitio específico de interacción, en el caso de los 6 blancos moleculares 5 de ellos los esteroides se colocan en el sitio catalítico o activo de cada una excepto en la CYP21A2 en las que se coloca lejos del grupo hemo, por lo que aunque tengan una EA mejor que el fármaco no garantiza un efecto sobre ésta, aunque algunas moléculas no cumplen esto en el resto de proteínas, como la botogenina (**1c**) en CYP11A1 y **8a** en el caso de FGFR.

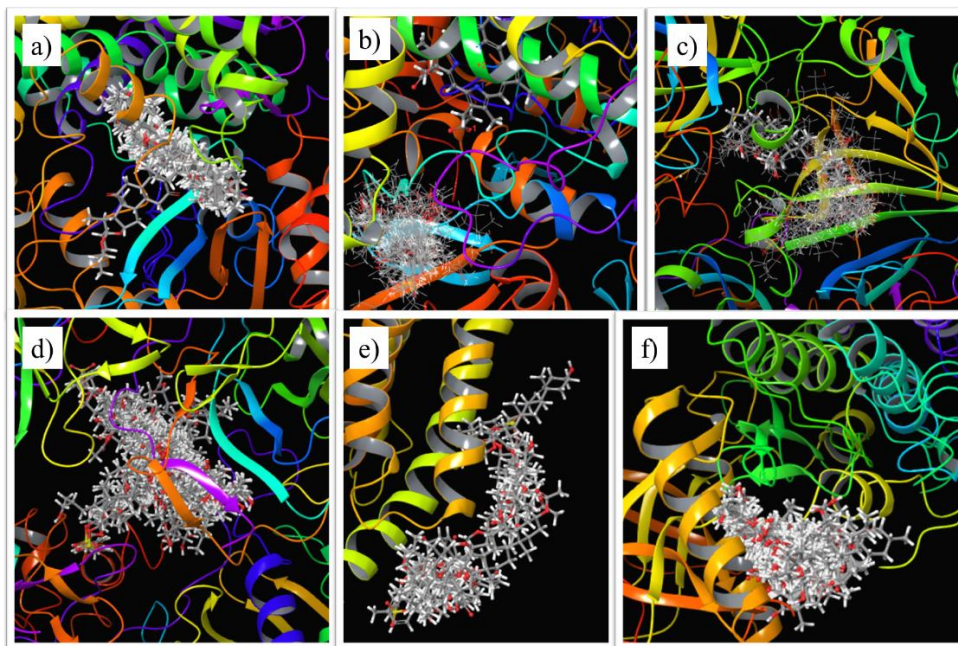


Figura 22. Análisis 3D de sitios activos: a) CYP11A1, b) CYP21A2, c) CA9, d) CA12, e) FR y f) FGFR.

Para poder seleccionar compuestos para su evaluación biológica es necesario considerar la selectividad de interacción con las proteínas de interés, para la CA9 (Figura 23). El compuesto **8b** muestra selectividad hacia ésta, sin interacción en las otras proteínas estudiadas, fenómeno similar se observa para FGFR y FR; para este último particularmente es la cadena lateral la que muestra la interacción principal en la capa expuesta del receptor, para la inhibición de la enzima CYP11A1 contra cáncer de tipo hormona dependiente el número de moléculas con potencial incrementa. Particularmente **1b**, **3a** y **4a** presentan una energía mayor al fármaco de referencia y en competencia con el colesterol, estos funcionan inhibiendo el acceso al grupo hemo y estos tres particularmente acoplan el anillo A con este grupo, lo que lo hace potenciales inhibidores de esta enzima, haciendo a estos 6 compuestos los ideales para evaluar su efecto anti-proliferativo.

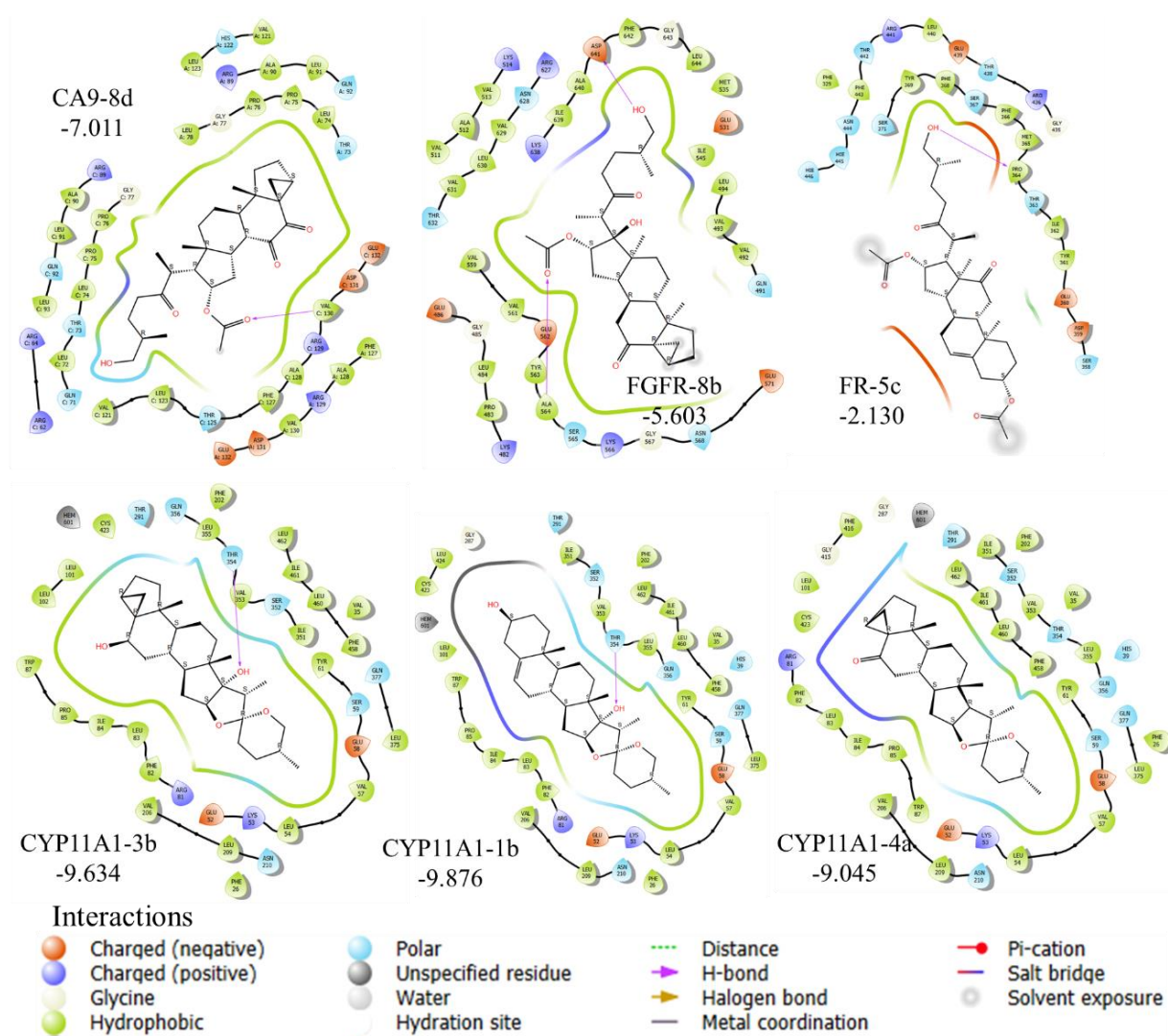


Figura 23. Interacciones 2D de moléculas selectivas con su respectiva proteína.

1.4.2 Potencial antiinfeccioso

Otro campo importante en el diseño de fármacos y de agentes bioactivos es contra enfermedades infecciosas, estas se dividen en 4 grupos, las bacterianas, parasitarias, fúngicas y virales, todas debido a un agente externo al hospedero (humano, animal o planta) las enfermedades parasitarias dependen completamente del parásito en específico y al ser un organismo complejo, el diseño de compuestos bioactivos es multidiana, en contraste con los demás tipos de enfermedades, que tienen vías particulares de reproducción, siendo este proceso el objetivo a inhibir o inducir apoptosis del agente infeccioso. En este sentido los esteroides muestran un potencial latente como nuevos agentes infecciosos (Tabla 10). Al estudiar las dos hipótesis cuestionadas en la actividad *in silico*, podemos observar que solo en la integrasa del virus del HIV existe una diferencia estadística entre los derivados 3 β Δ 5 y los i-esteroides, siendo estos últimos los de mayor EA. Para la comparación entre los derivados 22-oxocolestanos y espirostanos se obtuvieron 3 con diferencia significativa, con la proteasa del virus del HIV, la *Pseudomonas aeruginosa* Penicillin-Binding Protein 3 y la sterol 14- α demethylase (CYP51) de *C. albicans*, en las proteínas de proliferación viral, presentan mejor energía los espirostanos, mientras que en las proteínas antibacteriales y antifúngicas son mejores los 22-oxocolestanos, lo que demuestra la selectividad que pueden presentar los esteroides hacia algún tipo de infección.

Tabla 6. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Kruskal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia contra blancos moleculares antiinfecciosos.

Target	PDB	Medianas EA (kcal/mol)			KW	Medianas EA (kcal/mol)			KW	Farmaco Ref	EA (kcal/mol)	Lig Ref	EA (kcal/mol)
		3 β Δ 5	i-esteroides	p		22Oxocolestano	espirostando	p					
Proteasa HIV	7UPJ	-5.890	-5.600	0.419	-4.906	-5.965	0.008	-	Darunavir	-7.015	-	-	
Integrasa HIV	3LPU	-2.652	-4.540	0.027	-3.002	-4.184	0.071	-	Lamivudine	-5.494	-	-	
Transcriptasa HIV	IREV	-3.738	-4.061	0.119	-4.270	-4.045	0.854	-	Abacavir	-7.415	-	-	
Neuraminidasa HNN5	3NSS	-3.463	-3.307	0.817	-3.542	-3.244	0.086	-	Oseltamivir	-5.711	-	-	
Mproteasa Covid	5RGG	-2.892	-2.895	0.545	-3.476	-2.848	0.143	-	NZD	-3.094	-	-	
FTSZ	6RVM	-2.928	-2.888	1.000	-3.102	-2.878	0.426	-	Curcumina	-4.135	-	-	
Kass	2VB8	-3.260	-3.981	0.453	-3.451	-3.423	0.358	-	Tioloactomicina	-6.713	-	-	
KPC2	3RXX	-5.304	-4.821	0.073	-4.901	-5.235	0.245	-	Relebactam	-5.293	-	-	
30S ribosomal	1HNW	-4.257	-4.683	0.299	-4.763	-4.148	0.111	-	Tetraciclina	-6.642	-	-	
CAT III	3CLA	-4.023	-4.170	0.644	-4.295	-3.903	0.221	-	-	-	Cloranfenicol	-5.325	
PABP3	6IIE	-3.641	-3.987	0.005	-4.374	-3.705	0.032	-	amoxicilina	-6.216	-	-	
SaFab	6YUR	-6.360	-6.596	0.157	-7.991	-6.478	0.134	-	Triclosan	-6.961	-	-	
PNBChlamidia	6IIF	-3.509	-3.216	0.356	-3.495	-3.216	0.759	-	amoxicilina	-4.994	-	-	
CYP51Chlamidia	5TZ1	-4.086	-4.425	0.488	-4.998	-4.046	0.003	-	tetrazole	-4.949	-	-	
1,3Glucanase	3N9K	-4.810	-4.507	0.419	-4.709	-4.782	0.624	-	Apegina	-7.086	1,3 Glucano	-6.846	
Chitinase B	7CB1	-6.790	-6.325	0.248	-6.530	-6.570	0.582	-	FOO	-7.856	Frg Chitina	-5.707	

El fenómeno observado para la integrasa del HIV con derivados de tipo espirostanos, los que mostraron mayor energía de acoplamiento fueron los derivados de la pennogenina (**1b**) donde la materia prima presenta una energía de acoplamiento mayor al lamivudine (fármaco de referencia) aunque el derivado i-esteroideo **4b** incrementa su energía en 0.3 kcal/mol con respecto al **1b**, debido a la región hidrofóbica alrededor de la Gly-118 y la Val-113, mientras que **1b**, al presentar el hidroxilo en C-6 no permite la formación de interacciones hidrofóbicas alrededor de este sitio, lo que genera un espaciamiento del esteroide hacia el Trp-132, alejando al hidroxilo en C-17 de la Thr-122, con quien forma una interacción de tipo polar, en cambio en **4b** esto se invierte, lo que resulta en el incremento de la EA, destacando que

estos son aminoácidos clave para la inhibición como se observa en el diagrama de interacción del lamivudine (Figura 24).

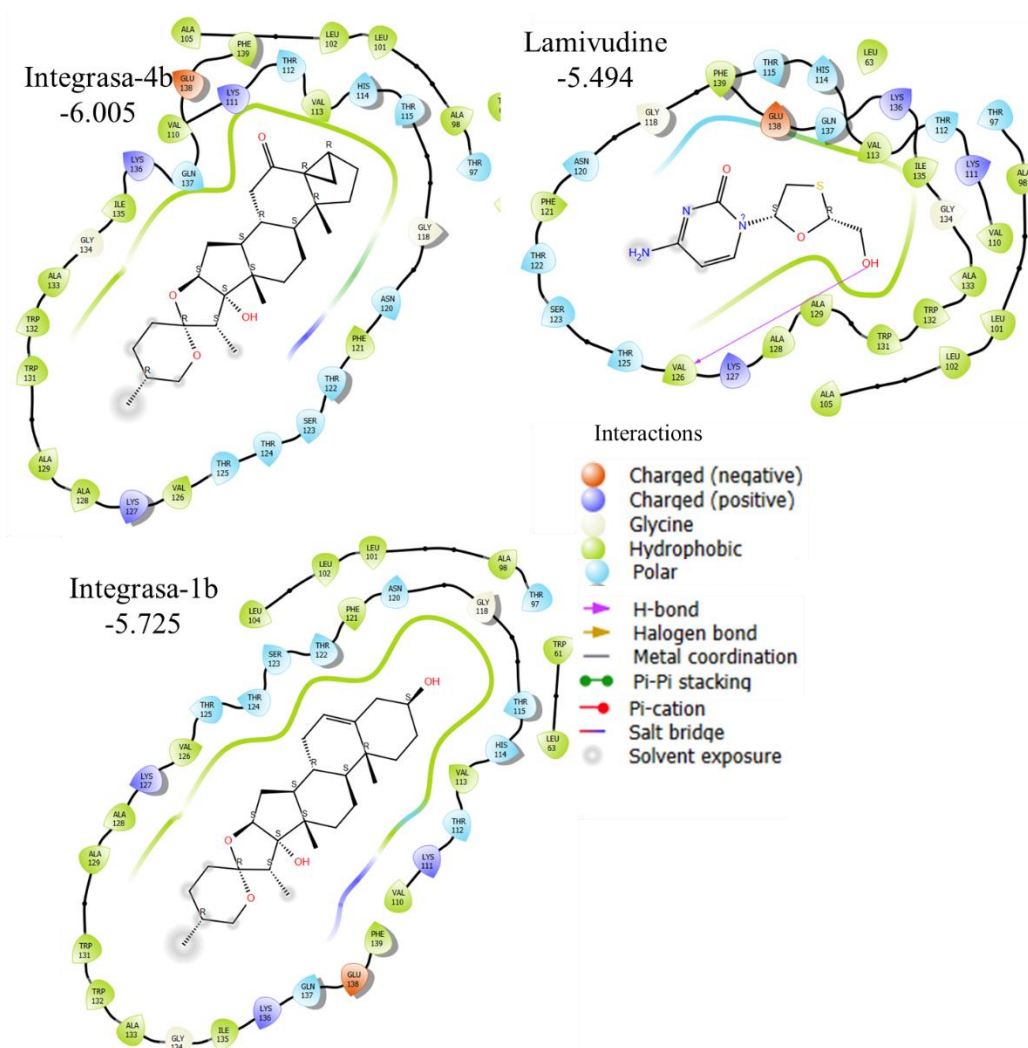


Figura 24. Diagrama 2D de interacción en la integrasa HIV.

Por otro lado, para la inhibición de transcriptasa HIV, los derivados espiroestánicos presentan mejor energía debido a la rigidez de la estructura, porque el sitio catalítico de esta enzima es reducido, dado esto, la cadena lateral libre de los derivados 22-oxocolestánicos resulta es una disminución de la energía dado la alta movilidad de este sitio. Aunque particularmente esto favorece la formación de nuevas interacciones de puente de hidrogeno con la Lys161 y con la Arg172; en contraposición los derivados i-esteroidales espirostanicos, presenta la interacción por puente de hidrogeno con la Ile135, además atracción polar con el Asn136 y Asn137 y una capa completamente hidrofóbica con los anillos A, B y C. En la cadena lateral los oxígenos del espiroacetal forman atracción de carga positiva con la Lys173 y Arg172, lo que incrementa considerablemente la EA (Figura 25). Un dato particular de esta proteína es su facilidad de hidratación, y particularmente en el anillo A, con la contracción de anillo se

logra un volumen que funciona como sitio de hidratación lo que facilita una interacción directa, pero genera un efecto menor que el abacavir. Es decir, que si bien los compuestos podrían interaccionar en el sitio activo no tendrían una función mejor que este fármaco, aunque sí un efecto inhibitor a dosis altas, a diferencia del caso de la transcriptasa, pero energéticamente permitiría un efecto doble en ambas proteínas sin efecto en la proteasa por el nivel energético.

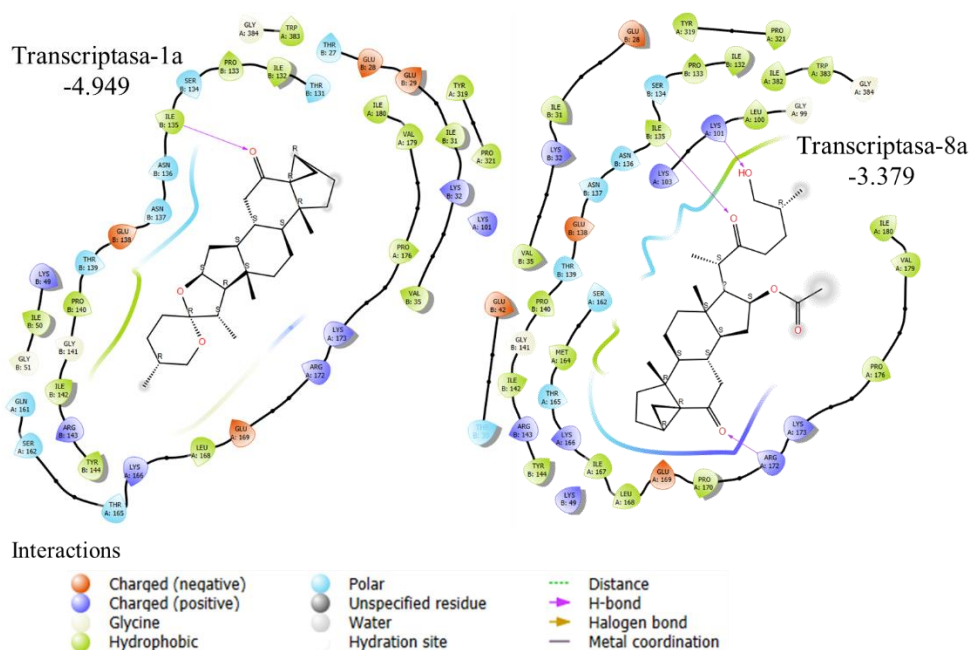


Figura 25. Diagrama 2D de interacción en la transcriptasa HIV

Al analizar puntualmente las estructuras se determinó un potencial antiviral particularmente por algunas estructuras, aunque no a nivel familia (Tabla 7), contra la proteasa de HIV solo el i-esteroide 22-oxocolestánico derivado de la pennogenina presenta una EA mejor que algún fármaco de referencia, mientras que contra la Integrasa del HIV son los espirostanos, lo que permitirá un diseño selectivo contra una de éstas, por otro lado, para influenza no se encontró compuestos con potencial latente, mientras que para la proteasa del virus Sar-Cov2 son los 22-oxocolestanos de pennogenina y 7-oxodiosgenina.

Tabla 7. Moléculas con potencial antiviral.

Diana/tipo	3βA5	i-esteroides
Proteasa HIV	-	8b
Integrasa HIV	1a,1b,1c	4a,4b
Transcriptasa HIV	-	-
Neuraminidasa HNN5	-	-
M. Proteasa Covid	5b,5d	8b,8c,8d

Por otro lado, para la función antifúngica existen varias alternativas de tratamiento, con diferencia estadística encontramos a la CYP51, en particular de *Candida albicans* donde los derivados 22-oxocolestánicos presentan mejor energía inclusive que los fármacos de referencia, esto debido a la formación de puentes de hidrogeno de la cadena lateral con Gly59A, Gln67A, Trp54A y Trp54B así como atracción electrostática de carga negativa con el Glu70B y, generando un sitio activo hidrofóbico alrededor de la parte alifática de la cadena lateral, mientras que las estructuras espirostánicas si bien presentan interacciones polares alrededor de cada región polar, la estructura se invierte de manera que en el sitio catalítico hidrofóbico se colocan los anillos A y B que, aunque estos son hidrofóbicos el hidroxilo en C-3 disminuye la EA al regenerar repulsión, además de no presentar los puentes de hidrógeno con la cadena lateral como en los derivados 22-oxocolestánicos.

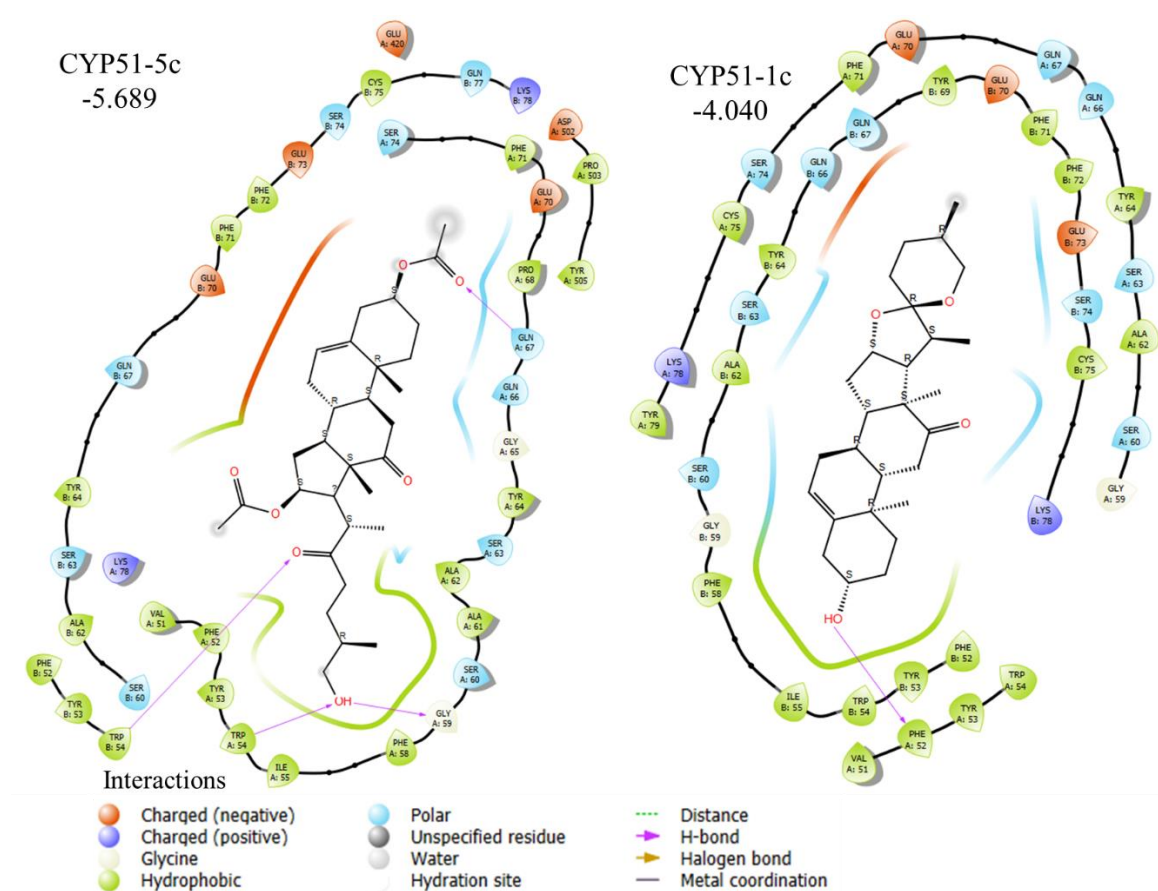


Figura 27. Interacciones 2D con la CYP51 de *Candida A.*

Particularmente, al analizar la EA con respecto al fármaco de referencia y/o ligando endógeno, se presentan estructuras con potencial específico, para el caso de la proteína de división celular FTSZ es el derivado **8c** el que puede inhibir este proceso en particular por la interacción del grupo carbonilo en C-12 mientras que para la hidrolasa KPC2 son todos los

derivados espiroestánicos **1a**, **1b** y **1d** los que presentan potencial inhibitorio, e i-esteroides de diosgenina y pennogenina, sin embargo una función contra Kass, el fragmento ribosomal 30S y las asociadas a penicilina, ningún compuesto presenta un potencial latente contra bacterias.

Tabla 8. Moléculas con potencial antifúngico y antibiótico.

Diana/tipo	3$\beta$$\Delta$5	i-esteroides
FtsZ	-	8c
Kass	-	-
KPC2	1a,1b,1d,2c,2d,5b	4a,4b
30S ribosomal	-	-
CAT III	1d	8c
PABP3	-	-
PABC3	-	-
SaFab	-	8d
CYP51Clamidia	5c,5d	8a,8b,8c
1,3 Glucanase	-	-
Chitinase	5a	-

Por otro lado, para el caso de antifúngicos contra la proteína Fab solo el compuesto **8d** es el que presenta una buena energía de acoplamiento como inhibidor de la proliferación fúngica, aunque contra la CYP51 es mayor el número de estructuras que presentan un potencial latente son los 22-oxocolestános tanto i-esteroides como 3 β Δ 5; denotando que la función biológica contra ésta va vía inhibición competitiva contra el sustrato de esta demetilasa. También se encuentran los hongos denominados fitopatógenos, donde destacan dos mecanismos la inhibición de la 1,3 β -glucanasa y la chitinasa, encargadas de fragmentar sus sustratos para facilitar el proceso de infección vegetal, resultando en que solo el derivado 22-oxocolestánico de diosgenina es el que presenta una EA mejor que la chitina, lo que le confiere un potencial inhibitorio competitivo, inclusive con un potencial mayor al F00 inhibidor experimental de referencia, caso particular porque el acetato en C-3 permite la interacción en el sitio activo, porque al formar el i-esteroide ésta se pierde disminuyendo considerablemente la EA, lo que demuestra la alta selectividad que presenta esta estructura contra dicha proteína.

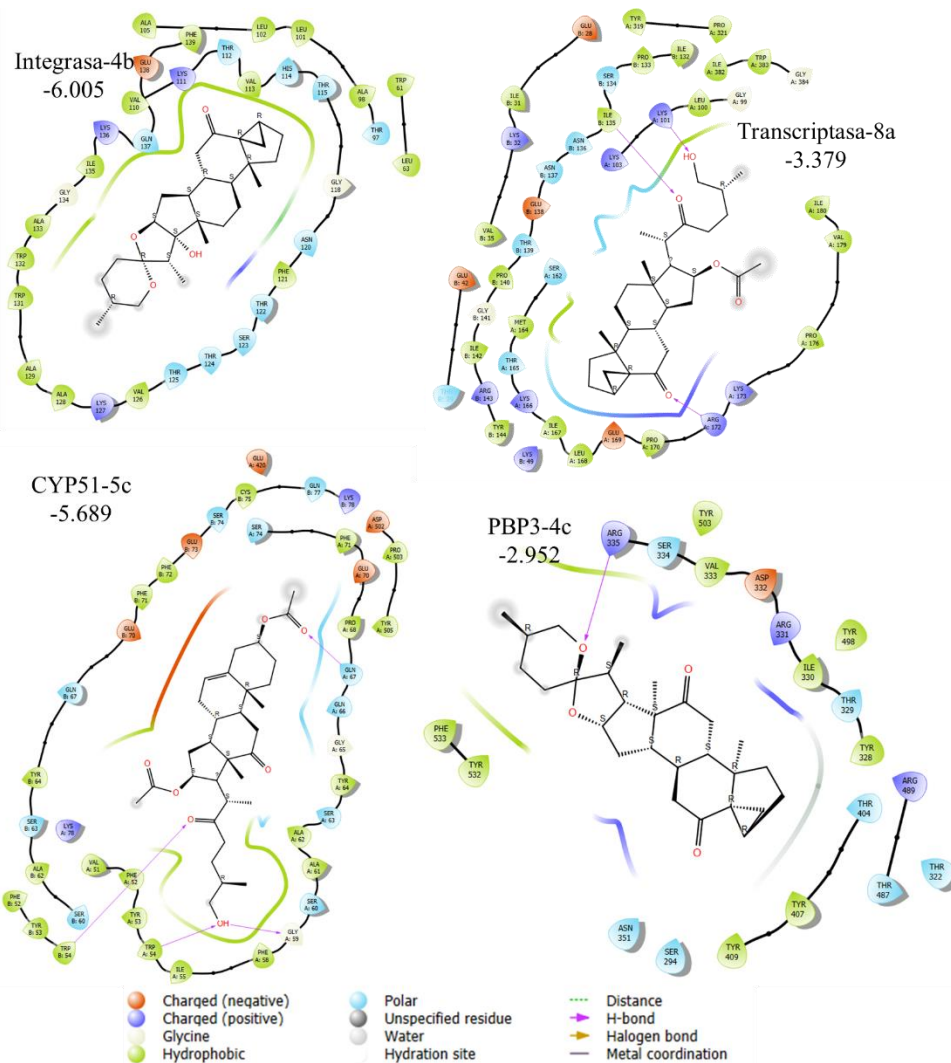


Figura 28. Interacciones 2D de moléculas multifuncionales con su respectiva proteína.

1.4.3 Potencial contra enfermedades sistémicas

Si bien el cáncer y las infecciones bacterianas o fúngicas afectan a todo el sistema, estas enfermedades se tratan de manera aislada, otro grupo de enfermedades son aquellas resultantes de la alteración hormonal o desequilibrio del metabolismo, lo que conlleva una respuesta compleja de manera sistémica, para los esteroides se destacan los receptores hormonales esteroidales y los corticoesteroides, así como de respuesta a glucosa vía la aldoreductasa y a respuesta de Kawasaki con la calceurina. En la Tabla 9, podemos observar las medianas de interacción en EA con cada una de estas proteínas asociadas a la respuesta metabólica y sistémica, mostrando energías bajas comparado con los inhibidores de referencia, dado la alta especificidad de cada uno de estos, lo cual no es necesariamente

desalentador ya que permite al presentar efecto en otras proteínas como se observó previamente, se esperaría un efecto mínimo secundario a nivel sistémico.

Tabla 9. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Krukal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia con cada blanco molecular contra enfermedades sistémicas.

Target	PDB	Medianas EA (kcal/mol)			KW	Medianas EA (kcal/mol)			Farmaco ref	EA (kcal/mol)	Lig Ref	EA (kcal/mol)
		3 β Δ 5	<i>i</i> -esteroides	<i>p</i>		22Oxocolestano	espirostanos	<i>p</i>				
AR	2AMA	-2.252	-2.434	0.843	-2.251	2.316	0.838	-	-	DHT	-11.129	
ER α	1A52	-2.864	-3.031	0.336	-2.899	-3.026	0.821	4hidroxitamoxifeno	-10.725	Estradiol	-10.665	
ER β	5TOA	-2.997	-2.964	0.773	-3.317	-2.840	0.111	-	-	Estradiol	-10.013	
MR	3VHU	-2.963	-2.452	0.035	-2.653	-2.809	0.339	Espironolactona	-11.236	Aldosterona	-9.868	
GR	4CJS	&	&	&	&	&	&	Dexametasona	-10.947	Cortisol	-10.155	
Aldoreductasa	4PR4	-5.025	-5.471	0.299	-5.348	-5.228	0.54	Lidorestat	-7.440	-	-	
Calceurina	1MF8	-5.094	-4.924	0.299	-4.983	-5.061	0.426	cyclophilin	-8.902	-	-	

& Las estructuras no caben dentro del sitio activo.

A nivel estadístico se encontró diferencia únicamente en el receptor de mineralocorticoides, entre los *i*-esteroidales y los 3 β Δ 5, con una mayor energía por parte de estos últimos, principalmente por los tosilatos esteroidales, donde este grupo forma puente de hidrógeno con las Phe956 y con la Ala958, mientras que los *i*-esteroides presentan puente de hidrógeno con la Ser949, e interacciones hidrofóbicas en el centro del esteroide (Figura 29).

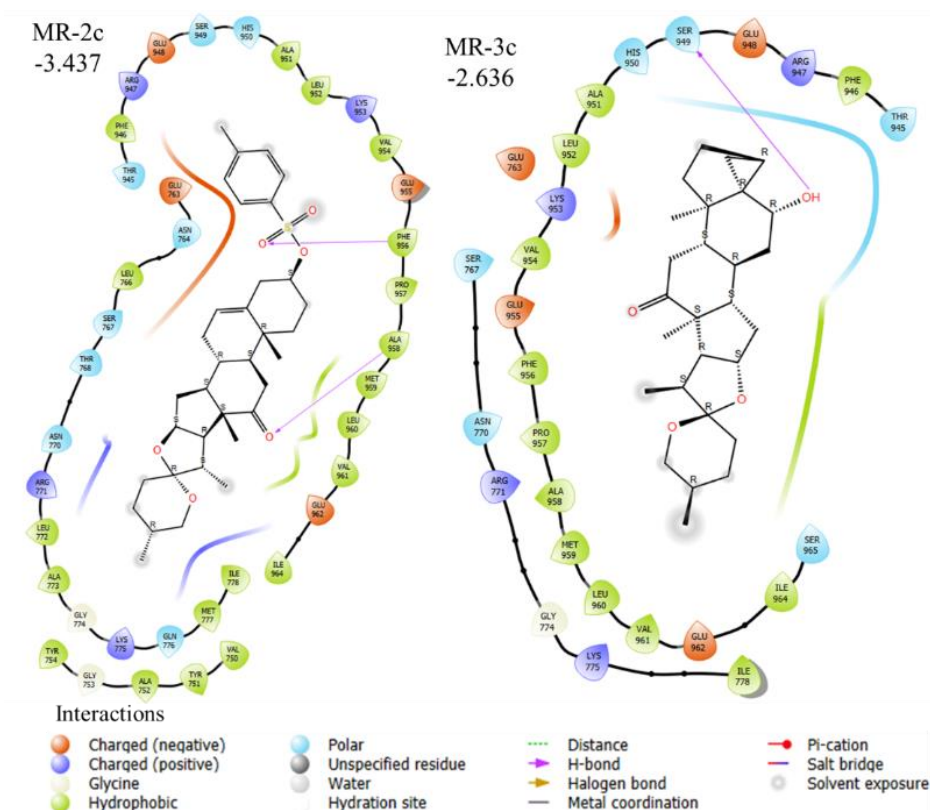


Figura 29. Diagrama 2D de interacción en el receptor de mineralocorticoides.

Por otro lado, al analizar particularmente el conjunto de proteínas asociadas a diversas rutas metabólicas destacan la 5 α -reductasa, la CA9, la aldoreductasa y el PDGFR, donde el derivado **4d**, presenta potencial comparado contra el inhibidor de referencia, mismo efecto observado para PDGFR por los **4b**, mientras que los derivados 22-oxocolestánicos tienen potencial contra las enzimas aldoreductasa y la CA9. Estas interacciones logradas dado la formación de puentes de hidrógeno con la cadena lateral, denotan que la función de la cadena lateral además de aumentar la EA cambia la selectividad específicamente; de igual forma la función i-esteroidal regula efectos en sitios activos altamente hidrofílicos.

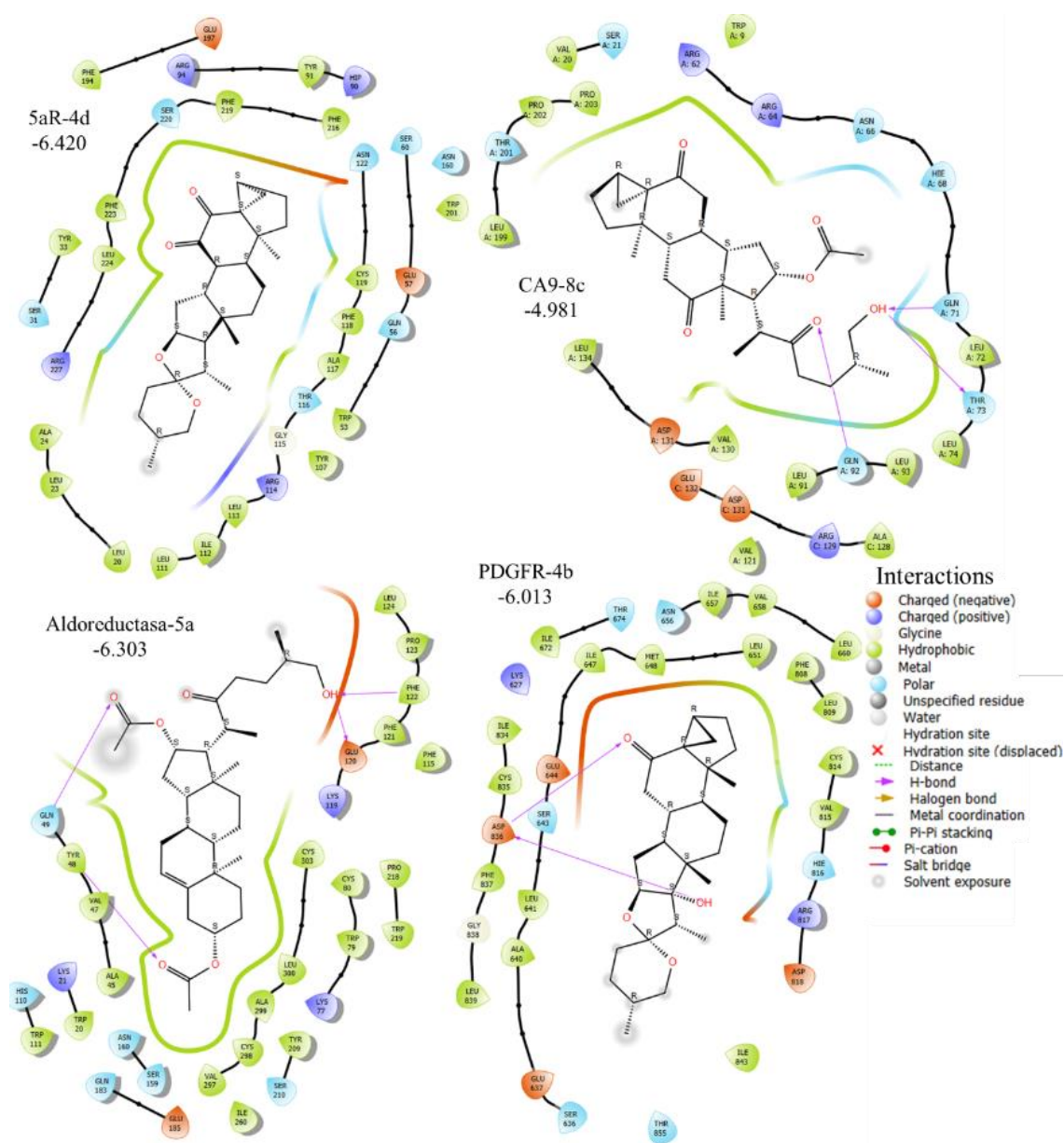


Figura 30. Diagrama 2D de interacción de estructuras con potencial contra enfermedades sistémicas.

1.4.4 Potencial contra enfermedades neurodegenerativas

Si bien enfermedades infecciones, el cáncer o las enfermedades sistémicas, son de alta incidencia en la salud humana, a nivel de órgano funcional también podemos encontrar diversas enfermedades, un grupo que ha afectado considerablemente la salud son las neurodegenerativas, las cuales se encuentran asociadas a diferentes proteínas, destacando la AChE, asociado a los niveles del neurotransmisor acetil colina, también un opción indirecta es vía la inhibición de la BACE1 de forma que se detenga el proceso degenerativo, de igual forma el cambio de la actividad el receptor NMDA y la inhibición de la QNR1 y la MAOA, al estudiar las estructuras diseñadas, en la Tabla 10 podemos observar que los derivados esteroidales tienen altos niveles energéticos en la AChE, el receptor NMDA y la QNR1, como nuevos inhibidores o bloqueadores de estos, particularmente a nivel estadístico se observó una diferencia estadística para la AChE y la QNR1; particularmente, para la AChE dicha diferencia se mostró para los 22-oxocolestánicos contra los espirostanos, con una mayor energía por los primeros, inclusive a nivel superior del sustrato (la acetilcolina), mientras que para la QNR1 la diferencia se observa entre la 3 β Δ 5 y los *i*-esteroides, con una mayor energía por estos últimos inclusive que el dicumarol, inhibidor de referencia, resultando en un potencial a nivel estadístico.

Tabla 10. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Kruskal Wallis, comparados con ligando y fármaco de referencia con cada blanco molecular contra enfermedades neurodegenerativas.

