



M'agradaria començar aquest treball agraint a totes les persones que mencionaré i a moltes d'altres que segurament em deixaré, la seva col·laboració, el seu suport i el seu ajut en aquests darrers anys.

Carme, gràcies per haver-me donat la possibilitat de treballar en investigació en el teu laboratori, per la llibertat atorgada, per permetre iniciar-me en el terreny computacional, microbiològic i de bioassaigs. També agrair-te les teves profundes i ràpides correccions. I com no, agrair-te sempre el teu suport.

Isma, què puc dir-te? Ja ho saps de sobres, infinites gràcies per la teva dedicació, la teva paciència, el teu bon humor i per les hores que has dedicat a aquest projecte. Realment has estat de gran ajuda.

Marc, què hauria estat sense la teua dissocio científica i les reunions? Merci pels consells, el suport, les cerveses... Gràcies per tota l'ajuda i, com ja saps si mai necessites res, ja saps, aquí tens un amic...

Aquest treball ha estat subvencionat per una beca de la Generalitat de Catalunya (DURSI, N° 2002FI 00701) i el Fons Social Europeu (ESF). També voldria agrair al Grup consolidat de Química Biològica i Biotecnologia (GQBB) dins del pla de recerca de la Generalitat de Catalunya (SGR 00335) i al Ministerio de Ciencia y Tecnologia de España ("Brassinosteroides: Estudios de Estructura-Función", BQU2003-07852) per donar suport al projecte

A tots els de la secció, especialment a vosaltres, els meus tfcs, per suportar-me i ajudar-me. Toni, sempre seràs el pare adoptiu encara que tu no vulguis fills.

Als companys de Química Computacional. En especial a l'Óscar, un bon amic que sempre disposa d'una estoneta per compartir, ja sigui una cervesa, una bona conversa o unes classes de mates.

A tots aquells que m'han fet gaudir d'aquests anys. Els del químic, tant la colla de la tesi com els amics de la classe de la Berta, amb les festes Bockma, els sopars a casa, la celebració d'aniversaris per tota Barcelona i les sortides per arreu. Els del futbol amb les seves esbufegades i sopars. Els del poble amb la seva diversió despreocupada i les seves incursions muntanyenques. Tota la família de la Berta i la meua.

Berta, tu m'has ensenyat a ser millor persona, m'ho has donat tot i sempre has estat al meu costat. Gràcies per la teva infinita comprensió, pel teu amor i per ensenyar-me a estimar.

Jaume i Joel sempre estareu allí. Pares, gràcies per dedicar-me la vostra vida.





Seguint un dels objectius de l'equip d'aprofundir en els requisits estructurals necessaris per a que un brassinoesteroide presenti activitat com a promotor del creixement vegetal i, després dels estudis teòrics que s'han dut a terme en l'equip sobre el KM-01 (primer inhibidor conegut de l'acció biològica dels brassinoesteroides), es creu interessant treballar en l'obtenció de mimètics del KM-01 amb possibilitats de desencadenar activitat brassinoesteroide. Per assolir aquest objectiu s'ha realitzat un treball multidisciplinari des de la vessant microbiològica, de química computacional, de síntesi orgànica i de bioassaig, en el que s'han aplicat tècniques estadístiques de disseny d'experiments.

Pel que fa a la vessant microbiològica, s'ha posat a punt un mètode per a produir PR toxina, metabòlit secundari generat en el cultiu del fong *Penicillium roquefortii*. S'ha millorat la producció d'aquesta toxina i, se n'ha produït suficient quantitat per a emprar-la com a producte de partida per a la síntesi de mimètics del KM-01. També s'han aïllat altres metabòlits d'aquest fong: eremofortines C i D, i s'ha intentat aïllar el KM-01 i la bipolaroxina del fong *Bipolaris cynodontis*.

En el terreny de la química computacional, s'ha col·laborat, amb l'empresa LEAD MOLECULAR DESIGN en el desenvolupament i validació d'una nova metodologia (SHOP, Scaffold HOPing) per a seleccionar compostos actius d'una base de dades, útils per al disseny de nous fàrmacs. També s'han realitzat 4 estudis computacionals diferents per obtenir més informació dels requisits estructurals necessaris per a que un compost presenti activitat brassinoesteroide i per a definir l'estructura dels mimètics del KM-01 amb possible activitat brassinoesteroide. Els dos primers estudis han servit per a definir l'estructura dels mimètics del KM-01. En el tercer, s'ha emprat la nova metodologia SHOP per analitzar una base de dades d'àcids carboxílics comercials amb l'objectiu de predir quins seran els àcids, cadenes laterals, més idonis per a acoblar tant en esquelets androstànics com en l'esquelet del KM-01, amb l'objectiu de desencadenar activitat brassinoesteroide. El darrer, és un estudi teòric que s'ha dut a terme sobre els primers anàlegs no-esteroidals de la brassinolida, sintetitzats per Back *et al.* (Andersen, D. L., Back, T. G., Janzen, L., Michalak, K., Pharis, R. P., Sung, G. C. Y., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 7129-7141) per veure si compleixen amb els requisits estructurals per a que un anàleg brassinoesteroide desenvolupi activitat.

A partir de la PR toxina, s'han sintetitzat tres mimètics del KM-01 ancorant una cadena lateral a l'esquelet del citat metabòlit secundari, i s'ha iniciat la transformació sintètica de l'esquelet de la PR toxina per convertir-lo en un esquelet anàleg al del KM-01.

Finalment, en el camp dels bioassajos, s'ha posat a punt un test per avaluar la capacitat de superar, per part dels compostos sintetitzats, l'estrès salí en l'etapa de germinació de les llavors.

ÍNDIX

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>6</b>
<b>1. LES HORMONES DE CREIXEMENT VEGETAL</b> .....	<b>6</b>
<b>2. ELS BRASSINOESTEROIDES (BRS)</b> .....	<b>8</b>
2.1.  Descobriments i aïllament de la brassinolida (1).....	8
2.2.  Propietats i aplicacions .....	8
2.3.  Problemàtica en l'obtenció de brassinoesteroides .....	9
2.4.  Els bioassaigs .....	12
2.5.  Mode d'acció dels brassinoesteroides .....	13
2.5.1.  Senyalització hormonal en plantes .....	13
2.5.2.  Relació entre l'estructura i l'activitat dels brassinoesteroides .....	16
2.5.2.1.  Relacions qualitatives estructura-activitat (SAR) .....	16
2.5.2.2.  Relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR) .....	19
<b>3. EL KM-01 (9): UN INHIBIDOR DE L'ACTIVITAT BRASSINOESTEROIDE</b> .....	<b>22</b>
3.1.  Aïllament i activitat biològica del KM-01 (9) .....	22
3.2.  Estudi a nivell estructural del KM-01 (9) .....	22
<b>4. MIMÈTICS DEL KM-01 (9) AMB ACTIVITAT BRASSINOESTEROIDE</b> .....	<b>25</b>
4.1.  Disseny de nous anàlegs .....	25
4.2.  Síntesi de mimètics del KM-01 (9) .....	25
4.3.  Estudi computacional .....	26
<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTOL 1: OBTENCIÓ D'UN PRODUCTE DE PARTIDA</b> .....	<b>30</b>
<b>1. ELECCIÓ D'UN PRODUCTE DE PARTIDA</b> .....	<b>31</b>
1.1.  KM-01 (9) .....	31
1.2.  Bipolaroxina (21) i dihidrobipolaroxina (22) .....	32
1.3.  PR toxina (19) i eremofortina C (20) .....	32
<b>2. OBTENCIÓ DE PR TOXINA (19) I EREMOFORTINA C (20)</b> .....	<b>36</b>
2.1.  Antecedents .....	36
2.1.1.  Etapas de creixement .....	36
2.1.2.  Condicions de creixement .....	36
2.1.3.  Extracció, aïllament i detecció de PR toxina (19) i eremofortina C (20) .....	38
2.2.  Posta a punt del mètode d'obtenció dels metabolits .....	39
2.3.  Millora del procés de producció i obtenció de PR toxina (19) i eremofortina C (20) .....	43
2.3.1.  Producció de PR toxina (19) i eremofortina C (20) .....	43
2.3.2.  Estudis a nivell de microorganisme .....	45
2.3.3.  Estudis sobre el cultiu del fong <i>Penicillium roquefortii</i> .....	47
2.3.3.1.  Recompte de conidis .....	47
2.3.3.2.  Soca de <i>Penicillium roquefortii</i> .....	49
2.3.3.3.  Medi de cultiu .....	51
2.3.3.4.  Disseny d'experiments emprant sucs .....	52
2.3.3.5.  Disseny d'experiments final .....	55
2.3.4.  Estudis sobre el procés d'extracció dels metabolits .....	62
2.3.5.  Estudis del procés d'aïllament dels metabolits .....	63
2.3.5.1.  Millora de l'aïllament de PR toxina (19) del medi de cultiu .....	63
2.3.5.2.  Aïllament i identificació d'eremofortina C (20) i D (28) .....	63
2.3.5.3.  Transformació de PR toxina (19) en eremofortina C (20) .....	66
2.3.6.  Mètode d'HPLC per la detecció i quantificació de metabolits .....	67
<b>3. OBTENCIÓ DE BIPOLAROXINA (21) I KM-01 (9)</b> .....	<b>71</b>

<b>4. CONCLUSIONS</b> .....	<b>72</b>
<b>CAPÍTOL 2: ESTUDI COMPUTACIONAL</b> .....	<b>73</b>
<b>1. ESQUEMA DEL TREBALL COMPUTACIONAL</b> .....	<b>74</b>
<b>2. TEORIA I MÈTODES</b> .....	<b>76</b>
<b>2.1. Modelització molecular</b> .....	<b>76</b>
2.1.1. Energia .....	76
2.1.2. Mecànica Molecular: <i>Force Field</i> .....	76
2.1.3. Anàlisi conformacional .....	78
2.1.3.1. Anàlisi sistemàtic .....	78
2.1.3.2. Fusió simulada ( <i>Simulated annealing (SA)</i> ) .....	79
2.1.4. Conformació activa .....	80
<b>2.2. Propietats moleculars</b> .....	<b>82</b>
2.2.1. Alineament .....	82
2.2.2. Descriptors .....	84
2.2.2.3. Descriptors en QSAR-Clàssic .....	84
2.2.2.4. Descriptors en 3D-QSAR .....	85
2.2.3. Descriptors GRIND ( <i>GRid-Independent Descriptors</i> ) .....	85
2.2.3.1. Càlcul del MIF (Camp d'interacció molecular) .....	85
2.2.3.2. Filtrat del MIF .....	86
2.2.3.3. Codificació del VRS cap a GRIND .....	87
2.2.4. Descriptors del programa ASP ( <i>Automated Similarity Package</i> ) .....	89
2.2.5. Descriptors SHOP .....	90
<b>2.3. Tractament de les dades</b> .....	<b>92</b>
2.3.1. Índexs de similitud .....	92
2.3.1.1. Índex de similitud de Carbó .....	92
2.3.1.2. Índex de Hodgkin .....	94
2.3.1.3. Optimització dels índexs de similitud .....	94
<b>3. MAQUINARI I PROGRAMARI</b> .....	<b>96</b>
<b>3.1. Maquinari</b> .....	<b>96</b>
<b>3.2. Programari</b> .....	<b>96</b>
3.2.1. Modelització molecular .....	96
3.2.2. Alineament i descriptors .....	97
3.2.3. Programació .....	97
<b>4. NOMENCLATURA DELS ANÀLEGS DEL KM-01 (9)</b> .....	<b>98</b>
<b>4.1. Anàlegs de la PR toxina (19):</b> .....	<b>98</b>
<b>4.2. Anàlegs del KM-01 (9)</b> .....	<b>98</b>
<b>5. ESTUDI COMPUTACIONAL PRELIMINAR DELS ANÀLEGS DEL KM-01 (9)</b> .....	<b>99</b>
<b>5.1. Introducció</b> .....	<b>99</b>
<b>5.2. Metodologia</b> .....	<b>99</b>
<b>5.3. Biblioteca virtual</b> .....	<b>101</b>
<b>5.4. Discussió de resultats</b> .....	<b>103</b>
5.4.1. Estudi de la cadena lateral dels mimètics del KM-01 (9) .....	103
5.4.1.1. Anàlegs amb els índexs de similitud més elevats .....	105
5.4.1.2. Anàlegs amb un diol en la cadena lateral .....	106
5.4.1.3. Anàlegs amb un únic hidroxil en posició $\alpha$ de carbonil .....	107
5.4.1.4. Anàlegs amb un hidroxil en posició $\beta$ de carbonil .....	108
5.4.1.5. Anàlegs amb un únic hidroxil en posició $\gamma$ de carbonil .....	108
5.4.1.6. Anàlegs amb un sol hidroxil en posició $\delta$ de carbonil .....	109
5.4.1.7. Els millors candidats .....	110
5.4.2. Estudi de l'esquelet dels mimètics del KM-01(9) .....	110
5.4.2.1. Anàlegs amb els índexs de similitud més elevats .....	113
5.4.2.2. Anàlegs funcionalitzats a C11 i C12 .....	114
5.4.2.3. Anàlegs funcionalitzats a C12 i C13 .....	115
5.4.2.4. Anàlegs funcionalitzats a C12 i C13 on s'omet l'hidroxil de C7 .....	116
5.4.2.5. Anàleg amb doble funcionalitat a C12 .....	118

5.4.2.6.	Anàleg que presenten com a esquelet base el de la PR toxina (19)	118
5.4.2.7.	Els millors candidats	118
5.4.3.	PR toxina (19) com a base dels mimètics del KM-01 (9)	119
<b>5.5.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>ESTUDI COMPUTACIONAL EXHAUSTIU DELS MIMÈTICS DEL KM-01 (9)</b>	<b>122</b>
<b>6.1.</b>	<b>Introducció</b>	<b>122</b>
<b>6.2.</b>	<b>Metodologia</b>	<b>122</b>
6.2.1.	Anàlisi conformacional	123
6.2.2.	Càlcul de descriptors GRIND	123
<b>6.3.</b>	<b>Biblioteca virtual</b>	<b>124</b>
6.3.1.	Metabòlits secundaris produïts en el cultiu del <i>P. roquefortii</i>	124
6.3.2.	Hormones clàssiques de creixement vegetal	125
6.3.3.	Mimètics del KM-01 (9)	125
6.3.4.	Anàlegs de la PR toxina (19)	128
6.3.5.	Inhibidors de la biosíntesi de brassinoesteroides	129
6.3.6.	Inhibidors de la proteïna Hsp90	129
<b>6.4.</b>	<b>Discussió de resultats</b>	<b>131</b>
6.4.1.	Hormones i metabòlits	131
6.4.2.	Inhibidors de brassinoesteroides	132
6.4.3.	Anàlegs de la PR toxina (19)	136
6.4.4.	Mimètics del KM-01 (9)	138
6.4.4.1.	Resultats generals	138
6.4.4.2.	Cadenes laterals	145
6.4.4.3.	Esquelets	147
<b>6.5.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>149</b>
<b>7.</b>	<b>ANÀLISI COMPUTACIONAL D'ÀCIDS COMERCIALS</b>	<b>151</b>
<b>7.1.</b>	<b>Introducció</b>	<b>151</b>
<b>7.2.</b>	<b>Metodologia</b>	<b>151</b>
7.2.1.	Metòdica computacional	151
7.2.2.	Exemple detallat	155
7.2.3.	Validació de la metodologia	160
<b>7.3.</b>	<b>Discussió de resultats</b>	<b>170</b>
<b>7.4.</b>	<b>Activitat dels mimètics androstànics i conclusions</b>	<b>175</b>
<b>8.</b>	<b>ESTUDI TEÒRIC SOBRE ELS ANÀLEGS NO ESTEROIDALS DE THOMAS BACK</b>	<b>176</b>
<b>8.1.</b>	<b>Introducció</b>	<b>176</b>
<b>8.2.</b>	<b>Solapament amb la brassinolida (1)</b>	<b>178</b>
<b>8.3.</b>	<b>Comparació energètica</b>	<b>180</b>
8.3.1.	Exploració conformacional	181
8.3.2.	Alineament amb la brassinolida (1)	184
<b>8.4.</b>	<b>Càlcul de descriptors GRIND i anàlisi de similitud</b>	<b>186</b>
<b>8.5.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>188</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>189</b>
	<b>SÍNTESI D'ANÀLEGS DEL KM-01 (9)</b>	<b>190</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>191</b>
<b>2.</b>	<b>SÍNTESI D'ANÀLEGS DE LA PR TOXINA (19)</b>	<b>194</b>
<b>2.1.</b>	<b>Síntesi del PR alcohol (153)</b>	<b>194</b>
<b>2.2.</b>	<b>Síntesi del mimètic PR-bq (152)</b>	<b>195</b>
2.2.1.	Síntesi de l'àcid dendrifièlic A (bq)	195
2.2.1.1.	Síntesi de ( <i>E</i> )-4-trifenilfosforaniliden-2-butenoat de metil (171)	196
2.2.1.2.	Síntesi de ( <i>S</i> )-2-metilbutiraldehid (165)	203
2.2.1.3.	Síntesi de dendrifielat A de metil (169)	208
2.2.1.4.	Hidròlisi del dendrifielat A de metil (169)	210
2.2.2.	Esterificació del PR alcohol (153) i l'àcid dendrifièlic A (bq)	211
<b>2.3.</b>	<b>Síntesi de PR-ad (161)</b>	<b>212</b>



2.3.1.	Protecció de l'àcid (S)-3-hidroxibutíric ( <b>ad</b> ) .....	212
2.3.1.1.	Protecció via acetat .....	212
2.3.1.2.	Protecció amb <i>p</i> -metoxibenzil (MPM) .....	214
2.3.2.	Esterificació del PR alcohol ( <b>153</b> ) i l'àcid (S)-3-( <i>p</i> -metoxi)benziloxibutíric ( <b>202</b> ).....	216
<b>2.4.</b>	<b>Síntesi de PR-bb (162)</b> .....	<b>216</b>
<b>2.5.</b>	<b>Activitat de mimètics de PR toxina (19)</b> .....	<b>218</b>
<b>3.</b>	<b>ESTERIFICACIÓ DE YAMAGUCHI</b> .....	<b>220</b>
3.1.	Síntesi de <i>o</i> -acetilsalicilat de ciclohexil ( <b>210</b> ) .....	220
3.2.	Síntesi de <i>o</i> -metoxibenzoat d'estigmasteril ( <b>212</b> ).....	221
3.3.	Síntesi d'octanoat de <i>p</i> -metoxibenziloxi ( <b>215</b> ) .....	222
3.4.	Conclusions.....	222
<b>4.</b>	<b>SÍNTESI D'ANÀLEGS DEL KM-01 (9)</b> .....	<b>224</b>
4.1.	Reducció selectiva de l'epòxid C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> de la PR toxina ( <b>19</b> ).....	224
4.1.1.	Reducció emprant trifenilfosfina/iode.....	225
4.1.2.	Reducció emprant selenoamides .....	227
4.1.3.	Reducció sobre PR toxina ( <b>19</b> ).....	228
4.2.	Reducció de l'epòxid C <sub>7</sub> -C <sub>11</sub> de la PR toxina ( <b>19</b> ).....	229
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>230</b>
	<b>BIOASSAIG ANTIESTRÈS</b> .....	<b>231</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>232</b>
1.1.	Germinació de llavors.....	232
1.2.	Antecedents.....	233
<b>2.</b>	<b>POSTA A PUNT DEL BIOASSAIG</b> .....	<b>235</b>
2.1.	Primers experiments amb llavors de rave.....	235
2.1.1.	Efecte de la concentració de NaCl .....	235
2.1.2.	Efecte del volum de dissolució emprat en el paper de filtre .....	237
2.1.3.	Efecte del dissolvent.....	239
2.1.4.	Efecte de la concentració de brassinoesteroide.....	240
2.2.	Disseny d'experiències amb llavors de rave.....	241
2.2.1.	Factors i nivells del disseny .....	242
2.2.2.	Elecció del disseny .....	243
2.2.3.	Disseny de Taguchi L <sub>8</sub> (2 <sup>7</sup> ) .....	246
2.3.	Experiments amb llavors d'arròs .....	249
<b>3.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>250</b>
	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>251</b>
	<b>PART EXPERIMENTAL</b> .....	<b>253</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>304</b>





## INTRODUCCIÓ

### 1. Les hormones de creixement vegetal

El creixement i desenvolupament de les plantes ve regulat per un gran nombre de processos. Aquests estan controlats, a més del propi programa genètic de la planta, per factors externs (llum, temperatura, longitud del dia, gravetat...) i factors interns (compostos químics principalment). Aquests compostos, que són substàncies controladores del creixement en les plantes, reben el nom de fitohormones o hormones vegetals. Són productes sintetitzats per les plantes que afecten a molts aspectes del desenvolupament i creixement dels vegetals a molt baixes concentracions.<sup>1</sup> Les fitohormones són de gran importància ja que tots els aspectes del creixement de les plantes, en cert grau, es troben regulats per un control hormonal. Una única hormona pot regular una gran diversitat de processos, mentre que al mateix temps múltiples hormones sovint influeixen un únic procés.<sup>2</sup>

Des de que foren descobertes les fitohormones, la seva capacitat reguladora ha fascinat als biòlegs. També ha cridat la seva atenció el fet que els nivells hormonals o les seves respostes puguin manipular-se per millorar característiques de les plantes. Potser, el millor exemple d'això és l'aïllament de varietats mutants d'ordi i arròs que evitaren, durant la segona meitat del segle XX, la mort de milions de persones de tot el món. Aquestes noves varietats eren menys susceptibles als efectes produïts pel vent i la pluja que no pas les varietats naturals.<sup>3</sup>

Per tal d'elucidar el mecanisme molecular que dirigeix l'acció de les fitohormones s'han realitzat molts estudis. Alguns d'ells han emprat com a planta model l'*Arabidopsis thaliana* (**Figura 1**) per la seva simplicitat genètica i, d'aquesta manera, aïllar mutants que tenen diferents respostes en aplicar una hormona. Encara que no es coneix completament cap pas de transducció hormonal en plantes, actualment ja es comprenen moltes accions controlades per l'acció hormonal.<sup>4-11</sup>



**Figura 1.** *Arabidopsis thaliana*.

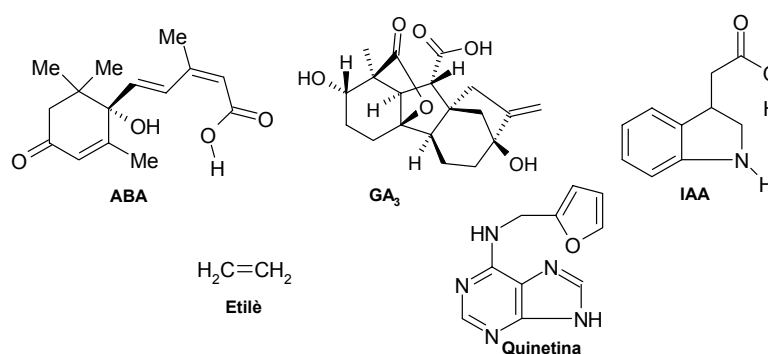
De fet, es creu que les fitohormones poden actuar segons dos tipus de mecanismes generalment acceptats:

- a) L'hormona travessa la membrana cel·lular de la cèl·lula diana i assoleix el citoplasma. Allí, s'uneix a una molècula adequada (receptor) i forma un complex hormona-receptor. A partir d'aquí, el complex pot dissociar-se o pot entrar al nucli com a tal afectant la síntesi d'ARN missatger. Aquesta modificació en el procés de transducció és el que produeix la resposta fisiològica.
- b) L'hormona s'uneix a un receptor de membrana en la cèl·lula diana. La unió hormona-receptor

produeix un canvi conformacional en aquest darrer que condueix a una cascada interna de reaccions citoplasmàtiques que poden produir efectes molt variats: noves activitats enzimàtiques, modificació de processos metabòlics, inducció de síntesi d'ARN missatger...

Les fitohormones poden agrupar-se en cinc grups als que sovint es fa referència com els cinc grups clàssics d'hormones vegetals (**Figura 2**):

- Les auxines (àcid indolacètic (IAA) principalment), típicament associades a l'elongació cel·lular, determinen el creixement de la planta i afavoreixen la maduració del fruit.
- Les gibberel·lines (GA) determinen el creixement de la tija, provocant l'elongació del brot i dels entrenusos i indueixen la germinació de les llavors.
- Les citoquinines incrementen el ritme de creixement cel·lular estimulant-ne la divisió, participen en la floració, intervenen en la destrucció de la clorofil·la i inhibeixen la caiguda de les fulles. Una de les primeres citoquinines descobertes fou la quinetina.
- L'etilè estimula l'obertura de les flors, la maduració del fruit i la caiguda de les fulles, així com el creixement i la diferenciació d'arrels i tija.
- L'àcid abscísic (ABA) propicia la caiguda de les fulles, frena el creixement de la tija, i inhibeix la germinació de les llavors.



**Figura 2.** Compostos que pertanyen als 5 grups de fitohormones clàssiques.

Tot i això, també es classifiquen altres grups com a fitohormones: poliamines, jasmonats, àcid salicílic, sistemina i brassinoesteroides (BRs), de les quals aquests darrers, com s'explicarà més a fons en l'apartat 2.2, són els més interessants. De fet, els brassinoesteroides són actius a concentracions molt inferiors (al voltant de 100 cops) a les de la resta de fitohormones. Aquest fet, juntament amb les propietats que es citen a l'apartat 2.2, els converteixen en les hormones idònies per aplicar en el regne vegetal.

## 2. Els brassinoesteroides (BRs)

### 2.1. Descobriment i aïllament de la brassinolida (1)

El 1941 Mitchell i Whitehead, treballant en el Beltsville Agricultural Research Center (BARC) del Departament d'Agricultura dels Estats Units (USDA), publicaren un article afirmant que el pol·len de *Zea mays* contenia compostos promotors del creixement vegetal.<sup>12</sup> L'interès d'en Mitchell en aquest camp el portà a publicar al 1970 a la revista Nature "Brassins – A New Family of Plant Hormones from Rape Pollen".<sup>13</sup> Aquests nous compostos, que eren biològicament actius en el bioassaig del segon entrenús de la mongeta, es trobaren en uns 20 tipus de plantes diferents.<sup>14</sup> En un primer moment, es va pensar que aquests promotors corresponien a una mescla d'àcids grassos esterificats amb glicerol<sup>14</sup> i, posteriorment, esterificats amb galactosa.<sup>15</sup> L'evidència que aportaren aquests investigadors va ser força criticada ja que es va considerar prematura per extreure conclusions. Per aquest motiu, al 1974, els científics de l'USDA van iniciar un important esforç per aïllar *brassins* a partir d'una enorme quantitat de pol·len de colza (227 kg).<sup>16</sup> Així, al 1979 Grove *et al.*<sup>17</sup> obtingueren 4 mg de cristalls de brassinolida (1) a partir d'uns 40 kg de pol·len de colza (*Brassica napus* L.) (Figura 3). Però no fou fins l'any següent que es va caracteritzar completament la seva estructura per mitjà de dades espectroscòpiques i raigs X com (22*R*,23*R*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahidroxi-6,7-seco-5 $\alpha$ -campestan-6,7-lactona (1) (Figura 4).<sup>18</sup>



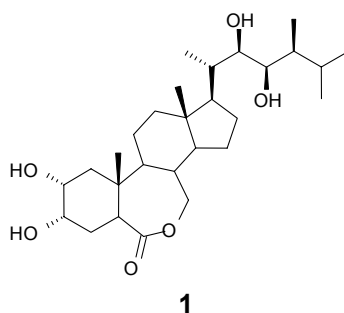
Figura 3. Camp de cultiu i flor de la planta de colza (*Brassica napus* L.).

Un cop identificada l'estructura d'aquest compost, es va intensificar la recerca en el camp dels brassinoesteroides, centrant els esforços en el terreny d'activitat fitofisiològica, mode d'acció, metodologies de síntesi química, relacions estructura activitat, microanàlisi, distribució en el regne vegetal, búsqueda de nous compostos relacionats, biosíntesi, metabolisme i aplicacions a nivell de camp. Va ser en aquest moment quan es va acabar de definir l'enorme importància d'aquestes hormones per l'agricultura, donades les seves magnífiques propietats.<sup>19,20</sup>

### 2.2. Propietats i aplicacions

Els efectes fisiològics<sup>21-23</sup> d'aquests potents reguladors del creixement vegetal, que són actius a concentracions de  $10^{-10}$  M (en aplicacions agrícoles 5-50 mg de brassinoesteroide per hectàrea són suficients),<sup>24</sup> es poden il·lustrar a través de dos importants conceptes: el primer, que els brassinoesteroides poden accelerar el creixement i la maduració de la planta i, el segon, que els efectes produïts pels brassinoesteroides no es poden considerar de manera aïllada, ja que aquestes fitohormones interaccionen

amb altres reguladors del creixement i amb senyals ambientals, particularment la llum. De fet, els brassinoesteroides presenten una resposta sinèrgica amb auxines i una resposta additiva amb gibberel·lines.<sup>25-27</sup> Per tant, des d'aquesta perspectiva i concretant una mica més, es pot dir que els brassinoesteroides indueixen a la planta, a més d'un augment del tamany i de la divisió cel·lular, la inclinació de les fulles, el bombeig de protons i la polarització de les membranes,<sup>28,29</sup> fotosíntesi<sup>30</sup> i milloren la resistència a l'estrès incloent termotolerància,<sup>31,32</sup> senescència,<sup>25</sup> estrès salí,<sup>33-35</sup> sequedat,<sup>36,37</sup> atacs de patògens i agents químics agressius com plaguicides i herbicides.<sup>22,34,38</sup> Aquesta darrera propietat indica la influència positiva que provoquen aquestes fitohormones front al medi ambient. Tot i així, els brassinoesteroides inhibeixen el creixement de les arrels de les plantes, fet que pot ser una conseqüència de la producció d'etilè a la qual indueixen ja que aquest n'inhibeix el creixement.<sup>39,40</sup>



**Figura 4.** Brassinolida (1), esteroide campestà polihidroxilat amb funcionalitat lactona.

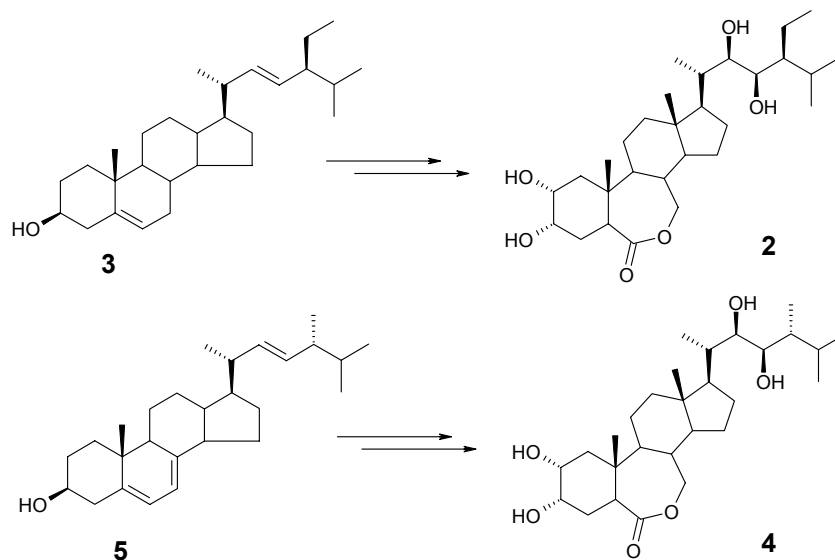
Algunes noves prometedores aplicacions dels brassinoesteroides són l'estimulació del creixement de bolets, la producció de plantes ornamentals,<sup>41</sup> la resistència que confereixen a les plantes front a ambients contaminants, la millora en el procés d'introducció i d'adaptació de noves collites en àrees noves,<sup>42</sup> la producció de raïm.<sup>43-45</sup> Fins i tot, alguns estudis confirmen que els brassinoesteroides són uns constituents obligatoris en les plantes.<sup>46-48</sup> Molts resultats suggereixen que els brassinoesteroides són necessaris per a una productivitat òptima i per a una resistència contra influències desfavorables de l'ambient. De fet, una manca de brassinoesteroides en mutants d'*Arabidopsis thaliana* condueix a desviacions dramàtiques del desenvolupament normal de la planta, les quals es poden recuperar mitjançant l'aplicació externa d'aquestes fitohormones.<sup>21,49-56</sup>

### 2.3. Problemàtica en l'obtenció de brassinoesteroides

Tot i la importància d'aquestes molècules, i més concretament de la brassinolida (1) (ja que és el brassinoesteroide més actiu conegut fins al moment), apareix un problema en el moment d'emprar-les en el món agrícola: com es poden obtenir en quantitats importants? En un principi, es podria pensar en la seva extracció del medi natural, però aquesta solució no és viable ja que, tot i trobar-se en gairebé 50 espècies vegetals, tant representants del medi marí (algues) com terrestre (gimnospermes, monocotiledònies o dicotiledònies), estan presents en molt baixes concentracions, com es pot observar en el fet que foren necessaris 10 anys de dedicació per aïllar únicament 4 mg de brassinolida (1) a partir de 40 kg de pol·len.

Per tant, descartada aquesta primera opció, sembla que la solució podria passar per la síntesi química de la brassinolida (1). Tot i haver-se assolit amb èxit,<sup>57-60</sup> cal remarcar que aquesta és força costosa ja que presenta 13 centres quirals en la seva estructura, fet que en dificulta molt la síntesi total. La síntesi parcial de la brassinolida (1) continua essent igualment costosa ja que no es disposa d'un precursor adequat. Però,

si enlloc de la brassinolida (1) es pretén sintetitzar la 28-homobrasinolida (2) o la 24-epibrassinolida (4) (productes naturals menys actius que la brassinolida (1) però amb elevada activitat) es poden sintetitzar més directament a partir d'esterols molt abundants en la naturalesa: estigmasterol (3) i ergosterol (5) respectivament.



**Figura 5.** Esterols de partida per obtenir brassinoesteroides.

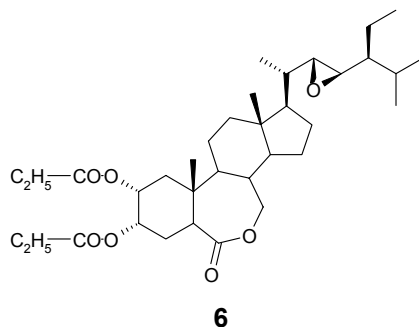
De totes maneres, tots tres brassinoesteroides, després de nombroses investigacions on s'ha arribat a desenvolupar diverses rutes pràctiques, poden sintetitzar-se a gran escala estereoquímicament purs. Per tant, durant la segona meitat de la dècada dels 80 foren escollits com a candidats pràctics per emprar-los en l'agricultura, i els seus tests a nivell de camp es realitzaren a Japó, Xina, Cuba i molts altres països.<sup>61,62</sup> Els resultats obtinguts suggeriren que aquests compostos poden aplicar-se a una gran varietat de cultius. Tanmateix, donat que els components de les plantes varien de les llavors a les plantes joves i adultes, i donat que les condicions també varien de les cambres de creixement a les zones de cultius, els efectes com a reguladors del creixement vegetal en collites foren gairebé nuls. Per aquest motiu foren suspeses les proves a nivell de camp a Europa i Japó. Però, actualment Xina ha registrat la 28-homobrasinolida (2) com a promotor del creixement millorant el rendiment de les collites de tabac, sucre, te i diverses fruites, mentre que Rússia i Bielorrússia han registrat la 24-epibrassinolida (4) com a regulador de la patata, el tomàquet, el cogombre, el pebrot...<sup>24,63</sup>

Una manera de solventar l'inconvenient de la variable activitat d'aquestes hormones en condicions de camp, és sintetitzar compostos similars amb major estabilitat. Actualment es disposa del brassinoesteroide TS303 (6)<sup>64</sup> que presenta, a nivell de camp, unes millors propietats que els brassinoesteroides citats anteriorment (**Figura 6**). De fet, actualment ja s'empra ruixant llavors amb el producte líquid TNZ303 (una mescla de 30 mg de TS303 per cada litre de n-propil dihidrojasmonat) en països com Rússia, Polònia o Xina.<sup>20</sup>

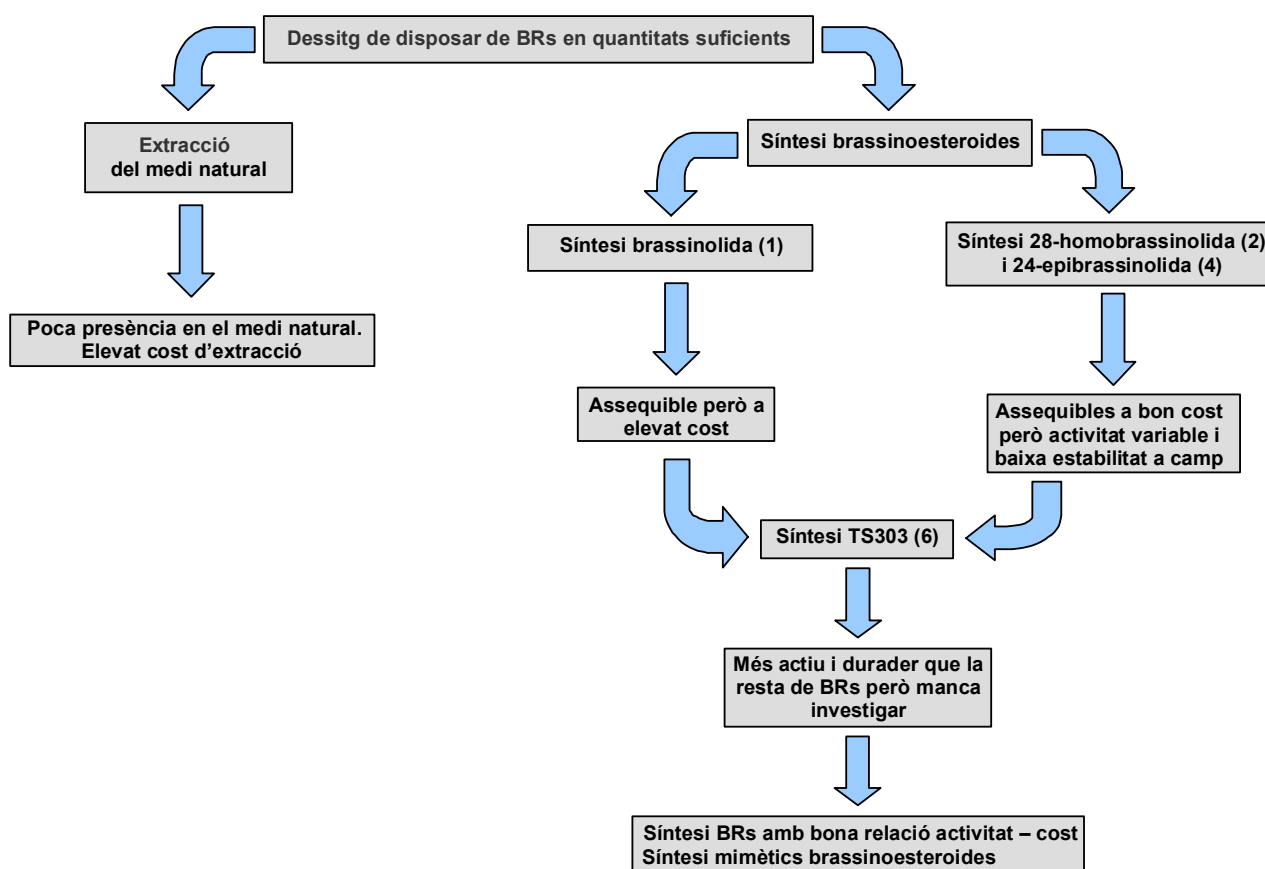
En resum (**Figura 7**), pot dir-se que tot i que la brassinolida (1), la 24-epibrassinolida (4), la 28-homobrasinolida (2) i el TS303 (6) són bons candidats per emprar-los com a promotors del creixement vegetal, encara es continua investigant en aquest terreny per tal de millorar-ne les seves propietats. Doncs, la síntesi dels tres primers, a pesar d'haver-se assolit a gran escala, continua essent massa costosa per a



comercialitzar aquests productes com a promotors del creixement. Per una banda, la ràpida inactivació d'aquests brassinoesteroides (catabolització) fa necessari sintetitzar nous productes que la millorin. Per altra banda, el TS303 (**6**), tot i millorar la seva estabilitat en les condicions de camp, encara manca investigar més a fons les seves propietats. Per això, actualment els esforços estan centrats en la síntesi de brassinoesteroides amb una major relació activitat cost sintètic i amb una major estabilitat a nivell de camp, i així poder també estudiar millor el seu mecanisme d'acció a nivell fisiològic.



**Figura 6.** Compost TS303 (**6**)



**Figura 7.** Esquema resum de l'obtenció de brassinoesteroides.

Per poder realitzar la síntesi d'aquestes noves molècules amb garanties d'èxit és necessari, paral·lelament, desenvolupar i disposar de diferents bioassaigs per poder-ne avaluar la seva activitat. Entre ells es destaquen, per la seva alta sensibilitat i aplicabilitat, el test d'inclinació de la làmina d'arròs i el del segon internodi de la mongeta sensibilitzat.<sup>65,66</sup>

Altrament, s'ha de tenir en compte la manca d'informació sobre el receptor dels brassinoesteroides. Per tant, també resulta de gran importància, per al disseny de nous anàlegs sintètics econòmicament més assequibles, el coneixement de les característiques estructurals per a que un brassinoesteroide presenti activitat com a promotor del creixement vegetal. Així, també s'extrauria més informació sobre com actuen aquestes molècules en la planta; fet que permetria determinar els anàlegs brassinoesteroide més interessants per a desencadenar activitat brassinoesteroide abans de ser sintetitzats, així com dissenyar nous compostos actius amb estructura diferent a la dels brassinoesteroides.

## 2.4. Els bioassaigs

Com ja s'ha comentat, degut a que els brassinoesteroides es troben en l'ordre de ppm o ppb en les espècies vegetals i a que la seva síntesi és molt costosa, no es disposa, a un preu raonable, de quantitats suficients per poder realitzar proves a camp. A més, el temps de resposta en les proves a camp és molt elevat i això alenteix la investigació en aquest terreny. Per aquests motius, han sorgit els bioassaigs, que són aproximacions a camp efectuades en el laboratori i mesuren un efecte macroscòpic conseqüència d'una cascada de fenòmens interns i de processos biològics. Alguns d'ells foren, en un primer moment, desenvolupats per avaluar l'activitat d'auxines, gibberel·lines o citoquinines, però, posteriorment, foren adaptats per avaluar també l'activitat de brassinoesteroides. Alguns dels més importants s'enumeren a la **Taula 1**.

Bioassaigs per a brassinoesteroides	Límit de detecció (M)
Inhibició del pèsol <sup>67</sup>	$1 \times 10^{-14}$
Elongació del segon entrenús de la mongeta sensibilitzat <sup>65</sup>	$1 \times 10^{-14}$
Inclinació de la làmina d'arròs <sup>66</sup>	$1 \times 10^{-13}$
Elongació del segon entrenús de la mongeta <sup>68</sup>	$2 \times 10^{-12}$
Curvatura del primer entrenús de la mongeta <sup>69</sup>	$3 \times 10^{-10}$
Llavors de rave <sup>70</sup>	$8 \times 10^{-9}$
Elongació de l'hipocòtil del tomàquet <sup>70</sup>	$4 \times 10^{-9}$

**Taula 1.** Diferents bioassaigs emprats per avaluar l'activitat de fitohormones.

El test del pèsol, tot i la seva sensibilitat, no s'utilitza perquè està molt menys estandarditzat que la resta. Els bioassaigs del tomàquet i del rave s'apliquen sobre les plantes senceres i han estat substituïts per tests més sensibles i de més fàcil realització.

D'entre tots els bioassaigs esmentats, el més utilitzat per avaluar l'activitat de brassinoesteroides és el test d'inclinació de la làmina d'arròs, ja que és un dels més sensibles i el que presenta millors valors de repetibilitat i reproduïbilitat. Per aquests motius, l'equip disposa d'un bioassaig d'arròs (RLIT III)<sup>71,72</sup> per avaluar l'activitat de les hormones que s'hi sintetitzen. En ell es mesura l'angle d'inclinació format entre la tija de la planta d'arròs i l'anvers de la segona làmina (**Figura 8**) mitjançant un transportador, essent aquesta mesura proporcional a l'activitat. En el bioassaig desenvolupat en l'equip, els valors d'activitat s'expressen com el logaritme negatiu de la dosi que dona una resposta de 45° ( $-\log(\text{dosi } 45^\circ)$ ), és a dir, després d'avaluar els BRs a diferents dosis ( $\mu\text{g/planta}$ ) per poder construir la corba  $\log(\text{dosi})$  front l'angle, s'interpol·la el valor de 45° per conèixer l'activitat de l'anàleg corresponent (expressada com  $-\log(\text{dosi } 45^\circ)$ ). Així doncs,

en aquest bioassaig, la brassinolida (1) presenta una activitat de 4.01, l'homobrassinolida (2) de 3.32 i es considera que un compost té una activitat baixa per a valors de  $-\log(\text{dosi } 45) < 1.00$  i elevada activitat per a valors al voltant de 1.50-2.50.



**Figura 8.** Diferents inclinacions de la làmina de la plàntula d'arròs.

El test d'elongació del segon entrenús de la mongeta sensibilitzat també és comunament emprat en l'avaluació dels brassinoesteroides doncs, tot i presentar major variabilitat en la mesura dels valors d'activitat, és més sensible que el de l'arròs. Actualment, en l'equip s'està posant a punt aquest bioassaig. Així, es disposarà de dos bioassaigs que mesuraran efectes macroscòpics diferents i això permetrà disposar de major informació sobre aquestes molècules. La disposició de diferents bioassaigs per avaluar unes mateixes hormones és molt important per obtenir informació, doncs, de quants més resultats d'activitat es disposi, més bé es coneixerà la manera d'actuar d'aquests reguladors. Pels citats motius, també es pretén desenvolupar un nou bioassaig que permeti avaluar la capacitat antiestrès dels brassinoesteroides. D'aquesta manera, encara es disposaran de més dades per analitzar la manera que tenen d'actuar aquestes fitohormones, doncs, els anteriors dos bioassaigs de que disposa l'equip són per avaluar el creixement de la planta però no són, en cap cas, per avaluar l'efecte antiestrès d'aquestes fitohormones, una de les seves propietats més importants.

## 2.5. Mode d'acció dels brassinoesteroides

### 2.5.1. Senyalització hormonal en plantes

Els esteroides juguen un paper essencial com a hormones tant en les plantes com en els animals. De fet, els esteroides, tant animals com vegetals, presenten similituds estructurals, com per exemple els brassinoesteroides i ecdiesteroides (certes hormones esteroidals de vertebrats o insectes). Fins i tot, les plantes produeixen nombrosos esteroides i esterols, alguns dels quals són també reconeguts com hormones en els animals.<sup>73-75</sup>

En el model clàssic de l'acció de les hormones esteroidals, aquestes s'uneixen a receptors intracel·lulars per tal de regular la transcripció genètica.<sup>76</sup> Tot i així, a part d'aquests receptors intracel·lulars que ja han estat estudiats a fons, hi ha una evidència creixent que els esteroides poden provocar un ràpid efecte no genòmic en una gran varietat de cèl·lules, incloent neurones, cèl·lules pituïtàries, cor, músculs, esperma... mitjançant interaccions amb receptors localitzats a la superfície cel·lular. Es coneix, però, poca cosa del mecanisme d'acció d'aquests receptors esteroidals de membrana.<sup>77-79</sup>

Per entendre el mecanisme pel qual els brassinoesteroides regulen el desenvolupament de les plantes, és necessari identificar els components que intervenen en la seva ruta biosintètica, incloent el receptor. Tot i que de moment encara no es coneix aquest receptor, s'han elaborat nombrosos treballs en aquest terreny mitjançant l'estudi d'hormones esteroidals i la seva senyalització en plantes.<sup>21,22,75,80-84</sup>

Per una banda, molts brassinoesteroides han estat identificats i, juntament amb els estudis sobre metabolisme, han permès elucidar la ruta bioquímica que condueix a la producció de brassinolida (**1**) com es mostra en la **Figura 9**.<sup>80,85-90</sup> Per altra, l'observació que mutacions de l'*Arabidopsis thaliana* cancel·len la biosíntesi de brassinolida (**1**) resulta en un fenotip deficient que pot ser restablert mitjançant l'aplicació externa de **1** o d'intermedis brassinoesteroides biosintètics.<sup>38,91</sup> Fins i tot, la caracterització de mutants intensius de brassinoesteroides amb un fenotip deficient similar ha permès identificar alguns gens claus en la senyalització d'aquests.<sup>92-94</sup>

Donat que els brassinoesteroides tenen unes propietats promotores del creixement tan essencials, no és gens sorprenent que els mutants involucrats en la biosíntesi i senyalització de BRs presentin un fenotip dramàticament alterat. Alguns fenotips d'aquests mutants exhibeixen retard en la senescència, manca de formació de xilema, problemes d'esterilitat, alteració de la resposta front a l'àcid abscísic o auxines...<sup>95,96</sup>

També s'està treballant en l'estudi hormonal de plantes des d'una vessant més química, mitjançant l'ús d'inhibidors específics de la biosíntesi de brassinoesteroides. El brassinazol (**7**), per exemple, és un inhibidor d'aquest tipus que, quan s'aplica a concentracions micromolars, genera fenotips que mimetitzen els generats pels mutants (**Figura 10**).<sup>97,98</sup> Això proporciona una eina molt útil per discernir l'efecte dels brassinoesteroides en espècies de plantes on encara no s'han identificat mutants que afectin determinats passos de la biosíntesi de brassinoesteroides.

Alguns científics, emprant conjuntament el treball genètic realitzat amb mutants de l'*Arabidopsis* i el treball químic amb inhibidors específics de brassinoesteroides, han arribat a la conclusió que el gen BRI1 juga un paper fonamental en la senyalització d'aquestes hormones. De fet, molts mutants de l'*Arabidopsis* han estat estudiats (*det2*, *dwf4*, *cpd*, *d<sup>x</sup>*, *cu-3*, *bri1*, *bin2*...) i, en la majoria d'ells, es pot regenerar el fenotip deficient que provoquen a la planta aplicant brassinolida (**1**) externament. Els únics mutants on això no és possible són els anomenats *brassinosteroid-intensive* (*bri*). Curiosament, d'uns 20 mutants *bri* únicament els que presenten alteracions en el gen BRI1 han resultat ser no redundants, i d'aquí que aquest gen es consideri tan important.<sup>92,93,99,100</sup> El mutant *bri1* de l'*Arabidopsis* va ser originalment identificat per la seva elongació normal de les arrels d'aquesta en presència de brassinolida (**1**).<sup>92</sup>

El BRI1 es troba localitzat a la membrana citoplasmàtica, suggerint que, de fet, pot funcionar com un receptor per a lligands extracel·lulars.<sup>99</sup> Actualment, es desconeix la manera exacta en que aquest gen pot interaccionar amb la brassinolida (**1**), però s'han proposat dos mecanismes possibles (**Figura 11**).<sup>83,93</sup> La primera hipòtesi sosté que el BRI1 interacciona directament amb la brassinolida (**1**), i la segona sosté que el BRI1 s'uneix a una proteïna portadora que s'ha unit prèvia i directament a **1**. En aquest darrer mecanisme, es creu que l'activació del BRI1 per la brassinolida (**1**) inicia una cascada de processos que provoquen canvis en el creixement i desenvolupament de la planta. Tot i així, encara manca descriure components addicionals en el funcionament de senyalització del BRI1.<sup>101</sup>

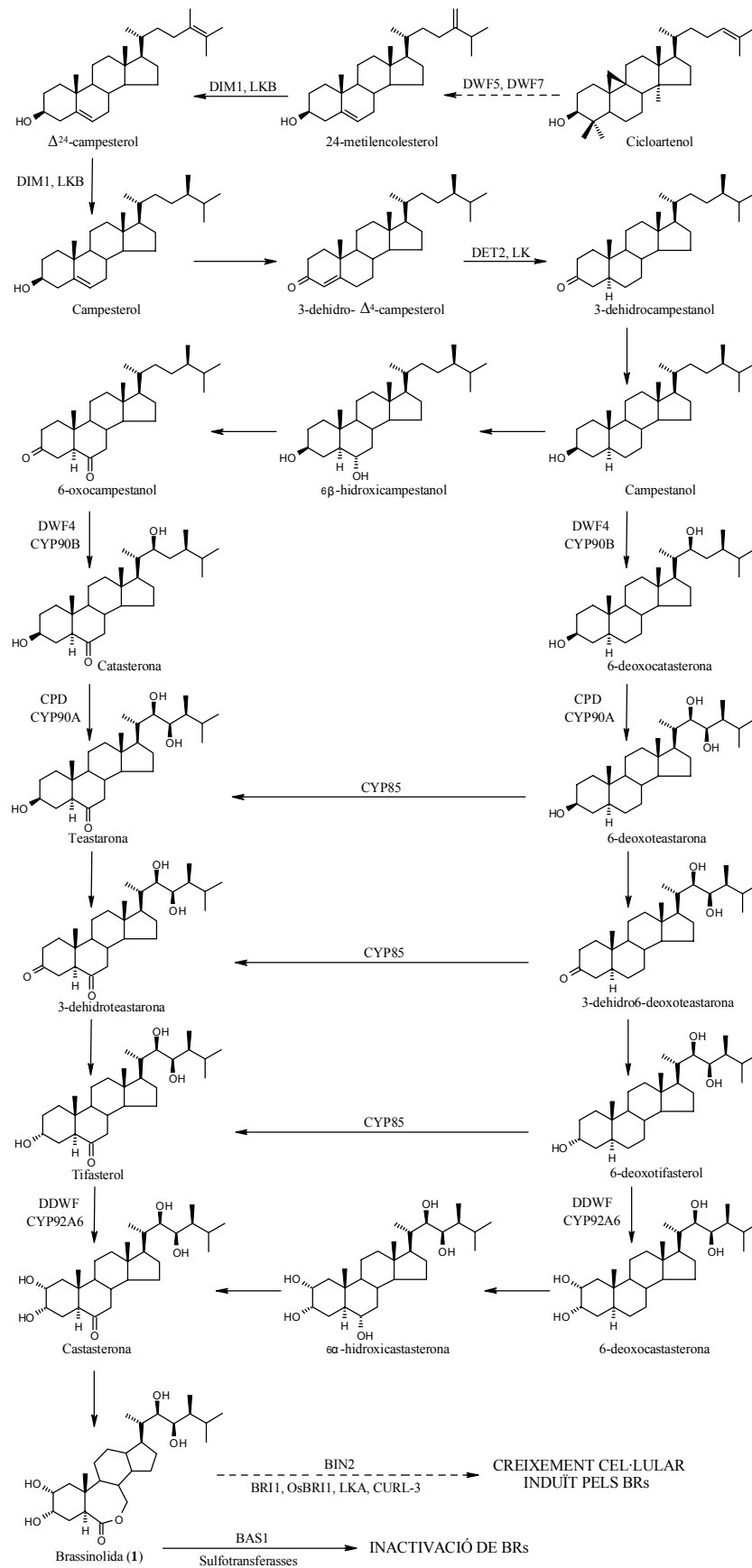
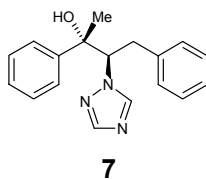
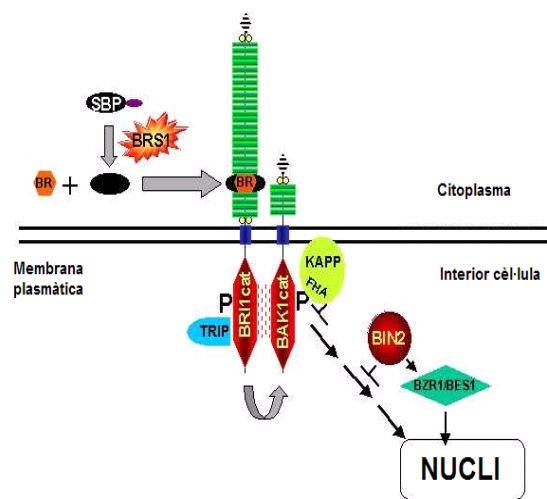


Figura 9. Esquema de la ruta biosintètica dels BRs. S'indiquen els mutants i els enzims inactivadors en cada pas.



**Figura 10.** Inhibidor específic de la biosíntesi de brassinoesteroides.



**Figura 11.** Model esquemàtic que indica el paper fonamental del BRI1 en la senyalització de brassinoesteroides.<sup>102</sup>

Tres línies donen suport a la idea que el BRI1 pot ser el receptor dels brassinoesteroides:<sup>103-105</sup>

- Els mutants *bri1* són morfològicament molt similars als mutants biosintètics de brassinoesteroides i no poden recuperar el seu fenotip natural quan s'apliquen BRs externament.<sup>92,93,99,100,106</sup>
- Quan s'expressa, en una suspensió cel·lular d'arròs, una proteïna que conté el domini extracel·lular de BRI1 i el domini quinassa citoplasmàtic de Xa21<sup>107-109</sup> (un gen resistent a certes malalties de la planta), s'observen múltiples respostes de defensa en el moment en que s'aplica brassinolida (1), suggerint que el domini extracel·lular del BRI1 és sensible als brassinoesteroides.<sup>110</sup>
- L'immunoprecipitat BRI1-GFP pot interaccionar amb la brassinolida (1).<sup>111</sup>

Per tant, donada la manca de coneixements sobre el receptor, tot i els treballs publicats més recentment sobre mutants i inhibidors de la biosíntesi de brassinoesteroides, els esforços per dirigir la síntesi de BRs cap a nous anàlegs amb una bona relació activitat-cost sintètic s'han de basar en l'estudi de relacions entre l'estructura d'aquestes fitohormones i la seva activitat en els diferents bioassaigs. Així doncs, no es poden realitzar estudis computacionals emprant les noves tècniques de *docking*<sup>112-116</sup> de proteïnes i és necessari recórrer a relacions estructura-activitat ja siguin de caire qualitatiu (SAR) o de caire quantitatiu (QSAR) comparant l'estructura de diferents molècules actives.

## 2.5.2. Relació entre l'estructura i l'activitat dels brassinoesteroides

### 2.5.2.1. Relacions qualitatives estructura-activitat (SAR)

Des de principis dels anys 80 s'han establert diferents relacions qualitatives entre l'estructura de BRs i l'activitat biològica que aquests han mostrat en diferents bioassaigs.<sup>68,70,117,118</sup> A partir dels estudis SAR realitzats s'ha postulat que els requisits estructurals per a que un BR presenti una alta activitat són:

- 1.-  $2\alpha,3\alpha$ -diol a l'anell A.
- 2.- 7-oxolactona és preferible a una 6-cetona a l'anell B.
- 3.- fusió *trans* entre els anells A i B.
- 4.- diol *cis* en  $C_{22}$ - $C_{23}$ , preferentment de configuració  $22R,23R$ .
- 5.- metil o etil en  $C_{24}$ .

Ara bé, en molts dels estudis SAR realitzats s'ha observat una gran dependència entre els valors d'activitat obtinguts i el mètode de bioassaig emprat. Junt amb aquest fet, s'ha observat que els resultats obtinguts en aquests estudis es troben condicionats pel conjunt de molècules utilitzat.

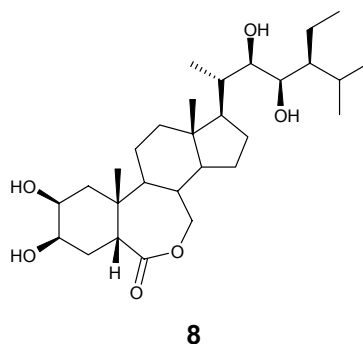
Un exemple el tenim en els treballs publicats per Takatsuto *et al.*,<sup>70</sup> que postulen que la funcionalitat  $22R,23R$ -diol és més important en el test del tomàquet o del rave que la trobada en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT), on les dues configuracions en *cis* d'aquest diol,  $22R,23R$  i  $22S,23S$ , són acceptades.<sup>118</sup>

Per altra banda, Yokota *et al.*<sup>119</sup> van concloure que els requeriments estructurals pels restes alquil en  $C_{24}$  són menys rigorosos quan s'empra el mètode d'inclinació de la làmina d'arròs. Ara bé, aquests mateixos autors accepten com a actius compostos amb substituents metil, etil, metilè o etilè en  $C_{24}$ , així com un metil en  $C_{25}$ , encara que l'activitat varia en un ampli marge que va de 5 a 300  $\mu\text{g/planta}$ .

Altres contradiccions trobades en els bioassaigs han estat descrites per L. Kohout *et al.*<sup>120</sup> l'any 1991 després de sintetitzar i avaluar, en el bioassaig del primer i segon internodi de la mongeta, alguns esters i amides del tipus androstà i colestà, i alguns inclús sense cadena lateral.<sup>70,117,119,120</sup> Mentre alguns d'ells presenten una gran activitat en el bioassaig del segon internodi de la mongeta, la seva activitat en el bioassaig del primer internodi va resultar marginal. El comportament front a l'activitat d'altres anàlegs BRs es va demostrar que també era contrària en aquests dos bioassaigs, apreciament la dificultat de definir l'especificitat de la seva acció hormonal.

En conclusió, els diferents SAR descrits en la literatura i les contradiccions que es troben en aquests revelen la poca solidesa de les seves propostes respecte als requeriments estructurals per a que un BR presenti alta activitat. Brosa *et al.*<sup>72</sup> varen mostrar, a través d'una anàlisi detallat de l'estructura d'un petit conjunt d'anàlegs BRs amb poques modificacions estructurals, que els resultats obtinguts en els diferents SAR emprats no són generals des de dos punts de vista:

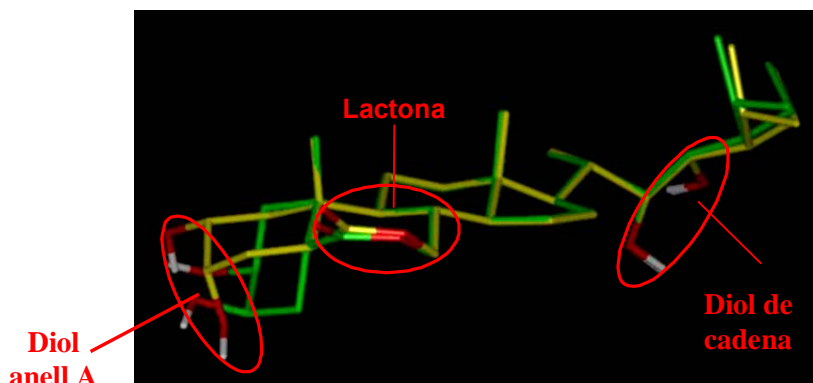
- En primer lloc, els grups funcionals dels brassinoesteroides no haurien de ser considerats independentment tal i com s'ha fet en els diferents estudis de SAR realitzats, doncs s'ha trobat que les funcionalitats estan estretament lligades entre elles.
- En segon lloc, els requeriments postulats limiten el marge d'aplicabilitat a les funcionalitats implicades en el conjunt de BRs assajat. Així, si bé des d'un principi es van fixar com a requeriment estructural una fusió A/B *trans* i un  $2\alpha,3\alpha$ -diol, no s'havia avaluat encara cap brassinoesteroide amb aquestes funcionalitats oposades. Brosa *et al.* varen sintetitzar compostos d'aquest tipus.<sup>121,122</sup> Obtingueren un valor d'activitat molt alt pel compost **8**, que presenta alhora un  $2\beta,3\beta$ -diol i una fusió A/B *cis* (**Figura 12**).



**Figura 12.** Brassinoesteroide sintètic amb un 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -diol a l'anell A i una fusió A/B *cis*.

Aquest resultat posa de manifest que l'activitat d'un brassinoesteroide està íntimament relacionada amb l'estructura tridimensional de la molècula, és a dir, amb la disposició global de tot el conjunt dels grups funcionals presents en la molècula i no únicament de la manca o presència de certes funcionalitats. A pesar de que el conjunt de característiques estructurals descrites amb anterioritat a la literatura són les que, en general, presenten els BRs més actius, no es poden considerar per separat. Aquest fet es pot corroborar a través de la comparació entre les estructures **2** i **8**. Aquests dos compostos només difereixen en l'estereoquímica del diol de l'anell A i en la fusió A/B. L'activitat mesurada per **2** amb el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT) és de 3.32. S'observa com **2** presenta tots els requisits que en els estudis SAR realitzats s'havien postulat com els necessaris per desencadenar una alta activitat. Ara bé, tot i que **8** no els presenta, ja que té un 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -diol i una fusió A/B *cis*, presenta un valor d'activitat en el RLIT força elevat, de 2.49.<sup>72,123</sup>

Una explicació intuïtiva de l'alta activitat mostrada per **8** es troba en la superposició tridimensional de les dues molècules (**Figura 13**). En ella s'observa com, tot i que les dues molècules mostren les diferències estructurals esmentades, les seves funcionalitats presenten una distribució espacial tal que queden situades, les unes de les altres, en zones properes de l'espai. Així, s'observa com el 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -diol de **8**, en verd, se situa en una zona molt pròxima al 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -diol de **2**, en groc. S'observa així mateix com les altres funcionalitats polars, la lactona i el diol a 22*R*,23*R*, se solapen molt bé, tot i presentar **8** una fusió A/B *cis*. Així, la correcta superposició en l'espai de totes les funcionalitats dels dos compostos explica l'activitat semblant que presenten.



**Figura 13.** Superposició dels brassinoesteroides **2** (en groc) i **8** (en verd).

Degut a la feblesa dels requeriments postulats a la literatura per obtenir una alta activitat brassinoesteroide, en el laboratori d'Esteroides de l'Institut Químic de Sarrià (IQS) s'ha desenvolupat una metodologia per

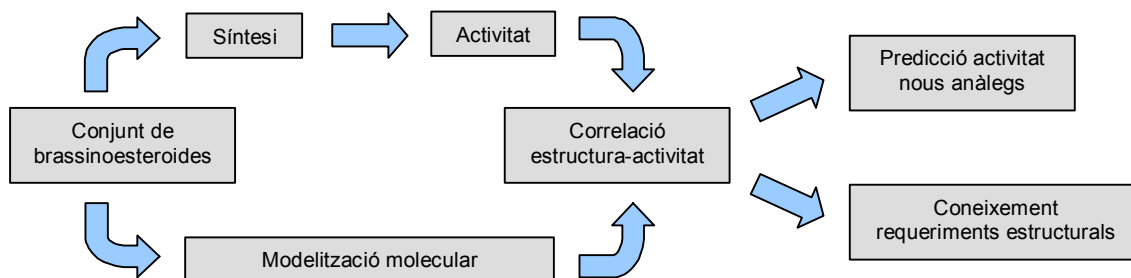


estudiar les relacions entre l'estructura i l'activitat d'un brassinoesteroide tenint en compte l'estructura tridimensional de la molècula. Aquesta ha permès l'obtenció d'un bon model de relació quantitativa estructura-activitat (QSAR) a través de tècniques de modelització molecular.<sup>72</sup>

### 2.5.2.2. Relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR)

L'objectiu final d'aquest estudi és establir una correlació quantitativa estructura-activitat (QSAR)<sup>124-127</sup> que permeti, per una banda, dirigir la síntesi de BRs cap a nous anàlegs amb una bona relació activitat-cost sintètic, amb vistes a una posterior aplicació a l'agricultura i, per altra, aprofundir en el coneixement del receptor a través de l'estudi sobre els requisits estructurals necessaris per a que el brassinoesteroide presenti activitat.

Cal recordar que no es coneix l'estructura del receptor dels brassinoesteroides, i per tant, de moment no es poden emprar mètodes directes, basats en la modelització d'aquest. Cal recórrer així a mètodes indirectes, que es basen en obtenir informació a partir de la comparació entre sí de l'estructura d'un conjunt de substrats del receptor d'activitat coneguda (**Figura 14**).<sup>128</sup>



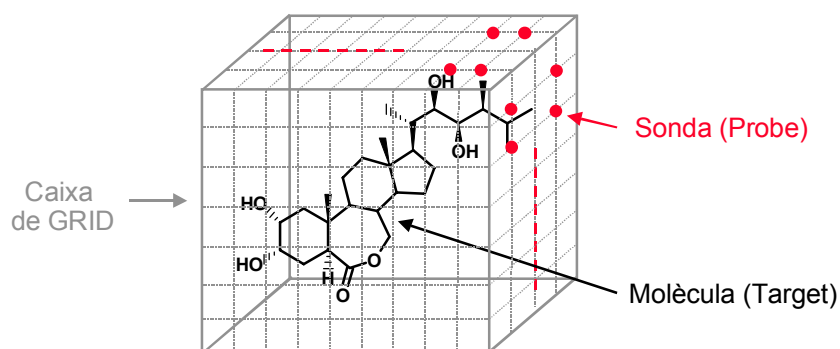
**Figura 14.** Esquema a seguir per obtenir informació del receptor mitjançant mètodes indirectes.

Es proposa un conjunt o *set* de BRs d'estructura el més diversa possible per a obtenir un model representatiu d'aquesta família de compostos. Aquests se sintetitzen i se n'obtenen dades d'activitat a través del test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT).<sup>71,72</sup> Paral·lelament, es realitza la modelització molecular del *set* de BRs i se'n calculen descriptors a partir de la seva estructura. A través de la correlació dels valors obtinguts pels descriptors del conjunt de compostos amb les corresponents dades d'activitat es pot obtenir un model de QSAR.

Tal com s'ha comentat, amb aquest model es poden assolir dos objectius. Per una banda, es pot obtenir informació sobre el lloc d'unió del receptor, i per l'altra, es pot predir l'activitat d'un nou brassinoesteroide que no s'hagi emprat per elaborar el model. En aquest sentit, si el nou BR plantejat presenta característiques interessants se'n realitza la modelització molecular i se'n calcula el valor del descriptor anteriorment emprat per elaborar el model, que s'interpol·la en el model de QSAR per rendir un valor d'activitat teòric. Si es creu adient, a continuació es procedeix a la seva síntesi i se n'avalua l'activitat biològica. El valor d'activitat teòric obtingut es compara amb el valor experimental de bioactivitat mesurat. Si els dos valors són equivalents es pot optar per incloure aquest nou compost en el model de QSAR. En tot cas, aquest fet permet validar el model de QSAR obtingut. Si els dos valors difereixen prou significativament, caldrà replantejar convenientment les premisses a través de les quals s'ha elaborat el model de QSAR existent.

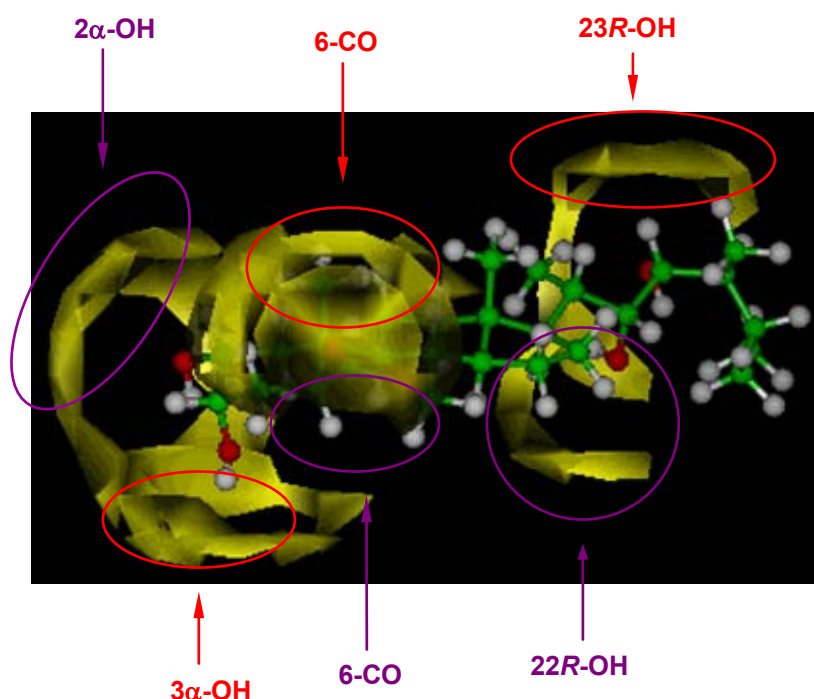
La tècnica de modelització molecular que ha donat resultats més bons a l'equip és la metodologia GRID.<sup>129-131</sup> Aquesta tècnica consisteix en situar la molècula d'estudi, amb una conformació determinada, a l'interior d'una malla tridimensional definida per punts distribuïts uniformement a través de l'espai. A continuació, es calcula l'energia d'interacció de la molècula d'estudi amb una sonda en cada un dels punts de la malla, recorrent així tot l'espai tridimensional (**Figura 15**). Aquesta sonda correspon, en funció del tipus d'interacció que es desitgi estudiar, a una molècula d'aigua, un reste metil... A partir d'aquest càlcul s'obtenen camps d'interacció molecular (MIF),<sup>132</sup> la representació gràfica dels punts de la malla on l'energia d'interacció entre la sonda i la molècula d'estudi pren un valor determinat.

En l'equip, els MIF que més s'han estudiat i que han proporcionat millors resultats són els que s'obtenen emprant la sonda d'aigua i utilitzant una energia d'interacció de  $-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .<sup>131</sup> La sonda d'aigua és una molècula donadora i acceptora de pont d'hidrogen. Així, indica aquelles regions de l'espai amb una alta probabilitat d'interaccionar a través de punts d'hidrogen.



**Figura 15.** Malla tridimensional (GRID) emprada per al càlcul de descriptors.

A la **Figura 16** es mostra el MIF per la brassinolida (**1**) per una energia d'interacció inferior a  $-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  emprant una sonda d'aigua. Així, les àrees representades en groc corresponen a aquelles regions de l'espai amb una alta probabilitat de formar punts d'hidrogen.



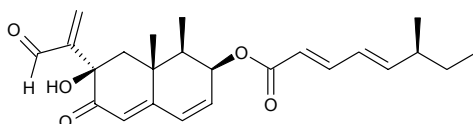
**Figura 16.** Mapa de GRID de la brassinolida (**1**) a  $-3 \text{ kcal/mol}$  utilitzant la sonda d'aigua.

A través d'un estudi comparatiu dels mapes de GRID realitzat entre la brassinolida (1) i uns 20 anàlegs BRs s'ha postulat que les zones que es creuen més importants per tal que un brassinoesteroide expressi activitat (en color vermell) són les zones corresponents als hidroxils en C<sub>3</sub> i en C<sub>23</sub> i la zona corresponent a la part alta del carbonil lactònic. Per altra banda, es creu que les zones que no tenen un paper tan important en l'activitat (en color lila) són les zones corresponents als hidroxils en C<sub>2</sub> i en C<sub>22</sub> i la zona corresponent a la part baixa del carbonil lactònic.

### 3. El KM-01 (9): un inhibidor de l'activitat brassinoesteroide

#### 3.1. Aïllament i activitat biològica del KM-01 (9)

Durant la recerca de substàncies anàlogues a BRs procedents de fongs, Kim *et al.*<sup>133,134</sup> descobriren que els fongs *Drechslera avenae* i *Pycnoporus coccineus* causaven una inhibició significativa en la inclinació de la làmina d'arròs induïda per la brassinolida (1). Aquests autors, interessats per aquesta nova activitat inhibidora i pel fet que el coneixement de la substància causant d'aquest efecte podria aportar informació sobre les característiques dels brassinoesteroides per desencadenar activitat, aïllaren i elucidaren l'estructura del primer inhibidor conegut de la brassinolida (1): el KM-01 (9).



9

Figura 17. El KM-01 (9), inhibidor de l'activitat brassinoesteroide.

L'activitat d'aquest compost va ser primerament avaluada en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT) i en el test del rave. El compost no va mostrar activitat quan es va aplicar sol en els dos bioassaigs. En canvi, la coaplicació amb la brassinolida (1) en els dos tests va proporcionar valors d'activitat molt inferiors als obtinguts quan 1 és aplicada sola. En el test del rave, l'elongació de l'hipocòtil del rave va disminuir dràsticament, i en el RLIT no es va observar angle d'inclinació de la làmina d'arròs. Per altra banda, el KM-01 (9) no va mostrar efecte inhibidor en l'activitat d'auxines, citoquinines i de l'etilè. Però va mostrar un efecte sinèrgic amb gibberel·lines (GA<sub>3</sub>) i un efecte inhibidor amb l'àcid abscísic (ABA).<sup>135</sup>

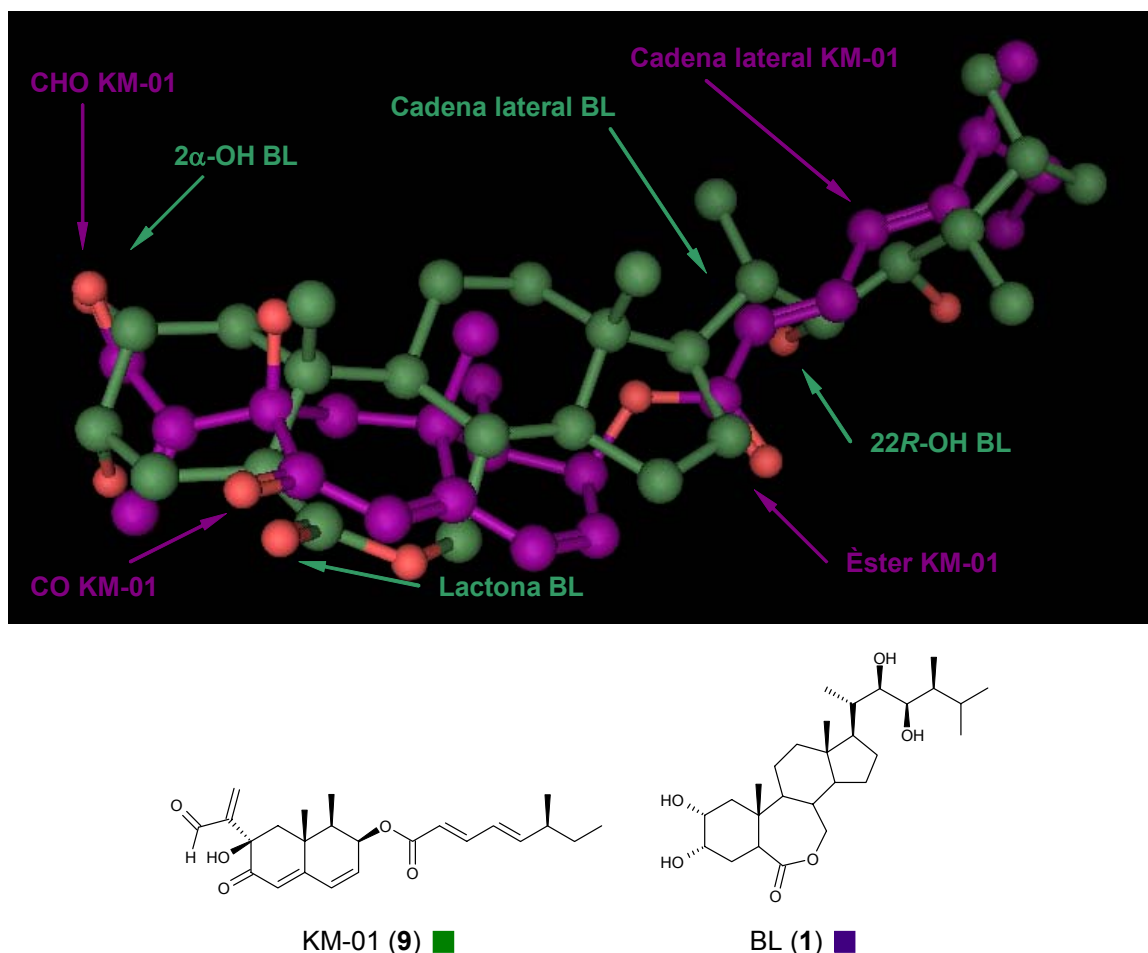
Atenent aquests resultats i seguint la línia de recerca de les característiques estructurals per a que un brassinoesteroide presenti activitat, l'equip trobà interessant fer un estudi a nivell estructural del KM-01 (9).

#### 3.2. Estudi a nivell estructural del KM-01 (9)

El mecanisme d'inhibició del KM-01 (9) és desconegut. A l'equip es va plantejar la hipòtesi que aquest mecanisme es podria donar per antagonisme, és a dir, per un bloqueig competitiu del lloc d'unió del receptor dels BRs. Aquesta hipòtesi implica que el KM-01 (9) i la brassinolida (1) han de compartir algunes característiques estructurals i electrostàtiques. Així, l'equip va trobar interessant realitzar un estudi comparatiu entre l'estructura i les propietats del KM-01 (9) i la brassinolida (1).<sup>72,131</sup> A partir d'aquesta comparació, sempre sota el supòsit que els brassinoesteroides i el KM-01 (9) s'unissin en el mateix lloc d'unió del receptor i interaccionessin pels mateixos punts, es podrien obtenir els requisits estructurals necessaris per a que un brassinoesteroide desencadenés activitat (requisits que presentaria 1 però no 9). Aquesta informació podria ser aplicada posteriorment per a la síntesi de nous anàlegs.

L'estudi comparatiu es va iniciar amb la recerca de la conformació de 9 més semblant a la conformació activa de 1. Es va determinar que els dos compostos presentaven una gran similitud en la distribució de càrregues electrostàtiques, però que alhora presentaven diferències geomètriques importants.

A la **Figura 18** es representa la superposició de la brassinolida (**1**) (en verd) amb el KM-01 (**9**) (en lila). S'observa com, tot i que les estructures dels dos compostos són diferents, presenten peculiaritats estructurals que se solapen considerablement bé.



**Figura 18.** Superposició entre la brassinolida (**1**) (en lila) i el KM-01 (**9**) (en verd).

Així doncs, a partir de l'observació d'aquesta figura es poden realitzar les següents consideracions:

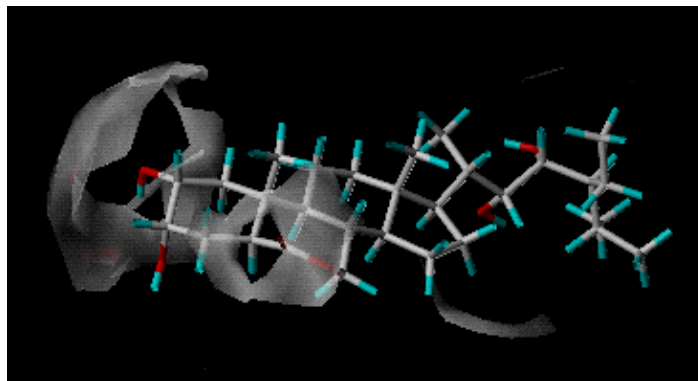
- El grup aldehídic de **9** coincideix amb l'orientació del 2 $\alpha$ -hidroxil de **1**.
- El grup cetònic de **9** se situa proper al carbonil de la lactona de **1**.
- El carbonil de l'èster de **9** s'orienta cap a la posició del 22*R*-hidroxil de **1**.
- La cadena lateral de **9** s'acosta a la de **1**.

Aquest estudi es va complementar amb un estudi de selectivitat d'interaccions. Aquesta metodologia, desenvolupada per Cruciani i Goodford,<sup>136,137</sup> s'ha emprat per corroborar les observacions obtingudes de la superposició a la **Figura 18**. El procediment consisteix en avaluar la interacció entre una molècula i diferents sondes, seguida d'una anàlisi de components principals. Per aquest estudi, s'empraren sondes per descriure interaccions hidrofòbiques, estèriques, electrostàtiques i per pont d'hidrogen.

Així, un estudi de selectivitat d'interaccions dels dos compostos indicarà les zones d'interacció comunes als dos compostos i les zones d'interacció pròpies de cada un d'ells.

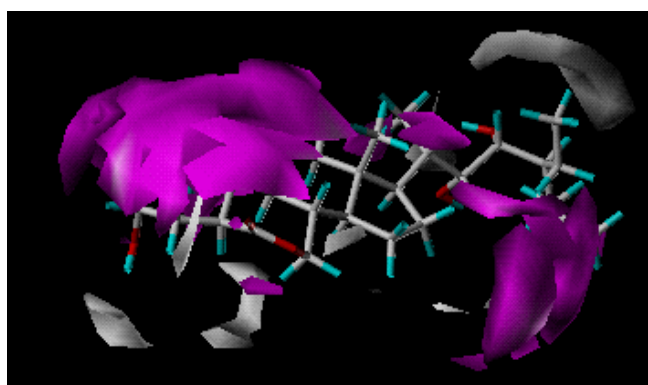
A la **Figura 19** s'observen les zones d'interacció fortes i no específiques per la brassinolida (**1**) i el KM-01 (**9**)

projectades sobre l'estructura de **1**. Aquestes zones corresponen a regions properes a la part baixa del carbonil lactònic de l'anell B, al 2 $\alpha$ -hidroxil de l'anell A i al 22*R*-hidroxil. Aquestes àrees comunes no són essencials per desencadenar activitat ja que les presenta tant una molècula activa (**1**) com una molècula inhibidora (**9**).



**Figura 19.** Zones d'interacció fortes i no específiques per la brassinolida (**1**) i el KM-01 (**9**) (en gris).

Per altra banda, a la **Figura 20** es mostra la superposició de les zones d'interaccions fortes i específiques per la brassinolida (**1**) (en gris) i pel KM-01 (**9**) (en lila) projectades sobre l'estructura de **1**. Les zones d'interacció de color gris mostren les regions d'interacció forta pròpies de **1** i que no posseeix **9**. Aquestes corresponen a regions properes al 3 $\alpha$ -hidroxil de l'anell A, al 23*R*-hidroxil de la cadena, a una part de l'extrem alifàtic de la cadena i a la part alta del carbonil lactònic de l'anell B, tot i que a la **Figura 20** aquesta darrera regió no s'aprecia ja que es troba tapada per una regió lila corresponent a **9**, que es troba situada en un pla superior. Aquestes zones d'interacció forta i específica de la brassinolida (**1**) serien així el tret diferencial estructural que permetria el desencadenament d'activitat biològica.



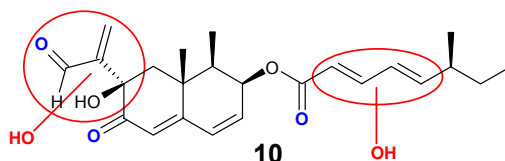
**Figura 20.** Zones d'interacció fortes i específiques per a la brassinolida (**1**) (en gris) i el KM-01 (**9**) (en rosa).

Cal remarcar que els resultats obtinguts en l'estudi de selectivitat d'interaccions realitzat coincideixen amb els resultats previs obtinguts en l'equip a partir d'aplicar la metodologia GRID a brassinoesteroides, els resultats dels quals s'han il·lustrat a la **Figura 16**.

## 4. Mimètics del KM-01 (9) amb activitat brassinoesteroide

### 4.1. Disseny de nous anàlegs

Un cop realitzat aquest estudi teòric del KM-01 (9), l'equip considerà interessant, per tal de confirmar els resultats obtinguts i obtenir més informació de la unió d'un brassinoesteroide amb el seu receptor, sintetitzar i avaluar l'activitat d'anàlegs del KM-01 (9). Aquests, a més de posseir les característiques estructurals comunes amb la brassinolida (1), incorporarien també els grups funcionals que els manquen per desencadenar activitat com a reguladors del creixement vegetal. Amb aquesta finalitat, es plantejà el disseny de noves molècules l'estructura general de les quals (10) es mostra en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Estructura general d'un mimètic del KM-01 (9) amb possible activitat brassinoesteroide.

L'estructura **10** manté els grups funcionals postulats que se solapaven, en la **Figura 18**, força bé amb els de la brassinolida (1) (en blau). Així mateix, incorpora dues noves funcionalitats en zones estratègiques per tal que aquestes desenvolupin les interaccions amb el receptor, que es creu que són les que li manquen per desencadenar activitat. Fent referència als resultats il·lustrats en la **Figura 18**, es suggereix que les dues noves funcionalitats (en roig) haurien de mimetitzar els hidroxils 3 $\alpha$  i 23R de la brassinolida (1).

Així, en el grup d'Esteroides es va decidir iniciar una línia de recerca per intentar dissenyar, sintetitzar i avaluar estructures del tipus **10**, mimètics de **9** amb possible activitat brassinoesteroide.

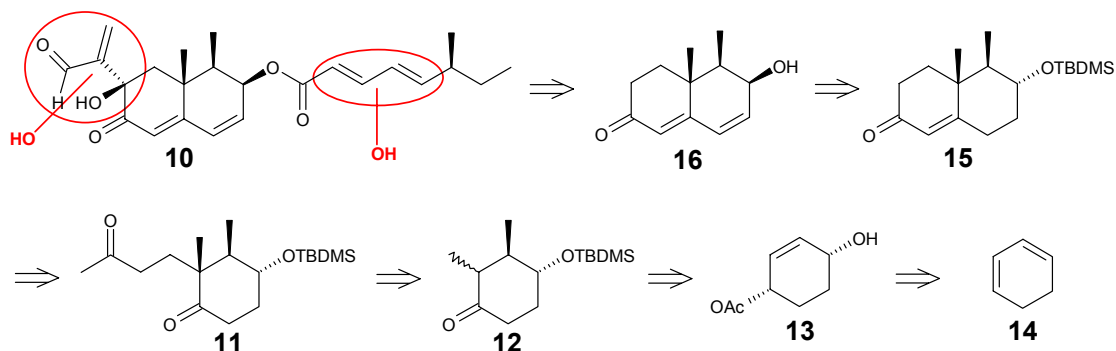
### 4.2. Síntesi de mimètics del KM-01 (9)

En la bibliografia es va observar que l'obtenció d'un sintó de partida per abordar la síntesi parcial d'un mimètic del KM-01 (9) era molt costosa i laboriosa. Per tant, es va optar, en un primer moment, per intentar abordar la síntesi total.<sup>138</sup> L'estructura **10** és força complexa i la presència de cinc centres estereogènics dificulta enormement la seva síntesi. A més, l'absència de sintons comercials que presentin ja l'estereoquímica desitjada fa que l'estratègia sintètica sigui considerablement llarga. Aquesta fou la raó per la qual el primer objectiu de l'equip en aquest terreny va centrar-se en el disseny sintètic de l'intermedi **15**.

En la **Figura 22** es presenta l'anàlisi retrosintètic mitjançant el qual es pot arribar a sintetitzar una estructura del tipus **10**. En ella s'observa que l'estructura d'interès es pot obtenir a partir de l'intermedi **15** únicament afegint un doble enllaç conjugat a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, invertint l'estereoquímica del centre quiral que suporta l'hidroxil protegit i, finalment, ancorant les dues cadenes presents a **10**. Per una banda, s'hi pot unir l'àcid carboxílic corresponent per esterificació en C<sub>8</sub>. Per altra banda, la unió de la cadena en C<sub>2</sub> és viable donada la seva posició en  $\alpha$  de carbonil.

Malauradament, el rendiment global d'obtenció de **15** va ser només del 4% i el nombre d'etapes sintètiques (12) força elevat. Tenint en compte que l'intermedi **15** encara ha de ser posteriorment funcionalitzat per a l'obtenció d'un mimètic del KM-01 (9) amb una estructura del tipus **10**, és previsible que una estratègia de

síntesi total sigui molt llarga i costosa. Per tant, es va creure convenient, en aquesta tesi, assajar l'alternativa de la síntesi parcial. Però cal tenir en compte la gran importància de conèixer prèviament l'estructura de la molècula objectiu **10**. Segons la disposició dels grups funcionals a introduir la seva síntesi pot variar molt i per això, es creu necessari realitzar un estudi computacional.



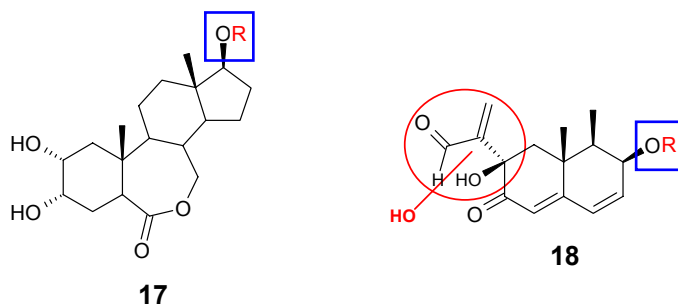
**Figura 22.** Anàlisi retrosintètic per a la síntesi de **10**.

Per tant, per sintetitzar anàlegs del KM-01 (**9**) prèviament s'analitzaran bibliogràficament els possibles sintons de partida i, paral·lelament, se seleccionarà per tècniques de química computacional els mimètics més semblants a la brassinolida (**1**).

### 4.3. Estudi computacional

L'estudi pretén avaluar quines són les posicions òptimes de **10** on situar els nous grups funcionals, així com les seves configuracions, per tal que la seva estructura tridimensional sigui el més similar possible a la de la brassinolida (**1**). És d'esperar que, com més gran sigui aquesta similitud, més gran serà l'activitat de la molècula en estudi.

En aquest estudi es pretén analitzar, a part de les estructures del tipus **10**, la seva cadena lateral per separat ja que es tracta d'un àcid carboxílic, molècula molt versàtil donat que pot ancorar-se per esterificació o amidació en múltiples esquelets d'estructura completament diferent als brassinoesteroides. Aquestes estructures únicament han de complir el requisit de presentar un hidroxil (requadrat en blau) en la seva estructura on poder ancorar la cadena lateral, incloent-hi esquelets anàlegs al del KM-01 (**9**) i els androstats (**Figura 23**).



**Figura 23.** Estructura de l'esquelet d'androstà (**17**) i d'anàlegs de **9** (**18**).

D'aquesta manera, es pretén estudiar computacionalment totes les possibles cadenes laterals d'àcids carboxílics comercials. A continuació, mitjançant una anàlisi de similitud entre aquests i les dues cadenes



laterals dels dos brassinoesteroides més actius<sup>16,19</sup> (brassinolida (1) i homobrassinolida (2)), poder establir una escala de prioritats d'àcids comercials per tal de saber quins d'aquests són els més adequats per ancorar en esquelets i disposar de mimètics no-esteroidals actius.

Actualment ja s'està treballant amb androstans en col·laboració amb el grup de L. Kohout de l'Institut de Química Orgànica i Bioquímica de l'Acadèmia de Ciències de la República Txeca. Aquestes molècules difereixen en la cadena lateral dels BRs usuals i permeten aprofundir en els requisits estructurals mínims d'un BR per a que desencadeni activitat. En l'equip ja es van estudiar una sèrie de  $\alpha$ -hidroxiàcids i *D*- $\alpha$ -aminoàcids comercials per modelització<sup>130</sup> que, en ancorar-los a l'esquelet androstànic, la seva activitat va resultar baixa (inferior a 1.00). Per aquesta raó, es creu interessant també realitzar el mencionat estudi computacional de les cadenes laterals d'àcids comercials ja que es creu que poden ajudar a definir quines són les cadenes laterals idònies per a anàlegs androstànics.

A més, cal mencionar que la metodologia emprada en aquest estudi també s'utilitzarà per obtenir més informació de les característiques estructurals necessàries per a que un substrat s'ancori en el receptor dels brassinoesteroides. Doncs, s'aplicarà a l'estudi d'inhibidors de l'acció brassinoesteroide (apartat 6.4.2 de l'estudi computacional) i fins i tot a un conjunt de mimètics no-esteroidals sintetitzats per Back *et al.*<sup>139</sup> (apartat 8 de l'estudi computacional).

Un cop definides les molècules més semblants a 1, obtingudes en aquest estudi computacional, es pretén abordar la seva síntesi.

## **OBJECTIUS**

---

## OBJECTIUS

Tenint en compte el que s'ha exposat anteriorment, els objectius d'aquest treball són:

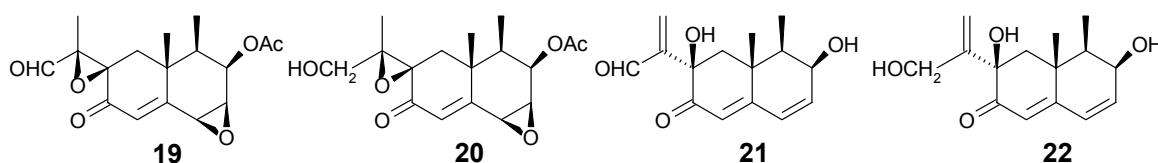
- Obtenció d'un producte de partida que permeti sintetitzar anàlegs del KM-01(9).
- Realització d'un estudi computacional per a fixar l'estructura de l'anàleg **10** del KM-01 (9). És a dir, determinar les posicions idònies del KM-01 (9) on situar els nous grups funcionals a introduir per tal d'obtenir un anàleg que pugui desencadenar activitat brassinoesteroide.
- Validació i aplicació d'una nova metodologia (SHOP) que s'emprarà per a seleccionar els àcids carboxílics comercials més semblants a la cadena lateral dels brassinoesteroides més actius (**1** i **2**).
- Estudi de l'estructura dels mimètics no-esteroidals de Thomas Back per obtenir més informació de l'estructura dels substrats que s'ancoren al receptor dels brassinoesteroides.
- Síntesi d'anàlegs del KM-01 (9).
- Elaboració d'un bioassaig per determinar la capacitat dels brassinoesteroides a l'hora de superar condicions d'estrès.

## **CAPÍTOL 1: OBTENCIÓ D'UN PRODUCTE DE PARTIDA**

## CAPÍTOL 1: OBTENCIÓ D'UN PRODUCTE DE PARTIDA

### 1. Elecció d'un producte de partida

En la recerca bibliogràfica per a la búsqueda d'estructures similars al KM-01 (**9**) es trobaren alguns sesquiterpens eremofilans aïllats de fongs (**Figura 24**) que, per les seves característiques estructurals, podien resultar vàlids per a la síntesi de mimètics amb una estructura del tipus **10**. Una condició important que han de complir aquests sesquiterpens és que puguin aïllar -se en quantitats suficients com per poder dur a terme les transformacions sintètiques posteriors.



**Figura 24.** Sesquiterpens eremofilànics d'origen fúngic útils per a emprar-los com a producte de partida per a la síntesi de mimètics del KM-01 (**9**).

Es plantejà, doncs, la possibilitat d'aïllar directament algun d'aquests productes del fong corresponent, evitant així un gran nombre de passos sintètics per a la construcció enantioselectiva de l'esquelet. Els productes més interessants i vàlids que es trobaren com a sintó de partida foren, a part del mateix KM-01 (**9**), la PR toxina (**19**), l'eremofortina C (**20**), la bipolaroxina (**21**) i la dihidrobipolaroxina (**22**).

#### 1.1. KM-01 (**9**)

Per una banda, existeix la possibilitat d'obtenir directament el KM-01 (**9**) de la *Drechslera avenae* o del *Pycnoporus coccineus* reproduint els treballs de Kim *et al.*<sup>133</sup> En els primers treballs d'aquest grup només s'obtenen 0.8 mg/l de KM-01 (**9**) en cultius de *Drechslera avenae*, però en posteriors modificacions de la metodologia de treball<sup>134</sup> arriben a aïllar fins a 20.4 mg/l. També estudiaren la influència de la llum en la producció de la toxina, determinant que les millors condicions són sota obscuritat i sota llum ultraviolada, sent aquesta segona lleugerament superior. Però també s'observà que el KM-01 (**9**) presentava inestabilitat en medi àcid.

Per una altra banda, Watanabe *et al.*<sup>140</sup> també aïllaren, el 1995, el KM-01 (**9**) d'un cultiu de *Bipolaris* sp. Aquests autors arribaren a aïllar fins a 50 mg de **9** per litre del medi de cultiu del *Bipolaris* sp.

El 1996 Lim<sup>141</sup> produí 31.4 mg de **9** després de cultivar el fong *Bipolaris cynodontis* en 1000 plaques Petri de 9 cm de diàmetre, en medi d'agar de dextrosa i patata a 26 °C durant 14 dies.

L'obtenció del KM-01 (**9**) permetria posar a punt un bioassaig per determinar si un compost és inhibidor de l'acció biològica dels brassinoesteroides. A més, amb una sola reacció d'hidròlisi, es podria obtenir tant l'esquelet eremofilànic d'aquest, ideal per ancorar-hi cadenes laterals amb funcionalitats polars per a disposar de mimètics amb possible activitat brassinoesteroide, com la cadena lateral d'aquest, per a sintetitzar inhibidors de l'acció biològica de la brassinolida (**1**) que podrien ajudar a entendre la seva interacció amb el receptor (**Figura 25**).

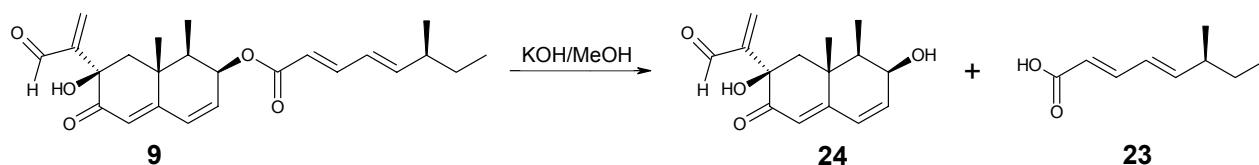


Figura 25. Tractament de KM-01 (**9**) amb medi bàsic metanòlic.

## 1.2. Bipolaroxina (**21**) i dihidrobipolaroxina (**22**)

El sesquiterpè bipolaroxina (**21**) és un metabòlit fitotòxic aïllat del fong *Bipolaris cynodontis*, patògen natural de l'herba tipus Bermuda (*Cynodon dactylon* (L.)), una mala herba a la que se li marceixen les fulles en presència d'aquest fong.<sup>142</sup> Es creu que es tracta del sistema hidroxienal de **21** qui li confereix aquesta fitotoxicitat a la molècula.

Després de cultivar el fong *Bipolaris cynodontis* en un medi agitat a 90 rpm a 26 °C, mitjançant l'extracció del medi de cultiu amb acetat d'etil i la posterior purificació cromatogràfica, Sugawara *et al.* únicament aïllaren 1-2 mg de producte per litre de medi de cultiu.<sup>142,143</sup>

Un segon sesquiterpè aïllat del fong *Bipolaris cynodontis*, mitjançant el mateix procediment que la bipolaroxina (**21**), és la dihidrobipolaroxina (**22**). A pesar de que es tracta d'una molècula que no presenta caràcter fitotòxic (manca del sistema hidroxienal), l'aïllament d'aquest sesquiterpè resulta encara més costós que en el cas anterior ja que en la literatura únicament s'aconsegueixen 0.3-0.6 mg de producte per litre de medi de cultiu.<sup>142</sup>

## 1.3. PR toxina (**19**) i eremofortina C (**20**)

La PR toxina (**19**) i l'eremofortina C (**20**) són metabòlits secundaris de l'espècie fúngica *Penicillium roquefortii*.<sup>144</sup>

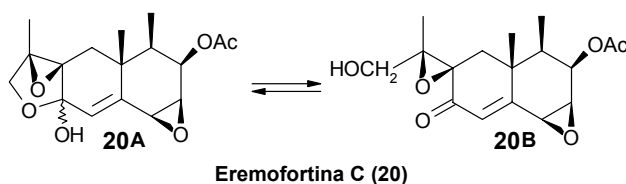
La PR toxina (**19**) fou aïllada l'any 1973 per Wei *et al.*<sup>145</sup> i, dos anys més tard, els mateixos autors caracteritzaren la seva estructura i descriueren la seva activitat biològica.<sup>146</sup> Els mateixos autors<sup>147,148</sup> descriuen, l'any 1991, les condicions més adequades trobades fins al moment per a la producció màxima de **19** i **20**. Per al mateix fong, la soca utilitzada que dona un nivell més alt d'aquests productes és l'ATCC 48936, adquirida de l'American Type Collection Culture (ATCC). El medi de cultiu estava format inicialment per aigua desmineralitzada, amb un 2% d'extracte de llevat i un 15% de sacarosa. Sota aquestes condicions, la producció de PR toxina (**19**) era d'uns 80 mg per litre de medi de cultiu i d'uns 100 mg per litre de medi de cultiu d'eremofortina C (**20**). S'observà que, si es complementava amb un 60% de cereals i es disminuïa la sacarosa fins un 7.5% i l'extracte de llevat fins un 1%, s'aconseguia augmentar considerablement la producció tant de **19** com de **20**. Sota aquestes noves condicions, la producció de PR toxina (**19**) i d'eremofortina C (**20**) fou d'uns 800-900 mg/l i uns 1200 mg/l, respectivament. La incubació del fong té lloc durant 14 dies a una temperatura de 24 °C en un sistema estacionari. L'aïllament dels metabòlits d'interès es realitza per extracció amb cloroform i posterior purificació amb diverses columnes cromatogràfiques.<sup>145</sup>

Si es posa atenció en l'estructura dels possibles candidats que poden ser emprats com a productes de

partida per a la síntesi d'anàlegs del KM-01 (**9**), s'observa que les molècules que més s'hi assemblen són, a part de la mateixa estructura de **9**, la bipolaroxina (**21**) i la dihidrobipolaroxina (**22**). La bipolaroxina (**21**) és directament l'esquelet del KM-01 (**9**) i la dihidrobipolaroxina (**22**) és fàcilment convertible en **21** oxidant el seu hidroxil per rendir l'aldehid corresponent. Tot i així, aquestes molècules no resulten ser bons candidats ja que únicament es poden aïllar del medi de cultiu del fong *Bipolaris cynodontis* en quantitats inferiors a 2 mg de producte per litre de medi de cultiu. El mateix succeeix amb el KM-01 (**9**) ja que també s'aïlla en quantitats similars a les de **21** i **22**.

En conseqüència, els productes naturals escollits com a producte de partida per a la síntesi d'estructures del tipus **10** foren la PR toxina (**19**) i l'eremofortina C (**20**). Tot i així, com es veurà més endavant no es va descartar intentar aïllar els metabòlits **9**, **21** i **22** del fong corresponent.

Tant la PR toxina (**19**) com l'eremofortina C (**20**) es poden emprar, en principi, com a productes de partida ja que únicament difereixen entre ells en una funcionalitat fàcilment interconvertible: mentre el primer presenta un grup aldehid a l'extrem de la cadena, el segon presenta un grup hidroxil. Però **19** resulta més interessant que no pas **20** ja que aquest darrer presenta dues estructures en equilibri (la forma ciclada (**20A**) i la no ciclada (**20B**)) (**Figura 26**) que en dificultarien la detecció i aïllament. De totes maneres, l'eremofortina C (**20**) resulta igualment interessant aïllar-la perquè pot convertir-se a PR toxina (**19**), augmentant així el rendiment global d'obtenció de **19**.<sup>149-151</sup>



**Figura 26.** Equilibri de l'eremofilà eremofortina C (**20**).<sup>152</sup>

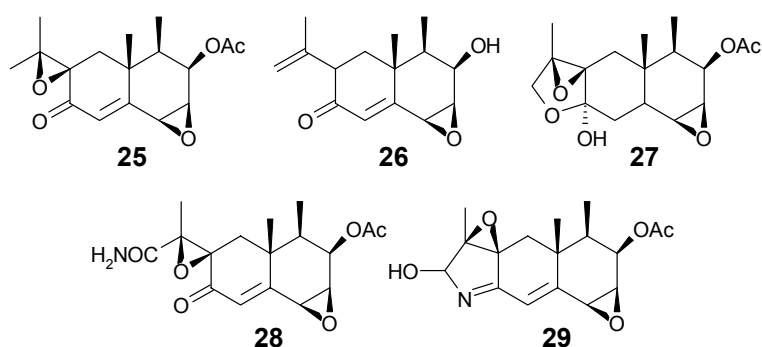
L'equilibri de la **Figura 26** fou provat per Moreau *et al.*<sup>152</sup> mitjançant estudis de <sup>1</sup>H-RMN a diferents temperatures. Un augment de la temperatura semblava promoure la formació del compost **20** en la forma no ciclada (**20B**) (79% a 95 °C). Un descens de la temperatura comportava la recuperació del percentatge inicial d'aquestes dues estructures en equilibri (un 61% de **20** en la forma no ciclada (**20B**) a 20 °C).

La casa Sigma comercialitza la PR toxina (**19**), però a un preu inassequible: 1 mg de producte costa uns 43 euros, per la qual cosa el cost de grams de producte estaria en l'ordre de desenes de miler d'euros. Per aquesta raó resulta molt més econòmic produir-lo al laboratori a partir del fong *Penicillium roquefortii* que no pas comprar-lo directament.

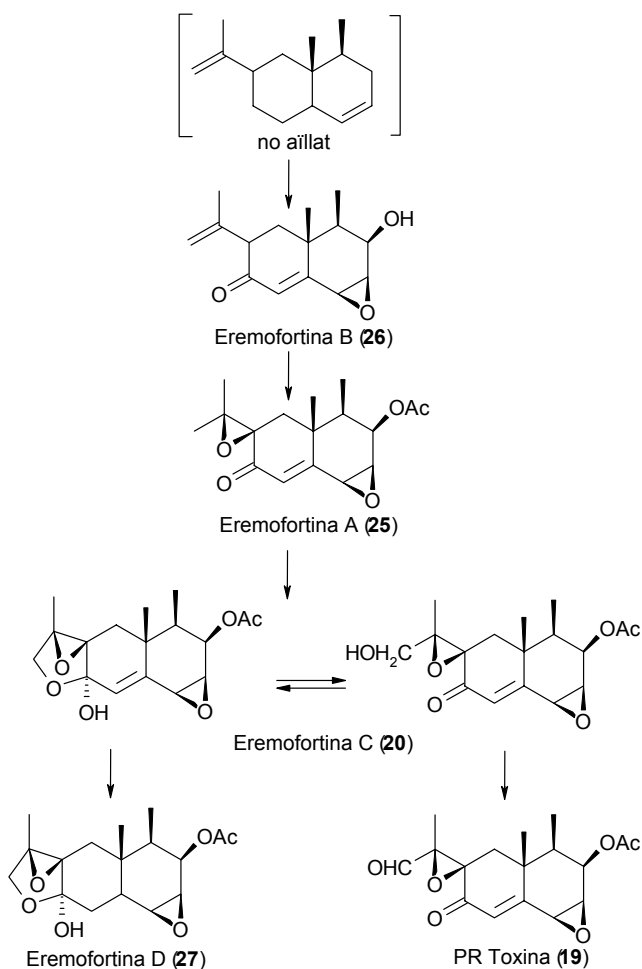
A pesar d'haver-se emprat el fong *Penicillium roquefortii* per a la fabricació de formatges des de l'any 500 a.C., no fou fins el 1968 quan es va descobrir que aquest fong produïa metabòlits tòxics. El compost que confereix aquesta toxicitat a aquest fong és la PR toxina (**19**). El grup aldehid de **19** està directament involucrat en l'activitat biològica i bioquímica de la toxina<sup>153</sup> de la mateixa manera que succeïa amb la bipolaroxina (**21**). Per tant, l'eremofortina C (**20**), a l'igual que la dihidrobipolaroxina (**22**), no es tracta d'un producte tòxic ja que no presenta el mencionat grup aldehid en la seva estructura. De totes maneres, la toxicitat de la PR toxina (**19**) ha estat extensament estudiada<sup>145,153-157</sup> i, únicament resulta tòxica a elevades concentracions. Per tant, es tracta d'un producte que pot ser perfectament utilitzat com a producte de

partida si es té cura en la seva manipulació.

Cal tenir en compte que, en la mateixa espècie fúngica, encara s'han trobat altres metabòlits sesquiterpènics d'estructura similar als anteriors (**Figura 27**), com són les eremofortines A (**25**), B (**26**), D (**27**), E (PR-amida) (**28**) i PR-imina (**29**).<sup>158-160</sup> Tots aquests metabòlits estan relacionats per una mateixa ruta biosintètica descrita per Moreau *et al.* (**Figura 28**).<sup>153</sup> A mesura que els metabòlits evolucionen, s'observa com cada cop es troben en una forma més oxidada. En les primeres etapes d'aquesta ruta, l'eremofortina B (**26**) incorpora un epòxid en la seva estructura per rendir l'eremofortina A (**25**) i, al final, l'eremofortina C (**20**) s'oxida a PR toxina (**19**) i eremofortina D (**27**). De fet, l'enzim que catalitza la transformació de **19** a **20** és la EC oxidasa.<sup>151</sup>



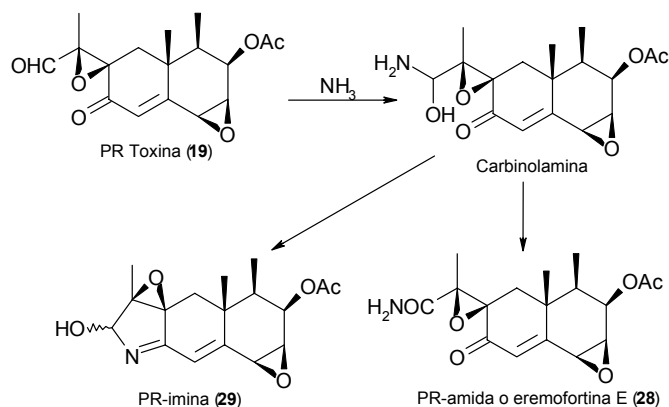
**Figura 27.** Altres metabòlits sesquiterpènics, aïllats del fong *P. roquefortii*, d'estructura similar a **19** i **20**.



**Figura 28.** Ruta biosintètica dels sesquiterpens aïllats del fong *Penicillium roquefortii*.<sup>159</sup>



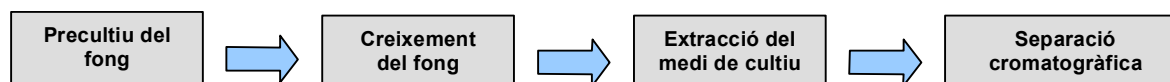
La PR-imina (**29**) i la PR-amida (**28**) es produeixen quan la producció de PR toxina (**19**) decreix ja que la presència d'aminoàcids, triptamina o extractes de formatge blau en el medi de cultiu la degraden fins a convertir-la en **29**.<sup>161</sup> A més, la toxina **19** forma PR imina (**29**) amb amoníac i reacciona amb aminoàcids neutres i bàsics presents al formatge.<sup>162</sup> La PR-amida (**28**), com es mostra en la **Figura 29**, es forma gràcies a l'acció d'una alcohol deshidrogenasa per oxidació de la carbinolamina, que és un intermedi de la reacció de l'amoníac amb la PR toxina (**19**). L'amoníac prové d'alteracions del medi de cultiu.<sup>158</sup>



**Figura 29.** Esquema de la hipotètica biosíntesi de PR-amida (**28**) i PR-imina (**29**). Aquesta hipòtesi queda verificada amb l'addició de sulfat d'amoní al medi de cultiu ja que només es troba la PR imina (**28**) sota aquestes condicions.<sup>158</sup>

## 2. Obtenció de PR toxina (19) i eremofortina C (20)

Durant el transcurs d'aquesta tesi, s'ha posat a punt una metodologia per a l'extracció, aïllament i detecció de PR toxina (19) i eremofortina C (20) a partir de cultius del fong *Penicillium roquefortii*, basada en els treballs realitzats per Chang *et al.*<sup>147</sup> Les etapes necessàries per obtenir aquests metabòlits secundaris es mostren a la **Figura 30**.



**Figura 30.** Passos a seguir per a l'obtenció de PR toxina (19) i eremofortina C (20).

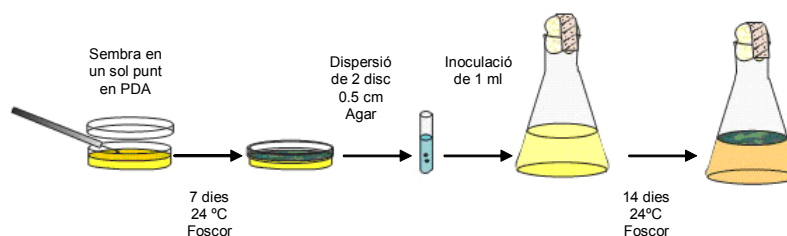
El cultiu del fong s'inicia amb un precultiu d'aquest, sembrant-lo des de la placa Petri on es conserven les soques, a una altra placa Petri amb medi de manteniment. Després de 7 dies d'incubació, el fong es fa créixer en el medi de cultiu durant 12-14 dies. Finalment, la PR toxina (19) i l'eremofortina C (20) s'extreuen i s'aïllen del medi de cultiu.