Target	PDB	Medianas EA (kcal/mol)			Medianas EA (kcal/mol)			Farmaco ref	EA (kcal/mol)	Lig Ref	EA (kcal/mol)
		3 β Δ 5	<i>i</i> -esteroides	<i>p</i>	22Oxocolestano	espirostando	<i>p</i>				
AChE	4MOE	-4.069	-4.062	0.705	-4.180	-3.866	0.011	Donepizilo	-5.459	Acetilcolina	-3.934
NMDA Ro25	3QEM	-2.958	-2.627	0.225	-2.605	-2.829	0.198	Ro25	-3.709	-	-
BACE1	6C2I	-3.178	-3.812	0.166	-3.518	-3.815	0.142	Verubecestat	-4.298	-	-
MAOA	2Z5Y	&	&	&	&	&	&	Norepinefrina	-8.418	Serotonina	-8.908
QNR1	3JSX	-3.533	-4.013	0.003	-3.652	-3.829	0.668	Dicumarol	-3.771	-	-

& Las estructuras no caben dentro del sitio activo.

Para explicar esta diferencia energética estadística podemos observar en la Figura 31 para la QNR1 que la función *i*-esteroidal permite una interacción hidrofóbica con la Met44A, Ala43A, Try42A y Leu41A, mientras que la formación el carbonilo en C-6 genera la formación de puente de hidrógeno con la Ser51B, por parte de la cadena lateral el acetato en C-16 genera una interacción de carga positiva con la Arg14C y la función 22-oxo y la 26-hidroxilada, da lugar a la formación de puentes de hidrógeno con la Thr15A, Arg14A y Glu13A, mientras que al introducir el acetato en C-3 genera una interacción desplazada en el sitio catalítico, perdiendo las interacciones observadas en el anillo A, este movimiento en el sitio genera también la pérdida de los puentes de hidrógeno con la cadena lateral, presentando únicamente uno con la Ser12A, y dado el ambiente altamente cargado positivamente en el sitio catalítico la ausencia de grupos electronegativos disminuyo la EA ya que el esteroide presenta un carácter mayoritariamente hidrofóbico.

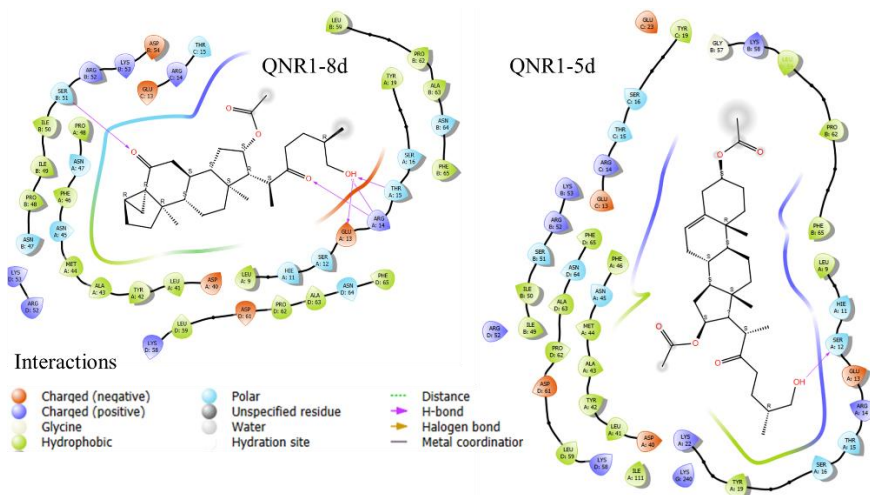


Figura 31. Análisis de interacciones 2D en la quinona reductasa tipo 1.

Para el caso de la AChE, donde los espirostanos tienen una mayor energía de acoplamiento que los 22-oxocolestanos, debido principalmente a la rigidez del sitio catalítico y el tamaño de éste, al comparar la acetilcolina o los inhibidores comerciales como el donepezilo, se aprecia un menor volumen que los esteroides. Lo que se denota es la formación de interacciones con el Asp400 y Arg393, mientras que con los derivados 22-oxocolestánicos no se observa este efecto.

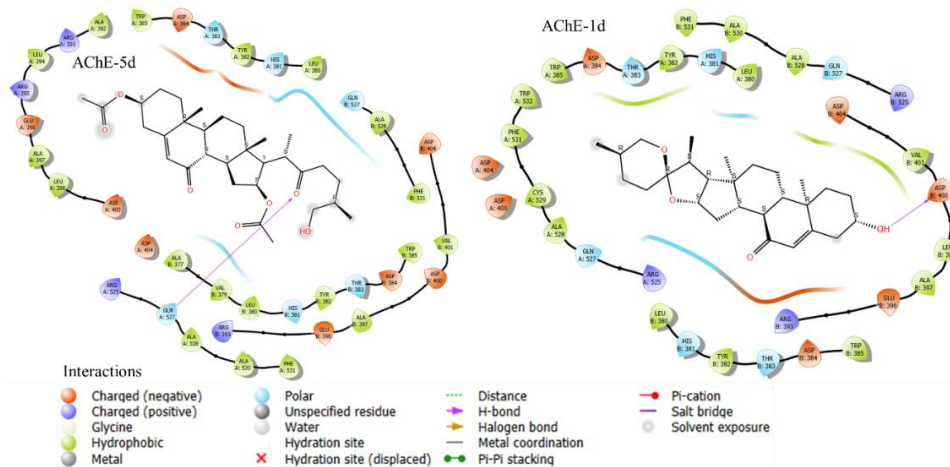


Figura 32. Análisis de interacciones 2D en la acetilcolinesterasa.

Aunque estadísticamente se observa diferencia en estas dos proteínas, de manera particular al analizar estructura a estructura a nivel energético se observa para la AChE y la QNR1 (Tabla 11) varias estructuras con potencial inhibitorio, destacando los derivados de materia prima y 22-oxocolestánicos $3\beta\Delta 5$, mientras que para los derivados i-esteroidales, cuando está presente el espirostanos es necesario la función 6-hidroxilados, pero al pasar a 22-

oxocolestanos son los derivados 6-cetónicos, esto para la AChE, mientras que para la QNR1 los i-esteroides, independientemente si son espirostanos o 22-oxocolestanos presentan mayor energía de acoplamiento. Por otro lado, para el bloqueo del receptor NMDA, vía inhibición alostérica únicamente por el derivado 22-oxocolestánico de botogenina, mientras que para la BACE1 son las materias primas las que presentan una mayor energía únicamente el derivado i-esteroidal de la diosgenina es el que tienen una energía suficiente para inhibir a esta enzima, como se observa en la Figura 33.

Tabla 11. Estructuras con efecto contra enfermedades neurodegenerativas.

Diana/tipo	3 β Δ 5	i-esteroides
AChE	1c,1d,2c,5a,5b,5c,5d	3a,3c,3d,8a,8b,8d
NMDA Ro25	1c	-
BACE1	1a,1b,1c,1d	4a
QNR1	1b,1c,1d,2d	3a,3b,3c,4a,4b,4d,8a,8b,8d

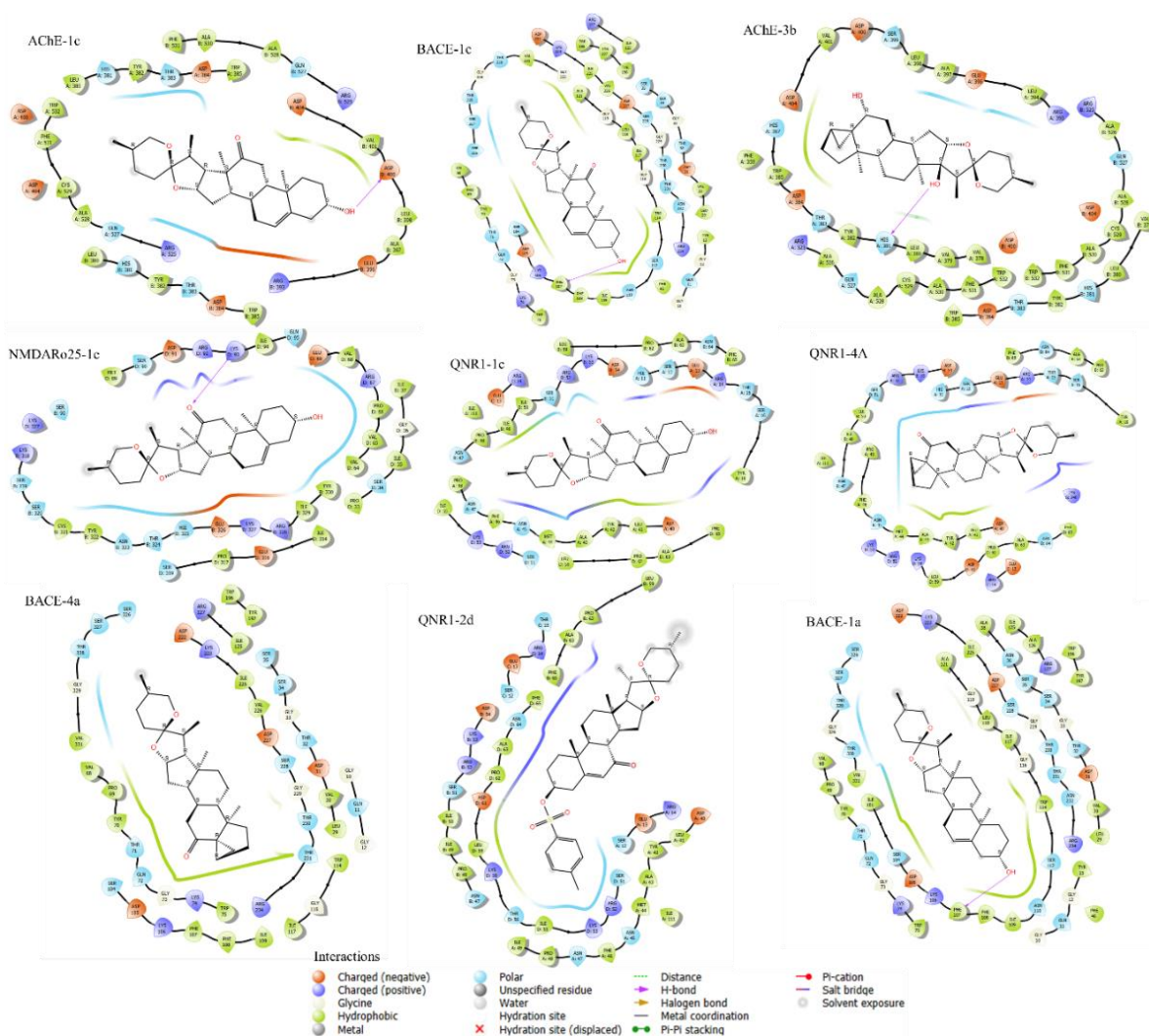


Figura 33. Diagrama 2D de estructuras multifuncionales esteroidales.

1.4.5 Potencial promotor de crecimiento vegetal

Los *i*-esteroides han demostrado un gran potencial a favor de la salud humana y vegetal (caso particular contra fitopatógenos), pero no el único campo en que los esteroides han demostrado actividad biológica, otra opción es la promoción del crecimiento vegetal, esto a diversos niveles, principalmente se busca promover la acción germinadora (vía auxinas o estrigolactonas) la proliferación celular vegetal (vía receptor del gen BRI1 y el receptor de jasmonatos) y finalmente la elongación celular (vía receptor del gen BRI1 y el receptor de giberelinas). En la Tabla 12 podemos observar el análisis estadístico de las medianas donde se denota que en el caso de la vía de jasmonatos y giberelinas los esteroides no caben en el sitio activo del receptor, en los otros tres si existe una interacción aunque a nivel de medianas no mayores por parte de las moléculas propuestas hacia los ligandos de referencia, pero se debe denotar que como la función es vía activación lo que se busca es una respuesta dado ciertas interacciones y puede variar en nivel pero aun así presentar un efecto promotor parcial.

Tabla 12. Medianas de EA (kcal/mol) analizados vía Krukal Wallis, comparados con ligando y promotor de referencia.

Target	PDB	Medianas EA (kcal/mol)			Medianas EA (kcal/mol)			Promotor ref	EA (kcal/mol)	Lig Ref	EA (kcal/mol)
		3 β Δ 5	<i>i</i> -esteroides	KW <i>p</i>	22Oxocolestano	espirostanos	KW <i>p</i>				
Jasmonato Receptor	3OGL	&	&	&	&	&	&	-	-	A. Jasmonico	-8.552
Giberelina Receptor	3ED1	&	&	&	&	&	&	5280379	-10.771	GA4	-10.659
BRI1	3RGZ	-6.270	-5.985	0.488	-5.981	-6.134	0.298	-	-	Brasinolida	-7.074
Estrigolactonas R	5DJ5	-4.799	-4.248	0.386	-5.904	-4.121	0.037	-	-	strigolactona	-8.14
Auxinas R	2PIP	-3.658	-3.548	0.773	-3.884	-3.362	0.076	-	-	Auxina 1	-6.794

& Las estructuras no caben dentro del sitio activo.

Al estudiar el conjunto de moléculas de manera individual, solo para la proteína asociada al gen BRI1 (Figura 34) se puede observar las moléculas con mayor potencial promotor de crecimiento vegetal, al analizar la interacción en comparación con la brasinólida se destaca una interacción hidrofóbica en el centro de la molécula y la formación de dos puentes de hidrogeno con la Ser647 y Thr729, así como la interacción polar y de carga positiva por parte del anillo A de la estructura, este último simulado por el hidroxilo en C-3 de las nuevas moléculas diseñadas y particularmente para los derivados 22-oxocolestánicos obtenidos, se presenta una atracción hidrofóbica por el núcleo esteroide y se presenta el puente de hidrogeno con la Ser647, lo que genera un potencial latente de estos derivados como activadores de la respuesta de dicho gen.

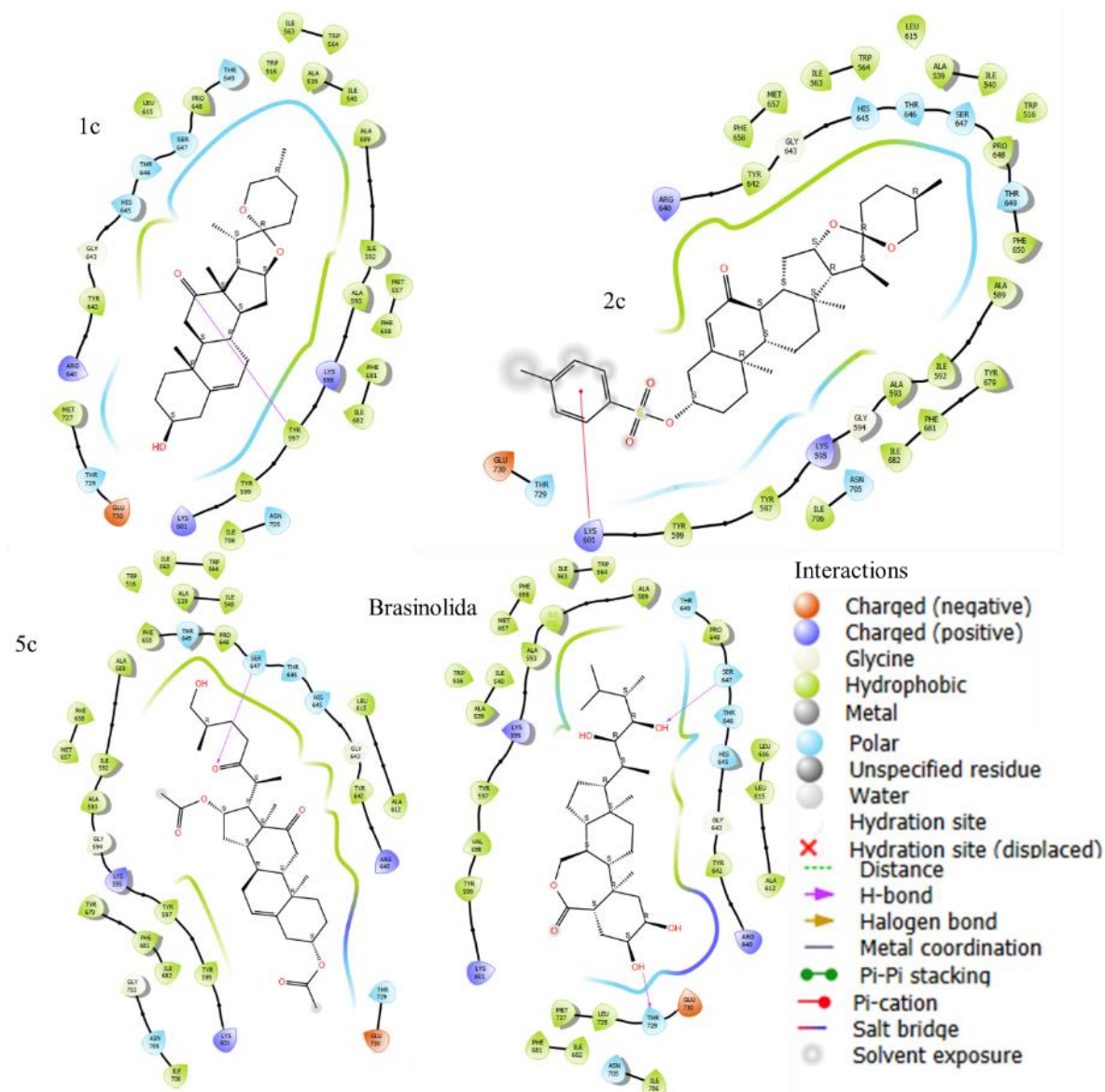


Figura 34. Diagrama 2D de interacción con potencial promotor de crecimiento vegetal.

1.5 Propiedades ADMETx

Una molécula puede presentar una excelente actividad biológica en modelos *in vitro* e *in vivo*, pero para pasar a función en humanos es necesario estudiar el proceso ADME (administración, distribución, metabolismo y excreción), así como también la toxicidad, mediante PASS Online se estudiaron en conjunto todas las moléculas diseñadas y después por separado los grupos de i-esteroides/ β Δ 5 y 22-oxocolestanos/ espirostanos, en la Figura 35 podemos observar los posibles efectos adversos por este conjunto de estructuras diseñadas.

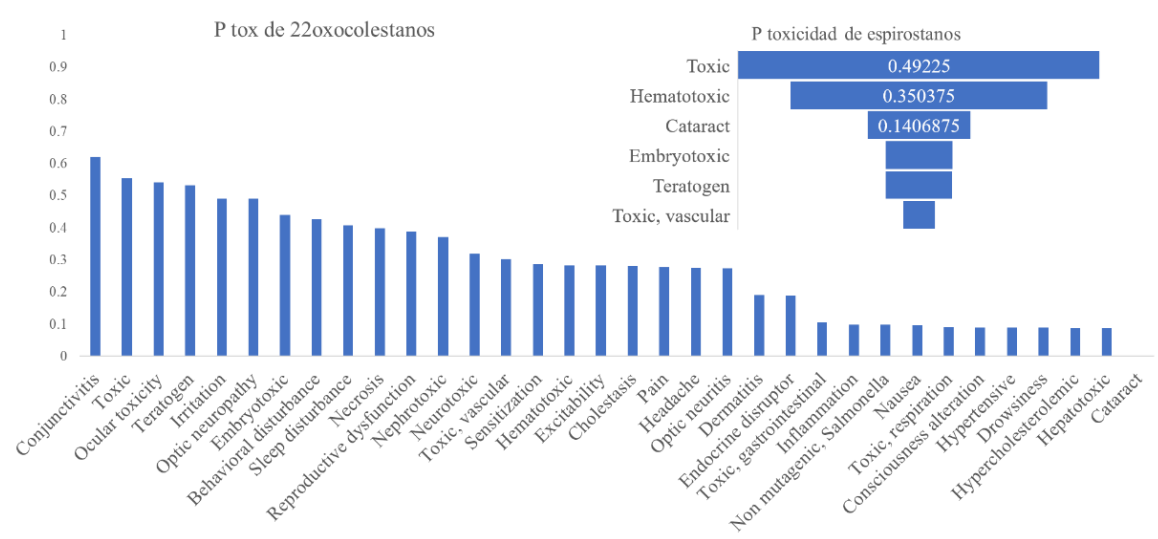
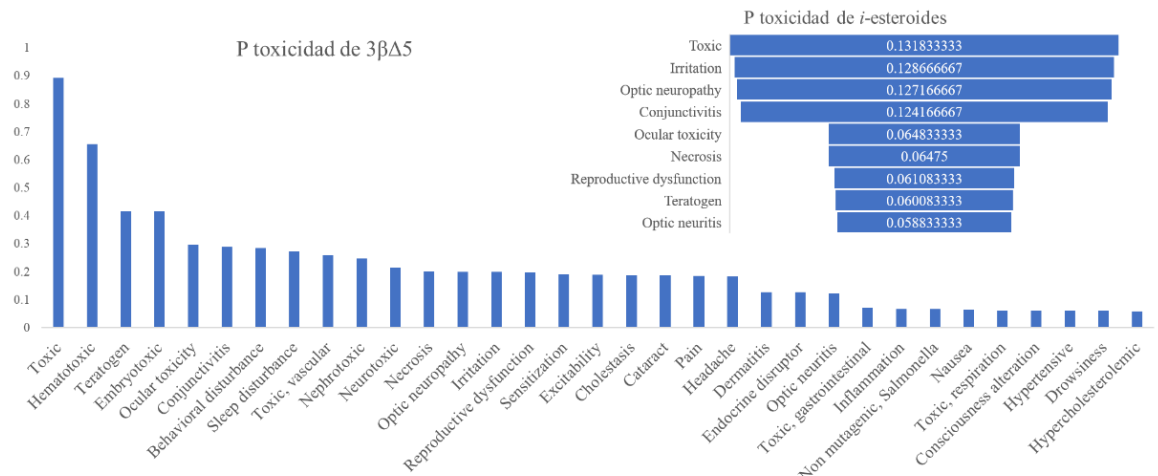
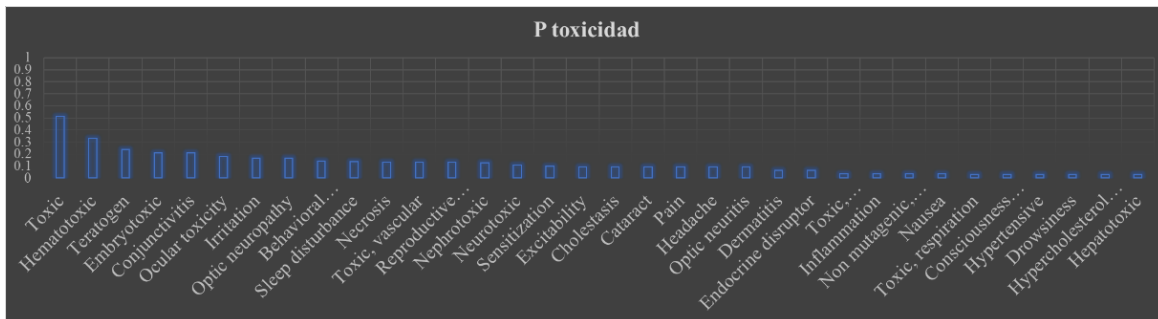


Figura 35. Predicciones de toxicidad por PASS Online.

A nivel global podemos observar que el 52% de las moléculas presentan cierto nivel de toxicidad, destacando hemotoxicidad, teratogénica y embriotoxicidad. En particular, para los i-esteroides se observa el 13% de probabilidad de presentar efectos tóxicos, mientras que por ejemplo los derivados 3β-hidroxilados-Δ5 tienen una probabilidad de hasta el 85%, sumando una posible toxicidad ocular. Por lo que se evidencian las ventajas de utilizar i-esteroides

como plataformas de posibles fármacos. Al comparar la función en la cadena lateral tenemos un equilibrio a nivel de toxicidad, aunque con más variedad por parte de los 22-oxocolestanos, pero a nivel probabilidad estos presentan un 61% mientras que los espirostanos solo un 49 %, demostrando que es la función i-esteroidal la que disminuye la toxicidad y no la función en la cadena lateral.

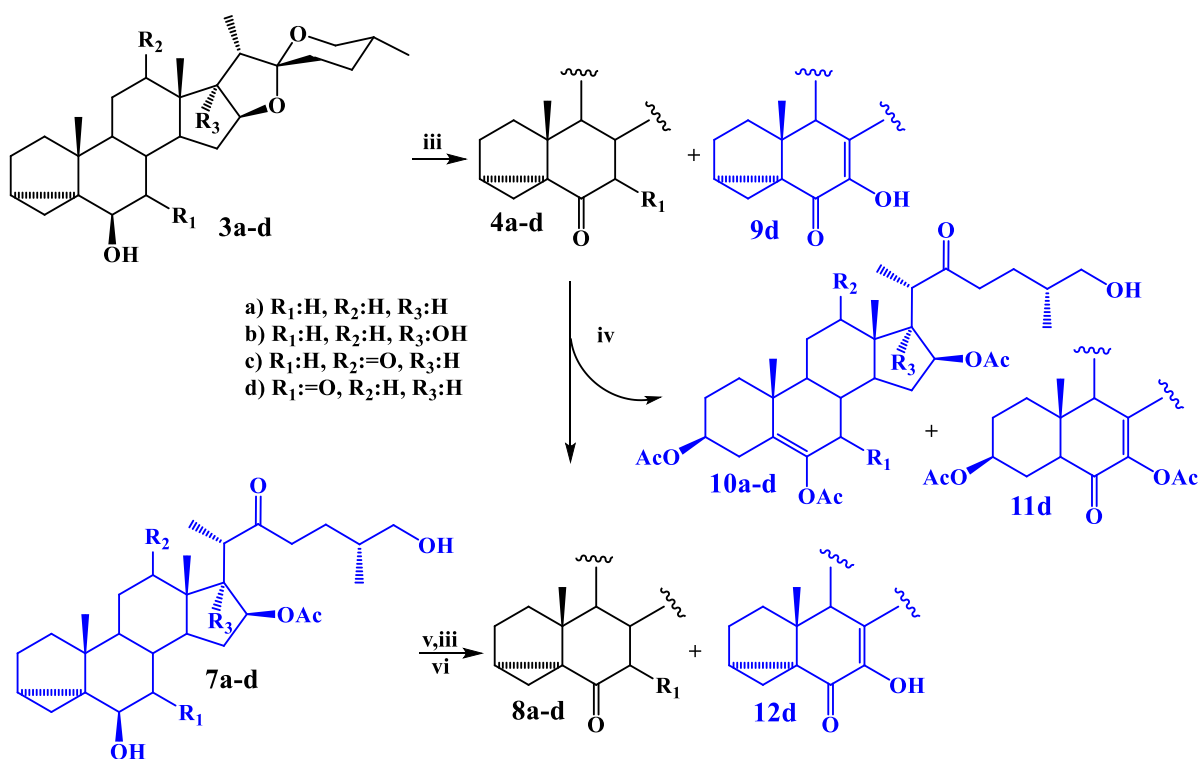
Tabla 13. Análisis de comparación por KW de parámetros ADMETx por Qikprop

Clave	Numstars	CNS	QPlogPo/w	QPlogS	QPlogHERG	QPPCaco	QPlogKhsa	%HumanOralAbsorption	RuleOffFive	RuleOfThree	Jm	%ADMETx
1a	3	1	6.137	-7.338	-4.305	3393.964	1.649	100	1	1	3.87E-05	84.44
1b	2	0	5.577	-7.223	-4.256	2231.328	1.407	100	1	1	8.42E-05	88.89
1c	1	0	5.097	-7.133	-4.364	1645.52	1.253	100	1	1	4.58E-05	91.11
1d	1	0	5.029	-7.06	-4.267	1449.09	1.243	100	1	1	4.54E-05	91.11
2a	3	0	7.87	-10.305	-6.103	2418.5	2.138	100	2	1	4.10E-07	84.44
2b	3	-1	7.174	-9.635	-5.721	1046.145	1.989	100	2	1	3.95E-07	86.67
2c	3	-1	6.71	-9.245	-6.059	1152.612	1.624	95.116	2	1	1.15E-06	86.67
2d	3	-1	6.643	-9.255	-6.078	1027.813	1.611	93.831	2	1	8.81E-07	86.67
3a	3	1	6.105	-7.67	-4.1	4189.58	1.621	100	1	1	6.27E-05	86.67
3b	4	0	5.573	-7.077	-4.023	2904.828	1.385	100	1	1	1.56E-04	84.44
3c	1	0	5.103	-6.922	-4.043	2073.993	1.241	100	1	1	9.26E-05	91.11
3d	1	0	5.071	-6.798	-4.009	2538.87	1.2	100	1	1	1.83E-04	91.11
4a	2	1	5.98	-7.478	-4.02	4044.497	1.541	100	1	1	7.28E-05	88.89
4b	1	0	5.547	-7.275	-4.057	2548.702	1.426	100	1	1	6.13E-05	91.11
4c	2	0	4.828	-6.551	-4.09	1956.665	1.029	100	0	1	1.55E-04	88.89
4d	0	0	4.778	-6.281	-3.92	2347.794	0.982	100	0	1	4.12E-04	91.11
5a	1	-2	5.46	-7.454	-5.041	355.129	1.203	78.644	2	1	7.86E-06	82.22
5b	1	-2	5.55	-7.65	-5.169	244.271	1.256	76.261	2	1	3.11E-06	82.22
5c	1	-2	4.397	-6.6	-4.985	176.023	0.784	79.922	1	1	1.48E-05	82.22
5d	2	-2	4.322	-6.589	-4.988	152.979	0.771	78.395	1	1	1.14E-05	80.00
8a	0	-2	4.495	-6.097	-4.355	359.844	0.853	100	0	1	1.07E-04	88.89
8b	0	-2	4.502	-6.078	-4.369	237.527	0.877	95.828	0	1	6.41E-05	88.89
8c	1	-2	3.458	-5.277	-4.312	196.985	0.437	88.26	0	0	2.25E-04	86.67
8d	0	-2	3.435	-5.311	-4.335	176.887	0.441	87.287	0	0	1.69E-04	88.89

Por otro lado, al analizar los 45 parámetros obtenidos por QikProp para cálculo de propiedades ADMETx, en la Tabla 13 podemos observar el porcentaje de cumplimiento los criterios establecidos para estas predicciones [34] demostrando un porcentaje alto en la mayoría de las estructuras, pero particularmente los derivados i-esteroidales muestran porcentaje mayor a su contra parte, los derivados 22-oxocolestánicos disminuyen dicho efecto para favorecer las propiedades farmacológicas y farmacodinámicas, particularmente los parámetros que tienen una diferencia entre los grupos se observan en la Tabla 13, destacando a la viabilidad de efecto sobre sistema nervioso central (CNS) donde se denota que los compuestos con valores menores a cero no tienen efecto adverso sobre CNS, donde los derivados 22-oxocolestánicos (independiente de su función en C-3) son completamente inactivos, mientras que los derivados i-esteroidales espirostanos tienen un valor de +1, destacando que estos compuestos tienen potencial contra enfermedades neurodegenerativas, resultando como candidatos a los derivados 22-oxocolestánicos. Otros parámetros importantes que deben mantener equilibrio son el coeficiente de reparto ($\text{LogP}_{o/w}$) y la solubilidad (LogS), porque es necesario que las moléculas sean liposolubles para atravesar membrana celular (valores entre -2.0 a 6.5), así como solubles en agua para garantizar vías de administración adecuadas (valores entre -6.5 a 0.5), en contraste los derivados espirostanos su solubilidad es baja, por lo que serán viables solo si funcionan a dosis bajas,

lo cual va sintonía con el porcentaje de adsorción oral, donde los derivados 22-oxocolestánicos son los que presentan baja adsorción gastrointestinal, por parte de los parámetros de toxicidad en estos casos se asocian al bloqueo del canal de potasio (HERG) y la predicción de acoplamiento con el suero albumino humano, a fin de observar bioacumulación y daño a la reproducción celular, siendo de baja toxicidad los parámetros obtenidos por los derivados esteroidales. Finalmente, para garantizar la excreción otro parámetro obtenido es el J_m o la predicción de transporte máximo obtenido para la eliminación del cuerpo, esto se calcula en función de la solubilidad, peso molecular y transporte en piel y glucoproteína, obteniendo la velocidad de transporte y eliminación de masa por hora, o viscosidad cinemática de eliminación obteniendo mejores valores para los derivados de 7-oxodiosgenina.

1.6 Productos secundarios



iii) NBS o Jones, CH_2Cl_2 ; iv) $Et_2O \cdot BF_3, Ac_2O, CH_2Cl_2$; v) TFAA; vi) $NaHCO_3$

Figura 36. Esquema de productos secundarios obtenidos.

El uso de herramientas bioinformáticas para el diseño de moléculas bioactivas como fármacos o promotores de crecimiento vegetal es un proceso cíclico, comúnmente se combina con los resultados biológicos para optimizar las estructuras a fin de mejorar continuamente dicha actividad. Sin embargo, las rutas sintéticas experimentales muchas veces conducen a la obtención de productos secundarios, que inicialmente no fueron estudiados mediante

métodos computacionales. No obstante, resulta interesante analizar el comportamiento teórico de estos compuestos. A continuación, se describe el estudio de los productos secundarios encontrados tras la síntesis de los productos principales. Al realizar el diagrama de interacción mediante STP se obtuvieron blancos moleculares asociados al citocromo P450 de nuevo dada la similitud con las hormonas esteroidales (Figura 37), pero también aparecen nuevas dianas particulares como la proteína de acoplamiento a p53 vía Mdm-2 asociado a cáncer.

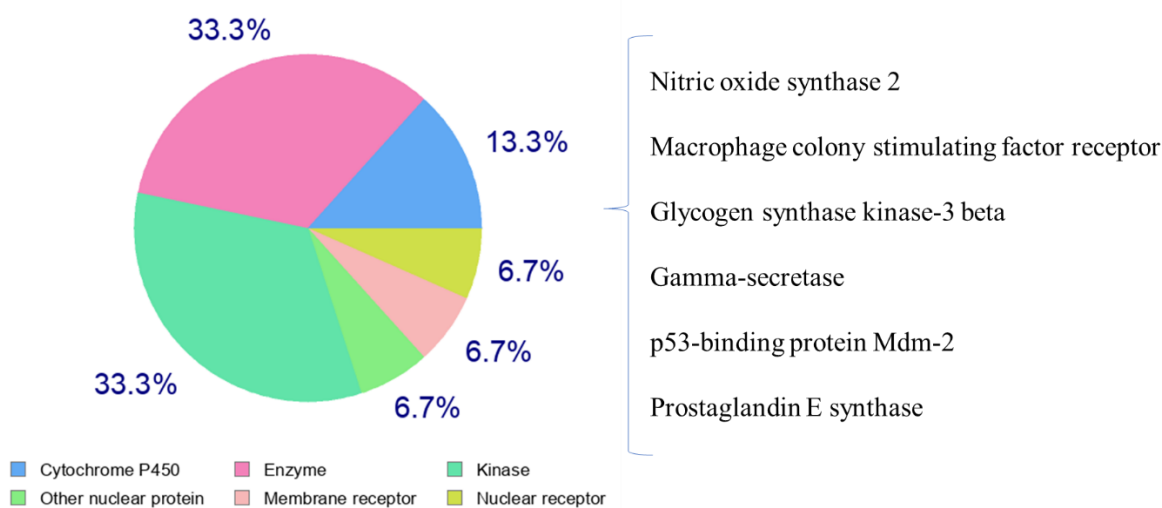


Figura 37. Blancos moleculares específicos de los productos secundarios.

Dado el alto potencial de actividad biológica que presentan estos intermediarios, fue de interés realizar los cálculos de acoplamiento molecular con los blancos moleculares previamente analizados, en la Tabla 14 podemos observar los compuestos que presenta energía de acoplamiento mejor que los ligandos o sustratos endógenos, volviéndolos candidatos a evaluación biológica, denotando que los intermediarios obtenidos presentan inclusive energía de acoplamiento mayor que las moléculas diseñadas previamente, con la formación de los derivados enólicos subproductos de la apertura del espiroacetal de derivados i-esteroidales y particularmente enoles en C-7 resultado de la inestabilidad de los derivados 6,7-dicetónicos.

Tabla 14. Nuevo potencial in silico de docking molecular de productos secundarios.

Diana/tipo	7	10	9d,11d,12d
CA9	7d	-	12d
CA12	7a,7b,7c,7d	10d	12d
FR	-	10c	-
FGFR	7d	10c	-
PDGFR	-	10b	-
Proteasa HIV	-	10a,10c	-
Mproteasa Covid	7a,7b,7d	10a,10b,10c,10d	11d,12d
AChE	7a,7b,7c,7d	10a,10b,10c,10d	11d,12d
BACE1	7c,7d	-	-
QNR1	7a,7b,7d	10a	11d,12d
Aldosa reductora	-	10a	-
KPC2	7c,7d	10b,10c	-
PABP3	-	10c	-
CYP51Clamidia	7b,7c,7d	10a,10b	-
Chitinasa	-	10a,10c	-
Bri1	7a,7b,7c	10c	-

Como potencial anticancerígeno se destaca la inhibición de la CA9 y CA12, para la primera en la Figura 38 se puede observar que los derivados 6-hidroxilados obtenidos por la ruta alterna, generando la formación de un puente de hidrogeno con la Ala128, aunque también el acetato en C-16 y el hidroxilo en C-26 continúan formando el puente de hidrogeno con la Val130 y Gln71 observado previamente, así mismo las interacciones hidrofóbicas generadas entre el núcleo esteroidal y el sitio de activo específico, demostrando que una sola modificación incrementa la EA considerablemente (~1.0 kcal/mol), mientras que para CA12 son los derivados enol acetilados los que presentan mejor energía de acoplamiento mediante la formación de un puente de hidrogeno con la Arg194 con el enol acetilado formado en C-6 permitiendo acomodo fijo en el sitio catalítico de dicha enzima.

Por otro lado, para el cáncer de mama dependiente del receptor farsenoide, previamente los compuestos tenían muy bajo potencial activo, mientras que los derivados enol-acetilados en C-6 permiten un acomodo que facilita la formación de dos puestos de hidrógenos con el Glu449 y Ser358 formados por el hidroxilo en C-26 y el acetato en C-16 e interacciones de tipo de carga negativa por el ambiente electrostático de los anillos C y D, en contraste para el cáncer de mama triple negativo estos derivados enol-acetilados dan lugar a la formación de puentes de hidrógeno con PDGFR, particularmente para el derivado **10b** con el Asp836 forma 3 puentes de hidrógeno con el acetato en C-6, los hidroxilo en C-17 y en C-26 incrementando la energía de acoplamiento, además de incrementar la rigidez en este receptor.

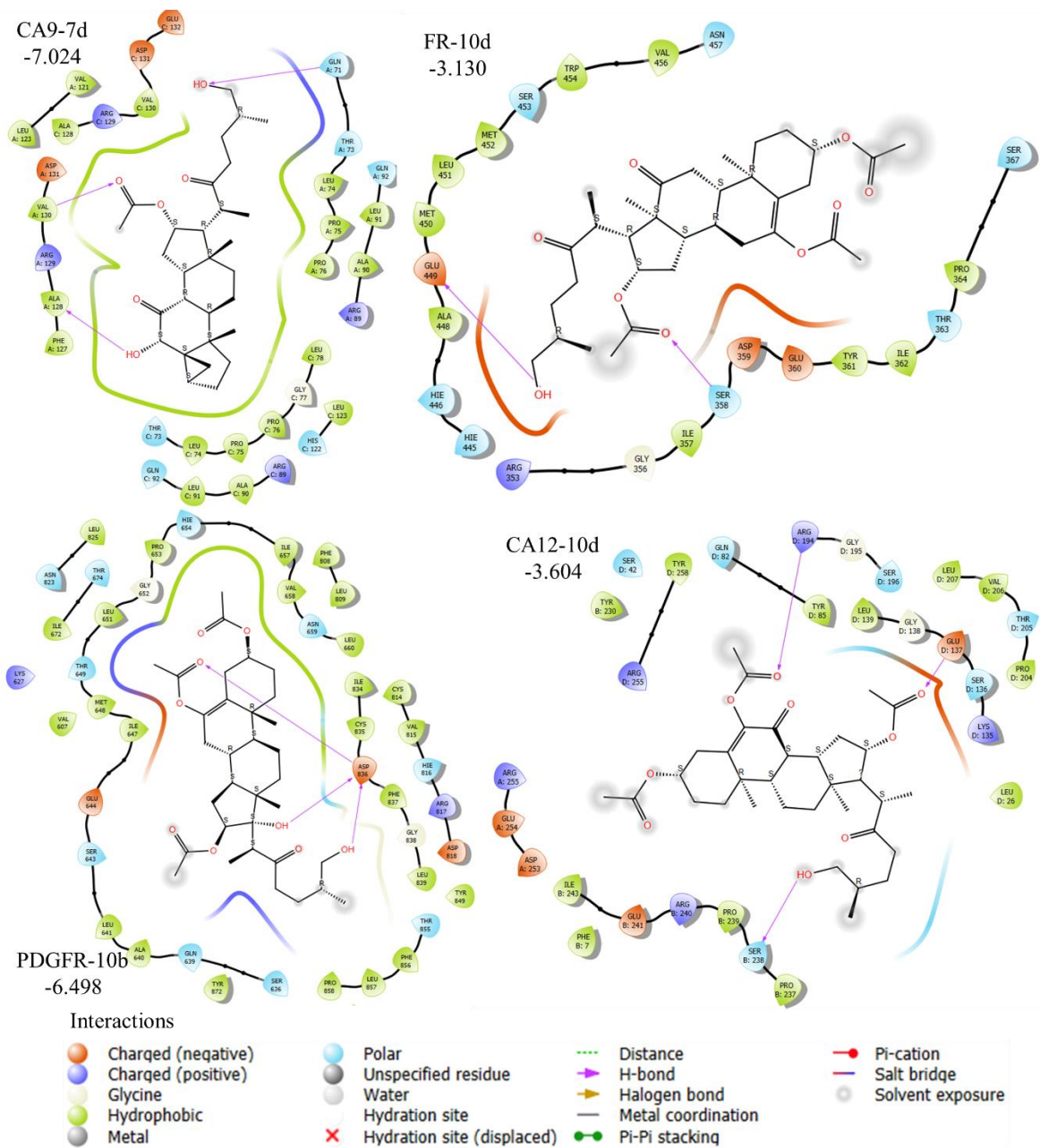


Figura 38. Diagrama 2D de moléculas con potencial anticancerígeno

Contra las infecciones, a nivel viral los productos secundarios no muestran un potencial mayor a lo existente o a sus predecesores, pero contra bacterias si se observó un nuevo potencial, particularmente para los derivados enol-acetilados, contra KPC2 y PABP3 (Figura 39) en los cuales los derivados previamente diseñados no habían presentado potencial contra estas proteínas, pero para KPC2 no presenta un efecto directo en el grupo sino en el acomodo espacial para incrementar la energía, en cambio para PABP3 si es el acetato en el enol el que forma nuevo puente de hidrógeno con la Thr496, generando este efecto.