### 2.1. Antecedents

#### 2.1.1. Etapes de creixement

El creixement del fong *Penicillium roquefortii* per a la producció màxima dels metabòlits d'interès té lloc en dues etapes diferenciades (**Figura 31**):<sup>145,147</sup>

- En la primera, es prepara un precultiu del fong *Penicillium roquefortii* en tub d'agar de dextrosa i patata. S'incuba durant 7 dies a 24 °C en la foscor. A continuació, es prepara una suspensió de conidis del fong *Penicillium roquefortii* (de concentració  $10^7$ - $10^8$  conidis·mL<sup>-1</sup>) dispersant un disc de 0.5 cm de diàmetre del medi de manteniment en 2 mL d'una dissolució aquosa estèril de dodecilsulfat sòdic 0.01% mitjançant agitació vigorosa amb un vòrtex. Tot seguit, s'addicionen 500 µl d'aquesta suspensió a cadascun dels recipients que contenen el medi líquid de cultiu (120-150 mL).
- En la segona, el fong es cultiva en un medi de cultiu líquid format per 1% d'extracte de llevat, 7.5% de sacarosa i 60% d'extracte d'arròs de la varietat Indica (*Oryza sativa* L.). La incubació del fong té lloc en la foscor, a 24 °C, a un pH inicial de 4.0, regulat per una dissolució tampó citrat-fosfat, i sense agitació, durant un període comprès entre 12 i 15 dies.



**Figura 31.** Passos a seguir per al cultiu i creixement del fong *Penicillium roquefortii*.

#### 2.1.2. Condicions de creixement

L'estudi realitzat per Chang *et al.*<sup>147</sup> permet concloure que les condicions òptimes de creixement del *Penicillium roquefortii* per tal de produir la màxima quantitat de PR toxina (19) i eremofortina C (20) són:

- Soca de *Penicillium roquefortii* de l'American Type Collection Culture (ATCC): ATCC 48936.
- Els cereals resulten millor que els llegums per al medi de cultiu, i el que dona millors resultats és la varietat d'arròs Indica (*Oryza sativa L.*).
- L'òptim període d'incubació del medi de cultiu, per tal d'obtenir la major quantitat possible dels metabòlits d'interès, és 12-14 dies.
- L'òptima temperatura d'incubació és 24 °C.
- El pH s'ajusta, mitjançant una dissolució citrat-fosfat, a 4.0.
- Sistema estacionari.
- En condicions de foscor.

**Soca:** Per tal de conèixer amb quina soca s'aconsegueix la màxima producció conjunta de PR toxina (19) i eremofortina C (20) aquests autors assajaren 17 soques diferents de *Penicillium roquefortii* cultivades en dos medis: YES (2% extracte de llevat – 15% sacarosa) i YESC (1% extracte de llevat – 7.5% sacarosa – 20% extracte de cereals) sota condicions estacionàries i de foscor a 20 i 24 °C. Un total de 13 soques produïren els dos compostos en el medi de cultiu YESC, però únicament quatre soques (ATCC 6987, ATCC 6989, ATCC 48936 i ATCC 9295) produïren els dos metabòlits en estudi en ambdós medis. La producció de 19 i 20 per part d'aquestes quatre soques fou molt major en el medi YESC que no pas en el YES, i les que van produir els nivells més elevats dels productes d'interès van ser les tres primeres (Taula 2).

Soca	Màxima concentració de 20/mg·L <sup>-1</sup>	Màxima concentració de 19/mg·L <sup>-1</sup>
ATCC 6989	160	936
ATCC 48778	248	625
ATCC 48936	1640	550

Taula 2. Producció de PR toxina (19) i eremofortina C (20) per part de diferents soques de *P. roquefortii*.

**Medi de cultiu:** Quan Chang *et al.*<sup>147</sup> van afegir al medi de cultiu 6.7, 20, 60 i 100% d'extracte de cereals i van inocular el medi de cultiu amb la soca ATCC 48936 sota condicions estacionàries i de foscor a 24 °C, la quantitat produïda d'eremofortina C (20) i PR toxina (19) augmentava considerablement (Taula 3). Aquests mateixos autors investigaren 10 cereals (civada, blat, avena, arròs...) i 8 llegums (mongetes, cacauets, pèsols...). El cereal que proporcionava la màxima concentració dels productes d'interès va ser l'arròs Indica (*Oryza sativa L.*) quan s'addicionava en una proporció del 60%, tot i que el 100% també donava resultats similars.

Concentració (%) d'extracte de cereals afegida	Màxima concentració de 20/mg·L <sup>-1</sup>	Màxima concentració de 19/mg·L <sup>-1</sup>
0	51	38
6.7	1244	437
20.0	1650	550
60.0	1750	607
100.0	1705	590

Taula 3. Efecte de l'extracte de cereals en la producció d'eremofortina C (20) i PR toxina (19) per part de l'ATCC 48936. El medi de cultiu de la primera experiència és 2% d'extracte de llevat i 15% de sacarosa (YES), mentre que la resta és 1% d'extracte de llevat, 7.5% de sacarosa i diferents % d'extracte de cereals (YESC).

**Període i temperatura d'incubació:** El període i la temperatura d'incubació són crítics per tal d'assolir els

màxims nivells de PR toxina (19) i eremofortina C (20). Aquests resultats foren obtinguts quan el fong creixia a 24 °C, i el temps òptim d'incubació a aquesta temperatura per ambdós compostos fou 12-14 dies. A mesura que es disminuïa la temperatura es requerien més dies d'incubació per arribar als nivells màxims dels dos metabòlits. A pesar que el fong podia créixer fins i tot a 32 °C, la producció dels compostos en estudi disminuïa significativament.

**pH:** El pH també és crític. Chang *et al.*<sup>147</sup> van descriure que el màxim rendiment d'ambdós compostos s'obtenia quan el pH inicial del medi de cultiu és 4.0 i es regula al llarg del cultiu amb un tampó. A valors de pH superiors, la quantitat dels metabòlits decreixia gradualment, i fortes davallades s'observaven a pH extrem (2.0 i 8.0). A més a més, la producció de 19 en un medi amb pH inicial de 4.0 era 2.6 vegades superior a la d'un medi sense tampó. En contrast, els rendiments de 20 eren similars en ambdós medis.

**Sistema estacionari:** Aquest fong ha estat incubat, tradicionalment, sense agitació. La quantitat de PR toxina (19) i eremofortina C (20) produïda en sistemes estacionaris era, respectivament, 2 i 6 vegades major que la produïda en sistemes amb agitació.<sup>147</sup> Per contra, la transformació de l'eremofortina C (20) en PR toxina (19) mitjançant l'eremofortina C oxidasa en el mateix medi de cultiu requereix d'agitació.<sup>151,152</sup> Quan la màxima quantitat de PR toxina (19) es va dividir per la màxima quantitat d'eremofortina C (20) en el medi de cultiu, es va trobar que el nivell de transformació de 20 a 19 era al voltant del 100% quan el fong creixia en un sistema agitat a 120 rpm, mentre que el nivell de transformació era únicament del 35% en un sistema estacionari.

Els conidis de *P. roquefortii* que es van inocular en el medi de cultiu normalment tenien una vellesa de 5-7 dies. Tanmateix, els màxims nivells d'eremofortina C (20) i PR toxina (19) que es van aconseguir no foren significativament diferents amb conidis de 3 o 48 dies de vellesa.<sup>147</sup>

### 2.1.3. Extracció, aïllament i detecció de PR toxina (19) i eremofortina C (20)

Un cop s'han produït els metabòlits necessaris per poder utilitzar-los com a producte de partida per a la síntesi d'anàlegs del KM-01 (9), l'eremofortina C (20) i la PR toxina (19), s'han d'extreure del medi de cultiu i aïllar-los de la resta de metabòlits produïts pel fong *Penicillium roquefortii*.

Els primers treballs foren realitzats per Wei *et al.*<sup>145</sup> separant els eremofilans 19 i 20 del medi de cultiu mitjançant extraccions amb cloroform després de filtrar el fong crescut en la superfície. El posterior aïllament d'aquests compostos requeria tres processos de separació cromatogràfica.

Posteriorment, Moreau *et al.*<sup>159</sup> van descriure el procés d'extracció i aïllament de la PR toxina (19) i de les eremofortines A (25), B (26), C (20) i D (27), després de l'extracció del medi de cultiu amb cloroform, sotmeten el cru a diferents processos cromatogràfics. Una primera separació (eluent: cloroform/metanol (0.5-10%)) permet obtenir fraccions enriquides amb els metabòlits produïts, purificant cada una d'elles mitjançant un nou procés cromatogràfic (eluent: cloroform/metanol progressiu). Finalment, cristal·litzen aquests metabòlits en èter dietílic o acetat d'etil segons el cas.

Aquests mateixos autors també van analitzar si els eremofilans mencionats es concentraven en el medi de cultiu o quedaven en l'interior del microorganisme. Els resultats amb que van concloure el treball foren que

el nivell de PR toxina (19) en l'interior del fong era molt baix i les diferents eremofortines, tot i estar presents en el microorganisme, es trobaven en molta major proporció en el medi de cultiu filtrat. Així doncs, només es necessari realitzar una extracció dels metabòlits del medi de cultiu ja que, en el fong, els compostos d'interès 19 i 20 es troben presents en baixes concentracions.

La majoria d'eremofilans sesquiterpens produïts pel fong *P. roquefortii* es poden detectar sota llum ultraviolada a 254 nm perquè posseeixen una cetona insaturada en la seva estructura. L'única excepció és l'eremofortina D (27). Per tant, poden detectar-se per cromatografia de capa fina o bé mitjançant cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) acoblat a un detector FID.

- Cromatografia de capa fina: Mitjançant la tècnica de cromatografia de capa fina,<sup>145</sup> la toxina 19 (amb metanol:cloroform (4:96, v/v)) presentava una taca a R<sub>f</sub> al voltant de 0.63. Si es varia la proporció de l'eluent a 5:95 (v/v), K. Siemens i J. Zawistowski,<sup>162</sup> descriuen que la PR toxina (19) s'observa a R<sub>f</sub> al voltant de 0.80. Segons Scott *et al.*,<sup>163</sup> aquest metabòlit també podia visualitzar-se eluint amb toluè:acetat d'etil:àcid fòrmic 90% (5:4:1,v/v/v) o bé benzè:metanol:àcid acètic (24:2:1,v/v/v). Per altra banda, l'eremofortina C (20)<sup>152</sup> es pot visualitzar emprant metanol:cloroform (5:95, v/v) com una taca sota la llum UV (365 nm) després de ruixar-la amb àcid sulfúric concentrat i escalfar-ho 2 minuts a 120 °C a l'estufa.
- Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC): Un primer mètode per a la detecció i determinació de la PR toxina (19) fou descrit per K. Siemens i J. Zawistowski, mitjançant l'ús d'una columna de fase reversa LiChrosorb C<sub>18</sub> emprant com a fase mòbil una mescla metanol:aigua en la proporció 65:35 (v/v).<sup>162</sup> En aquest primer mètode, quan s'analitzava la toxina 19 sola (temps de retenció de 3.8 minuts), era més sensible que el mètode que es mostra més avall però, continguda en un cru, la resolució dels pics era menor. Un segon mètode de cromatografia líquida d'alta eficàcia va permetre detectar, segons S. Moreau *et al.*, de forma quantitativa la PR toxina (19) i altres metabòlits del *Penicillium roquefortii* d'estructura similar (eremofortina A (25) i eremofortina B (26)).<sup>159,164</sup> Amb aquesta finalitat i mitjançant l'ús d'una columna de sílice i emprant-se una fase mòbil n-hexà:tetrahidrofurà (75:25, v/v), van obtenir-se uns temps de retenció, en minuts, de 4.9 per 25, 7.4 per 19 i 10.3 per 26. Per a l'eremofortina C (20) van emprar-se unes condicions diferents a les anteriors perquè, amb les condicions anteriors, s'obtenia un pic ample que impossibilitava el seu anàlisi quantitatiu. La fase mòbil emprada en aquest cas fou cloroform, obtenint-se un temps de retenció per a l'eremofortina C (20) de 6.7 minuts.

## 2.2. Posta a punt del mètode d'obtenció dels metabòlits

Donat que l'objectiu d'aquest capítol, en un principi, era únicament l'obtenció de quantitats de l'ordre de grams de metabòlits útils per a emprar-los en la síntesi de mimètics de 9, es va optar per reproduir la mètodica descrita per Chang *et al.*<sup>147</sup> Tot i així, com es veurà més endavant, la baixa producció de PR toxina (19) i eremofortina C (20) va portar a treballar a fons els factors que influïen per a millorar-ne l'obtenció.

Donat que la majoria dels metabòlits descrits en la literatura que s'obtenen del cultiu del *Penicillium roquefortii* presenten una estructura força semblant, no es descarta la possibilitat d'emprar algun d'aquests com a producte de partida per a la síntesi d'anàlegs del KM-01 (9). Per tant, en cadascuna de les experiències realitzades s'intenta aïllar i identificar altres productes presents en el cru de l'extracció.

En la **Taula 4** es mostren els tres cultius de *Penicillium roquefortii* que van permetre posar a punt aquesta metòdica per a l'obtenció de **19** i **20** en el laboratori d'Esteroides. Tot seguit s'enumeren les conclusions a les que s'arriba en l'estudi d'aquests cultius.

- En el primer cultiu, es reproduïx el treball realitzat per Wei<sup>145</sup> i Chang<sup>147</sup> i, es corroboren els resultats trobats en la literatura<sup>159</sup> que conclouen que la quantitat de **10** en l'interior del microorganisme era molt baixa. Per corroborar-ho, es realitza una extracció per separat dels metabòlits presents en l'interior del *Penicillium roquefortii* i dels presents en el medi de cultiu.
- Es millora el procés d'extracció i aïllament per a l'obtenció de PR toxina (**19**) descrit en la literatura,<sup>145</sup> i s'acaben de corroborar els resultats esmentats en la primera experiència.
- Estudi quantitatiu de la producció de PR toxina (**19**) durant el procés de cultiu i millora del procés d'aïllament de **19**.

Cultiu	Capacitat del flascó d'Erlenmeyer	Nº de flascons	Volum de medi per flascó
1	1 L	2	140
2	1 L	3	120
3	1 L	5	110
	2 L	2	220

**Taula 4.** Cultius realitzats per a la posta a punt del cultiu de *Penicillium roquefortii*.

#### Experiència 1:

En la primera experiència, es va fer créixer el microorganisme a 30 °C enlloc de 24 °C, que és l'òptima temperatura per assolir la màxima producció de PR toxina (**19**) i d'eremofortina C (**20**),<sup>147</sup> per la manca de disponibilitat d'una cambra a aquesta temperatura.

Per conèixer el dia de màxima producció de PR toxina (**19**) en el medi de cultiu, es va realitzar un seguiment per CCF (el mètode de detecció de **19** per cromatografia líquida d'alta resolució no es va posar a punt fins a la tercera experiència) de la producció de PR toxina (**19**) al llarg del temps (**Taula 5**). Únicament es va realitzar un seguiment de la producció de **19** perquè era l'únic metabòlit, produït pel microorganisme d'estudi, comercialment assequible. Per tant, era l'únic compost del qual es disposava de producte de referència.

Eluent	Rf (19)
CHCl <sub>3</sub> : MeOH (96:4)	0.59
Cy : AcOEt (3:5)	0.51

**Taula 5.** Factor de retenció (Rf) de la PR toxina (**19**).

Mitjançant aquesta tècnica, s'observà un cru complex en el que es va començar a detectar la presència de **19** en el medi de cultiu al vuitè dia. La transformació es va aturar al novè dia d'ésser inoculat, enlloc del 13-14 dia com es mencionava en la literatura,<sup>147</sup> ja que, en un primer moment, tant sols interessava assajar la metodologia de treball de detecció i d'extracció.

Es va corroborar, també per CCF, que en el procés d'extracció són suficients tres extraccions amb el mateix volum de cloroform per extreure tota la PR toxina (**19**) present en el medi de cultiu. A aquesta conclusió va arribar-s'hi realitzant una quarta extracció amb cloroform de la fase aquosa, de la que, després d'assecar-la i eliminar el dissolvent, solament es van obtenir 7 mg que no contenien el metabòlit d'interès **19**.

Així doncs, a partir dels 280 mL de medi de cultiu, es va obtenir un residu sec de cru de 42 mg. De la fase intermèdia emulsionada durant aquest procés d'extracció es van arribar a obtenir 29 mg més de cru. Resultats amb els que s'evidencia la importància que té el fet de poder trencar l'emulsió que es genera en el procés d'extracció de **19** del medi de cultiu per tal d'aconseguir aïllar la màxima quantitat possible d'aquesta toxina.

Finalment, per corroborar que la quantitat de **19** en l'interior del microorganisme era molt baixa, es va macerar, després de filtrar el medi de cultiu, el fong *Penicillium roquefortii* amb cloroform tota la nit. S'obtingueren 197 mg d'un cru on no es detectà la presència de **19**. D'aquesta manera, es va poder corroborar, també mitjançant CCF, que la quantitat de **19** en l'interior del microorganisme era molt baixa. Per tant, es pot afirmar que, a pesar de la gran quantitat de cru aïllat al macerar el microorganisme, la toxina **19** és un metabòlit extracel·lular, fet que en facilita la seva extracció del medi de cultiu.

#### Experiència 2:

En aquesta segona experiència, es retiraren els tres flascons d'Erlenmeyer de la cambra després de 13 dies d'incubació a 24 °C. En tots ells s'observava, mitjançant cromatografia de capa fina, un cru complex amb presència de **19**. Després d'extreure els 360 mL de medi de cultiu amb cloroform es van obtenir 835 mg d'un cru complex que, després de purificar-lo mitjançant diverses columnes cromatogràfiques, rendiren 87 mg de PR toxina (**19**). L'eluent emprat en la primera columna fou CHCl<sub>3</sub>:MeOH (98:2, v/v) i de les nou fraccions obtingudes únicament en la primera (633 mg) s'observava PR toxina (**19**) per CCF. S'aconseguien purificar 10mg més de PR toxina (**19**) (97 mg en total) de la primera fracció després de realitzar diverses columnes.

Es va intentar aïllar i identificar, de la resta de fraccions, altres metabòlits que puguin resultar interessants per a ésser emprats com a producte de partida per a la síntesi d'anàlegs actius del KM-01 (**9**) com per exemple l'eremofortina C (**20**). Després de realitzar diferents columnes cromatogràfiques (recta, flash, buit, esglaonada) i capes fines preparatives, únicament s'aconseguien aïllar 15 mg d'un sesquiterpè eremofilà no identificat per <sup>1</sup>H-RMN.

Pel que fa a l'eremofortina C (**20**), l'altre metabòlit que resulta interessant com a producte de partida i que es produeix, segons la literatura, en quantitats de l'ordre de 1 g/L de medi de cultiu, es desconeixia si es trobava present en el cru obtingut.

#### Experiència 3:

Abans d'iniciar aquesta darrera experiència, es va posar a punt un mètode de detecció i quantificació de PR toxina (**19**) mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Amb aquesta finalitat, es va determinar, primer, una recta de calibrat per tal d'avaluar la concentració en **19** en les mostres problema per interpolació. D'aquesta manera, es va poder tornar a corroborar, però aquest cop mitjançant HPLC, que la toxina d'interès **19** és un metabòlit extracel·lular i únicament es troba en el medi de cultiu. Després de macerar el *Penicillium roquefortii* amb cloroform i eliminar-lo per destil·lació a pressió reduïda, es va redissoldre en el mateix dissolvent i es va injectar en l'HPLC sense observar-se la presència del metabòlit secundari **19**.

En aquesta experiència, també es van centrar els esforços en aïllar l'eremofortina C (**20**) del cru complex obtingut del medi de cultiu ja que, com ja s'ha comentat amb anterioritat, és l'altre metabòlit, juntament amb

la PR toxina (19), que és útil per ser utilitzat com a producte de partida per a la síntesi de mimètics del KM-01 (9). Tot i així, després de realitzar diverses columnes cromatogràfiques (flash, lobar, preparativa) no es va aconseguir aïllar cap fracció suficientment pura que permetés la identificació de 20. La dificultat a l'hora d'aconseguir separar aquest compost fou doble. Per una banda, no es disposava d'eremofortina C (20) comercial de referència, i per altra banda, com ja fou esmentat anteriorment, l'eremofilà 20 es troba en equilibri entre dos formes (Figura 26), presentant una proporció de 61:39 entre la forma no ciclada (20B) i la ciclada (20A) a 20 °C que en dificulta la seva identificació.

Finalment, es va avaluar per HPLC el període de creixement que requereix el microorganisme per a que la producció de 19 sigui màxima. Amb aquest objectiu, es va calcular la concentració de PR toxina (19) en el medi de cultiu després de 11-15 dies de la seva inoculació (Taula 6 i Figura 32).

Temps / dies	Concentració de 19/ $\mu\text{M}$	Concentració de 19/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
11	459	147
12	665	213
13	677	217
14	671	215
15	653	209

Taula 6. Avaluació per HPLC de la concentració de PR toxina (19) en el medi de cultiu.

S'observa que la màxima producció de PR toxina (19) s'obté el dia 13 però no és crític si el cultiu es retira en els dies 12-14 o fins i tot el 15. Així doncs, el període d'incubació obtingut, per a que la producció de PR toxina (19) sigui màxima, coincideix amb el trobat per Chang *et al.*<sup>147</sup>

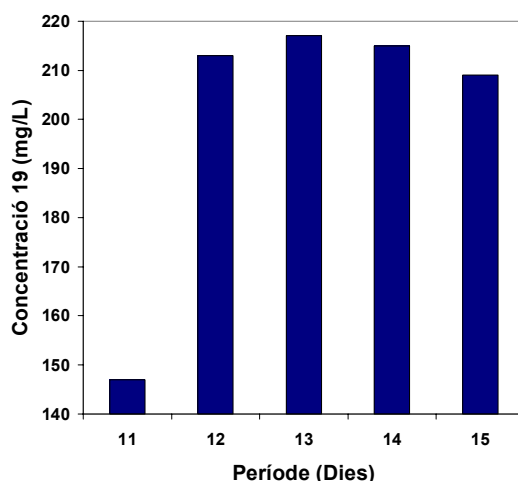


Figura 32. Quantitat de PR toxina (19), en  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , produïda en el medi de cultiu de *P. roquefortii*.

Tot i haver-se assolit amb èxit la posta a punt de la metodologia d'obtenció de PR toxina (19), la quantitat màxima d'aquesta és únicament de 217 mg/l de medi de cultiu, una quarta part de la descrita per Chang *et al.*<sup>147</sup> Aquest fet motiva la realització d'un estudi més a fons dels factors que poden afectar al metabolisme del fong *P. roquefortii* i, en conseqüència, la producció dels metabòlits secundaris en el medi de cultiu.



### 2.3. Millora del procés de producció i obtenció de PR toxina (19) i eremofortina C (20)

En els següents cultius d'aquesta tesi es pretén, a més de produir els metabòlits d'interès en grans quantitats, optimitzar aquesta producció mitjançant l'estudi dels factors que poden afectar a aquesta producció, així com millorar el procés d'extracció, aïllament i detecció d'aquests. Per tant, després d'exposar un resum dels cultius realitzats, s'avaluen els diferents factors estudiats per millorar la producció de **19**:

- els factors que afecten el creixement del fong *P. roquefortii*: composició del medi de cultiu, pH, tipus de soca...
- la capacitat d'extracció dels metabòlits secundaris amb cloroform
- l'aïllament dels metabòlits
- l'escalat del cultiu del fong

#### 2.3.1. Producció de PR toxina (19) i eremofortina C (20)

En el transcurs d'aquest treball s'ha realitzat un total de 34 cultius de fong *Penicillium roquefortii* per a obtenir PR toxina (**19**) i eremofortina C (**20**). Per aïllar 1927 mg de **19** cristal·lina, han estat necessaris 69.5 litres de medi de cultiu líquid. També es van aïllar d'aquest medi de cultiu líquid uns 18 g de PR toxina (**19**) per cristal·litzar. Uns altres 17 mg de **19** s'han aïllat a partir del cultiu del fong en medi sòlid (3750 g d'arròs). També s'ha aïllat 60 mg d'eremofortina D (**27**) a partir d'un cultiu del fong en 2.4 litres de medi de cultiu líquid i, 2124 mg d'eremofortina C (**20**) impurificada amb **27** cultivant el fong en un volum total de 4 litres. Aquests sesquiterpens únicament es van aïllar i identificar en els primers cultius. Després, en veure que el seu interès era inferior al de **19**, ja no van dedicar-se més esforços al seu aïllament.

A continuació, es mostra un resum dels cultius realitzats amb el fong *Penicillium roquefortii* (**Taula 7**). En tots ells, l'objectiu principal és la producció de PR toxina (**19**), però al mateix temps s'estudien els diferents factors que poden influir en la producció d'aquest metabòlit secundari ja que, a l'emprar-se com a producte de partida per a la síntesi de mimètics del KM-01 (**9**), se'n necessita força quantitat. Per aquesta raó, en la **Taula 7** es presenten els factors estudiats i la quantitat de PR toxina (**19**) obtinguda en cada cultiu.

Cultius	Característiques del medi	Factors d'estudi	Producció màxima 19
1-3	ATCC 48936, medi d'extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Dia producció màxima	217 mg/l
4	ATCC 48936, medi d'extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Centrifugar medi	246 mg/l
5	ATCC 48936, medi d'extracte de cereals (arròs <i>Bahia</i> )	Arròs <i>Bahia</i> de medi	145 mg/l
6-11	ATCC 48936, medi d'extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Ampolles Roux i pH	40 mg/l
12-14	Nova soca ATCC 48936, extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Nova soca i Roux	0 mg/l
15 i 16	ATCC 48936, medi sòlid de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Medi sòlid	5 mg/kg
17-20	ATCC 48936 i 48778, medi d'extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Soques (48778) i pH	653 mg/l
21-25	ATCC 48936, 48778 i 6989, extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Soques (6989) i pH	46 mg/l
26-28	ATCC 48936, 48778 i 6989, extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Barreja de soques	252 mg/l
29 i 30	ATCC 48936, medi d'extracte de cereals (arròs <i>Indica</i> )	Producció de <b>19</b>	-
31 i 32	Disseny d'experiències per avaluar sucs de fruites i soques	Soques i sucs de medi	789 mg/l
33	ATCC 48936, medi de suc de taronja	Producció de <b>19</b>	-
34	Disseny d'experiències per avaluar medi de cultiu i soques	Soques i medi de cultiu	83 mg/l

**Taula 7.** Cultius realitzats amb el fong *Penicillium roquefortii*.

Els tres primers cultius, com ja s'ha comentat en l'apartat 2.2, van dedicar-se a posar a punt la metodologia per produir PR toxina (**19**). Es va reproduir la mètrica descrita per Chang *et al.*<sup>147</sup> i, durant aquests tres cultius, es va avaluar per HPLC el dia en que la producció de PR toxina (**19**) era màxima, es va determinar

que la producció d'aquest metabòlit era extracel·lular i es va intentar aïllar, sense èxit, altres metabòlits secundaris produïts pel *P. roquefortii*. D'aquests tres cultius es va aïllar 129 mg de **19** amb una producció màxima de 217 mg/l el dia 13 de cultiu.

En el quart cultiu, es va observar que la producció de **19** no es veia afectada en centrifugar el medi de cultiu enlloc de filtrar-lo amb un embut Büchner i, reproduint les condicions dels cultius anteriors, es va assolir una màxima producció de 246 mg/l de **19**. Tot i així, la producció de **19** era únicament una quarta part de la descrita en la literatura (800-900 mg/l).<sup>147</sup> Aquesta fou la raó que va motivar emprar arròs *Bahia* (cultiu 5) enlloc de la varietat *Indica* utilitzada fins aquest moment, però la producció de **19** encara fou menor, 145 mg/l. Tot i així, aquests cultius van servir per aïllar 811 mg d'eremofortina C (**20**) impura i 60 mg d'eremofortina D (**27**).

En els cultius 6-11 es va tornar a les condicions de cultiu anteriors, arròs varietat *Indica*. Es va intentar substituir els matrassos d'Erlenmeyer per ampolles Roux, que tenen major superfície per al creixement del fong i, a més, al ser planes es poden apilar per aprofitar més eficientment l'espai de la cambra de cultiu. També es va intentar modificar el pH del medi per estudiar si aquest afectava a la producció, però la baixa producció de PR toxina (**19**), inferior a 40 mg/l i fins i tot nul·la en 4 dels 6 cultius, no va permetre extreure'n conclusions definitives.

En els cultius 12-14 es va inocular una nova soca ATCC 48936 per intentar solventar el problema de la producció nul·la de PR toxina (**19**). S'empraren ampolles Roux i matrassos d'Erlenmeyer però aquest fet tampoc va solucionar el problema. Per tant, l'estudi de les ampolles Roux va resultar altre cop infructuós.

En els següents cultius (15-16) es va substituir el medi de cultiu líquid d'extracte de cereals per medi sòlid. El medi sòlid permet augmentar la superfície específica on pot créixer el fong però, desafortunadament, la producció fou únicament de 5 mg/kg.

Donada la baixa producció en medi sòlid i en medi líquid en els darrers cultius (veure pàgina 45), es va decidir tornar al medi líquid anterior. En els cultius 17-20 es va emprar la soca ATCC 48936 i la 48778, una nova soca que, a pesar de produir menys PR toxina (**19**) que l'ATCC 48936, posseeix una alta capacitat productora de **19** (Taula 2). Es va intentar avaluar la influència del pH i d'aquesta nova soca en la producció de **19** però, aquest cop, tampoc es van poder extreure conclusions definitives per la variabilitat de resultats. A pesar d'assolir una producció màxima de 653 mg/l en uns cultius, d'altres van presentar una producció nul·la de **19**.

Els cultius 21-25 serviren per avaluar la influència de les anteriors soques i també de l'ATCC 6989 (Taula 2). La producció en els cultius 21-23 fou molt baixa, essent la producció màxima de 46 mg/l. Els altres dos cultius no es van avaluar per HPLC i es van cromatografiar conjuntament amb altres fraccions.

Donat que encara no s'havia arribat a valors semblants als descrits, en els cultius 26-28 es va inocular mescles de les soques anteriors assolint-se una producció màxima de 224 mg/l. En veure que aquesta mescla no millorava la producció de **19** es van realitzar els cultius 29 i 30 amb la soca ATCC 48936, que era la que havia presentat millors resultats. Aquests cultius es van realitzar amb l'únic objectiu d'obtenir **19** en quantitats importants per a poder-la emprar en la síntesi de mimètics del KM-01 (**9**).

En els cultius 31 i 32 es va substituir el medi líquid d'extracte de cereals per suc de fruites i es va aconseguir una producció de 672 mg/l, quantitat similar a l'obtinguda per Chang *et al.*<sup>147</sup>

Finalment, es va realitzar el cultiu 33 amb suc de taronja per a produir 19 i el cultiu 34 per acabar de determinar quin era el millor medi de cultiu i la millor soca.

### 2.3.2. Estudis a nivell de microorganisme

Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior, la producció de PR toxina (19) durant els cultius 6-14 fou nul·la en la majoria d'ells. De fet, de tots ells, només es va observar producció en el cultiu 8, on la producció únicament va ser de 0-40 mg/l.

En els cultius 6 i 7, mentre es pretenia estudiar la influència de les ampolles Roux no es va obtenir PR toxina (19) en el medi de cultiu. En el cultiu 8, en que es van reproduir les condicions dels cultius anteriors, la producció va ser inferior a 40 mg/l i, per aquest motiu, es va mesurar el pH al final del cultiu (pH = 5). En un primer moment, es va pensar que aquest podia ser el motiu de la manca de producció de PR toxina (19) ja que Chang *et al.*<sup>147</sup> descriuen que el pH final del medi no hauria d'excedir 4.5 per tal que la producció sigui màxima. A més, Galzy *et al.* observaren que la coloració verdosa o lleugerament blavosa dels micelis únicament es mantenia si el pH era inferior a 6, adquirint un color marronós per sobre d'aquest valor.<sup>166</sup> Partint d'aquesta hipòtesi, es van realitzar els cultius 9 i 10. En el primer, es va tamponar el medi amb clorur potàssic/àcid clorhídric (25 mM/25 mM) i, en el segon, es va tamponar amb citrat/fosfat 600 mM per mantenir el pH per sota de 4.5 al llarg de tot el cultiu. De totes maneres, en cap d'aquests cultius es va obtenir el metabòlit 19.

Durant aquests cultius, es va observar que aquesta dràstica disminució de la producció de PR toxina (19) estava associada a un enfosquiment del fong, passant de la típica coloració verda-blava a una coloració marronosa aproximadament al setè dia de cultiu (Figura 33). L'observació d'aquest canvi de coloració va fer que en l'onzè cultiu es partís de la soca ATCC 48936 que es conservava liofilitzada, enlloc de partir d'un glicerinat del fong com s'havia fet fins al moment, però tampoc es va produir 19.



**Figura 33.** Aspecte del fong *Penicillium roquefortii* (ATCC 48936) en els cultius en que es va produir PR toxina (19), coloració blau-verdosa (esquerra) i, en els que no se'n va detectar, coloració marronosa (dreta).

Davant la impossibilitat d'obtenir PR toxina (19), es va consultar l'ATCC (*American Type Culture Collection*) i la CECT (*Colección Española de Cultivos Tipo*) sobre aquest tema. Tots ells van coincidir que la disminució de la producció i l'enfosquiment podia ser degut a una degeneració de les soques de treball.

Certs articles també donaven suport a aquesta teoria.<sup>166,167</sup> El descobriment de que totes les soques de *P. roquefortii* que presenten un color marronós pàl·lid en l'anvers produeixen patulina en lloc de PR toxina (19) pròpia de les soques de *P. roquefortii*, va portar a Frisvad i Filtenborg<sup>167</sup> a classificar aquestes soques com una varietat separada, *Penicillium roquefortii* var. *carneum*. El Laboratori de Microbiologia de l'IQS també va suggerir que podia ser una qüestió del medi o de la dificultat inherent en l'aïllament de metabòlits secundaris. Per una banda, el substrat és fonamental i influeix de manera decisiva en el metabolisme secundari; per tant, al fer créixer els fongs en medis químicament indefinits pot fer que al canviar d'ingredients o de lots d'ingredients, hi hagi carències, sobre tot dels oligonutrients essencials pels fongs. Per altra, els metabòlits produïts en les etapes del metabolisme secundari de microorganismes, tot i ser productes d'expressió gènica similar a la dels metabòlits primaris, sembla que només es produeixen en condicions particulars de creixement o durant períodes d'estrès causats per limitacions nutricionals o per atacs microbials.

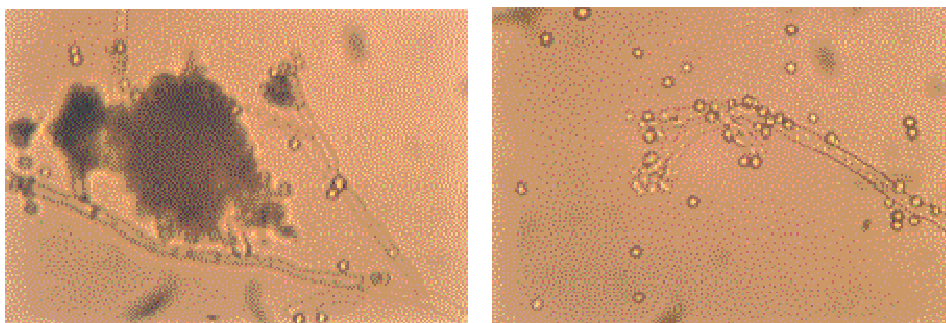
Davant els suggeriments dels laboratoris consultats, es va demanar una nova soca ATCC 48936 que es va emprar en els cultius 12-14, en els que tampoc es va produir 19 i es va observar altre cop l'esmentat canvi de coloració. Després, es van sol·licitar les soques ATCC 48778 i 6989 (en la **Taula 2** es mostra la seva producció). En els cultius 17-20 van emprar-se l'anterior soca ATCC 48936 i l'ATCC 48778. Aquest cop la producció va millorar considerablement però va ser molt variable. Així doncs, en el cultiu 17 la màxima producció fou de 266 mg/l, en el cultiu 18 de 173 mg/l, en el 19 de 653 mg/l i en el 20 altre cop fou nul·la. Cal remarcar que, tot i augmentar moltíssim la màxima producció de 19 en el dinovè cultiu, aquesta fou molt variable (**Taula 8**).

Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>		
Matràs	ATCC 48936	ATCC 48778
1	653	0
2	573	0
3	467	0
4	149	0
5	0	0
6	0	0

**Taula 8.** Producció de PR toxina (19) en el cultiu 19.

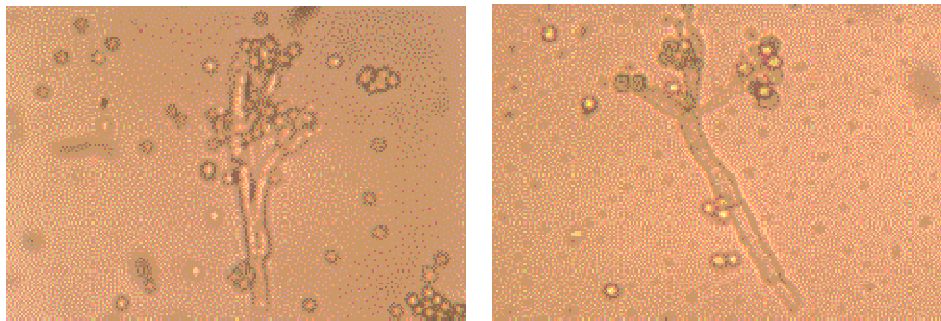
Davant d'aquests resultats, es va creure interessant observar la possible degeneració del cultiu emprant un microscopi òptic per analitzar la morfologia del fong, abans i després de l'enfosquiment del mateix:

- Es va observar un cultiu de *Penicillium roquefortii* de la soca ATCC 48778 després de 7 dies de creixement en placa, amb medi PDA (agar de dextrosa i patata), aquest cultiu presentava la típica coloració verdosa pròpia de la producció de PR toxina (19) (**Figura 34**).



**Figura 34.** Aspecte del *P. roquefortii* crescut en PDA a 200 augments en el microscopi òptic.

- b) El precultiu anterior es va inocular, segons la metodologia descrita anteriorment, en un medi de cultiu líquid format per 1% d'extracte de llevat, 7.5% de sacarosa i 60% d'extracte d'arròs de la varietat *Indica* (*Oryza sativa* L.). Quan el cultiu es va enfosquir, es va realitzar un frotis, per tal d'observar-lo microscòpicament (**Figura 35**).



**Figura 35.** Aspecte del *P. roquefortii* crescut en medi d'extracte de cereals a 200 augments en el microscopi òptic.

Aparentment, les quatre fotografies mostren la presència de conidis i hifes ramificades, propi del fong *Penicillium roquefortii*.<sup>168</sup> Aquestes fotografies indiquen que no existeix cap tipus de degeneració entre el *Penicillium roquefortii* ATCC 48778 d'aspecte verdós crescut en PDA i el d'aspecte marronós crescut en medi líquid amb extracte de cereal. Per tant, es creu que la baixa producció de **19** en els citats cultius pot ser conseqüència de factors difícils de controlar i no de paràmetres més senzills com la temperatura o la soca, doncs, aquests paràmetres sembla que ja foren suficientment estudiats per Chang *et al.*<sup>147</sup>

Aquests resultats fan palès la dificultat de treballar amb metabòlits secundaris. Com ja s'ha comentat, per a produir-los es requereixen unes condicions molt específiques. En conseqüència, es va decidir continuar cultivant les diferents soques de *P. roquefortii* en diferents medis de cultiu, tal com havia suggerit el laboratori de Microbiologia de l'IQS.

### 2.3.3. Estudis sobre el cultiu del fong *Penicillium roquefortii*

Els factors que es va considerar que més podien afectar a la producció de **19** foren la soca utilitzada i el medi de cultiu emprat per a cultivar-la. La capacitat productora de les diferents soques de *P. roquefortii* emprades es va avaluar en els cultius 17-28, 31, 32 i 34. El tipus de medi es va estudiar en els cultius 5, 15, 16, 31, 32 i 34. Tot i així, cal recordar que no es van poder extreure conclusions en tots els cultius degut a la variable producció del metabòlit d'estudi. Abans d'estudiar aquests dos factors més importants, el que es va avaluar va ser la concentració de conidis de la suspensió a introduir al medi de cultiu líquid.

#### 2.3.3.1. Recompte de conidis

Com ja s'ha comentat, Wei *et al.*<sup>145</sup> consideren una concentració idònia de  $10^7$ - $10^8$  conidis per mil·lilitre de dissolució. Per tal de no tenir que comptar per a cada cultiu el nombre de conidis presents a la suspensió, es va mesurar mitjançant una cambra de Bürker, la concentració de conidis que s'obtenia al dispersar un disc d'agar de 0.5 cm de diàmetre, on havia crescut el fong *P. roquefortii* durant 7 dies en condicions de foscor i 24 °C, en 2 mL de dodecil sulfat sòdic (SDS). Es van realitzar tres proves:

- a) Primer, a l'inici d'aquest treball, es va avaluar la soca ATCC 48936. Es prepararen dues dissolucions que contenien 2 mL de dodecil sulfat sòdic al 0.01%. A cadascuna d'elles es va introduir un disc d'agar que contenia conidis de *Penicillium roquefortii* incubats durant 7 dies a 24 °C a les fosques. De cada suspensió, es prepararen dues cambres de Bürker i, amb l'ajut d'un microscopi òptic, es van comptar el nombre de conidis presents en 40 quadres de cada cambra, obtenint una concentració mitja al voltant de  $1.5 \cdot 10^8$  conidis/ml (**Taula 9**).

Cambra de Bürker	Mitja de conidis per receptacle	Desviació estàndard	Concentració (conidis/mL)
1	11	5.3	$4.4 \cdot 10^7$
2	41	7.9	$1.6 \cdot 10^8$
3	63	8.1	$2.5 \cdot 10^8$
4	30	7.6	$1.2 \cdot 10^8$

**Taula 9.** Concentració de conidis presents en cada cambra de Bürker.

- b) En el cultiu 11, en veure que no s'obtenia una producció regular de PR toxina (19), es va repetir el recompte de conidis amb la mateixa soca ATCC 48936. Es preparà una suspensió de conidis pel procediment anterior, amb la que es prepararen 3 cambres de Bürker, de les quals es comptaren els conidis presents en 40 quadres. La concentració mitjana mesurada en les tres cambres de Bürker realitzades fou de  $3.6 \cdot 10^7$  conidis/mL (**Taula 10**).

Cambra de Bürker	Mitjana de conidis per receptacle	Desviació estàndard	Concentració (conidis/mL)
1	10	4.6	$4.1 \cdot 10^7$
2	8	3.5	$3.3 \cdot 10^7$
3	9	4.3	$3.5 \cdot 10^7$

**Taula 10.** Concentració de conidis presents a cada cambra de Bürker.

- c) En adquirir les soques ATCC 6989 i ATCC 48778, i la nova soca ATCC 48936 es va repetir el procediment anterior per a les tres soques. A més, es va avaluar la necessitat d'ús de SDS i, per tant, enlloc de dispersar els conidis en SDS es van dispersar en aigua. Es van preparar tres suspensions dispersant dos discs de cada soca en 4 mL d'aigua i es van avaluar 3 cambres de Bürker per a cada soca. Per a l'ATCC 6989 es va obtenir una suspensió de  $5.1 \cdot 10^7$  conidis·mL<sup>-1</sup> d'aigua; per a l'ATCC 48778, una suspensió de  $1.2 \cdot 10^8$  conidis·mL<sup>-1</sup> i per a l'ATCC 48936 una concentració de  $8.6 \cdot 10^7$  conidis·mL<sup>-1</sup> (**Taula 11**).

Soca <i>Penicillium roquefortii</i>	Mitjana N° conidis·mL <sup>-1</sup>	Desviació estàndard
ATCC 6989	$5.1 \cdot 10^7$	$8.3 \cdot 10^6$
ATCC 48778	$1.2 \cdot 10^8$	$7.7 \cdot 10^6$
ATCC 48936	$8.6 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^6$

**Taula 11.** Resum de la concentració de conidis per a cada soca.

Es pot concloure que, si se suspenen en 4 mL d'aigua dos discs d'agar de 0.5 cm de diàmetre, amb conidis de fong incubats durant 7 dies a 24 °C a les fosques, s'obtenen suspensions de concentracions que, si bé varien en funció de la soca, compleixen en tots els casos els requisits establerts.<sup>147</sup> Així, l'ús de SDS com a agent dispersant no és necessari per obtenir suspensions de concentració correcta per a inocular el fong en el medi de cultiu.

### 2.3.3.2. Soca de *Penicillium roquefortii*

En la **Taula 12** es presenta un resum de la quantitat de PR toxina (19) produïda en diferents cultius per tal de poder extreure conclusions sobre la capacitat productora de les tres soques de *Penicillium roquefortii*: ATCC 48936, 48778 i 6989.

Si es centra l'atenció en la màxima producció de cada soca independentment de les condicions de cultiu emprades s'observa que l'ATCC 48936 és la màxima productora del metabòlit d'interès (789 mg/l), a continuació la seguiria l'ATCC 48778 (173 mg/l) i, finalment, la soca ATCC 6989 (28 mg/l). Aquest ordre és invers al descrit per Chang *et al.*<sup>147</sup> (veure **Taula 2**). La producció assolida amb les soques ATCC 6989 (28 front 936 mg/l) i ATCC 48778 (173 front 625 mg/l) és inferior a la descrita per aquests autors però, en canvi, la producció assolida amb l'ATCC 48936 és superior (789 front 550 mg/l).

Els únics cultius on es van avaluar les tres soques a la vegada foren els 21, 22 i 26. Els dos primers, degut a la baixa producció emprant qualsevol de les soques, no van permetre extreure conclusions sobre la seva capacitat productora. De totes maneres, el cultiu 26, tot i que no va permetre discernir entre les soques ATCC 48778 i 6989, va deixar clar que la soca 4936 era la millor per a la producció del metabòlit 19. Doncs, en aquest cultiu es va quantificar 163-252 mg/l de 19 per a l'ATCC 48936 i únicament 15-20 mg/l per a la resta de soques.

Condicions	Concentració de PR toxina (19) en cada flascó d'Erlenmeyer del medi de cultiu (mg/mL)									
	ATCC 48936			ATCC 48778			ATCC 6989			
Cultiu 3: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 13 dies, pH = 4 (tampó diluït)	217			-			-			
Cultiu 4: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 13 dies, pH = 4 (tampó diluït)	246			-			-			
Cultiu 18: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 13 dies, pH = 4 (tampó diluït)	22	5	12	5	87	8	-			
	58	161	16	27	161	173				
Cultiu 19: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 13 dies, pH = 4	Tampó diluït			653	573	467	149	0	0	-
	Tampó concentrat			0	0	0	0	0	0	
Cultius 21 i 22: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 13 dies, pH = 4	Tampó diluït			4	4	3	4	28	31	
				3	0	5	4	5	13	
	Tampó concentrat			8	3	7	4	7	6	
				5	5	5	0	18	6	
Cultiu 23: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 12 dies, pH = 4 (tampó concentrat)	-			29	16	46	18	18	17	
				17	17	21				
Cultiu 26: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 12 dies, pH = 4 (tampó concentrat)	252	163	17			20	15			
Cultiu 27: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 12 dies, pH = 4 (tampó concentrat)	62			19	0	-				
Cultiu 28: Medi líquid arròs <i>Indica</i> , 12 dies, pH = 4 (tampó concentrat)	79	112	190	19	26	0	-			

**Taula 12.** Concentració de PR toxina (19) per avaluar la importància de cada soca com a productora de 19. Cada quadre correspon a un cultiu del fong *P. roquefortii* en un recipient diferent.

Els cultius que donen més suport a l'afirmació que l'ATCC 48936 té més capacitat productora que no pas la 48778 són els cultius 26, 27 i 28. La quantitat de 19 produïda en aquests cultius és molt diferent entre ambdues soques (62-252 mg/l per a l'ATCC 48936 front a 0-26 mg/l per a l'ATCC 48778).

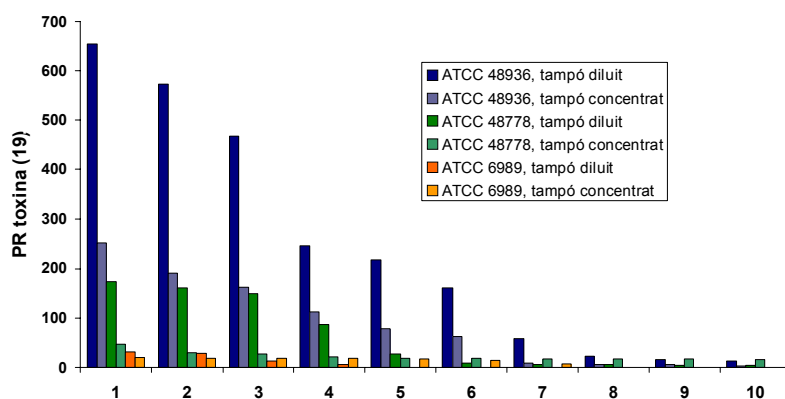
En el cultiu 19 amb tampó diluït, quan es va analitzar la quantitat de 19 produïda amb la soca ATCC 48936

també va ser molt superior a la de l'ATCC 48778. El tampó concentrat no va permetre obtenir **19** amb cap de les dues soques.

En el cultiu 18 la producció de les dues soques (48936 i 48778) fou molt similar, tot i que la producció de l'ATCC 48778 fou lleugerament superior (173 mg/l front a 161 mg/l). Tot i així, en aquest cas no es podia considerar que la capacitat productora de 48778 fos major perquè la producció en els 6 flascons avaluats va ser molt variable i, com ja s'ha comentat, la quantitat de PR toxina (**19**) promig determinada va ser molt semblant. A més, els cultius 2 i 3, realitzats sota les mateixes condicions que el cultiu 18, produïren 217 i 246 mg/l de PR toxina (**19**) respectivament; valors força superiors als obtinguts amb la soca ATCC 48778 en el cultiu 18.

Tot i que els cultius 21, 22, 23 i 26 no permetin afirmar que la capacitat productora de l'ATCC 48778 sigui major que la de l'ATCC 6989, el fet que en els cultius 18 i 19 la producció de **19** per part de l'ATCC 48778 hagi estat molt superior, fa pensar que aquesta soca és capaç de produir major quantitat de **19** que no pas l'ATCC 6989.

Donat que les condicions de tots els cultius de la **Taula 12** eren totes similars (medi arròs Indica) i únicament diferien en el tipus de tampó emprat, en la **Figura 36** es presenta la producció de PR toxina (**19**) per part de les tres soques segons el tampó emprat. En aquesta figura s'observa altre cop que la soca que produeix més PR toxina (**19**) és l'ATCC 48936 (en blau), a continuació la 48778 (en verd) i finalment la 6989 (en taronja).



**Figura 36.** Producció de PR toxina (**19**) en els 10 flascons d'Erlenmeyer on la producció ha estat més elevada.

Aquestes conclusions es veuen corroborades pel disseny d'experiències de l'apartat 2.3.3.5 en que s'ha treballat altre cop amb les tres soques.

A part d'inocular les soques soles, també es van assajar mesclades d'aquestes. Segons els estudis realitzats per Van den Tempel *et al.*<sup>169</sup> la producció de metabòlits secundaris tal com les toxines, pot ser potenciada per la coinoculació de espècies semblants de microorganismes. En aquest estudi es treballa coaplicant en un mateix medi *Penicillium roquefortii* i *Penicillium caseifulvum*. Per la seva banda, Nielsen *et al.*<sup>170</sup> descriuen que els metabòlits detectats en cultius duals (on s'empra *P. roquefortii* i *P. camemberti* com a iniciadors) foren similars als trobats pels cultius individuals, tot i que, en alguns casos, s'observen variacions, arribant a detectar un augment de la concentració de certes micotoxines en cultius duals enlloc de cultius individuals.



En la **Taula 13** es pot apreciar que en cap dels cultius realitzats barrejant soques de fong té lloc un increment de la producció de PR toxina (19) front a inocular una de les soques per sí soles. Així doncs, en cap de les mescles emprades se supera la producció de 19 de la soca que més ha produït a l'inocular-la sola. Per exemple, en el cultiu 28 la màxima producció de l'ATCC 48936 és de 190 mg/l mentre que la de la mescla és únicament de 91 mg/l. En el cultiu 27 passa quelcom semblant: 62 mg/l per a la soca 48936 i 42 mg/l per a la mescla 48936/48778. Finalment, en el cultiu 26, l'ATCC 48936 va produir 252 mg/l mentre que la mescla 48936/48778 va produir 238 mg/l i la mescla 48936/6989, 168 mg/l. La mescla 48778/6989 no va produir el metabòlit d'interès.

Es pot concloure que és millor inocular una única soca que no pas una mescla d'aquestes per a maximitzar la producció de 19, i altre cop, la soca amb major capacitat productora ha estat l'ATCC 48936.

Cultiu	Soques	Producció 19 mg/l	Soques	Producció 19 mg/l
Cultiu 28	ATCC 48936/48778	53	ATCC 48778	19
		91		26
		64		0
			ATCC 48936	79
				112
				190
Cultiu 27	ATCC 48936/48778	21	ATCC 48936	62
		42		
		35		
		26	ATCC 48778	19
		18		0
		22		
Cultiu 26	ATCC 48936/48778	209	ATCC 48936	252
		238		163
		226		
	ATCC 6989/48778	0	ATCC 48778	17
		0		
		145		20
	ATCC 6989/48936	26	ATCC 6989	15
		168		

**Taula 13.** Cultius on s'ha estudiat la influència de mesclar soques de *P. roquefortii* en la producció de 19.

### 2.3.3.3. Medi de cultiu

El medi de cultiu és un factor determinant en la producció de metabòlits secundaris, com és el cas de la PR toxina (19). Les condicions òptimes per a la producció d'una toxina poden ser diferents, fins i tot, entre soques del mateix fong.<sup>171</sup> Per altra banda, en certes ocasions, determinats compostos introduïts al medi de cultiu poden provocar la no producció de certs metabòlits secundaris. Així doncs, el clorur sòdic és un inhibidor de la producció de toxines en el *Penicillium caseifulvum*,<sup>170</sup> i l'àcid octanoic de la producció de la PR toxina (19) en el *Penicillium roquefortii*.<sup>172</sup> Se suposa que l'àcid octanoic actua sobre diferents compostos volàtils precursors biosintètics de la toxina 19. D'aquesta manera, es pot utilitzar *P. roquefortii* en l'elaboració de formatges ja que l'àcid octanoic, entre altres substàncies presents al formatge, impedeix que es produeixi la toxina. La lactosa també impedeix la producció de 19.<sup>173</sup>

En un principi, es va treballar amb un medi líquid d'extracte d'arròs, per analogia als treballs de Chang *et*

al.<sup>147</sup> Després, com a conseqüència dels mals resultats obtinguts en alguns cultius i, després de corroborar que la soca productora no influïa en aquests, es va decidir variar el medi de cultiu emprat. Per aquest motiu, es van assajar diversos suc de fruites com a medi de cultiu. Aquesta idea va sorgir consultant un article de Moeller *et al.*<sup>171</sup> En ell es comentava que es podia produir PR toxina (19) i altres micotoxines a l'inocular el fong en mostres de most per fermentar-lo. A pesar de que les concentracions de micotoxines variaven molt segons el medi i el temps emprat, en general s'obtenien millors resultats amb extracte de cereals que amb most. Finalment, es va realitzar un disseny d'experiències per acabar de confirmar la bondat del medi de suc front al medi d'extracte d'arròs. A més, en aquest disseny es va incloure el medi descrit per FDA (*Food and Drug Administration*)<sup>174</sup> com a medi de cultiu ja que el laboratori de Microbiologia de l'IQS, en tractar-se d'un medi universal per afavorir la producció de toxines, va recomanar el seu ús.

Durant el cultiu 4 es va assajar la necessitat de centrifugar l'extracte d'arròs un cop filtrat. D'aquesta manera s'elimina una gran part del midó que no s'ha filtrat però es va plantejar com podia afectar a la producció de 19. Les emulsions generades al realitzar les extraccions líquid-líquid amb medis de cultiu de microorganisme sense centrifugar eren molt superiors a les de medis centrifugats, dificultant en gran manera el procés d'extracció. Per aquesta raó, i donat que la quantitat de 19 aïllada en aquest cultiu (246 mg/l per a la mescla de medi centrifugat i sense centrifugar) fou similar a l'obtinguda en el cultiu 3 (217 mg/l amb medi de cultiu centrifugat), es va poder descartar l'ús de medi sense centrifugar.

Pel que fa referència al tipus de tampó emprat en cultivar el fong en un medi líquid d'extracte d'arròs *Indica*, el tampó diluït permet obtenir una major producció de PR toxina (19) que no pas el tampó concentrat. Així doncs, en la **Figura 36**, a excepció de concentracions baixes de 19, amb tampó diluït els resultats són més favorables que no pas amb concentrat. De totes maneres, aquest factor també es torna a avaluar en el disseny de l'apartat 2.3.3.5.

#### 2.3.3.4. Disseny d'experiments emprant suc

Es decideix estudiar la producció de PR toxina (19) per part del *Penicillium roquefortii*, en quatre suc comercials: suc de poma Caprabo, suc de tomàquet Caprabo, suc de taronja Alcosto i suc de préssec i raïm Alcosto. Per tal d'estudiar la influència dels diferents suc com a medi de cultiu, s'inocularen tres flascons d'Erlenmeyer de *Penicillium roquefortii* amb la soca ATCC 48936 (màxima productora de PR toxina (19) d'entre les tres soques disponibles) per a cada suc. Tots els suc es van complementar amb un 7.5% de sacarosa i un 1% d'extracte de llevat, però no es va afegir, en cap cas, tampó ja que el pH inicial òptim és de 4 i els suc ja tenen un pH similar a aquest valor. El suc de poma presenta un pH de 3.61, el de tomàquet de 4.21, el de taronja de 3.54 i el de préssec i raïm de 3.70. A més, també s'estudià la influència del centrifugat d'aquests suc de cara a la producció de la toxina. Es va realitzar un disseny factorial complet de 3 repeticions amb els factors i nivells a estudiar que es presenten en la **Taula 14**. La producció de PR toxina (19) de les 8 experiències realitzades es mostren a la **Taula 15**.

Factor	Nivell 1	Nivell 2	Nivell 3	Nivell 4
A. Medi	Taronja	Tomàquet	Préssec i Raïm	Poma
B. Centrifugat	Sí	No		

**Taula 14.** Factors i nivells estudiats en el disseny d'experiències.

Suc	Centrifugat	Conc. 19 (mg/l)	Suc	Centrifugat	Conc. 19 (mg/l)
Taronja	Sí	518	Tomàquet	Sí	14
		581			0
		508			0
Taronja	No	789	Tomàquet	No	0
		469			0
		758			0
Préssec i raïm	Sí	510	Poma	Sí	36
		476			10
		455			22
Préssec i raïm	No	361	Poma	No	243
		336			67
		49			134

Taula 15. Resultats del disseny d'experiències amb suc.

Els resultats obtinguts (Taula 16) de la producció de PR toxina (19) s'analitzen mitjançant una anàlisi de variància (ANOVA). A més, en la Taula 17 es presenta els valors de les mitges per mínims de producció de PR toxina (19) juntament amb l'error estàndard de cada mitjana. S'aprecia en la Taula 16 que el factor medi té una influència significativa al nivell del 99.99% donat que el seu valor de p és 0.0000. La interacció entre els factors medi i centrifugat també té un efecte estadísticament significatiu al voltant del 99% ja que el seu valor de p és pràcticament 0.01. Finalment, cal dir que el factor centrifugat no té un efecte estadísticament significatiu ( $p > 0.05$ ).

FONT	Suma de quadrats	Graus Llibertat	Quadrat mig	Valor de p
MEDI	1.35587E+06	3	451956.0	0.0000
CENTRIFUGAT	240.667	1	240.667	0.8719
INTERACCIÓ	131739.0	3	43913.0	0.0133
RESIDUS	143331.0	16	8958.21	-
TOTAL	1.63118E+06	23	-	-

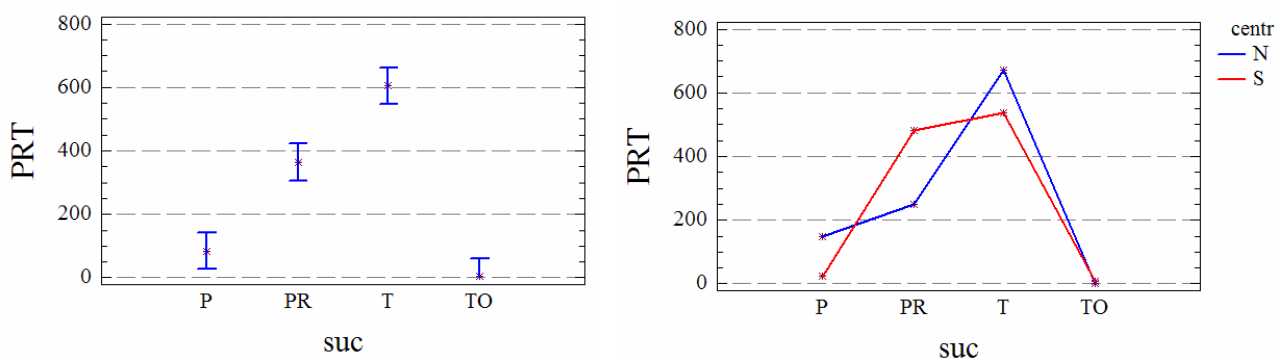
Taula 16. Taula ANOVA dels resultats de la producció de 19.

NIVELL	Freqüència	Mitja	Error estàndard	Límit inferior	Límit superior
Mitja total	24	264	38.6	-	-
Poma	6	85	38.6	3	167
Préssec/raïm	6	365	38.6	283	446
Taronja	6	604	38.6	522	686
Tomàquet	6	2	27.3	-80	84
Centrifugat	12	267	27.3	209	325
No centrifugat	12	261	54.6	203	319
Poma no centrifugat	3	148	54.6	32	264
Poma centrifugat	3	23	54.6	-93	139
Préssec/raïm no centrifugat	3	249	54.6	133	365
Préssec/raïm centrifugat	3	480	54.6	364	596
Taronja no centrifugat	3	672	54.6	556	788
Taronja centrifugat	3	536	54.6	420	652
Tomàquet no centrifugat	3	0	54.6	-116	116
Tomàquet centrifugat	3	5	54.6	-111	121

Taula 17. Taula de mitges per mínims quadrats per a la producció de 19 i de l'error estàndard de cada mitja. Les dos columnes de la dreta mostren el 95.0% dels intervals de confiança per a cada una de les mitges.

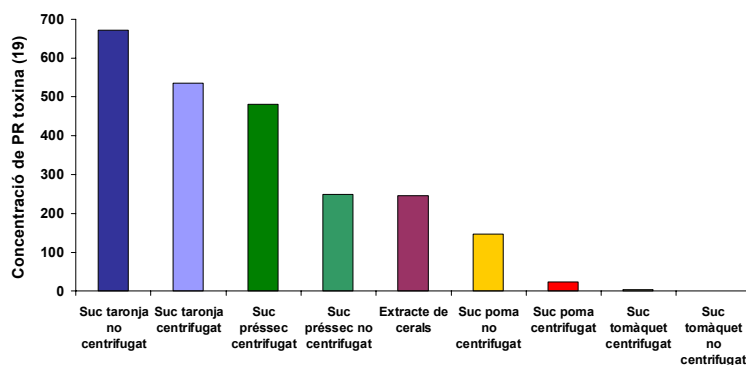
El millor medi de suc, tal com s'aprecia en els gràfics de la **Figura 37**, per a la producció de PR toxina (19) per part de la soca ATCC 48936 de *Penicillium roquefortii*, és el suc de taronja sense centrifugar, ja que és el que ha donat els valors de producció més elevats (672 mg/l de mitja). El medi de taronja centrifugat (536 mg/l), o el de préssec i raïm centrifugat (480 mg/l) també produeixen força quantitat de 19.

Els sucs que no funcionen són el de tomàquet que no produeix PR toxina (19) ja sigui centrifugat o no, ni el de poma centrifugat (23 mg/l). En el gràfic de la dreta de la **Figura 37** també s'aprecia que l'efecte de centrifugar el suc depèn del suc amb que es treballi, per tant, no es pot decidir entre centrifugar o no el suc d'una forma genèrica.



**Figura 37.** A l'esquerra es mostra el gràfic de les mitges, tractant conjuntament el centrifugat i el no centrifugat, de cada suc (poma (P), préssec i raïm (PR), Taronja (T) i tomàquet (TO)) i, a la dreta, la mitja dels sucs segons la centrifugació (en roig es representa els sucs centrifugats i en blau els no centrifugats). La PR toxina (19) s'expressa en mg/l.

En el diagrama de barres de la **Figura 38** també s'aprecia que el suc de taronja (en blau) és el medi que permet una major producció de 19, seguit del suc de préssec i raïm (en verd), el de poma (en color taronja) i, finalment, el suc de tomàquet (en color roig). A més, en grana es presenta la producció de 19 quan es cultiva el fong en extracte de cereals i s'observa que, tant el suc de taronja com el de préssec i raïm, tant si es centrifuguen com si no, permeten obtenir una major quantitat de 19 que no pas l'extracte de cereals (246 mg/l), tot i que s'ha de tenir en compte que en un cultiu aïllat, sense poder reproduir-lo, es va assolir una producció de 653 mg/l.



**Figura 38.** Producció de PR toxina (19), en mg/l, segons el medi de cultiu de suc emprat. En blau es presenta el medi de taronja, en verd el de préssec/raïm, en taronja el de poma, en roig el de tomàquet i en grana el d'extracte de cereals.

### 2.3.3.5. Disseny d'experiments final

A la vista del resultat obtingut al canviar el medi de cultiu, es va decidir fer un disseny d'experiències, on s'estudiaren els factors més importants en la producció de PR toxina (19) a tres nivells cadascun (**Taula 18**):

- Factor A: Soca. S'estudiaren les tres soques disponibles al laboratori: ATCC 6989, ATCC 48936 i ATCC 48778.
- Factor B: Medi de cultiu. S'estudiaren els medis de cultiu d'extracte d'arròs varietat Indica, el suc de taronja sense centrifugar i el medi proposat per la FDA característic per a la producció de toxines en fongs (arròs comercial sense closca i aigua desmineralitzada).<sup>177</sup>
- Factor C: Extracte de Llevat. S'estudia l'addició al medi d'extracte de llevat en tres concentracions diferents: 0%, 1% i 2%.
- Factor D: Sucre. S'estudia la quantitat de sacarosa addicionada al medi, en tres concentracions diferents: 0%, 5% i 10%.
- Factor E: Tampó. S'estudia la concentració de tampó addicionada al medi, d'un tampó citrat-fosfat de concentració, en cadascuna de les espècies: 0 mM, 25 mM i 50 mM.

FACTOR	NIVELL 1	NIVELL 2	NIVELL 3
Medi	Ext. Cereal	FDA	Suc
Soca	48936	48778	6989
Ext. Llev.	0	1	2
Sucre	0	5	10
Tampó	0	25	50

**Taula 18.** Factors i nivells estudiats en aquest disseny d'experiències.

Les interaccions que es creu que poden influir més són les que tenen lloc entre el medi i la resta de factors donat que és, juntament amb el factor soca, el més important, sent la resta de factors, modificacions sobre aquest medi. Per tant, es va decidir realitzar un disseny de Taguchi emprant una matriu  $L_{27}(3^{13})$  ja que els graus de llibertat totals, dels cinc factors a tres nivells i de les quatre interaccions que es volien estudiar, eren 26 (**Taula 19**).

Factors i interaccions	Graus de llibertat
A	2
B	2
C	2
D	2
E	2
B x A	4
B x C	4
B x D	4
B x E	4
Total	26

**Taula 19.** Graus de llibertat dels factors i interaccions estudiats.

El diagrama lineal que millor s'ajustava a aquesta matriu es mostra en la **Figura 39**, on 1 correspon al factor B, 2 al factor A, 5 al factor C, 8 al factor D, 11 al factor E, 3-4 a la interacció B x A, 6-7 a la interacció B x C, 9-10 a la interacció B x D i finalment, 12-13 a la interacció B x E.

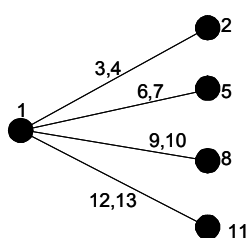


Figura 39. Diagrama lineal que millor s'ajusta a la matriu d'estudi.

En la **Taula 20** es presenta la matriu del disseny i, en la **Taula 21**, la matriu experimental.

Experiment \ Factor	1 = B	2 = A	5 = C	8 = D	11 = E	A x B		B x C		B x D		B x E	
						3	4	6	7	9	10	12	13
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	2	3	2	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	3	1	2	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	1	2	2	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	3	2	3	3	1	1	3	3	2	2
8	1	3	2	1	3	3	3	2	2	1	1	3	3
9	1	3	3	2	1	3	3	3	3	2	2	1	1
10	2	1	1	1	1	2	3	2	3	2	3	2	3
11	2	1	2	2	2	2	3	3	1	3	1	3	1
12	2	1	3	3	3	2	3	1	2	1	2	1	2
13	2	2	1	2	3	3	1	2	3	3	1	1	2
14	2	2	2	3	1	3	1	3	1	1	2	2	3
15	2	2	3	1	2	3	1	1	2	2	3	3	1
16	2	3	1	3	2	1	2	2	3	1	2	3	1
17	2	3	2	1	3	1	2	3	1	2	3	1	2
18	2	3	3	2	1	1	2	1	2	3	1	2	3
19	3	1	1	1	1	3	2	3	2	3	2	3	2
20	3	1	2	2	2	3	2	1	3	1	3	1	3
21	3	1	3	3	3	3	2	2	1	2	1	2	1
22	3	2	1	2	3	1	3	3	2	1	3	2	1
23	3	2	2	3	1	1	3	1	3	2	1	3	2
24	3	2	3	1	2	1	3	2	1	3	2	1	3
25	3	3	1	3	2	2	1	3	2	2	1	1	3
26	3	3	2	1	3	2	1	1	3	3	2	2	1
27	3	3	3	2	1	2	1	2	1	1	3	3	2

Taula 20. Matriu del disseny de Taguchi.

Després de realitzar totes les experiències, la quantitat de PR toxina (19) obtinguda en cadascuna de les repeticions es mostra en la **Taula 22**. També es mostren la mitjana, la desviació estàndard i la relació senyal soroll (s/n) per intentar maximitzar la resposta (**Equació 1**).

Experiment \ Factor	Medi	Soca	Ext. Llev. (%)	Sucre (%)	Tampó (mM)
1	Ext. Cereal	48936	0	0	0
2	Ext. Cereal	48936	1	5	25
3	Ext. Cereal	48936	2	10	50
4	Ext. Cereal	48778	0	5	50
5	Ext. Cereal	48778	1	10	0
6	Ext. Cereal	48778	2	0	25
7	Ext. Cereal	6989	0	10	25
8	Ext. Cereal	6989	1	0	50
9	Ext. Cereal	6989	2	5	0
10	FDA	48936	0	0	0
11	FDA	48936	1	5	25
12	FDA	48936	2	10	50
13	FDA	48778	0	5	50
14	FDA	48778	1	10	0
15	FDA	48778	2	0	25
16	FDA	6989	0	10	25
17	FDA	6989	1	0	50
18	FDA	6989	2	5	0
19	Suc	48936	0	0	0
20	Suc	48936	1	5	25
21	Suc	48936	2	10	50
22	Suc	48778	0	5	50
23	Suc	48778	1	10	0
24	Suc	48778	2	0	25
25	Suc	6989	0	10	25
26	Suc	6989	1	0	50
27	Suc	6989	2	5	0

Taula 21. Matriu d'experiències del disseny de Taguchi en estudi.

Experiment	mg/L de 19	mg/L de 19	Mitja	Desv. est.	Relació s/n
1	16.89	13.46	15.17	2.43	23.45
2	31.81	36.99	34.40	3.66	30.66
3	13.46	38.46	25.96	17.68	25.09
4	16.45	13.46	14.95	2.12	23.36
5	13.46	13.46	13.46	0.00	22.58
6	15.41	13.46	14.43	1.38	23.13
7	16.90	13.46	15.18	2.44	23.46
8	15.65	13.46	14.55	1.55	23.18
9	13.46	13.46	13.46	0.00	22.58
10	3.11	6.89	5.00	2.67	12.06
11	27.31	5.63	16.47	15.33	17.84
12	54.25	30.91	42.58	16.51	31.59
13	1.13	0.66	0.90	0.33	-1.84
14	0.92	0.71	0.81	0.15	-2.01
15	0.45	0.56	0.50	0.08	-6.10
16	24.50	6.03	15.27	13.06	18.36
17	25.00	18.67	21.84	4.48	26.51
18	9.03	27.38	18.21	12.98	21.68
19	20.26	59.43	39.84	27.70	28.66
20	82.60	69.97	76.28	8.93	37.56
21	28.69	18.44	23.56	7.25	26.82
22	18.51	13.46	15.98	3.58	23.75
23	13.46	13.46	13.46	0.00	22.58
24	16.29	13.46	14.87	2.00	23.33
25	13.46	13.46	13.46	0.00	22.58
26	18.63	13.46	16.04	3.66	23.77
27	16.03	13.46	14.74	1.82	23.27

Taula 22. Quantitat de PR toxina (19), mitja, desviació estàndard i relació senyal soroll dels 27 experiments realitzats.

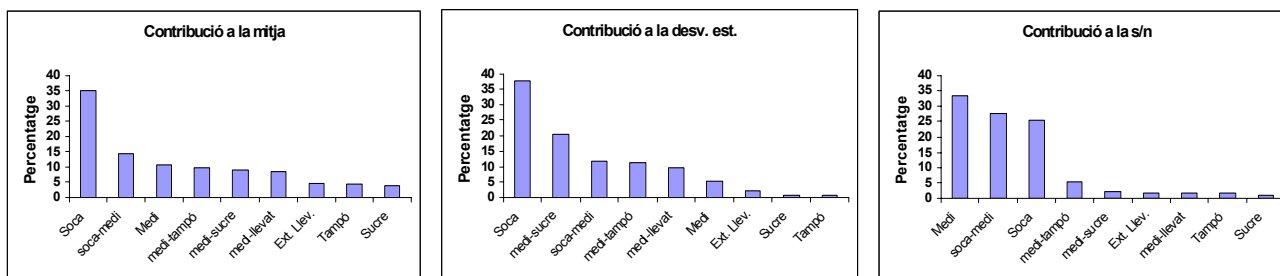
$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

$$s/n = -10 \cdot \log \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right]$$

**Equació 1.** Fórmula emprada per al càlcul de la mitjana ( $\bar{y}$ ), la desviació estàndard (S) i la relació senyal soroll (s/n), on n és el nombre de repeticions (n=2 en el nostre cas) i y el valor obtingut.

En la **Figura 40** es mostra, després d'analitzar segons l'ANOVA de Pareto els resultats, la contribució a la mitjana, desviació estàndard i a la relació senyal soroll de cadascun dels factors i de les interaccions estudiades.

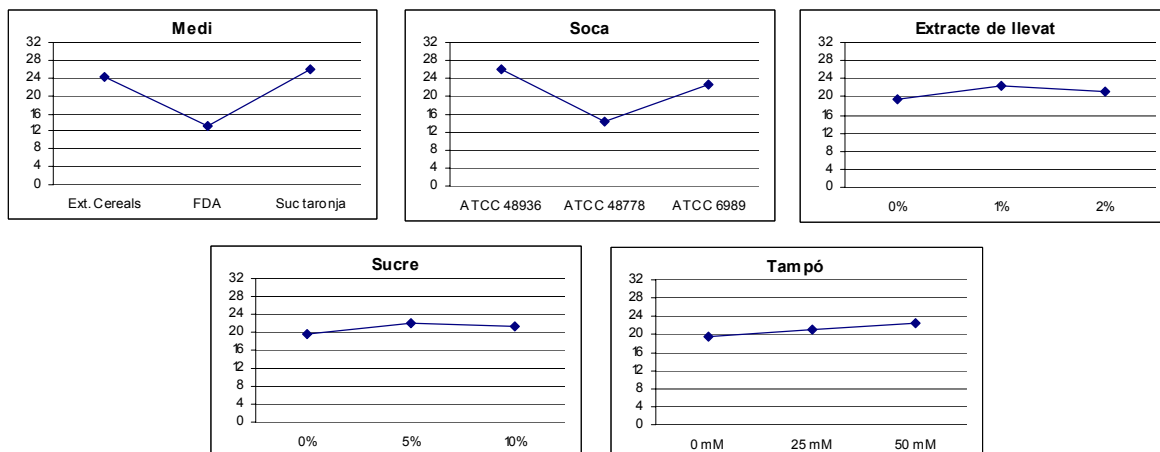


**Figura 40.** Contribució dels factors i interaccions a la mitja, a la desviació estàndard i a la relació senyal soroll.

En funció dels gràfics de la **Figura 40** sembla que els factors més influents per maximitzar la producció de PR toxina (19) són la soca de *Penicillium roquefortii* i el medi en que aquesta es cultiva. En els tres gràfics són els dos factors més influents. Cal afegir però, la importància de la interacció entre aquests dos factors (soca-medi). Si es centra l'atenció en la contribució dels factors i interaccions a la relació senyal/soroll (gràfic que conté informació tant de la mitja com de la desviació estàndard), s'aprecia que els factors i interaccions anomenats contribueixen en més d'un 25% cadascun, mentre que la resta contribueixen en menys d'un 6%. Per altra banda, els factors sucre, tampó i extracte de llevat i, les interaccions medi-llevat i medi-sucre semblen poc rellevants en la producció de PR toxina (19) ja que no superen una contribució del 9% en referència a la mitja ni un 2% en referència a la s/n. La interacció medi-tampó sembla que tingui una influència lleugerament superior a aquestes (10% en la mitja i 5% en la relació s/n).

També s'han elaborat els gràfics factorials dels factors per tal de determinar quin era el nivell més convenient en cada cas (**Figura 41**).

**Gràfics factorials obtinguts a partir de la relació senyal/soroll**





## Gràfics factorials obtinguts a partir de la mitja

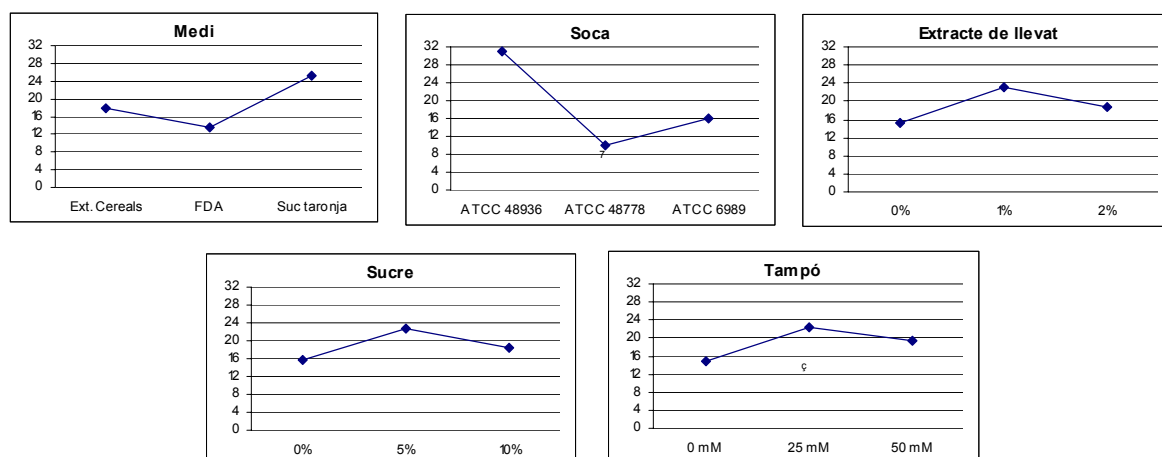


Figura 41. Gràfics factorials on es representa el promig de PR toxina (19) produïda segons cada nivell.

Els gràfics factorials, tant si s'efectuen calculant els valors promigs de la relació senyal/soroll o de la mitja la tendència dels gràfics és similar en els dos casos ja que la desviació comesa en realitzar les repeticions de les experiències no és gaire alta. La producció de PR toxina (19) varia molt segons el medi de cultiu o la soca emprada.

El medi de cultiu que permet obtenir més quantitat de PR toxina (19) és el suc de taronja però cal afegir que, en el gràfic del medi calculat a partir de la relació senyal/soroll, s'obtenen resultats similars amb el suc de taronja i l'extracte de cereals. Això vol dir que, si bé amb el suc taronja s'obtenen, en promig, millors resultats; amb l'extracte de cereals els resultats són més regulars, doncs la seva desviació estàndard és més petita. Davant d'aquest compromís es pot optar, en un primer moment, per produir PR toxina (19) amb el medi suc de taronja (s'obtenen valors superiors de producció de 19 tant amb els gràfics de mitja com amb els de relació senyal/soroll) i, en cas que la producció sigui molt irregular, es cultiva en medi d'extracte de cereals. En cas que s'haguessin obtingut resultats diferents pel promig i per la relació senyal/soroll, aleshores hauria estat més complicat concloure. En qualsevol cas, el que sí està perfectament clar és que el medi FDA fa que s'obtinguin els pitjors resultats.

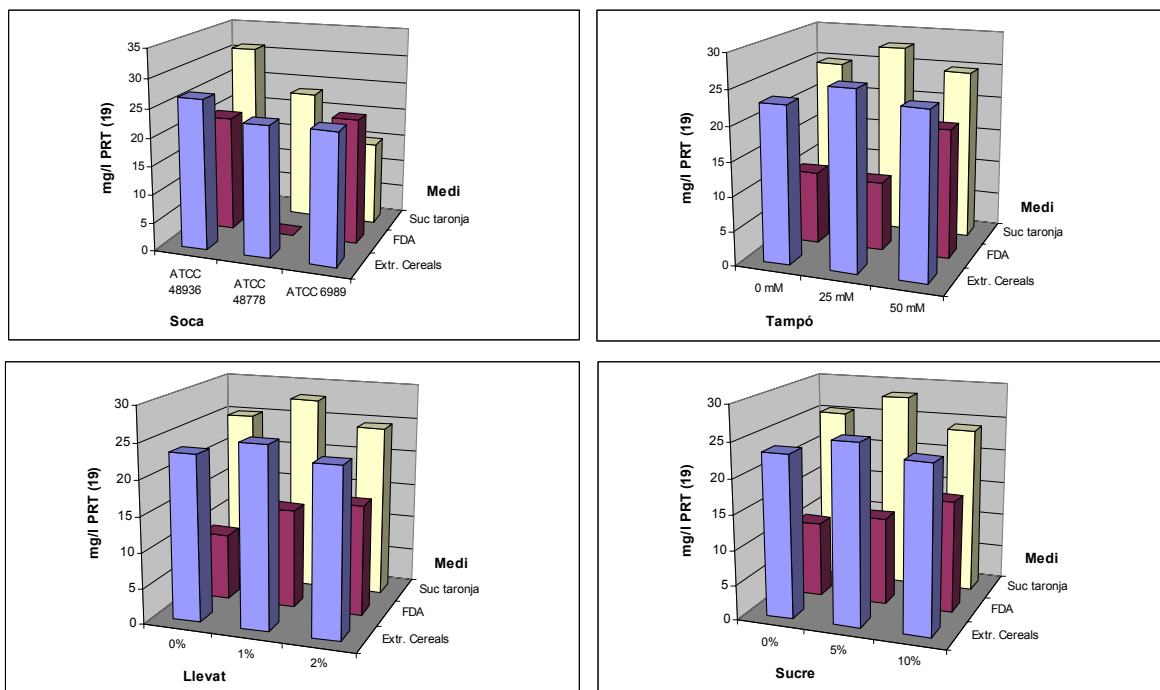
L'ATCC 48936 és la millor soca de *Penicillium roquefortii* i la pitjor, l'ATCC 48778. Però altre cop succeeix quelcom semblant al que succeïa amb el medi de cultiu. En el gràfic de soques calculat a partir de la relació senyal/soroll, s'obtenen resultats similars per a aquestes dues soques. Per tant, tot i que l'ATCC 48936 és la que produeix més, la soca ATCC 48778 és la que permet obtenir una producció més regular. Novament, davant d'aquest compromís, es considera adient emprar la soca ATCC 48936 i, en cas d'una producció mot irregular, emprar l'ATCC 48778. El que sí que queda completament clar és que la soca ATCC 6989 és la que produeix menys quantitat de PR toxina (19).

Els tres nivells d'extracte de llevat, de sucre o de tampó no influeixen de manera significativa en la producció de 19. Tot i així, tant amb l'extracte de llevat com amb el sucre el segon és lleugerament superior als altres dos, un 1% d'extracte de llevat i un 5% de sucre. En canvi, el tampó presenta la producció màxima a 25 ó 50 mM segons si es centra l'atenció en els gràfics factorials calculats a partir de la relació senyal/soroll o la mitja, però la diferència és molt petita. De totes maneres, d'acord amb l'ANOVA de Pareto el factor tampó no és important i, per tant, és tant bo fixar-lo a 25 mM com a 50 mM. La conclusió final sobre

quin és el millor nivell vindrà determinada per la seva interacció amb el medi, a partir del gràfic que s'extreu de la taula de contingència per a la interacció medi-tampó (Figura 42).

També s'analitza, a part de la interacció medi-tampó, la interacció soca-medi, medi-sucre i medi-llevat des del punt de vista de la mitja i de la relació senyal/soroll (Figura 42), per intentar acabar de definir els millors nivells de cada factor.

**Gràfics obtinguts a partir de la relació senyal/soroll**



**Gràfics obtinguts a partir de la mitja**

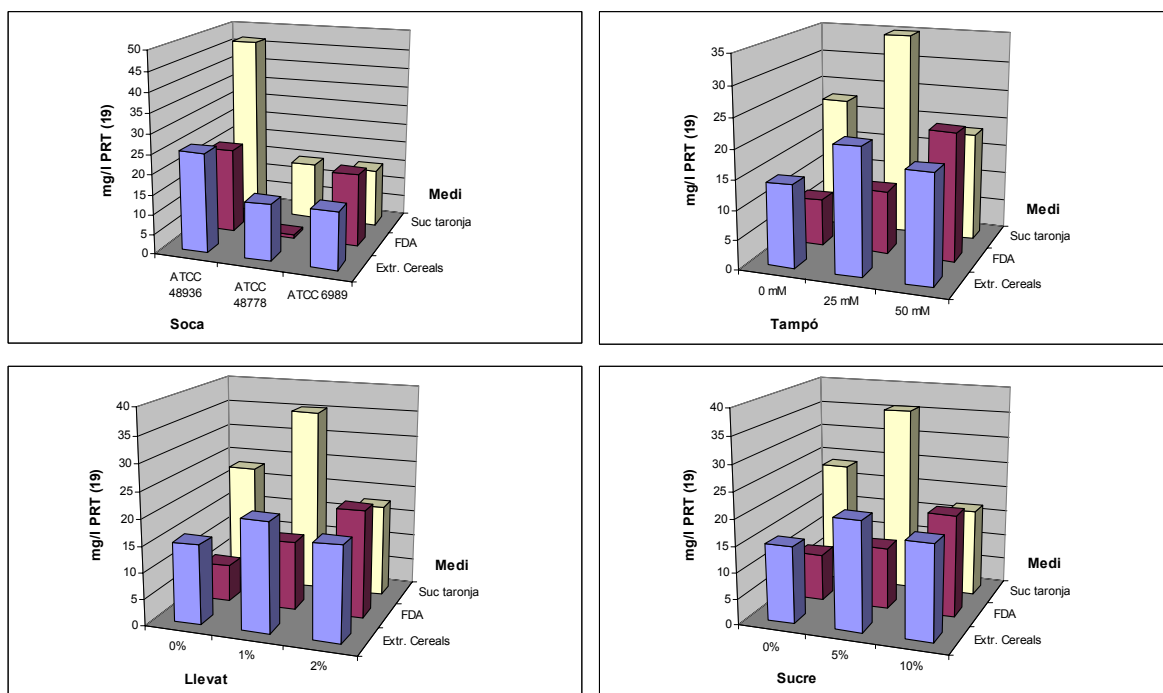


Figura 42. Gràfics de les interaccions soca-medi i medi-tampó.

En la interacció medi-soca s'obté la màxima producció de PR toxina (19) quan s'empra el medi suc de taronja i la soca ATCC 48936, condicions que coincideixen amb les obtingudes en analitzar les gràfiques factorials.

En la interacció medi-tampó s'obtenen els màxims valors per al mateix medi però tamponat a 25 mM, fixant així el nivell d'aquest factor.

En la interacció medi-sucre s'obtenen els millors resultats amb el 5% de sucre i medi suc de taronja i, en la interacció medi-llevat, amb el 1% de llevat i medi suc de taronja.

A la vista dels resultats obtinguts, es pot determinar que les condicions ideals per a maximitzar la producció de PR toxina (19) són cultivar la soca ATCC 48936 en un medi de suc de taronja complementat amb un 1% d'extracte de llevat, un 5% de sucre i tamponar el medi amb citrat-fosfat 25 mM. Per arribar a aquestes condicions s'ha seguit el següent raonament seqüencial:

1. El factor més important és la soca i, els millors resultats, segons la seva gràfica factorial, s'obtenen amb l'ATCC 48936.
2. A continuació, cal tenir en compte la interacció soca-medi. D'acord amb el gràfic de la interacció i havent ja fixat la soca, ha de ser el medi suc de taronja.
3. El medi és el següent factor en importància i, segons la gràfica factorial, el suc de taronja és el millor. Aquests resultats concorden amb la decisió presa en el punt 2.
4. Interacció medi-tampó. D'acord amb la gràfica d'interacció i donat que s'ha fixat el suc de taronja com a medi, tant amb la mitja com amb la relació senyal/soroll s'escull 25 mM com a concentració de tampó.
5. Interacció medi-sucre. Es fixa a 5% d'acord amb la gràfica de la interacció i després d'haver fixat el medi com a suc de taronja ja que en la gràfica factorial les diferències són molt petites.
6. Interacció medi-llevat. Es fixa a 1% d'acord amb la gràfica de la interacció. Les diferències entre els nivells del factor llevat són pràcticament nul·les en les gràfiques factorials.

Aquestes condicions queden corroborades amb l'experiment 20 ja que s'ha realitzat amb les condicions òptimes trobades i és, amb diferència (**Taula 22**), l'experiment en que s'obtenen millors resultats. Fet que indica que les condicions trobades són les més idònies per a la producció màxima del metabòlit 19 en el medi de cultiu del fong *P. roquefortii*.

Durant aquest estudi també es va analitzar l'aspecte del *P. roquefortii* en quan a color i homogeneïtat de creixement (veure fotografies de l'annex A). En aquest annex s'observa que no tots els cultius presenten el mateix aspecte. S'observa com els cultius amb més producció presenten un aspecte blanc verdós, tot i que no es pot extreure una relació directa entre la producció de PR toxina (19) i l'aspecte del fong. Els cultius en medi de FDA presenten tots un creixement no homogeni però un color molt verd. Els cultius en medi d'extracte de cereals presenten un aspecte blanc marronós en general, a excepció del cultius 7 i 4 que presenten un color més blanc verdós. Els cultius en medi de suc de taronja presenten un aspecte més blanc intens i verd que la resta de cultius.

### 2.3.4. Estudis sobre el procés d'extracció dels metabòlits

Reproduint els treballs realitzats per Wei *et al.*<sup>145</sup> i Moreau *et al.*,<sup>159</sup> el procés d'extracció dels metabòlits d'interès del medi de cultiu líquid, que es va emprar durant la posta a punt de la producció de PR toxina (19), segueix els següents passos:

- Filtrat del medi de cultiu a través d'un embut Büchner i rentat del fong amb una mescla d'aigua i cloroform.
- Triple extracció dels metabòlits d'interès amb cloroform, emprant el mateix volum de dissolvent que de medi aquós. En aquest procés es generen moltes emulsions, la major part de les quals s'eliminen a través de filtracions.
- Rentat de la fase orgànica amb el mateix volum d'aigua.
- Assecat amb sulfat magnèsic anhidre i eliminació del dissolvent a pressió reduïda.

Aquest procediment d'extracció era laboriós i no evitava la formació d'emulsions que, com ja s'ha comentat, és important trencar-les perquè en elles s'hi podia trobar fins a un 40% de la PR toxina (19) present en el medi. Per aquesta raó, en els següents cultius es va decidir centrifugar el medi de cultiu enlloc de filtrar-lo amb un embut Büchner i liofilitzar-lo per fer una extracció sòlid-líquid amb cloroform enlloc de fer l'extracció líquid-líquid. D'aquesta manera, a més d'un estalvi considerable de temps, s'evitaven en gran mesura les emulsions. Doncs, el filtrat amb l'embut Büchner comportava molts problemes en taponar-se sovint i, l'extracció líquid-líquid comportava un laboriós treball per a eliminar les emulsions (filtrat a través d'un embut Rossich). Per tant, aquest procediment va quedar de la següent manera:

- Centrifugat del medi de cultiu i decantació del líquid sobrenedant.
- Congelació ràpida amb una mescla d'acetona i neu carbònica.
- Liofilització del medi de cultiu congelat.
- Extracció sòlid-líquid mitjançant l'agitació del medi liofilitzat en cloroform després d'esmicolar el medi de cultiu liofilitzat. Filtrat de la mescla resultant.
- Assecat de les fases orgàniques amb sulfat magnèsic anhidre i eliminació del dissolvent a pressió reduïda.

Amb aquest procediment s'evitava la formació d'emulsions i el procés no resultava tan laboriós. El principal desavantatge que mostrava aquest nou mètode d'extracció és que el procés de liofilització, quan es treballava amb volums de medi de cultiu superiors als 2-3 litres, trigava entre dos i tres dies, fet que alentia considerablement el procés. Donat que en cultius posteriors es va intentar, a part d'avaluar factors que podien afectar al creixement del *P. roquefortii*, produir la màxima quantitat possible de PR toxina (19) (es treballava amb volums de medi de fins a 6 litres), es va decidir retornar al primer mètode d'extracció però modificant-lo lleugerament per fer-lo més eficient.

El filtrat amb un embut Büchner es va substituir per un filtrat amb un col·lador de 40 cm de diàmetre i 1 mm de pas de malla, i l'extracció líquid-líquid amb cloroform es va realitzar amb reactors de 10 L equipats amb agitadors mecànics enlloc d'emprar embuts d'extracció d'un litre. Amb el col·lador s'evita que l'embut es taponi i amb aquests reactors s'agilitza el procés d'extracció, fins i tot s'aconsegueix trencar gran part de les emulsions generades deixant-les passar a través de la boca del reactor. A més, es va comprovar que les extraccions amb la meitat de dissolvent que de medi líquid era suficient per extreure la PR toxina (19). Per tant, el procés d'extracció final emprat en la majoria de cultius és el que es detalla a continuació:

- Filtrat del medi de cultiu a través d'un col·lador de 40 cm de diàmetre i 1 mm de pas de malla, i rentat del fong amb una mescla d'aigua i cloroform.
- Triple extracció dels metabòlits d'interès amb cloroform en reactors de 10 l, emprant la meitat de volum de dissolvent que de medi aquós.
- Rentat de la fase orgànica amb el mateix volum d'aigua.
- Assecat amb sulfat magnèsic anhidre i eliminació del dissolvent a pressió reduïda.

### 2.3.5. Estudis del procés d'aïllament dels metabòlits

#### 2.3.5.1. Millora de l'aïllament de PR toxina (19) del medi de cultiu

Com ja s'ha comentat anteriorment, Wei *et al.*<sup>145</sup> aconseguien aïllar la PR toxina (19) del cru obtingut del medi de cultiu del *Penicillium roquefortii* després de tres columnes cromatogràfiques: 1) columna recta emprant sílice com a fase estacionària i cloroform com a eluent, 2) columna flash emprant sílice com a fase estacionària i una mescla de metanol/cloroform (4:96, v/v) com a eluent i, finalment, 3) una columna flash emprant Sephadex LH-20 com a fase estacionària i com a eluent Skellysolve B/cloroform (40:60, v/v).

Durant el transcurs d'aquesta tesi es va millorar aquest procés aconseguint aïllar la PR toxina (19) després d'una sola columna flash, emprant com a eluent una mescla de ciclohexà:acetat d'etil:cloroform en proporció 1:1:1 (v/v/v).

En un primer moment, es va poder aïllar PR toxina (19) després de dues columnes flash. Emprant com a eluent CHCl<sub>3</sub>:MeOH (98:2, v/v) s'aïllava una part de 19 del cru del medi de cultiu i, l'altra part s'obtenia emprant ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (1:1:1, v/v/v) en una segona columna. Després, es va assajar l'ús d'una columna recta eluïda amb ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (10:1:1) però, tot i aïllar 19 amb una única columna, el procés era lent i no s'observava presència d'aquest metabòlit fins a la fracció 8.

Per aquesta raó, es va assajar l'aïllament amb una columna flash emprant, aquest cop, una mescla de ciclohexà:acetat d'etil:cloroform en proporció 1:1:1 (v/v/v). Així, en la segona fracció ja es pot aïllar més del 85% de la PR toxina (19) present en el cru. Aquesta s'obté amb una puresa aproximada del 70% (determinada per <sup>1</sup>H-RMN), suficient per a realitzar la cristal·lització final i, així, poder disposar de PR toxina (19) pura per a la síntesi dels mimètics del KM-01 (9). La PR toxina (19) restant es troba impurificada en la tercera fracció d'aquesta columna però no se sotmet a un nou procés separatiu fins que no s'han realitzat varies separacions d'aquest tipus. Llavors, les fraccions impures es reuneixen en una de sola, que se sotmet a un procés de separació per cromatografia flash (ciclohexà:acetat d'etil:cloroform en proporció 1:1:1 (v/v/v)).

#### 2.3.5.2. Aïllament i identificació d'eremofortina C (20) i D (27)

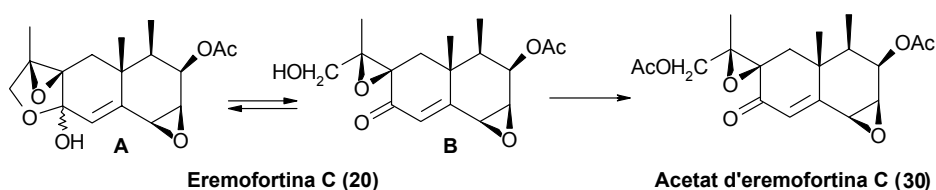
Durant la posta a punt de la metodologia d'obtenció de metabòlits secundaris útils per a emprar-los com a producte de partida per a la síntesi de mimètics del KM-01 (9), es va poder aïllar PR toxina (19) però no es va detectar ni aïllar eremofortina C (20). En els posteriors cultius, es van dedicar part dels esforços al seu aïllament. Amb aquesta finalitat, es va realitzar un cultiu que es va sotmetre a cromatografia flash amb l'eluent que permetia separar 19 amb una única columna flash (ciclohexà:acetat d'etil:cloroform en proporció

1:1:1 (v/v/v)). Es van obtenir cinc fraccions, dos d'elles corresponien a fraccions minoritàries de crus complexes, la segona corresponia a PR toxina (**19**) del 70% de puresa, la tercera a PR toxina (**19**) molt més impurificada i la darrera, a un compost desconegut. Aquest compost presentava un  $R_f = 0.13$  amb una mescla de ciclohexà:acetat d'etil (1:1, v/v) i de 0.39 amb acetat d'etil. Tot i que per CCF es detectava una única taca, per  $^1\text{H-RMN}$  s'observava que es tractava d'una mescla de compostos.

Aquesta tercera fracció es va sotmetre a un procés de purificació per cromatografia Lobar (rdt = 94%) emprant com a eluent ciclohexà:acetat d'etil:cloroform en proporció 1:3:1 (v/v/v). S'obtingué una fracció minoritària de PR toxina (**19**) i una altra que, per  $^1\text{H-RMN}$ , corresponia a una mescla de compostos. Aquesta darrera fracció es va sotmetre a un procés de cristal·lització en èter dietílic que va rendir un producte cristal·lí (rdt. 10%) que s'identificà en funció de les seves dades espectroscòpiques i punt de fusió<sup>158</sup> com l'eremofortina D (**27**). Tot seguit, es va detectar per  $^1\text{H-RMN}$  que el metabòlit **27** present en les aigües mare de cristal·lització era un producte molt minoritari respecte a altres dos de majoritaris.

Donat que Chang *et al.*<sup>147</sup> descriuen que en els cultius de *P. roquefortii*, realitzats en les condicions reproduïdes en aquest treball, s'obté una quantitat lleugerament superior d'eremofortina C (**20**) que de PR toxina (**19**), es va suggerir que en les aigües mare de cristal·lització es podia trobar **20**. El fet que aquest metabòlit sigui el precursor biogenètic immediat de **19** i **27** (**Figura 28**)<sup>159</sup> i que l'eremofortina C (**20**) sigui una estructura que es troba en equilibri entre dos compostos (**Figura 26**),<sup>146,152</sup> també donaven suport a aquesta hipòtesi. Si aquesta hipòtesi fos certa, l'equilibri entre les formes ciclada (**20A**) i no ciclada (**20B**) de **20**, explicaria que s'observés, en l'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  de les aigües mare de cristal·lització, la presència dos productes majoritaris diferents de l'eremofortina D (**27**). Fins i tot, la similitud estructural entre la forma ciclada de **20** (**20A**) i l'eremofortina D (**27**) (únicament difereixen en un doble enllaç) explicaria que aquests metabòlits presentessin el mateix factor de retenció (darrera fracció de la cromatografia del cru del medi de cultiu). Això, també explicaria la gran dificultat en la detecció i aïllament de **20**.

Finalment, per corroborar aquesta hipòtesi, es va acetilar la fracció que es considerava rica en eremofortina C (**20**) per obtenir l'acetat de l'eremofortina C (**30**). Aquest producte és fàcilment identificable per espectroscòpia ja que es tracta d'una única espècie (l'hidroxil de la seva estructura, en estar protegit, no pot formar l'enllaç hemiacetàlic intramolecular com en el sesquiterpè **20** i, així s'evita la ciclació de la molècula) (**Figura 43**). Es va realitzar l'acetilació de la fracció rica en eremofortina C (**20**) (aigües mare de cristal·lització) amb anhidrid acètic i piridina en quantitats equivolumètriques. Es va obtenir **30** amb un rendiment del 93%. Després, es va cristal·litzar d'èter etílic (rdt. 37%) i es va identificar en funció de les seves dades espectroscòpiques i el seu punt de fusió. La seva identificació va comportar la identificació indirecta de **20**.



**Figura 43.** Acetilació de l'eremofortina C (**20**).

A mode de resum, a la **Figura 44** s'esquematitza el procés de separació i purificació dels metabòlits produïts pel fong *Penicillium roquefortii* que s'han aïllat i identificat en aquest treball.

Un cop identificada l'eremofortina C (20), es va intentar seguir una nova estratègia, basada en separacions cromatogràfiques amb la fase estacionària impregnada amb nitrat de plata, per separar-la de la PR toxina (19). El catió Ag (I) interacciona amb els dobles enllaços produint una interacció diferencial entre els dos compostos que en possibilita la separació. Aquesta estratègia va ser assajada sobre cromatografia de capa fina amb èxit. Els factors de retenció obtinguts per 20 i 27 van ser de 0.39 i 0.34, respectivament, emprant acetat d'etil com a eluent. El factor de retenció quan no es va emprar la fase estacionària impregnada amb nitrat de plata va ser, per ambdós compostos, de 0.41.

Així, es va realitzar una separació de 4 fraccions d'eremofortina C (20) provinents de diferents cultius. Es va emprar una columna flash on la fase estacionària era sílice impregnada amb nitrat de plata i, com a eluent, una mescla de ciclohexà:cloroform:acetat d'etil (2:2:1). Es van obtenir 7 fraccions, tres de les quals estaven integrades per 20 i 27 en diferents proporcions, és a dir, que no es va aconseguir separar 20 de 27 per aquest procediment. Tot i que la fracció més rica en eremofortina C (20) presentava una puresa del 80%, la seva purificació per cristal·lització és molt difícil, si no impossible. Per tant, com ja s'ha comentat, s'opta per emprar la PR toxina (19) com a producte de partida per a la síntesi de mimètics del KM-01 (9) i, en cas d'aïllar eremofortina C (20), aquesta es transformarà en 19 quan se'n disposi d'una quantitat suficient.

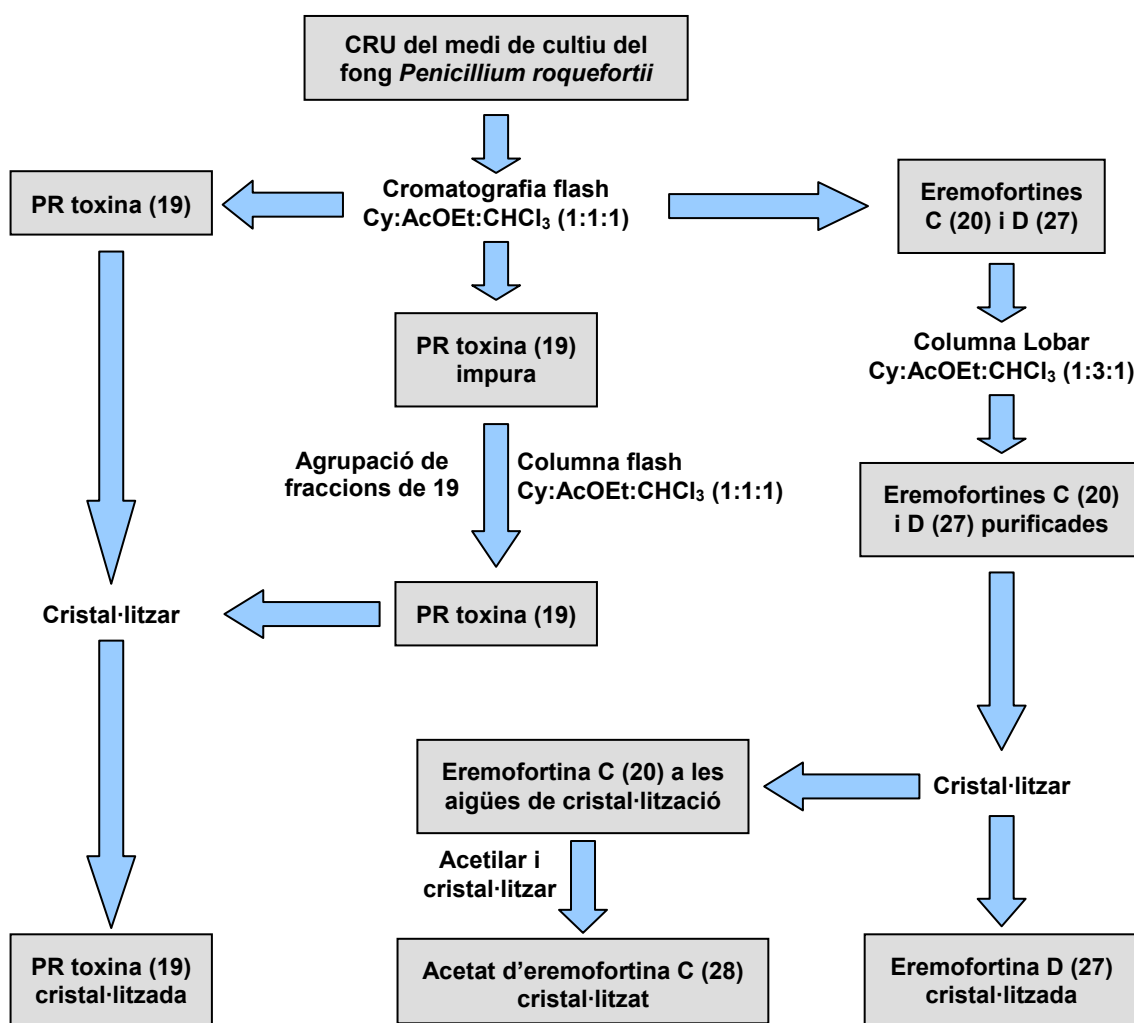


Figura 44. Esquema de l'aïllament de PR toxina (19), eremofortina C (20) i D (27).

### 2.3.5.3. Transformació de PR toxina (19) en eremofortina C (20)

En aquest treball, es va dur a terme la reducció de PR toxina (19) a eremofortina C (20) (Figura 45) per a poder acabar d'identificar l'eremofortina C (20). Així, es va poder comparar amb l'obtinguda en l'aïllament del medi de cultiu del fong *P. roquefortii*.

En la bibliografia es troba descrita la reducció de 19 a 20 (Figura 45) emprant borohidrur sòdic a -5 °C durant 20 minuts.<sup>152</sup>

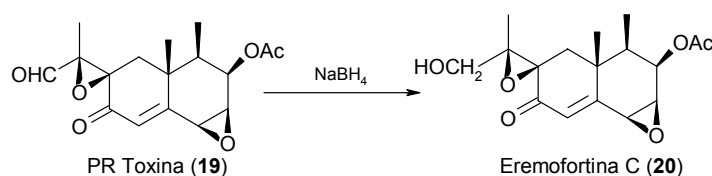


Figura 45. Reducció de PR toxina (19) a eremofortina C (20).

El rendiment de la reacció únicament és del 41% després de purificar el cru per cromatografia de columna i recristal·litzar l'eremofortina C (20) amb èter però es recupera un 50% del producte de partida. A més, és necessari controlar molt bé la quantitat de reductor adicionada i la temperatura de treball per tal d'evitar una sobreredució de la PR toxina (19) i arribar fins a la tetrahidro PR toxina (31) (Figura 46).<sup>152</sup> De fet, si la PR toxina (19) es fa reaccionar amb un excés de borohidrur sòdic i es deixa reaccionar a 40 °C durant 2 hores s'obté, amb un rendiment del 67%, la tetrahidro PR toxina (31) enlloc d'obtenir l'eremofortina C (20).<sup>145</sup>

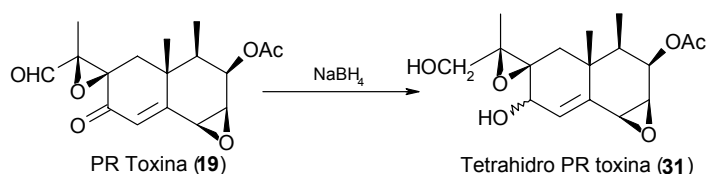


Figura 46. Reducció de PR toxina (19) a tetrahidro PR toxina (31).

En cas de produir-se la sobreredució, segons Capasso *et al.*,<sup>175</sup> el compost 31 pot ser transformat en 20 mitjançant el reactiu de Fetizon, un oxidant suau format per  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  sobre cel·lita<sup>176</sup> (Figura 47). Després de cromatografiar el cru obtingut i purificar l'eremofortina C (20) amb èter etílic, es pot obtenir aquest eremofil·la amb un rendiment del 49%.

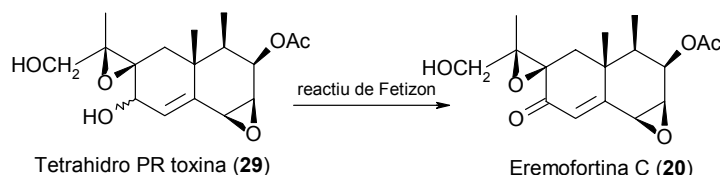


Figura 47. Transformació de tetrahidro PR toxina (31) en eremofortina C (20).

En aquest treball, es va dur a terme la reducció de PR toxina (19) a eremofortina C (20) (Figura 45) fent reaccionar 19, dissolta en metanol, a -5 °C amb borohidrur sòdic en defecte (per evitar la reducció d'altres grups funcionals presents a l'estructura de 19). Tot i que existia encara una quantitat apreciable de producte de partida, la reacció es va aturar després de 40 minuts perquè per CCF només s'observava la formació d'un producte de reducció més polar, sense productes originats per sobrereducions de 19. El cru resultant



es va separar per cromatografia Lobar obtenint-se un 20% del producte de reducció i un 39% de PR toxina (19), el que representa una conversió del 61%. El producte de reducció tenia el mateix factor de retenció que el producte aïllat del medi de cultiu i identificat indirectament (a través de la síntesi del derivat acetat d'eremofortina C (30)) com eremofortina C (20). A més, les senyals de  $^1\text{H}$ -RMN del producte de reducció coincidien amb les de l'eremofortina C (20) del medi de cultiu. Així doncs, aquesta informació va permetre corroborar, un cop més, que el producte aïllat del medi de cultiu era el metabòlit 20.

L'eremofortina C (20) obtinguda per reducció de 19, no està impurificada amb eremofortina D (27) i, per tant, s'està en disposició d'identificar les senyals característiques de les dos espècies en equilibri en l'eremofortina C (20). D'aquesta manera, per  $^1\text{H}$ -RMN es pot visualitzar l'equilibri de 20 existent entre les dos formes, ciclada (20A) i no ciclada (20B) ja que les senyals es troben duplicades. De totes elles, les que aporten més informació són, bàsicament, les corresponents a H9 i H3 perquè la resta se solapen o és difícil assignar-les a l'espècie corresponent (Taula 23).

Senyal	forma ciclada (20A)	forma no ciclada (20B)
H9 (s)	5.99	6.39
H3 (dd)	5.23	5.14

Taula 23. Desplaçaments dels protons H3 i H9 de les formes ciclada (20A) i no ciclada (20B) de l'eremofortina C (20).

A pesar de la similitud dels desplaçaments químics de H3, es poden assignar a l'espècie corresponent per comparació amb els de l'eremofortina D (27) i la PR toxina (19) (Taula 24), doncs, existeix una gran similitud estructural entre les parelles 20A - 27 i 20B - 19.

	forma ciclada (20A)	eremofortina D (27)	forma no ciclada (20B)	PR toxina (19)
H3	5.23	5.24	5.14	5.14

Taula 24. Desplaçaments de H3 en els metabòlits 19, 27 i en les dues espècies de 20.

En aquest treball, s'ha obtingut una relació d'integrals de 1/1.6 entre les espècies ciclada (20A) i no ciclada (20B) a temperatura ambient. Això suposa que el 61% de l'equilibri correspon a la forma no ciclada (20B) de l'eremofortina C (20), percentatge que coincideix amb el descrit a la bibliografia.<sup>152</sup>

Altres dades a favor de l'equilibri de 20 els aporten els espectres d'UV i IR. Tots els metabòlits produïts pel fong *P. roquefortii*, excepte l'eremofortina D (27), posseeixen el mateix cromòfor (carbonil  $\alpha,\beta$ -insaturat) i, per tant, presenten una  $\epsilon$  en l'UV del mateix ordre, al voltant de 15000. Així, mentre que l'acetat d'eremofortina C (30) presenta una  $\epsilon = 16319$  i la PR toxina (19) una  $\epsilon = 14198$ , la  $\epsilon$  calculada per a l'eremofortina C (20) és tant sols de 7419, disminució deguda a que part de la mostra es troba en la forma ciclada (20A), que no presenta aquest cromòfor. A més, en l'IR de 20, també s'observa que la banda corresponent a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $1679\text{ cm}^{-1}$ ) és menys intensa que en l'acetat de l'eremofortina C (30) o la PR toxina (19).

### 2.3.6. Mètode d'HPLC per la detecció i quantificació de metabòlits

Durant la posta a punt del procés d'obtenció de PR toxina (19) es va establir, tenint en compte els treballs de Moreau *et al.*,<sup>164</sup> un mètode de detecció i quantificació de PR toxina (19) per cromatografia líquida d'alta

resolució (HPLC), emprant una columna NovaPak<sup>®</sup> sílica com a fase estacionària. Les condicions de treball que permeteren obtenir un temps de retenció de 7.8 minuts per a la PR toxina (19) foren: fase mòbil THF/n-Hexà (15:85), flux de 1.5 mL/min i volum d'injecció de 10 µL.

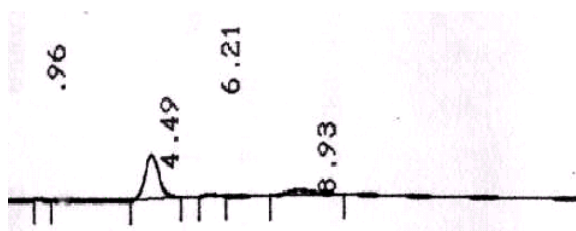
Aquest mètode, a pesar de permetre una bona separació i quantificació de la PR toxina (19), requeria d'un tractament de la mostra previ, és a dir, el pas de la PR toxina (19) d'una mostra aquosa (medi de cultiu) a un medi orgànic (CHCl<sub>3</sub>) per a poder-la analitzar en fase sílica. El tractament que es va fer de la mostra durant els primers cultius consistia en agafar 15-20 mL de medi de cultiu de cada flascó d'Erlenmeyer, filtrar-lo, extreure tres cops amb el mateix volum de cloroform, secar amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, eliminar el dissolvent a pressió reduïda i redissoldre el cru amb 15-25 mL de cloroform just abans de la injecció al cromatògraf.