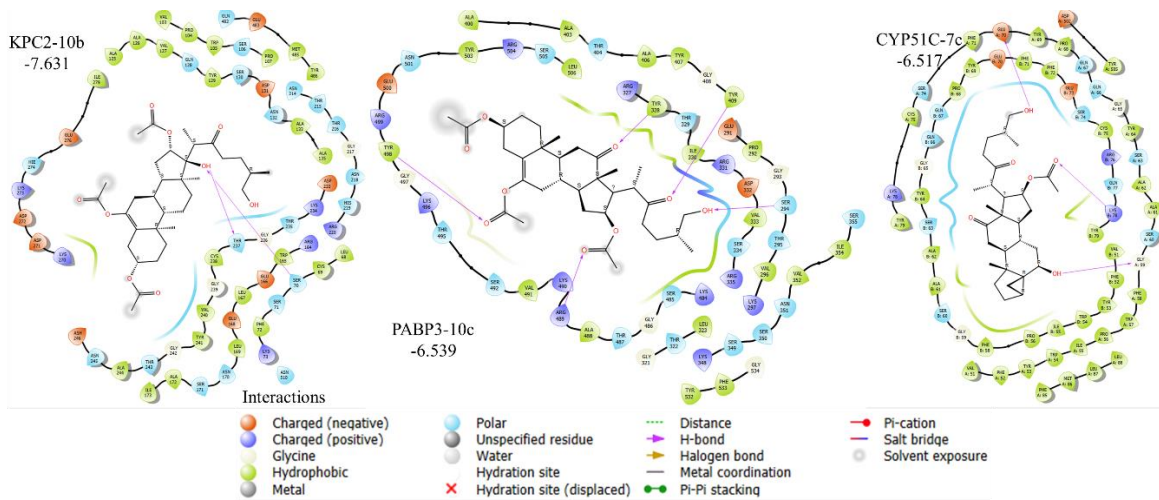


Figura 39. Diagrama 2D de moléculas con potencial antiinfeccioso.

Por otro lado, como antifúngico es vía la inhibición de la Cyp51 de *Candida albicans* es el derivado i-esteroidal con hidroxilo en C-6, siendo este el que forma un puente de hidrogeno con la Gly59 incrementando la EA, conservando los puentes de hidrógeno previamente observados con la Lys78 y el Glu70 obtenido por los derivados 6-cetónicos. Como promotores de crecimiento vegetal son estos compuestos los que incrementan la EA, inclusive mayor que la brasinólida siendo objetivos de evaluación ya que este hidroxilo es el que forma el puente de hidrógeno con la Ser647 que no se había observado por los derivados previamente obtenidos.

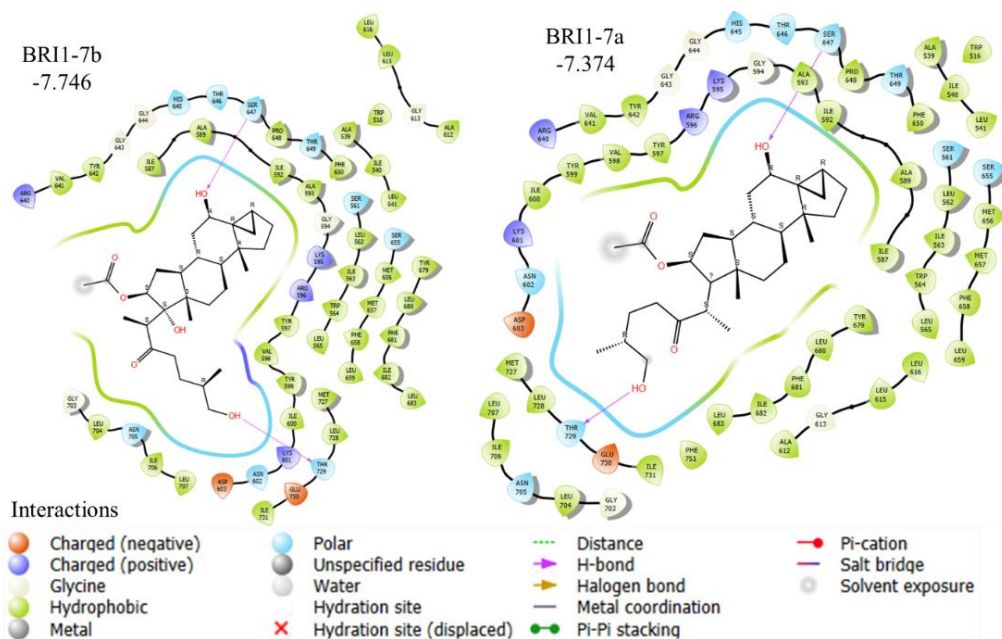


Figura 40. Diagrama 2D de moléculas con potencial promotor de crecimiento vegetal

CAPÍTULO 2. SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN Y MECANISMOS

2.1 Antecedentes

La obtención de i-esteroides se analizó ampliamente desde los 1950. Fieser [1] remarca la importancia de que el alcohol homoalílico en C-3 en posición β debe ser transformado en un buen grupo saliente. Esa estructura al ser tratada con una base débil, en medio acuoso, conduce al i-esteroide. La formación del producto final es explicada por un mecanismo que hace intervenir un traslapamiento del orbital de π del doble enlace con el orbital antienlace del sustituyente en C-3 (ver figura 41). Ello provoca la formación de un enlace sigma entre C-5 con C-3 con un proceso simultáneo de adición por una molécula de agua en C-6, sobre la cara β del esteroide. Si bien se han estudiado diversos grupos salientes y/o diversas bases, el uso de tosilatos y mesilatos como grupo saliente y acetato de potasio como base, son los que presentan mejores rendimientos (50 a 85 %), destacando que en todos los casos se ha reportado la recuperación un pequeño porcentaje del derivado 3β -hidroxilado inicial. Esta transformación se ha efectuado con sustratos de las familias de los pregnanos, colestanos, espirostanos, bisnorcolanos[16,67,68].

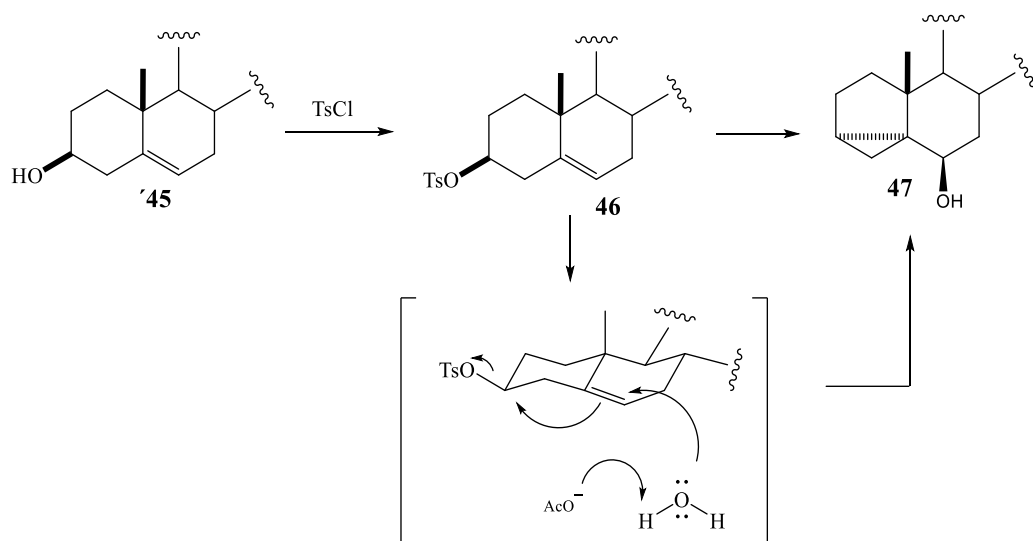


Figura 41. Esquema general de la obtención de i-esteroides.

Como se ha mencionado previamente, la aplicación principal que se le ha dado a los derivados i-esteroides es como un intermediario sintético, con la finalidad de insertar grupos hidroxilos o cetónicos en la posición 6, o bien para intercambiar el grupo hidroxilo en posición 3 por otros nucleófilos, permitiendo generar una gran variedad de compuestos esteroidales. Uno de los primeros usos fue estudiar la reactividad y movimiento de electrones en estructuras polivinílicas como el ergosterol, como se observa en la Figura 42, lo que condujo a la formación de dobles enlaces en los anillos B, C y D para poder dar lugar a la formación del ergosterol-B1, ergosterol-B2, ergosterol-B3 e inclusive llegar hasta obtener el esteroide triénico de Windaus [15,69,70].

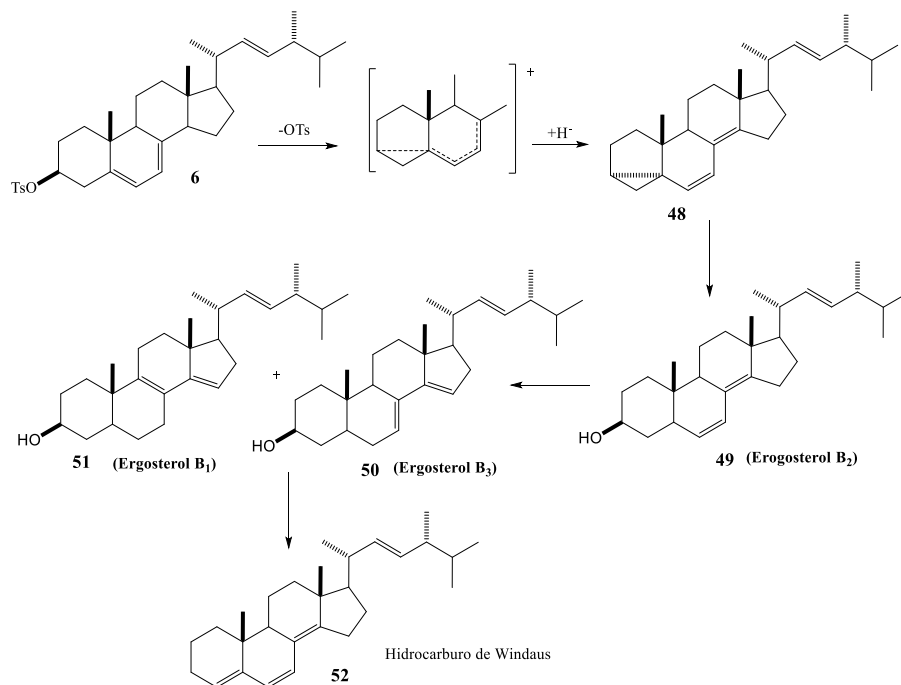


Figura 42. Esquema de modificaciones del ergosterol vía i-esteroides.

Un reordenamiento similar de un éster homoalílico (i-esteroide **60**) se presenta en la figura 43. Con éste se obtuvieron los compuestos 4-hidroxi- y 4-oxo- 5,7 α -ciclo-5 α -colestánicos, permitiendo obtener una gran variedad de compuestos con modificaciones tanto en el anillo A como en el B. Este estudio destacó la estabilidad del anillo ciclopropánico en el anillo B frente medios reductivos drásticos, como el empleo con tetrahidruro de litio y aluminio. Sin embargo, es susceptible a condiciones ácidas [71,72].

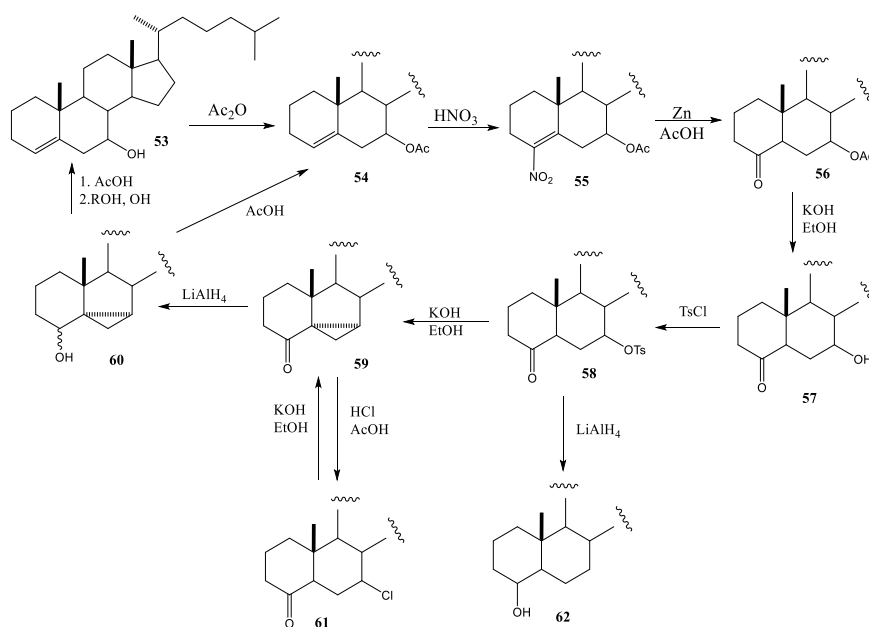


Figura 43. Esquema de modificaciones del pseudocolesterol **60**.

El uso de estos intermediarios se ha empleado durante mucho tiempo; una de las aplicaciones con fines biológicos más destacada fue la transformación de estigmasterol en desmosterol **69** (Figura 44). Debido a que este último es un intermediario en la biosíntesis del colesterol y, las personas que carecen de la desmosterol reductasa producen una acumulación de **69** generando una serie de malformaciones por la falta de colesterol. Ésta enzima fue de gran interés para analizar las características del demosterol y diseñar técnicas bioquímicas de conversión en colesterol [73–75].

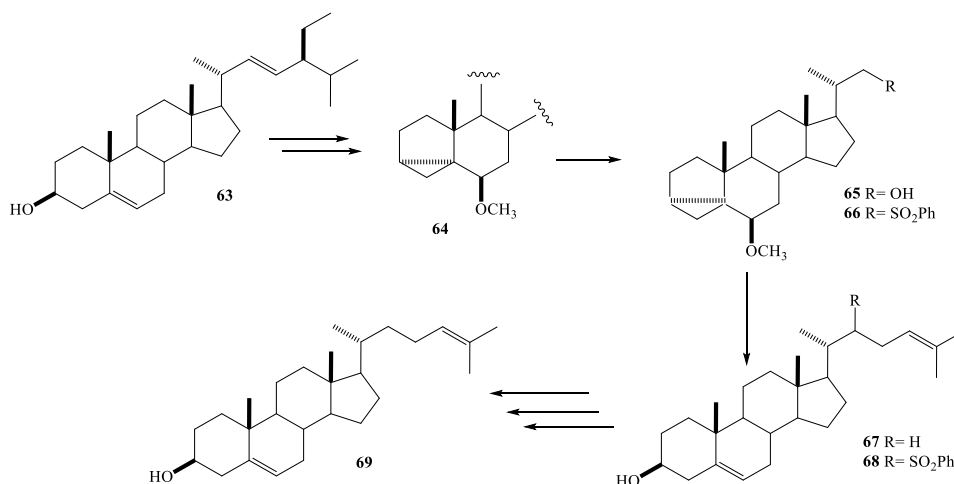


Figura 44. Esquema de obtención de desmosterol a partir de estigmasterol

La obtención de brasinoesteroides en mayores proporciones a los obtenidos por extracción de plantas ha sido de gran interés. Un buen recurso han sido los procesos semisintéticos a partir de derivados *i*-esteroideos, como lo es en el caso de la obtención de 24-epibrasinólida a partir de ergosterol como se observa en la Figura 45, ruta sintética que permitió constatar la estabilidad del *i*-esteroide a condiciones de oxidación básicas o neutras y reducción metálicas, pero al llevar a cabo la oxidación ya no es factible a priori la regulación del doble enlace, lo que requiere condiciones acidas más fuertes con el uso de ácido sulfúrico como catalizador para dar lugar a la formación de un H-5 en posición α exclusivamente dado la estabilidad específica de la fusión α de los anillos A y B.

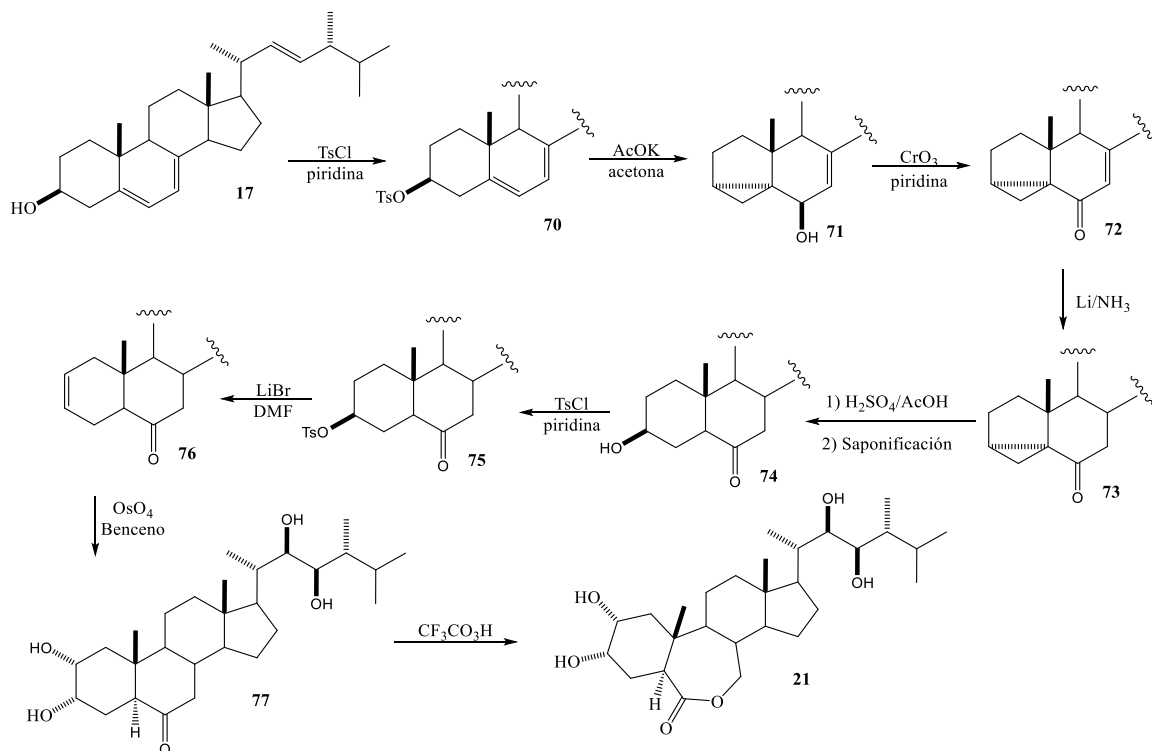


Figura 45. Esquema obtención de 24-epibrasinólida a partir de ergosterol vía i-esteroides

Recientemente se han utilizado con el fin de realizar la creación de nuevos ciclos entre los anillos C y D, o la creación de biciclos entre el anillo A y C para dar lugar a productos naturales (Figura 46) [76], utilizando a los intermediarios i-esteroidales **78** y **81**. La formación del 3 α ,5-ciclo-5 α -esteroide permite actuar como grupo protector del alcohol homoalílico o bien, enmascarar un doble enlace en el anillo A, como en el caso de la transformación de **78** y **81**.

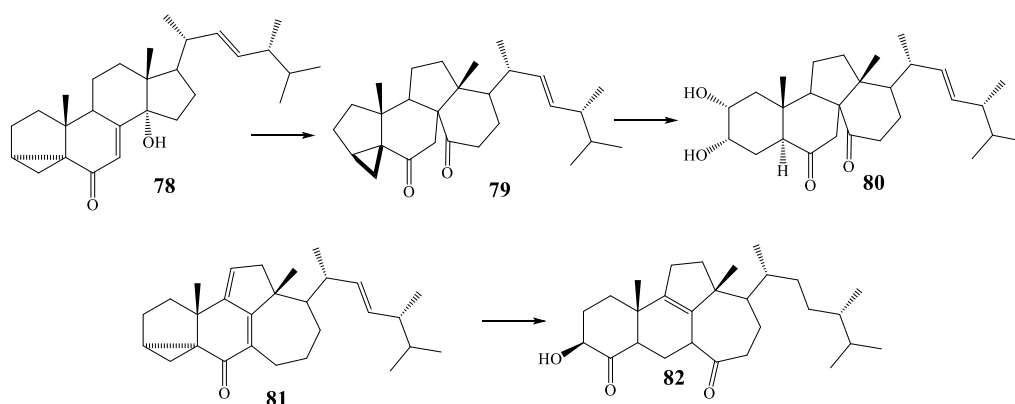


Figura 46. Esquema de reacción del uso de los i-esteroides como intermediarios protectores.

La formación de intermediarios *i*-esteroidales se ha aplicado en la pregnenolona, para realizar oxidaciones cabe destacar que la aplicación de estas metodologías no se limita a los esqueletos colestanos, como modificaciones de la pregnenolona, formando el *i*-esteroide en el anillo A, y a partir de este compuesto funcionalizar la posición 11 sin afectar los anillos A y B, lo cual permitió obtener 11 α -hidroxi, 11 β -hidroxi y 11-cetopregnenolonas, como se observa en Figura 47 [76].

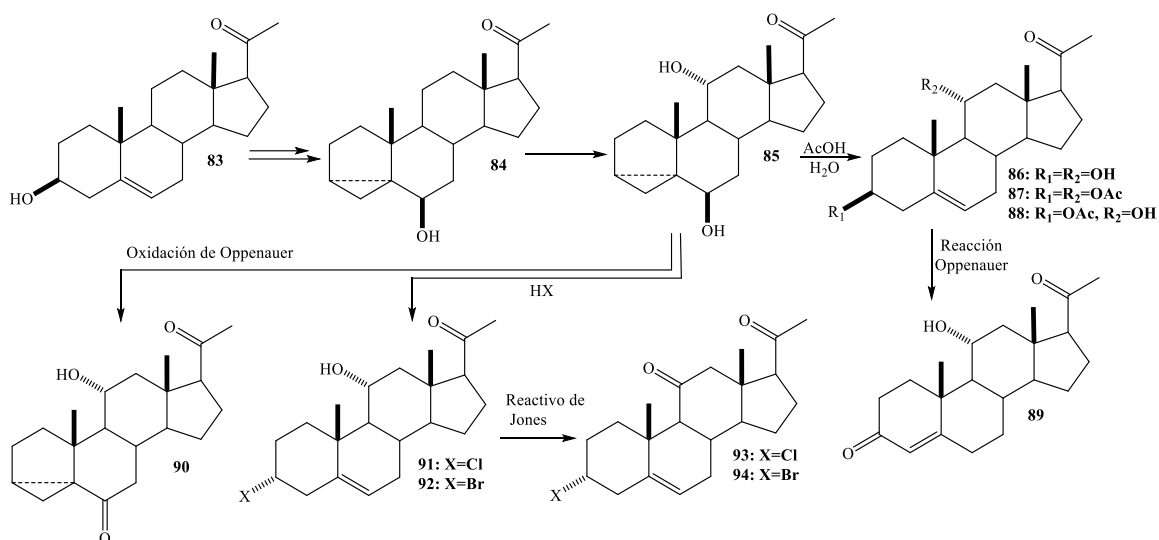


Figura 47. Esquema de síntesis de análogos 7-oxygenados esteroidales de Brasinoesteroides.

Como se puede observar existe una gran versatilidad para los derivados *i*-esteroidales que además de presentar una gran estabilidad, lo que permite estudiar en pruebas biológicas su función como moléculas bioactivas. En este sentido, en este trabajo se presenta el estudio de nuevos derivados con potencial biológico, obtenido mediante herramientas *in silico*.

2.2 Metodología

2.2.1 Métodos de caracterización y purificación

➤ Punto de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Melt Temp, mediante rampas de temperatura de 10 °C/min y 1°C/min por la técnica de capilar abierto y no fueron corregidos.

➤ Rotación óptica

La desviación óptica fue medida en un polarímetro compacto modular MCP100 con celda de 10 cm de longitud y una longitud de emisión de 589 nm (línea de emisión del Na) a temperatura constante de 25 °C, en solución de cloroformo o metanol según su solubilidad y se presenta como rotación óptica específica.

➤ Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 500 MHz de experimentos de 1D (^1H , ^{13}C) y 2D (COSY, HMBC, HSQC), se obtuvieron en un equipo Bruker, utilizando cloroformo deuterado conteniendo tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), 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 y DIAL PATH para líquidos, la ubicación de las bandas de transmitancia se expresa en número de onda $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}).

➤ Espectrometría de masas

Para la determinación de los datos de masa molecular exacta y espectros de masas se utilizó un equipo Agilent HPLC-MS expresando los espectros en % abundancia relativa vs relación masa/carga. Los resultados de masas de alta resolución se expresan con exactitud de 4 cifras decimales.

➤ 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 ALUGRAM Xtra SIL F₂₅₄ de Macherey-Nagel, Alemania y como fase móvil sistemas de elución de hexano/acetato de etilo. Para su revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara de UV) y por tratamiento con ácido sulfúrico al 50% con posterior calcinación de las placas.

➤ Cromatografía en columna

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

2.2.2 Materias primas

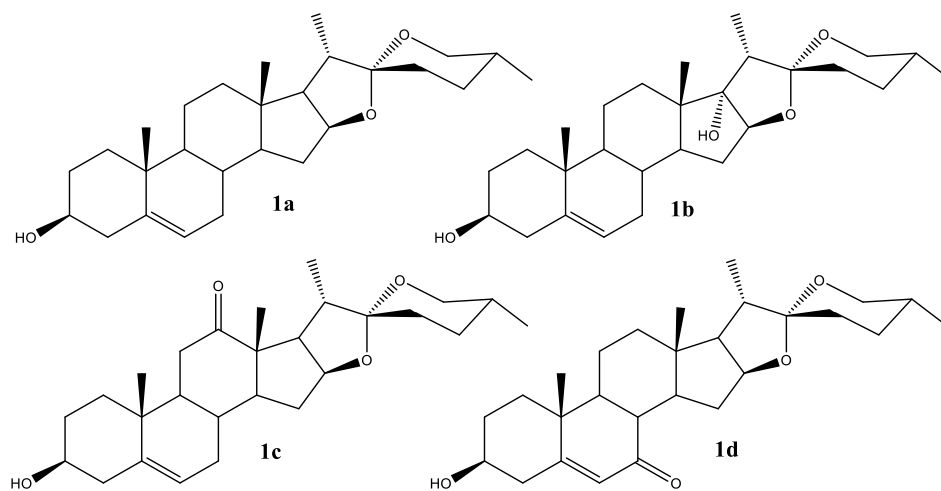


Figura 48. Estructuras utilizadas como materias primas.

Las materias primas diosgenina (**1a**), pennogenina (**1b**), botogenina (**1c**), y 7-oxodiosgenina (**1d**) fueron purificadas por columnas cromatográfica en gel de sílice, con sistemas de elución hexano/acetato de etilo, siendo posteriormente caracterizados por métodos físicos y espectroscópicos.

2.2.3 Tosilación de espirostanos

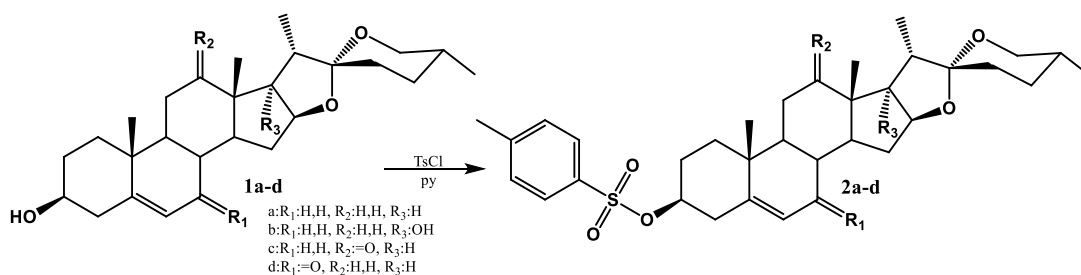


Figura 49. Esquema de reacción de tosilación en C-3.

A una solución de 5.0 mmol de **1a-d** en 20 mL de piridina seca se añadió 1.0 g (18.5 mmol) de TsCl. La reacción se mantuvo durante 2 h en agitación constante a temperatura ambiente, la piridina fue evaporada a presión reducida y el crudo se extrajo con éter etílico (2x15 mL) y se lavó con agua (2x25 mL). La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ y evaporada para obtener de un polvo blanco correspondiente al compuesto **2a-d**.

2.2.4 Formación del i-esteroide 6-hidroxilado.

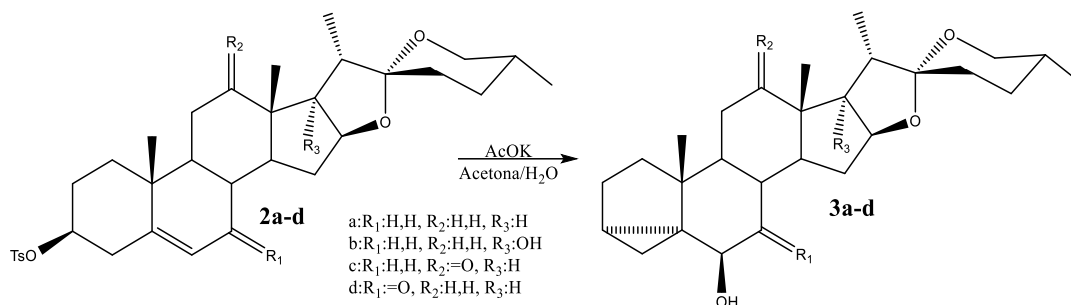


Figura 50. Esquema de formación de i-esteroides en C-3.

A una solución de 4.0 mmol de **2a-d** en 30 mL de solución v/v de H₂O/Acetona (20/80) fue añadido 1.0 g (12.5 mmol) de AcOK. La reacción se mantuvo durante 5 h en agitación constante, a reflujo. La acetona fue evaporada a presión reducida y el crudo se extrajo con acetato de etilo (2x15 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2x25 mL), seco con Na₂SO₄ y evaporada para obtener un polvo blanco correspondiente **3a-d**.

2.2.5 Oxidación del i-esteroide 6-cetónico.

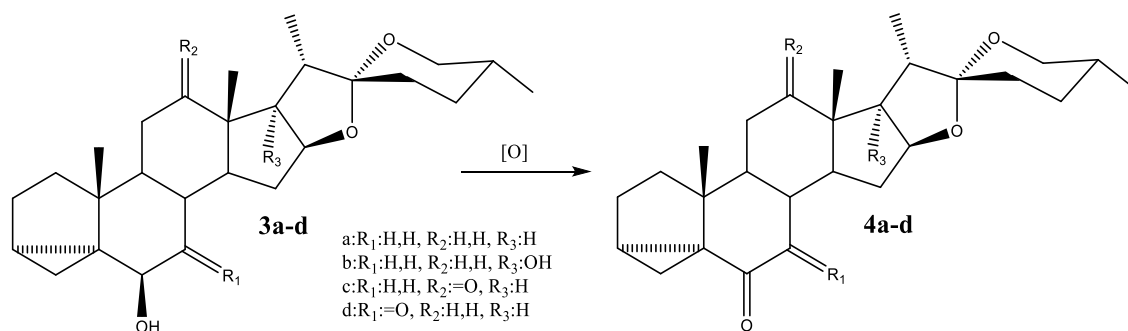


Figura 51. Esquema de oxidación en C-6.

Método A

A una solución de 4.5 mmol de **3a-d** en 30 mL de CH₂Cl₂ fue añadido 5 mL de reactivo de Jones. La reacción a la temperatura de 0 °C se detuvo en cuanto se obtuvo una ligera coloración anaranjada. El crudo de reacción se filtró a través de una capa de gel de sílice para retirar los compuestos cromados; se añadieron 30 mL de CH₂Cl₂ para terminar de eluir el esteroide, lavándose posteriormente la fase orgánica con solución acuosa de bicarbonato de sodio (2x25 mL), secada con Na₂SO₄ y evaporada para obtener un polvo blanco correspondiente **4a-d**.

Método B

A una solución de 4.5 mmol de **3a-d** en 30 mL de dioxano se añadieron 7.5 mmol de NBS, 10 mL de acetona y 2 de agua destilada. La reacción se colocó a reflujo por 30 min, posteriormente se evaporó el dioxano y la acetona para proceder a extraer con CH_2Cl_2 y lavar la solución de CH_2Cl_2 con agua (2x25 mL), secada con Na_2SO_4 y evaporada para purificar por columna cromatográfica y obtener un polvo blanco correspondiente a **4a-d**, pero en particular para la oxidación del compuesto **3d** dio lugar a **9d** (figura 52)

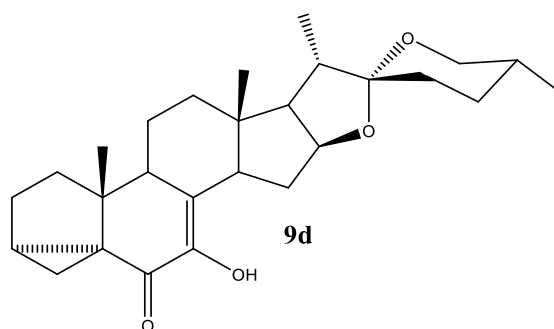


Figura 52. Estructura del subproducto de la oxidación de **3d**.

2.2.6 Apertura del espiroacetal de los i-esteroides

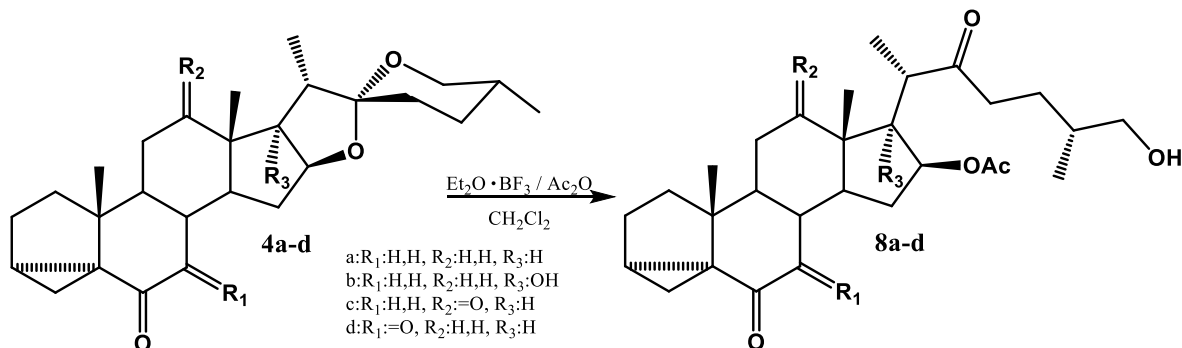


Figura 53. Reacción de apertura del espiroacetal de i-esteroides.

Se disolvieron 2.25 mmol **4a-d** en 10 mL de CH_2Cl_2 y se enfrió a 0°C . Paralelamente se preparó una solución de 2.5 mL de Ac_2O y 3 mL de $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$. Posteriormente esta solución se le añadió a la solución esteroidea y se mantuvo en agitación durante 15 min, después se vertió sobre agua con hielo y extrajo con CH_2Cl_2 (2x25 mL) y el crudo se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 (2x20 mL) y agua destilada (2x25 mL), se secó con Na_2SO_4 y concentró a presión reducida. El crudo fue purificado por columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice y fase móvil sistema 4:6 (hexano: acetato de etilo) obteniendo los productos **8a-d**, **10a-d** y **11d**.

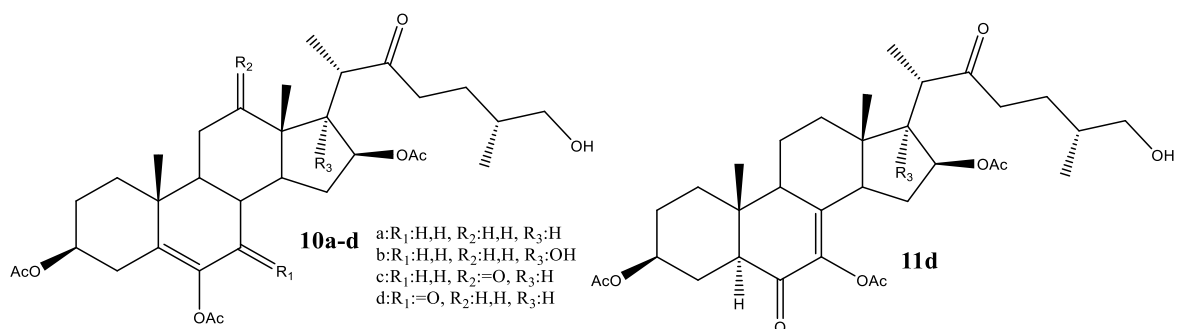


Figura 54. Subproductos de la apertura de 4.

2.2.7 Apertura de las sapogeninas esteroidales.

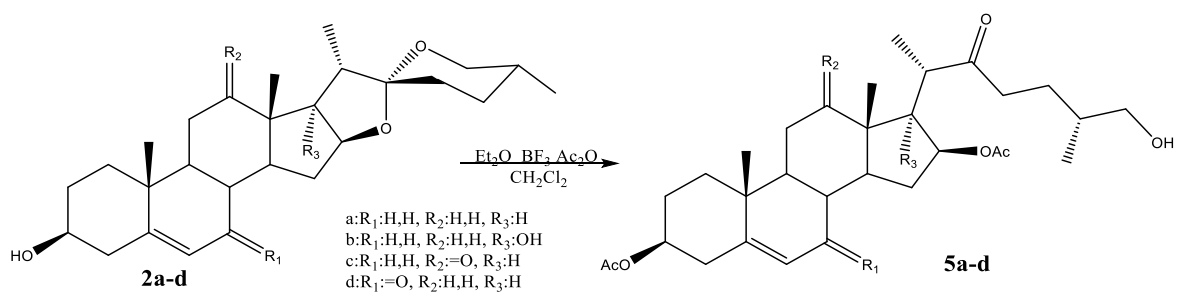


Figura 55. Reacción de apertura del espiroacetal.

Se disolvieron 2.25 mmol **1a-d** en 10 mL de CH₂Cl₂ y se enfrió a 0 °C, paralelamente se preparó una solución de 2.5 mL de Ac₂O y 3 mL de Et₂OBF₃ (46%), posteriormente esta solución se le añadió a la solución esteroidea y se mantuvo en agitación durante 15 min, después se vertió sobre agua con hielo y extrajo con CH₂Cl₂ (2x25 mL) y el crudo se lavó con una solución de saturada de NaHCO₃ (2x20 mL) y agua destilada (2x25 mL), se secó con Na₂SO₄ y concentro a presión reducida, el crudo fue purificado por columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice y fase móvil sistema 4:6 (hexano: acetato de etilo) obteniendo los productos **5a-d**.

2.2.8 Ruta alterna.

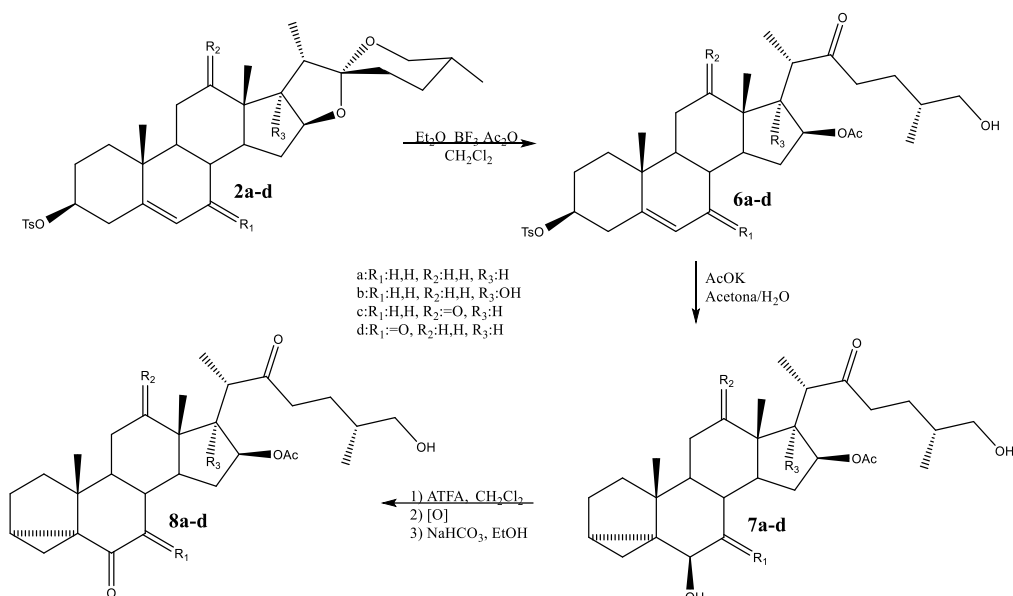


Figura 56. Esquema de protección oxidación desprotección.