Aquesta laboriosa manipulació de l'anàlisi es tradueix en una quantificació per defecte. Per una part, aquesta llarga manipulació pot introduir variables no controlades en el procés que no permetin una correcta quantificació de les mostres. Per altra, és necessari un volum de mostra considerable (15-20 mL) i això implica una reducció dràstica del volum de medi que no se sap com pot afectar al creixement del fong.

Tenint en compte aquests inconvenients es va intentar substituir la columna de fase sílica per una fase reversa ja que aquesta permet la injecció de les mostres aquoses directament sense necessitat de cap tractament de la mostra, tret d'una filtració per eliminar les partícules en suspensió i esterilitzar la mostra.

K. Siemens i J. Zawistowski<sup>162</sup> van descriure un mètode analític en fase reversa per a la quantificació de PR toxina (19) en el que empraven una columna LiChrosorb<sup>®</sup> C<sub>18</sub>. Aquest mètode es podia emprar quan es desitjava quantificar 19 sola però, continguda en un cru (com les mostres a analitzar), existeixen problemes de resolució dels pics. De totes maneres, en aquest treball es provaren les fases reverses NovaPak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> i Symmetry<sup>®</sup>.

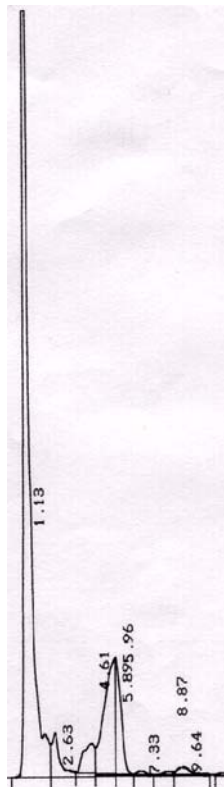
El mètode analític amb la columna NovaPak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> es va intentar posar a punt amb PR toxina (19) de referència. La fase mòbil escollida fou metanol:aigua en proporció 40:60 (v/v) que proporcionava un temps de retenció per a 19 de 4.49 minuts (Figura 48).



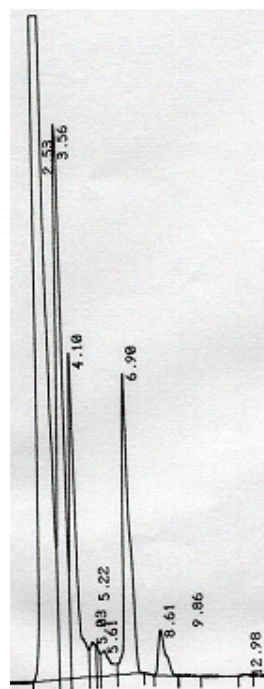
**Figura 48.** Cromatograma de la PR toxina (19) de referència emprant la columna NovaPak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> i l'eluent MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60).

Per tal d'avaluar possibles interferències amb d'altres metabòlits produïts en el medi de cultiu del fong *P. roquefortii*, es va analitzar una mostra provinent del cultiu d'aquest fong però es va observar que el pic d'aquesta se solapava amb altres pics (Figura 49). Aquesta separació no fou possible ni modificant les proporcions de la mescla metanol:aigua emprada com a eluent ni connectant dos columnes NovaPak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> per augmentar el recorregut de la mostra en la fase estacionària. Per tant, es pot concloure que aquest mètode analític, tot i que permet la quantificació de la PR toxina (19) sola, no permet quantificar-la en el

medi de cultiu del *Penicillium roquefortii*. Això va motivar l'ús de la fase reversa Symmetry<sup>®</sup>. En aquest cas, la fase mòbil que proporcionava millor separació fou acetonitril:aigua en proporció 60:40, obtenint-se un temps de retenció per a la PR toxina (19) de 6.90 minuts. La separació aconseguida, tot i que la base del pic de 19 se solapava amb altres pics, fou millor amb aquesta columna que no pas amb la NovaPak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>. De totes maneres, la resolució no era suficient com per a realitzar una correcta quantificació (Figura 50).



**Figura 49.** Cromatograma del medi de cultiu el dia 12 emprant la columna NovaPak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> i l'eluent MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60).



**Figura 50.** Cromatograma del medi de cultiu el dia 12 emprant la columna Symmetry<sup>®</sup> i l'eluent acetonitril:aigua (60:40).

Donat que, mitjançant fase reversa, no es va poder separar correctament la PR toxina (19) de la resta de metabòlits produïts en el medi de cultiu del *P. roquefortii*, es va decidir continuar emprant la fase sílica per a la quantificació de 19. Tot i així, es va creure convenient modificar el tractament de mostra necessari per a quantificar les mostres. El nou tractament havia de consistir principalment en l'eliminació d'aigua per poder introduir les mostres en la columna de sílica.

Inicialment, es va intentar eliminar l'aigua del medi de cultiu directament a pressió reduïda per arrossegament amb tetrahidrofurà o mitjançant la formació d'un azeòtrop, amb propanol per exemple, i posterior dissolució del residu amb cloroform. Aquest mètode es va descartar perquè era molt laboriós i difícil d'estandarditzar, doncs, la presència de partícules sòlides produïa ebullicions no controlades. Per això, es va proposar la liofilització com una alternativa més senzilla i eficaç. D'aquesta manera, era suficient amb una alíquota de 1 mL de mostra, congelar-la amb neu carbònica i liofilitzar-la. El residu sòlid obtingut era sotmès a una extracció sòlid-líquid, es filtrava i s'enrasava a 5 mL en un matràs aforat (volum suficient per dissoldre tota la PR toxina (19) present en el residu).

Es pot concloure, que per a la quantificació de PR toxina (19) s'empra el mètode analític posat a punt a

l'inici de la tesi (fase estacionària sílica). Cada cop que es quantifiquen les mostres del medi de cultiu no es realitza una nova recta de calibrat sinó que aquesta es valida mitjançant la injecció de diversos patrons de PR toxina (**19**) de concentració coneguda. La recta de calibrat, degut al preu elevat d'aquest metabòlit, únicament es repeteix un cop l'any (en totes elles s'han obtingut resultats equivalents).

Per detectar l'eremofortina C (**20**) per HPLC es va emprar la mateixa columna NovaPak Sílica que per a la PR toxina (**19**) però variant la fase mòbil. El metabòlit **20** va presentar un temps de retenció de 9 minuts quan la fase mòbil era cloroform:acetat d'etil en proporció 70:30 (v/v). Tot i que es van fixar les condicions de separació en aquesta tesi, no es va calibrar el mètode analític perquè com ja s'ha comentat el metabòlit més interessant és **19** i a més, per disposar d'eremofortina C (**20**) de referència és necessari sintetitzar-la a partir de la PR toxina (**19**) ja que la seva purificació del medi de cultiu es veu dificultada per la presència d'eremofortina D (**27**).

### 3. Obtenció de bipolaroxina (21) i KM-01 (9)

Tot i haver-se assolit amb èxit la producció de PR toxina (19), es va decidir fer algunes proves amb el fong *Bipolaris cynodontis* per intentar aïllar bipolaroxina (21) i/o KM-01 (9), que es produeixen en poca quantitat però tenen una estructura més semblant a l'estructura desitjada 10 que no pas la PR toxina (19).

Per a la posta a punt de la metodologia de producció de bipolaroxina (21) es va adquirir la soca CBSnr 109894 del fong *Bipolaris cynodontis*, provinent del *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, que es va mantenir en Agar V8.<sup>177</sup>

Es van realitzar dos cultius del fong en medi líquid seguint els treballs realitzats per Watanabe *et al.*<sup>140</sup>

Del primer cultiu que es realitzà, amb 1 L de medi sintètic, després d'aïllar els metabòlits es van obtenir 10 fraccions diferents. D'aquestes fraccions només s'observava la presència d'un grup aldehid (característic dels metabòlits d'interès) per <sup>1</sup>H-RMN en una fracció de 2 mg. La baixa quantitat de mostra dificultat la seva determinació estructural per <sup>1</sup>H-RMN.

Per aquesta raó, es va decidir realitzar dos cultius més, en 1 L de medi sintètic cadascun, per tal d'obtenir la suficient quantitat de mostra per a poder fer el seu anàlisi estructural per <sup>1</sup>H-RMN. Malauradament cap de les fraccions obtingudes després d'aïllar els productes presentava un grup aldehid. Davant la dificultat en l'obtenció dels metabòlits d'interès es va abandonar el cultiu d'aquest fong ja que la PR toxina (19) de que es disposava era suficient com per realitzar la síntesi dels mimètics del KM-01 (9).

#### 4. Conclusions

La PR toxina (**19**) és el metabòlit més útil per a emprar-lo com a producte de partida per a la síntesi d'anàlegs del KM-01 (**9**) ja que s'ha assolit una producció màxima de 789 mg per litre de medi de cultiu del fong *P. roquefortii*, superior a la de la resta de metabòlits. Altres metabòlits que a priori presenten un esquelet més adient (eremofortina D (**27**), bipolaroxina (**21**), dihidrobipolaroxina (**22**) o el propi KM-01 (**9**)) no s'han obtingut per procediments microbiològics i, la seva producció màxima descrita es troba al voltant dels 2 mg/l. En canvi, l'eremofortina C (**20**), tot i produir-se també en quantitats importants, presenta un equilibri entre dos espècies que dificulta treballar amb aquest compost.

S'han produït uns 6 grams de PR toxina (**19**) després de 34 cultius del fong *P. roquefortii*.

Donada la variabilitat en la producció del metabòlit d'interès en el medi de cultiu, s'ha analitzat a fons alguns dels factors que podien conduir a aquesta variabilitat, incloent la realització de dos dissenys d'experiments. Les condicions idònies per maximitzar la producció de **19** són cultivar la soca ATCC 48936 en un medi de suc de taronja complementat amb un 1% d'extracte de llevat, un 5% de sucre i tamponar el medi amb citrat-fosfat 25 mM. Tot i així, cal remarcar que, en tractar-se d'un metabòlit secundari, és força difícil reproduir indefinidament les condicions necessàries per a que el fong produeixi PR toxina (**19**) i llavors es pot substituir el medi de suc de taronja pel d'extracte de cereals.

El seguiment de la concentració de PR toxina (**19**) en el medi de cultiu es realitza per HPLC emprant una columna NovaPak<sup>®</sup> sílica com a fase estacionària, una fase mòbil THF/n-Hexà (15:85), un flux de 1.5 mL/min i un volum d'injecció de 10 µl. El tractament del cru abans d'injectar-lo a l'HPLC consisteix en agafar una alíquota de 1 mL de mostra, congelar-la amb neu carbònica i liofilitzar-la. El residu sòlid obtingut se sotmet a una extracció sòlid-líquid, es filtra i s'enrasa a 5 mL de cloroform en un matràs aforat.

Un cop produït el metabòlit **19** s'extreu filtrant el medi per un col·lador de 40 cm de diàmetre i pas de malla 1 mm, rentant el fong amb una mescla d'aigua i cloroform, extraient tres cops amb la meitat de volum de cloroform emprant reactors de 10 l, rentant la fase orgànica amb el mateix volum d'aigua i, finalment, eliminant el dissolvent a pressió reduïda després d'assecar-lo amb sulfat magnèsic anhidre. Aquest cru es purifica amb una única columna cromatogràfica flash emprant sílice com a fase estacionària i com a fase mòbil una mescla d'acetat d'etil:cloroform:ciclohexà en proporció 1:1:1 (v/v/v).

## **CAPÍTOL 2: ESTUDI COMPUTACIONAL**

## **CAPÍTOL 2: ESTUDI COMPUTACIONAL**

### **1. Esquema del treball computacional**

Per tal de facilitar la lectura d'aquesta part de la tesi doctoral, a continuació, es resumeix breument tot el treball computacional realitzat (**Figura 51**). Cal recordar que l'objectiu global de l'estudi computacional és el disseny d'una o diverses molècules amb una estructura del tipus **10**, anàloga al KM-01 (**9**) i amb possibilitats de desencadenar activitat brassinoesteroide. Aquest objectiu s'aborda a través de diversos blocs que s'han elaborat paral·lelament durant la realització de la tesi doctoral.

- **Estudi computacional preliminar dels anàlegs del KM-01 (9):** Aquest bloc va dirigit vers unes molècules que, intuïtivament, poden desencadenar activitat. Totes les molècules que es defineixen incorporen unes funcionalitats en la seva estructura per tal de mimetitzar les funcionalitats polars de la brassinolida (**1**); és a dir, són estructures del tipus **10**. Es realitza una primera aproximació ràpida mitjançant la qual s'intenta acotar on situar aquestes noves funcionalitats polars sobre l'estructura del KM-01 (**9**). En aquesta primera aproximació la rapidesa s'aconsegueix, principalment, al no realitzar una anàlisi conformacional previ de les molècules en estudi.
- **Estudi computacional exhaustiu dels mimètics del KM-01 (9):** Complementant l'estudi anterior i, després d'acotar les posicions on situar aquestes noves funcionalitats, mitjançant una anàlisi conformacional previ i l'ús de descriptors millor definits, es fixa definitivament la posició d'aquestes. La metodologia emprada en aquest segon anàlisi s'utilitza també per avaluar les característiques estructurals d'altres molècules: inhibidors de la biosíntesi de brassinoesteroides, inhibidors de l'activitat de la proteïna Hsp90, hormones de creixement vegetal i metabòlits que s'obtenen durant el cultiu del fong *Penicillium roquefortii*. Així, s'obté una major informació del tipus de molècules que són necessàries per desencadenar activitat brassinoesteroide.
- **Anàlisi computacional d'àcids comercials:** En aquest estudi es treballa amb una nova metodologia (SHOP, Scaffold HOPing)<sup>178</sup> per a la selecció de molècules actives d'una base de dades. Aquesta s'aplica sobre una sèrie de bases de dades (derivats de l'àcid abscísic, anàlegs antiplaquetaris i antimalàrics) per provar-ne la seva utilitat. Un cop validada aquesta nova metodologia, s'aplica per seleccionar els àcids carboxílics més similars a la cadena lateral de la brassinolida (**1**) i l'homobrassinolida (**2**).

Es considera que, si els plantejaments han estat suficientment adequats, els resultats de les cadenes laterals dels anàlegs del KM-01 (**9**) canalitzaran en un únic tipus de molècula. De totes maneres, el primer estudi permet obtenir informació de tota l'estructura de les molècules del tipus **10**, tant de l'esquelet com de la cadena lateral. En canvi, en el segon estudi es podran seleccionar cadenes laterals diferents de les primeres ja que, enlloc de dissenyar-les, s'ha partit d'una base de dades d'àcids carboxílics comercials.

Per altra banda, i donat que també interessa obtenir la màxima informació possible sobre les característiques estructurals necessàries per sintetitzar compostos amb elevada activitat, es realitza un estudi teòric sobre els anàlegs no esteroidals de Thomas Back (veure pàgina 176).<sup>139</sup> L'equip d'aquest autor va sintetitzar diversos anàlegs no esteroidals que, tot i no presentar activitat per si sols, sí que van resultar actius en coaplicar-los amb l'àcid indol-3-acètic (IAA). L'estudi d'aquests mimètics permet obtenir informació estructural sobre els anàlegs brassinoesteroides i així disposar de major informació per dissenyar amb èxit noves molècules amb activitat brassinoesteroide.



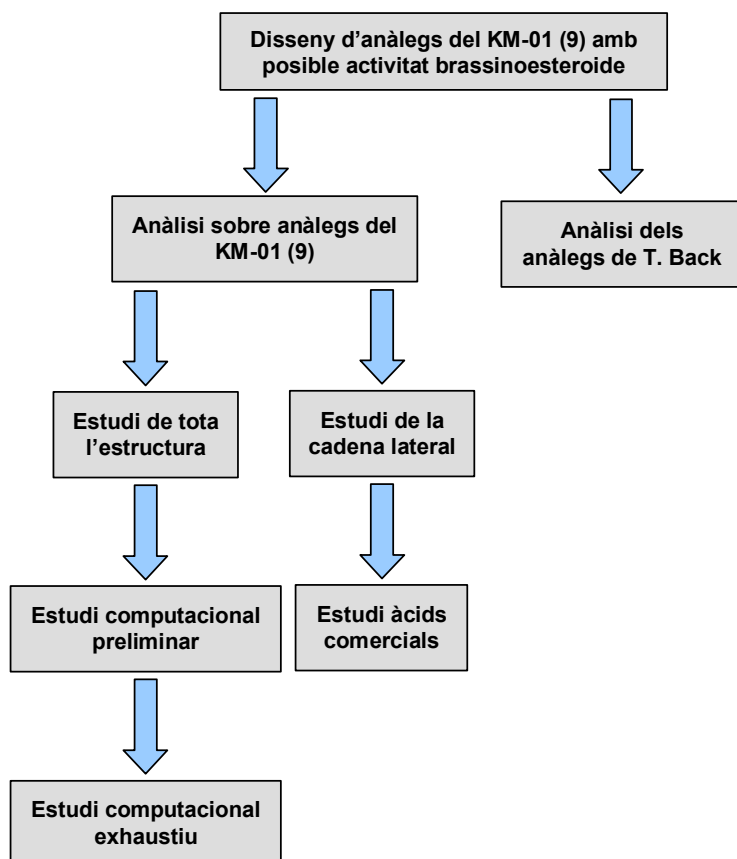


Figura 51. Esquema del treball computacional realitzat.

Tots els diversos estudis computacionals realitzats es poden englobar dins d'un esquema general que es resumeix en la **Figura 52**. El primer pas consisteix en definir les molècules que configuren la biblioteca d'anàlegs amb els que es desitja treballar. A continuació, es realitza una anàlisi conformacional de totes les molècules de la biblioteca (recordar que en l'estudi computacional preliminar dels anàlegs del KM-01 (9) de la pàgina 99 no s'ha realitzat aquesta etapa). Després, es calculen les propietats físico-químiques que serviran per comparar les molècules entre si i, finalment, es tracten les dades obtingudes ja sigui mitjançant tècniques estadístiques, emprant índexs de similitud...

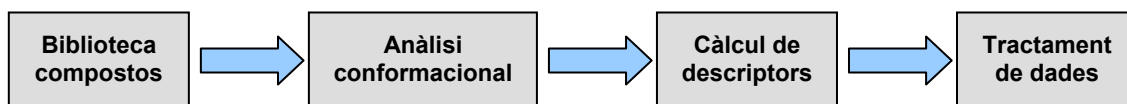


Figura 52. Esquema general dels anàlisis computacionals realitzats.

## 2. Teoria i mètodes

### 2.1. Modelització molecular

La modelització molecular es defineix com la representació, descripció i avaluació de l'estructura o propietats d'un sistema químic requerint l'ús de la informàtica com a eina de treball.<sup>179</sup> El primer pas en l'estudi teòric d'una molècula o sistema químic es fonamenta en realitzar una anàlisi conformacional per estudiar la relació entre l'energia i la geometria de la molècula.

#### 2.1.1. Energia

El càlcul de l'energia és un dels punts principals en l'estudi de les molècules, ja que aquesta es pot relacionar amb moltes de les propietats moleculars. L'optimització de la geometria es realitza mitjançant la minimització energètica. Les tècniques usades habitualment pel càlcul de l'energia s'agrupen en tres grups en funció del nivell de teoria emprat.<sup>180,181</sup>

- Mètodes *ab initio*. Es fonamenten en la mecànica quàntica. Aquests mètodes inclouen el comportament electrònic dels sistemes d'estudi.
- Mètodes semiempírics. Es fonamenten igualment en la mecànica quàntica, però efectuen una sèrie de suposicions i de simplificacions que els fan més assequibles donat que el temps de càlcul és inferior.
- Mètodes de mecànica molecular. Es fonamenten en la física clàssica, de manera que es tracta simplificadament l'energia electrònica donat que està parametritzada en funció de les posicions nuclears.

Tot i que els resultats que s'obtenen amb els mètodes de mecànica molecular no són tan rigorosos des d'un punt de vista teòric, en molts casos seran suficients per donar una explicació dels sistemes d'estudi. Fins al punt que són els mètodes més usats en química computacional ja que ofereixen una velocitat de càlcul 1000 cops superior als mètodes *ab initio* i 100 cops superior als semiempírics. Aquests mètodes permeten abordar l'estudi de sistemes de gran mida (macromolècules, interaccions proteïna-ligand...) que resultaria inabordable mitjançant un estudi mecanoquàntic, donat l'elevat temps computacional que suposa.

#### 2.1.2. Mecànica Molecular: *Force Field*

El conjunt d'equacions i paràmetres estructurats de forma coherent usats per a calcular l'energia d'un sistema a partir de les seves coordenades atòmiques s'anomena *Force Field*. L'elecció d'aquests ve motivada pel tipus de sistemes que es vulguin estudiar, així com de la disponibilitat d'una determinada capacitat de càlcul i de la mida del sistema.

L'expressió d'un *Force Field* contempla diferents termes, cadascun d'aquests termes contindrà una sèrie de paràmetres depenent del tipus d'àtom (*atom type*). Els *atom types* són etiquetes que s'assignen als àtoms i que pretenen resumir tant les seves propietats estructurals (distància, angles d'enllaç, etc...) com químiques (hibridació, aromaticitat, etc...) tenint en compte l'element químic del que es tracta. A continuació s'especifica una equació genèrica d'un *Force Field*:



### 2.1.3. Anàlisi conformacional

La conformació d'una molècula<sup>186,187</sup> es defineix com la disposició tridimensional dels àtoms associada a un valor d'energia. A les molècules hi poden haver enllaços que poden tenir rotació, ja sigui lliure o restringida. El gir d'aquests enllaços dóna lloc a una sèrie de conformacions que formen l'espai conformacional de les molècules. Dins de l'espai conformacional, els estats termodinàmicament estables corresponen a les conformacions de mínima energia.

Hi ha diverses metodologies per a dur a terme l'anàlisi conformacional de les molècules. Entre elles destaquen l'anàlisi sistemàtic i les simulacions per dinàmica molecular, totes dues emprades en la present tesi.

#### 2.1.3.1. Anàlisi sistemàtic

L'anàlisi conformacional sistemàtic és el mètode més complet per explorar l'espai conformacional i, en conseqüència, és un dels més utilitzats.<sup>188-191</sup> L'exploració conformacional es realitza mitjançant la variació ordenada i seqüencial dels paràmetres geomètrics rellevants (p. ex. torsió). Aquest mètode consisteix en mostrejar l'energia en tot el domini rotacional dels angles de torsió d'interès a intervals equiespaiats definits per un pas d'angle ( $\Delta\phi$ ). En cada punt es pot calcular el valor de l'energia o bé es pot optimitzar tota l'energia de la molècula. Per tal de simplificar el càlcul, es considera només l'espai definit pel gir dels enllaços.<sup>187</sup> Així, l'estudi es redueix a fer girar els angles díedres amb un pas d'angle determinat al llarg dels 360°. En cada punt es pot calcular el valor de l'energia. La resolució ve donada pel pas d'angle utilitzat ( $\Delta\phi$ ). A continuació es mostra, a mode d'exemple, com es realitzaria l'anàlisi sistemàtic per un compost amb dos angles díedres ( $n=2$ ) i un pas d'angle ( $\Delta\phi$ ) de 30°:

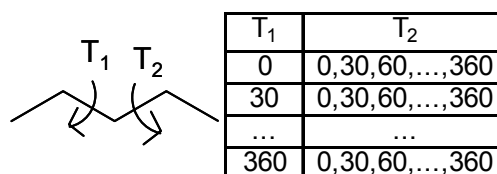


Figura 54. Exemple d'anàlisi sistemàtic.

La principal limitació es troba en la mida de la molècula ja que el nombre de conformacions a analitzar creix geomètricament amb el nombre d'enllaços flexibles que es considerin ( $n$ ) (**Equació 3**). Aquest creixement es coneix com explosió combinatòria<sup>192</sup> i limita la utilització del mètode a molècules que tinguin com a màxim 4 angles de torsió.<sup>193</sup>

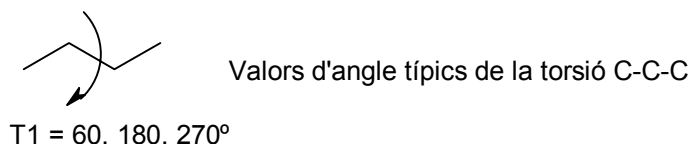
$$n^{\circ} \text{ conformacions} = \left( \frac{360^{\circ}}{\Delta\phi} \right)^n$$

**Equació 3.** Nombre de conformacions en funció del n° d'angles de torsió ( $n$ ) que es consideri i del pas d'angle ( $\Delta\phi$ ).

Aquest darrer mètode s'ha emprat anteriorment en l'equip per a realitzar anàlisis conformacionals de cadenes de brassinoesteroides<sup>131</sup> i en aquest treball per corroborar els anàlisis realitzats amb XConfort<sup>194</sup> i per fusió simulada amb INSIGHT II.<sup>182</sup>

Per tal de simplificar el problema de l'explosió combinatòria s'empra la metodologia Confort<sup>195</sup> del programa

XConfort.<sup>194</sup> Aquesta, a diferència de l'anàlisi sistemàtic, no es basa en explorar totes les combinacions d'angles dièdres, sinó que explora només les més "interessants" per cada rotor (**Figura 55**)<sup>195,196</sup> entenen per "interessants" aquelles que són més probables que es donin, doncs el programa ràpidament identifica els enllaços de mínima energia per a cada rotor. Tot i així, permet obtenir un conjunt de confòrmers de màxima diversitat basat en distàncies interatòmiques d'aquests enlloc d'angles dièdres amb elevada fiabilitat i reduint força el temps de càlcul.



**Figura 55.** Exemple dels valors que prendria el programa XConfort com a més "interessants" pel dièdre T1 (C-C-C).

A continuació es mostra en la **Taula 25**, el nombre de confòrmers que es generen emprant l'anàlisi sistemàtic amb un pas d'angle de 10° i la metodologia *Confort* per a un angle de torsió C-C-C.

Nº d'angles de torsió de la molècula	Nº de conformacions generades	
	Anàlisi sistemàtic	Metodologia <i>Confort</i>
1	36	3
2	1296	9
3	46656	27
4	1679616	81
5	60466176	243
10	3.65616E15	59049

**Taula 25.** Diferència entre el nombre de conformacions generades emprant l'anàlisi conformacional sistemàtic o la metodologia *Confort* per a angles de torsió C-C-C.

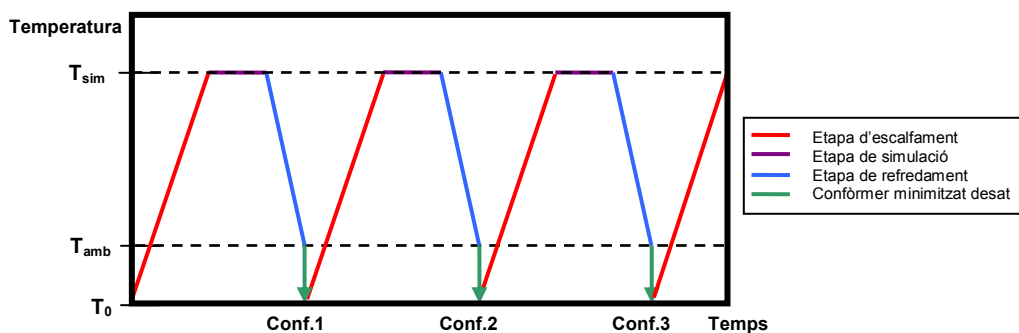
La metodologia *Confort* únicament presenta tres valors d'angles de torsió interessants per a un angle del tipus C-C-C i, en canvi, l'anàlisi sistemàtic en presenta 36 si s'empra un pas d'angle de 10°. Per tant, el nombre de conformacions generades, i en conseqüència el temps de càlcul, és molt menor emprant la metodologia *Confort* que no pas l'anàlisi sistemàtic.

### 2.1.3.2. Fusió simulada (*Simulated annealing* (SA))

La dinàmica molecular<sup>179,191,197,198</sup> utilitza les equacions del moviment de la mecànica clàssica per simular el comportament, al llarg del temps, d'un conjunt d'àtoms que interaccionen entre si a través de l'energia potencial determinada segons un *Force-Field* concret. Una simulació de dinàmica molecular és així un model pel moviment d'una molècula. Un desavantatge de la dinàmica molecular convencional és que no permet realitzar un estudi conformacional complet excepte en la regió pròxima a la conformació inicial, degut a les barreres d'energia potencial que delimiten aquesta.

Una variant d'aquesta metodologia, que pretén solucionar aquesta peculiaritat, és el protocol de la fusió simulada o *Simulated annealing* (SA), que minimitza cada un dels confòrmers obtinguts durant l'etapa de simulació i la realitza a elevades temperatures. La fusió simulada és un mètode per a realitzar l'anàlisi conformacional d'una molècula que consisteix en tres etapes: una etapa d'escalfament o iniciació, una de simulació i, finalment, una etapa de refredament. Inicialment el sistema s'escalfa fins a una temperatura molt elevada, per exemple d'uns 900 K, a la qual es deixa evolucionar el sistema durant un cert temps. L'energia

assolida pel sistema a aquesta temperatura permet superar barreres d'energia potencial. Passat un cert temps, es deixa refredar el sistema lentament fins a temperatura ambient, a la qual té lloc la minimització d'energia de la molècula (**Figura 56**).<sup>199</sup> Aquest mètode permet trobar conformacions de mínima energia estables a temperatura ambient. El procés es repeteix un gran nombre de vegades. És necessari doncs, que la simulació sigui prou llarga per augmentar les probabilitats d'analitzar tot l'espai conformacional.



**Figura 56.** Metodologia emprada en la fusió simulada. S'escalfa el sistema fins a 900 K, es deixa evolucionar, es refreda fins a 298 K i es minimitza l'energia. Exemple repetint 3 vegades el procés.

El protocol de la fusió simulada inicia la recerca d'un nou conformer a partir d'una estructura d'energia minimitzada. Això implica que, inicialment, cal remuntar un pou d'energia potencial des de la seva base. En sistemes que tinguin superfícies d'energia potencial molt amples, aquest fet suposa un inconvenient, doncs la trajectòria de la simulació passaria molt de temps dins d'aquest pou d'energia potencial abans de passar a un altre pou, dificultant així l'evolució de la simulació.

En aquest treball, s'empra el mètode de la fusió simulada (*simulated annealing* (SA)) per a realitzar l'anàlisi conformacional d'hormones de creixement vegetal, de brassinoesteroides, d'inhibidors dels BRs, de metabòlits produïts en el medi de cultiu del fong *Penicillium roquefortii*, dels mimètics no esteroidals de la brassinolida (**1**) i d'alguns mimètics del KM-01 (**9**).

#### 2.1.4. Conformació activa

Per dissenyar nous anàlegs basant-se en la unió entre una molècula i el seu receptor biològic, les tècniques de QSAR disposen de dos grans metodologies en funció de la informació que es té sobre el receptor:<sup>200</sup>

- Mètodes directes: emprats quan es coneix l'estructura del receptor mitjançant dades experimentals (raigs X o ressonància magnètica nuclear) o mitjançant modelització (modelat per homologia).
- Mètodes indirectes: emprats quan es desconeix l'estructura del receptor i, per tant, no empra informació sobre la geometria del receptor, però aquesta informació es pot obtenir a partir de la comparació entre si dels diferents anàlegs.

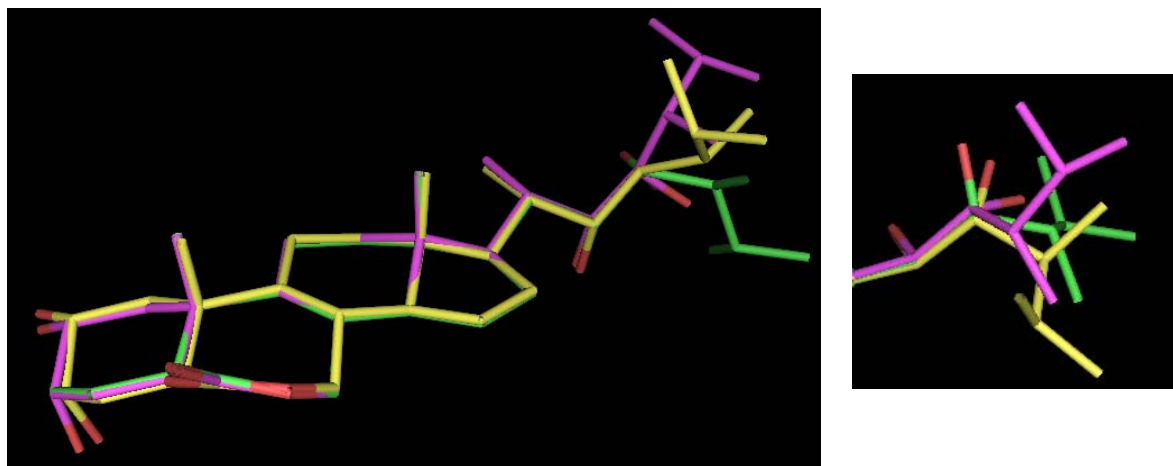
En els segons se suposa que tota la informació necessària per explicar l'activitat d'un grup de compostos es troba en la seva estructura ja que es parteix de la hipòtesi que tots interaccionen amb el mateix receptor pels mateixos punts d'unió. Així doncs, l'estudi de les propietats dels diferents compostos proporciona la manera d'esbrinar quins són els grups funcionals (punts d'unió) d'aquesta sèrie de compostos que permeten la unió amb el receptor. A més, s'ha de considerar que els compostos posseeixen un determinat grau de flexibilitat, per la qual cosa poden adoptar diferents conformacions. Tot i així, únicament una conformació o

reduït grup de conformacions, denominada “conformació activa”, s'uneixen amb el receptor, donat que posseiran l'orientació espacial necessària per a que els punts d'unió del compost siguin capaços d'interaccionar amb el receptor.

En el camp dels brassinoesteroides ens trobem en el segon cas ja que, tot i els grans avenços que estan tenint lloc en aquests darrers anys, encara no es coneix el seu receptor. Amb la qual cosa, és necessari definir una o diverses conformacions actives de la brassinolida (**1**) per poder comparar la resta de molècules amb aquest cap de sèrie. L'equip disposa, fins al moment, de tres conformacions actives de **1**:

- es va buscar aquella conformació de la brassinolida (**1**) comú a 6 brassinoesteroides actius, atenent a diferents criteris de similitud: SQR (criteri geomètric basat en la comparació de distàncies entre determinats àtoms de la molècula; en aquest cas concret entre àtoms d'oxigen i entre àtoms d'oxigen i diferents plans definits per àtoms del nucli esteroidal), RMS (criteri geomètric basat en el càlcul d'àtoms equivalents dels diferents confòrmers un cop superposades les molècules; en aquest cas es calculen les distàncies dels àtoms de carboni i oxigen de la cadena lateral, així com les dels àtoms d'oxigen dels anells A i B superposant les molècules pels àtoms C11, C12 i C14 ja que són la part constant del nucli esteroidal) i MOV (criteri geomètric basat en la comparació de la forma de les diferents molècules en estudi mitjançant un índex de similitud que consisteix en obtenir el volum comú de les cadenes laterals al superposar els esteroides pels àtoms C11, C12 i C14).<sup>131</sup> Aquesta conformació activa es troba representada en color verd a la **Figura 57** (bl\_sqr).
- primer anàlisi de mapes de GRID flexibles. Per aplicar aquesta metodologia es van superposar manualment els confòrmers dels BRs trobats per anàlisi conformacional aleatori (*Force Field Tripos FF* de SYBYL) pels anells C i D, que és la part rígida comú a tots els brassinoesteroides, es va fixar el primer angle de torsió de la cadena lateral al voltant de 180° i, finalment, es van considerar com graus de llibertat (gdl) la resta d'angles de torsió de la cadena. Els gdl es van fixar en un procés iteratiu on s'aplica un model de PLS amb els mapes de GRID considerant el moviment (rotació) dels enllaços (gdl) no fixats (mapes de GRID flexibles). En aquest model s'interpolaven un conjunt de conformacions (rígides) per a cadascun dels brassinoesteroides. Finalment, comparant els valors de les torsions de les conformacions seleccionades, es van fixar els gdl i es va seleccionar aquella conformació on l'activitat predita s'acostava més a la real.<sup>131</sup> Aquesta conformació activa es troba representada en color groc a la **Figura 57** (bl\_pls).
- segon anàlisi de mapes de GRID flexibles. La metodologia emprada en aquest cas era la mateixa del cas anterior. La diferència bàsica rau en l'anàlisi conformacional realitzat (els confòrmers a comparar es van obtenir mitjançant la tècnica de dinàmica molecular a través de fusió simulada) i en el nombre de brassinoesteroides a comparar (es van incloure 4 nous brassinoesteroides i es redefiní l'activitat real de la brassinolida (**1**)). A més, l'alineament es va redefinir (superposició de mapes de GRID emprant la sonda d'aigua) a la meitat de les iteracions, quan ja s'havien fixat els grups funcionals polars. Aquesta conformació activa es troba representada en color lila a la **Figura 57** (bl\_mv).<sup>130</sup>

Si es centra l'atenció en la **Figura 57**, on es troben representades les tres conformacions actives de la brassinolida (**1**) trobades al laboratori d'Esteroides, es pot apreciar que les diferències existents en la zona de l'esquelet són pràcticament nul·les. En canvi, en la zona de la cadena lateral i com a conseqüència de la major mobilitat conformacional que presenta, s'observen diferències centrades en la part hidrofòbica de la cadena lateral i en la zona de l'hidroxil 23*R*-OH.



**Figura 57.** Superposició de les tres conformacions actives de la brassinolida (1). Ampliació de la cadena lateral. En color groc es representa la primera conformació activa obtinguda per GRID flexible (bl\_pls), en lila la segona trobada per mapes de GRID flexible (bl\_mvp) i en verd l'obtinguda per criteris de similitud (bl\_sqr).

## 2.2. Propietats moleculars

El següent pas a realitzar, una vegada s'ha finalitzat l'anàlisi conformacional, és el càlcul d'una sèrie de propietats moleculars que depenen de l'estructura. En la literatura s'ha descrit una gran quantitat de paràmetres de diferents tipus per tal de descriure les propietats físiques i/o químiques d'una molècula. Aquests paràmetres s'anomenen descriptors i es poden classificar en dos tipus:

- Descriptors que s'associen a un valor concret d'una propietat. Aquest és el cas dels descriptors clàssics.<sup>201</sup>
- Descriptors que s'associen a una regió de l'espai al voltant de la molècula. Aquest és el cas dels camps moleculars.<sup>129,202</sup>

La majoria de paràmetres pretenen descriure els tipus d'interaccions més habituals en la unió entre un substrat i el seu receptor biològic. Així doncs, es troben paràmetres per descriure l'efecte hidrofòbic, l'efecte electrostàtic, l'efecte estèric, i les interaccions per pont d'hidrogen. S'ha de tenir en compte que un únic descriptor matemàtic no serà capaç de representar exhaustivament la molècula i, per tant, s'utilitzen els descriptors adequats segons les necessitats de cada estudi.

En certs casos és necessari realitzar un alineament de les molècules previ al càlcul de les propietats moleculars, per tal que els paràmetres siguin comparables entre si en l'anàlisi estadístic posterior.

### 2.2.1. Alineament

La correlació entre l'estructura i l'activitat d'una sèrie de compostos es basa en les diferències entre les diverses propietats moleculars que es comparen, que en molts casos han d'estar alineats (superposats) entre si. En aquest sentit, l'alineament defineix un origen i uns eixos de coordenades comuns a totes les molècules sobre els quals se situaran diferents paràmetres. En aquest moment, els paràmetres poden ser comparats entre si de forma numèrica.

El resultat de l'alineament depèn en gran mesura de la propietat triada per comparar les molècules entre si i



superposar-les en funció d'aquest criteri. Es poden emprar diverses propietats alhora de fer l'alineament:

- Índex de similitud: les molècules s'orienten de forma que es maximitza la superposició del potencial electrostàtic molecular (MEP) i/o el volum molecular definits a través d'uns índex de similitud.
- Esquelet comú: les molècules s'orienten de forma que es minimitza la distància entre els àtoms equivalents que conformen un esquelet rígid, el qual és present en tots els compostos de la sèrie.
- Camps moleculars: les molècules s'orienten de forma que es maximitza la superposició d'un o diversos camps moleculars.

A més, en l'optimització del paràmetre escollit, es pot considerar la molècula flexible o rígida. Si es considera flexible l'algorisme d'optimització ha de maximitzar l'índex de similitud alhora que minimitza també l'energia. Si es considera rígida és necessari determinar amb anterioritat la conformació activa de la molècula.

Un bon alineament es donarà quan es compleixin una sèrie de condicions:<sup>203</sup>

- Estabilitat energètica del confòrmer
- Forma semblant
- Solapament dels àtoms aromàtics
- Solapament de les zones donadores de pont d'hidrogen de la molècula
- Solapament de les zones acceptores de pont d'hidrogen de la molècula

En aquest treball s'han alineat les molècules basant-se en dues metodologies diferents. Per una banda, en l'estudi computacional preliminar de mimètics del KM-01 (**9**) es va dur a terme una optimització rígida per a la superposició de les molècules mitjançant l'índex de similitud de Carbó, amb el programa TSAR (emprant el *Force Field* COSMIC).<sup>204</sup> Per altra, s'ha emprat el programa MOE<sup>205</sup> per realitzar un alineament flexible (emprant el *Force Field* MMFF94) i així poder refinar els resultats obtinguts en l'estudi de les cadenes laterals (àcids comercials), o de mimètics del KM-01 (**9**), on no ha estat necessari realitzar un alineament previ per comparar els descriptors.

L'alineament flexible que el programa MOE realitza es basa en generar conformacions a l'atzar d'una col·lecció de molècules i l'alineament d'aquestes. La metodologia que aquest programa segueix es basa en mesurar la similitud de les molècules. La mesura d'aquesta similitud és funció de l'aromaticitat, dels grups donadors, dels acceptors i del volum (**Equació 4**).

$$F = F_{\text{arom.}} + F_{\text{don.}} + F_{\text{acc.}} + F_{\text{vol.}}$$

**Equació 4.** Mesura de similitud.

Una de les maneres de realitzar l'alineament flexible és fixant la molècula de referència (en el nostre cas la brassinolida (**1**) o el KM-01 (**9**)) i permetre flexibilitat a l'anàleg, d'aquesta manera s'aconsegueix obtenir un confòrmer que presenti *a priori* propietats similars a la molècula de referència emprada. Una vegada el càlcul ha acabat, s'obté una base de dades que conté diferents camps (**Figura 58**):

- mol: mostra per cada alineament la distribució espacial de les molècules.
- U: l'energia promig de la tensió de les molècules en kcal/mol. Es calcula realitzant la suma de l'energia potencial individual dividit pel nombre de molècules.
- S: el resultat de la distribució espacial de l'alineament que té en compte U i els paràmetres

corresponents a l'Equació 4. Valors més baixos indiquen millor solapament.

	mol	U	S
1		18.5022	289.7878
2		18.7844	201.7682

Figura 58. Base de dades (output).

## 2.2.2. Descriptors

En el camp del disseny de fàrmacs, s'han anat desenvolupant des de fa dècades descriptors matemàtics referits a les propietats farmacològiques de compostos. L'any 1969 C. Hansch<sup>206</sup> ja va demostrar la possibilitat d'obtenir funcions que permetien la correlació entre descriptors matemàtics i les propietats biològiques de compostos. En el camp de les relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR), s'han desenvolupat nombrosos models. Entre aquests, cal destacar el treball de P. J. Goodford,<sup>129</sup> que va introduir el concepte de camp d'interacció molecular (MIF), i el de Cramer *et al.*,<sup>202</sup> que va introduir l'estructura tridimensional de la molècula en l'obtenció de descriptors moleculars, desenvolupant així el concepte de 3D-QSAR.

### 2.2.2.3. Descriptors en QSAR-Clàssic

Cadascuna de les propietats moleculars es pot descriure a través d'un o diversos paràmetres, els quals es caracteritzen per ser unidimensionals. És a dir, tenen un únic valor (p.ex. log P) o, en el millor dels casos, són bidimensionals generant un vector (p.ex. moment dipolar), el qual sempre es pot descompondre en les seves components en l'espai.

Els paràmetres poden classificar-se en funció del tipus de propietats a les quals fan referència. Així, es poden trobar tan descriptors químics (anàlisi de Free-Wilson,<sup>207,208</sup> índexs topològics<sup>209-211</sup>) com descriptors fisico-químics<sup>212</sup> (descriptors hidrofòbics,<sup>213,214</sup> estèrics<sup>215,216</sup> i electrostàtics<sup>217,218</sup>).

### 2.2.2.4. Descriptors en 3D-QSAR

L'any 1985, P. Goodford *et al.*<sup>129,219-221</sup> van descriure un camp de forces (GRID) que permet calcular els camps moleculars (MIF: *Molecular Interaction Field*) globals. El GRID permet trobar els llocs d'unió favorables de la molècula. L'energia d'interacció entre una sonda i un compost es calcula mitjançant la suma de tres factors (estèric, electrostàtic, i pont d'hidrogen).

$$E_{xyz} = \sum_{i=1}^{\text{àtoms}} E_{i-xyz}^{\text{ste}} + \sum_{i=1}^{\text{àtoms}} E_{i-xyz}^{\text{elec}} + \sum_{i=1}^{\text{àtoms}} E_{i-xyz}^{\text{hb}}$$

**Equació 5.** Càlcul de l'energia d'interacció entre una sonda i un compost.

En funció del tipus de sonda que s'utilitzi es poden calcular diferents tipus de camps moleculars. En el programa GRID<sup>222</sup> es troben descrites i parametritzades més de 50 tipus de sondes diferents, que comprenen la majoria dels grups funcionals implicats en la unió substrat-receptor. Malgrat tot, moltes de les sondes presenten un tipus d'interacció molt semblant, amb la qual cosa es poden agrupar en 5 categories diferents tal com mostra la **Taula 26**.

Tipus	Sonda
Estèrica	C3, C1=, S1
Pont d'hidrogen	N1, N1=, NH=, N2, N:, N2:, N2+, N2=, N1+, N:=, OH2, O1, OH, O-, O:
Acceptador de pont d'hidrogen	OC2, OES, O
Electrostàtic	Na+, ZN+2
Hidrofòbica	DRY

**Taula 26.** Es presenten els 5 grups de sondes en funció de la interacció energètica predominant.

### 2.2.3. Descriptors GRIND (*GRid-INdependent Descriptors*)

No és gens fàcil establir criteris per alinear molècules diferents en l'espai. Normalment, aquesta acostuma a ser una etapa llarga i que pot introduir determinismes amb facilitat. A més, el resultat obtingut depèn en gran mesura de l'alineament realitzat. Aquests desavantatges han motivat el desenvolupament de descriptors moleculars independents de l'alineament.

Una solució a aquest problema es va plantejar amb el desenvolupament dels descriptors GRIND (*GRid-INdependent Descriptors*).<sup>223</sup> Aquests descriptors recullen informació relacionada amb la distància existent entre diferents grups funcionals presents a la molècula. Aquesta metodologia permet obtenir descriptors independents de l'alineament que faciliten la interpretació dels resultats, doncs la informació obtinguda pel descriptor es pot referir a les propietats moleculars a partir de les quals aquest s'ha generat. El procés per obtenir els descriptors GRIND emprats en l'estudi computacional exhaustiu dels mimètics del KM-01 (9) de la pàgina 122 i en l'estudi teòric sobre els anàlegs no esteroïdals de Thomas Back de la pàgina 176,<sup>224</sup> comprèn tres etapes.

#### 2.2.3.1. Càlcul del MIF (Camp d'interacció molecular)

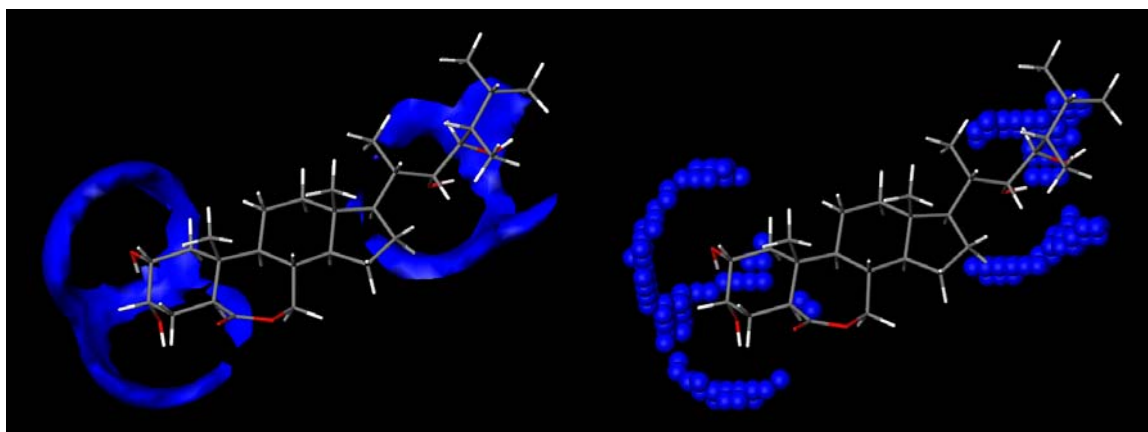
El primer pas per obtenir els descriptors GRIND és calcular els MIF (camps d'interacció molecular) per la molècula d'estudi. Amb aquests camps es defineix el *Virtual Receptor Site* (VRS),<sup>223</sup> una entitat abstracta

que defineix un lloc d'unió ideal complementari per la molècula d'estudi i representa la seva habilitat potencial per unir-se al receptor. Els descriptors GRIND es fonamenten en el VRS computat, ja que representen les relacions geomètriques existents entre les regions rellevants del VRS.

El procés s'inicia situant la molècula dins d'una caixa en forma de malla tridimensional definida per nodes distribuïts uniformement en l'espai (**Figura 15**). A continuació, per cada node de la malla es calcula l'energia d'interacció entre un àtom, o un grup d'àtoms, que defineixen una sonda (*probe*) i la molècula que és objecte d'estudi (*target*), recorrent així tot l'espai tridimensional. El conjunt de nodes amb una mateixa energia d'interacció entre la molècula d'estudi i la sonda corresponent defineixen camps d'interacció molecular (MIF).<sup>129</sup> Els MIF identifiquen regions on certs grups funcionals de la molècula poden interaccionar favorablement, suggerint així posicions on els grups funcionals d'un potencial receptor poden interaccionar amb el lligand. Les propietats que es consideren són les interaccions hidrofòbiques, electrostàtiques, estèriques, i de pont d'hidrogen i venen determinades pel tipus de sonda que es fa servir (**Taula 26**). Així, amb l'ús de diferents sondes es pot obtenir, per a un cert lligand, un conjunt de posicions d'interacció energètica favorable que defineix el *Virtual Receptor Site* (VRS). Els VRS rellevants s'obtenen amb sondes que representin grups funcionals potencialment importants del lloc d'unió del receptor.

### 2.2.3.2. Filtrat del MIF

Generalment, els MIF obtinguts amb la metodologia GRID per una molècula oscil·len entre  $10^4$  i  $10^5$  nodes. Ara bé, la informació proporcionada per tots aquests punts a vegades és redundant. Per aquesta raó, en aquest pas es realitza un filtrat de tots els nodes obtinguts en la computació dels MIF, rendint només aquells punts que aporten informació, independent de la resta, sobre regions d'interacció rellevants. Pels propòsits a que es destina el càlcul, s'escullen només les regions més interessants, que són aquelles caracteritzades per energies intenses d'interacció favorable. El filtrat es realitza en base a un algorisme d'optimització del tipus Fedorov que selecciona els punts més rellevants de cada MIF a través d'una funció de ponderació on s'hi troben reflectits dos criteris: la intensitat del camp en un node determinat i les distàncies mútues entre els nodes seleccionats. Per defecte, el nombre de nodes que rendeix el procés de filtrat és de 100. Per molècules grans aquest nombre s'ha d'augmentar a 150-200 nodes. La **Figura 59** mostra el procés descrit. A l'esquerra hi ha el resultat de computar el MIF emprant la sonda O (oxigen carbonílic) sobre la molècula de brassinolida (**1**). Es representa el contorn que engloba punts en que l'energia d'interacció és menor que  $-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A la dreta hi ha els 150 nodes que se seleccionen en el procés de filtrat.



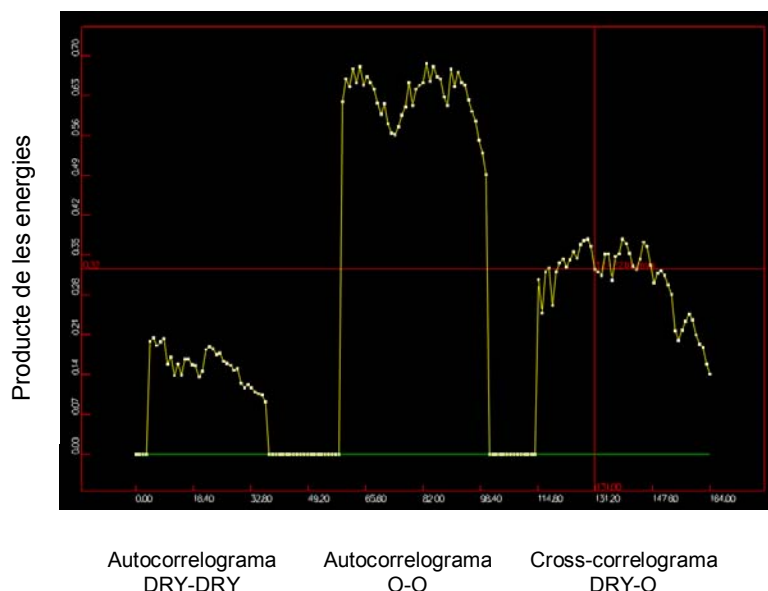
**Figura 59.** Procés de filtratge del MIF.

### 2.2.3.3. Codificació del VRS cap a GRIND

Quan s'ha obtingut el VRS i s'ha realitzat el corresponent filtrat dels punts, es procedeix a l'obtenció dels descriptors GRIND. Per calcular els descriptors GRIND es duu a terme el producte de l'energia d'interacció per cada parell de nodes. Els resultats es poden representar gràficament a través de gràfics anomenats correlogrames, en els quals els productes d'energia entre dos nodes es representen en funció de la distància que els separa. Es considera un nombre discret de marges de distàncies. Dins de cada marge es contempla només aquell parell de nodes el producte de l'energia dels quals rendeix un valor més alt. El nombre de marges de distàncies és el mateix per a tots els correlogrames. S'adequa per a tots ells el nombre de marges més alt present en els correlogrames.

Quan les energies calculades entre dos nodes s'han obtingut amb una mateixa sonda, els correlogrames obtinguts s'anomenen auto-correlogrames (*auto-correlograms*). Quan els nodes s'han obtingut amb sondes diferents s'anomenen correlogrames creuats (*cross-correlograms*). El nombre de correlogrames (C) obtingut és funció del nombre de sondes emprades. Per exemple, si s'empren 3 sondes (DRY, O, N1), el nombre total de correlogrames obtinguts serà de 6, dels quals 3 correspondran a auto-correlogrames (DRY-DRY, O-O, N1-N1) i 3 a correlogrames creuats, corresponents a les interaccions entre la primera sonda i la segona (DRY-O), la segona i la tercera (O-N1), i la tercera i la primera (DRY-N1).

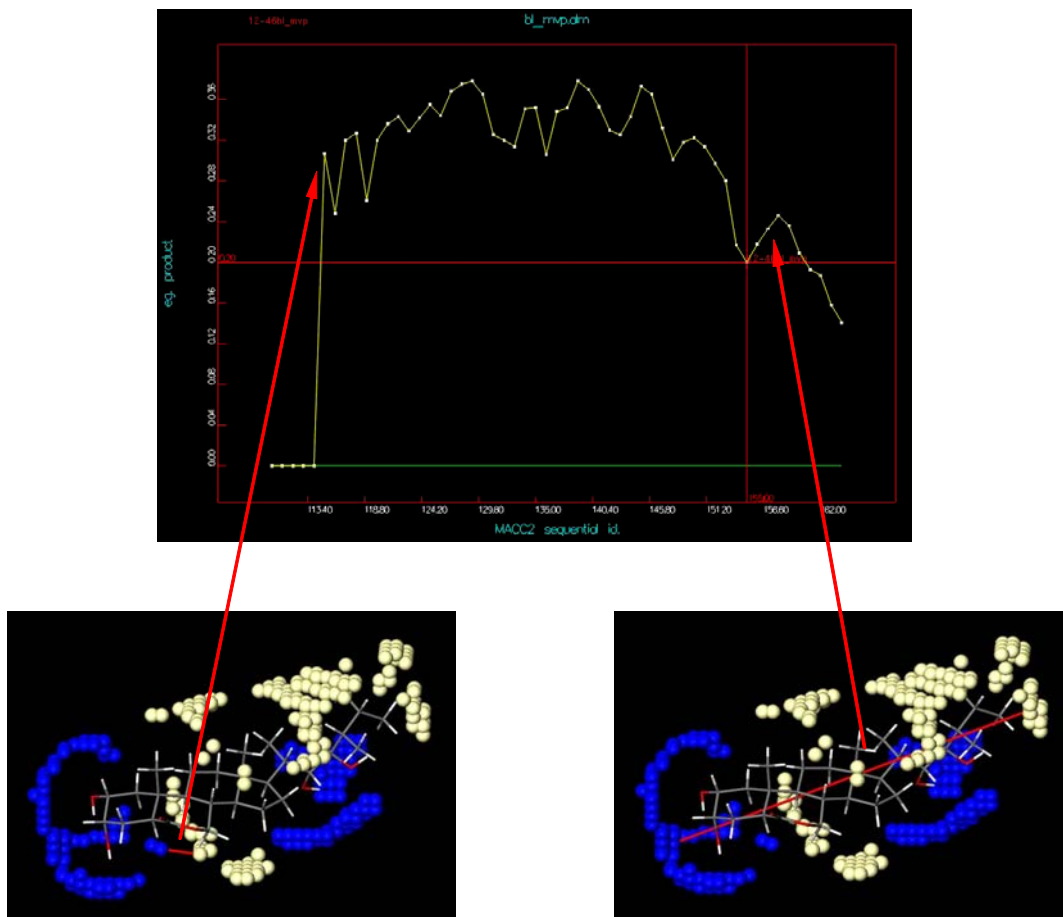
Els correlogrames calculats per una molècula d'estudi amb diferents sondes es representen situant-los l'un al costat de l'altre. Cada un dels correlogrames té els valors de distància menor a l'esquerra i els de major a la dreta. Un exemple el tenim en el perfil de correlogrames obtingut per la molècula de brassinolida (1) emprant les sondes DRY i O. D'esquerra a dreta es representen l'auto-correlograma DRY-DRY, l'auto-correlograma O-O i el correlograma creuat DRY-O (**Figura 60**).



**Figura 60.** Exemple de diferents correlogrames.

La metodologia GRIND suposa un avantatge respecte de les metodologies d'autocorrelació anteriors, doncs permet una fàcil interpretació de les dades obtingudes. Aquesta facilitat es fonamenta en que els dos nodes, el producte d'energia dels quals es representa en els correlogrames, es desen en la memòria de l'ordinador. Així, per cada valor d'energia obtingut, es pot conèixer quin parell de nodes l'ha originat. Aquest mètode

s'anomena *maximum auto- and cross-correlation 2* (MACC-2).<sup>225</sup> Així, a mode d'exemple, amb el correlograma creuat corresponent a les sondes DRY-O obtingut per la brassinolida (**1**) es pot conèixer a quins dos nodes correspon cada punt del gràfic (**Figura 61**). Tal com s'observa, a la part esquerra del correlograma s'hi troben les distàncies curtes i a la part dreta les llargues.

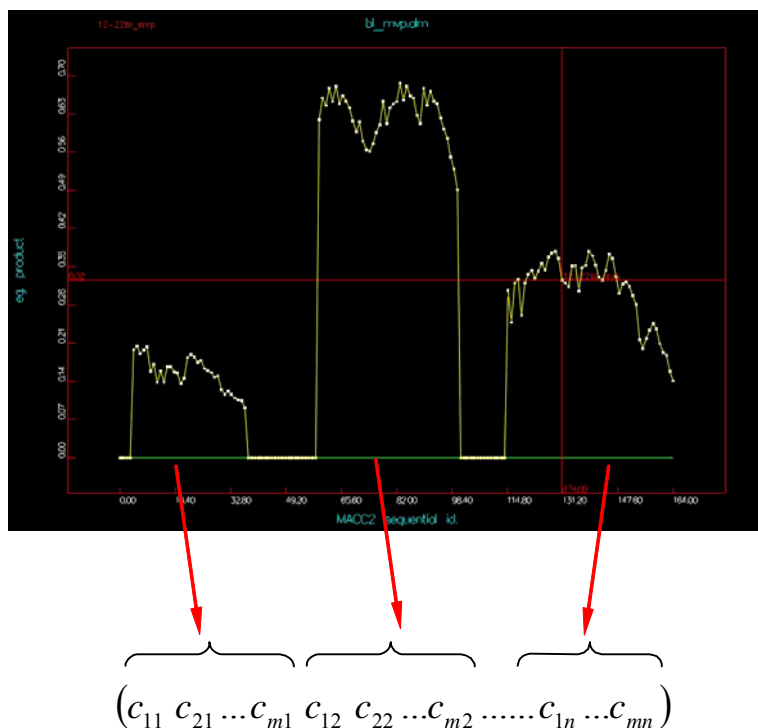


**Figura 61.** Exemple d'interpretació dels valors d'energia obtinguts en el correlograma amb el parell de nodes corresponent. En blau es mostra la sonda O i en beix la sonda DRY.

Així, quan per una molècula s'han calculat els descriptors GRIND s'obté un perfil d'energies relacionat amb la distància, que descriu quines distàncies separen les zones d'interacció més importants de la molècula.

Els pics del correlograma corresponen a productes d'energia elevats entre dos nodes. La forma del pic aporta informació. Els grups funcionals amb interaccions intenses es representen, després del procés de filtració, per bastants nodes continus, i per tant, els pics que generen són amples. En canvi, els pics estrets tendeixen a representar interaccions febles. A nivell matemàtic, el conjunt de correlogrames obtingut s'expressa a través d'un vector en el qual hi ha els valors d'energia ordenats tal com apareixen en el correlograma de la **Figura 62**.

El vector obtingut equival, a nivell matemàtic, al descriptor calculat per a la molècula d'estudi.



on  $n$  = nombre total de correlogrames  
 $m$  = nombre de valors d'energia presents als correlogrames

**Figura 62.** Exemple del vector obtingut.

#### 2.2.4. Descriptors del programa ASP (*Automated Similarity Package*)

Aquests descriptors s'han emprat en l'estudi computacional preliminar dels anàlegs del KM-01 (9), veure pàgina 99.

Per al càlcul dels descriptors ASP es defineix una malla de punts tridimensional que conté les dues molècules a comparar. A continuació, s'assignen les càrregues atòmiques parcials de cada molècula i es calcula el potencial electrostàtic i el camp elèctric en els diferents punts de la malla tal com es mostra en les següents equacions:

$$P(r) = \sum_{j=1}^n \frac{q_j}{|r - r_j|}$$

**Equació 6.** Càlcul del potencial electrostàtic on  $P(r)$  és el potencial al punt de grid  $r$ ,  $q_j$  és la càrrega sobre l'àtom  $j$ ,  $r_j$  és la posició de l'àtom  $j$  i  $n$  el nombre total d'àtoms de la molècula.

$$F(r) = \sum_{j=1}^n \frac{q_j(r - r_j)}{|r - r_j|^3}$$

**Equació 7.** Càlcul del potencial electrostàtic on  $F(r)$  és el vector de camp elèctric al punt de grid  $r$ ,  $q_j$  és la càrrega sobre l'àtom  $j$ ,  $r_j$  és la posició de l'àtom  $j$  i  $n$  el nombre total d'àtoms de la molècula.

Els valors de  $P(r)$  i  $F(r)$  se substitueixen directament per  $P$  en les **equacions 8 i 13**. Quan es compara el camp elèctric, el producte escalar dels dos vectors de camp s'avaluen als punts de grid de la malla.

### 2.2.5. Descriptors SHOP

Tot i l'avantatge que presenten els descriptors GRIND respecte aquells que requereixen un alineament, cal recordar que no tenen en compte la distribució tridimensional de la molècula, ja que es calculen distàncies entre tots els camps d'interacció molecular. Aquest problema el solventen, en certa manera els descriptors SHOP, que tampoc requereixen d'un alineament amb la molècula a comparar.

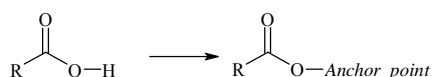
En aquesta nova metodologia SHOP, per comparar els diferents compostos és necessari definir un punt comú en l'estructura de totes les molècules a comparar, que s'anomena punt d'ancoratge ("anchor point").<sup>226, 227</sup> Aquest *anchor point* no proporciona suficients paràmetres geomètrics per alinear les molècules però és útil per descriure les regions MIF d'una manera més eficient que no ho fan els descriptors GRIND.<sup>223</sup>

L'*anchor point* pot definir-se de dues maneres:

- Com els grups essencials o subestructures que estan implicats en la interacció amb el receptor o amb altres molècules. Per exemple, en alguns inhibidors de trombina, la seva interacció amb el residu d'àcid aspàrtic Asp189 del centre actiu S1 es defineix com l'*anchor point*.<sup>228</sup>
- Com el grup d'una molècula que està involucrat en la síntesi d'altres compostos. Per exemple, en les reaccions de N-acilació per a la síntesi de pèptids, l'àcid carboxílic dels reactius es defineix com el punt d'ancoratge.<sup>229,230</sup>

Les molècules en aquesta metodologia SHOP es descriuen emprant tres tipus diferents de descriptors: GRID-SHOP, SHAPE-SHOP i SHOP-Fingerprint. Aquests descriptors també es basen, parcialment, en la geometria molecular i la metodologia GRID.<sup>129,220</sup>

Aquesta metodologia s'ha aplicat a l'Anàlisi computacional d'àcids comercials i, per tant, s'ha definit l'hidrogen del grup àcid carboxílic com a *anchor point* (**Figura 63**).

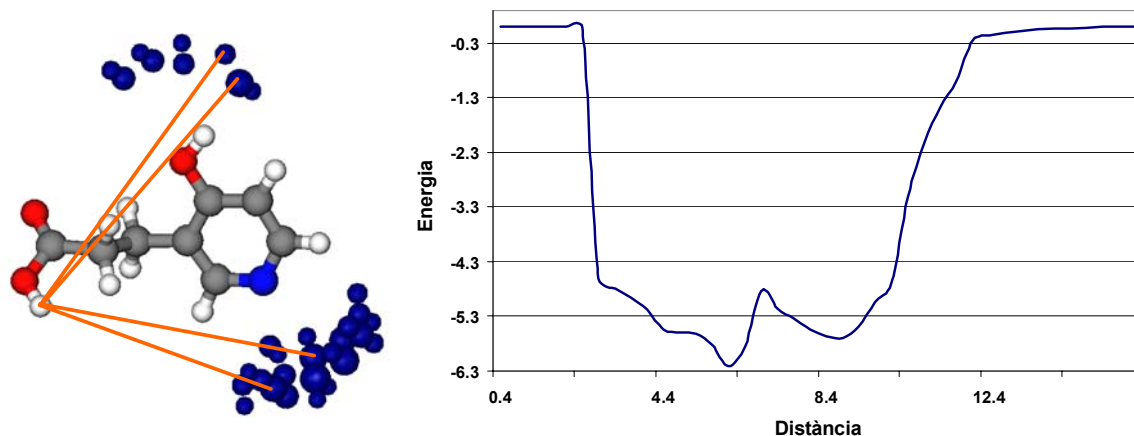


**Figura 63.** Definició del punt d'ancoratge en els àcids carboxílics.

Els descriptors SHOP es detallen a continuació:

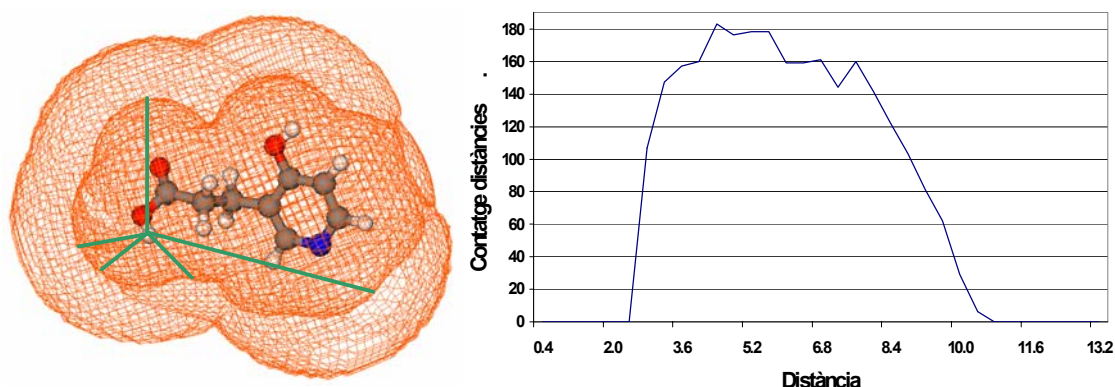
- GRID-SHOP: aquests es basen en les regions rellevants del VRS i l'*anchor point* de la molècula. El càlcul d'aquest tipus de descriptors s'inicia obtenint diversos MIFs mitjançant el programa GRID. Després del corresponent filtratge per extreure les regions més rellevants que defineixen el VRS, la informació continguda en el MIF s'extreu i es codifica en noves variables independents de la posició espacial de la molècula en estudi. Les distàncies que s'obtenen entre l'*anchor point* (present en totes les molècules) i els punts dels MIFs s'agrupen en diferents categories de distàncies (*bin*). Finalment, el mínim valor d'interacció energètica de cada *bin* correspon als descriptors GRID-SHOP. En aquesta tesi s'obtenen tres descriptors d'aquest tipus en funció de les tres sondes utilitzades: DRY, N1 i O. En la **Figura 64** es mostra el descriptor GRID-SHOP per a N1 a mode d'exemple.





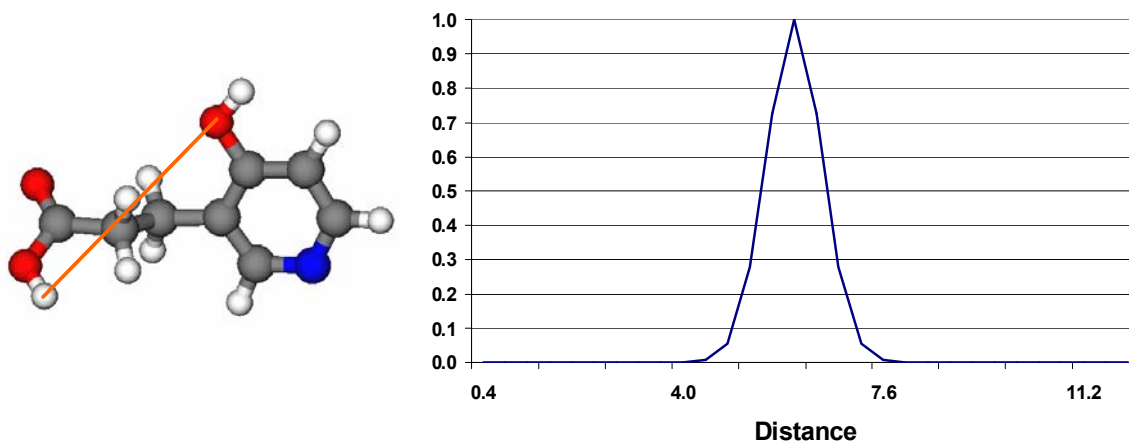
**Figura 64.** Representació del descriptor GRID-SHOP per a la sonda N1. Les línies taronja indiquen algunes de les distàncies entre l'*anchor point* i les regions més rellevants del MIF (en blau). En el gràfic de la dreta es mostra la relació existent entre la distància i l'energia.

- b) SHAPE-SHOP (**Figura 65**): descriu el volum de la molècula amb els MIF obtinguts amb N1 des del punt de l'*anchor point*. El procés seguit consisteix en calcular les distàncies entre l'*anchor point* i la superfície de la molècula, definida pel MIF. El nombre de vegades que apareix una distància per a cada categoria (*bin*) es codifica en un vector que s'empra posteriorment en l'anàlisi de similitud.



**Figura 65.** Representació del descriptor SHAPE-SHOP. En verd es mostren les distàncies de l'*anchor point* a la superfície de la molècula (en taronja). En el gràfic de la dreta es mostra el nombre de vegades que s'obté una distància determinada.

- c) SHOP-Fingerprint: es calculen les distàncies entre l'*anchor point* i les posicions atòmiques de la molècula. Donat que els àtoms en una molècula es poden classificar en hidrofòbics, donadors de pont d'hidrogen i acceptors, es calcula un vector que descriu, per a cada classe d'àtom, la distància des de l'*anchor point*. Si la distància es troba present en la molècula en estudi, es guarda en forma de corba Gaussiana. En la **Figura 66** es mostra, a mode d'exemple, el SHOP-Fingerprint calculat amb la sonda N1.



**Figura 66.** Representació del descriptor SHOP-Fingerprint per a la sonda N1. La línia taronja representa la distància descrita per aquest descriptor. La presència o absència d'una distància s'indica, com es mostra en el gràfic, per 1 ó 0.

Tot i que no s'empra en aquesta tesi, cal mencionar que la metodologia SHOP també pot emprar-se per a molècules que posseeixen més d'un *anchor point* en la seva estructura. En aquests casos, és necessari definir un nou descriptor anomenat GEOM-SHOP. Aquests descriptors mesuren les distàncies i angles entre els diferents *anchor points*.

## 2.3. Tractament de les dades

El tractament de les dades obtingudes, és a dir, dels descriptors moleculars, és el darrer pas que s'ha de realitzar. La correlació entre l'estructura i l'activitat d'una sèrie de compostos es fonamenta en les diferències entre les diverses propietats moleculars que es comparen.

L'anàlisi de similituds és una tècnica que s'utilitza per a realitzar el tractament de les dades. En aquest treball s'utilitza l'índex de Carbó i de Hodgkin.

### 2.3.1. Índexs de similitud

#### 2.3.1.1. Índex de similitud de Carbó

Carbó *et al.*<sup>231</sup> van proposar l'any 1980 un índex de similitud per comparar les densitats electròniques de dues molècules superposades, i establir així un criteri de semblança entre elles.

$$Q_{AB} = \frac{\int \rho_A \cdot \rho_B \cdot dv}{\left(\int \rho_A^2 \cdot dv\right)^{1/2} \cdot \left(\int \rho_B^2 \cdot dv\right)^{1/2}}$$

on  $\rho_i$  = densitat electrònica de la molècula i  
v = volum

**Equació 8.** Expressió de l'índex de similitud de Carbó.

El numerador és una mesura de la superposició entre les densitats electròniques de dues molècules (A i B) i el denominador és un factor de normalització per tal que l'índex de similitud estigui comprés en el marge

entre 0 i 1. El valor de 1 correspon així a la màxima similitud entre les molècules comparades.

L'expressió pròpia de l'índex de Carbó (**Equació 8**) es pot adaptar per propietats relacionades amb camps moleculars o potencials electrostàtics, que és el cas que ens ocupa. En aquest cas, l'equació anterior pren la forma:

$$Q_{AB} = \frac{\sum_{i=1}^N (P_{i,A} \cdot P_{i,B})}{\left( \sum_{i=1}^N P_{i,A}^2 \right)^{1/2} \cdot \left( \sum_{i=1}^N P_{i,B}^2 \right)^{1/2}}$$

on  $N$  = nombre de variables a comparar  
 $P_{ij}$  = propietat de la molècula  $j$  que es compara en la dada  $i$

**Equació 9.** Expressió de l'índex de similitud electrostàtic de Carbó.

A part de mesurar paràmetres electrostàtics, l'any 1991 Meyer *et al.*<sup>232</sup> va demostrar que la fórmula de Carbó (**Equació 9**) es podia adaptar per mesurar semblances en termes de forma molecular (**Equació 10**). Cada molècula es pot representar com un sistema d'esferes interconnectades, centrades en el nucli atòmic, amb un radi equivalent al radi de Van der Waals. El parell de molècules superposades es situa en una xarxa tridimensional i s'examinen els punts d'aquesta. El recompte es fa de la següent manera:

- O1: el nombre de punts de la xarxa on únicament reposa la molècula 1.
- O2: el nombre de punts de la xarxa on únicament reposa la molècula 2.
- B: el nombre de punts de la xarxa on reposen ambdues molècules.

Llavors, el nombre total ( $T$ ) de punts de la xarxa per a cada molècula és  $T_1 = O_1 + B$  i  $T_2 = O_2 + B$ . Finalment, l'índex de similitud de forma de Carbó es pot expressar com:

$$S_{12}^C = \frac{B}{(T_1 \cdot T_2)^{1/2}}$$

**Equació 10.** Índex de similitud de forma de Carbó.

Fins i tot, els índexs amb una propietat individual es poden combinar linealment per donar un índex combinat dels dos anteriors (**Equació 11**): l'electrostàtic (**Equació 9**) i el de forma (**Equació 10**), amb un pes determinat per a cadascun d'ells.

$$C_{AB} = \frac{w_S \cdot S_{AB} + w_Q \cdot Q_{AB}}{w_S + w_Q}$$

on  $S_{AB}$  és l'índex de similitud de forma  
 $Q_{AB}$  és l'índex de similitud electrostàtica  
 $w_S$  és el factor de pes per l'índex de forma  
 $w_Q$  és el factor de pes per l'índex electrostàtic

**Equació 11.** Índex de similitud combinat de Carbó.

Per als descriptors SHOP, l'índex de similitud final entre un anàleg i el cap de sèrie ( $Q_T$ ), per a ordenar els compostos segons l'ordre decreixent d'aquest valor, s'obté a través de la mitja aritmètica dels set índexs de similitud calculats (**Equació 12**). Aquest valor és particularment útil quan es considera la interacció des del

punt de vista de l'anchor point.

$$Q_T = \frac{\sum_l^{N1,O,DRY} Q_{AB}^{GRID-SHOP(l)} + \sum_l^{N1,O,DRY} Q_{AB}^{SHOP-Fingerprint(l)} + Q_{AB}^{SHAPE-SHOP}}{7}$$

**Equació 12.** Mitja aritmètica dels índexs de similitud trobats per als diferents descriptors SHOP.

### 2.3.1.2. Índex de Hodgkin

Hodgkin *et al.*<sup>233</sup> van proposar un índex de similitud molecular basat en el de Carbó. Aquests autors varen puntualitzar que l'índex de Carbó per dues molècules diferents tals que  $\rho_{i,A} = n \cdot \rho_{i,B}$  rendia un valor de 1. Així, varen constatar que l'índex de similitud de Carbó representa la similitud entre les formes de les distribucions de densitat entre dues molècules, però no entre la seva magnitud. Així, es va plantejar un nou índex que tingués en compte aquests dos paràmetres.

$$H_{AB} = \frac{2 \int \rho_A \cdot \rho_B \cdot dv}{\int \rho_A^2 \cdot dv + \int \rho_B^2 \cdot dv}$$

on  $\rho_i$  = densitat electrònica de la molècula i

**Equació 13.** Expressió de l'índex de similitud de Hodgkin.

Per propietats relacionades amb camps moleculars o potencials electrostàtics l'expressió de l'**Equació 13** pren la següent forma:

$$H_{AB} = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^N (P_{i,A} \cdot P_{i,B})}{\sum_{i=1}^N P_{i,A}^2 + \sum_{i=1}^N P_{i,B}^2}$$

on N = nombre de variables a comparar

$P_{ij}$  = propietat de la molècula j que es compara en la dada i

**Equació 14.** Expressió de l'índex de similitud de Hodgkin relacionat amb camps moleculars.

### 2.3.1.3. Optimització dels índexs de similitud

L'optimització dels índexs de similitud es pot agrupar en dos grups de tècniques generals:

- **Rígid:** troba, per a cada comparació, l'orientació relativa òptima respecte a la molècula líder (pre-alineament i optimització rígida emprant l'algorisme Simplex).
- **Flexible:** troba, per a cada comparació, la conformació òptima respecte a la molècula que s'està comparant (búsqueda torsional completa o bé optimització flexible emprant l'algorisme Simplex).

Els passos a seguir per a l'optimització dels índexs de similitud emprant la tècnica rígida, que és la que s'empra en l'estudi computacional preliminar dels anàlegs del KM-01 (9) de la pàgina 99, són els que es presenten a continuació:

- **Pre-alineament:** alineament correcte de les molècules per iniciar l'optimització mitjançant una

fórmula basada en la combinació de les propietats de forma i de càrrega electrostàtica per a cada molècula i (**Equació 15**).

$$cp(i) = 1.0 \cdot w_S + q_i \cdot w_Q$$

on  $w_S$  i  $w_Q$  són els factors de pes de forma i de càrrega electrostàtica  
 $q_i$  és la càrrega parcial per a cada àtom  $i$ .

**Equació 15.** Fórmula per al pre-alineament de les molècules.

- **Búsqueda orientacional completa:** troba l'orientació relativa de màxima similitud, mitjançant la consideració de totes les possibles orientacions relatives.
- **Optimització rígida emprant l'algorisme Simplex:** És una alternativa a la búsqueda orientacional completa perquè és molt més ràpida i, a més, per la majoria de les molècules s'obtenen resultats considerablement bons. Troba l'orientació relativa de màxima similitud, mitjançant rotacions rígides i translacions aleatòries dirigides per l'algorisme Simplex. En una optimització d'aquest tipus cal tenir en compte tota la problemàtica referent a l'obtenció de màxims locals i absoluts de similitud.

### 3. Maquinari i programari

#### 3.1. Maquinari

Els computadors emprats en aquest treball inclouen ordinadors personals i estacions de treball.

Pel que fa als primers, s'empren quatre equips:

- PC Pentium: a 1.6 GHz, 512 MB de RAM i 60 GB de disc dur sota un sistema operatiu Windows XP
- PC Pentium III a 733 MHz, 64 MB de RAM i 15 GB de ROM sota un sistema operatiu Windows 98
- PC Pentium a 1.6 GHz, 1.5 GB de RAM i 75 GB de disc dur sota un sistema operatiu Linux Red Hat
- PC Pentium 4 a 1.7 GHz, 256 MB de RAM i 60 GB de disc dur sota un sistema operatiu Linux Red Hat

Com a estació de treball s'ha emprat:

- Workstation INDIGO2 de Silicon Graphics, amb un processador R10000/IP28 a 195 MHz amb 256 MB de RAM i 4 GB de disc dur. INDIGO2 és una estació de treball UNIX que treballa amb un sistema operatiu IRIX 6.5 i que disposa d'unes elevades prestacions gràfiques.
- Workstation Origin2 de Silicon Graphics, amb quatre processadors R10000/IP27 a 180 MHz amb 512 MB de RAM i dos discs durs de 4 GB cadascun. Aquesta es diferencia de l'anterior en que presenta una potència de càlcul superior en detriment de les prestacions gràfiques.

#### 3.2. Programari

En aquest treball s'han emprat diversos programes comercials en funció de l'etapa realitzada en l'estudi computacional. A més s'han emprat macros d'Excel i *scripts* desenvolupats en el mateix laboratori d'Esteroides o a LEAD MOLECULAR DESIGN, S.L., representada per Ismael Zamora Rico, amb qui s'ha col·laborat en aquesta part de la tesi de química computacional.

##### 3.2.1. Modelització molecular

Penguins:<sup>234</sup> Programa desenvolupat per Molecular Discovery Ltd. que s'empra per a realitzar el canvi de format SDF (*Structure Data File format*)<sup>235</sup> a *smiles format (Simplified Molecular Input Line Entry Specification)*.<sup>236</sup>

XConfort:<sup>195</sup> Programa desenvolupat per Tripos Inc. que s'empra per fer l'anàlisi conformacional mitjançant la metodologia *Confort*.<sup>194</sup>

SYBYL:<sup>237</sup> Programa de modelització molecular desenvolupat per Tripos Inc. que opera en plataformes UNIX. S'ha utilitzat per generar anàlegs del KM-01 (9), optimitzar l'energia dels conformers i realitzar l'anàlisi conformacional sistemàtic convencional.

Insight II:<sup>182</sup> Programa de modelització molecular desenvolupat per Biosym Technologies que opera en plataformes UNIX. S'ha utilitzat per construir part dels compostos de la biblioteca virtual i per realitzar l'anàlisi conformacional a través del protocol de la fusió simulada (*simulated annealing*).

### 3.2.2. Alineament i descriptors

TSAR:<sup>204</sup> Programa de QSAR clàssic desenvolupat per Oxford Molecular Ltd., que permet calcular diversos descriptors clàssics i, posteriorment, aplicar tot un conjunt de tècniques estadístiques. En aquest treball s'ha emprat, en l'estudi computacional preliminar dels anàlegs de **9**, per alinear els confòrmers dels diferents anàlegs del KM-01 (**9**) amb el confòrmer actiu de la brassinolida (**1**) i calcular els índexs de similitud electrostàtics, de forma i combinat de Carbó.

MOE:<sup>205</sup> S'ha emprat el programa comercial MOE 2003.02 (*Molecular Operating Environment*) desenvolupat per *Chemical Computing Group Inc.*, que permet realitzar alineaments flexibles de molècules. En aquest treball s'ha utilitzat per realitzar el solapament dels diferents anàlegs estudiats amb la brassinolida (**1**) o amb el KM-01 (**9**) i per a la construcció de molècules en format mol2.

GRID:<sup>222</sup> Programa desenvolupat per P. Goodford i comercialitzat per Molecular Discovery Ltd., que permet realitzar el càlcul dels camps d'interacció globals (MIF) podent emprar una o diverses de les més de 50 sondes de que disposa. Emprat per calcular els MIFs i els mapes de GRID.

ALMOND:<sup>238</sup> Programa de modelització molecular desenvolupat per MIA (*Multivariate Infometric Analysis*),<sup>239</sup> que permet calcular els descriptors GRIND sobre un conjunt de molècules i realitzar, posteriorment, tractaments estadístics multivariants. S'ha emprat per calcular els descriptors dels compostos en l'estudi computacional exhaustiu de mimètics de **9**, així com per a la realització de l'anàlisi de components principal (PCA) en les molècules on s'han calculat descriptors GRIND.

SHOP: Programa desenvolupat per Ismael Zamora que permet calcular els descriptors SHOP. S'ha emprat per a calcular els descriptors dels àcids carboxílics.

### 3.2.3. Programació

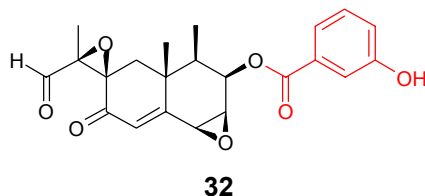
Scripts: Ismael Zamora va desenvolupar, en llenguatge de programació perl, el *script* "dat2txt.pl" per convertir arxius de text en format .dat a arxius de text en format .txt i el *script* "txt2dat.pl" per fer la conversió inversa. Per al reconeixement de fragments de molècules es va programar "fragment\_recognition\_web". També va desenvolupar el *script* "descriptor.pl" que, mitjançant la interacció amb el programa GRID, permet calcular els descriptors SHOP per a l'Anàlisi computacional d'àcids comercials. El *script* "extract\_chain.pl" s'empra per separar les cadenes laterals dels brassinoesteroides dels seus esquelets. Finalment, va desenvolupar el *script* "similarity.pl" per calcular els índexs de similitud de Hodgkin i Carbó en l'estudi computacional exhaustiu dels anàlegs del KM-01 (**9**) (veure pàgina 99) i "similarity\_2.pl" per al càlcul de l'índex de similitud de Carbó en l'Anàlisi computacional d'àcids comercials.

Visual Basic: Berta Albaigés va desenvolupar un programa en Visual Basic per poder transposar matrius amb dimensions superiors a les que permet treballar un full d'Excel. També s'han emprat diversos programes, desenvolupats al laboratori d'Esteroides,<sup>130</sup> amb el llenguatge macro d'Excel (Visual Basic) per dur a terme l'anàlisi dels resultats dels confòrmers obtinguts durant la fusió simulada ("Anàlisi de la Dinàmica Molecular" i "Anàlisi conformacional (Simulated Annealing)").

## 4. Nomenclatura dels anàlegs del KM-01 (9)

### 4.1. Anàlegs de la PR toxina (19):

Els anàlegs de PR toxina (19) s'anomenen amb les dues lletres majúscules PR, que indiquen que l'esquelet del compost és el de la PR toxina (19), separades per un guió de dos lletres, que indiquen el tipus de cadena lateral que s'ha unit al citat esquelet. Un exemple és l'anàleg PR-ao (32) que presenta l'esquelet de 19 (en negre) i la cadena lateral **ao** (en roig), **Figura 67**.

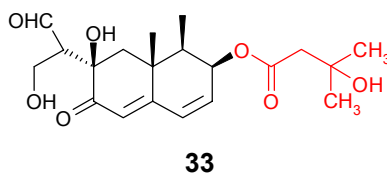


**Figura 67.** Anàleg PR-ao (32): esquelet de la PR toxina (19) (en negre) i cadena del tipus **ao** (en roig).

Els anàlegs que presenten un hidroxil protegit s'indiquen posant tres lletres representatives del grup protector a continuació del nom del compost, separat per un guió baix. Així doncs, si l'hidroxil de l'anàleg 32 es protegís amb un grup acetat s'anomenaria PR-ao\_ace, i si es protegís amb p-metoxibenziloxi s'anomenaria PR-ao\_mpm.

### 4.2. Anàlegs del KM-01 (9)

Els anàlegs del KM-01 (9) s'anomenen amb les dues lletres majúscules KM, que indiquen que l'esquelet del compost és un eremofilà semblant al de 9, separades per un guió de dos nombres i dues lletres. Les dues lletres indiquen el tipus de cadena lateral del compost i els dos nombres el tipus d'esquelet. Un exemple permet visualitzar aquesta nomenclatura. Així doncs, si es cita el compost KM-03aa (33) s'està fent referència a un anàleg del KM-01 (9) amb un esquelet del tipus **03** (en negre) i una cadena lateral del tipus **aa** (en roig), **Figura 68**.



**Figura 68.** Anàleg KM-03aa (33): esquelet del tipus **03** (en negre) i cadena lateral del tipus **aa** (en roig).



## 5. Estudi computacional preliminar dels anàlegs del KM-01 (9)

### 5.1. Introducció

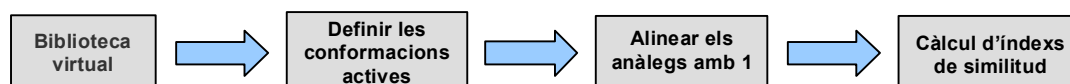
Com ja s'ha comentat anteriorment, abans d'iniciar cap pas sintètic per tal de poder obtenir els anàlegs del KM-01 (9), és necessari avaluar quins són els millors candidats per tal que aquesta activitat sigui màxima. Una bona eina és la realització d'un estudi computacional que permeti triar prèviament l'estructura 10. D'aquesta manera, es coneixeran les millors posicions on situar els nous grups funcionals a introduir, així com es disminuiran considerablement el nombre de compostos a sintetitzar, simplement fent una tria de les molècules més adequades.

Aquest estudi computacional consta de dos etapes:

- generar una biblioteca virtual d'anàlegs del KM-01 (9), el més àmplia i diversa possible, considerant les diferents possibilitats on afegir els nous grups funcionals.
- alinear els diferents anàlegs amb la brassinolida (1) mitjançant l'índex de similitud de Carbó ( $C_{ab}$ ) electrostàtic, de forma i el combinat dels dos anteriors.<sup>231,240</sup> Després, amb l'ajut d'aquests resultats, comparar quantitativament ( $C_{ab}$ ) la distribució dels grups funcionals de cada nou anàleg estudiat i els de la brassinolida (1), seleccionant com a més interessants els compostos que presenten un índex de similitud més elevat. D'aquesta manera, es pot realitzar una primera selecció dels anàlegs i així descartar els menys interessants.

### 5.2. Metodologia

La metodologia emprada en aquest estudi computacional preliminar es sintetitza en la **Figura 69**.



**Figura 69.** Metodologia per avaluar la validesa dels anàlegs del KM-01 (9).

Després de generar la biblioteca virtual que permet tenir una llista de tots els possibles compostos susceptibles d'ésser anàlegs actius del KM-01 (9), s'han de construir els compostos que la integren.

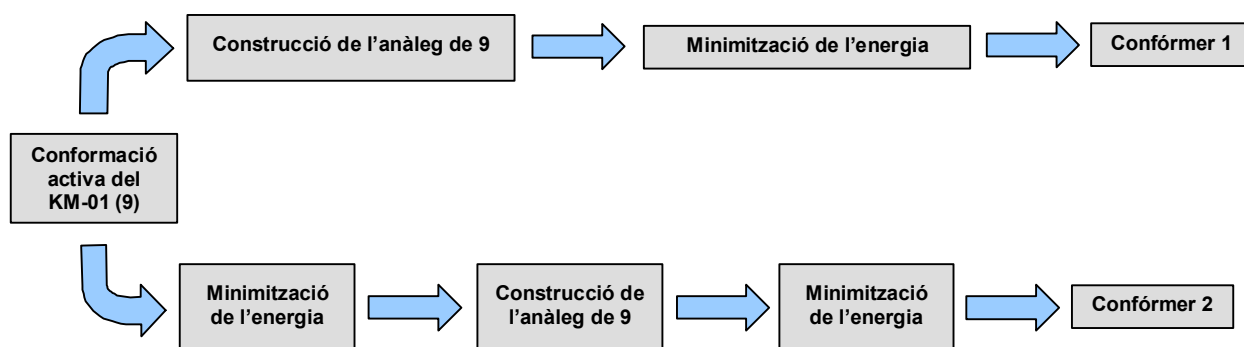
Per analogia amb la metodologia emprada per als brassinoesteroides, en aquests sesquiterpens eremofilans també es va assumir que, malgrat que poden adoptar diferents conformacions, només interaccionen amb el receptor amb una geometria determinada que es defineix amb el nom de "*conformació activa*". Per a poder determinar la conformació activa de cadascun dels anàlegs de la biblioteca de manera adequada és necessari realitzar una anàlisi conformacional però, degut a l'elevat temps que això requereix, en aquest estudi preliminar es segueix una via més ràpida. D'aquesta manera, segurament s'arribi a una orientació del confòrmer inicial amb un màxim de similitud local amb la brassinolida (1) i no pas global com es desitjaria. Tot i així, aquesta aproximació resulta considerablement bona per a un estudi preliminar per a realitzar una primera tria de compostos i tenir una idea de si aquesta família de nous anàlegs és prometedora com a conjunt de molècules amb activitat brassinoesteroide.

La conformació activa dels anàlegs del KM-01 (9) es realitza a partir del confòrmer actiu de l'antagonista 9

calculat anteriorment en l'equip.<sup>131</sup> Aquest es va trobar, al laboratori d'Esteroides, realitzant una optimització simultània de l'índex de similitud de forma i electrostàtic de Carbó respecte de **1** i de l'energia, mitjançant el programa ASP. Un cop es disposava d'aquest confòrmer actiu del KM-01 (**9**) i donat que no es segueix cap anàlisi conformacional exhaustiu, es segueixen dos camins per a la construcció i obtenció de dos confòrmers per a cadascun dels anàlegs de **9** que constitueixen la biblioteca virtual (**Figura 70**).

Per una banda, es va calcular, partint del mencionat confòrmer actiu de **9**, el confòrmer de l'antagonista amb un mínim local d'energia. Tot seguit, es van realitzar les modificacions pertinents sobre l'estructura del KM-01 (**9**) per tal d'obtenir els diferents compostos de la biblioteca virtual. I finalment, es va tornar a minimitzar l'energia de cadascun dels 52 anàlegs de **9**.

Per altra banda, es van realitzar, sense cap optimització energètica prèvia, les modificacions necessàries sobre la conformació activa de l'estructura de l'inhibidor **9** per obtenir tots els compostos en estudi. Posteriorment, sí que es va minimitzar l'energia de tots ells.



**Figura 70.** Metodologia per a construir els confòrmers dels anàlegs del KM-01 (**9**) que constitueixen la biblioteca.

Per tant, es disposava de dos confòrmers, obtinguts per camins diferents, de cada un dels compostos que formaven part de la biblioteca virtual. En alguns casos, aquests dos confòrmers poden convergir en un únic confòrmer. El darrer pas d'aquest estudi computacional fou la superposició de cadascun dels confòrmers trobats amb la brassinolida (**1**) utilitzant els índexs de similitud:

- Índex de similitud electrostàtic o de càrrega de Carbó ( $I_e$ )
- Índex geomètric de similitud o índex de similitud de forma ( $I_f$ )
- Índex combinat (1:1) dels dos anteriors ( $I_c$ )






S'ha de tenir en compte que, al realitzar una optimització rígida, en molts anàlegs ens mancarà alguns moviments d'enllaços que, en principi, poden rotar sense cap tipus d'impediment i que, per tant, no s'aconseguiran els millors índexs de Carbó possibles. Cal també tenir present que en l'alineament es pot arribar, per a cadascun dels confòrmers, a un màxim local de similitud enlloc d'arribar al màxim absolut. Per solucionar aquest problema, es realitzen diferents alineaments d'aquest confòrmer, però partint de diferents orientacions inicials.

El procediment seguit per a determinar el compost amb millor superposició amb **1** ha estat el següent:

- En la fulla de treball de la **Figura 71** s'importa la brassinolida (**1**), i a sota s'importa el confòrmer de l'anàleg corresponent que es desitja comparar amb aquesta. A continuació, es realitzen tres còpies

d'aquest confòrmer. La brassinolida (1) i el confòrmer en estudi es mantenen inalterables i es treballa amb les tres còpies restants.

- Les tres còpies del confòrmer se situen amb una orientació inicial diferent entre si i, tot seguit, s'alineen amb la brassinolida (1). De les tres orientacions finals, se selecciona aquella que presenta un valor de l'índex de similitud combinat més elevat.
- Es modifica, aleatòriament, l'orientació inicial de les altres dues còpies i, tot seguit, es tornen a alinear amb la brassinolida (1). Les dos orientacions finals es comparen amb l'orientació del confòrmer anteriorment seleccionat i es torna a escollir l'orientació final que presenta un índex de similitud més elevat. D'aquesta manera es conserva l'orientació del confòrmer en estudi que permet obtenir uns índexs de similitud més grans.
- Aquest procés es repeteix successives vegades fins que, al cap de diverses iteracions, no es pot millorar l'índex de similitud combinat del compost escollit. Així, es troba l'orientació del confòrmer amb millor superposició amb la brassinolida (1), és a dir, aquella que presenta uns valors dels índexs més elevats. Aquest procediment es repeteix per als 104 confòrmers en estudi (52 anàlegs amb dos confòrmers cadascun).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
	Row ID	Whole M <sub>c</sub>	Name (Whole Mol)	Combined vs Molect	Combined vs Molect	Charge Si vs Molect	Shape Sir vs Molect	Combined vs Molect	Combined vs Molect	Combined vs Molect	Charge Si vs Molect	Shape Sir vs Molect
1			bl									
2			anal17_opt									
3			anal17_opt1	0.49529	0.61923	0.47801	0.76245	0.62009		0.61613	0.4518	0.78045
4			anal17_opt2	0.53423	0.56188	0.36178	0.76197	0.56952	0.61609	0.61694	0.48194	0.75195
5			anal17_opt3	0.56723	0.61946	0.47366	0.76525			0.61969	0.47152	0.76787
6												

**Figura 71.** Es mostra, en aquesta fulla de treball, un dels anàlegs del KM-01 (9) amb els corresponents índexs de similitud calculats per a les tres còpies del mateix anàleg.

En aquest estudi preliminar es tria l'orientació de cadascun dels anàlegs a estudiar a partir de criteris basats en índexs geomètrics de superposició.

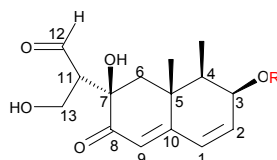
### 5.3. Biblioteca virtual

Durant la creació de la biblioteca virtual i mentre es realitza l'estudi computacional, és de gran importància estudiar conjuntament les diverses possibilitats sintètiques per obtenir l'anàleg corresponent i l'estabilitat del mateix. Doncs, en aquells casos on la complexitat sintètica sigui molt elevada i/o l'estabilitat de l'anàleg molt baixa, per molt bons candidats que resultin en quan a alineament amb la brassinolida (1), s'hauran de descartar.

Es va observar que els compostos amb un hidroxil o un grup àcid a C12 podien ciclar donant lloc a dues estructures en equilibri, com és el cas de l'eremofortina C (20), que ja s'ha mencionat anteriorment en la **Figura 26**. Per tant, en la biblioteca s'inclouen ambdues formes la ciclada (20A) i la no ciclada (20B).

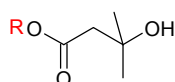
La biblioteca virtual que s'ha generat per realitzar aquest estudi computacional preliminar s'ha anat construint en etapes successives i consta de tres grups de molècules:

- Donat que l'hidroxil situat en C23 de la brassinolida (1) és, segons els anteriors estudis realitzats en l'equip, el grup funcional més important per a que un brassinoesteroide desencadeni activitat, en el primer grup de molècules es modifica la cadena lateral del KM-01 (9) i es mantenen fixes els grups funcionals de l'anell. D'aquesta manera, es genera un conjunt de 25 molècules per tal d'esbrinar la posició idònia on situar el grup funcional en la cadena lateral del KM-01 (9), de tal manera que s'orienti de la millor forma possible a la zona de l'hidroxil 23R-OH de la cadena lateral de la brassinolida (1). L'esquelet que queda fix en aquest primer grup, mentre es varien les cadenes laterals, no és exactament el del KM-01 (9), sinó que s'ha afegit una funcionalitat hidroxil en la posició C13 per tal que s'orienti vers la zona de l'alcohol 3 $\alpha$ -OH de la brassinolida (1) i, d'aquesta manera, s'obtingui un millor alineament entre ambdós compostos.



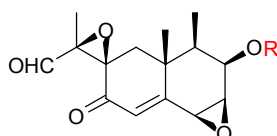
**Figura 72.** Anàlegs del KM-01 (9) on es manté fixa una estructura inicial per a l'anell (en color negre) i es varien les cadenes laterals (en color roig).

- Un cop seleccionada la cadena lateral més adient, es genera el segon grup de molècules, que consta de 21 anàlegs on es modifiquen els grups funcionals dels anells i es manté fixa la cadena per tal d'esbrinar la millor posició on situar el grup funcional en l'anell del KM-01 (9) per aconseguir l'òptima superposició amb l'hidroxil 3 $\alpha$ -OH de l'anell A de la brassinolida (1).



**Figura 73.** Anàlegs del KM-01 (9) on es manté una mateixa cadena lateral per als 21 compostos (en color negre) i es varien els grups funcionals presents en la zona de l'anell (en roig).

- Finalment, tenint en compte que el producte de partida és la PR toxina (19) i que l'hidroxil en C23 de la brassinolida (1) és, segons els anteriors estudis realitzats en l'equip, el més important per a desencadenar activitat, el darrer grup de molècules consta de 8 anàlegs on es varien les cadenes laterals de la PR toxina (19). És a dir, mantenint com a base l'anell de 19 s'ancoren diverses cadenes laterals (les millors que s'han obtingut del primer anàlisi). Si resultessin mitjanament interessants aquests anàlegs ja es podrien tenir uns primers resultats sense necessitat de realitzar un gran esforç sintètic: únicament la desprotecció de l'acetat de la PR toxina (19) i la posterior esterificació amb la cadena lateral adient.



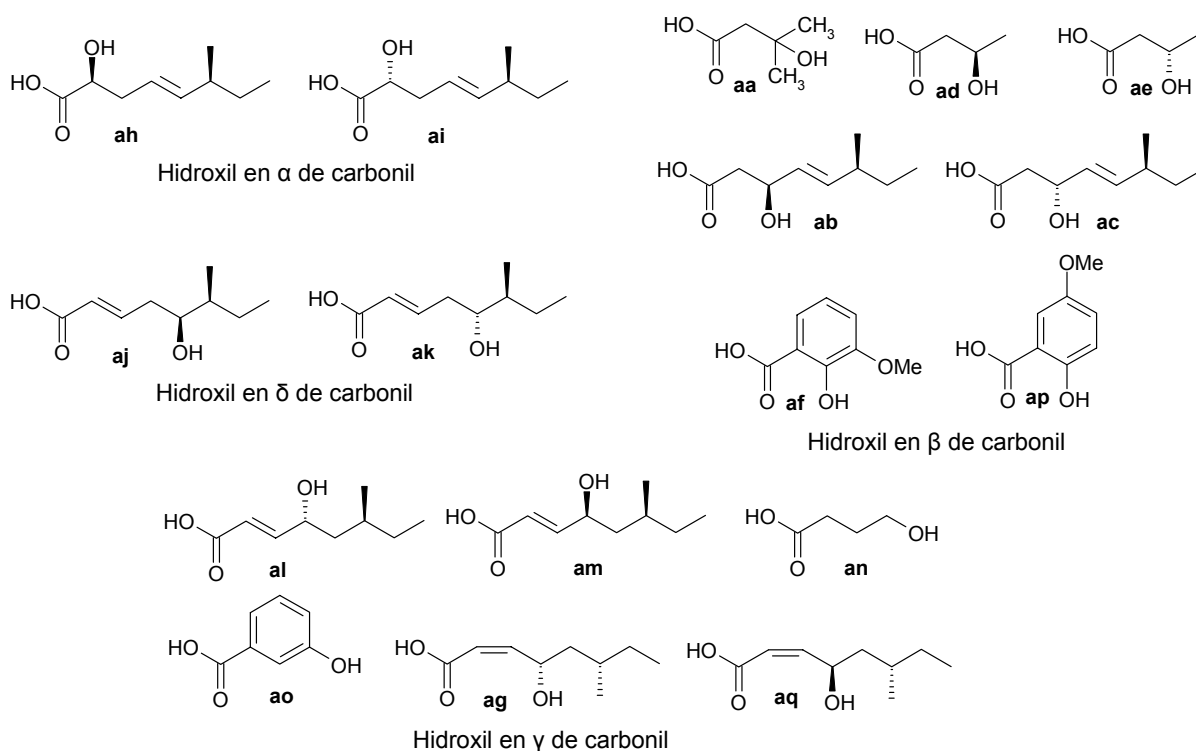
**Figura 74.** Anàlegs del KM-01 (9) on es manté la part de l'anell de la PR toxina (19) (en negre) i es varien les cadenes laterals (en roig).

## 5.4. Discussió de resultats

### 5.4.1. Estudi de la cadena lateral dels mimètics del KM-01 (9)

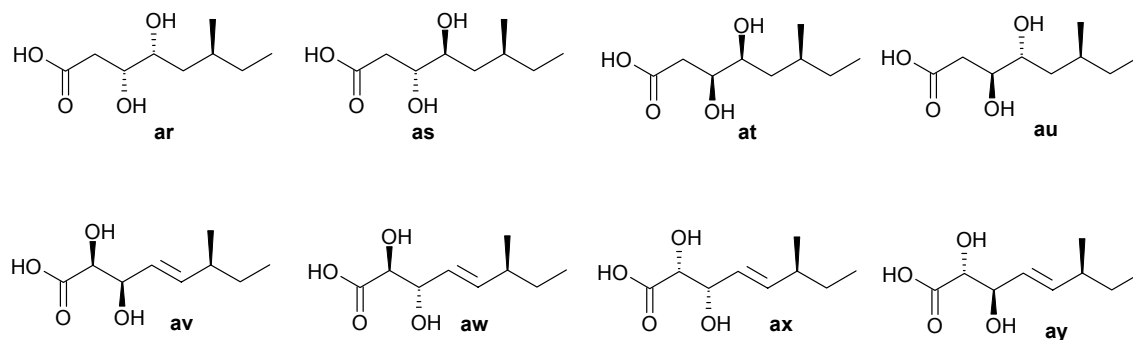
Les cadenes laterals que conformen aquest grup són àcids carboxílics comercials (**aa**, **ad**, **ae**, **af**, **an**, **ao**, **ap**) i cadenes laterals derivades de la cadena del KM-01 (9) (**ab**, **ac**, **ag**, **ah**, **ai**, **aj**, **ak**, **al**, **am**, **aq**, **ar**, **as**, **at**, **au**, **av**, **aw**, **ax**, **ay**). Donat que es parteix de la hipòtesi que l'inhibidor **9** s'uneix al mateix centre actiu que la brassinolida (**1**) es creu que la forma i el volum de la cadena d'aquest compost és força idònia. Tot i així, com ja s'ha comentat en la introducció, es creu que li manca una funcionalitat polar per a poder mimetitzar l'hidroxil 23*R* de **1**. Hi ha dos tipus de cadenes en aquest grup segons si s'afegeix un o dos hidroxils en aquesta cadena hidrocarbonada:

- se situa un hidroxil (**Figura 75**) des de la posició en  $\alpha$  de carbonil fins a la  $\delta$  (**aa**, **ab**, **ac**, **ad**, **ae**, **af**, **ag**, **ah**, **ai**, **aj**, **ak**, **al**, **am**, **an**, **ao**, **ap**, **aq**). D'aquesta manera, partint de la hipòtesi que el carbonil d'aquests àcids mimetitza l'hidroxil 22*R* de **1**, es pretén trobar la posició idònia de l'hidroxil de la cadena lateral per a poder mimetitzar l'hidroxil 23*R* de **1**. Es descarta, tal i com es veurà més endavant, que aquest hidroxil es pugui situar en una posició superior ja que quedaria massa allunyat del carbonil de l'ester d'aquesta cadena per a que els dos nous grups funcionals es puguin alinear correctament amb el diol 22*R*,23*R*-OH de la brassinolida (**1**).



**Figura 75.** Àcids amb un únic hidroxil en la cadena lateral que, per esterificació en C3, rendirien els sesquiterpens eremofilans mimètics de **9**.

- se situen dos grups hidroxil per intentar millorar l'alineament del mimètic amb l'hidroxil 22*R*-OH de **1** (**ar**, **as**, **at**, **au**, **av**, **aw**, **ax**, **ay**). En la **Figura 18** es va observar com l'alineament del carbonil de l'àcid de la cadena amb 22*R*-OH de **1** era únicament una aproximació d'ambdues zones. Per aquesta raó, si es considera que aquest carbonil no se solapa amb cap funcionalitat de **1**, manca un diol veïnal per a poder mimetitzar el diol de la cadena de **1**.



**Figura 76.** Àcids amb un diol en la cadena lateral que, per esterificació en C3, rendirien els sesquiterpens eremofilans mimètics de **9**.

Per tant, es disposa d'un conjunt de 25 anàlegs del KM-01 (**9**) amb variacions a la cadena lateral. En la **Taula 27** es presenten els índexs de similitud de Carbó de forma, càrrega i el combinat dels dos anteriors (1:1) dels 25 anàlegs que mantenen fixa l'estructura de base de l'anell i varien la cadena lateral. Els compostos de la **Taula 27** es presenten en ordre decreixent de valor d'índex de similitud combinat i, al costat dels índexs de similitud de càrrega i forma, s'indica la posició en que el compost es troba dins la sèrie considerant l'índex corresponent.

	Estructura	Combinat (Ic)	Càrrega (Ie)		Forma (If)	
KM-03aa	Hidroxil en $\beta$	0.620	0.472	1°	0.768	2°
KM-03ae	Hidroxil en $\beta$	0.618	0.462	3°	0.773	1°
KM-03ag	Hidroxil en $\gamma$	0.566	0.430	4°	0.701	17°
KM-03an	Hidroxil en $\gamma$	0.566	0.363	9°	0.768	3°
KM-03ab	Hidroxil en $\beta$	0.563	0.466	2°	0.660	22°
KM-03af	Hidroxil en $\beta$	0.560	0.420	5°	0.700	18°
KM-03ad	Hidroxil en $\beta$	0.552	0.384	6°	0.721	9°
KM-03ax	Diol en $\alpha, \beta$	0.543	0.345	11°	0.741	5°
KM-03ao	Hidroxil en $\gamma$	0.539	0.369	7°	0.709	14°
KM-03aj	Hidroxil en $\delta$	0.534	0.359	10°	0.710	13°
KM-03ap	Hidroxil en $\beta$	0.531	0.366	8°	0.696	19°
KM-03ac	Hidroxil en $\beta$	0.512	0.302	14°	0.722	8°
KM-03aw	Diol en $\alpha, \beta$	0.512	0.345	12°	0.679	20°
KM-03ak	Hidroxil en $\delta$	0.509	0.301	15°	0.718	10°
KM-03as	Diol en $\beta, \gamma$	0.506	0.273	18°	0.743	4°
KM-03ar	Diol en $\beta, \gamma$	0.506	0.294	16°	0.717	11°
KM-03ai	Hidroxil en $\alpha$	0.494	0.251	22°	0.736	6°
KM-03aq	Hidroxil en $\gamma$	0.493	0.281	17°	0.705	15°
KM-03av	Diol en $\alpha, \beta$	0.476	0.241	23°	0.712	12°
KM-03au	Diol en $\beta, \gamma$	0.471	0.341	13°	0.602	25°
KM-03ay	Diol en $\alpha, \beta$	0.465	0.265	19°	0.666	21°
KM-03am	Hidroxil en $\gamma$	0.448	0.255	21°	0.640	23°
KM-03al	Hidroxil en $\gamma$	0.447	0.261	20°	0.633	24°
KM-03ah	Hidroxil en $\alpha$	0.433	0.130	25°	0.724	7°
KM-03at	Diol en $\beta, \gamma$	0.424	0.147	24°	0.702	16°

**Taula 27.** Índexs de similitud dels mimètics de **9** amb variacions a la cadena lateral.

Un cop es disposa dels seus respectius resultats dels índexs de similitud, es procedeix a discutir els valors

obtinguts per a cadascun dels anàlegs, per tal d'avaluar quins són els millors candidats amb possibilitats de desencadenar activitat brassinoesteroide. Tot i així, abans de comparar els valors obtinguts resulta convenient fer referència als valors d'aquests índexs. Donat que les estructures que es comparen són molt semblants, i únicament presenten lleugeres variacions de presència o absència d'algun grup hidroxil, els valors d'aquests índexs de similitud també seran força semblants.

L'índex de similitud combinat serà l'índex que més informació aportarà d'aquests anàlegs ja que conté informació, en una proporció 1:1, tant de la forma com de la distribució de càrregues de les estructures que es comparen. Els altres dos índexs de similitud, en principi, tenen una importància semblant. Doncs, en la interacció d'un substrat amb el receptor intervien tant la part estèrica com la part polar de la molècula. De totes maneres, per a escollir quines són les molècules més semblants a la brassinolida (**1**) influeix més l'índex de similitud electrostàtic ja que els seus valors, tot i ser inferiors als de l'índex de similitud de forma, presenten un marge més ampli (0.342 front 0.171). Per tant, en comparar la posició que ocupen uns anàlegs dins la sèrie influirà més l'índex electrostàtic que no pas el de forma.

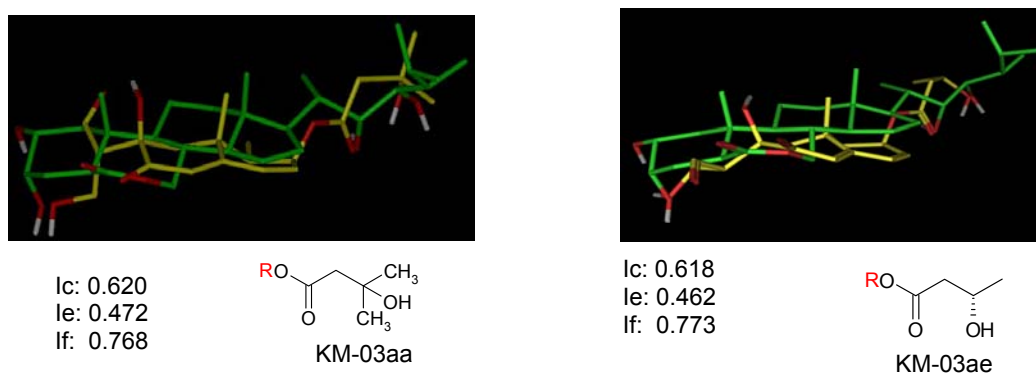
#### 5.4.1.1. Anàlegs amb els índexs de similitud més elevats

Índex de similitud combinat (Ic): els 6 anàlegs del KM-01 (9) que presenten un índex de similitud combinat més elevat (0.620-0.560) són KM-03aa, KM-03ae, KM-03ag, KM-03an, KM-03ab i KM-03af (indicats en roig en la **Taula 27**). Tots ells presenten un hidroxil en posició  $\beta$  de carbonil, a excepció del KM-03an i el KM-03ag, que el presenten en posició  $\gamma$ . Donat que els anàlegs que tenen l'hidroxil en  $\beta$  són els que, en general, presenten uns índexs de similitud superiors, fa pensar que la posició on situar l'hidroxil per a que s'aconsegueixi un millor alineament amb la brassinolida (**1**) sigui la posició  $\beta$ .