Se disolvieron 2.25 mmol **2a-d** en 10 mL de CH₂Cl₂ y se enfrió a 0 °C, paralelamente se preparó una solución de 2.5 mL de Ac₂O y 3 mL de Et₂OBF₃ (46%), posteriormente esta solución se le añadió a la solución esteroidea y se mantuvo en agitación durante 15 min, después se vertió sobre agua con hielo y extrajo con CH₂Cl₂ (2x25 mL) y el crudo se lavó con una solución de saturada de NaHCO₃ (2x20 mL) y agua destilada (2x25 mL), se secó con Na₂SO₄, se concentró a presión reducida, al crudo de reacción se le adicionaron 3.0 mL de ATFA, se lavó con agua destilada (2x25 mL) y finalmente se adicionaron 30 mL de solución de H₂O/Acetona (20/80) y 1.0 g (12.5 mmol) de AcOK. La reacción se mantuvo 5 h bajo agitación constante, a reflujo. La acetona fue evaporada a presión reducida, el crudo se extrajo con CH₂Cl₂ (2x15 mL) y se le adicionaron 20 mL de solución al 10 % de NaHCO₃ y se dejó en agitación durante 1 h para finalmente purificar por columna con sistema 6:4 obteniendo los productos **8a-d** y particularmente **12d**, para el uso de **2d**.

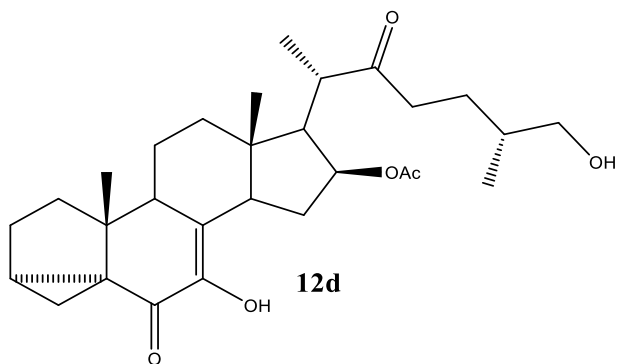


Figura 57. Subproducto de la oxidación de **7d**

2.3 Derivados *i*-esteroideos espiroestánicos

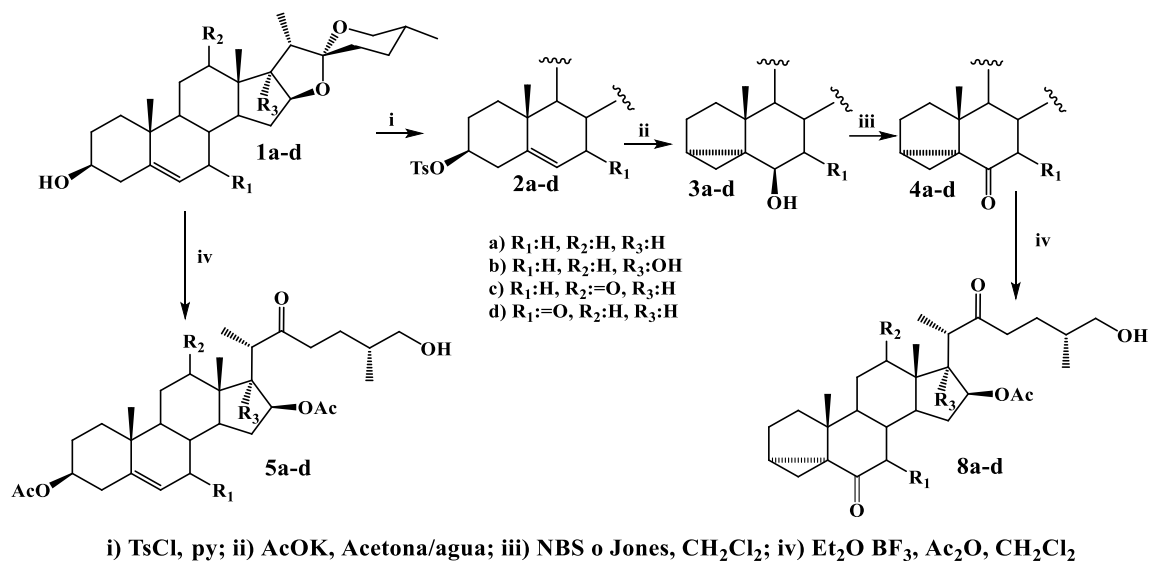


Figura 58. Esquema de obtención de derivados *i*-esteroideos.

Dado el gran potencial que han demostrado las moléculas propuestas, se diseñó una ruta sintética para la obtención de estos, para la formación del *i*-esteroide, la primera etapa será la formación del tosilato como buen nucleófilo y después proceder a la formación del enlace de C-3 a C-5 con un hidroxilo en C-6, para posteriormente proceder a oxidar y finalmente a realizar la apertura del espiroacetal con un ácido de Lewis. En paralelo, se realizó la apertura del espiroacetal de las materias primas para formar los derivados 22-oxocolestánicos con la función original (Figura 58), para lo cual fue necesario diseñar condiciones de reacción que permitan su obtención, así como la caracterización de cada uno de los compuestos obtenidos mediante técnicas de RMN, IR, Espectrometría de masas, rotación óptica (α_D) y punto de fusión.

2.3.1 Derivados espiroestánicos de partida

El requisito fundamental para lograr la formación de un *i*-esteroide entre C-3 y C-5 es necesario un doble enlace en C-5 y un hidroxilo en C-3 en posición β . Se seleccionaron 4 materias primas: diosgenina (**1a**), pennogenina (**1b**), botogenina (**1c**) y la 7-oxodiosgenina (**1d**), siendo los tres primeros productos de origen natural. Los compuestos **1a** y **1b** se obtuvieron de barbasco mediante extracción alcohólica y posterior hidrólisis ácida; **1c** fue obtenida de *agave sisalana*, particularmente de la espuma formada en el proceso de fermentación del agave, mientras que **1d** se obtuvo mediante oxidación selectiva alílica en C-7 de la diosgenina [77].

La caracterización de las materias primas es fundamental para establecer el marco de referencia en la modificación de productos naturales dado la complejidad que existe en el núcleo base esteroideal, que si es factible su caracterización total, dado la semejanza que existe entre estos, el proceso se enfoca en las señales características y las que son modificadas a lo largo de síntesis, aunque todas las técnicas de caracterización proveen información importante, es la resonancia magnética nuclear (RMN) la que permite un seguimiento adecuado de la reacción, así como identificar productos secundarios de reacción.

Para la diosgenina en el espectro de RMN-¹H a 500 MHz (Figura 59), podemos observar señales entre 0.7 a 5.4 ppm, en 5.35 ppm se observa la señal del protón vinílico H-6, la cual es una señal *ddd* debido al acoplamiento con los protones diasterotópicos en C-7 y a 4 enlaces con H-4, a menor frecuencia en 4.41 ppm se encuentra la señal de H-16, como un *ddd* con constantes de acoplamiento cercadas lo que da forma de un cuarteto, esto debido al ciclopentano del anillo E y al acoplamiento con los protones en C-15 y el de C-17, en el intervalo de 3.3 a 3.6 ppm se presentan las señales de los protones diasterotópicos en C-26 y el H-3, estos base de oxígeno, particularmente el H-26a debido al acoplamiento geminal y con H-25 (180° de ángulo diedro) lo que da una señal *dd* con constantes iguales, en contraste las señales de H-26e y H-3 se traslapan pero se denotan las dos señales, una señal *tt* con respecto a H-3 y un *ddd* del H-26e, debido al acoplamiento geminal, con H-25 y a 4 enlaces con H-24e, a menor frecuencia en 2.3 ppm se encuentra la señal que corresponde a los protones en C-4 y en 2.0 ppm la correspondiente a los protones en C-7, aunque son diasterotópicos al presentar un desplazamiento similar lo que genera que estas señales se traslapan. En baja frecuencia se encuentran las señales correspondientes a los metilos de la estructura que corresponde a los metilos 19, 21, 18 y 27 respectivamente, estos últimos dos traslapados en 0.79 ppm.

Para el caso de la caracterización en RMN-¹H de la pennogenina (**1b**) dada la estructura se puede observar una gran similitud con respecto **1a**, con diferencias específicas, primero que la señal de H-16 se encuentra a 3.9 ppm como una señal triple, dado el acoplamiento con los protones en C-15, a diferencia de H-16 en diosgenina existe un hidrogeno en C-17, mientras que en **1b** esta sustituido por un hidroxilo, además el cono de protección de este genera que la señal de H-16 disminuya su desplazamiento, otra señal que se altera es la correspondiente al metilo 18 que se desplaza ligeramente a mayor frecuencia, a diferencia del metilo en C-21 que se desplaza a menor frecuencia. Para el caso de la botogenina (**1c**) el espectro también es similar, solo que en este caso las señales de H-3 y H-26e se separan, demostrando que H-3 corresponde a un *dddd* aunque por los valores de las constantes ($J_{3-2a}=J_{3-4a}=11.2$, $J_{3-4e}=J_{3-2e}=4.9$) se observa como un *tt* y H-26e a un *ddd*, un par de señales nuevas son las correspondientes a los hidrógenos en C-11, que el ser base del grupo carbonilo se desplazan a 2.4 y 2.2 ppm, ambas como *dd*, dado el acoplamiento geminal y con H-9, variando únicamente este último dado el ángulo formato con el H-11 correspondiente, en la región de los metilos el metilo en C-18 se desplaza a 0.9 ppm debido al efecto generado por el carbonilo en C-12.

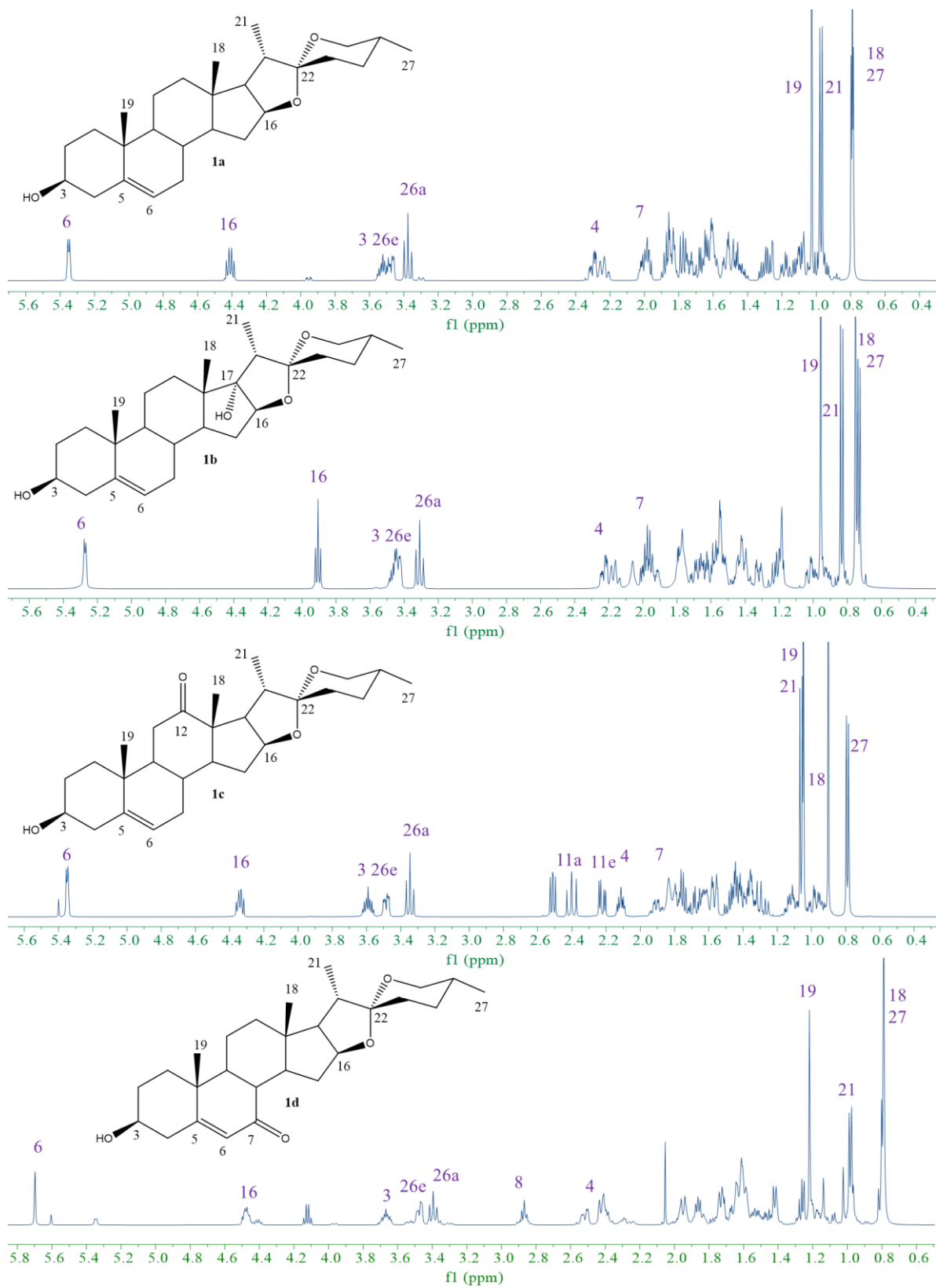


Figura 59. Espectros de RMN- ^1H a 500 MHz de las estructuras 1a-d.

Por otro lado, para el derivado **1d** (7-oxodiosgenina), al comparar con **1a** el primer cambio observado es la multiplicidad de H-6 que ahora es una señal simple dado el grupo oxo en C-7 y por ende la señal de H-8 a se desplaza a 2.9 ppm, dado el efecto desprotector por el carbonilo en C-7, por otro lado, el cambio en el anillo B la señal de H-3 se desplaza a 3.7 ppm. Para la caracterización por RMN-¹³C (Figura 60) en el espectro de **1a** se denotan las señales correspondientes a los carbonos del doble enlace y en 110 ppm la señal del carbono cuaternario del espiroacetal C-22, en la región de los carbonos base de oxígeno se destacan 3 señales la correspondiente a C-16, C-3 y C-26 respectivamente, las cuales se asignaron mediante el espectro de HSQC; en contraste el espectro de **1b** presenta una señal extra en 90 ppm correspondiente al C-17, así como un incremento en el desplazamiento de C-16 a 91 ppm dado este hidroxilo, para asignar la diferencia entre estos dos se utilizó el espectro de HMBC (Figura 61) dado el acoplamiento de la señal H-16 con C-17 y con el HSQC la correlación entre H-16 y C-16.

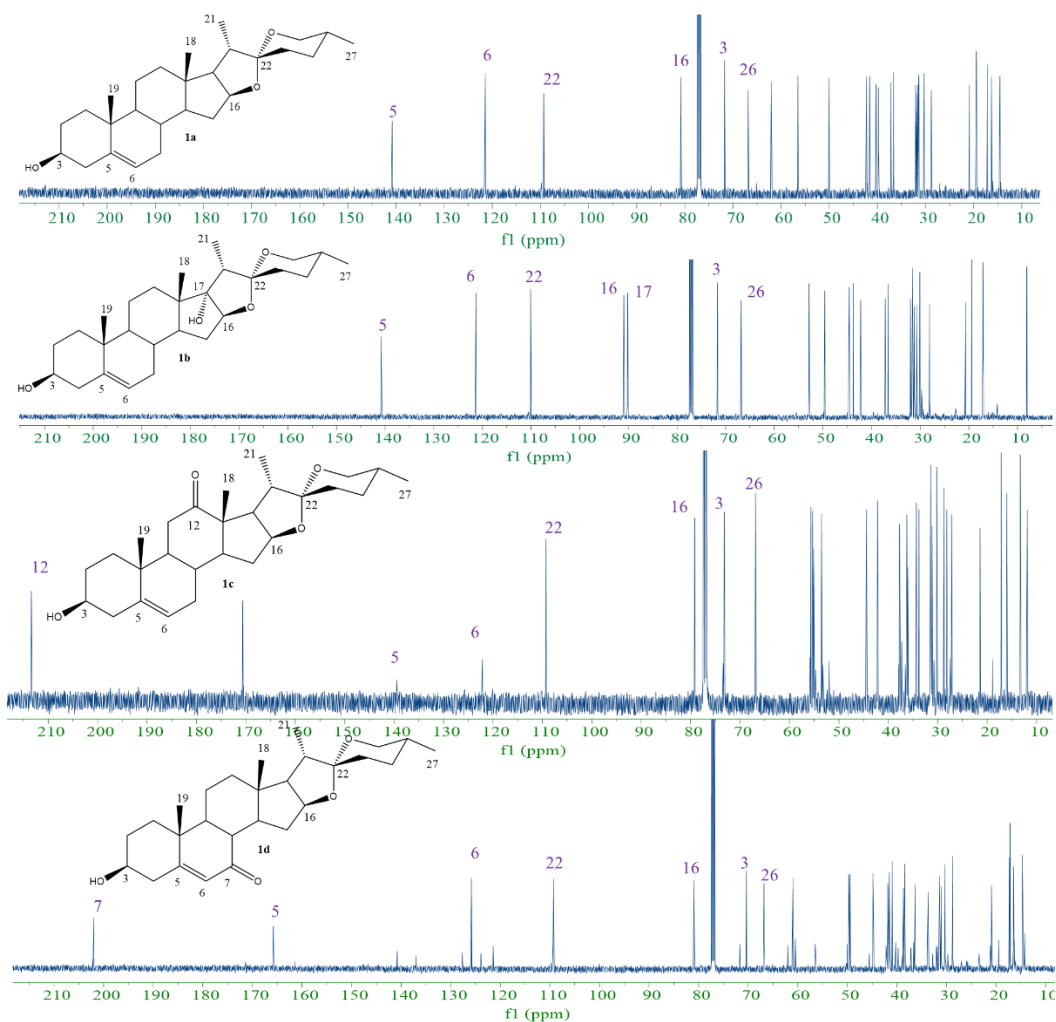


Figura 60. Espectros de RMN-¹³C a 125 MHz de las estructuras **1a-d**.

En cambio, para el espectro de la botogenina (**1c**), se destaca la señal en 208 ppm correspondiente al C-12, el cual permitió la asignación de los protones diasterotópicos en C-11, mientras que para **1d** el carbonilo en C-7 se observa en 202 ppm, a menor frecuencia por el efecto de cercanía con el doble enlace en C-5, carbono que se desplaza a mayor frecuencia (164 ppm) debido a la resonancia del sistema conjugado, señal que con el espectro de HMBC y HSQC (Figura 61 y Figura 62) permitió asignar la señal de C-8, esta caracterización permite establecer un marco de referencia para las modificaciones a realizar.

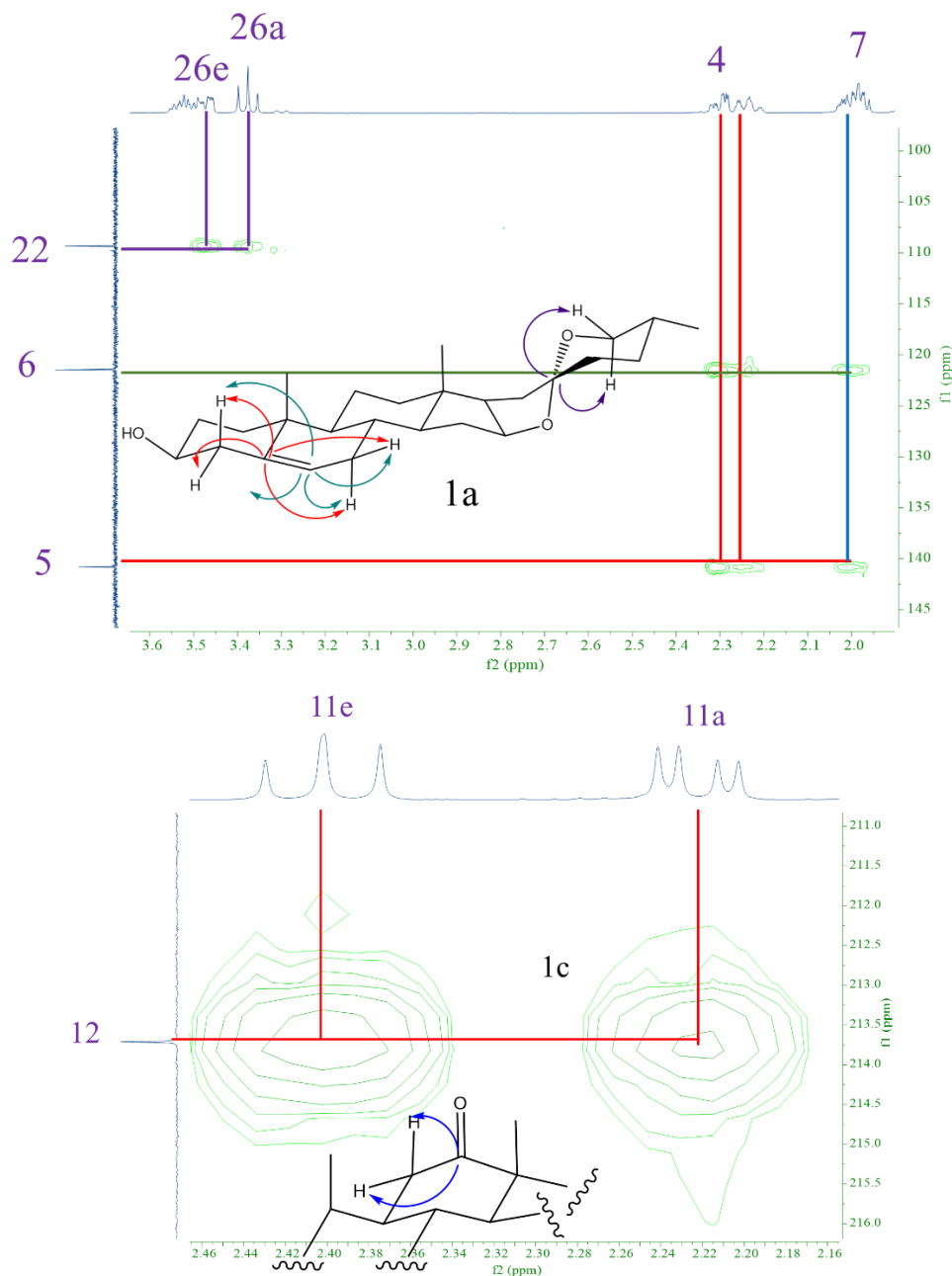


Figura 61. Expansiones de espectros de HMBC y HSQC característicos de **1a** y **1c**.

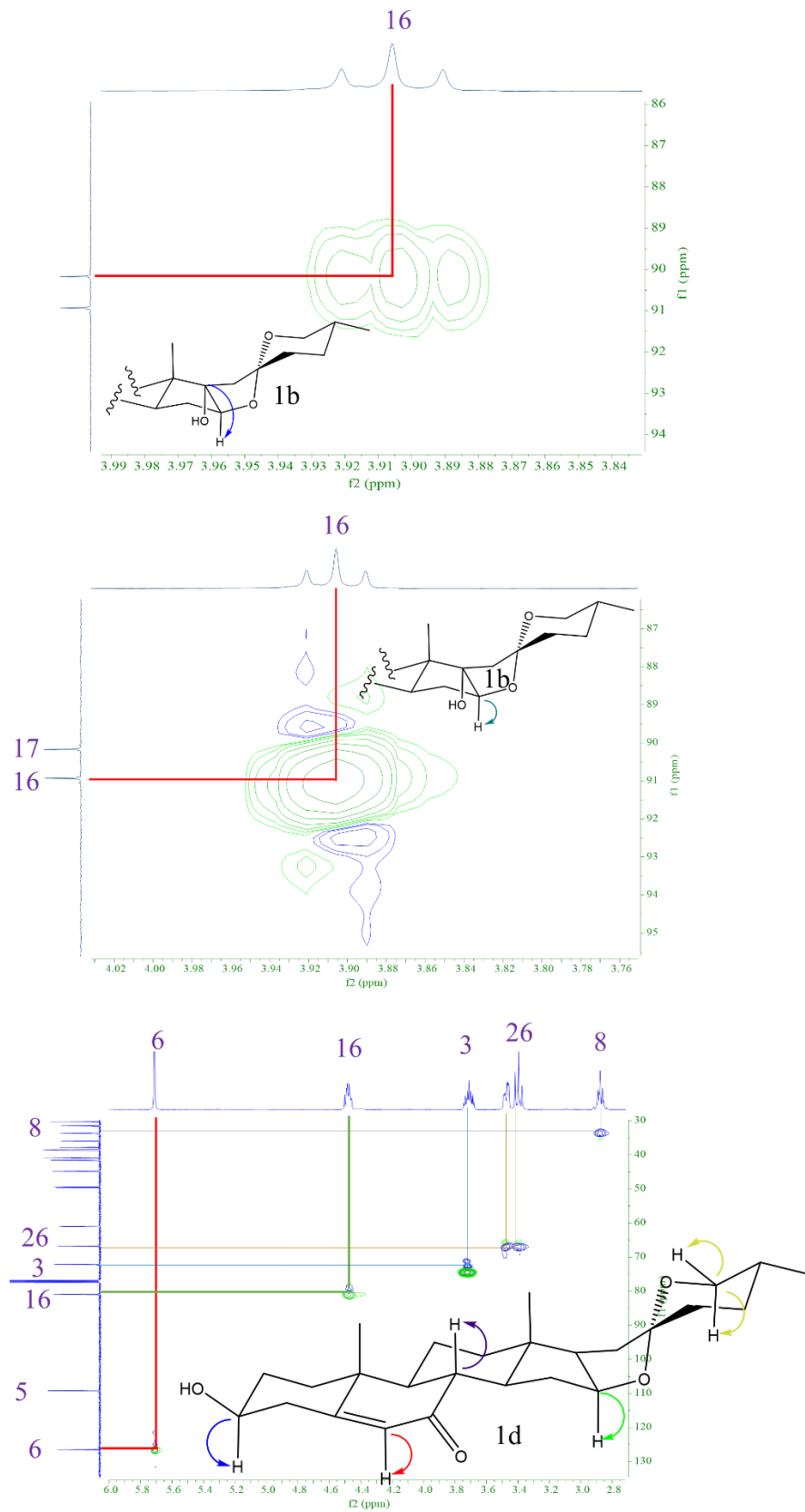


Figura 62. Espectro HMBC y HSQC de **1b** y **1d**.

2.3.2 Tosilación de los estrostanos

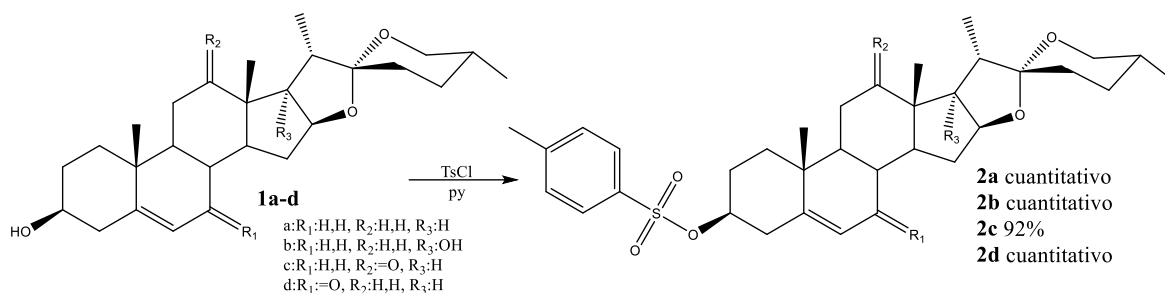


Figura 63. Esquema de reacción de tosilación de estrostanos.

La primera reacción realizada para la obtención de *i*-esteroides es la formación de un buen grupo saliente en C-3, las principales opciones son el mesilato y el tosilato, siendo este último el más estable, para llevar a cabo dicho proceso, es necesario el uso de una base débil, en la Tabla 15 se puede observar el efecto de estas variables, denotando que la piridina es la mejor opción como base y disolvente, excepto para la **1c**, donde si se utiliza diclorometano incrementa el rendimiento dada la baja solubilidad de **1c** en piridina. Para la caracterización por RMN el cambio es específico sobre H-3 a mayor frecuencia dado el efecto desprotector de la esterificación y, como nuevas señales repetidas en todos tosilatos son la señal en 2.48 ppm el metilo del tosilato y los protones aromáticos entre 7.3 a 7.8 ppm como se observa en la Figura 64.

Tabla 15. Efecto del disolvente, tiempo y base en la tosilación en C-3.

Esteroides	Disolvente	Base	Tiempo	Rendimiento
1a	CH ₂ Cl ₂	Na ₂ CO ₃	12 h	52%
1a	CH ₂ Cl ₂	Piridina	8 h	78%
1a	Éter etílico	Piridina	8 h	82%
1a	Piridina	Na ₂ CO ₃	12 h	Cuantitativo
1a		Piridina	12 h	Cuantitativo
1a		Piridina	4 h	Cuantitativo
1b		Piridina	4 h	67%
1b		Piridina	6 h	Cuantitativo
1c		Piridina	4 h	55 %
1c	CH ₂ Cl ₂	Piridina	24 h	92 %
1d		Piridina	4 h	87 %
1d		Piridina	5 h	Cuantitativo

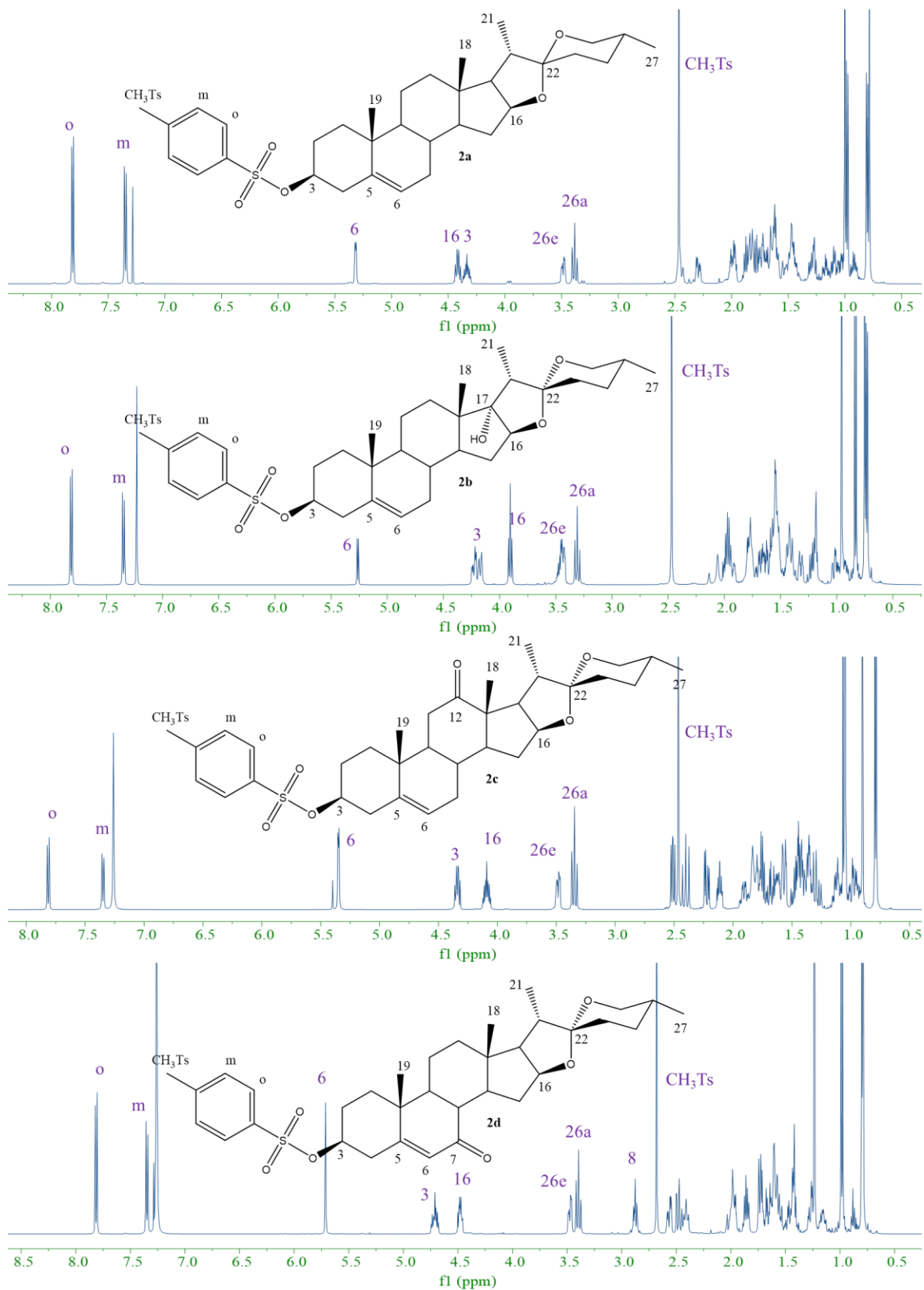


Figura 64. Espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de 500 MHz de tosilatos espirosteróicos.

2.3.3 Formación del i-esteroide 6-hidroxilado

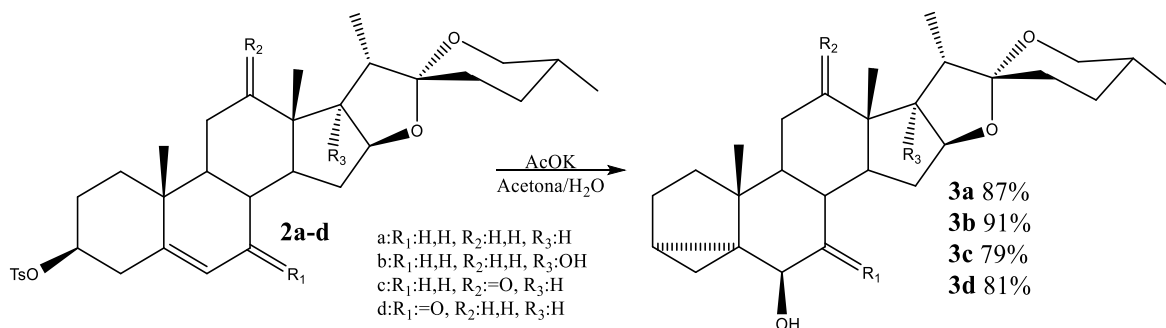


Figura 65. Esquema de formación del i-esteroide.

Para formar el i-esteroide se necesita un medio en presencia de un nucleófilo débil, una base débil y un ambiente altamente polarizado a fin de favorecer el traslape de los electrones π con el orbital de antienlace del C-3, en la

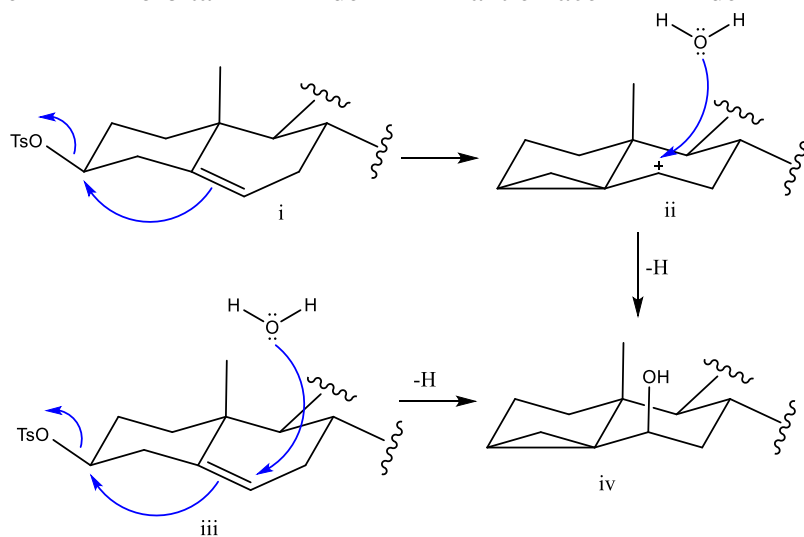


Figura 66 podemos observar el mecanismo propuesto para la formación del enlace entre C-5 y C-3, destacando un proceso concertado entre la polarización del C-6 para la inserción de la molécula de agua y el desplazamiento de C-5 a C-3 generando la eliminación del tosilato, aunque se podría estimar un proceso diferente en el cual primero se realice la formación del carbocatión en C-3 para proceder con el ataque por el doble enlace y finalmente la inserción del nucleófilo, u otra opción es el proceso inverso por la formación directa del carbocatión en C-6 y después la adición, pero termodinámicamente estos últimos dos mecanismos no son viables como se observa en el diagrama energético de la Figura 67.

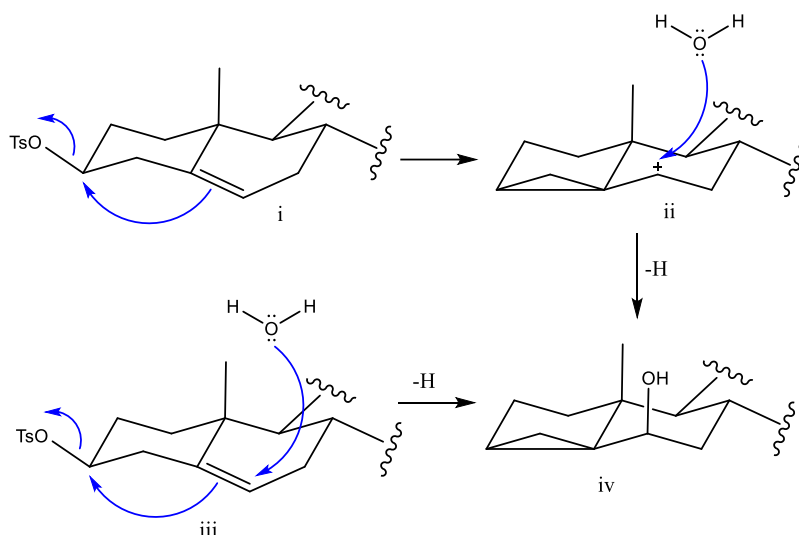


Figura 66. Mecanismo de reacción de formación de i-esteroides.

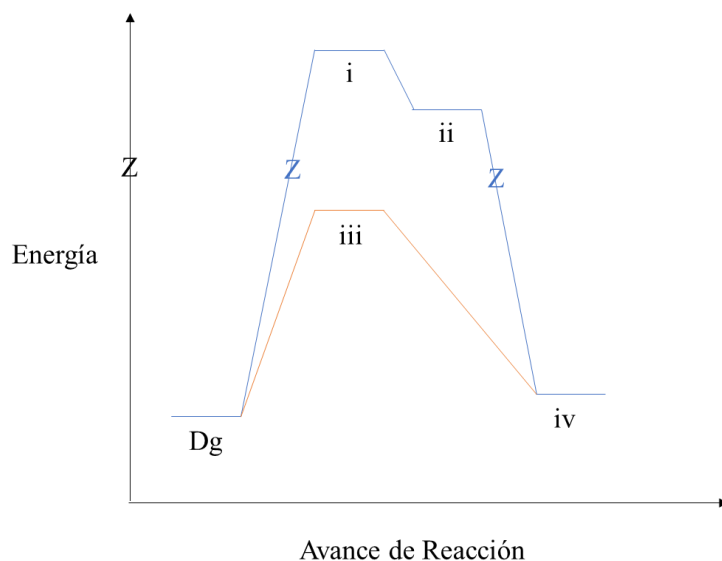


Figura 67. Diagrama energético de avance de reacción para la formación de i-esteroides.

A nivel de rendimiento la base y la relación de acetona/agua son fundamentales, como se observa en la Tabla 16, denotando al acetato de potasio, posteriormente se logró optimizar el tiempo de reacción hasta 1h para los derivados de diosgenina, botogenina y 7-oxodiosgenina, mientras que la pennogenina requiere mayor tiempo de reacción para alcanzar el máximo rendimiento factible, esto debido a dos factores, el primero la solubilidad ya que en altos contenidos de agua disminuye el rendimiento al igual que bases de fuerza media, debido a que no genera un ambiente polar suficiente para lograr el ataque concertado característico de este mecanismo. Dado la obtención de los derivados i-esteroidales se procede a su caracterización, donde se observan cambios considerables en los espectros, pero repetitivos

entre los esteroides seleccionados, el primer efecto se observa con el desplazamiento a baja frecuencia de C-6 dado la presencia del hidroxilo (Figura 68).

Tabla 16. Análisis del efecto en el rendimiento de la base utilizada en la formación de i-esteroides.

Esteroides	Base	Relación acetona/agua	Tiempo	Rendimiento
2a	Na ₂ CO ₃	50/50	8 h	42 %
2a	Piridina	50/50	8 h	28 %
2a	AcOK	50/50	8 h	67 %
2a	AcOK	80/20	4 h	88 %
2a	AcOK	80/20	2 h	88 %
2a	AcOK	80/20	1 h	87 %
2b	AcOK	80/20	2 h	91 %
2c	AcOK	80/20	1 h	79 %
2d	AcOK	80/20	1 h	81 %

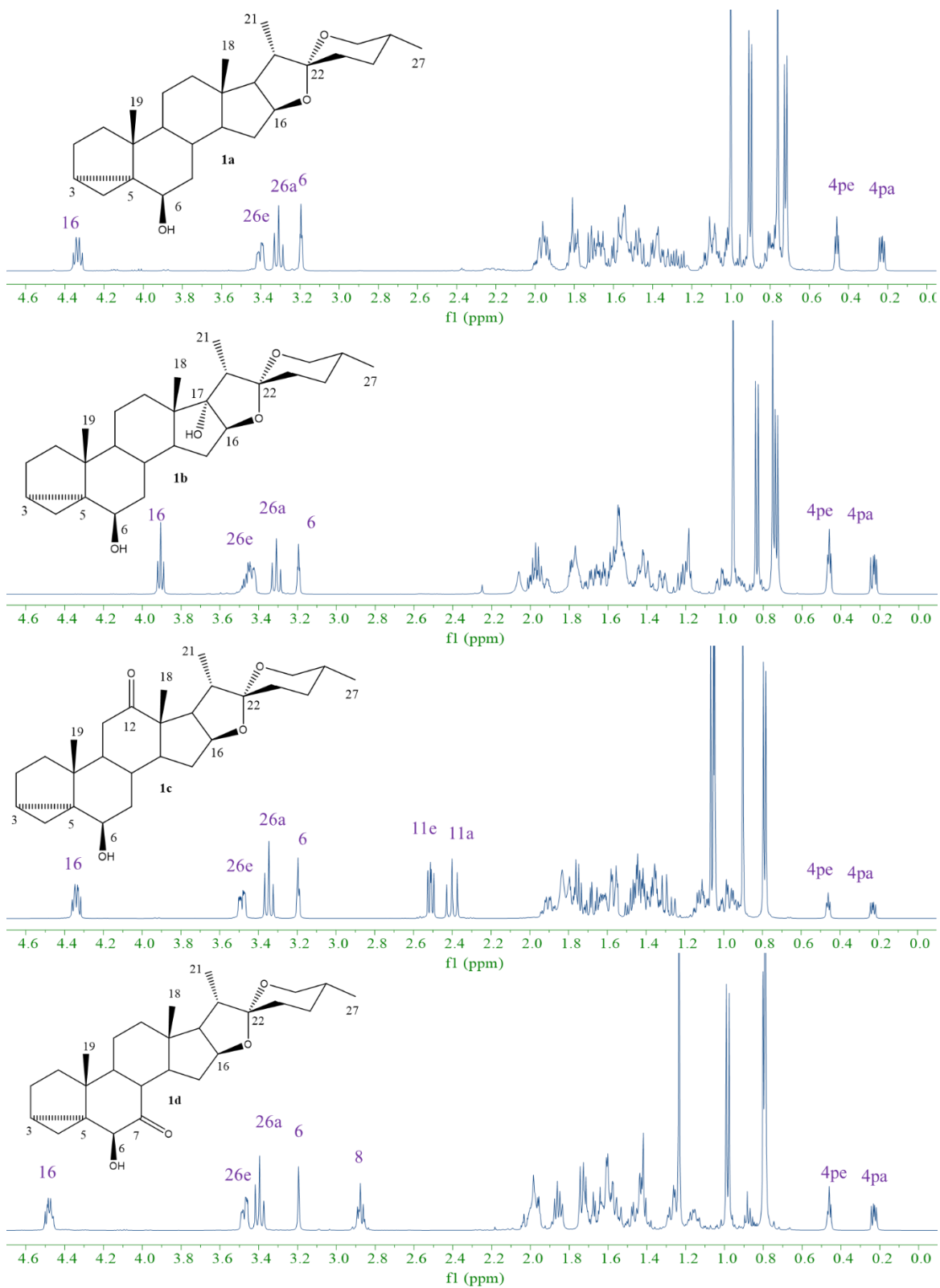


Figura 68. Espectro de RMN- ^1H a 500 MHz de derivados i-esteroidales.

Las dos señales características debido al ciclopropano son las correspondientes a los protones disterotópicos en C-4 los cuales quedan protegidos desplazando hasta 0.22 y 0.46 ppm para el 4pa y 4pe respectivamente, lo cual se asignó mediante el experimento HSQC (Figura 69) como se observa en la Figura 69 la correlación entre el C-4 y sus hidrógenos, con mayor desplazamiento para el H_{pa} dado el efecto desprotector del grupo hidroxilo, mientras que el H_{pe} se encuentra fuera de este efecto.

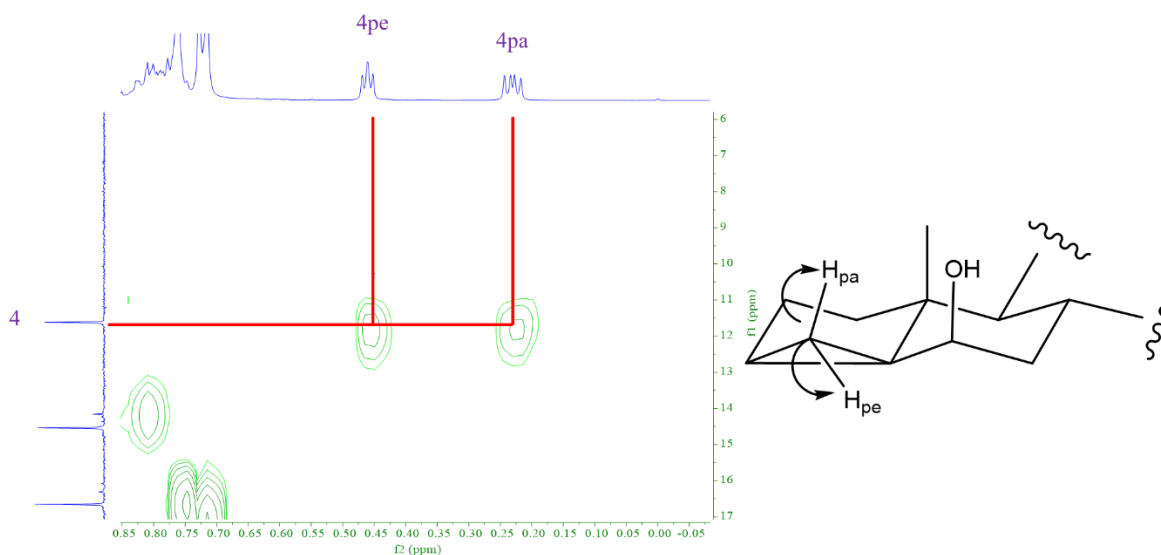


Figura 69. Expansión de HSQC del derivado **3a**.

La señal de H-6 también permitió la asignación de los carbonos aledaños a esta posición, en el caso de los compuestos **3a**, **3b** y **3c** permitió observar las interacciones primarias con C-5 y C-7 a 3 enlaces en el espectro de HMBC (Figura 70), mientras que a menor intensidad se observa interacción con C-9, C-4 y C-3 a tres enlaces, esta última demuestra la formación del enlace entre C-5 y C-3; en contraste para el derivado **3d** que presenta un carbonilo en C-7 se observa con mayor intensidad una única señal de interacción con el C-5, y a menor intensidad con C-8, C-4 y C-3, por parte de los espectros de RMN-¹³C el efecto claro fue el desplazamiento a baja frecuencia de las señales de C-5 y C-6 dado la desaparición del doble enlace (Figura 71).

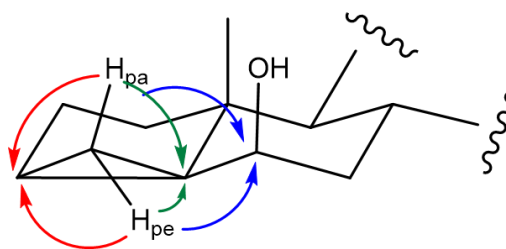
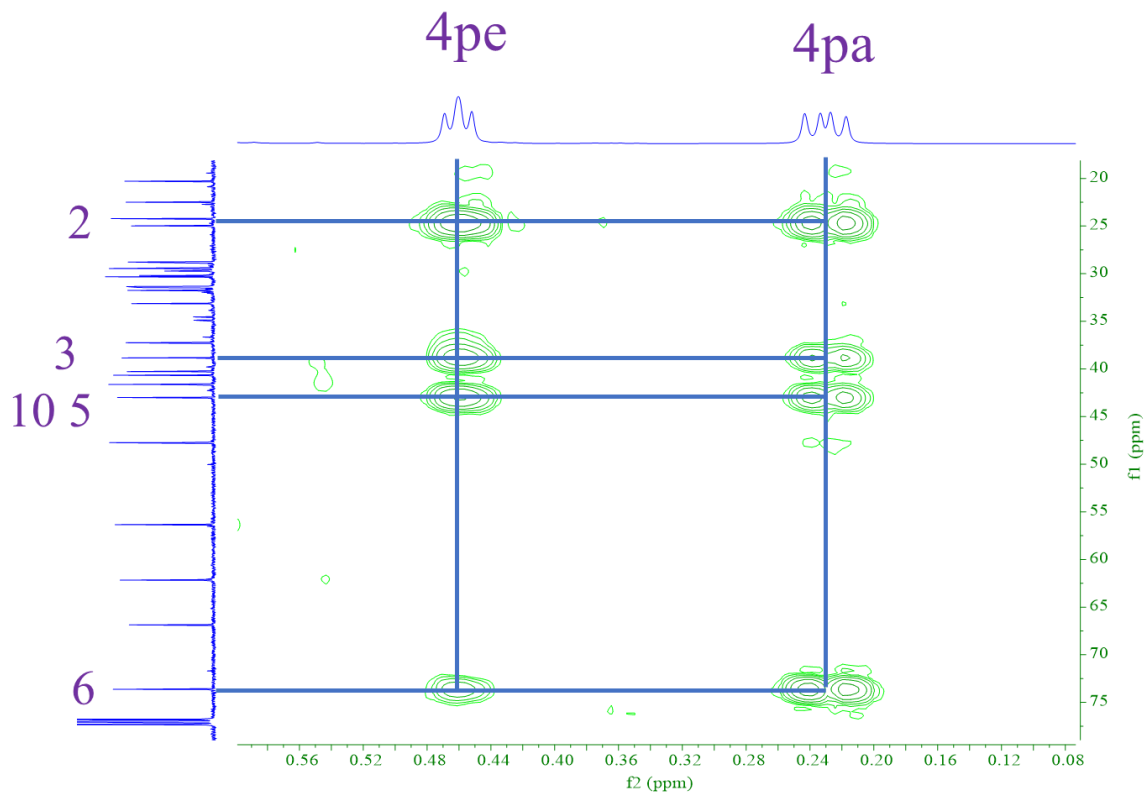


Figura 70. Expansión de HMBC del derivado 3a.

Cabe destacar que a nivel subproducto, se obtuvo las materias primas, esto explicado dado la tensión generada por la formación del ciclopropano dentro del ciclohexano del anillo A, permite que el agua funcione como nucleófilo para generar la adición en C-3 y la posterior eliminación del hidroxilo en C-6 para dar lugar al doble enlace en C-5.

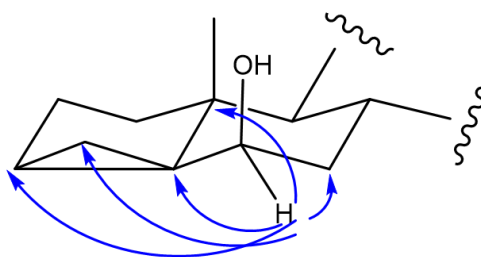
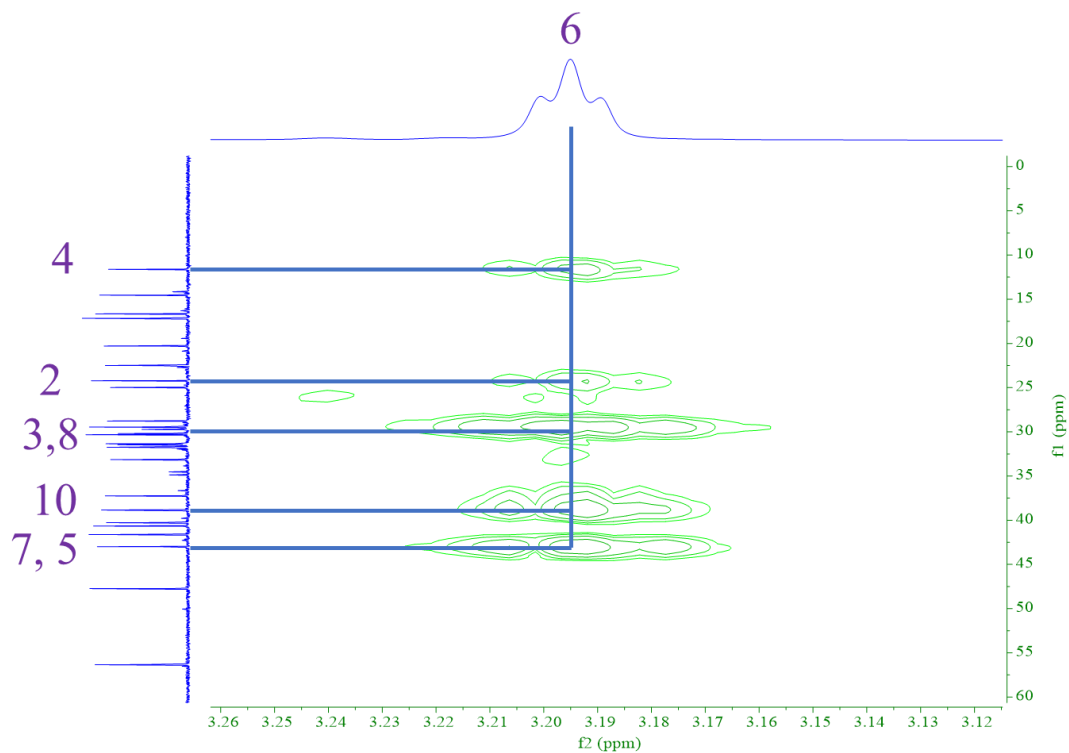


Figura 71. Expansión de HMBC del derivado **3a**.

2.3.4 Oxidación del i-esteroide 6 hidroxilado

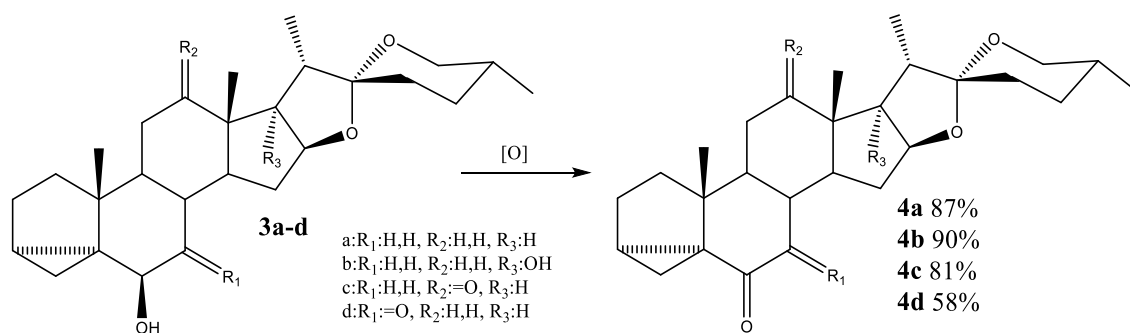


Figura 72. Esquema de oxidación en C-6 de i-esteroides.

Con el derivado i-esteroidal 6-hidroxilado obtenido se procedió a la oxidación del C-6, altamente favorecida dado el impedimento estérico mostrado por las interacciones 1,3 con el metilo en C-19, resultando en una reacción rápida, por lo que se procedió a analizar el efecto del oxidante, denotando que el reactivo de Jones y el NBS en medio ácido son idóneos para la oxidación con rendimientos altos, pero para la oxidación de **3d** el rendimiento disminuyó drásticamente en ambas metodologías, pero al cambiar por reactivo de Collins el rendimiento incrementó significativamente. Para la caracterización de los nuevos compuestos obtenidos en los espectros de RMN-¹H (Figura 73) se observa en toda la desaparición de la señal del H-6 corroborando la oxidación y, la aparición de señales alrededor de 2 ppm correspondientes a los protones en C-7 para **4a**, **4b** y **4c**.

Tabla 17. Análisis del oxidante y tiempo de oxidación en C-6 de i-esteroides.

Esteroides	Oxidante	Rendimiento
3a	Jones	85%
3a	PCC	71%
3a	Collins	72%
3a	Br ₂	81%
3a	NBS	87%
3b	Jones	91%
3b	NBS	90%
3c	Jones	79%
3c	NBS	81%
3d	Jones	21%
3d	NBS	37%
3d	Collins	58%

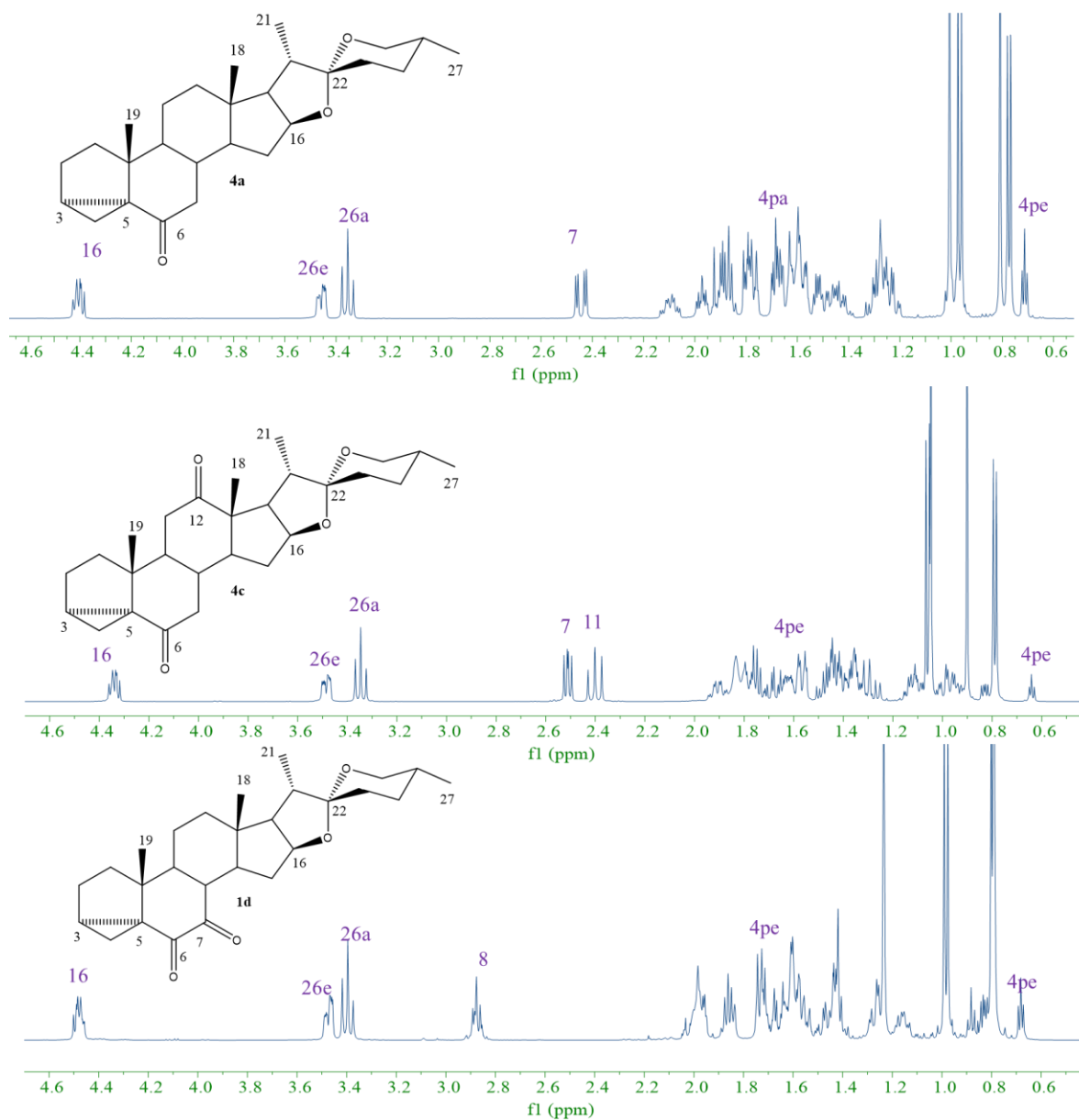


Figura 73. Espectros de RMN-¹H a 500 MHz de los derivados **4a-d**.

Por otro lado, los protones en C-4 (Figura 74) cambia el efecto protector dado el cambio de hibridación genera un mayor desplazamiento para el protón pseudoequatorial y a menor frecuencia el pseudoaxial, pero para los compuestos **4a**, **4b** y **4c** la señal de H-4pe queda traslapado debajo del metilo en C-18, pero para **4d** al estar los dos carbonos sp² cambia el efecto permitiendo separar al H-4pe y se observa como una señal *dd* dado el acoplamiento geminal y con H-3.

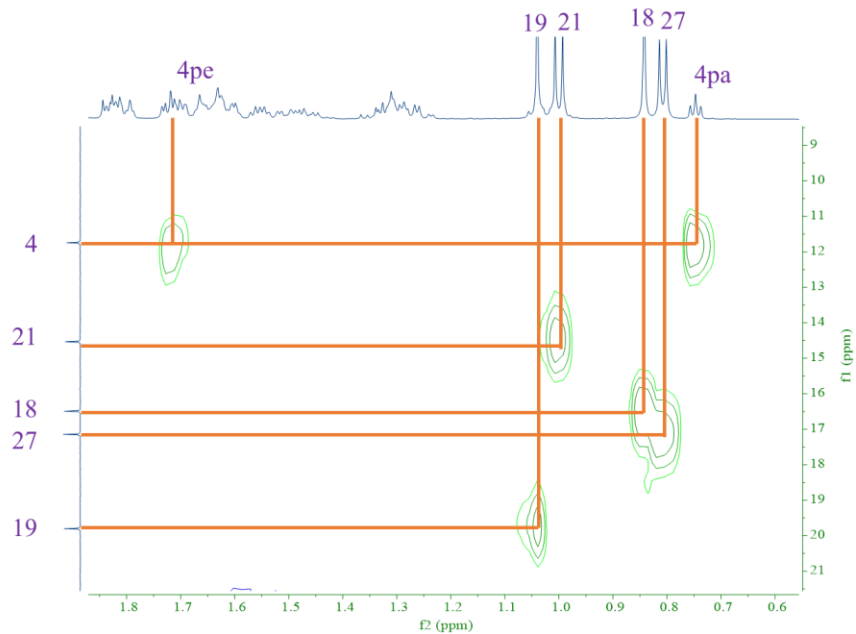


Figura 74. Expansiones de HSQC de derivados **4a**.

Para la asignación del C-6 podemos observar en la Figura 75 cambios específicos entre los derivados, primero el desplazamiento a 210 ppm de la señal correspondiente al C-6 ahora carbonilo, así como las interacciones a tres enlaces con los protones en C-7, con los protones en C-4 y el protón correspondiente a C-3.

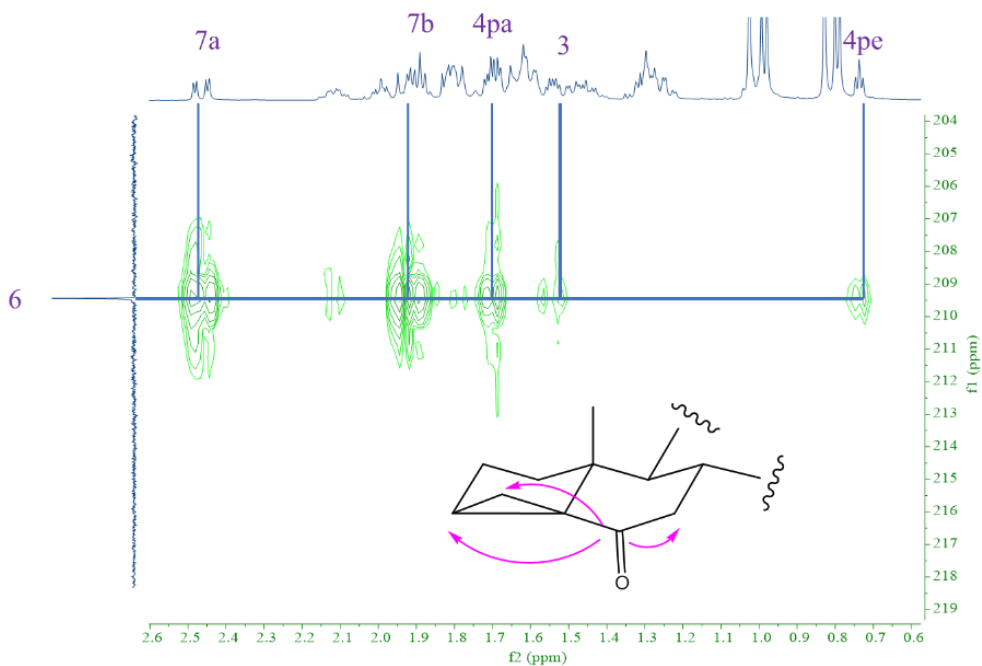


Figura 75. Expansión de HMBC del **4a**.

2.4 Derivados i-esteroides 22-oxocolestánicos

2.4.1 Apertura del espiroacetal de **1a-d**

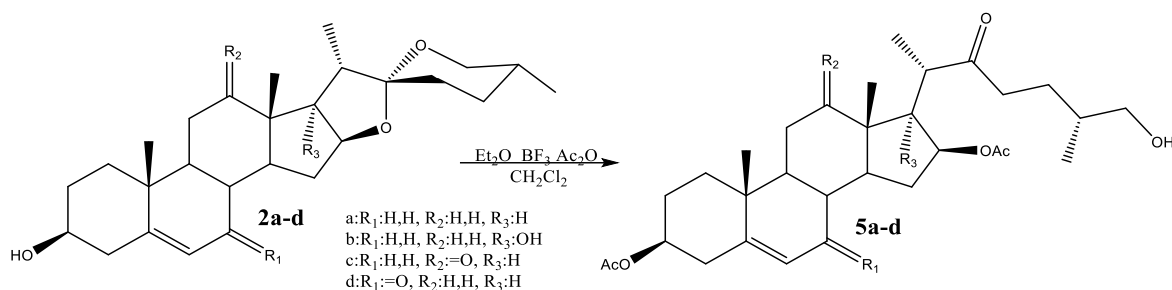


Figura 76. Esquema de reacción de apertura de espirostanos **1a-d**.

Si bien los espirostanos tanto i-esteroidales como 3 β -hidroxilados presentan un gran potencial en el área médica, algunos derivados 22-oxocolestánicos tienen potencial competitivo en este marco, pero sobre todo destacan en su actividad promotora de crecimiento vegetal, con las dos funciones en el anillo A, primero para estudiar el proceso de apertura en las nuevas materias primas **1c** y **1d**, ya que los derivados 22-oxocolestánicos de **1a** y **1b** han sido previamente sintetizados por el grupo de investigación, se utilizó la metodología propuesta en la Figura 76, en la cual mediante el ácido de Lewis BF₃ se promueve la apertura del espiroacetal para dar lugar a un derivado acetilado en C-16 (efecto paralelo en C-3) y después en presencia de agua proceder a la apertura del anillo E obteniendo el derivado 26-hidroxilado, destacando que se puede obtener como subproducto el derivado 26-acetilado, aunque limitante la cantidad de anhídrido acético esto se minimiza.

Para fines de caracterización utilizando como referencia el espectro de RMN-¹H de 5a se caracterizaron los obtenidos del resto de materias primas, en los espectros de RMN-¹H de la Figura 77 podemos denotar diversos cambios específicos, primero la resolución como una única señal de los protones H-26, que previamente en los espirostanos debido a la rigidez del anillo F su desplazamiento eran diferente, mientras que en la cadena lateral el libre giro de esta resulto en una señal doble a 3.42 ppm, corroborando esto por medio del espectro de HSQC (Figura 78) al observar una única interacción entre estos protones y el C-26.

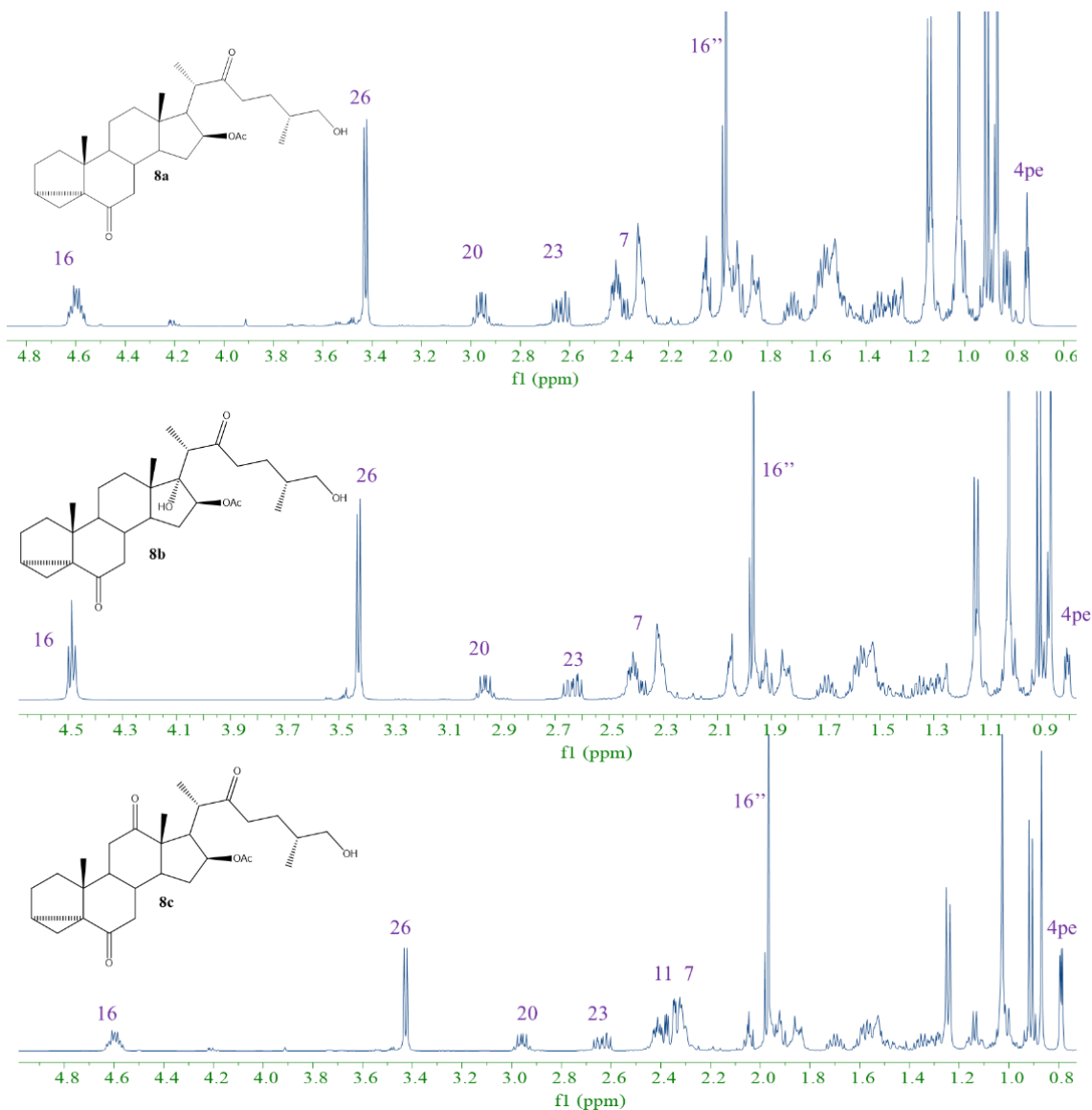


Figura 77. Espectros de RMN de $RMN^{-1}H$ a 500 MHz de **5a-c**.

Por otro lado, el desplazamiento a mayor frecuencia de H-3 y H-16 resultado de la esterificación y formación de acetatos, lo cual es congruente con la aparición de dos señales en 2.1 ppm correspondiente a los metilos de estos, las siguientes señales modificadas fueron las correspondiente a los protones H-20 y H-23, dado la presencia del grupo carbonilo en 22, asignados mediante el espectro de HMBC mostrando dichas correlaciones y a menor intensidad con H-24 y H-21, las otras señales características como H-8 en **5d** y H-11 en **5c** se obtuvieron sin cambios significativos dado la posición de estas con respecto a la modificación estructural.

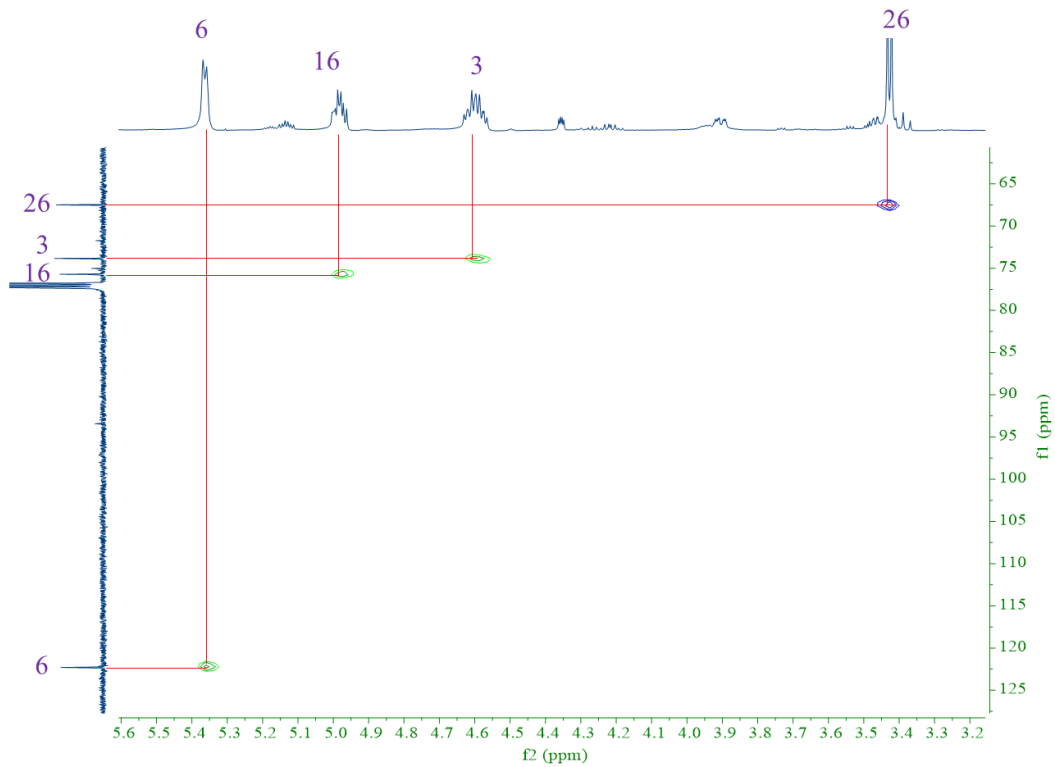


Figura 78. Espectro HSQC de 5a.

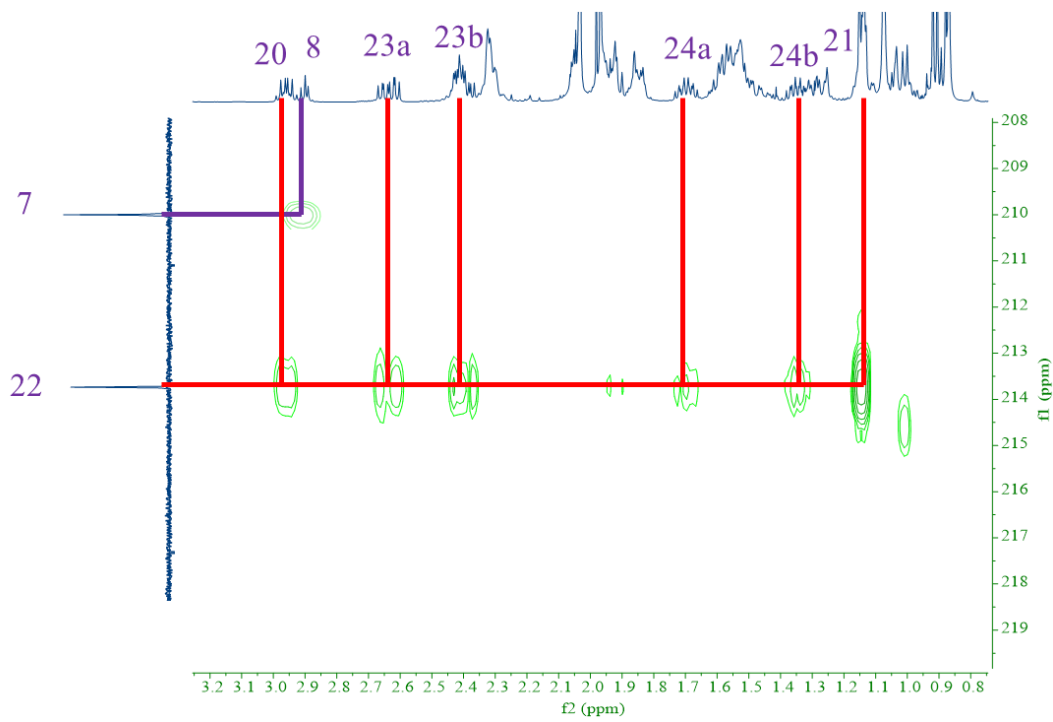


Figura 79. Espectro HMBC de 5d

2.4.2 Apertura del espiroacetal de **4a-d**

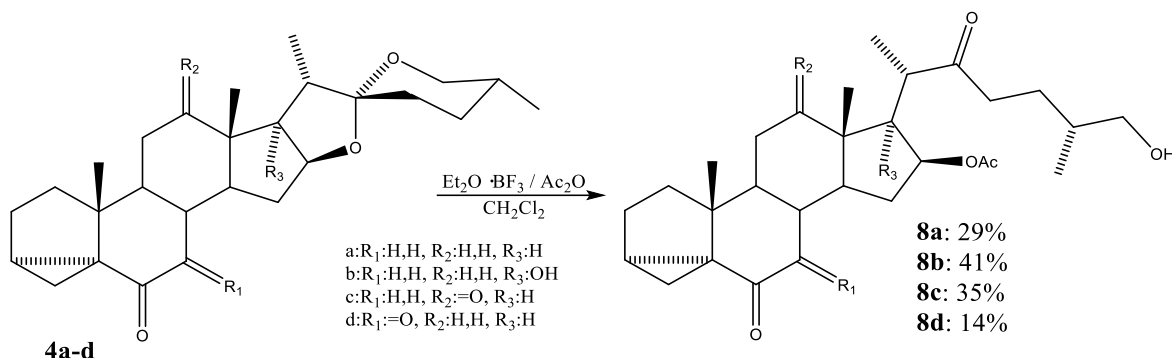


Figura 80. Esquema de reacción de apertura de espirostanos **4a-d**.

En contraste a la apertura de las materias primas, la apertura de los derivados *i*-esteroidales **4a-d** presenta una disminución considerable en el rendimiento de reacción hasta de un 54 % en el caso de la obtención de **8d**, (Tabla 18) esto debido a la obtención de nuevos subproductos de reacción, explicado ya que en condiciones ácidas se favorece la apertura del ciclopropano en C-3.

Tabla 18. Rendimiento de obtención de 22-oxocolestano *i*-esteroidal.