Índex de similitud de forma (If): els 6 anàlegs que presenten uns valors més grans d'índex de forma són KM-03ae, KM-03aa, KM-03an, KM-03as, KM-03ax i KM-03ai (0.773-0.736) (en roig en la **Taula 27**). Amb els resultats que s'obtenen amb aquest estudi computacional previ emprant una optimització rígida, no es poden obtenir conclusions significatives sobre la part hidrofòbica de la cadena lateral. En considerar només els grups funcionals polars de la molècula, a l'hora de construir i alinear els anàlegs, no permet obtenir la configuració idònia en la part final de la cadena lateral dels anàlegs del KM-01 (9) per tal d'aconseguir una bona superposició amb la conformació activa de la brassinolida (**1**). Tot i així, cal remarcar que KM-03aa, KM-03ae i KM-03an han estat ja seleccionats pels valors dels seus índexs de similitud combinat.

Índex de similitud de càrrega (Ie): els 6 anàlegs que presenten uns valors més elevats d'índex de càrrega (en roig en la **Taula 27**) són aquells que presenten una major superposició dels grups funcionals de la cadena lateral amb els hidroxils 22R-OH i 23R-OH de la brassinolida (**1**). Els tres primers són KM-03aa, KM-03ab i KM-03ae (0.472-0.462), tots ells  $\beta$ -hidroxiàcids i que ja han estat seleccionats pels seus valors d'índex de similitud combinat. Amb aquests resultats es pot afirmar que els millors compostos a emprar com a cadena lateral, pel que fa referència a la part polar d'aquesta, són els  $\beta$ -hidroxiàcids. Els altres 3 anàlegs que també presenten uns índexs de similitud de càrrega força elevats (0.430-0.384) són el KM-03ag, KM-03af i KM-03ad, dos dels quals també presenten l'hidroxil en posició  $\beta$ . Únicament el KM-03ag presenta l'hidroxil en la posició  $\gamma$ . Cal remarcar que, entre les cadenes d'aquests 6 anàlegs, les que presenten els anàlegs KM-03aa, KM-03ae i KM-03af són comercials, fet que facilitarà molt la seva síntesi.

A continuació (**Figura 77**) es presenta l'alineament de KM-03aa i KM-03ae amb la brassinolida (**1**) ja que són les dos molècules, amb cadenes laterals comercials, que presenten els índexs de similitud més elevats. Tot i així, no s'observa en cap d'elles un bon alineament en la zona de l'hidroxil  $2\alpha$ -OH de la brassinolida (**1**). Això és conseqüència de l'orientació inicial que pren l'hidroxil a C13 en tots els conformers de les molècules en estudi. Aquest inconvenient se solucionarà amb l'anàlisi computacional més exhaustiu (apartat 6) ja que, enlloc de realitzar una superposició rígida entre les estructures a comparar, es realitzarà una anàlisi conformacional previ i s'empraran descriptors independents de l'alineament.



**Figura 77.** Superposició dels anàlegs KM-03aa i KM-03ae (en groc) i la brassinolida (**1**), en verd.

#### 5.4.1.2. Anàlegs amb un diol en la cadena lateral

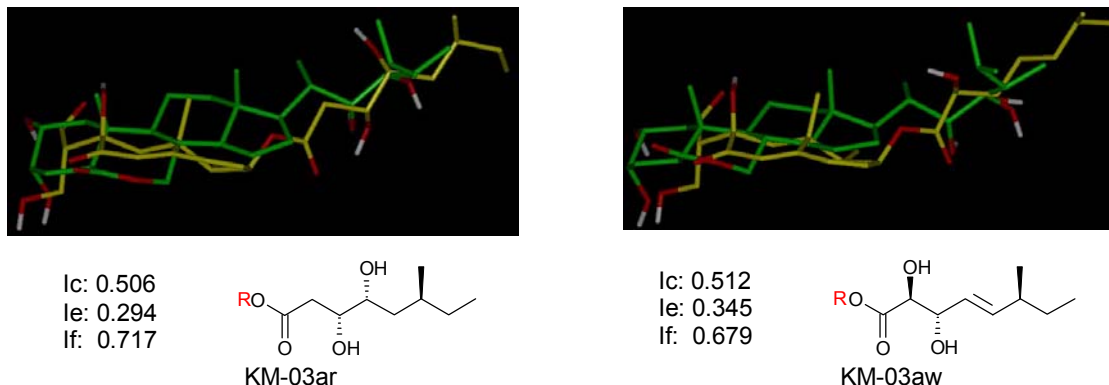
Els anàlegs que presenten un diol en la cadena lateral es poden agrupar en dos grups: KM-03ar, KM-03as, KM-03at i KM-03au que tenen un diol en posició  $\beta,\gamma$  de carbonil i KM-03av, KM-03aw, KM-03ax i KM-03ay que el tenen en posició  $\alpha,\beta$ . Tots ells presenten en general un baix índex de similitud de càrrega (0.345-0.147) malgrat que, en alguns d'ells, un elevat índex de similitud de forma (KM-03as 0.743 i KM-03ax 0.741). Això fa que els valors d'aquests compostos per als índexs combinats de similitud siguin també força baixos (0.543-0.424). Els valors elevats en l'índex de similitud de forma sembla que són conseqüència de que totes aquestes cadenes laterals que presenten un diol són força llargues i, per tant, es poden superposar força bé amb la cadena lateral de la brassinolida (**1**). Els baixos valors dels índexs de càrrega poden ser conseqüència que totes aquestes cadenes presenten tres grups polars en la cadena (un carbonil i dos hidroxils) i, en canvi, la cadena lateral de **1** presenta únicament dos hidroxils. Per tant, la cadena lateral d'aquests mimètics sempre presentarà una funcionalitat sense alinear-se amb els hidroxils de la cadena de la brassinolida (**1**).

A mode d'exemple es mostra, en la **Figura 78**, la superposició dels anàlegs KM-03ar (exemple d'un diol en  $\beta,\gamma$ ) i KM-03aw (exemple d'un diol en  $\alpha,\beta$ ) amb la brassinolida (**1**), juntament amb els corresponents índexs de similitud avaluats. En l'anàleg KM-03ar s'observa una bona aproximació d'aquest diol amb el diol de la cadena lateral de la brassinolida (**1**), però amb orientació oposada per l'hidroxil en  $\gamma$  de carbonil; en canvi, en l'anàleg KM-03aw qui es superposa amb el diol de **1** és el carbonil de l'ester de la cadena lateral i l'hidroxil en posició  $\beta$ , aquest amb l'orientació correcta.

En general, doncs, en els anàlegs amb cadena amb diol  $\alpha,\beta$  els grups funcionals que es superposen amb el diol  $22R,23R$  de la brassinolida (**1**) són el carbonil de l'ester i l'hidroxil en  $\beta$ , quedant l'hidroxil en  $\alpha$  no alineat amb cap grup polar de la brassinolida (**1**). En els anàlegs amb cadena amb diol  $\beta,\gamma$ , és aquest diol el que



s'aproxima bé al de la brassinolida (1), però quedant el carbonil de l'ester sense alinear-se amb cap grup polar. Per altra banda, sembla que els mimètics que presenten el diol en les posicions  $\beta,\gamma$  permeten superposar les funcionalitats polars de l'esquelet amb el diol de l'anell A i la lactona de l'anell B de la brassinolida (1) millor que aquells anàlegs que en la cadena presenten el diol en  $\alpha,\beta$ .



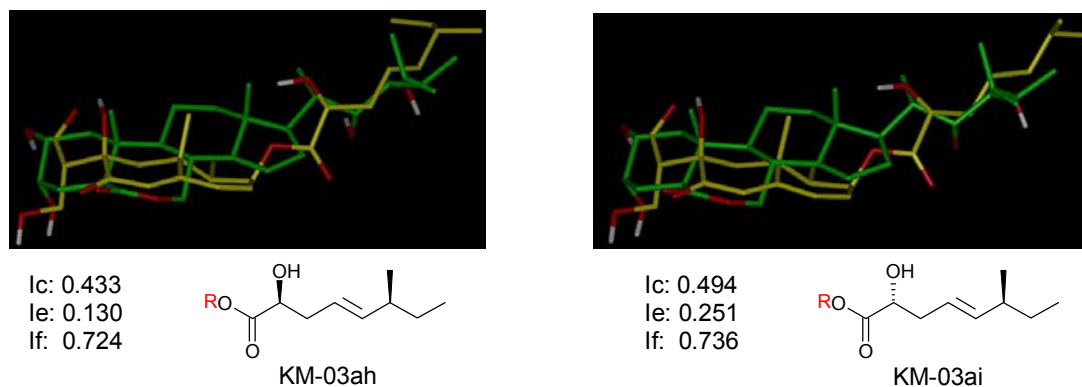
**Figura 78.** Superposició dels anàlegs KM-03ar i KM-03aw (en groc) amb la brassinolida (1), en verd.

Amb els resultats exposats sembla que, tot i no tractar-se dels millors candidats, no es poden descartar en aquest primer estudi computacional ja que els valors dels índexs de similitud de forma i combinat són força bons.

#### 5.4.1.3. Anàlegs amb un únic hidroxil en posició $\alpha$ de carbonil

Les cadenes laterals que presenten un hidroxil en  $\alpha$  de carbonil (ai, ah) no són bones candidates ja que les dues funcionalitats estan massa properes per aconseguir un bon alineament amb la brassinolida (1). Els valors d'índexs que presenten els compostos KM-03ai i KM-03ah són baixos en el combinat (0.433 i 0.493) i de càrrega (0.130 i 0.251) i elevats en el de forma (0.724 i 0.736).

En la **Figura 79** s'observa que en cap dels dos anàlegs representats hi ha un bon alineament entre el diol de la cadena lateral de 1 i els grups funcionals de la cadena del mimètic corresponent. Això es veu reflexa en els baixos índexs de similitud que presenten, amb la qual cosa aquests anàlegs ja es poden descartar com a candidats per a poder desencadenar activitat brassinoesteroide.



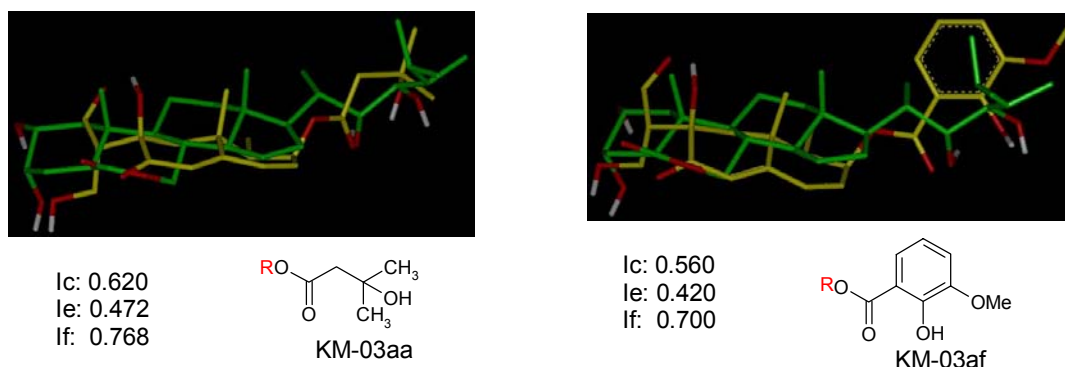
**Figura 79.** Superposició dels anàlegs KM-03ai i KM-03ah (en groc) amb la brassinolida (1), en verd.

#### 5.4.1.4. Anàlegs amb un hidroxil en posició $\beta$ de carbonil

Els anàlegs que presenten un únic hidroxil en  $\beta$  de carbonil (KM-03aa, KM-03ab, KM-03ae, KM-03af, KM-03ad, KM-03ap i KM-03ac) són els que presenten uns majors índexs de similitud de càrrega (0.472-0.366 i 0.302 per a KM-03ac) i combinat (0.620-0.512), fet que indica que són els millors candidats per a un bon alineament amb els hidroxils de la cadena de la brassinolida (**1**).

En la **Figura 80** es presenten a mode d'exemple dos d'aquests 7 anàlegs. En aquesta representació s'observa una bona superposició de les funcionalitats polars de la cadena d'ambdós anàlegs (en groc) amb el diol de la cadena lateral de la brassinolida (**1**), en verd. Tant en el KM-03aa com en el KM-03af, el carbonil de l'ester se situa en la zona de l'hidroxil 22*R*-OH de **1** i l'hidroxil de la posició  $\beta$  se situa proper al 23*R*-OH. A més, també hi ha un bon alineament dels grups funcionals de l'esquelet d'aquests anàlegs amb la lactona de l'anell B i amb l'hidroxil 3 $\alpha$ -OH de l'anell A de **1**.

Pel que fa referència a la configuració de l'hidroxil en la posició  $\beta$  no es poden extreure conclusions significatives. Si es comparen els valors dels índexs de similitud de les parelles d'anàlegs KM-03ae i KM-03ad per una banda i, KM-03ab i KM-03ac per una altra, s'observa que, en la primera, la configuració *S* (per sota el pla) de l'hidroxil de KM-03ae és millor que la *R* (per sobre el pla) de KM-03ad, i en canvi, en la segona parella, la configuració *S* (per sobre el pla) de KM-03ab sembla millor que no pas la *R* (per sota el pla) de KM-03ac.



**Figura 80.** Superposició dels anàlegs KM-03aa i KM-03af (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

D'aquestes set cadenes laterals, 5 d'elles són comercials (**aa**, **ad**, **ae**, **af**, **ap**) i per tant, es podran emprar per sintetitzar compostos d'aquest tipus amb relativa facilitat. Cal afegir també, que les cadenes comercials **aa** i **ae** són les que millors resultats presenten de totes les cadenes assajades.

#### 5.4.1.5. Anàlegs amb un únic hidroxil en posició $\gamma$ de carbonil

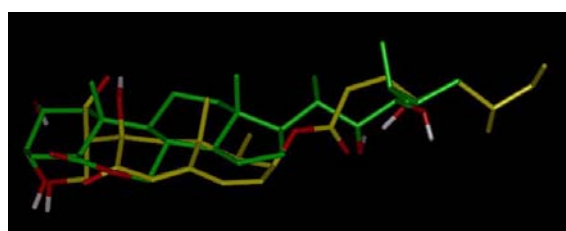
Els anàlegs del KM-01 (**9**) que presenten un hidroxil en  $\gamma$  de carbonil es poden agrupar en dos conjunts:

- el primer d'ells està format pels compostos que entre el carbonil de l'ester i l'hidroxil en  $\gamma$  presenten alguna característica estructural que permet que l'hidroxil de l'anàleg i el 23*R*-OH de la brassinolida (**1**) s'orientin considerablement bé (KM-03ag, KM-03an, KM-03ao i KM-03aq). Per tant, presenten uns valors d'índexs de similitud de càrrega (0.430-0.363) i combinat (0.566-0.493) força elevats. Així doncs, la cadena **ao** presenta un anell aromàtic, la cadena **an** un hidroxil primari i les cadenes **ag** i

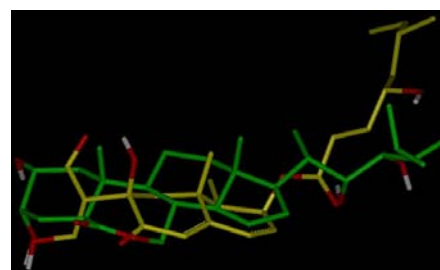
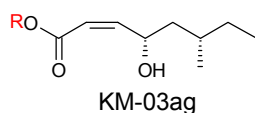
**aq** presenten un doble enllaç *cis* que permeten un bon alineament. L'única excepció de la sèrie és el compost KM-03aq que no s'alinea correctament degut a la configuració *R* del carboni en  $\gamma$ . Els valors dels índexs de similitud de forma per a aquests compostos són baixos (0.709-0.701, a excepció del KM-03an amb 0.768) ja que tots ells tenen cadenes curtes o bé cadenes llargues però amb un doble enllaç *cis*, el que fa que no s'orientin adequadament.

- el segon grup està format per dos molècules (KM-03al i KM-03am) que presenten entre el carbonil de l'ester i l'hidroxil en  $\gamma$  un doble enllaç *trans* que no permet una bona orientació d'aquest hidroxil. El compost KM-03al presenta uns índexs de similitud combinat, de càrrega i de forma de 0.447, 0.261 i 0.633 respectivament, i el compost KM-03am de 0.448, 0.255 i 0.640.

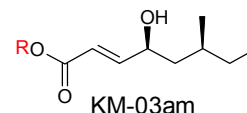
En la **Figura 81** es presenta l'alineament, amb la brassinolida (**1**), d'un anàleg del primer grup (el KM-03ag amb un doble enllaç *cis*) i, d'un anàleg del segon grup (el KM-03am amb un de *trans*). El compost KM-03ag presenta una bona superposició de l'hidroxil en  $\gamma$  amb l'hidroxil 23*R*-OH de **1**. Per contra, en l'anàleg KM-03am l'hidroxil en qüestió s'allunya molt del 23*R*-OH. Això és conseqüència de la presència d'un doble enllaç *trans* entre el carbonil de l'ester i l'hidroxil en  $\gamma$  (KM-03am).



Ic: 0.566  
Ie: 0.430  
If: 0.701



Ic: 0.448  
Ie: 0.255  
If: 0.640

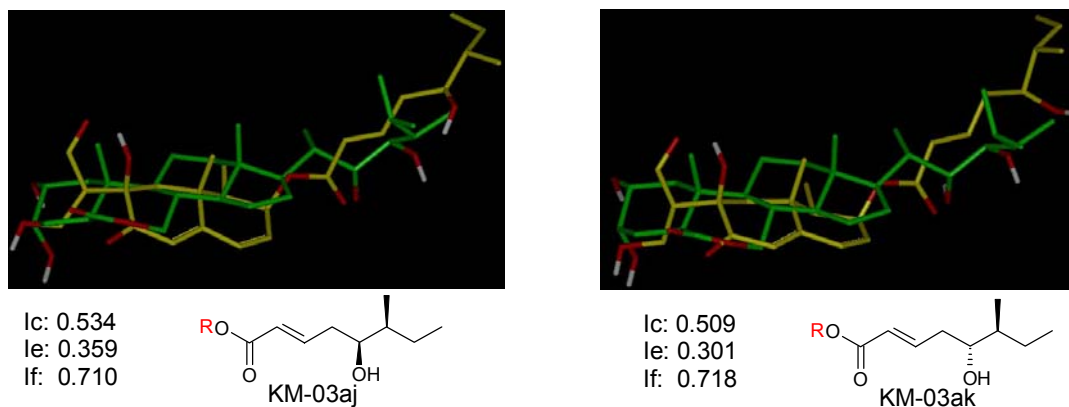


**Figura 81.** Superposició dels anàlegs KM-03ag i KM-03am (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

Per tant, els compostos del segon tipus són uns mals candidats i ja es poden descartar, mentre que els del primer grup s'analitzaran més a fons en l'estudi computacional exhaustiu, doncs en aquest estudi preliminar, tot i presentar un bon alineament en la zona polar de la cadena lateral de **1**, no se superposa correctament la part hidrofòbica d'aquesta.

#### 5.4.1.6. Anàlegs amb un sol hidroxil en posició $\delta$ de carbonil

Els compostos KM-03aj i KM-03ak presenten uns valors d'índexs de similitud inferiors als del primer grup de l'apartat anterior però superiors als del segon grup. Això és conseqüència, tal i com s'observa en la **Figura 82**, de que la posició  $\delta$  per a l'hidroxil és massa llunyana al carbonil de l'ester per a aconseguir un bon alineament amb la brassinolida (**1**) tot i estant totes dues funcionalitats ben orientades. Per tant, aquests compostos també es descarten. Cal afegir que la superposició de la part hidrofòbica d'aquestes cadenes tampoc és l'adequada.



**Figura 82.** Superposició dels anàlegs KM-03aj i KM-03ak (en groc) i la brassinolida (1), en verd.

#### 5.4.1.7. Els millors candidats

Després de discutir els valors dels índexs de similitud i els alineaments dels diferents anàlegs, ja s'està en disposició de decidir quines són les cadenes laterals que permeten obtenir una millor superposició amb el diol de la cadena lateral de la brassinolida (1). Són aquelles que presenten un hidroxil en posició  $\beta$ . Entre elles, els compostos amb uns valors d'índexs de similitud més elevats són els que contenen les cadenes **aa** i **ae**, ambdues comercialment assequibles. Però, com que els valors d'índexs de similitud de la cadena **aa**, tal i com es mostra en la **Taula 27**, són superiors als que s'obtenen per la cadena **ae**, s'escull la primera per a utilitzar-la com a part fixa en els anàlegs del següent grup.

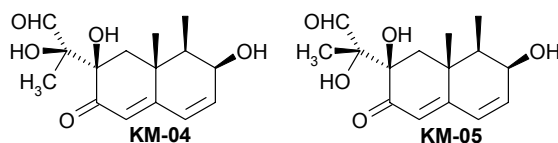
Es poden ja descartar, amb aquest estudi preliminar, les cadenes laterals que presenten un hidroxil en la posició  $\alpha$  o en la posició  $\delta$  o un diol en  $\alpha,\beta$  i aquelles que presenten entre el carbonil de l'èster i l'hidroxil en  $\gamma$ , un doble enllaç *trans*.

#### 5.4.2. Estudi de l'esquelet dels mimètics del KM-01(9)

Després d'estudiar les diverses cadenes laterals per a poder determinar la millor posició on situar l'hidroxil de la cadena lateral per a que s'orienti vers la zona de l'hidroxil 23*R*-OH de la brassinolida (1), se selecciona la cadena **aa** (**Figura 73**) per generar el segon grup de 21 molècules.

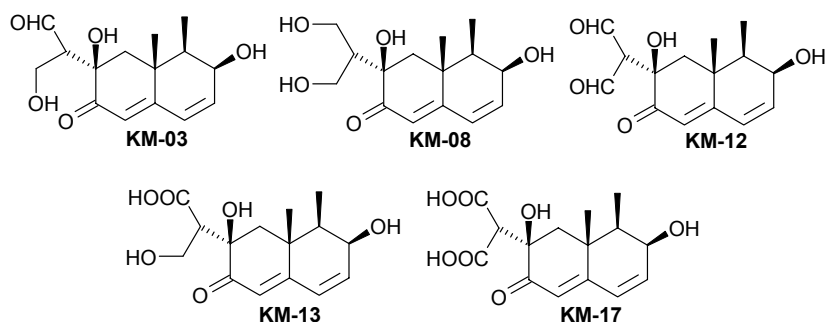
Els criteris de selecció dels diferents esquelets a estudiar són diversos:

- esquelets amb dues funcionalitats polars en les posicions C11 i C12 i un hidroxil a C7 per analogia amb l'inhibidor KM-01 (9). Aquests compostos generen un nou centre quiral en la posició C11 i, per tant, augmenten la dificultat de la seva síntesi (**Figura 83**).



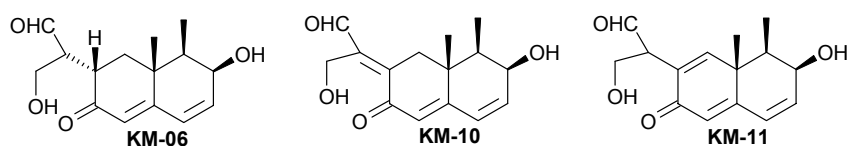
**Figura 83.** Esquelets amb dues funcionalitats polars a C11 i C12 i un hidroxil a C7.

- esquelets amb dues funcionalitats polars en les posicions C12 i C13 i un hidroxil en la posició C7 (**Figura 84**). En aquest conjunt es troben presents esquelets que també generen un centre quiral en la posició C11. Això és una conseqüència directa d'emprar com a grups polars dues funcionalitats diferents. Per tant, en el cas d'emprar dos hidroxils, dos àcids o dos aldehids no es generaria cap nou centre quiral i, d'aquesta manera, es disminuiria la dificultat sintètica.



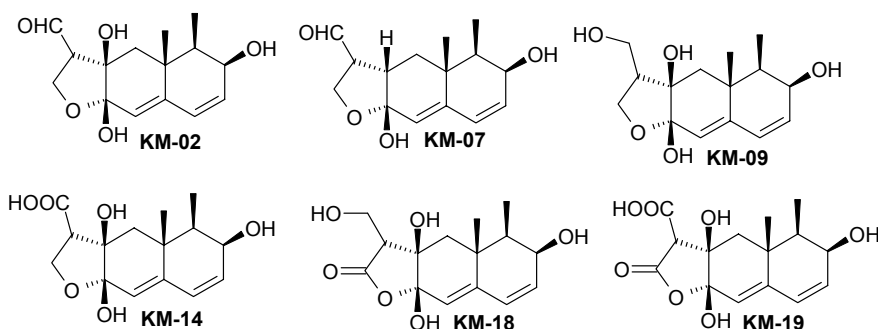
**Figura 84.** Esquelets amb dues funcionalitats polars a C12 i C13 i un hidroxil a C7.

- esquelets que contenen dues funcionalitats en les posicions C12 i C13 però que eliminen l'hidroxil de C7 (**Figura 85**) ja que, com s'ha vist en la **Figura 18**, aquest no s'alinea amb cap funcionalitat de la brassinolida (1).



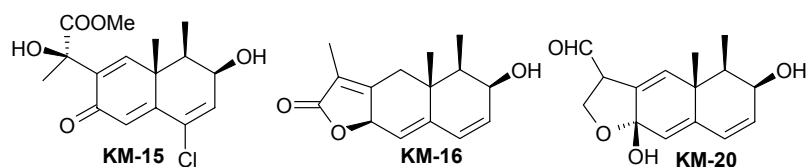
**Figura 85.** Esquelets amb dues funcionalitats polars a C12 i C13 sense l'hidroxil a C7.

- esquelets dels dos grups anteriors en els que es produeix una ciclació intramolecular (**Figura 86**). Cal recordar que en aquells casos on el grup introduït a C12 o C13 sigui un hidroxil o un àcid carboxílic, pot donar-se una ciclació intramolecular generant-se un tercer anell de 5 baules mitjançant la formació d'un hemiacetal, de la mateixa manera que succeïa amb l'eremofortina C (**Figura 26**).



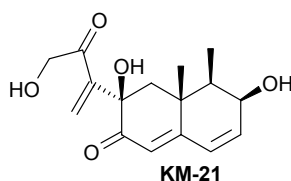
**Figura 86.** Esquelets amb dues funcionalitats polars a C12 i C13 on s'ha produït una ciclació intramolecular.

- esquelets on la seva síntesi a partir de la PR toxina (**19**), producte de partida, ja ha estat descrita en la literatura (**Figura 87**).<sup>241</sup>



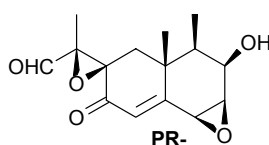
**Figura 87.** Esquelets de la literatura obtinguts a partir de la PR toxina (**19**).

- un esquelet amb una doble funcionalitat polar a C12 (**Figura 88**).



**Figura 88.** Esquelet amb una doble funcionalitat polar a C12.

- finalment, un anàleg de la PR toxina (**19**) on únicament s'ha substituït el seu grup acetat per la cadena lateral en estudi (**Figura 89**). Aquest compost seria més senzill de sintetitzar que la resta de mimètics ja que s'obtidria per desprotecció de l'hidroxil de **19** i ancoratge de la cadena lateral per esterificació.



**Figura 89.** Esquelet de la PR toxina (**19**).

Un cop calculats els índexs de similitud es procedeix a discutir els valors obtinguts per a cadascun dels mimètics per tal d'assabentar-se quins són els millors candidats amb possibilitats de desencadenar activitat brassinoesteroide. Cal recordar que ara també tots els valors dels índexs de similitud són força semblants donat que únicament es varia una petita part de l'estructura dels anàlegs. En aquest cas, també succeeix quelcom semblant al que succeïa quan s'analtzaven les cadenes laterals, ja que el valor de l'índex de similitud electrostàtic és inferior al de forma però el seu marge és superior (0.268 front a 0.148).

En la **Taula 28** també es presenten els índexs de similitud de forma, càrrega i el combinat dels dos anteriors (1:1) dels 21 anàlegs que mantenen fixa la cadena lateral i varien els grups funcionals presents en els anells. Els compostos de la **Taula 28** es presenten en ordre decreixent del valor d'índex de similitud combinat i, al costat dels índexs de similitud de càrrega i forma, s'hi indica la posició en que el compost es troba dins la sèrie considerant l'índex corresponent.

	Estructura	Combinat (Ic)	Càrrega (Ie)	Forma (If)	
KM-16aa	sintètic	0.663	0.605	1°	0.722 16°
KM-12aa	C12 i C13 ciclat	0.663	0.532	3°	0.793 5°
KM-17aa	C12 i C13 no ciclat	0.653	0.534	2°	0.771 11°
KM-13aa	C12 i C13 ciclat	0.634	0.446	13°	0.799 2°
KM-08aa	C12 i C13 no ciclat	0.633	0.469	11°	0.798 3°
KM-06aa	No OH a C7 no ciclat	0.632	0.494	4°	0.771 12°
KM-11aa	Doble enllaç C6-C7	0.631	0.485	5°	0.777 8°
KM-02aa	C12 i C13 ciclat	0.629	0.481	6°	0.777 7°
KM-03aa	C12 i C13 no ciclat	0.620	0.472	9°	0.768 13°
KM-19aa	C12 i C13 ciclat	0.617	0.439	15°	0.795 4°
KM-21aa	Doble funció a C12	0.614	0.470	10°	0.758 14°
KM-14aa	C12 i C13 no ciclat	0.609	0.428	16°	0.789 6°
KM-07aa	No OH a C7 ciclat	0.604	0.472	8°	0.735 15°
KM-09aa	C12 i C13 ciclat	0.595	0.415	17°	0.776 10°
KM-15aa	sintètic	0.589	0.468	12°	0.711 18°
KM-20aa	Doble enllaç C6-C7	0.589	0.402	18°	0.776 9°
KM-18aa	C12 i C13 ciclat	0.580	0.355	20°	0.805 1°
KM-04aa	C11 i C12	0.575	0.474	7°	0.676 20°
KM-05aa	C11 i C12	0.550	0.442	14°	0.658 21°
KM-10aa	Doble enllaç C7-C11	0.545	0.377	19°	0.712 17°
PR-aa	PR toxina (19)	0.514	0.337	21°	0.692 19°

Taula 28. Índexs de similitud dels mimètics de 9 amb variacions a l'esquelet.

#### 5.4.2.1. Anàlegs amb els índexs de similitud més elevats

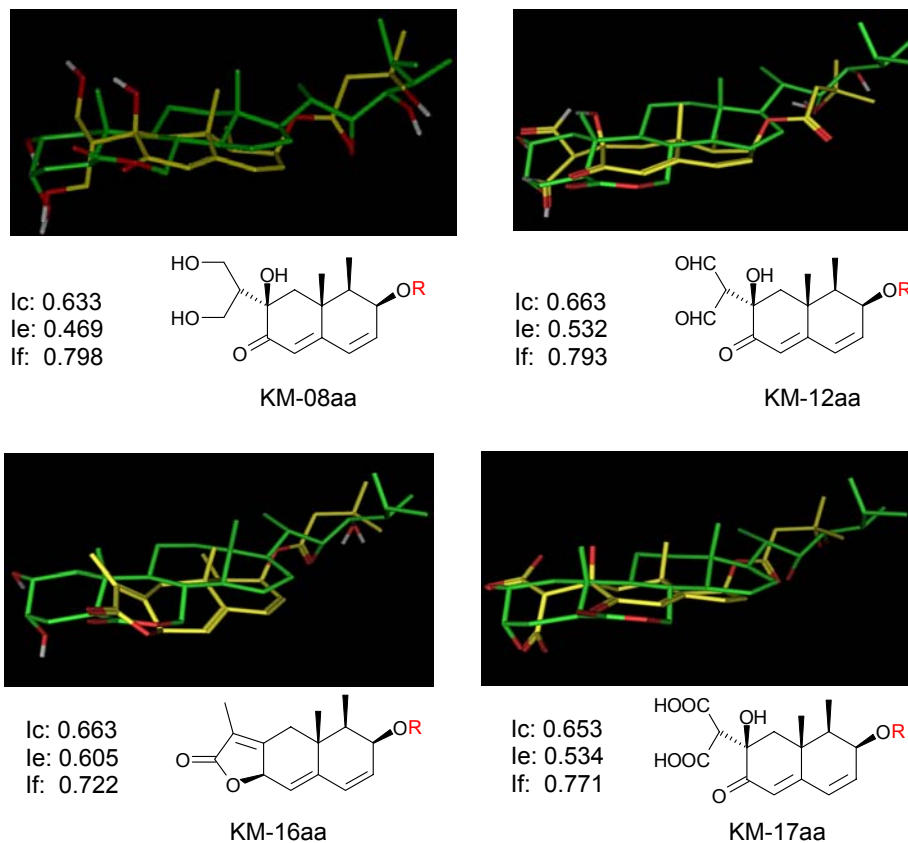
Índex de similitud combinat (Ic): els 6 mimètics que presenten un Ic més elevat (0.663-0.632) són: KM-16aa, KM-12aa, KM-17aa, KM-13aa, KM-08aa i KM-06aa. Tots ells, a excepció del KM-16aa, presenten un parell de grups polars (hidroxil, carbonil o àcid carboxílic) en les posicions C12 i C13, fet que fa pensar que aquestes són les millors posicions on situar aquests grups. Els anàlegs que presenten uns pitjors índexs de similitud combinats (0.575-0.514) són KM-04aa, KM-05aa, KM-10aa i PR-aa, és a dir, aquells compostos que estan funcionalitzats en C11 i C12 o bé aquells que presenten un moviment més restringit en l'enllaç C7-C11, ja sigui per la presència d'un doble enllaç o un epòxid.

Índex de similitud de forma (If): els 6 valors dels If més elevats (0.805-0.789) s'obtenen amb els anàlegs KM-18aa, KM-13aa, KM-08aa, KM-19aa, KM-12aa i KM-14aa. D'aquests valors no es pot extreure cap conclusió significativa però sí indicar que tots ells presenten funcionalitat a C12 i C13. Tot i així, cal destacar els baixos valors dels compostos PR-aa, KM-04aa i KM-05aa (0.692-0.658), que es corresponen amb els compostos que tenen com a base la PR toxina (19) o bé amb aquells que situen un hidroxil directament en el carboni C11.

Índex de similitud de càrrega (Ie): els 6 anàlegs en que s'obtenen uns índexs de similitud de càrrega més elevats (0.604-0.481) són KM-16aa, KM-17aa, KM-12aa, KM-06aa, KM-11aa i KM-02aa. En aquest cas també tots ells, a excepció del KM-16aa, presenten les funcionalitats polars en estudi en els carbonis C12 i C13. Per tant, sembla ser que els candidats que millor es superposen amb la brassinolida (1) són aquells que estan funcionalitzats en C12 i C13. Els pitjors candidats són els anàlegs que presenten un doble enllaç (KM-10aa) o un epòxid entre els carbonis C7-C11 (PR-aa), tal com ho demostren els baixos índexs de

similitud electrostàtica d'aquests compostos, 0.377 i 0.337 respectivament.

A continuació, en la **Figura 90**, es mostren les superposicions dels mimètics KM-08aa, KM-12aa, KM-16aa i KM-17aa ja que són dels mimètics amb millor índex de similitud combinat de càrrega i forma.



**Figura 90.** Superposició dels anàlegs KM-08aa, KM-12aa, KM-16aa i KM-17aa (en groc) amb **1**, en verd.

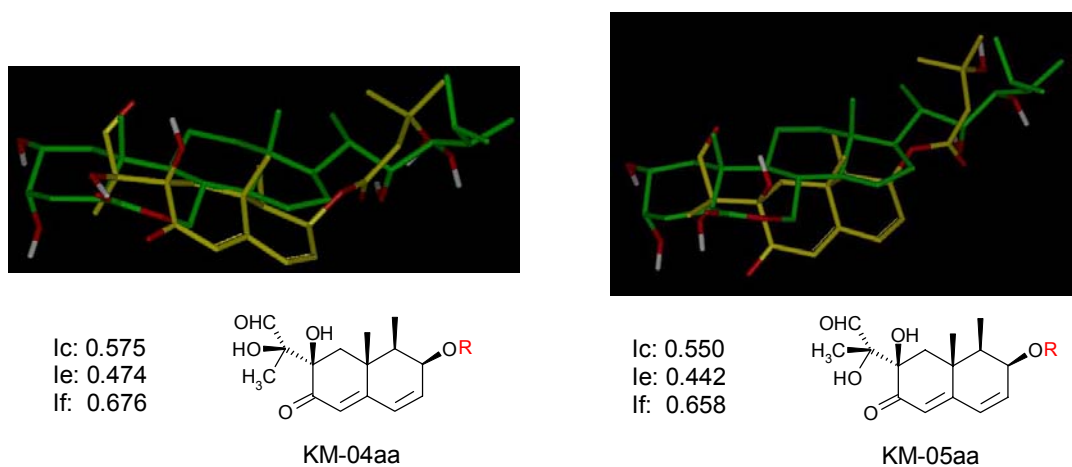
S'observa una molt bona superposició en la regió de les zones polars en els anàlegs KM-12aa i KM-17aa, i fins i tot en part de la cadena lateral. Aquest fet explica els elevats índexs de similitud electrostàtica que s'obtenen per a aquests mimètics. El mimètic KM-16aa està en contra d'aquesta bona tendència ja que els bons índexs de similitud electrostàtica no es veuen ben reflectits en la superposició mostrada en la regió del diol de l'anell A. Per altra banda, el mimètic Km-08aa presenta una molt bona superposició en tota l'estructura justificant d'aquesta manera l'elevat índex de similitud de forma calculat.

#### 5.4.2.2. Anàlegs funcionalitzats a C11 i C12

Els compostos funcionalitzats en les posicions C11 i C12 (KM-04aa, KM-05aa i KM-15aa) són dels compostos que pitjors índexs de similitud de forma (0.711-0.658) i combinat (0.589-0.550) ofereixen. Malgrat tot, presenten, dins la sèrie, uns valors intermedis dels índexs de similitud de càrrega (0.474, 0.468 i 0.442). La distància existent entre els grups polars introduïts en l'esquelet de l'anàleg i l'hidroxil en posició  $\beta$  de la cadena lateral d'aquest mateix anàleg, és massa petita per permetre un bon solapament amb el diol de l'anell A de la brassinolida (**1**). En vista dels resultats obtinguts, s'ha d'evitar situar la funcionalitat que es desitja que s'aproximi a la zona de l'hidroxil  $3\alpha$ -OH de la brassinolida (**1**) en el carboni C11.



En la **Figura 91** s'observa que no hi ha alineament entre el diol de l'anell A de **1** amb els grups polars units a C11 dels anàlegs que s'hi representen. Per tant, aquests compostos no són uns bons candidats.



**Figura 91.** Superposició dels anàlegs KM-04aa i KM-05aa (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

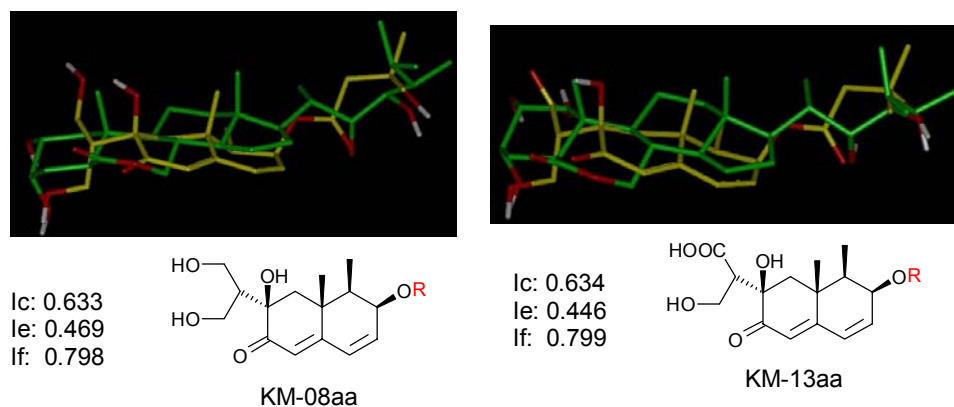
#### 5.4.2.3. Anàlegs funcionalitzats a C12 i C13

En aquest grup, on tots els anàlegs presenten, a més de l'hidroxil a C7, un grup polar en les posicions C12 i C13, es poden diferenciar tres subgrups:

- anàlegs on aquests grups polars són iguals i per tant, no es genera un nou centre quiral en el carboni C11. Aquests tres anàlegs (KM-08aa, KM-12aa i KM-17aa) presenten uns índexs de similitud combinats (0.663-0.633) molt elevats, fet que els converteix en uns bons candidats. L'índex de similitud de càrrega també és molt elevat en els compostos amb els esquelets KM-12 i KM-17 (0.534-0.532) i una mica inferior en el mimètic KM-08aa (0.469). Amb l'índex de similitud de forma succeeix quelcom semblant, és força elevat en els anàlegs KM-08aa i KM-12aa (0.798-0.793) però una mica inferior per l'anàleg KM-17aa (0.771). Tot i així, s'haurien de sotmetre a un estudi computacional més a fons per acabar de determinar si tots tres són bons candidats. Sembla doncs interessant evitar la formació d'un nou centre quiral en el carboni C11, facilitant així la seva síntesi.
- anàlegs amb diferent funcionalitat polar a C12 i C13, amb la conseqüent generació d'un nou centre quiral a C11. Els seus valors d'índex de similitud no són pas superiors als anteriors, sinó inclús lleugerament inferiors: 0.620 (KM-03aa) i 0.634 (KM-13aa) per al combinat, 0.768 (KM-03aa) i 0.799 (KM-13aa) per al de forma i 0.472 (KM-03aa) i 0.446 (KM-13aa) per a l'electrostàtic.
- anàlegs que presenten un grup hidroxil o àcid en la posició C12 o C13 i es troben en la seva forma ciclada, donant lloc a un tercer anell de 5 baules. En aquest estudi preliminar s'han estudiat els anàlegs en la forma ciclada (KM-02aa, KM-09aa, KM-14aa, KM-18aa, KM-19aa) que es corresponen amb els no ciclats dels dos subgrups anteriors, obtenint-se uns valors inferiors als de les formes no ciclades d'índexs de similitud combinat (0.629-0.580) i d'índexs de similitud electrostàtica (0.439-0.355, a excepció de KM-02aa amb 0.481) però força elevats d'índexs de similitud de forma (0.805-0.776). La possibilitat de que es doni aquest equilibri entre les dues formes (ciclada-no ciclada) i els baixos valor d'índexs fa que es qüestionari l'interès d'aquests anàlegs.

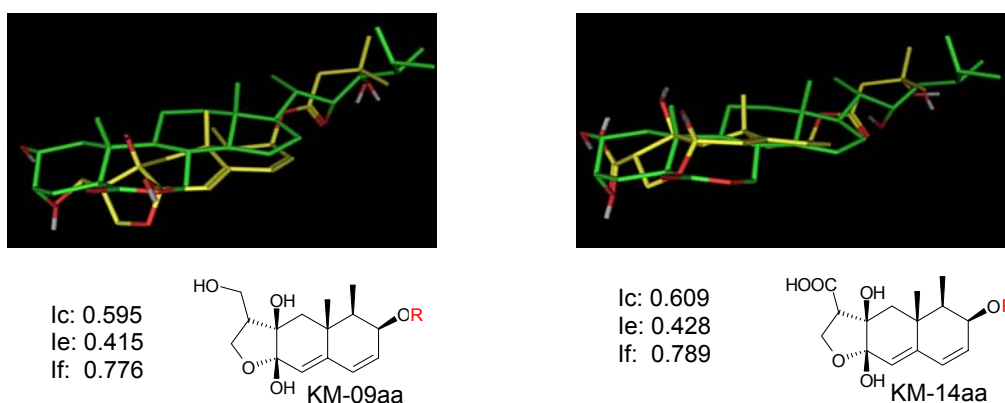
En la **Figura 92** es representa l'anàleg KM-08aa que presenta els dos grups polars a C12 i C13 iguals i l'anàleg KM-13aa que els presenta diferents. Així, s'observa per ambdós anàlegs una bona superposició

tant en la zona del diol de la cadena lateral de la brassinolida (**1**) com en les zones de la lactona de l'anell B i de l'hidroxil  $3\alpha$ -OH de l'anell A. Únicament no s'observa un bon alineament en la zona de l'hidroxil  $2\alpha$ -OH de **1**, però es podria millorar considerablement (sense distorsionar gaire la resta de la molècula) considerant un altre conformató on es pogués girar (manualment) aquest enllaç que uneix C12 amb la funcionalitat polar de l'anàleg de forma que adoptés una orientació més adequada. Per tant, els anàlegs que presenten un esquelet amb aquestes característiques són uns molt bon candidats per a superposar-se adequadament amb la brassinolida (**1**).



**Figura 92.** Superposició dels anàlegs KM-08aa i KM-13aa (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

En la **Figura 93** es representa l'anàleg KM-09aa, la forma ciclada del compost KM-08aa i l'anàleg KM-14aa, la forma ciclada del KM-13aa quan cicla pel grup hidroxil. Així, s'observa per ambdós anàlegs una bona superposició en la zona del diol de la cadena lateral de la brassinolida (**1**) i en la zona de l'hidroxil  $3\alpha$ -OH de l'anell A. Únicament no s'observa un bon alineament en la zona de la lactona i en l'anàleg KM-09aa tampoc s'observa bon alineament en la zona de  $2\alpha$ -OH de **1**. Cal també remarcar que aquests dos anàlegs presenten un alineament pitjor que els corresponents KM-08aa i KM-13aa. En formar-se aquest tercer anell, l'hemiacetal format no se superposa correctament amb la lactona de l'anell B, fet que podria explicar que les estructures ciclades presentin uns índexs de similitud amb la brassinolida (**1**) inferiors.



**Figura 93.** Superposició dels anàlegs KM-09aa i KM-14aa (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

#### 5.4.2.4. Anàlegs funcionalitzats a C12 i C13 on s'omet l'hidroxil de C7

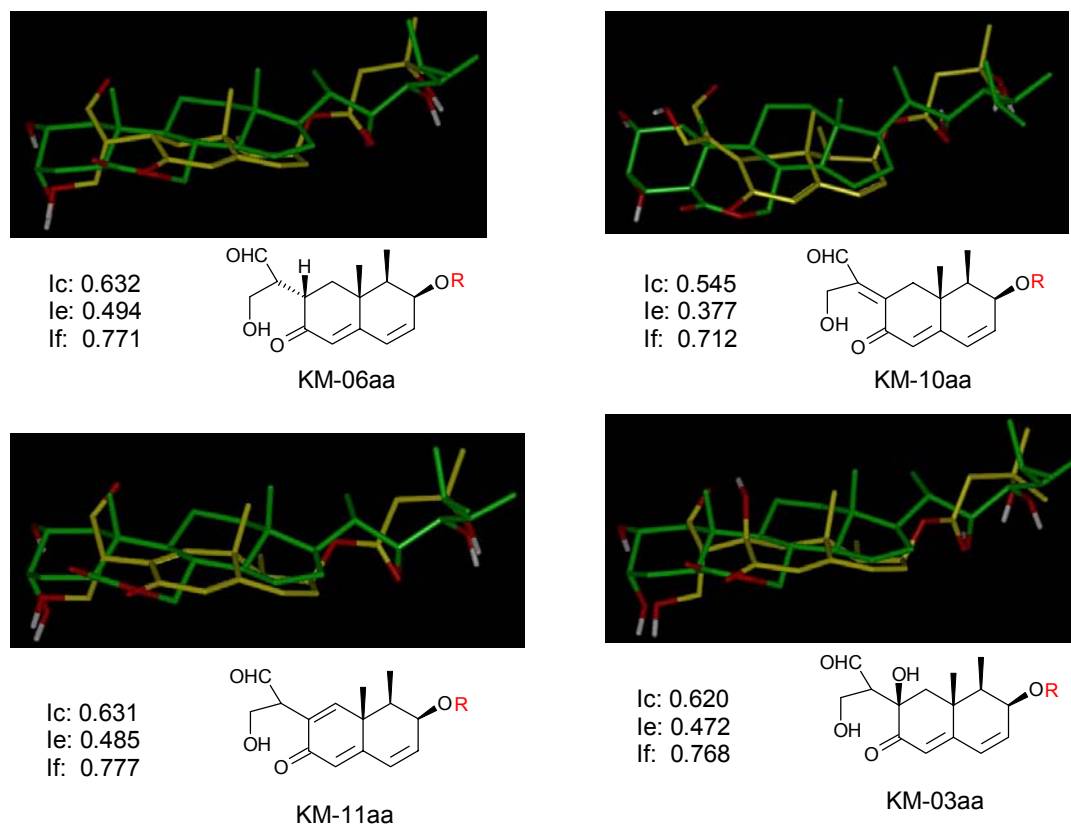
En aquest grup també es pot fer una diferenciació en subgrups segons si aquests anàlegs presenten:

- un doble enllaç exocíclic, entre els carbonis C7 i C11. L'anàleg KM-10aa, únic component d'aquest

subgrup, presenta uns índexs de similitud força dolents (**Figura 94**), doncs el doble enllaç exocíclic no li permet superposar-se adequadament amb la brassinolida (**1**) ja que aquest enllaç entre C7 i C11 té restringit el seu moviment. Per tant, ja es poden descartar aquells anàlegs que presentin un doble enllaç exocíclic entre els carbonis C7 i C11.

- un doble enllaç endocíclic, entre els carbonis C6 i C7 (KM-11aa i la seva forma ciclada KM-20aa), o bé un hidrogen enloc de l'hidroxil de C7 (KM-06aa i la seva forma ciclada KM-07aa). En aquest grup es poden corroborar els resultats obtinguts anteriorment per a les parelles d'anàlegs que presenten les dues formes (ciclada - no ciclada), ja que també s'obtenen uns valors d'índexs de similitud inferiors per a les formes ciclades. Els valors dels índexs de similitud dels anàlegs KM-06aa i KM-11aa, són del mateix ordre que els que s'obtenen per als corresponents anàlegs amb l'hidroxil en C7 (KM-03aa). Per tant, sembla ser que no afecta el fet de tenir sobre C7 un hidroxil, un hidrogen o un doble enllaç endocíclic (entre C6 i C7); doncs, tots tres presenten un bon alineament amb la brassinolida (**1**). Per acabar de determinar quin de tots ells és el millor candidat s'hauria d'estudiar a fons l'estratègia de síntesi i realitzar un estudi computacional exhaustiu.

En la **Figura 94** es pot apreciar com l'anàleg KM-11aa (que presenta un doble enllaç endocíclic entre C6 i C7), l'anàleg KM-06aa (que presenta un hidrogen enloc de l'hidroxil a C7) o bé l'anàleg KM-03aa (que presenta un hidroxil a C7) es superposen força millor que l'anàleg KM-10aa (que presenta un doble enllaç exocíclic entre C7 i C11).



**Figura 94.** Superposició dels anàlegs KM-06aa, KM-10aa, KM-11aa i KM-03aa (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

En els tres primers s'observa una bona superposició amb les zones del diol de la cadena lateral, de la lactona de l'anell B i de l'hidroxil 3 $\alpha$ -OH de l'anell A de la brassinolida (**1**) però no en la zona del 2 $\alpha$ -OH.

En la mateixa **Figura 94** s'observa que l'anàleg KM-10aa, tot i presentar un bon alineament amb el diol de la cadena lateral de **1**, no es superposa gens bé en la zona del diol de l'anell A.

Per tant, els tres esquelets KM-03, KM-06 i KM-11 són molt bons candidats.

#### 5.4.2.5. Anàleg amb doble funcionalitat a C12

L'anàleg KM-21aa presenta sobre el carboni C12 una cetona i un grup  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . En aquest cas, a pesar de que els índexs obtinguts són d'un valor intermedi, la superposició no es tan bona com en el cas dels mimètics que presenten les seves funcionalitats polars en C12 i C13, fet que fa descartar aquests candidats.

#### 5.4.2.6. Anàleg que presenten com a esquelet base el de la PR toxina (19)

Un cop estudiades les diferents possibilitats i tal com ja s'ha indicat, es decideix ancorar sobre l'esquelet de PR toxina (**19**) la cadena **aa** per determinar si pot resultar útil sintetitzar aquest anàleg (PR-aa) ja que resultaria una síntesi força senzilla si es compara amb la resta de mimètics proposats. Aquest anàleg és qui presenta els pitjors índexs de similitud de tot el conjunt i aquests valors són molt semblants als del KM-10aa, que és el compost que presenta un doble enllaç exocíclic entre C7 i C11. Això fa pensar que aquesta mala superposició és conseqüència de la mala orientació dels grups polars de C12 provocada per la fixació de l'enllaç C7-C11, ja sigui mitjançant un epòxid o un doble enllaç. De totes maneres, els compostos amb esquelet de **19** s'estudien més a fons en l'apartat 5.4.3.

#### 5.4.2.7. Els millors candidats

En vista de tots els resultats comentats, els millors candidats com a esquelets d'aquests anàlegs són el KM-12, KM-08 i KM-16, on els dos primers presenten dos grups funcionals polars en els carbonis C12 i C13 i un hidroxil a C7. A més, els anàlegs del tipus KM-12 i KM-08, és a dir, els que presenten dos grups funcionals iguals, són els més interessants ja que d'aquesta manera s'evita la formació d'un nou centre quiral en el carboni C11, fet que en dificultaria la síntesi.

Tot i així, faltaria aprofundir en si la diferència d'índexs de similitud entre els compostos amb un nou centre quiral a C11 i els que no el presenten compensa l'esforç addicional que se suposa que es té que realitzar per sintetitzar els primers. El KM-16aa, un anàleg sintètic descrit en la literatura a partir de PR toxina (**19**) també sembla que pugui ser un bon candidat, tot i la no presència de dos funcionalitats polars a C12 i C13.

Uns altres candidats als que no s'ha de restar importància són aquells que tenen els requisits anteriorment citats però no presenten un hidroxil a C7, ja sigui per la presència d'un doble enllaç endocíclic entre els carbonis C6 i C7 (KM-11aa) o simplement un hidrogen (KM-06aa). En aquest cas, també s'hauria de realitzar un estudi computacional més a fons per acabar de determinar la influència d'aquestes funcionalitats.

Els candidats que es poden descartar, ara per ara, són aquells compostos que no tenen les dues noves funcionalitats polars introduïdes en els carbonis C12 i C13: anàlegs funcionalitzats a C11 i C12 (KM-04aa, KM-05aa, KM-15aa) i anàlegs amb doble funcionalitat a C12. També són descartables aquells anàlegs funcionalitzats a C12 i C13 i amb un doble enllaç exocíclic entre C7 i C11 (KM-10aa).

### 5.4.3. PR toxina (19) com a base dels mimètics del KM-01 (9)

Com ja s'ha comentat anteriorment, a pesar dels resultats obtinguts amb el compost PR-aa, es va decidir, degut a la seva facilitat sintètica, generar un nou grup de molècules mantenint l'esquelet de la PR toxina (19) i variant les cadenes laterals, **Figura 74**. D'aquesta manera, s'estaria en disposició de predir l'interès de sintetitzar una molècula a partir de la PR toxina (19). Per obtenir aquesta molècula únicament faria falta desprotegir l'hidroxil de 19 i esterificar la molècula obtinguda amb la cadena lateral corresponent.

El criteri de selecció d'aquestes cadenes fou que fossin comercialment assequibles (**aa, ad, ae, af**) ja que amb aquests anàlegs es busca rapidesa sintètica i amb bons índexs de similitud en l'estudi anterior. Tot i així, també es van avaluar els resultats que s'obtenien amb algunes de les cadenes no comercials; les que millors resultats havien donat en l'estudi primer de les cadenes laterals (**ab, ac**).

A continuació, en la **Taula 29** es presenten, en ordre decreixent d'índex de similitud combinat, els resultats obtinguts pels anàlegs corresponents a les característiques estructurals citades.

	Combinat	Carga		Forma	
<b>PR-af</b>	0.551	0.403	1°	0.699	2°
<b>PR-ad</b>	0.550	0.374	3°	0.726	1°
<b>PR-ae</b>	0.550	0.401	2°	0.698	3°
<b>PR-aa</b>	0.514	0.337	5°	0.692	4°
<b>PR-ac</b>	0.491	0.350	4°	0.632	6°
<b>PR-ab</b>	0.470	0.303	6°	0.636	5°

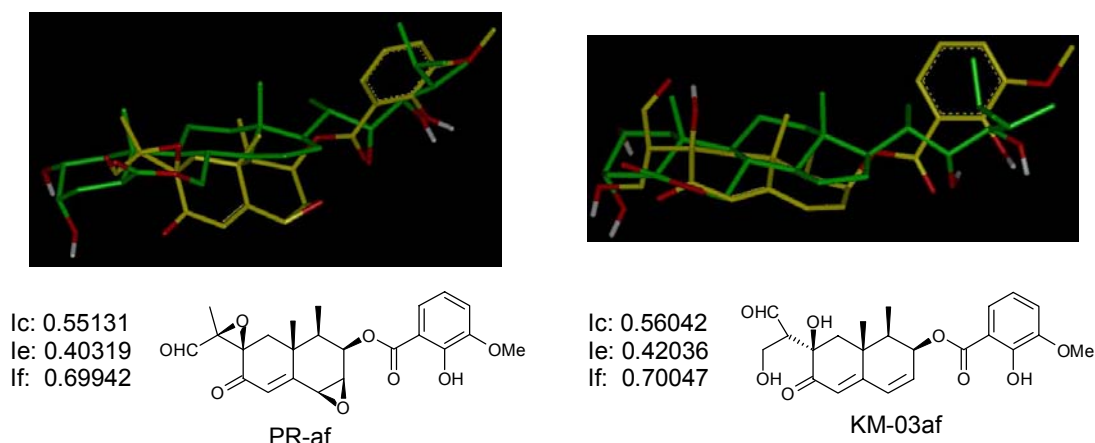
**Taula 29.** Índexs de similitud dels mimètics de 9 amb esquelet de 19.

En aquest cas, els mimètics que presenten un major valor d'índex de similitud combinat (0.551-0.550) són PR-ad, PR-ae i PR-af. Els mateixos anàlegs són també els que presenten els millors valors per als altres dos índexs de similitud (0.403-0.374 per al de càrrega i 0.726-0.698 per al de forma). Per tant, les millors cadenes laterals per a la PR toxina (19) són **ad, ae** i **af**. Tot i així, presenten uns índexs inferiors als que s'obtenen amb altres esquelets diferents als de la PR toxina (19).