Esteroides	Rendimiento	Esteroides	Rendimiento
1a	72 %	4a	29 %
1b	71 %	4b	41 %
1c	81 %	4c	35 %
1d	68 %	4d	14 %

La caracterización de los derivados *i*-esteroidales 22-oxocolestánicos, resultó una mezcla entre las caracterizaciones de los derivados **4** y **5**, primero con la ausencia de la señal del doble enlace y la señal de H-3, sin embargo, H-16 en todos aparece como una señal múltiple esto debido al acoplamiento con H-15, H-17 y H-20 (Figura 81), excepto en el derivado **8b**, que al tener hidroxilo en C-17 la multiplicidad disminuye, para estos derivados observamos una única señal de metilo α a carbonilo en 2.0 ppm correspondiente al acetato en C-16, pero a menor frecuencia en 0.7 y 0.9 ppm observamos las señales que de los protones en C-4, con mayor desplazamiento para H-4_{pe}, dado el efecto desprotector del grupo carbonilo, aunque para el caso de **8d** la señal de H-4_{pe} se encuentra traslapada con la señal del metilo en C-18

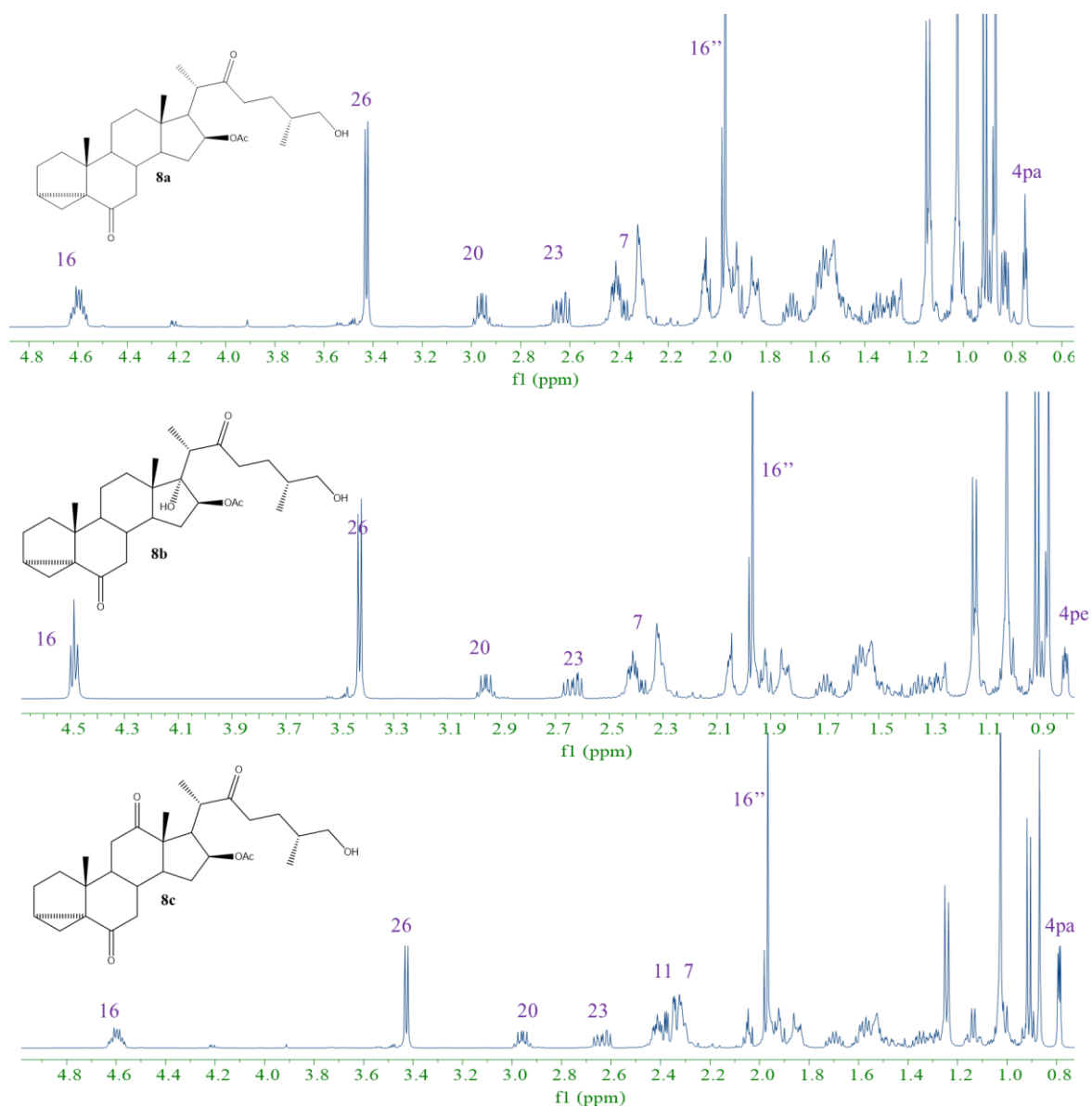


Figura 81. Espectros de RMN-¹H a 500 MHz de 8a-d

En los espectros de RMN-¹³C se observó una gran similitud a los obtenidos con los derivados **5a-d**, con la diferencia fundamental en la aparición de la señal en 210 ppm correspondiente a C-6, así como la ausencia al doble enlace y las particularidades de cada una de las materias primas utilizadas.

2.4.3 Ruta alterna

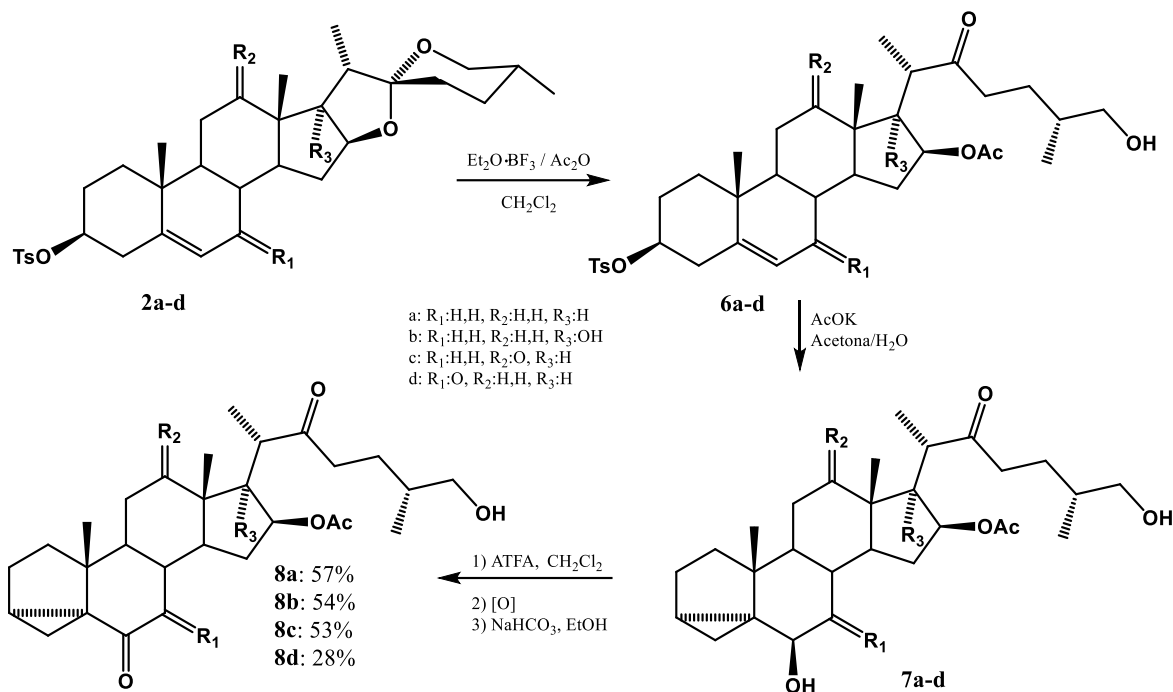


Figura 82. Esquema de ruta alternativa para la síntesis de 8a-d.

Debido al bajo rendimiento de los compuestos **8a-d** obtenidos mediante la apertura de los i-esteroides **4a-d** y a su alto potencial biológico *in silico* demostrado en el capítulo 1, se diseñó una ruta alterna, en la cual en primera instancia se abre el espiroacetal y posteriormente se forma el i-esteroide. En la Tabla 19 se puede observar el efecto de esta ruta alternativa en el rendimiento global de la obtención de los compuestos **8a-d**, destacando el inconveniente en el proceso protección oxidación desprotección (POD) para el paso de **6a-d** a **8a-d** donde la purificación de los intermediarios dado lo lábil del grupo trifluoroacetato, pero realizando las reacciones *in situ* este fenómeno se disminuye, aunque para los derivados de diosgenina se exploró la oxidación directa por NBS dado la mayor reactividad del hidroxilo en C-6 que en C-26, aunque no se obtienen un rendimiento mayor al proceso POD propuesto si permite explorar una oxidación controlada para futura optimización, dadas las condiciones particulares y el uso de reacciones consecutivas *in situ* se obtuvo únicamente de esta ruta los tosilatos y los i-esteroides 6-hidroxilados-22-oxocolestánicos, mismos que se procedieron a caracterizar.

Tabla 19. Análisis de rendimiento de obtención de derivados **8** vía ruta alterna.

Producto	R global A	Apertura/i-esteroide	POD	R global B
8a	9 %	68 %	85 %	57 %
8b	17 %	65 %	87 %	54 %
8c	15 %	72 %	78 %	52 %
8d	4.5 %	52 %	58 %	28 %
8a*	9 %	68 %	48 %*	30 %

* utilizando NBS como oxidación directa de **6a** a **8a**.

2.5 Subproductos de reacción

La síntesis orgánica es un proceso complicado, tanto por la estabilidad de los productos esperados, como por las reacciones colaterales que se pueden presentar en el mecanismo de reacción, para los cuales es de interés su caracterización a fin de dilucidar el mecanismo e inclusive ser utilizado si tiene potencial biológico, combinando con las herramientas bioinformáticas se le puede dar aplicación, para esto es necesario su caracterización, aunque en CCF en la mayoría de las reacciones solo en algunas el rendimiento del subproducto fue considerable, particularmente en los derivados de la 7-oxo de la i-diosgenina (**3d**), así como en la apertura del espiroacetal de i-esteroides como se destacó anteriormente.

2.5.1 Derivados de la 7-oxo i-diosgenina (**3d**)

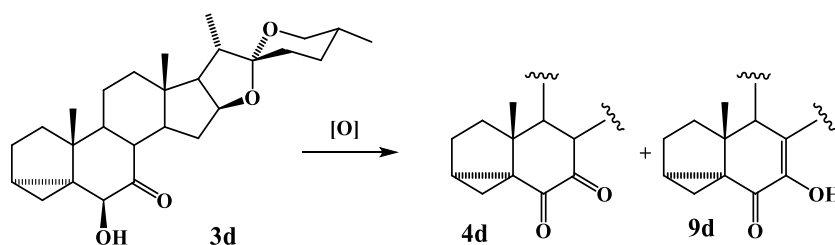


Figura 83. Esquema de oxidación de **3d**.

La oxidación del derivado **3d** genera el compuesto 6,7-dicetónico **4d**, que no es totalmente estable debido a los dos grupos carbonilos y a la densidad electrónica que conlleva el anillo ciclopropanico en el anillo A. Al momento de la oxidación se observó la formación de un subproducto en la misma proporción que el producto principal, en el cual se identificó la presencia de un enol en C-7, dado que en el espectro de RMN-¹H se observa la desaparición de la señal correspondiente al H-8 (Figura 84), así como la aparición de una señal en 2.1 ppm correspondiente al protón en C-9.

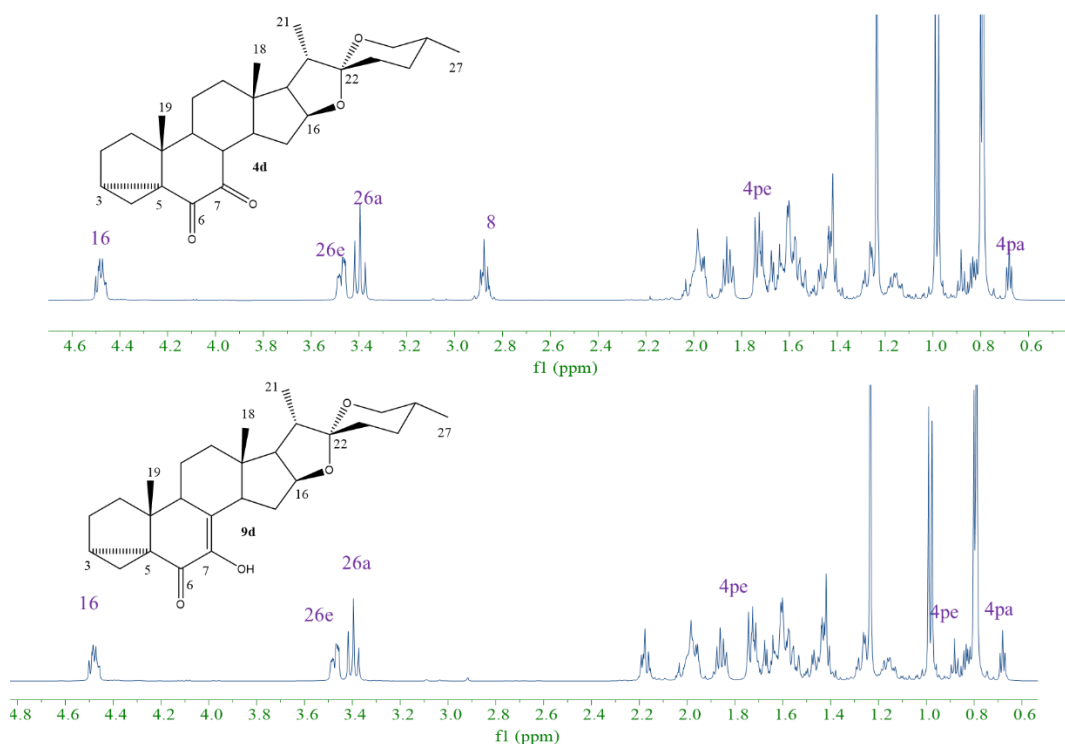


Figura 84. Comparación de espectros de RMN-¹H a 500 MHz de **4d** y **9d**.

2.5.2 Derivados enólicos acetilados **10a-d** y **11d**.

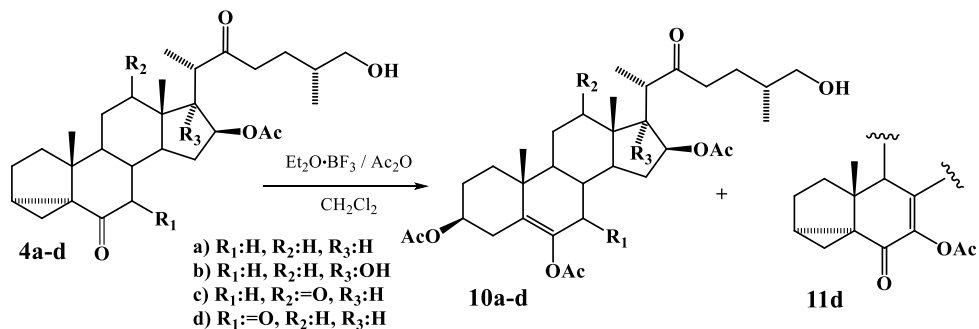


Figura 85. Esquema de apertura de derivados **8a-d**.

La reacción de apertura de los derivados **4a-d** presentó bajo rendimiento hacia los productos esperados, de manera que se buscó una ruta alternativa para incrementar dicho rendimiento. En la reacción original no se recuperó materia prima y al analizar el crudo de reacción se observó la presencia de derivados **26** acetilados en muy bajo rendimiento, aunque predominó un subproducto que al observar su espectro de RMN-¹H (Figura 86) se denota la aparición de dos señales de metilo de acetato, uno correspondiente al metilo en C-16 y otro similar a

los observados en los derivados **5a-d** que corresponde a un acetato en C-3, congruente con la desaparición de las señales de los protones en C-4 característicos de los i-esteroides. El tercer acetato, corresponde a la esterificación del hidroxilo en C-26 pero el desplazamiento de los H-26 corresponde a la forma hidroxilada, lo cual fue corroborado mediante el espectro de RMN-¹³C (Figura 86); la ubicación de las señales es similar a aquellas del enol **9d**; por tanto, estas señales se asignan al enol acetilado en C-6. El carbonilo en C-6 se tautomeriza a la forma enólica y ésta, dado la presencia del anhidrido acético, se esterifica y da lugar a los derivados **10a-d**. En el caso de la apertura del anillo 3,5-ciclopropánico del derivado **4d**, se obtuvo el compuesto **11d**. En el espectro de RMN-¹H de este nuevo compuesto se muestran solo dos señales de grupos acetato; la señal hacia 0.75 ppm, es característica para el protón H-4_{pa} de un anillo 3,5-ciclopropánico de un i-esteroide (Figura 87). Por otra parte, no se observa una señal que corresponda a H-8; por tanto, todo indica la formación del enol en C-7. La señal hacia 3.43 ppm es característica para los protones en C-26 que soporta un grupo alcohol. Cabe destacar que a diferencia del enol **9d**, la presencia del acetato del enol evita el proceso tautomérico, por lo que ofrece estabilidad del compuesto.

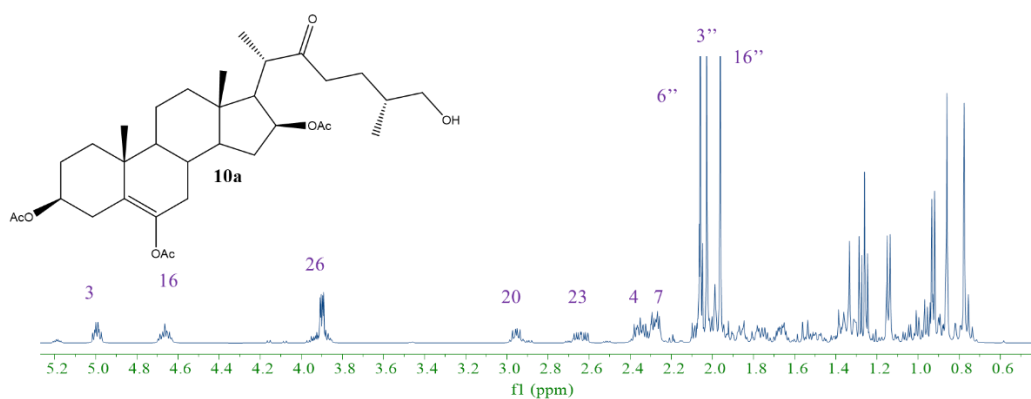


Figura 86. Espectros de RMN-¹H de **10a**

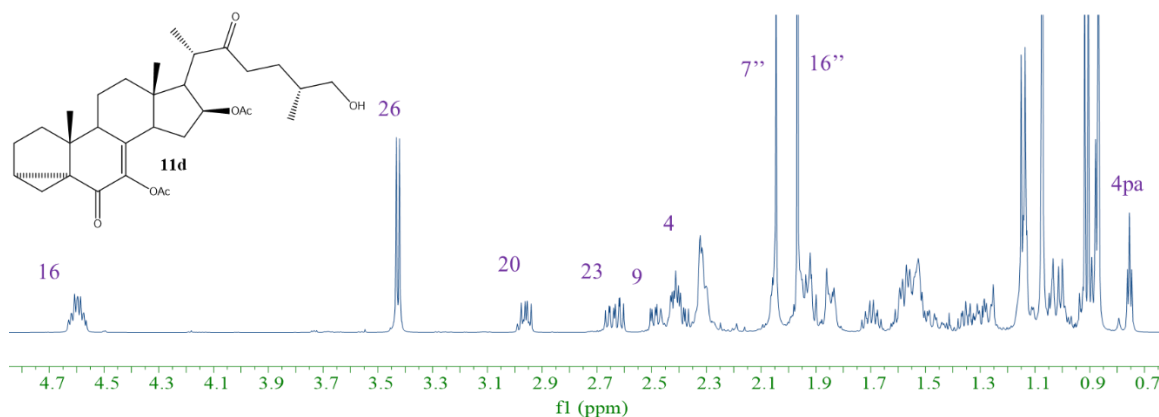


Figura 87. Espectro de RMN-¹H a 500 MHz de **11d**

Por otro lado, en la ruta alterna para obtener el derivado **8d**, se aisló un subproducto con ausencia de la señal H-8, en el cual la señal de metilo base de oxígeno corresponde al acetato en C-16 y también se aprecia una señal para un protón H-4_{pa} de un 3,5-cicloesteroide. Por tanto, al oxidar el hidroxilo en C-6 también dió lugar a la formación del enol como se había observado para el caso de la obtención de **9d**. Esto último muestra la alta reactividad presentada por la presencia de la 6,7-dicetona. Los derivados de botogenina no presentan formación de un grupo enólico derivado del carbonilo en C-12.

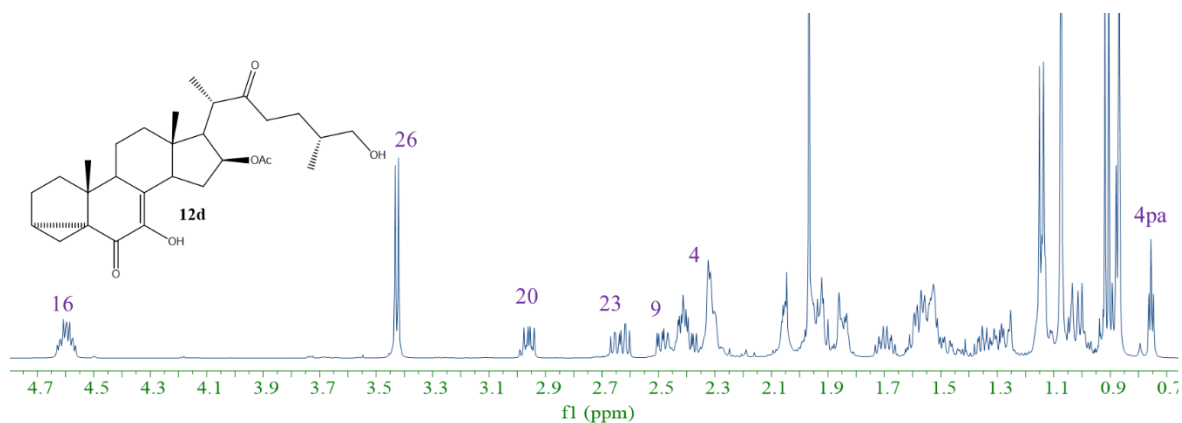


Figura 88. Espectro de RMN-¹H a 500 MHz de **9d**

CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

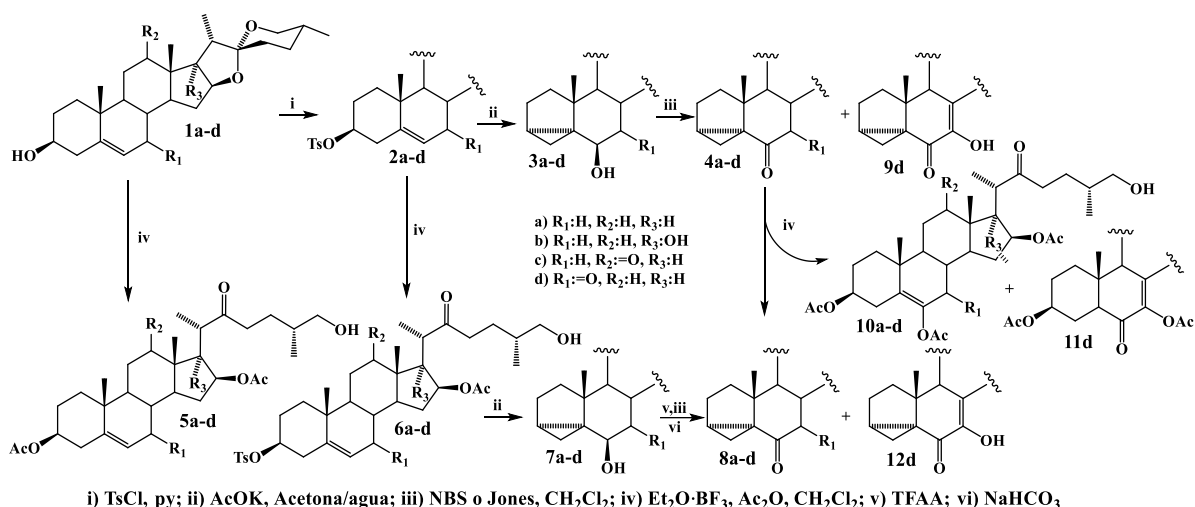


Figura 89. Esquema de reacción con subproductos principales obtenidos.

En los capítulos 1 y 2 se expuso el potencial biológico y la estabilidad sintética de los derivados i-esteroidales, así como de los principales subproductos que se encontraron (Figura 89), denotando potencia en diversas áreas biológicas y estabilidad química para la mayoría de los compuestos sintetizados. Antes de pasar a la evaluación biológica fue necesario determinar la estabilidad de los compuestos ante dos condiciones; la primera, como componente de una solución fisiológica, y en particular, a la estabilidad a diversos valores de pH y en presencia de sales de sistema buffer. En segundo lugar, a la estabilidad con respecto a la temperatura fisiológica.

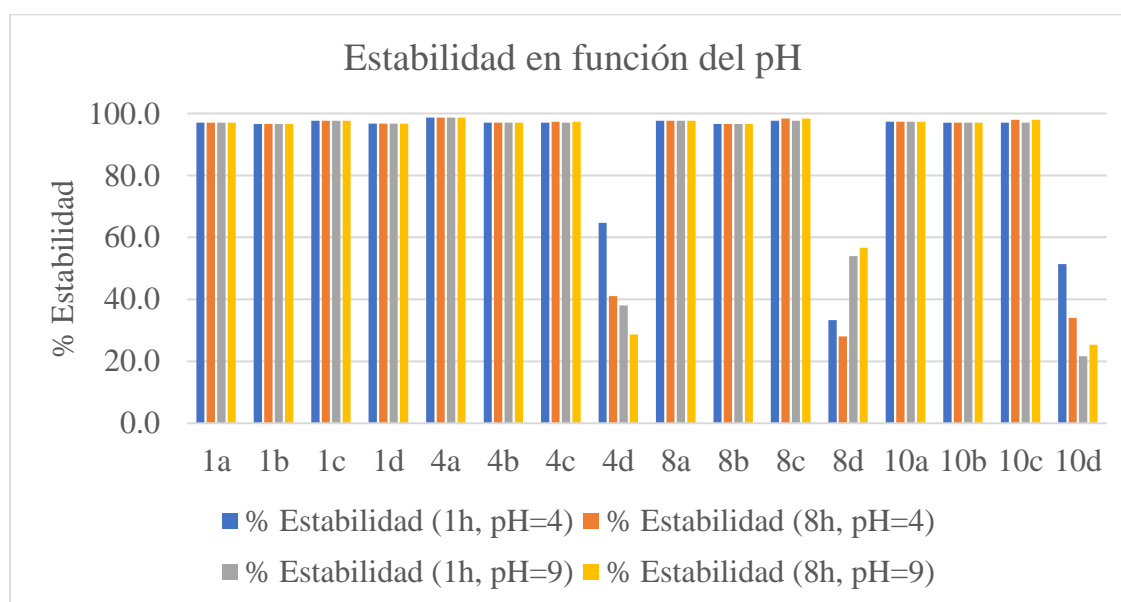


Figura 90. Prueba de estabilidad en función del pH a dos tiempos de exposición.

Para determinar la estabilidad en la escala de pH, se trabajó desde pH=4 hasta pH=9, para garantizar las condiciones ácidas que se requieren en el retículo endoplásmico y en el tejido vegetal. Por otra parte, se determinaron valores ligeramente básicos como los existentes en medios de cultivo cancerígenos hepáticos. En ambos casos, las determinaciones se llevaron a cabo en dos tiempos de exposición: 1 h y 8 h, bajo agitación constante. Como se puede observar en la Figura 90, los derivados i-esteroidales son bastante estables excepto los obtenidos a partir de 7-oxodiosgenina, lo cual es comprensible dado que en esas condiciones de pH se genera un equilibrio entre las dos formas tautoméricas **8d - 12d** y **4d - 9d**. Este equilibrio fue anulado cuando se añadió anhídrido acético porque con ello se formó el enol acetilado en C-7 (Figura 91). Otro grupo que desestabiliza son los derivados tosilados; sin embargo, esto se debe a la naturaleza misma del nucleófilo, lo que dio lugar a una gran cantidad de subproductos.

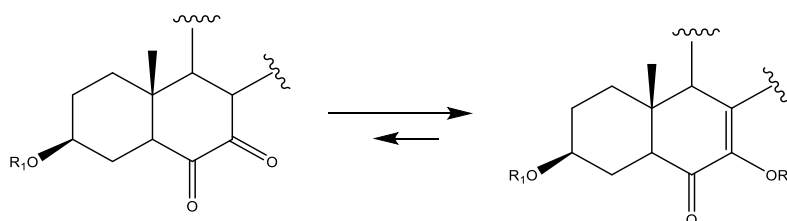


Figura 91. Equilibrio tautomérico **8d - 12d** y **4d - 9d**

Con respecto a la temperatura, se realizó un estudio similar, utilizando únicamente pH de 7.4; dado la estabilidad que, demostrada en función del cambio de pH, se eliminaron los derivados tosilados. En la Figura 92 se puede apreciar que, en el intervalo de 15 °C a 60 °C, existe una gran estabilidad para los derivados estirostánicos; en cambio, los compuestos 22-oxocolestánicos a 60 °C comenzaron a presentar descomposición. Algunos de esos compuestos correspondieron a la formación de esteroides furosténicos y estirostánicos.

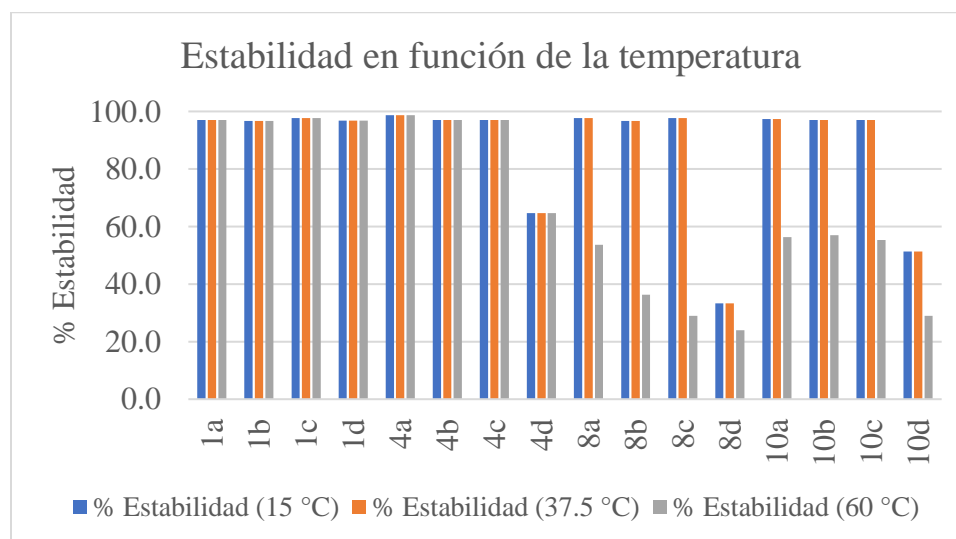


Figura 92. Efecto en la estabilidad de la temperatura.

3.1 Efecto promotor de crecimiento vegetal

3.1.1 Antecedentes

Existen diversos mecanismos mediante los cuales las plantas encaran los diversos tipos de estrés abiótico que afectan los rendimientos de cultivos. Cada tipo de estrés provoca una compleja y única respuesta celular y molecular en la planta.

En la mayoría de la literatura se menciona que solamente existen cinco tipos de fitohormonas: las auxinas, las citoquinas, las giberelinas, los ácidos abscísicos y el etileno (ver Figura 93). Recientemente, se ha incorporado a la familia de los brasinoesteroides, como la brasinólida y la homobrasinólida [78,79], que son mucho más potentes que las 5 antes mencionadas.

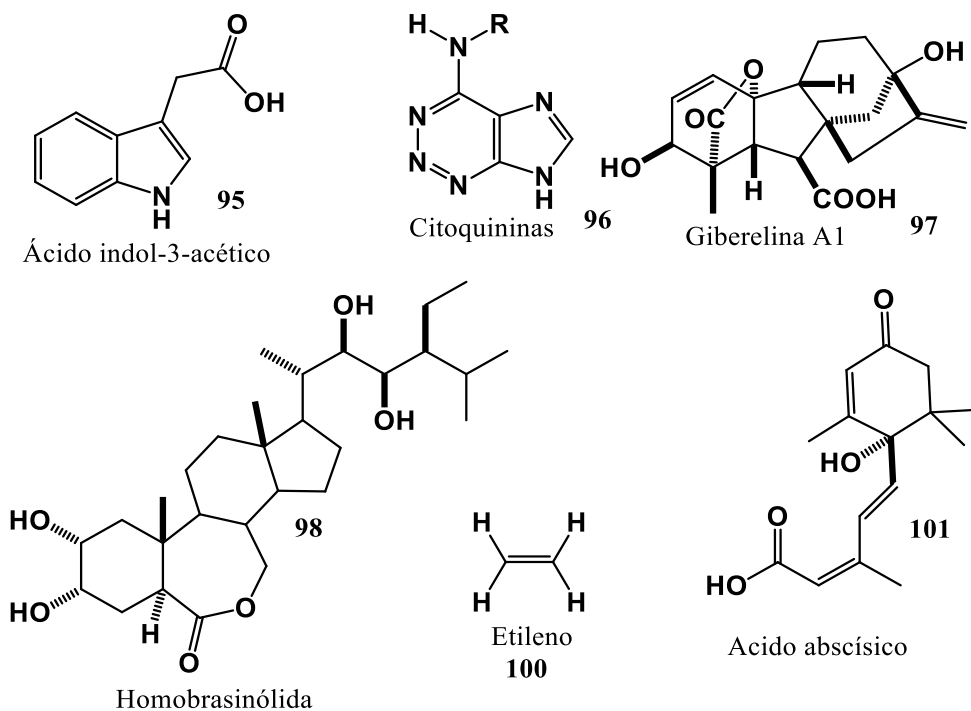


Figura 93. Principales tipos de fitohormonas.

La obtención de los brasinoesteroides de su fuente natural es improductiva dado su bajo rendimiento, por lo que la síntesis ha sido un apasionado objetivo, lo que a la vez ha conducido a obtener compuestos con múltiples modificaciones; por ejemplo, el compuesto **108**, que no presenta el grupo hidroxilo en C-2, tiene una bioactividad similar a la de la epibrasinólida (Figura 94). Ello representa en la práctica una gran ventaja en la obtención de fitohormonas, puesto que diversos potentes análogos pueden obtenerse a través de un menor número de pasos de reacción [80].

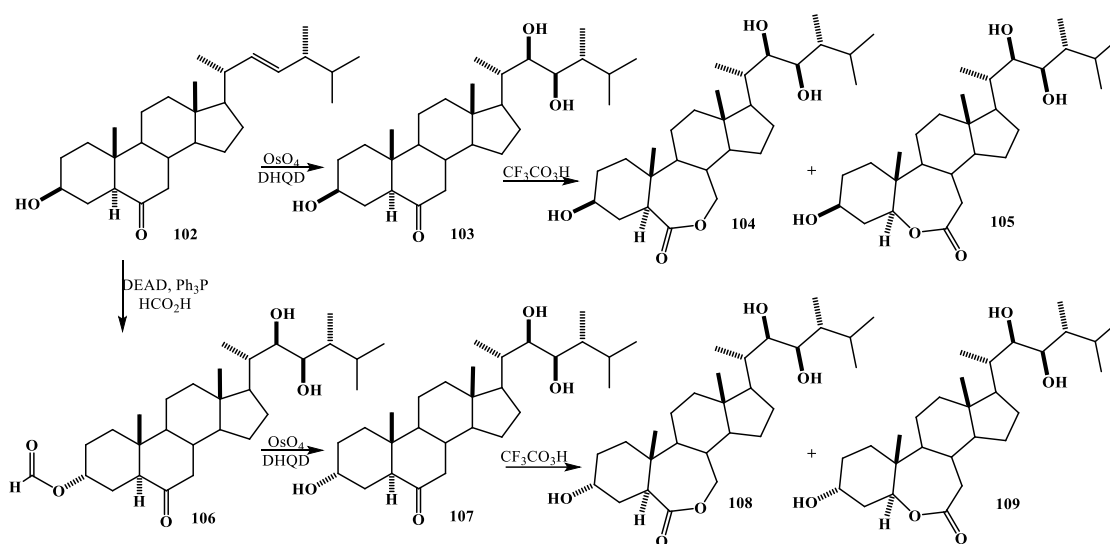


Figura 94. Síntesis de los análogos 104, 105, 108 y 109 de la brassinólida.

Debido a estos sorprendentes resultados, muchos grupos de investigación se han dado a la tarea de insertar grupos polares y no polares en las diversas posiciones del esteroide. A diferencia de otros compuestos con gran actividad biológica por la introducción de átomos de flúor, como los análogos fluorados en la posición 24 de la brassinólida, homobrasinólida y epibrasinólida (Figura 95) [81], algunos presentaron un ligero incremento en la actividad como promotor de crecimiento vegetal, pero lo sorprendente fue que estos nuevos compuestos, demostraron poseer propiedades anticancerígenas, dando mayor importancia a este tipo de esteroides, y a una nueva e importante aplicación.

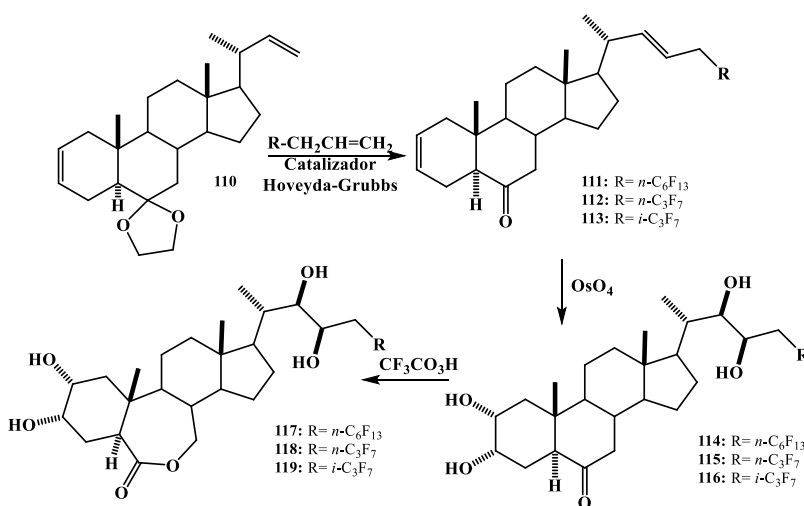


Figura 95. Esquema de síntesis de análogos de BS con la cadena fluorada.

Sin embargo, el uso de esteroides en el campo vegetal no se restringe únicamente a la promoción de crecimiento vegetal, también tienen potencial contra diferentes tipos de estrés destacando: temperaturas, aridez de suelos, agua, salinidad, plagas de insectos, fitopatógenos, y otros, lo que ha llevado a optimizar la estructura para tener función promotora de crecimiento vegetal además de control contra plagas, por ejemplo. Estructuras con inserción de heterociclos (Figura 96) generaron un efecto de resistencia contra contaminación por plomo y estrés por cambio de temperatura. [12,82,83]

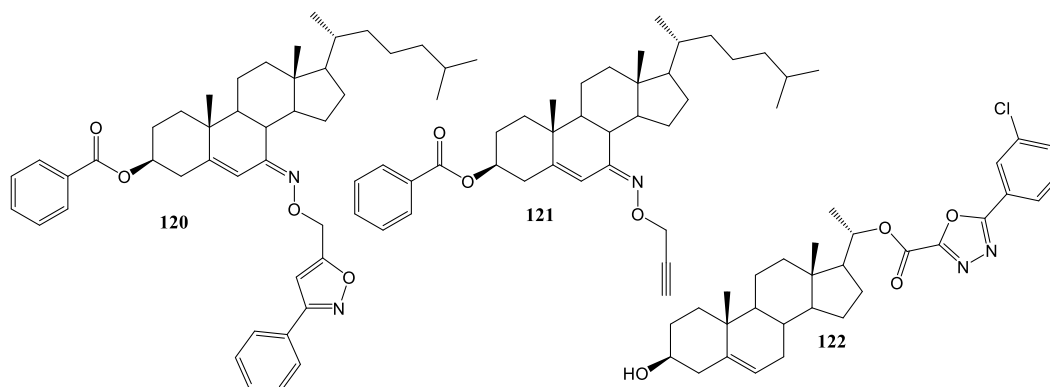


Figura 96. Ejemplos de modificaciones con efecto anti-estrés en plantas.

Se denota que los esteroides tienen un gran potencial a beneficio de la agricultura en diferentes ámbitos y que los i-esteroides han sido utilizados como intermediarios y que no se les ha evaluado en su actividad biológica intrínseca, lo que lo hace objeto de estudio.

Existen varios métodos para la evaluación de actividad promotora de crecimiento vegetal, destacando el ensayo de inclinación de lámina de arroz (que ayuda a determinar efectos de elongación celular), evaluación de desarrollo radicular en lechuga *G. Rapid* (para determinar el efecto de proliferación celular), ensayo de desarrollo de cotiledón de soya (para evaluar el efecto de acumulación de biomasa), el ensayo de germinación en diferentes especies como maíz, frijol, brocoli, tomate, entre otras (a fin de determinar el efecto en la activación de las vías de germinación asociadas a auxinas y giberelinas).

3.1.2 Metodología

➤ Ensayo de inclinación de lámina de arroz.

Plántulas de arroz variedad Morelos, crecidas en oscuridad durante 6 días, a 30 °C en sustrato de vermiculita, se seleccionaron por uniformidad de tamaño; de ellas se obtuvieron segmentos (1 cm de vaina y 1 cm de lámina) de la segunda hoja y se colocaron bajo luz roja y amarilla. Los segmentos se incubaron durante 24 h en agua destilada (en oscuridad) a 30

°C, luego durante 48 h en solución buffer de malato de potasio 2.5 mM conteniendo cada uno de los compuestos esteroideos seleccionados, a 3 dosis (1.0 mg/L 0.1 mg/mL y 0.01 mg/L). Después del tiempo se midió el ángulo respecto a la vaina y se normalizó respecto a la desviación generada por la brasinólida a concentración de 0.1 mg/mL.

➤ Prueba del alargamiento del segundo entrenudo de plántulas de frijol

Plántulas de frijol “Pinto” (*Phaseolus vulgaris*) germinadas en vermiculita y petmost fueron seleccionadas por homogeneidad de crecimiento. Éstas se trataron con cada una de las sustancias durante 24 h y se determinó el crecimiento después del segundo entrenudo, normalizando los datos respecto al control positivo brindado por la giberelina GA4 (ácido giberélico).

➤ Prueba de velocidad de germinación

Se seleccionaron semillas por homogeneidad de peso, se esterilizaron con agua, se lavaron con solución de hipoclorito de sodio al 1%, por 5 min, y se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron durante 8 h en inhibición con cada uno de los compuestos sintetizados a las concentraciones de 1.0 mg/L, 0.1 mg/L y 0.01 mg/L, así como con las diversas fitohormonas de referencia. La germinación se monitoreó mediante la aparición del primer brote en vermiculita. Se efectuó un diseño experimental por bloques de 24 repeticiones en cada uno.

➤ Análisis estadístico

Para comparar el efecto de los compuestos se utilizó una prueba de una vía ANOVA post LSD-Fisher para una $p < 0.05$ de comparación entre compuestos y controles, empleando el software Minitab 18.0.

3.1.3 Efecto PCV

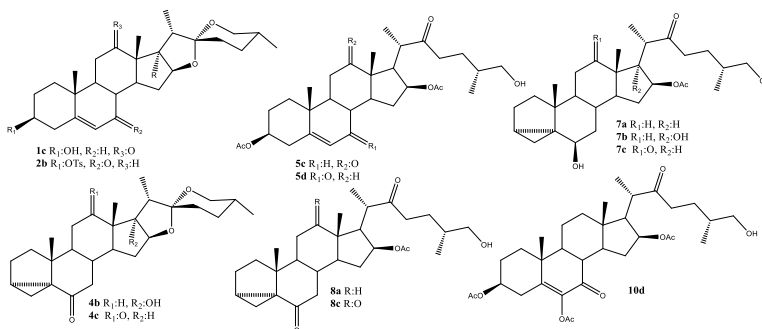


Figura 97. Estructuras seleccionadas para evaluación promotora de crecimiento vegetal.

La promoción del crecimiento vegetal es una actividad que tienen diversos niveles, desde potenciar la germinación, la elongación celular hasta finalmente incrementar la producción del fruto. Los brasinoesteroides, como se observó previamente, su principal atribución es en cuanto a fenómenos de germinación y de elongación celular. Para éste último, la evaluación generalmente emplea la aplicación de las metodológicas de ensayo de inclinación de lámina de arroz y la de elongación de segundo entrenudo de frijol. Los resultados *in silico*, determinaron a las estructuras **1c**, **2d**, **5c**, **7a**, **7b**, **7c** y **10c** como productos o subproductos con potencial promotor vía brasinoesteroides o no competitivos vías auxinas y jasmonatos, aunque con menor energía de acoplamiento, pero a fin de comparar grupos funcionales, se decidió agregar a los derivados **8a**, **8c**, **4a** y **4d**, dado que presentan diferencias puntuales contra los seleccionados previamente (Figura 97).

Tabla 20. Análisis de resultados del efecto de la inclinación de la lámina de arroz.

Compuesto	EA BRI1 (kcal/mol)	Dosis 1.0 mg/L	Dosis 0.1 mg/L	Dosis 0.01 mg/L
Brasinólida	-7.074	-	100% ⁺	-
Epibrasinólida	-6.258	-	98% ⁺	-
Blanco	N/A	52%*	52%*	52%*
1c	-7.381	45%*	51%*	53%*
2d	-7.213	42%*	47%*	-
5c	-7.009	98% ^{&}	104% ⁺	83% ^{*+}
7a	-7.374	112% ^{*+}	225% ^{*+}	187% ^{*+}
7b	-7.746	65% ^{*+}	148% ^{*+}	110% ⁺
7c	-7.103	99% ⁺	100% ⁺	81% ⁺
10d	-6.590	87%	128% ^{*+}	-
4a	-6.226	78%*	54%*	55%*
4c	-5.675	51%*	50%*	51%*
8a	-6.188	108% ⁺	91% ⁺	88% ⁺
8c	-6.4252	101% ⁺	105% ⁺	187% ⁺

* diferencia significativa vs brasinólida 0.1 mg/L $p < 0.05$ Anova pos LSD-Fisher

⁺ diferencia significativa vs blanco $p < 0.05$ Anova pos LSD-Fisher

Al realizar los estudios de inclinación de lámina de arroz, podemos observar en la Tabla 20, el efecto de la inclinación con respecto a la brasinólida y la epibrasinólida, efecto que se reporta como porcentaje, siendo el 100% para la brasinólida. A nivel estructural, los derivados i-esteroidales 6-hidroxilados 22-oxocolestánicos son los que presentaron una mayor actividad de elongación celular particularmente, el derivado **7a**. A la misma dosis de aplicación de la brasinólida y la epibrasinólida presenta el doble de actividad, mientras que **7b** sólo brinda un incremento del 50%. En particular, a dosis más altas este último presenta un efecto menor, no implícitamente inhibitorio, sino que a esta mayor concentración las células son fuertemente elongadas y pueden conducir a su destrucción. Este es un tema interesante que se estudiará posteriormente. El derivado **8c** presentó una actividad más alta que el de la brasinólida a 0.1 mg/L, y dado que su energía de acoplamiento presentó un efecto similar a la misma dosis ello sería indicativo que tiene una segunda vía de activación muy posiblemente la vía de los jamonatos de la cual se conoce que está relacionada a la proliferación más que a la elongación.

Los derivados espirostánicos demostraron efecto nulo con valores estadísticamente comparables a los del blanco. Por otro lado, al alargamiento del segundo entrenudo de frijol, se le atribuye un proceso vía activación de los receptores de giberelinas, sin embargo, los esteroides en el estudio teórico se observaron que a nivel espacial no pueden ocupar un diferente sitio de activación del receptor; sin embargo, los compuestos **8c** y **10c** (Tabla 21) presentan un efecto estadísticamente distinto al del blanco e inclusive **10c** mayor al de la giberelina, lo que lo coloca como compuesto promotor de la elongación celular, tanto por la vía de brasinoesteroides como de giberelinas, pero al no caber en el sitio, se presume que éste puede estar alterando indirectamente la vía, mediante el incremento de la presencia de giberelinas libres para la activación directa del receptor.

Tabla 21. Efecto en el alargamiento del segundo entrenudo de frijol

Compuesto	Dosis 0.1 mg/L	Dosis 0.01 mg/L
AIA	100%	74%* ⁺
Blanco	32%*	32%*
1c	34%*	31%*
5c	42%*	33%*
7a	35%*	39%*
7b	29%*	35%*
10c	121% ⁺⁺	104% ⁺
4a	31%*	38%*
4c	34%*	33%*
8a	54%* ⁺	31%*
8c	103% ⁺	58%* ⁺

* diferencia significativa vs AIA 0.1 mg/L $p < 0.05$ Anova pos LSD-Fisher

& diferencia significativa vs blanco $p < 0.05$ Anova pos LSD-Fisher

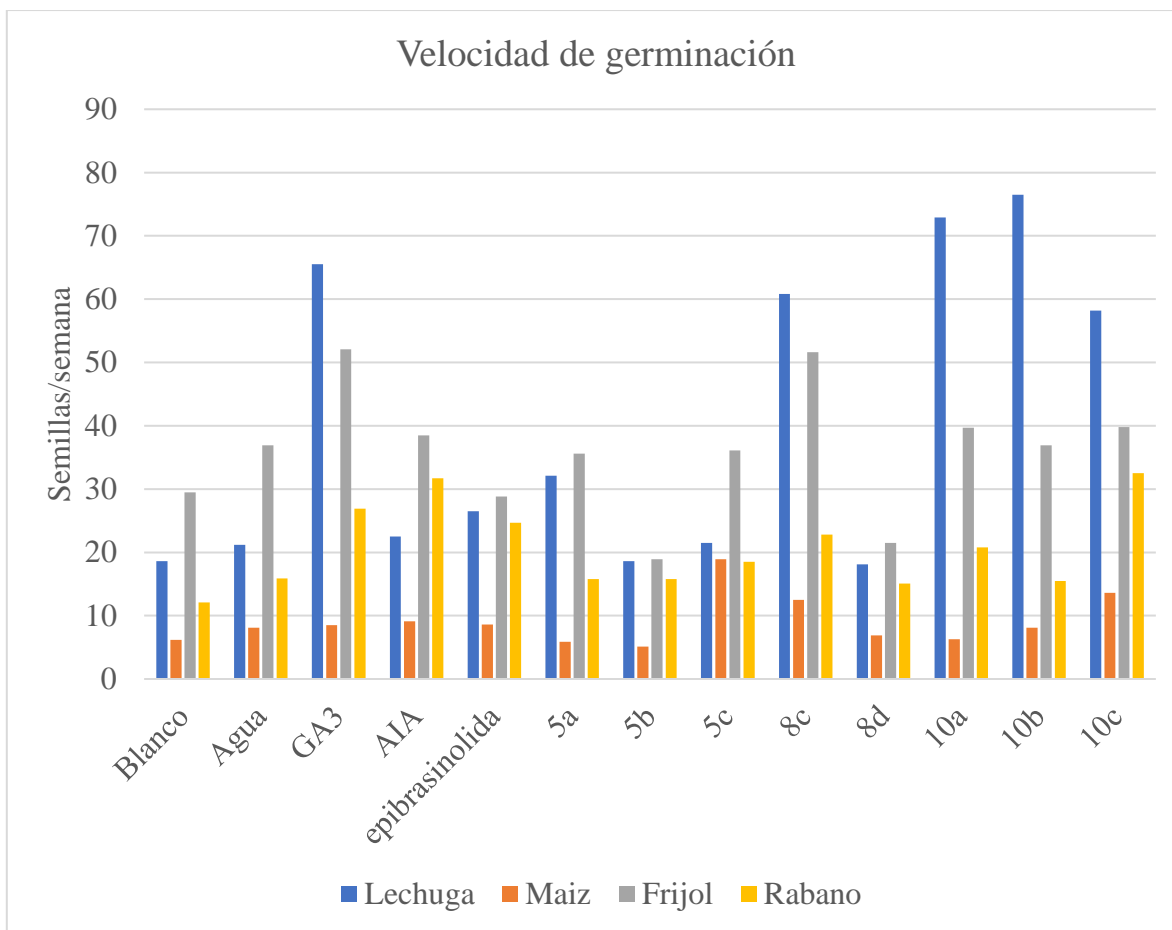


Figura 98. Efecto en la velocidad de germinación de los PCV.

En cambio, en la prueba de germinación, éstas se atribuyen principalmente a la vía de las auxinas y los jasmonatos, aunque estos también están relacionados al proceso de formación radicular. En primera instancia se compararon 4 especies de germinación controlable, lechuga variedad G. Rapid, Maíz híbrido variedad Azul, Frijol variedad Morelos y Rábano; en la Figura 98, se puede observar que los compuestos 22-oxocolestanos obtenidos son los que presentan un efecto de aceleración e incremento de la viabilidad de las semillas. Particularmente el enol **10c** fue el que presentó un incremento significativo a la dosis más baja; **8c** presentó un efecto considerable a 0.1 mg/L. En el caso de la germinación en maíz y rábano el compuesto **5c** fue el que presentó una germinación completa antes que la germinación auspiciada por el AIA. Para lechuga, fueron los derivados **10a** y **10b** los que presentaron mejores resultados. Aunque a nivel filogenético los receptores son muy similares (identidad mayor al 77%) el ambiente celular, los canales de transporte y la permeabilidad de cada una de las semillas incluye el aprovechamiento de la fitohormona, por lo que se puede optimizar el tiempo de inhibición o agregando agitación para garantizar el ingreso de la hormona a la semilla.

3.2 Efecto antibiótico y antifúngico

3.2.1 Antecedentes

El colesterol es el esteroide más importante en el reino animal; en las plantas superiores se encuentran principalmente el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol; en algas pardas se encuentra al fucosterol. En hongos y levaduras se encuentra principalmente al ergosterol. Esteroides como el ergosterol y el poriferasterol juegan un rol muy importante en el desarrollo de bacterias y hongos. Las respectivas rutas biosintéticas son una alternativa para el diseño de inhibidores, utilizando estructuras esteroidales con modificaciones específicas que permiten la interacción con enzimas como la 24-STM (24-metilreductasa) y la 28-STM (28-metilreductasa) utilizando esteroides con bloque biosintético en 24 y 28 átomos de carbono, respectivamente (Figura 99), la estrategia se fundamenta en inhibición competitiva sin metabolismo en el inhibidor, pero también existes inhibidores no esteroidales como la CYP51 (14-metilasa) se usan miméticos estructurales (Figura 99) [11,84].

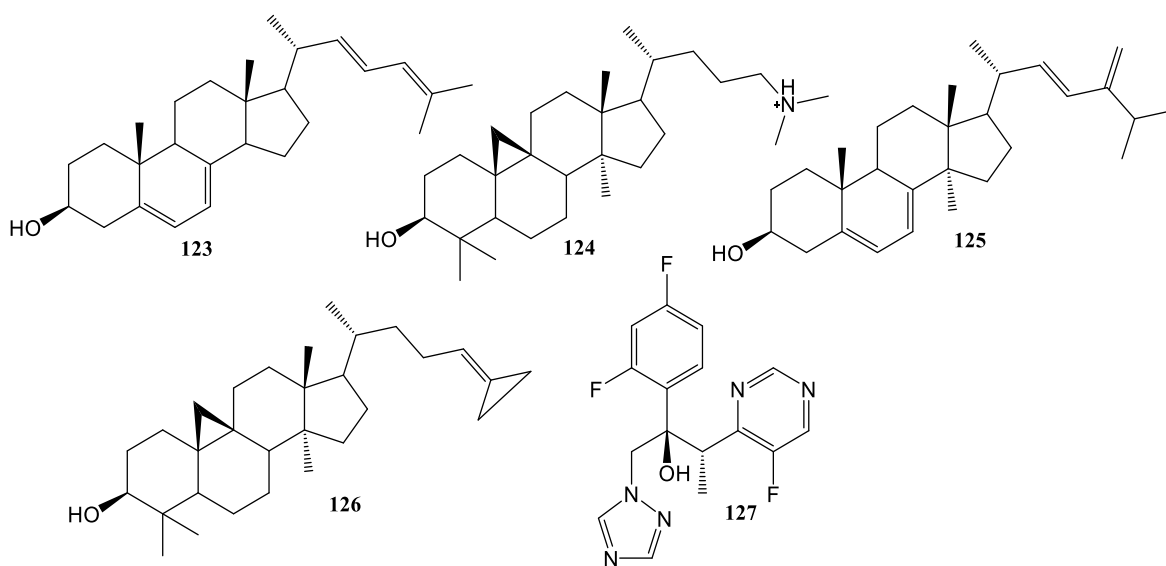


Figura 99. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides en bacterias y hongos.

Cabe destacar que el mecanismo de inhibición de la biosíntesis de esteroides no es el único por el cual los esteroides han presentado potencial antimicrobiano, específicamente como antibióticos se encuentra la familia de esteroides antibióticos catiónicos (CSAs por sus siglas en inglés), los cuales su mecanismo es mediante disrupción de la membrana bacteriana, generando un estado forzado de autofagia dado la exposición del contenido citoplasmático, este proceso se fundamenta en el núcleo esteroidal permite la inserción en la membrana mientras que las cadenas catiónicas, principalmente de aminas primarias o péptidos pequeños (Figura 100) generan un canal falso que desestabilizan la membrana celular, aunque la

desventaja principal de estos es sus bajos rendimientos dado los posibles procesos de polimerización que se presentan en su síntesis [85,86].

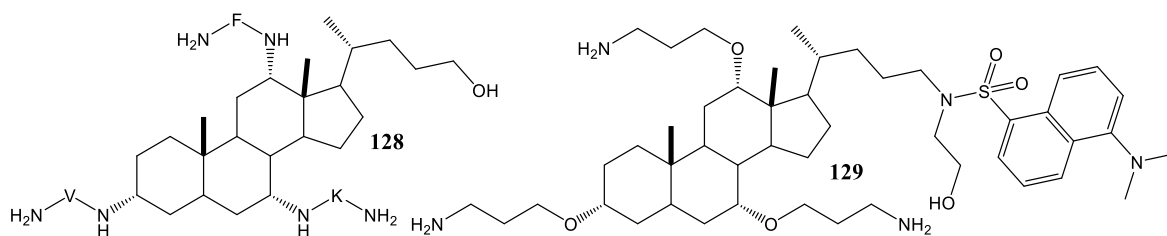


Figura 100. Esteroides antibióticos catiónicos

Contra bacterias otro grupo estudiado son los corticoesteroides, aunque en estos se presume que su función va vía la activación del sistema inmune, aunque esto no esté completamente demostrado, se han realizado pruebas clínicas sinérgicas, principalmente contra neumonía, utilizando prednisolona y metil-prednisolona (Figura 101) en dosis bajas, aunque se combina con otros antibióticos a fin de reducir la resistencia bacteriana, aunque desafortunadamente estos no han sido probados a largo tiempo por lo que se desconoce sus efectos secundarios y mecanismo real de acción [51].

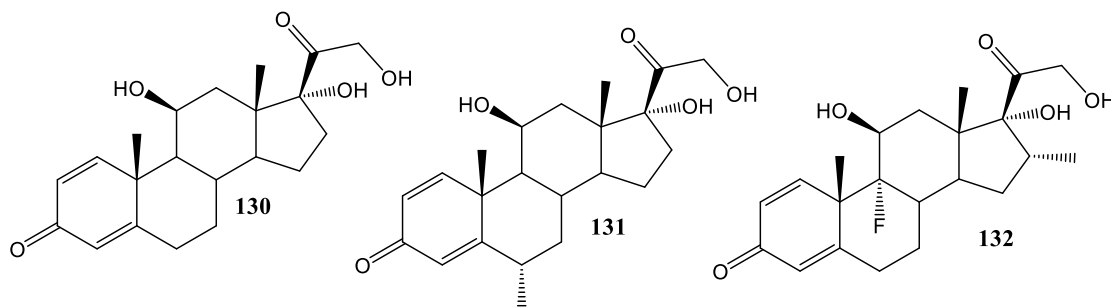


Figura 101. Corticoesteroides utilizados como antibióticos.

En materia fúngica las sales de imidazol esteroidales (Figura 102) destacan con actividad antifúngica principal contra *Candida albicans* mostrando una MIC a dosis del orden de a 0.5 a 0.9 μM , una sexta parte de la MIC reportada para el fuconazol, para estas estructuras se observó que la formación de un dímero utilizando como grupo espaciador el imidazol disminuye la dosis hasta un 75 %, lo que indica que la parte esteroidal es la da el efecto antifúngico y la sal de imidazol favorece la absorción y el transporte en el microorganismo, para lo cual se comprobó utilizando bacterias que tienen esta vía menos sensible, observando en *E. Coli* y *B. cereus* MIC de 10 a 15 veces más grandes que las obtenidas en *C. albicans* [9].

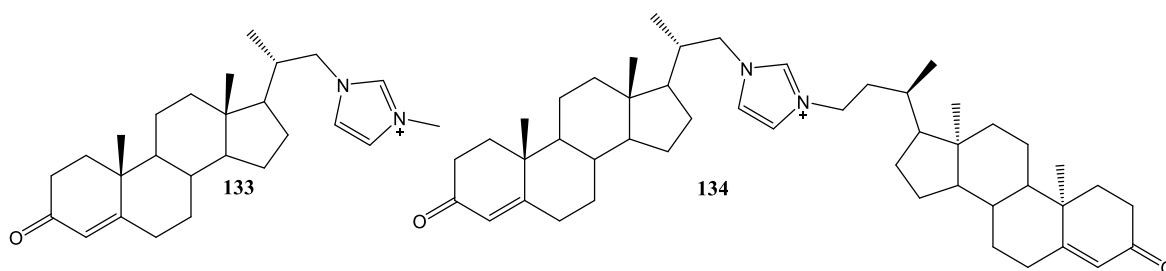


Figura 102. Sales de imidazol esteroidales antifúngicas y antibióticas.

La cadena lateral de los esteroides ha sido ampliamente modificada con el fin de implantar actividad antifúngica, en C-21 (Figura 103) particularmente se han añadido por esterificación o condensación alcohólica grupos aromáticos, dado su similitud con los indoles β -lactámicos, obteniendo compuestos bioactivos contra el crecimiento de *S. scleroriorum*, *M. oryzae* y *V. pirina* (fitopatógeno) obteniendo IC_{50} del orden del Carbendazim ($1.5 \mu M$) en general, aunque se encontraron algunos con una dosis 100 veces menor a estos, principalmente cuando la adición en C-21 fue por grupos piridínicos [87].

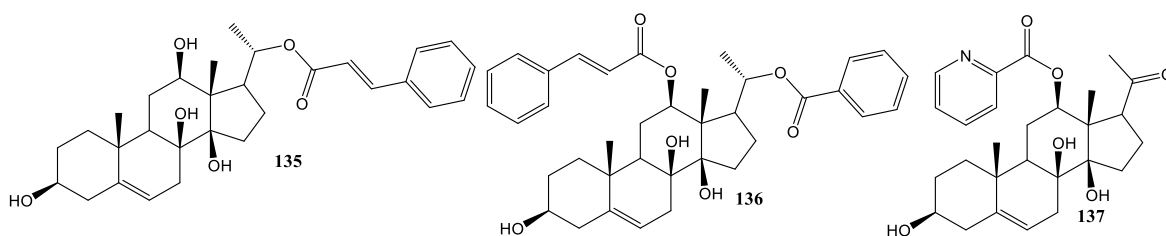


Figura 103. Esteroides modificados en C-21 con efecto contra fitopatógenos.

Aunque la actividad antifúngica de los esteroides no se limita a derivados colestánicos, también los derivados espirostánicos glicosilados en C-3 (Figura 104) han demostrado actividad inhibitoria fúngica en *C. glabrata* y *C. neoformares* con MIC del orden de 10 a 50 $\mu g/mL$, mientras que con la presencia de 3 o más unidades de carbohidratos presentan actividad contra *C. albicans* y *C. tropicalis* en MIC menor a 25 $\mu g/mL$, demostrando la cantidad de glicósidos altera el efecto y la concentración inhibitoria, pero es constante al mantener la función esteroidal [88,89].

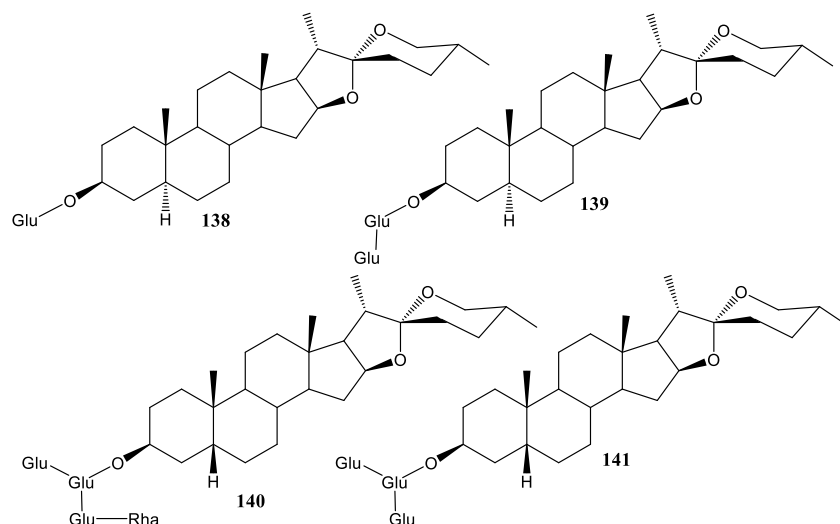


Figura 104. Saponinas con efecto antifúngico

Los métodos de evaluación del efecto antibiótico y antifúngico son muy variados, van desde el estudio con discos impregnados en solución de los compuestos, que permiten observar el efecto inhibitorio a dosis específicas siempre comprando con un control, mediante el halo de inhibición, circunferencia sin proliferación alrededor del disco adsorbido en los compuestos, este método es exploratorio aunque cuantificable, el segundo método en medios líquidos, en el cual se estandariza por espectroscopia UV/Vis la concentración y se suplementa el medio a diversas concentraciones (micro diluciones) para determinar la dosis a la que no sobrevive el microorganismo y por ende, se asigna como concentración mínima inhibitoria (MIC) [90,91].

3.2.2 Metodología

➤ Sensidiscos antimicrobianos

Se preparó una solución de los compuestos evaluados a concentración máxima de 1.0 mg/mL in DMSO para los derivados 22-oxocolestánicos y a 1.0 mg/mL en AcOEt para los derivados espirostánicos y se prepararon disoluciones consecutivas utilizando agua tridestilada estéril y se sumergieron sensidiscos vacíos a adsorción durante 30 segundos, como control se utilizó, flucanazol y ampicilina, en sensidiscos estandarizados microbiológicamente.

➤ Actividad antimicrobiana

Para el cultivo de los hongos *C. albicans* y *A. Niger* se realizó en agar papa dextrosa en placa solida de 10 cm, para *E. Coli* y *S. aureos* fueron cultivados en medio de cultivo de soja tríplico y en medio de cultivo de lactosa respectivamente. Para todas las pruebas se colocaron en

octa-sistema con siembra de punto en el centro de la placa y se dejó en proliferación a 37 °C hasta confluencia de la placa, para determinar la actividad comparado con cada control se utilizó la formula siguiente:

$$\%_{AA} = \frac{D}{Dc} * 100\%$$

Donde:

$\%_{AA}$: Porcentaje de actividad respecto con el antimicrobiano de referencia

D: Diámetro del halo de inhibición a una dosis específica

Dc: Diámetro del halo de inhibición del antimicrobiano de referencia

➤ Análisis estadístico

Para comparar el efecto de los compuestos se utilizó una prueba de una vía ANOVA post LSD-Fisher para una $p < 0.05$ de comparación entre compuestos y contra los controles, en el software Minitab 18.0.

3.2.3 Efecto ATB y antifúngico

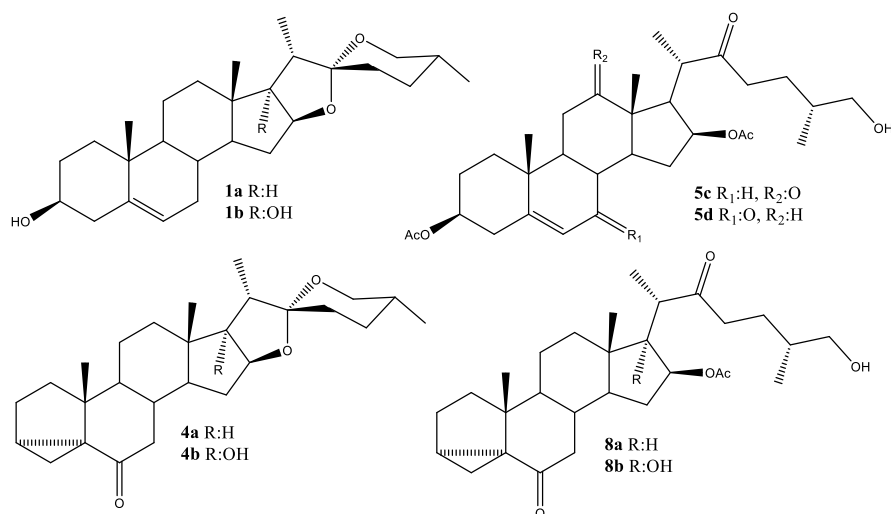


Figura 105. Estructuras seleccionadas para evaluación antifúngica y antibacteriana.

La actividad antifúngica ha sido ampliamente estudiada para esteroides, pero la antimicrobiana es menos la información disponible como se observó previamente, pero los

estudios *in silico* se encontró potencial contra estos dos tipos de agentes infecciosos en particular 13 derivados de los cuales 8 fueron evaluados en dos especies de bacterias (*E. Coli* -gram negativo- y *S. áureos* -gram positivo-) y dos de hongos (*C. albicans* y *A. Niger*) utilizando comparativo de halo de inhibición utilizando como antibiótico a la ampicilina y como antifúngico fuconazol, ya que estos tienen demostrado actividad antimicrobiana en dichas especies del orden de 0.25 a 2 µg/mL, por lo que se decidió emplear como referencia la dosis disponible en sensidiscos comerciales de ampicilina 10.0 µg/mL y fuconazol 5.0 µg/mL, mientras que los esteroides a probar se prepararon soluciones de 100 µg/mL a 0.1 µg/mL en diluciones de factor de 10 con agua destilada, así como un blanco de disolvente, en el cual dada la disolución de se realiza el efecto inhibición no es significativo. En la Tabla 22 podemos observar el efecto en el halo de inhibición de los diferentes compuestos en las dos bacterias elegidas, en los estudios *in silico* los i-esteroides surgieron como potenciales compuestos contra bacterias en las vías de KPC2 y CATIII, aunque para esta última no es resistente las dos especies evaluadas si está presente, denotando como se esperaba para los derivados **8a** y **8b** en *S. aureus* un efecto sobre gran positivo denotando potencial a nivel de 1.0 µg/mL a nivel de la ampicilina, destacando que esta tiene como reporte MIC de 0.25 a 1.0 µg/mL, es decir que estos compuestos muestran un potencial mayor al mismo nivel de dosis, por lo que se podrían esperar MIC del mismo orden, mientras que para *E. Coli*, son los derivados espirostánicos los que presenta actividad, y en particular los derivados i-esteroidales espirostánicos son que tienen un potencial del orden o mayor al control positivo (MIC 0.8-2.0 µg/mL), aunque particularmente el derivado de diosgenina presenta un efecto de inhibición a 0.1 µg/mL de alrededor del 50% comparado con el control positivo, es decir que su MIC se deberá encontrar en dosis menores a esta por lo que será menor al fármaco de referencia, pero esto indica que existe una vía alternativa de inhibición dado que estos compuestos no serían candidatos según las vías elegidas, aunque también es posible una inhibición alostérica no estudiada como mecanismo de acción, deja campo para investigar la correlación estructura actividad y mecanismo específico.

Tabla 22. Efecto de relación inhibitoria para bacterias de los compuestos evaluados comparado con los fármacos de referencia.

Bacteria	<i>E. Coli</i>				<i>S. aureus</i>				
	Dosis (µg/mL)	100	10	1.0	0.1	100	10	1.0	0.1
1a		102.5%	82.9%*	0	0	0	0	0	0
1b		62.3 %*	0	0	0	15.8%*	0	0	0
4a		232.1%*	124.8%	88.1%*	50.4%*	0	0	0	0
4b		175.1%*	111.2%	78.5%	11.8%*	15.3%*	6.9%*	0	0
5c		0	0	0	0	0	0	0	0
5d		0	0	0	0	0	0	0	0
8a		0	0	0	0	180.9%*	132.5%*	99.1%	74.5%*
8b		0	0	0	0	191.4%*	155.1%*	121.3%	69.5%*

*Diferencia estadística p<0.05 vs ampicilina 10.0 µg/mL, Anova pos LSD-Fisher

Por otro lado, en el estudio del efecto antifungico, en las especies estudiadas (se reporta 2 y 6 µg/mL como MIC para *C. albicans* y *A. niger*), se puede denotar rápidamente que las materias primas evaluadas no tienen efecto ni a la dosis más alta, si no son los compuestos i-esteroidales los que tienen mayor efecto, en particular 4b y 8b presentan efectos en ambas especies del mismo orden, lo que indica que los compuestos deben estar funcionando por una vía en común, siendo posible la inhibición de la CYP51 dado que se comparte en ambas especies, mientras que 5d solo presenta efecto en *C. albicans*, siendo idóneo el mecanismo vía inhibición de DNA topoisomerasa IV exclusiva de esta especie, mientras que 8a presenta efecto únicamente en *A. niger*, siendo objetivo de explicación la búsqueda de un mecanismo exclusivo para esta especie de hongo, por otro lado para el caso de 8b particularmente se observa efecto en ambas especies pero con mayor nivel en *C. albicans*, lo que indicaría acción por dos mecanismos, siendo posible los dos estudiados (inhibición de CYP51 y DNA topoisomerasa IV), particularmente mostrando que la función i-esteroidal, con la reducción espacial en el anillo A permite una interacción directa con enzimas encargadas del desarrollo de estas especies de hongos.

Tabla 23. Efecto antifúngico de las moléculas de estudio comparadas con el fluconazol.

Bacteria	<i>A. niger</i>				<i>C. albicans</i>				
	Dosis (µg/mL)	100	10	1.0	0.1	100	10	1.0	0.1
1a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1b	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4a	178.1%*	97.4%	19.3%*	0	105.9%	67.5%*	32.4%*	0	0
4b	185.0%*	125.1%	89.9%	58.5%*	218.5%*	185.3%*	115.1%	95.3%	0
5c	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5d	0	0	0	0	102.8%	71.3%*	24.5%*	0	0
8a	121.7%*	103.5%	61.3%*	0	0	0	0	0	0
8b	113.5%	98.5%	71.4%*	11.3%*	199.5%*	145.2%*	105.5%	79.5%*	0

*Diferencia estadística p<0.05 vs fluconazol 5.0 µg/mL, Anova pos LSD-Fisher

3.3 Efecto anticancerígeno

3.3.1 Antecedentes

En la búsqueda de nuevas alternativas al tratamiento de los diversos tipos de cáncer, los derivados esteroidales destacan contra cánceres de hormona dependientes, el OSW1 es uno de los primeros en destacar en este tema, por lo que se han sintetizado nuevos análogos a partir de laxogenina (Figura 106), insertando una molécula de glucosa en la posición 3, evaluándolo en líneas celulares de cáncer cervicouterino, CaSki, HeLa y ViBo, obteniendo buenos resultados con un efecto 50% mayor al control, permitiendo generar nuevos

compuestos con potencial actividad anticancerígena y, en particular se han sintetizado muchos derivados glicosilados buscando dicha actividad [92–94].

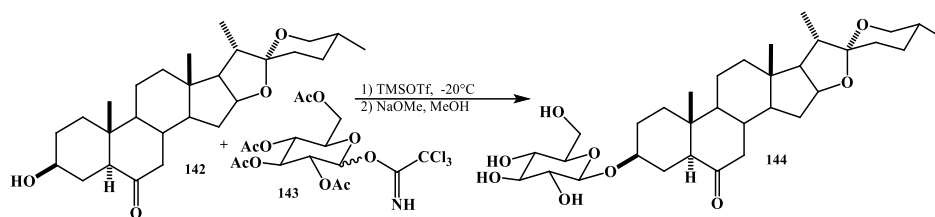


Figura 106. Síntesis de glucolaxogenina con actividad anticancerígena.

Previamente se estimaba que se necesitaba tanto la parte glucosilada como la esteroidea, pero también se ha demostrado que existe actividad importante únicamente por la parte esteroidea, como en el caso de derivados de estradiol (Figura 107), los cuales además presentaron actividades inclusive mejores a la de saponinas, lo que ha llevado al estudio de correlación estructura actividad (QSAR y SAR), dando inicio a la combinación de dos áreas con el fin de diseñar compuestos con presumible actividad biológica destacada y modelarlos, antes de llevar a cabo su síntesis, así como la optimización de las estructuras de manera dirigida, esto combinado con estudios de acoplamiento molecular (docking molecular) lo que ha permitido la selección adecuada de compuestos para evaluación biológica [93,95,96].

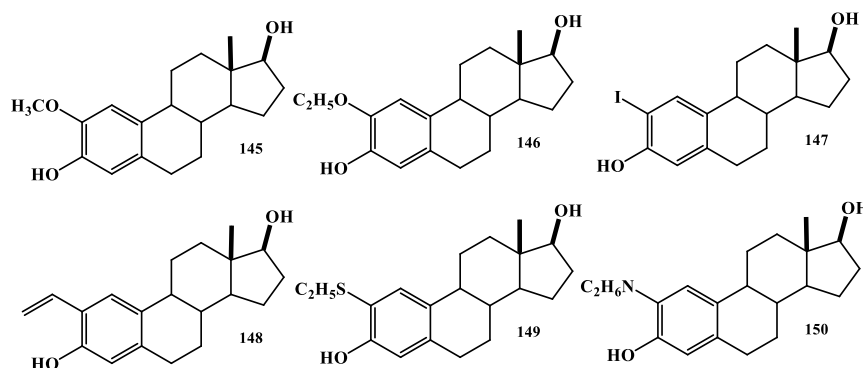


Figura 107. Derivados de estradiol con actividad anticancerígena en cáncer de mama.

Otro campo altamente estudiado es el uso de heteroátomos como los derivados azufrados de estrógenos (Figura 108) los cuales fueron evaluados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 obteniendo resultados prometedores, generando compuestos que causan más del 50 % de inhibición del crecimiento celular a concentraciones menores de 10 μ M, ensayos que continuaron con estos compuestos en diversas líneas celulares de cáncer, observando que en cáncer de ovario, próstata y melanoma, mostraron resultados similares, siendo todos estos

cáncer del tipo hormona-dependiente; sin embargo no descartaron que fueran activos en otros tipos de cáncer, dado que mostraban buenos resultados, aunque no de la misma magnitud y también el uso de nitrógeno para generar azaesteroides los cuales incrementan la actividad biológica, no solo en cáncer hormona-dependiente sino también en líneas triple negativas [96–99].

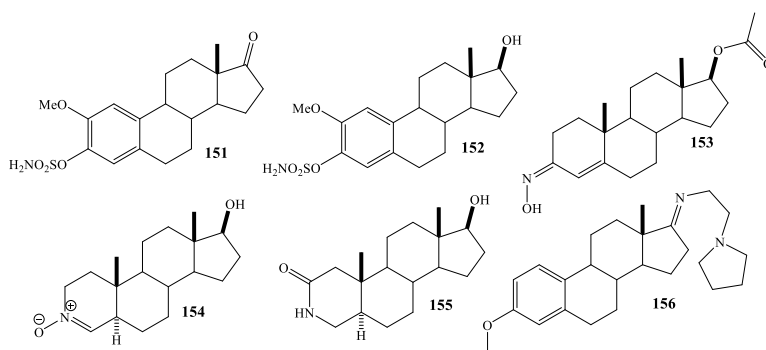
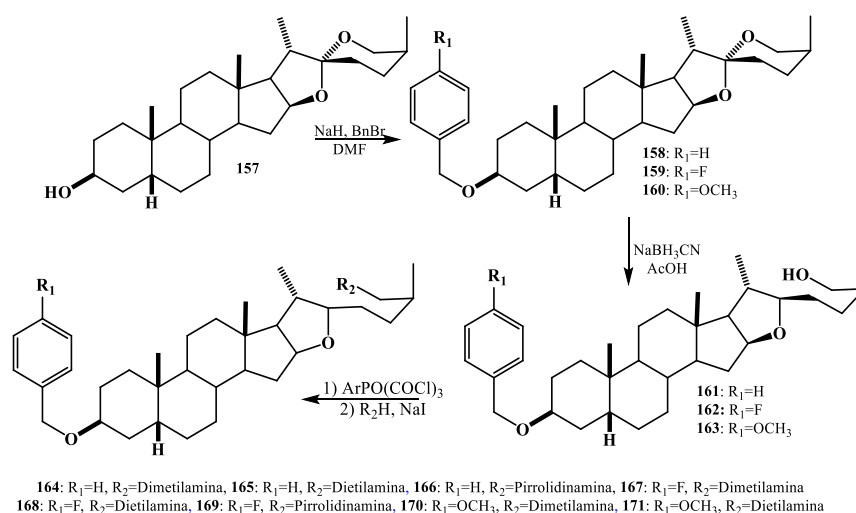


Figura 108. Derivados esteroidales azufrados y nitrogenados con actividad anticancerígena

No obstante, al estudiar este tipo de estructuras se observa que tienen en común ser de base androstánica, pero se debe destacar que los compuestos colestánicos también presentan importante actividad biológica. Como se mencionó anteriormente, los esteroides espiroestánicos son excelente materia prima para la síntesis de aminoesteroides, a partir de sarsapogenina obtuvieron compuestos 3-OBz-26-amino-esteroidales, como se observa en Figura 109, compuestos que al evaluarlos en diversas líneas celulares de cáncer, entre la que destaca la MCF-7 mostrando resultados sorprendentes no solo en bajos valores de IC_{50} (~ 5 μM) sino que también se comprobó que inducen a muerte por apoptosis, evitando así el daño a células no cancerosas [100].



164: R₁=H, R₂=Dimetilamina, 165: R₁=H, R₂=Dietilamina, 166: R₁=H, R₂=Pirrolidinamina, 167: R₁=F, R₂=Dimetilamina
168: R₁=F, R₂=Dietilamina, 169: R₁=F, R₂=Pirrolidinamina, 170: R₁=OCH₃, R₂=Dimetilamina, 171: R₁=OCH₃, R₂=Dietilamina

Figura 109. Síntesis de compuestos furostánicos anticancerígenos.

Los esteroides tienen muchos frentes de acción contra el cáncer, a nivel clínico ya se utilizan algunos de estos como el fulvestran, el formestano y el trilostano (Figura 110), los cuales funcionan al nivel de bloque de receptores de estrógenos, inhibiendo la esteroidogénesis para la producción de hormonas y como modulador alostérico hormonal, para cáncer no hormona dependiente, no hay esteroides en fase clínica, pero si preclínica, funcionando vía inhibición de la polimerización de actina, fosforilación de VaV2 y activación de Cdc42, encargadas de la proliferación de las líneas celulares [101–105].

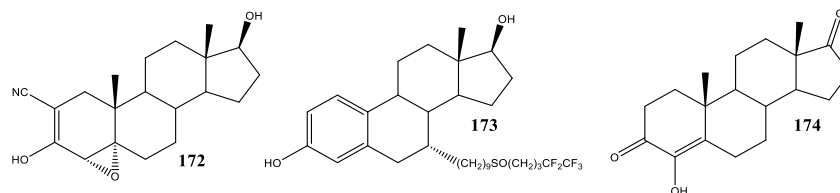


Figura 110. Fármacos anti-estrogénicos contra el cáncer.

3.3.2 Metodología

➤ Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa y CaSki obtenidas del laboratorio CIBIOR IMSS-Metepec se cultivaron en medio RPMI-1640, que contenía suero fetal bovino al 5% (NCS, GIBCO BRL. La línea celular TN de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se obtuvo de ATCCR HTB-26 y se cultivó de forma rutinaria en DMEM en rojo fenol suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) en la presencia de penicilina 100 U / mL y estreptomina 100 ug / mL (P4333, MERCK). Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂, línea celular MCF-7 de cáncer de mama luminal humano, obtenida de ATCCR HTB-22, se incubó en medio de cultivo MEM en rojo fenol con 1% Insulina transferrina-selenio (ITS) (I3146, MERCK). Todos los ensayos basados en células se realizaron utilizando células en la fase de crecimiento exponencial.

➤ Determinación de efecto anti-proliferativo.

Los ensayos se realizaron sembrando 7.5×10^3 células / pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a un volumen de 100 μ L del medio adecuado para cada línea por pocillo. Se permitió que las células crecieran durante 24 h en el medio de cultivo antes de la exposición a los compuestos. Se utilizó cisplatino como control positivo, para los estudios contra las líneas de cáncer cervicouterino. Además, se añadió 1% de vehículo (DMSO) a las células de control. La actividad antiproliferativa (IC₅₀) se determinó después de 24 h mediante tinción con violeta cristal. Los recuentos de células se realizaron midiendo la absorbancia a 590 nm en un lector de placas ELISA.

➤ Análisis estadístico

Para comparar el efecto de los compuestos se utilizó una prueba de una vía ANOVA post LSD-Fisher para una $p < 0.05$ de comparación entre compuestos y contra los controles, en el software Minitab 18.0.

3.3.3 Efecto antiproliferativo.

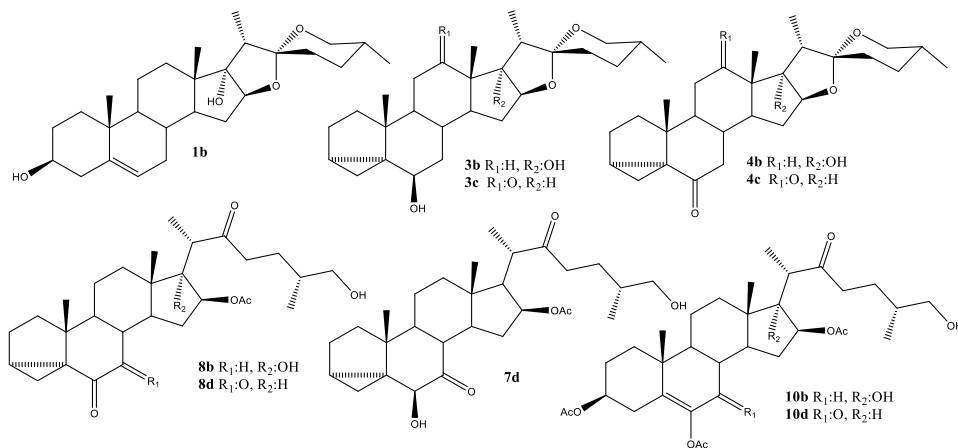


Figura 111. Estructuras evaluadas como anticancerígenos.

Los esteroides han demostrado gran potencial anticancerígeno y los i-esteroides no son la excepción a dicha actividad, en los estudios *in silico* fue la actividad con mayor potencial y mayor representatividad, pero la evaluación y comprobación de estos plausibles mecanismos es complejo, siendo la primera etapa de evaluación del determinar la concentración inhibitoria media (IC_{50}), de los compuestos seleccionados mediante estudios *in silico*, se seleccionaron 10 para su evaluación (Figura 111), 7 de los diseñados y 3 de los obtenidos como subproductos. En la Tabla 24 podemos observar los valores de IC_{50} obtenidos para las 4 líneas celulares de estudio, denotando una actividad variada, para el caso particular de la línea HeLa (VPH positivo) el mejor compuesto es el **10b** seguido del **4b**, indicativo que el hidroxilo en C-17 incrementa la actividad de esta línea celular así como la función i-esteroidal ya que el resto de los derivados que mostro actividad poseen esta función estructural, denotando además que la presencia del 22-oxocolestano incrementa la actividad debido a la disminución del valor de la concentración, como se observó en los estudios de acoplamiento molecular ya que la cadena incrementa la formación de puentes de hidrógeno así como que su flexibilidad le permite colocarse en sitios específicos de las proteínas asociadas a la proliferación celular y no de inducción de muerte celular. Además, al estar presente el virus del papiloma humana en ésta, permite analizar si la inhibición viral podría resultar en la actividad biológica, ya que al contrastar con el resultado obtenido en la línea CaSki, que es VPH negativo, se observan dosis más altas que las obtenidas en la línea Hela, excepto para **10b** y **10d**, lo que indica que los grupos acetato de enol no funcionan por esta vía, sino por la vía de PDGFR que es común en ambas líneas celulares. Para **10d**

particularmente se observa un efecto a dosis muy baja comparado con el cisplatino en HeLa y del mismo valor para CaSki lo que demuestra el potencial biológico de los subproductos obtenidos en una reacción, además de funcionar como estructuras para explicar el mecanismo de la reacción.

Tabla 24. IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos evaluados en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino.

Compuesto	HeLa	CaSki	MCF-7	MDA-MB-231
1b	NI	NI	39.5	NI
3b	18.5	97.5	NI	3.11
3c	59.5	15.8	NI	8.9
4b	2.4	3.2	89.5	9.5
4c	12.5	0.9	NI	7.6
8b	9.8	14.8	32.5	NI
8d	NI	NI	NI	NI
7d	8.5	3.5	2.1	NI
10b	1.1	1.1	0.07	NI
10d	0.05	1.2	0.08	NI
Cisplatino	2.3	1.2	3.7	6.5

NI: no se observó efecto inhibitorio a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Respecto a **10d** podemos observar que en la línea de cáncer de mama luminal A también muestra una dosis inhibitoria muy baja, permitiendo teorizar que dicha inhibición ocurre por vía hormonal ya que es el común denominador entre estas tres líneas celulares, como inhibidores de la esteroidogénesis, observado en los resultados obtenidos *in silico*; efecto similar para el compuesto **10b**, que inclusive comparado con cisplatino muestra una dosis menor, mientras que para la línea MDA-MB-231, línea que no depende de hormonas estrogénicas y progestágenas, en contraste los derivados i-esteroidales espiroestánicos que presentaron mayor energía de acoplamiento vía no hormonal presentan menor dosis en dicha línea, demostrando el potencial de estos derivados y como la cadena lateral dirige hacia un efecto dependiente de hormonas y no dependiente.

CONCLUSIONES

1. El núcleo base de los esteroides mediante análisis de similitud estructural devuelve potencial biológico contra enfermedades relacionadas a la esteroidogénesis del colesterol, como el cáncer de mama, próstata y cervicouterino, en particular los derivados i-esteroidales presentan potencial actividad selectiva hacia el sistema endocrino así como baja o nula toxicidad, mientras que la función $3\beta 5\Delta$ resulta en un conjunto de dianas más diverso y diferentes tipos de toxicidad destacando hemo-toxicidad.
2. Los compuestos i-esteroideos espirostánicos (**3a-d** y **4a-d**) presenta mayor energía de acoplamiento en las proteínas asociadas a cáncer hormona-dependiente, mientras que los derivados 22-Oxocolestánicos presenta potencial contra cáncer no hormona-dependiente; en contraste para enfermedades asociadas al sistema nervioso central los compuestos **2a-c** y **4a-c** presentan una mayor energía vía inhibición de la quinona reductasa y la acetilcolinesterasa ambas asociadas al progreso del Alzheimer y Parkinson.
3. Los esteroides diseñados presentaron potencial antiinfecciosos en dos clases de organismos, en los fúngicos resultan con mayor energía los derivados i-esteroidales (**4a**, **4b**, **8b**, **8c** y **8d**) mientras que contra bacterias resultan los derivados 22-Oxocolestánicos (**5a**, **5b**, **5d**, **8a**, **8c**) con mayor energía de acoplamiento que los inhibidores de referencia, además de presentar interacciones específicas, como el bloqueo del grupo hemo para la inhibición de la CYP51 encargada de la biosíntesis de los esteroides responsables de la membrana celular.
4. Los esteroides como promotores de crecimiento vegetal fue la actividad con mayor potencial encontrada, en particular hacia la activación del gen BRI1 por parte de los derivados 22-Oxocolestánicos particularmente los derivados **5a-d** y **8a-c** demuestran ser competitivos a nivel de la brasinólida y la homobrasinólida, además de que los subproductos obtenidos incrementan dicho potencial en especial los derivados enolacetilados **10a**, **10c** y **10d**.
5. Mediante una reacción en medio básico se obtuvieron los derivados i-esteroidales espirostánicos mediante el desplazamiento del grupo tosilo en rendimientos globales mayores al 70% mientras que al obtener los derivados 22-Oxocolestánicos i-esteroidales por apertura del espiroacetal directa el rendimiento decae a menos del 10%, por lo que mediante la apertura inicial y formación del i-esteroide posterior resulta en un incremento del rendimiento hasta en un 25%.

6. La reacción de apertura dio lugar a derivados enolacetilados en C-6 (**10a-d**) debido a la apertura espontánea del i-esteroide en condiciones de acetólisis del espiroacetal, generando un enol en C-6 que se acetiló por presencia de anhídrido acético en el medio con un rendimiento superior al 40% en todos los casos, compuestos que presentan un gran potencial como promotores de crecimiento vegetal y anticancerígenos.
7. Se propone una reacción de tipo concertada en la formación del i-esteroide en el anillo A, debido a la posición *sin* que existe entre los orbitales *p* del doble enlace y el orbital de antienlace del tosilato en C-3, analizado mediante cálculos teóricos de estabilidad de procesos, observando que la formación del carbocatión no está termodinámicamente favorecido.
8. Los compuestos **8a-c** presentaron efecto promotor de crecimiento vegetal en particular en incremento de la elongación celular y proliferación demostrado mediante la prueba del crecimiento del segundo internodo de frijol y de inclinación de lámina de arroz con valores superiores a las fitohormonas de referencia, mientras que para germinación los derivados **7a** y **7b** presentaron un incremento significativo mayor a un 30% a las hormonas de referencias lo cual se correlaciona como los compuestos con mayor energía en la proteína asociada al gen BR11 y el de jasmonatos.
9. El efecto anticancerígeno de los i-esteroides (**3a-c** y **4a-c**) es dirigido hacia cáncer de tipo hormona dependiente mientras que al presentar función 22-Oxocolestanica (**8a-c**) hacia los hormona no dependientes esto demuestra la correlación con la inhibición de las CYP17A y CYP19A1 para los cáncer hormona dependiente y vía PDGFR para los no dependientes, resultando en IC₅₀ menores al cis-platino.
10. La inhibición de la CYP51 por los derivados i-esteroides en bacterias fueron los compuestos **1a**, **1b**, **4a**, **4b**, **8c** y **8d** mientras que en el caso contra hongos son **4a**, **4b**, **8a** y **8b** son los presenta una actividad mejor que los fármacos de referencia, aunque a nivel *in silico* también destacaban los derivados **5c** y **5d** estos posiblemente no llegan al sitio activo para lograr el efecto, demostrando que la contracción en el anillo A por la formación del i-esteroide permite la interacción y por ende el efecto antiinfeccioso.

ANEXOS

El presente trabajo y el material bioinformático diseñado en el mismo condujo en las siguientes publicaciones:

1.

Biointerface Research in Applied Chemistry

Platinum Open Access Journal (ISSN: 2069-5837)

Article

Volume 10, Issue ..., 2020, ...- ...

<https://doi.org/10.33263/BRIAC00.000000>

In Silico Study of Coumarins Derivatives With Potential Use in Systemic Diseases

Alan Carrasco-Carballo ^{1,*}, Daniel F. Mendoza-Lara ¹, Jesus A. Rojas-Morales ¹, Victorino Alatrste ², Penelope Merino-Montiel ³, Felix Luna ², Jesus Sandoval-Ramirez ³

¹ Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, México; alan.carrascoc@correo.buap.mx

² Laboratorio de Neuroendocrinología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, México

³ Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, México

* Correspondence: alan.carrascoc@correo.buap.mx (ACC); jesus.sandoval@correo.buap.mx (JSR)

Scopus Author ID 57192107532 (A.C.C.)

6603613113 (J.S.R.)

2.

Journal of
Molecular
Docking

Journal of Molecular Docking

Vol 1 Issue 2 December 2021

Pages 59 - 67

<http://journal.umpalangkaraya.ac.id/index.php/jmd/article/view/2904>

DOI: <https://doi.org/10.33084/jmd.v1i2.2904>

e-ISSN: 2798-138X

Original Research Article

Molecular Docking Studies of Spirostans as MAPK14 (P38 α) Inhibitors and Their Potential Use against Cancer

Guiee Niza Lopez-Castillo ¹

Victorino Alatrste ²

Jesus Sandoval-Ramirez ³

Felix Luna ²

Alan Carrasco-Carballo ^{1,*}

¹Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

²Laboratorio de Neuroendocrinología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

³Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

*email: alan.carrascoc@correo.buap.mx

Keywords:

MAPK14 inhibition

Molecular docking

Spirostans

Abstract

Spirostans (SPs) are chemical products widely distributed in the plant kingdom; currently, they are studied by their medical applications. Cancer has a high incidence in humans; it reaches second place worldwide deaths. In molecular biology, it has been accepted that Mitogen-Activated Protein p38 α Kinase (MAPK14 (p38 α)) is implicated in the regulation of cancer. This study aimed to identify SPs as potential MAPK14 (p38 α) inhibitors. From a set of 133 modified SPs, SwissTargetPrediction platform, and molecular docking, it was obtained that 129 chemical structures had molecular interaction with the MAPK14 (p38 α). From those molecules, 123 were bound to a specific inhibition site of MAPK14 (p38 α), and 6 of the structures resulted in inhibitors similarly to minocycline and dasatinib. One SP had binding couple energy (BCE, kcal/mol) as that of fostamatinib. In addition, 115 modified SPs had better BCE than the minocycline but not as that using fostamatinib. The key amino acids (aa) for the protein kinase MAPK14 (p38 α) inhibition were Arg 70, Asp 168, Lys 53, His 148, and Ile 145, at a different interaction level. The BCE was enhanced when the H atom was substituted in C-2, C-11, and C-17 SPs positions. Similarly, the α OH group at C-5 and C-6 upgraded BCE. Stereochemistry and substitution at C-3, C-12, and C-25 did not present significant differences (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). From all this ensemble of results, it is foreseeable that the SPs can be an option for MAPK14 (p38 α) inhibition, a key modulator in cancer processes.

Received: November 14th, 2021

Accepted: December 20th, 2021

Published: December 30th, 2021

3.



Advances in Enzyme Research, 2021, 9, 55-71

<https://www.scirp.org/journal/aer>

ISSN Online: 2328-4854

ISSN Print: 2328-4846

Steroidal Plant Growth Promoters vs. Phytopathogens, via Enzymatic Regulation; An *in Silico* Approach

Alan Carrasco-Carballo^{1*}, Emiliano Marín-Merino¹, Penélope Merino-Montiel², Blanca Colin-Lozano², Sandra Luz Cabrera Hilerio³, Jazmin Ciciolil Hilario-Martínez⁴, Jesús Sandoval-Ramírez^{1,2*}

¹Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

²Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

³Laboratorio de Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

⁴Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, CDMX, México

Email: *alan.carrascoc@correo.buap.mx, jesus.sandoval@correo.buap.mx

4.





Steroids

Volume 166, February 2021, 108787



Synthesis and biological *in vitro* evaluation of the effect of hydroxyimino steroidal derivatives on breast cancer cells

Alan Carrasco-Carballo ^a, María Guadalupe Hernández-Linares ^{b, c}, Maura Cárdenas-García ^d, Jesús Sandoval-Ramírez ^a  

BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. F. Fieser; M. Fieser., *Steroids*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1959.
- [2] Ch. W. Shoppee, Ch. W. Shoppee, *Chemistry of the Steroids*, Butterworths, 2da ed., London, 1964..
- [3] W. Kyne, *The Chemistry of the Steroids*, Methuen & Co; New Ed edición, London, 1965.
- [4] S. Coffey, *Chemistry of Carbon Compounds Vol. II, part D*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, 1970.
- [5] S. Coffey, *Chemistry of Carbon Compounds Vol. II, part E*, 2nd ed., Amsterdam, 1971.
- [6] G.P. Moss, IUPAC. Nomenclature of Steroids, *Pure Appl. Chem.* 61, 10 (1989) 1783–1822.
- [7] V.K. Bajpai, S.C. Kang, In Vitro and In Vivo Inhibition of Plant Pathogenic Fungi by Essential Oil and Extracts of *Magnolia liliflora* Desr, *J. Agr. Sci. Tech.* 14 (2012), 845.
- [8] Z. Huskova, J. Steigerova, J. Oklestkova, L. Rarova, Z. Kolar, M. Strnad, Molecular mechanisms of plant steroids and study of their interaction with nuclear receptors in prostate cancer cells, *Food Chem. Toxicol.* 137 (2020) 111164. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111164>.
- [9] A. Hryniewicka, M. Malinowska, T. Hauschild, K. Pieczul, J.W. Morzycki, Synthesis and antimicrobial properties of steroid-based imidazolium salts, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 189 (2019) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.02.006>.
- [10] K. K. Nepal, J. C. Yoo, J. K. Sohng, A Biosynthetic Approach for the production of new aminoglycoside derivative, *J. Biosci. Bioeng.*, 110 (1) 2010, 109-112. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>.
- [11] W. Zhou, E. Ramos, X. Zhu, P.M. Fisher, M.E. Kidane, B.H. Vanderloop, C.D. Thomas, J. Yan, U. Singha, M. Chaudhuri, M.T. Nagel, W. David Nes, Steroidal antibiotics are antimetabolites of *Acanthamoeba* steroidogenesis with phylogenetic implications, *J. Lipid Res.* 60 (2019) 981–994. <https://doi.org/10.1194/jlr.M091587>.
- [12] M.B. Hafeez, N. Zahra, K. Zahra, A. Raza, A. Khan, K. Shaukat, S. Khan, Brassinosteroids: Molecular and physiological responses in plant growth and abiotic stresses, *Plant Stress.* 2 (2021) 100029. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100029>.
- [13] J.C. Hilario-Martínez, A. Huerta, J.C. Amaro-López, V. Alatríste, M.G. De los Santos, I. Martínez, S. Bernès, J. Sandoval-Ramírez, G. Merino, F. Luna, M.A. Fernández-Herrera, Stereoselective synthesis of (26R)-26-hydroxydiosgenin and its effect on the regulation of rat ovarian function, *Bioorg. Chem.* 115 (2021) 105189.
- [14] H.T. Chang, Y.H. Cheng, C.L. Wu, S.T. Chang, T.T. Chang, Y.C. Su, Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi, *Bioresour. Technol.* 99 (2008)

6266–6270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.005>.

- [15] M. Fieser, W.E. Rosen, L.F. Fieser, An α -Steroid Hydrocarbon from Ergosterol, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 5397–5403. <https://doi.org/10.1021/ja01141a052>.
- [16] T.A. Spencer, D. Li, J.S. Russel, N.C.O. Tomkinson, T.M. Willson, Further studies on the synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. A new, efficient preparation of desmosterol, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 1919–1923. <https://doi.org/10.1021/jo991370c>.
- [17] Q. Sun, S. Cai, B.R. Peterson, Practical Synthesis of 3β -Amino-5-cholestene and Related 3β -Halides Involving α -Steroid and Retro- α -Steroid Rearrangements, *Organic Lett.* 11(3) (2009) 567-570.
- [18] M.A. Williams, T. Daviter, Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology. 1008), 2da edicion, Humana Press, Springer protocols, 2013.
- [19] R. Mannhold, H. Jubinyi, G. Folkers, Protein–Ligand Interactions, From Molecular Recognition to Drug Desing, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim All, 2003.
- [20] R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz, Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>.
- [21] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, D. Cheng, S. Shrivastava, D. Tzur, B. Gautam, M. Hassanali, DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) D901-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm958>.
- [22] F. Saldívar-González, F.D. Prieto-Martínez, J.L. Medina-Franco, Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional, *Educ. Quim.* 28 (2016) 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>.
- [23] J. Rubio-Martínez, A. Jiménez-Alesanco, L. Ceballos-Laita, D. Ortega-Alarcón, S. Vega, C. Calvo, C. Benítez, O. Abian, A. Velázquez-Campoy, T. M. Thomson, J. Manuel Granadino-Roldán, P. Gómez-Gutiérrez, J. J. Pérez, Discovery of Diverse Natural Products as Inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro Protease through Virtual Screening, *J. Chem. Inf. Model.* 61 (12) (2021), 6094-6106.
- [24] RCSB PDB - 5R83: PanDDA analysis group deposition -- Crystal Structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with Z44592329, (n.d.). <https://www.rcsb.org/structure/5R83> (accessed June 3, 2020).
- [25] V.O. Gawriljuk, P.P.K. Zin, A.C. Puhl, K.M. Zorn, D.H. Foil, T.R. Lane, B. Hurst, T.A. Tavella, F.T.M. Costa, P. Lakshmanane, J. Bernatchez, A.S. Godoy, G. Oliva, J.L. Siqueira-Neto, P.B. Madrid, S. Ekins, Machine Learning Models Identify Inhibitors of SARS-CoV-2, *J. Chem. Inf. Model.* 61 (2021) 4224–4235. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00683>.
- [26] H. Mslati, F. Gentile, C. Perez, A. Cherkasov, Comprehensive Consensus Analysis

- of SARS-CoV-2 Drug Repurposing Campaigns, *J. Chem. Inf. Model.* 61 (2021) 3771–3788. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00384>.
- [27] A.H. Vo, T.R. Van Vleet, R.R. Gupta, M.J. Liguori, M.S. Rao, An Overview of Machine Learning and Big Data for Drug Toxicity Evaluation, *Chem. Res. Toxicol.* 33 (2020) 20–37. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00227>.
- [28] P.M. Njogu, E.M. Guantai, E. Pavadai, K. Chibale, Computer-Aided Drug Discovery Approaches against the Tropical Infectious Diseases Malaria, Tuberculosis, Trypanosomiasis, and Leishmaniasis, *ACS Infect. Dis.* 2 (2016) 8–31. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00093>.
- [29] S. Hira, U. Saleem, F. Anwar, Z. Raza, A.U. Rehman, B. Ahmad, In Silico Study and Pharmacological Evaluation of Eplerinone as an Anti-Alzheimer’s Drug in STZ-Induced Alzheimer’s Disease Model, *ACS Omega.* 5 (2020) 13973–13983. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01381>.
- [30] A. Wadood, N. Ahmed, L. Shah, A. Ahmad, H. Hassan, S. Shams, In-silico drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process, *OA Drug Des. Deliv.* 1 (2013) 1–4. <https://doi.org/10.13172/2054-4057-1-1-1119>.
- [31] W. Zhang, J. Pei, L. Lai, Computational Multitarget Drug Design, *J. Chem. Inf. Model.* 57 (2017) 403–412. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00491>.
- [32] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) W357–W3664. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>.
- [33] D.A. Filimonov, A.A. Lagunin, T.A. Gloriozova, A. V. Rudik, D.S. Druzhilovskii, P. V. Pogodin, V. V. Poroikov, Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource, *Chem. Heterocycl. Compd.* 50 (2014) 444–457. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>.
- [34] Schrödinger, QikProp, (2021). <https://www.schrodinger.com/products/qikprop>. consultado marzo 2022
- [35] Chemical Computing Group ULC, Molecular Operating Environment (MOE), (2021). <https://www.chemcomp.com/Products.htm> consultado marzo 2022.
- [36] D.A. Filimonov, A. V. Zakharov, A.A. Lagunin, V. V. Poroikov, QNA-based “Star Track” QSAR approach, *SAR QSAR Environ. Res.* 20 (2009) 679–709. <https://doi.org/10.1080/10629360903438370>.
- [37] Schrödinger Release 2021-4: Field-based QSAR, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021, <https://www.schrodinger.com/products/field-based-qsar> consultado marzo 2022.
- [38] C. T. Supuran, C. Capasso, G. De Simone, Carbonic Anhydrase II as target for drug design, in carbonic anhydrases as biocatalysts from theory to medical and industrial applications, Chapter 4-Carbonic Anhydrase II as Target for Drug Desing, 1st ed. Elsevier, U.S.A, 2015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63258-6.00004-4>.

- [39] C. Temperini, A. Cecchi, A. Scozzafava, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors. Comparison of chlorthalidone, indapamide, trichloromethiazide, and furosemide X-ray crystal structures in adducts with isozyme II, when several water molecules make the difference, *Bioorganic Med. Chem.* 17 (2009) 1214–1221. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.12.023>.
- [40] J.Y. Winum, C. Temperini, K. El Cheikh, A. Innocenti, D. Vullo, S. Ciattini, J.L. Montero, A. Scozzafava, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors: Clash with Ala65 as a means for designing inhibitors with low affinity for the ubiquitous isozyme II, exemplified by the crystal structure of the topiramate sulfamide analogue, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7024–7031. <https://doi.org/10.1021/jm060807n>.
- [41] P.C. McDonald, S. Chia, P.L. Bedard, Q. Chu, M. Lyle, L. Tang, M. Singh, Z. Zhang, C.T. Supuran, D.J. Renouf, S. Dedhar, A Phase 1 Study of SLC-0111, a Novel Inhibitor of Carbonic Anhydrase IX, in Patients with Advanced Solid Tumors, *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials.* 43 (2020) 484–490. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000691>.
- [42] A. Akdemir, Ö. Güzel-Akdemir, Carbonic Anhydrase as Biocatalysts, From Theory to Medical and Industrial Applications. Chapter 7: The Structure, Physiological Role, and Potential Medicinal Applications of Carbonic Anhydrase V, Elsevier B.V. U.S.A, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63258-6.00007-X>.
- [43] G. Guercio, N. Saraco, M. Costanzo, R. Marino, P. Ramirez, E. Berensztein, M.A. Rivarola, A. Belgorosky, Estrogens in Human Male Gonadotropin Secretion and Testicular Physiology From Infancy to Late Puberty, *Front. Endocrinol.* 11 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00072>.
- [44] B.S. Komm, Y.P. Kharode, P.V.N. Bodine, H.A. Harris, C.P. Miller, C.R. Lyttle, Bazedoxifene acetate: A selective estrogen receptor modulator with improved selectivity, *Endocrinology.* 146 (2005) 3999–4008. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0030>.
- [45] J. Eldufani, G. Blaise, The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications, *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 5 (2019) 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.03.004>.
- [46] C. Legay, F.A. Mankal, J. Massoulié, B.J. Jasmin, Stability and secretion of acetylcholinesterase forms in skeletal muscle cells, *J. Neurosci.* 19 (1999) 8252–8259. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-19-08252.1999>.
- [47] G. Editors, E. Cadenas, K.J.A. Davies, I. Of, N.A.D.P.H. Quinone, O. Nqo, Special issue: Lars Ernster commemorative issue., *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 201–383. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00315-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00315-4).
- [48] J. V. Cross, J.C. Deak, E.A. Rich, Y. Qian, M. Lewis, L.A. Parrott, K. Mochida, D. Gustafson, S. Vande Pol, D.J. Templeton, Quinone reductase inhibitors block SAPK/JNK and NFκB pathways and potentiate apoptosis, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31150–31154. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31150>.

- [49] Behl, T.; Kaur, D.; Sehgal, A.; Singh, S.; Sharma, N.; Zengin, G.; Andronie-Cioara, F.L.; Toma, M.M.; Bungau, S.; Bumbu, A.G. Role of Monoamine Oxidase Activity in Alzheimer's Disease: An Insight into the Therapeutic Potential of Inhibitors. *Molecules* (2021), 26, 3724. <https://doi.org/10.3390/molecules26123724>
- [50] Md Afroz Ahmad, Ozaifa Kareem, Mohammad Khushtar, Md Akbar, Md Rafiul Haque, Ashif Iqbal, Md Faheem Haider, Faheem Hyder Pottoo, Fatima S. Abdulla, Mahia B. Al-Haidar, Noora Alhajri, Neuroinflammation: A Potential Risk for Dementia, *International Journal of Molecular Sciences*, (2022), 23, 2, (616).
- [51] Yang, E.-A.; Kang, H.-M.; Rhim, J.-W.; Kang, J.-H.; Lee, K.-Y. Early Corticosteroid Therapy for *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia Irrespective of Used Antibiotics in Children. *J. Clin. Med.* (2019), 8, 726. <https://doi.org/10.3390/jcm8050726>.
- [52] L.M. Podust, T.L. Poulos, M.R. Waterman, Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3068–3073. <https://doi.org/10.1073/pnas.061562898>.
- [53] G. I. Lapesheva, M. R. Waterman, Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 2060–2071. <https://doi.org/10.2174/156802611796575902>.
- [54] M. Shrivastava, P. Sharma, R. Singh, Identification of potential CYP51 inhibiting anti-*Aspergillus* phytochemicals using molecular docking and ADME/T studies, *Chem. Biol. Lett.* 8 (2021) 18–21. <http://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/156>.
- [55] T.Y. Hargrove, Z. Wawrzak, D.C. Lamb, F.P. Guengerich, G.I. Lapesheva, Structure–functional characterization of cytochrome P450 Sterol 14 α -Demethylase (CYP51B) from *aspergillus fumigatus* and molecular basis for the development of antifungal drugs, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 23916–23934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677310>.
- [56] K. Díaz, L. Espinoza, R. Carvajal, M. Conde-González, V. Niebla, A.F. Olea, Y. Coll, Biological activities and molecular docking of brassinosteroids 24-norcholane type analogs, *Int. J. Mol. Sci.* (2020), 21 8–10. <https://doi.org/10.3390/ijms21051832>.
- [57] A. Morales-Tapia, A. Ruz-Ramírez, Computational modeling of auxin: A foundation for plant engineering, *Front. Plant Sci.* (2016), 7 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01881>.
- [58] B. Lei, N. Heng, X. Dang, J. Liu, X. Yao, C. Zhang, Structure based: In silico identification of potentially non-steroidal brassinosteroids mimics, *Mol. Biosyst.* 13 (2017) 1364–1369. <https://doi.org/10.1039/c7mb00214a>.
- [59] E. Moreno-Castillo, D.P. Ramírez-Echemendía, G. Hernández-Campoalegre, D. Mesa-Tejeda, F. Coll-Manchado, Y. Coll-García, In silico identification of new potentially active brassinosteroid analogues, *Steroids.* 138 (2018) 35–42.

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.06.009>.

- [60] M. Quareshy, J. Prusinska, M. Kieffer, K. Fukui, A.J. Pardal, S. Lehmann, P. Schafer, C.I. Del Genio, S. Kepinski, K. Hayashi, A. Marsh, R.M. Napier, The Tetrazole Analogue of the Auxin Indole-3-acetic Acid Binds Preferentially to TIR1 and Not AFB5, *ACS Chem. Biol.* (2018)13, 2585–2594.
- [61] K.-I. Hayashi, J. Neve, M. Hirose, A. Kuboki, Y. Shimada, S. Kepinski, H. Nozaki, Supplementary Information for “Rational design of an auxin antagonist of the SCFTIR1 auxin receptor complex,” *ACS Chem. Biol.* 1 (n.d.) 1–27.
- [62] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 27 (2013) 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>.
- [63] Schrödinger Release 2021-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021. <https://www.schrodinger.com/products/ glide, consultado marzo 2022>.
- [64] Schrödinger Release 2021-4: MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021. <https://www.schrodinger.com/products/macromodel consultado marzo 2022>.
- [65] Schrödinger Release 2021-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021. <https://www.schrodinger.com/products/ligprep, consultado 2022>.
- [66] Schrödinger Software Release 2015-2, QikProp 4.4 User Manual, Schrodinger Press. (2015) 1–45. http://gohom.win/ManualHom/Schrodinger/Schrodinger_2015-2_docs/qikprop/qikprop_user_manual.pdf.
- [67] A.Z. Castro, J.E. Tacoronte, F.C. Manchado, L.A. De, M.T. Cabrera, Ecdysteroid analogs based on steroidal sapogenins I. Synthesis of bromo-derivatives from diosgenin. Preliminary study of their biological activity, *Rev. CENIC. Ciencias Químicas.* 33 (2002) 19–24.
- [68] Q.R. Petersen, Pseudocholesterol. II. i-Pseudocholesterol and i-Steroid Rearrangement, *J. Am. Chem. Soc.* 82 (1960) 3677–3680. <https://doi.org/10.1021/ja01499a051>.
- [69] F. The, *ORGANIC AND BIOLOGICAL CHEMISTRY* [, Evolution (N. Y). 966 (1962) 3673–3677.
- [70] M.T. etTadashi Gomi, NII-Electronic Library Service, *Chem. Pharm. Bull.* (2002) 2091. <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.
- [71] P.G. Gassman, W.E. Hymans, Photochemical and non-photochemical routes to derivatives of 5 β ,7 β -cyclocholestane. A new class of cyclosteroids, *Tetrahedron.* 24 (1968) 4437–4447. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96282-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96282-9).
- [72] J. Fajkos, J. Joska, On steroids. CXLII. * 5,7-ciclosteroids. VI. **Acetolysis of 4 α -Methanesulphonyloxy-5,7, β -cyclo-5 β -cholestane, 3095 (1972) 3483–3489.
- [73] J.A. Steele, E. Mosettig, The Solvolysis of Stigmasteryl Tosylate, *J. Org. Chem.* 28

(1963) 571–572. <https://doi.org/10.1021/jo01037a505>.

- [74] A.Y. Misharin, A.R. Mehtiev, G.E. Morozevich, Y. V. Tkachev, V.P. Timofeev, Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives, *Bioorganic Med. Chem.* 16 (2008) 1460–1473. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.056>.
- [75] W.G. Salmond, M.C. Sobala, K.D. Maisto, A synthesis of 25-hydroxycholesterol, *Tetrahedron Lett.* 18 (1977) 1237–1238. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)92985-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)92985-5).
- [76] F.L. Duecker, R.C. Heinze, P. Heretsch, Synthesis of Swinhoeisterol A, Dankasterone A and B, and Periconiastone A by Radical Framework Reconstruction, *J. Am. Chem. Soc.* 142 (2020) 104–108. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b12899>.
- [77] A.R. Nikolić, I.Z. Kuzminac, S.S. Jovanović-Šanta, D.S. Jakimov, L.D. Aleksić, M.N. Sakač, Anticancer activity of novel steroidal 6-substituted 4-en-3-one D-seco dinitriles, *Steroids.* 135 (2018) 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.03.009>.
- [78] V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, A.E. de Groot, *Brassinosteroids: a new class of plant hormones*, 1ra edición, Academic Press, London, 1998.
- [79] S.D. Clouse, A. Sakurai, T. Yokota, *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*, 1ra edición, Tokyo, Springer, 1999.
- [80] B. Voigt, J. Schmidt, G. Adam, Synthesis of 24-epiteasterone, 24-epityphasterol and their B-homo-6a-oxalactones from ergosterol, *Tetrahedron.* 52 (1996) 1997–2004. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)01042-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)01042-4).
- [81] B. Eignerová, B. Slavíkova, M. Buděšínský, M. Dračínský, B. Klepetářová, E. Št' Astná, M. Kotora, Synthesis of fluorinated brassinosteroids based on alkene cross-metathesis and preliminary biological assessment, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5753–5757. <https://doi.org/10.1021/jm900495f>.
- [82] H. Xu, K. Zhang, M. Lv, M. Hao, Construction of Cholesterol Oxime Ether Derivatives Containing Isoxazoline/Isoxazole Fragments and Their Agricultural Bioactive Properties/Control Efficiency, *J. Agric. Food Chem.* 69 (2021) 8098–8109. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01884>.
- [83] F. R. Carvalho, C. F. Maia, B. R. Serrao da Silva, B. L. Batista, M. N. Alyemeni, P. Ahmad, A. K. da Silva Lobato, Exogenous 24-Epibrassinolide stimulates root protection, and leaf antioxidant enzymes in lead stressed rice plants: Central roles to minimize Pb content and oxidative stress, *Environ. Pollut.* (2021), 280, 116992 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116992>.
- [84] M. Wang, Y. Wang, B. Peng, N. Zhao, J. Zhao, Z. Xiong, L. Zhao, Multi-class determination of steroid hormones and antibiotics in fatty hotpot ingredients by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 171 (2019) 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.019>.

- [85] B. Ding, N. Yin, Y. Liu, J. Cardenas-Garcia, R. Evanson, T. Orsak, M. Fan, G. Turin, P.B. Savage, Origins of cell selectivity of cationic steroid antibiotics, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 13642–13648. <https://doi.org/10.1021/ja046909p>.
- [86] B. Ding, U. Taotofa, T. Orsak, M. Chadwell, P.B. Savage, Synthesis and characterization of peptide-cationic steroid antibiotic conjugates, *Org. Lett.* 6 (2004) 3433–3436. <https://doi.org/10.1021/ol048845t>.
- [87] L.J. Huang, B. Wang, J.X. Zhang, C.M. Yuan, W. Gu, S.Z. Mu, X.J. Hao, Synthesis and evaluation of antifungal activity of C21-steroidal derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 2040–2043. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.080>.
- [88] M. Sautour, T. Miyamoto, M.A. Lacaille-Dubois, Steroidal saponins from *Smilax medica* and their antifungal activity, *J. Nat. Prod.* 68 (2005) 1489–1493. <https://doi.org/10.1021/np058060b>.
- [89] A. Cammarata, S.K. Upadhyay, B.S. Jursic, D.M. Neumann, Antifungal activity of 2 α ,3 β -functionalized steroids stereoselectively increases with the addition of oligosaccharides, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 7379–7386. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.015>.
- [90] G.E. Siless, M.E. Knott, M.G. Derita, S.A. Zacchino, L. Puricelli, J.A. Palermo, Synthesis of steroidal quinones and hydroquinones from bile acids by Barton radical decarboxylation and benzoquinone addition. Studies on their cytotoxic and antifungal activities, *Steroids.* 77 (2012) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.09.012>.
- [91] Shamsuzzaman, M.S. Khan, M. Alam, Z. Tabassum, A. Ahmad, A.U. Khan, Synthesis, antibacterial and antifungal activities of 6,5 fused steroidal oxazoles in cholestane series, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1094–1097. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.004>.
- [92] J.W. Morzycki, A. Wojtkielewicz, Synthesis of a highly potent antitumor saponin OSW-1 and its analogues, *Phytochem. Rev.* 4 (2005) 259–277. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-1233-6>.
- [93] M.P. Leese, H.A.M. Hejaz, M.F. Mahon, S.P. Newman, A. Purohit, M.J. Reed, B.V.L. Potter, A-ring-substituted estrogen-3-O-sulfamates: Potent multitargeted anticancer agents, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5243–5256. <https://doi.org/10.1021/jm050066a>.
- [94] Q. Wang, B. Duan, B. Duan, R. Yang, Y. Zhao, L. Zhang, Screening and Identification of Chitinolytic Actinomycetes and Study on the Inhibitory Activity against Turfgrass Root Rot Disease Fungi, *J. Biosci. Med.* 03 (2015) 56–65. <https://doi.org/10.4236/jbm.2015.33009>.
- [95] K. Muranaka, Anticancer activity of estradiol derivatives: A quantitative structure-activity relationship approach, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 1390. <https://doi.org/10.1021/ed078p1390>.
- [96] T.S. Dexheimer, L.K. Gediya, A.G. Stephen, I. Weidlich, S. Antony, C. Marchand,

- H. Interthal, M. Nicklaus, R.J. Fisher, V.C. Njar, Y. Pommier, 4-Pregnen-21-ol-3,20-dione-21-(4-bromobenzenesulfonate) (NSC 88915) and related novel steroid derivatives as tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 7122–7131. <https://doi.org/10.1021/jm901061s>.
- [97] A.J. Robinson, I. DeLucca, S. Drummond, G.A. Boswell, Steroidal nitron inhibitors of 5α -reductase, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 4801–4804. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)00741-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00741-X).
- [98] M.P. Leese, F.L. Jourdan, K. Gaukroger, M.F. Mahon, S.P. Newman, P.A. Foster, C. Stengel, S. Regis-Lydi, E. Ferrandis, A. Di Fiore, G. De Simone, C.T. Supuran, A. Purohit, M.J. Reed, B.V.L. Potter, Structure-activity relationships of C-17 cyano-substituted estratrienes as anticancer agents, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1295–1308. <https://doi.org/10.1021/jm701319c>.
- [99] D.P. Jindal, R. Chattopadhyaya, S. Guleria, R. Gupta, Synthesis and antineoplastic activity of 2-alkylaminoethyl derivatives of various steroidal oximes, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 1025–1034. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2003.09.002>.
- [100] W. Wang, D. Wang, Z. Wang, G. Yao, X. Li, P. Gao, L. Li, Y. Zhang, S. Wang, S. Song, Synthesis of new sarsasapogenin derivatives with cytotoxicity and apoptosis-inducing activities in human breast cancer MCF-7 cells, *Eur. J. Med. Chem.* 127 (2017) 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.011>.
- [101] L.G. de A. Chuffa, L.A. Lupi-Júnior, A.B. Costa, J.P. de A. Amorim, F.R.F. Seiva, The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers, *Steroids.* 118 (2017) 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.12.011>.
- [102] K.L. Dao, R.R. Sawant, J.A. Hendricks, V. Ronga, V.P. Torchilin, R.N. Hanson, Design, synthesis, and initial biological evaluation of a steroidal anti-estrogen - Doxorubicin bioconjugate for targeting estrogen receptor-positive breast cancer cells, *Bioconj. Chem.* 23 (2012) 785–795. <https://doi.org/10.1021/bc200645n>.
- [103] Y.A. Volkova, A.S. Kozlov, M.K. Kolokolova, D.Y. Uvarov, S.A. Gorbatov, O.E. Andreeva, A.M. Scherbakov, I. V. Zavarzin, Steroidal N-Sulfonylimidates: Synthesis and biological evaluation in breast cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.* 179 (2019) 694–706. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.048>.
- [104] Y.A. Mostafa, S.D. Taylor, Steroid derivatives as inhibitors of steroid sulfatase, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.013>.
- [105] Q. Li, X. Liu, X. Wang, S. Qiu, K. Byambasuren, L. Dang, Z. Wang, Antiproliferative Ability and Fluorescence Tracking of α -Linolenic Acid-Loaded Microemulsion as Label-Free Delivery Carriers in MDA-MB-231 Cells, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 11518–11526. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04972>.