En la **Figura 95** es comparen dos anàlegs: el PR-af (que presenta un esquelet base de PR toxina (19)) i el KM-03af (que presenta un esquelet funcionalitzat en C12 i C13). S'observa que l'esquelet base de PR toxina (19), en principi, és una pitjor opció per a la formació d'un mimètic del KM-01 (9) amb bona activitat brassinoesteroide ja que les funcionalitats presents en PR-af, a diferència del KM-03af, es troben molt allunyades del diol de l'anell A de la brassinolida (1). Amb tot, l'orientació final del PR-af no és la que a priori s'esperava. S'interpreta que el programa hagi pogut tractar el carbonil de l'aldehid i l'oxigen de l'epòxid tal com si fossin el grup carboxilat d'un èster. Així doncs, com s'observa en la **Figura 95**, ha superposat l'aldehid del PR-af amb la lactona de l'anell B de la brassinolida (1) enlloc de superposar-lo amb els diols de l'anell A d'aquesta.

Donada la facilitat sintètica d'aquests anàlegs es va creure interessant sintetitzar anàlegs d'aquest tipus per intentar extreure unes primeres conclusions sobre l'interès d'aquests mimètics com a promotors del creixement vegetal. A més, la diferència entre els valors d'índex de similitud no és significativament diferent entre els compostos que es comparen en la **Figura 95** per exemple. Per tant, es decideix sintetitzar els anàlegs PR-ad o PR-ae i PR-af (els anàlegs amb millors índexs de similitud). Els dos primers presenten

l'hidroxil sobre una cadena lateral saturada i en canvi el tercer sobre un anell benzènic.



**Figura 95.** Superposició dels anàlegs PR-af i KM-03af (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

## 5.5. Conclusions

Les conclusions que es poden extreure dels valors obtinguts pels diferents índexs dels 51 mimètics avaluats es resumeixen en diversos punts:

- Les posicions idònies on situar el nou grup hidroxil de la cadena lateral és en  $\beta$  (KM-03aa, KM-03ae, KM-03ab, KM-03af o KM-03ad entre d'altres) o en  $\gamma$  però sense la presència d'un doble enllaç *trans* entre l'ester i el nou hidroxil (KM-03ag, KM-03an, KM-03ao, KM-03aq). D'aquestes cadenes, les de tipus **aa**, **ae**, **af** i **an** són comercials, amb la qual cosa augmenta el seu interès per la facilitat sintètica que això suposa.
- Aquells anàlegs que presenten un diol en la posició  $\alpha,\beta$  de carbonil (KM-03ar, KM-03as, KM-03at i KM-03au) o la posició  $\beta,\gamma$  (KM-03av, KM-03aw, KM-03ax i KM-03ay) no es poden descartar encara i s'haurien de sotmetre a un estudi computacional més a fons per a poder determinar la seva validesa.
- Altres posicions més properes a la cetona de l'ester, com és en  $\alpha$  (KM-03ah i KM-03ai), o més llunyanes com és en  $\delta$  (KM-03aj i KM-03ak), queden descartades al no aconseguir-se un bon alineament amb el diol de la cadena de la brassinolida (**1**).
- També es descarten les cadenes laterals que presenten un hidroxil en la posició  $\gamma$  i, entre aquest i la cetona de l'ester, un doble enllaç *trans* (KM-03al i KM-03am).
- Una bona superposició amb el diol de l'anell A de la brassinolida (**1**) s'aconsegueix situant una funcionalitat polar a C12 i l'altra a C13 (KM-03aa, KM-06aa o KM-11aa entre d'altres). A més, si aquestes dues funcionalitats són iguals, s'evita la generació d'un nou centre quiral a C11.
- En la mesura del que es pugui s'ha d'evitar situar un doble enllaç exocíclic entre C7 i C11 (KM-10aa) ja que aquest fa disminuir força l'alineament de l'anàleg en estudi amb la brassinolida (**1**). Per contra, no suposa cap variació significativa el fet de substituir l'hidroxil de C7 (KM-03aa) per un doble enllaç endocíclic (KM-11aa) o simplement eliminar-lo (KM-06aa).
- També es poden descartar els anàlegs que presenten una doble funcionalitat a C12 (KM-21aa) i aquells funcionalitzats a C11 i C12 (KM-04aa i KM-05aa).
- Si se situa en C11 un grup  $-\text{COOH}$  (KM-13aa, KM-17aa o KM-19aa entre d'altres) o bé un grup  $-\text{CH}_2\text{OH}$  (KM-03aa, KM-06aa o KM-08aa entre d'altres) es pot produir un equilibri entre la forma

oberta i ciclada intramolecularment pel que es qüestiona la utilitat d'aquests anàlegs. Això es pot evitar emprant com a grup funcional polar un aldehid (KM-12aa).

- A pesar de que l'esquelet de la PR toxina (**19**) no sigui el candidat més adient per aconseguir un mimètic de **9** amb elevada activitat brassinoesteroide, la facilitat sintètica que suposa obtenir anàlegs d'aquest tipus amb cadenes comercials els fa aptes per extreure unes primeres conclusions ja que la diferència entre els seus valors d'índexs de similitud i els obtinguts per a esquelets més adients és petita. Per aquesta raó, resulta interessant sintetitzar els anàlegs PR-ae o PR-ad i PR-af.
- Un altre factor a tenir en compte per al posterior estudi és l'avaluació de les combinacions de les millors cadenes assajades amb els millors esquelets.

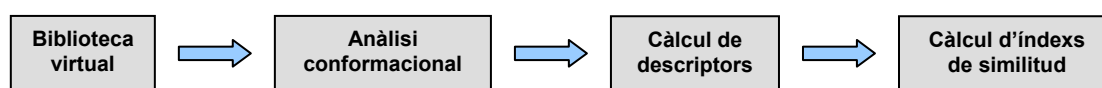
## 6. Estudi computacional exhaustiu dels mimètics del KM-01 (9)

### 6.1. Introducció

Com ja s'ha mencionat amb anterioritat, tota la metodologia desenvolupada al laboratori d'Esteroides i en aquesta mateixa tesi està condicionada pel fet que, fins a la data, no es coneix l'estructura del possible receptor dels BRs. Aquest fet obliga a emprar mètodes indirectes en els estudis computacionals, mètodes que obtenen informació a partir de la comparació entre si de l'estructura d'un conjunt de possibles substrats del receptor. En aquest sentit, com ha succeït en l'estudi preliminar, és essencial l'etapa de superposició de les molècules a comparar, una etapa força difícil que consumeix molt temps de càlcul. Per aquesta raó, les modificacions més importats que s'inclouen en aquest nou estudi, per tal de realitzar un estudi computacional més acurat, són la realització d'una anàlisi conformacional dels compostos d'interès i l'ús, com s'ha mencionat a l'apartat 2.2.3, dels descriptors GRIND, que no requereixen de l'alineament de les dues molècules a comparar.

### 6.2. Metodologia

La metodologia emprada en aquest estudi, per tal de trobar quins anàlegs del KM-01 (9) amb una estructura del tipus 10 són els millors candidats per desencadenar activitat BR, és essencialment la mateixa que en l'estudi preliminar incloent-hi l'anàlisi conformacional i variant els descriptors per tal d'evitar l'etapa d'alineament (**Figura 96**).



**Figura 96.** Metodologia general de l'estudi computacional exhaustiu.

En primer lloc, es genera una biblioteca virtual de mimètics del KM-01 (9), susceptibles de desencadenar activitat brassinoesteroide. Aquesta biblioteca virtual comprèn els millors candidats trobats en l'estudi computacional previ, mimètics on encara no s'ha pogut definir el seu interès i d'altres molècules d'interès plantejades a posteriori.

L'estudi computacional que es planteja depèn sensiblement de la conformació que adoptin les molècules de la biblioteca virtual. Per aquest motiu, cal realitzar per a totes elles una anàlisi conformacional. El protocol emprat és, en un primer moment, la fusió simulada (*simulated annealing* (SA)) però, després, se substitueix per la metodologia *Confort*, ja que s'obtenen resultats amb molta major rapidesa i sense diferències significatives entre ambdós metodologies.

A continuació, per a cada un dels confòrmers obtingut per a cada compost, se n'obté un descriptor amb la metodologia GRIND. Pel càlcul dels descriptors s'empen quatre sondes (DRY, O, N1 i TIP), que pretenen mimetitzar les interaccions més comunes donades entre un receptor proteic i el seu substrat. S'obté així un descriptor, desat en forma de vector, per a cada un dels confòrmers trobats de cada molècula que forma part de la biblioteca virtual.

Finalment, cada un dels vectors obtinguts es compara mitjançant els índexs de similitud de Carbó i de Hodgkin amb cada un dels corresponents vectors obtinguts per als 49 confòrmers de la BL (1). D'aquests 49 confòrmers, 46 són el resultat d'aplicar l'anàlisi conformacional per fusió simulada sobre 1 i els tres restants



són les tres conformacions actives de la brassinolida (**1**) trobades anteriorment en l'equip (apartat 2.1.4).<sup>130,131</sup> Aquests càlculs generen dos taules, una per a cada índex de similitud, on es presenten els valors dels índexs de cada confòrmer estudiat amb els 49 confòrmers de **1**. Tot i així, en la discussió de resultats únicament es mostra per a cada un dels dos tipus d'índexs de similitud calculat, l'índex màxim trobat per tots els confòrmers de **1** amb tots els confòrmers de la molècula en estudi.

A través de la comparació dels índexs de similitud trobats per cada mimètic del KM-01 (**9**) s'estableixen els candidats més adients per a desencadenar activitat brassinoesteroide.

### 6.2.1. Anàlisi conformacional

En anteriors treballs en l'equip,<sup>242</sup> es va establir un mètode de *simulated annealing* per a l'anàlisi conformacional de BRs mitjançant INSIGHT II.<sup>182</sup> Aquest mètode comprèn les següents etapes:

- Fusió simulada: Simulació en el buit, esquelet rígid, *force-field* CVFF.
- Dinàmica molecular: *time step* de 1 fs, etapa d'escalfament de 298 K a 900 K, etapa de simulació a 900 K, etapa de refredament de 900 K a 298 K, algorisme d'integració Verlet, conjunt canònic NVT, control de temperatura: per escala de velocitats.
- Optimització de la geometria: nombre de cicles fixat a 500 cicles per angle diedre d'estudi, *Steepest Descent* (convergència = 1000), Gradient conjugat (Polak, convergència = 10), Newton (bfgs, convergència = 0.001).

Amb l'anàlisi conformacional per fusió simulada s'obté un conjunt de confòrmers estables a temperatura ambient.

Tot i haver-se analitzat més de 60 compostos amb aquesta metodologia i tractar-se d'una tècnica força acurada i exhaustiva, presenta certs inconvenients. Per una banda, requereix un temps de càlcul al voltant de 10-12 hores per cada molècula i per altra, s'obtenen 500 confòrmers per a cada angle de torsió considerat en la molècula analitzada (2000-4000 confòrmers) que posteriorment s'han d'analitzar. Així, de tots els confòrmers obtinguts per cada compost, s'eliminen aquelles conformacions coincidents i es realitza un *cut off* d'energia de 5 kcal·mol<sup>-1</sup> a partir del confòrmer d'energia més baixa ja que es consideren com a més probables els de menor energia. Aquestes operacions de selecció es realitzen amb programes en llenguatge macro d'Excel desenvolupats anteriorment en l'equip.<sup>130</sup>

Aquest fou el motiu pel qual va posar-se a punt un nou anàlisi conformacional amb el programa XConfort.<sup>194</sup> La principal avantatge front a la fusió simulada és que únicament són necessaris 5-10 minuts per molècula per poder obtenir la llista de confòrmers. A més, s'obté un màxim de 200 confòrmers el més diversos possibles i, en conseqüència, no fa falta analitzar-los a posteriori, ja que les repeticions i els resultats anòmals ja es poden observar en els valors dels índexs de similitud.

### 6.2.2. Càlcul de descriptors GRIND

Les següents opcions es configuren, en el programa ALMOND, tal com es descriu a continuació:

- Distància entre nodes: 0.5 Å.
- *ALMD directive*: desactivat.
- *Keep kont*: desactivat.
- Nombre de punts filtrats: 150 punts.
- *Width of smooth window*: 0.8 unitats de grid.
- *Relative weight of the field*: 50%.
- *Autocorrelogram size*: 59 – 72.

Les sondes emprades per al càlcul de descriptors foren les d'ús més raonable per compostos que interaccionen amb proteïnes:<sup>137,223,243</sup>

- Sonda DRY: Sonda que mimetitzava les interaccions hidrofòbiques.
- Sonda O: Sonda que mimetitzava les interaccions acceptores de pont d'hidrogen del receptor.
- Sonda N1: Sonda que mimetitzava les interaccions donadores de pont d'hidrogen del receptor.
- Sonda TIP: Sonda que mesura la convexitat de la molècula en tot el seu contorn.<sup>244</sup>

Així, per a cada un dels confòrmers de cada molècula de la biblioteca virtual s'obtenen 10 correlogrames: 4 *auto-correlograms* i 6 *cross-correlograms*, que es representen amb un ordre determinat l'un al costat de l'altre.

Els correlogrames obtinguts per cada confòrmer es desen en format de vector, que representa matemàticament el descriptor obtingut per cada confòrmer. En aquest sentit, cal destacar que és necessari que els dos vectors que es comparen tinguin la mateixa mida. Per aquest motiu, cal establir pels dos vectors un mateix nombre de marges de distàncies considerats en cada correlograma. S'estableix com a tal el nombre més alt existent entre els dos confòrmers. La mida de cada correlograma per la brassinolida (1) és de 59. Per tant, cal ajustar a aquest nombre la mida de correlogrames més petits corresponents a altres compostos. Per compostos que tinguin una mida de correlograma major que 59, cal ajustar la mida de correlograma de la brassinolida (1) al nou valor.

### 6.3. Biblioteca virtual

En la biblioteca virtual d'aquest nou estudi computacional (220 molècules) es decideix incloure-hi, a part de 182 mimètics del KM-01 (9) i 16 anàlegs de la PR toxina (19), 5 metabòlits secundaris que es produeixen en el cultiu del fong *Penicillium roquefortii*, 3 hormones de creixement vegetal, 5 inhibidors de la biosíntesi de brassinoesteroides, el KM-01 (9) i 8 inhibidors de la proteïna Hsp90.

#### 6.3.1. Metabòlits secundaris produïts en el cultiu del *P. roquefortii*

Els metabòlits que s'analitzen són la mateixa PR toxina (19), l'eremofortina D (27), l'eremofortina C (20) tant ciclada com no ciclada i, fins i tot, amb l'hidroxil protegit amb acetat ja que aquesta protecció s'empra precisament per evitar la ciclació (Figura 97).

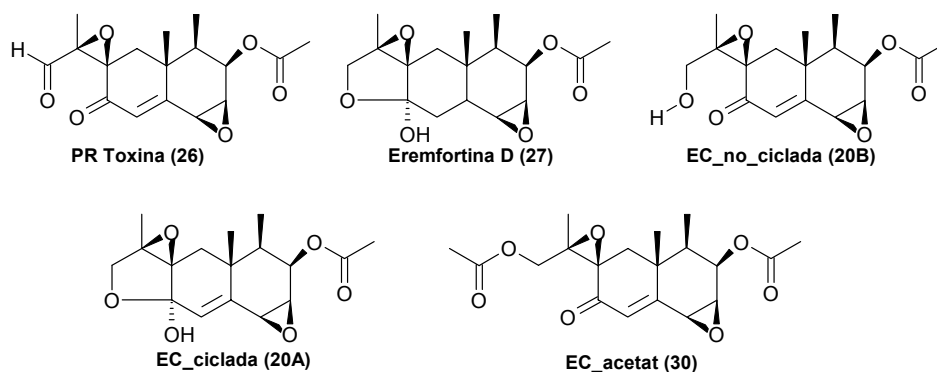


Figura 97. Metabòlits inclosos en la biblioteca de l'estudi computacional.

### 6.3.2. Hormones clàssiques de creixement vegetal

Les tres hormones clàssiques que actuen sobre el desenvolupament de les plantes emprades en aquest estudi són l'àcid abscísic (ABA), l'àcid indol-3-acètic (IAA) i la gibberel·lina GA3 (Figura 2).

### 6.3.3. Mimètics del KM-01 (9)

Continuant amb l'objectiu de l'estudi preliminar per trobar un o diversos mimètics de **9** amb activitat brassinoesteroide, s'analitza un gran conjunt de molècules que, tenint en compte la informació de l'estudi anterior, intenten mimetitzar la brassinolida (**1**).

Les cadenes laterals i els esquelets d'aquests anàlegs s'estudien paral·lelament (Figura 100).

Pel que fa a les cadenes, es mantenen **aa-ag**, **an-aq**, **as** i **ax** de l'estudi anterior (Figura 76). En aquest nou estudi ja no s'inclouen les cadenes **ah** o **ai**, que presenten un hidroxil en  $\alpha$  de carbonil, ni **aj** o **ak** que el presenten en  $\delta$ . Les cadenes **al** i **am**, tot i presentar uns valors d'índexs de similitud força bons en l'estudi preliminar, no s'inclouen perquè no tenen sentit des d'un punt de vista sintètic però sí que s'inclouen altres cadenes amb un hidroxil en  $\gamma$  i sense un doble enllaç *trans* entre aquest i el carbonil: **an** i **ao** (cadenes comercials), **ag** i **aq** (cadenes sense sentit sintètic però que s'inclouen perquè no es disposa de cap cadena comercial amb un hidroxil en  $\gamma$  i un doble enllaç *cis* entre aquest i el carbonil). Del grup de cadenes que presenten un diol en la cadena lateral en l'estudi anterior (**ar-ay**), únicament s'escull una cadena de cada tipus: **as** (diol  $\beta,\gamma$ ) i **ax** (diol  $\alpha,\beta$ ) ja que, tot i no ser dels millors candidats, no es van acabar de descartar en l'estudi anterior.

En aquest estudi més exhaustiu també s'inclouen altres cadenes laterals d'interès (Figura 98). La cadena comercial **az** és anàloga a la del KM-01 (**9**) però amb un nombre inferior d'àtoms de carboni, per tant, sembla que pugui tenir interès per dissenyar un inhibidor de l'acció biològica de brassinoesteroides. També s'estudiaran les cadenes comercials **ba-bm**, totes elles amb un hidroxil en  $\beta$  de carbonil, ja que és la posició que va presentar uns millors valors d'índexs de similitud en l'estudi preliminar. Les cadenes **bn** i **bo** mimetitzen la cadena de **9** però introdueixen un hidroxil en  $\beta$  i eliminen la presència de dobles enllaços ja que aquesta possibilitat no s'havia estudiat anteriorment. La cadena **bp**, semblant a les dues anteriors, disminueix mobilitat conformacional mitjançant la introducció d'un anell benzènic en la seva estructura. Les quatre cadenes **bq-bt** són: **bq** (cadena del KM-01 (**9**)), **br** (cadena equivalent a la de la brassinolida (**1**)), **bs**

(cadena **br** però amb l'estereoquímica de l'hidroxil contrària) i **bt** (cadena de **9** que introdueix un hidroxil en  $\beta$  de carbonil amb interès teòric). Les cadenes **bu-bz** i **ca** s'inclouen en la biblioteca per completar la sèrie de cadenes **ad**, **ae** i **bj-bm**, i així intentar esbrinar la importància de la llargària de la cadena lateral d'aquests mimètics. Finalment, després de realitzar l'estudi computacional de les cadenes d'àcids carboxílics (apartat 7) s'inclouen les quatre cadenes amb millors valors d'índexs de similitud (**cb-ce**).

Dels 21 esquelets avaluats en l'anterior estudi, únicament s'empren 3 d'ells (**KM-08**, **KM-12** i **KM-17**) per avaluar aquesta part de la molècula en el nou estudi. Aquests esquelets són els més idonis ja que presenten la mateixa funcionalitat polar a C12 i C13 i per tant, eviten la formació d'un nou centre quiral sobre el carboni C11. Els esquelets que no s'inclouen en aquest estudi són **KM-04**, **KM-05** i **KM-15** perquè tenen les funcionalitats a C11 i C12 i el **KM-21** que les té a C12. També es descarten els anàlegs **KM-02**, **KM-07**, **KM-09**; **KM-14** i **KM-18 – KM-20** que són la forma ciclada d'alguns dels anàlegs anteriors i en ells s'observa una disminució important dels valors dels índexs de similitud. Finalment, el **KM-16**, tot i no incloure'l en l'estudi s'ha de tenir present perquè és un anàleg sintètic obtingut a partir de la PR toxina (**19**) i presenta elevats índexs de similitud.

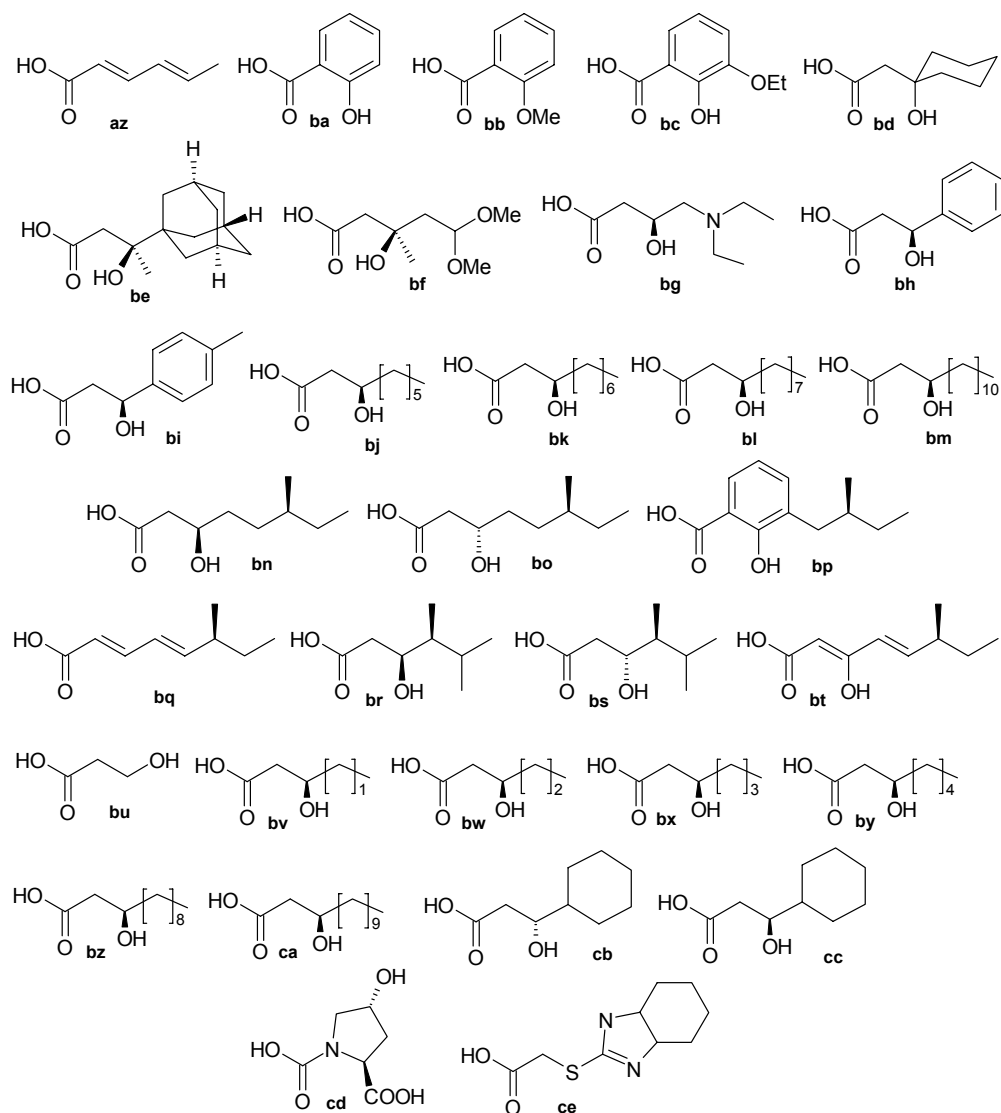
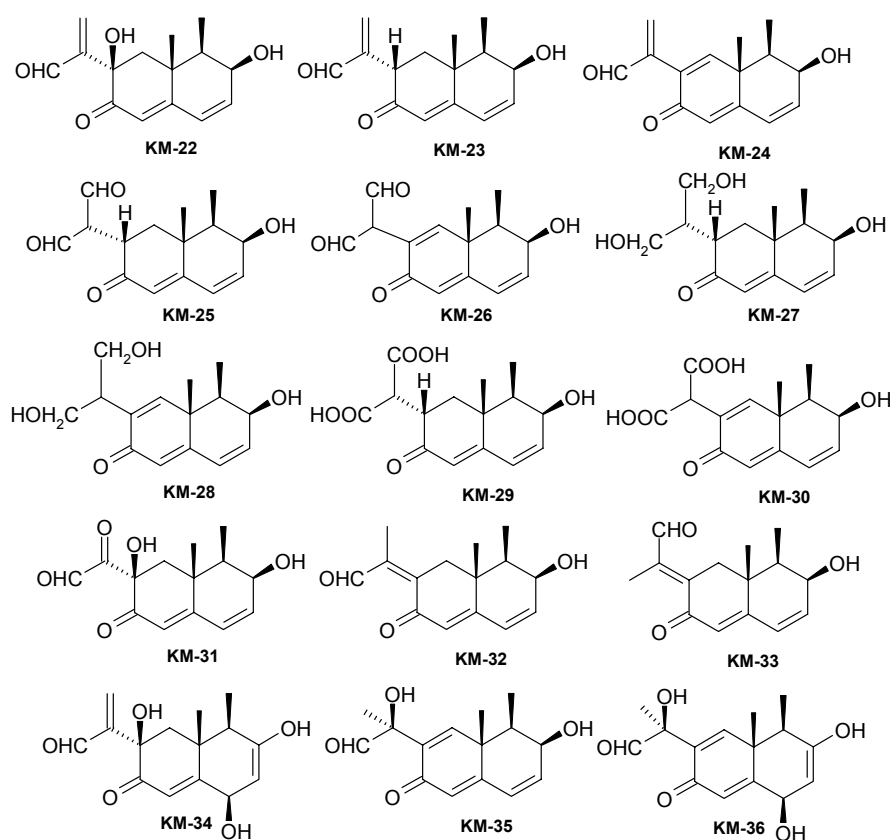


Figura 98. Cadenes laterals noves incloses en aquest estudi computacional.

En aquest nou estudi s'inclouen 15 esquelets addicionals (**Figura 99**). El **KM-22** és l'esquelet del KM-01 (**9**). Els esquelets **KM-23** i **KM-24** són també l'esquelet de **9** però en ells se substitueix l'hidroxil en C7 per un hidrogen o bé un doble enllaç endocíclic. El **KM-25** – **KM-30** són similars als esquelets **KM-08**, **KM-12** i **KM-17** on també se substitueix l'hidroxil de C7 per hidrogen o un doble enllaç endocíclic. Finalment, els esquelets **KM-32** – **KM-36** que són possibles productes de síntesi en el moment d'intentar obtenir l'esquelet de **9** a partir del metabòlit **19**. Els esquelets **KM-32** i **KM-33** provindrien de la reducció dels dos epòxids de la PR toxina (**19**) a doble enllaç. Els esquelets **KM-34** i **KM-36** provindrien del tractament de **19** amb una base forta que, a més de transformar els epòxids a alcohols al·lílics, hidrolitzaria l'ester a C2 de la PR toxina (**19**) evitant la posterior desprotecció d'aquest hidroxil per ancorar-hi la cadena lateral pertinent. El **KM-35** o el **KM-22** provindrien d'una primera reducció selectiva a doble enllaç de l'epòxid de l'anell de la PR toxina (**19**), seguit d'un tractament amb base forta per rendir un alcohol al·lílic.



**Figura 99.** Els 15 nous esquelets dels mimètics de **9** que formen la biblioteca virtual en estudi.

No s'inclouen totes les combinacions d'esquelets i cadenes en la biblioteca d'estudi perquè suposaria un esforç computacional (774 mimètics) molt elevat sense obtenir informació addicional. Per tant, els mimètics que sí s'inclouen són els que resulten de combinar l'esquelet de **9** (KM-22) amb totes les cadenes i la seva cadena (**bq**) amb tots els esquelets. Doncs, se suposa que l'inhibidor **9** s'ancora al receptor i d'aquesta manera se simplifica la interpretació dels resultats que s'obtinguin. Les cadenes **br** i **bs** també s'ancoren a tots els esquelets ja que són les que millor mimetitzen la cadena lateral de la brassinolida (**1**). També s'inclouen el KM-23aa, KM-12bt, KM-23bt, KM-24bt, KM-25bt i totes les combinacions resultants de combinar les cadenes **aa**, **ba**, **bc**, **bd**, **bg**, **bh** i **bj** amb els esquelets **KM-08**, **KM-17**, **KM-27** – **KM-30** i **KM-36** i, de combinar les cadenes **bw**, **bx**, **by**, **bz**, **ca**, **cb**, **cc**, **cd** i **ce** amb **KM-17**, **KM-30** i **KM-36** (**Taula 30**).

KM	08	17	27	28	29	30	36
aa	x	x	x	x	x	x	x
ba	x	x	x	x	x	x	x
bc	x	x	x	x	x	x	x
bd	x	x	x	x	x	x	x
bg	x	x	x	x	x	x	x
bh	x	x	x	x	x	x	x
bj	x	x	x	x	x	x	x
bu		x				x	x
bv		x				x	x

KM	08	17	27	28	29	30	36
bw		x				x	x
bx		x				x	x
by		x				x	x
bz		x				x	x
ca		x				x	x
cb		x				x	x
cc		x				x	x
cd		x				x	x
ce		x				x	x

Taula 30. Combinacions amb les que es resumeixen la major part dels mimètics que constitueixen la biblioteca virtual.

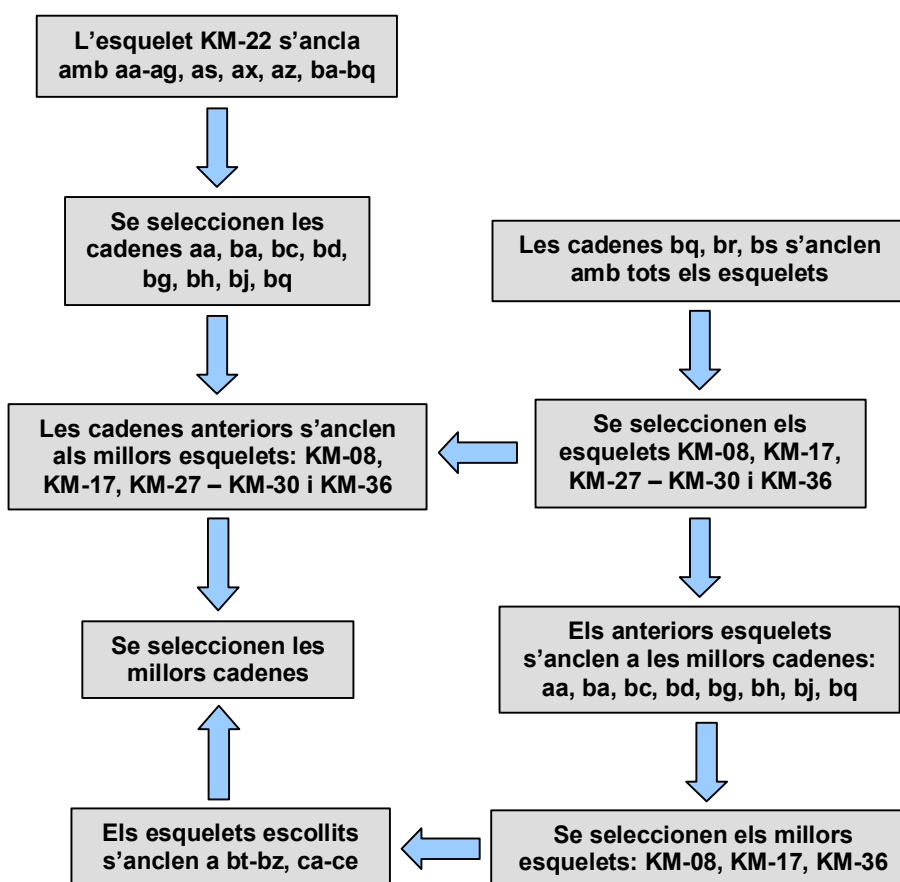


Figura 100. Esquema on s'explica el criteri seguit per estudiar els mimètics del KM-01 (9).

### 6.3.4. Anàlegs de la PR toxina (19)

En l'estudi preliminar anterior es va concloure que els anàlegs d'aquest tipus, tot i presentar uns valors d'índexs de similitud inferiors a la resta, resultava interessant sintetitzar-los per la facilitat que a priori això representava. Per tant, s'inclouen en aquest estudi per aprofundir en el seu interès, tot i que paral·lelament ja s'inicia la seva síntesi.

S'avaluen 16 anàlegs que tenen l'esquelet de **19** i variacions en la cadena lateral. Totes aquestes cadenes són àcids carboxílics comercials (**aa, ad, ae, af, an, ao, ap, az, ba, bb, bq**), per bé que algunes d'elles

també presenten l'hidroxil de cadena protegit (**af**, **an**, **ao**, **ap**, **ba**). Aquesta protecció és necessària dur-la a terme abans d'ancorar la cadena lateral, i per tant, s'avaluen per saber si es creu convenient avaluar-ne la seva activitat, ja que són intermedis sintètics.

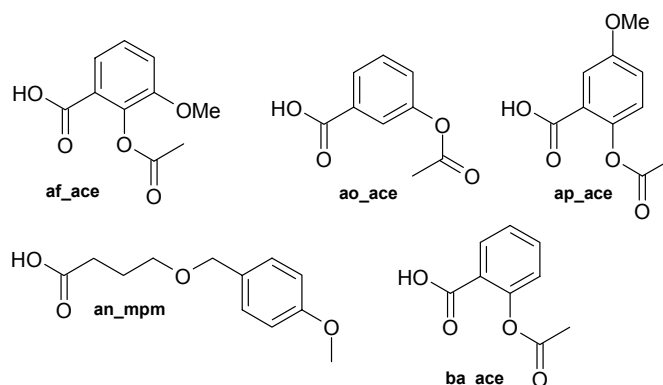


Figura 101. Cadenes protegides dels mimètics amb esquelet de PR toxina (19).

### 6.3.5. Inhibidors de la biosíntesi de brassinoesteroides

En la biblioteca també s'inclouen 5 inhibidors de la biosíntesi de brassinoesteroides (Figura 102). Aquests, tot i que no s'ancoren al mateix receptor que els brassinoesteroides, resulta interessant analitzar-los per comprovar si tenen alguna semblança amb ells o amb el KM-01 (9).

Moltes de les etapes de la biosíntesi de brassinoesteroides són catalitzades per enzims del citocrom P450. Per tant, inclouen varis centres actius on poden actuar aquests inhibidors ja que són específics d'aquests enzims, i aquests s'empren per estudiar la ruta biosintètica dels BRs.<sup>245,246</sup>

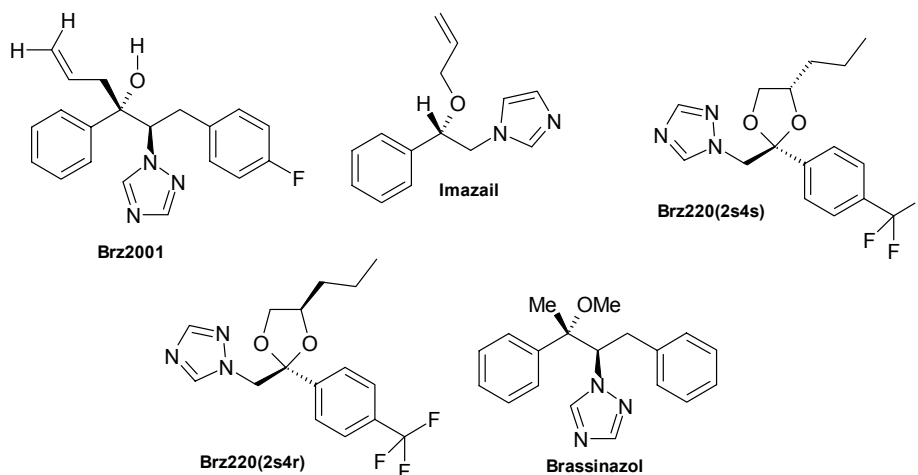


Figura 102. Inhibidors biosintètics dels brassinoesteroides.

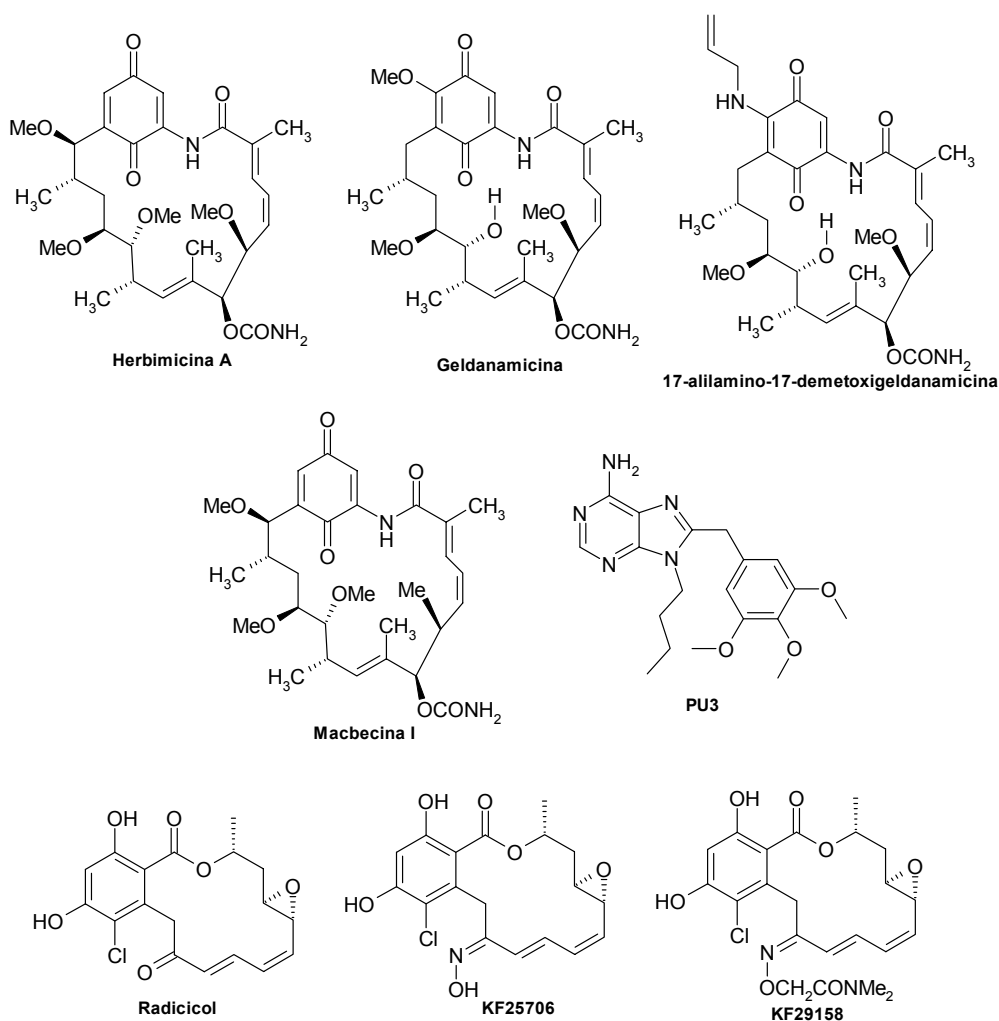
### 6.3.6. Inhibidors de la proteïna Hsp90

L'any 2003 es va publicar un article escrit per Amzallag i Goloubinoff i titulat "An Hsp90 inhibitor, Geldanamycin, as a Brassinosteroid Antagonist: Evidence from Salt-Exposed Roots of *Vigna radiata*".<sup>247</sup> Aquest era el segon cop que es feia referència a un inhibidor de l'acció biològica dels brassinoesteroides, el primer va ser un article sobre el KM-01 (9)<sup>134</sup> ja mencionat en l'apartat 3 de la introducció. Aquests autors

van decidir testar la geldanamicina basant-se en els estudis i hipòtesis realitzades sobre el receptor esteroïdal de les plantes.

A pesar que entre els anys 2000 i 2001 es va identificar un receptor de membrana esteroïdal a l'*Arabidopsis* i l'arròs, l'activitat quinassa de la qual era crítica en la senyal de transducció de BRs, encara avui dia no es coneix completament tots els passos de transducció hormonal que inclou. Per altra banda, sí que se sap que en les cèl·lules dels animals i en fongs, el pas de transducció esteroïdal implica l'activació d'un receptor nuclear hormonal organitzat al voltant del complex Hsp90. Per tant, davant el desconeixement del receptor dels brassinoesteroides en plantes, es pot establir una correspondència entre la informació obtinguda de fongs o animals i les plantes, i més, si es té en compte que Stancato *et al.*<sup>248</sup> van presentar evidències de la implicació de la proteïna Hsp90 en el mode d'acció dels BRs en plantes. Per tant, davant d'aquesta informació, i mitjançant l'efecte que tenen els BRs sobre l'elongació de les arrels de les mongetes, Amzallag i Goloubinoff<sup>247</sup> van demostrar la neutralització per part de la geldanamicina sobre els efectes que tenen els BRs en l'activitat de Hsp90.

Després dels resultats d'aquest treball es va incloure la geldanamicina en aquest estudi computacional. Però, anant una mica més enllà, es va realitzar una búsqueda bibliogràfica per introduir dins la biblioteca virtual altres fàrmacs relacionats amb Hsp90 en animals.<sup>249</sup> Així doncs, es van incloure 7 altres inhibidors (**Figura 103**).



**Figura 103.** Inhibidors de la proteïna Hsp90.



En aquesta búsqueda bibliogràfica, es va trobar que el radicol fou el primer antibiòtic descobert i emprat com a inhibidor de Hsp90.<sup>250</sup> Aquest producte natural fou aïllat l'any 1953 del fong *Monosporium bonorden* per la seva activitat antifúngica. Aquest compost presenta una potent activitat antiproliferativa contra una ampla varietat de tumors en humans. A pesar d'això, el radicol va resultar inactiu quan es va aplicar en models antitumorals *in vivo*, motiu pel qual es van sintetitzar derivats més estables, el KF25706 i el KF29158. Aquests van presentar una major activitat antiproliferativa en varis tumors humans.

La geldanamicina fou el següent antibiòtic natural trobat i actualment és l'inhibidor de Hsp90 més emprat. S'han realitzat modificacions químiques sobre el grup amida i el nucli de benzoquinona que presenta en la seva estructura, i alguns derivats sintetitzats presenten major activitat antitumoral en el sarcoma 180 que no pas la geldanamicina. Un d'aquests derivats és el 17-alilamino-17-demetoxi-geldanamicina, un anàleg menys tòxic que la geldanamicina i que es troba en fase de desenvolupament.<sup>251</sup>

Més tard, un altre antibiòtic amb un nucli de benzoquinona, herbimicina A, fou aïllat de la fermentació del cultiu de *Streptomyces hygroscopicus*.<sup>252,253</sup> Posteriorment també es va aïllar la macbecina I la II de la soca *Nocardia sp.*, que presenten similar activitat antibacteriana i antitumoral contra el leucoma P388 *in vivo*.<sup>254</sup>

Darrerament, s'ha dissenyat per mitjà de modelització computacional emprant estructures de raigs X de complexos lligand-Hsp90 un altre inhibidor d'aquesta proteïna, el PU3.<sup>254,255</sup>

## 6.4. Discussió de resultats

### 6.4.1. Hormones i metabòlits

Els valors dels índexs de similitud de Hodgkin i de Carbó per als metabòlits que es produeixen en el medi de cultiu del *Penicillium roquefortii* i per a les hormones de creixement vegetal es presenten en la **Taula 31** i la **Figura 104**. Aquests valors es troben, en la **Taula 31**, ordenats per ordre decreixent d'índex de similitud de Carbó. Si ens fixem en l'ordre de l'índex de similitud de Hodgkin, l'única diferència respecte el de Carbó és que el valor de l'acetat de l'eremofortina C (**30**) és lleugerament superior a l'indol-3-acètic (IAA).

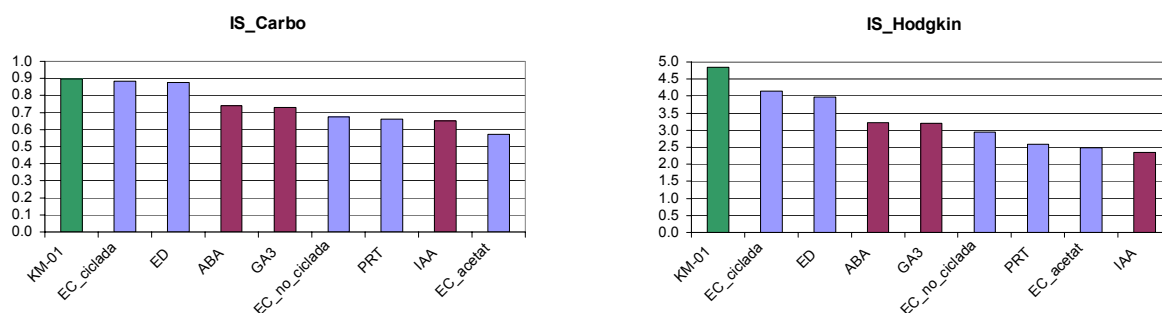
Compost	IS_Carbó	IS_Hodgkin
KM-01 (9)	0.896	4.857
EC_ciclada (20A)	0.884	4.151
ED (27)	0.875	3.978
ABA	0.740	3.225
GA3	0.730	3.211
EC_no_ciclada	0.672	2.954
PR toxina (19)	0.661	2.583
IAA	0.650	2.336
EC_acetat (30)	0.570	2.482

**Taula 31.** Valors d'índexs de similitud de Hodgkin i Carbó resultants de comparar els diversos metabòlits i hormones amb la brassinolida (1).

Tots els compostos de la taula presenten uns valors d'índex, tant de Carbó com de Hodgkin, inferiors als del KM-01 (9). Per tant, es pot concloure que tots ells presenten una baixa similitud amb la brassinolida (1). És

a dir, són mals candidats per a emprar-los com a hormones de creixement vegetal que puguin actuar sobre el receptor dels BRs. Els baixos valors obtinguts per a les hormones (ABA (0.740 i 3.225), GA3 (0.730 i 3.211) i IAA (0.650 i 2.336)) donen una idea de la poca similitud estructural que tenen amb **1**.

Si es centra l'atenció en els metabòlits secundaris (en blau a la **Figura 104**) s'observa que aquells que presenten un valor més elevat són la forma ciclada de l'eremofortina C (EC, **20**) i l'eremofortina D (ED, **27**), que també està ciclada. És a dir, en cas de buscar uns anàlegs de síntesi senzilla resultaria més interessant emprar l'esquelet de l'eremofortina D (**27**) que no pas el de la PR toxina (PRT, **19**) que presenta uns índexs força inferiors.



**Figura 104.** Representació gràfica dels valors dels índexs de similitud de Carbó i Hodgkin pels metabòlits produïts en el medi de cultiu del *Penicillium roquefortii* (en blau), les tres hormones en estudi (en grana) i el KM-01 (9) (en verd).

Tot i així, l'esquelet de l'eremofortina C (**20**), tot i presentar lleugerament millors índexs que l'eremofortina D (**27**), no es considera perquè està en equilibri amb la forma no ciclada i aquesta presenta uns valors molt inferiors als de la forma ciclada o als de l'eremofortina D (**27**). A més, cal recordar que la PR toxina (**19**) o l'eremofortina C (**20**) es produeixen en el medi de cultiu del *Penicillium roquefortii* en quantitats molt superiors a les de l'eremofortina D (**27**). Per tant, la PR toxina (**19**) és el metabòlit més útil per a emprar-lo com a esquelet de possibles mimètics de **9** de síntesi ràpida.

#### 6.4.2. Inhibidors de brassinoesteroides

Aquestes molècules s'analitzen des de dos punts de vista ja que es comparen tant amb la brassinolida (**1**) com amb el KM-01 (9). En la **Taula 32** i la **Figura 105** es presenten els resultats de comparar-los amb la brassinolida (**1**), i en la **Taula 33** i la **Figura 107** els resultats de comparar-los amb el KM-01 (9). En ambdues taules els inhibidors s'ordenen per ordre decreixent d'índex de similitud de Carbó.

En la comparació d'aquests inhibidors amb la brassinolida (**1**) s'observa, en la **Figura 105**, que queden perfectament separats els inhibidors Hsp90 (en blau) dels inhibidors biosintètics (en grana). A més, a excepció del brassinazol, la resta d'inhibidors biosintètics tenen una baixa semblança amb la brassinolida (**1**). Això es pot apreciar en els baixos valors d'índexs de similitud de la **Taula 32**: el brassinazol (**7**) presenta uns valors de 0.832 i 3.988 i en canvi, el següent inhibidor (imazail) presenta 0.695 i 2.950. Per tant, com ja s'esperava, els inhibidors biosintètics, potser amb l'excepció de **7**, no tenen cap interès per al disseny d'anàlegs amb possible activitat brassinoesteroide.

Inhibidor	IS_Carbó	IS_Hodgkin
17AAG	0.965	5.835
Herbimicina A	0.961	5.602
Geldanamicina	0.958	5.716
Macbecina I	0.951	5.590
KF29158	0.920	4.561
KF25706	0.912	4.372
KM-01 (9)	0.896	4.857
PU3	0.890	4.870
Radicicol	0.879	4.051
Brassinazol (7)	0.832	3.988
Imazail	0.695	2.950
Brz2001	0.659	2.783
Brz20 (2s4r)	0.657	2.945
Brz20 (2s4s)	0.503	2.185

Taula 32. Valors d'índex de similitud de Hodgkin i Carbó resultants de comparar els inhibidors amb la brassinólida (1).

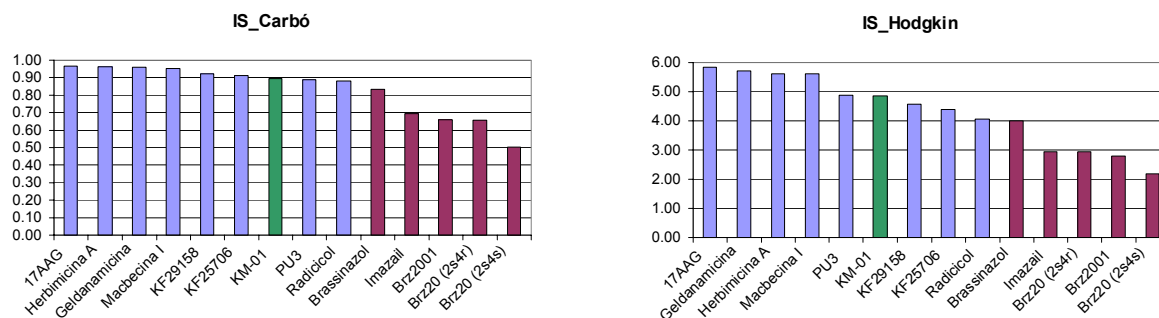
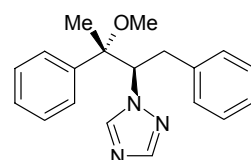
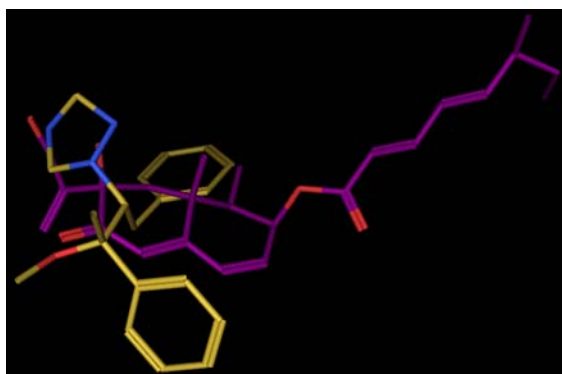


Figura 105. Representació gràfica dels valors d'índex de similitud dels inhibidors comparats amb 1. En color blau es presenten els inhibidors de Hsp90, en grana els inhibidors de biosíntesi i en verd el KM-01 (9).

Per determinar si el brassinazol (7) té interès s'alinea amb el KM-01 (9) però s'observa, com era d'esperar, un mal alineament entre ambdós molècules. Tot i que 7 mimetitzava força bé les zones polars de l'esquelet de 9 no s'alinea amb la cadena lateral ni amb part dels anells de l'inhibidor 9 (Figura 106). Així, es conclou que el brassinazol (7) no té interès per al disseny d'anàlegs amb possible activitat brassinoesteroide. Cal recordar que 7 és un inhibidor de la biosíntesi dels brassinoesteroides i, com a tal, no s'ancora amb el mateix receptor que aquests.



Brassinazol (7)  
IS\_Carbó 0.832  
IS\_Hodgkin 3.988

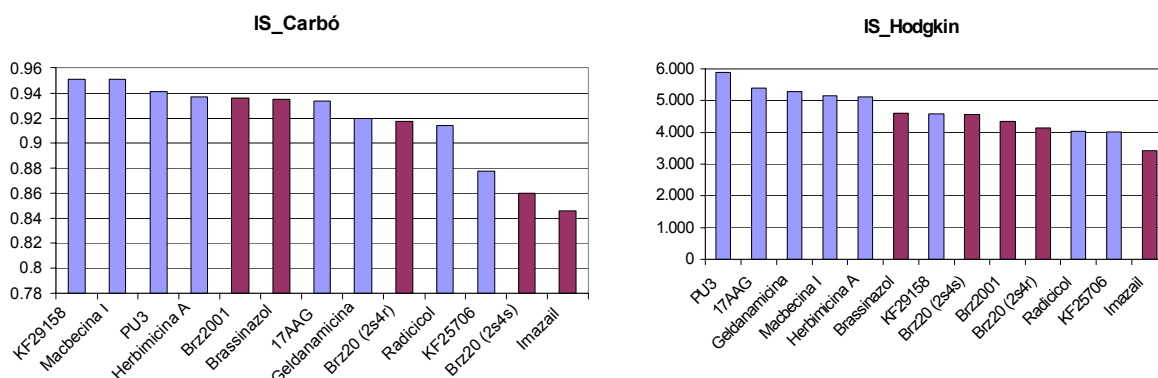
Figura 106. Superposició del brassinazol (7), en groc, amb el KM-01 (9), en lila.

Per altra banda, els quatre inhibidors macrocíclics amb un nucli de benzoquinona (geldanamicina, herbimicina A, macbecina I i 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17AAG)) són els que presenten una similitud més elevada amb la brassinolida (1).

Tant si ens fixem amb els valors d'índexs de similitud de Carbó com de Hodgkin (**Taula 33** i **Figura 107**), la majoria d'inhibidors de Hsp90 tenen una semblança elevada amb el KM-01 (9). Tots ells, a excepció de KF25706 (0.878), presenten valors d'índex de Carbó per sobre 0.900 i per sobre de 4.0 pel de Hodgkin. Fins i tot, els inhibidors PU3, 17AAG, geldanamicina, macbecina I i herbimicina A presenten aquest darrer índex per sobre de 5.000.

Inhibidor	IS_Carbó	IS_Hodgkin
<b>KF29158</b>	0.951	4.587
<b>Macbecina I</b>	0.951	5.165
<b>PU3</b>	0.941	5.887
<b>Herbimicina A</b>	0.937	5.114
<b>Brz2001</b>	0.936	4.335
<b>Brassinazol (7)</b>	0.935	4.605
<b>17AAG</b>	0.934	5.385
<b>Geldanamicina</b>	0.920	5.287
<b>Brz20 (2s4r)</b>	0.917	4.155
<b>Radicicol</b>	0.914	4.023
<b>KF25706</b>	0.878	4.018
<b>Brz20 (2s4s)</b>	0.86	4.564
<b>Imazail</b>	0.846	3.426

**Taula 33.** Valors d'índexs de similitud de Hodgkin i Carbó resultants de comparar els inhibidors amb el KM-01 (9).

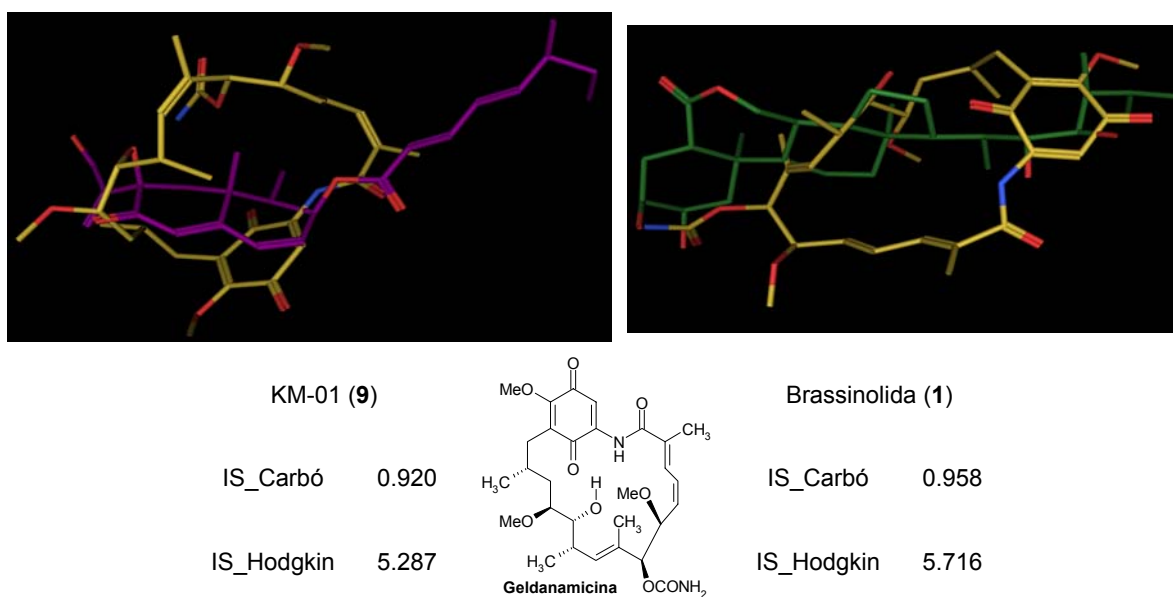


**Figura 107.** Representació gràfica dels valors d'índexs de similitud dels inhibidors comparats amb 9. En color blau es presenten els inhibidors de Hsp90 i en grana els inhibidors de biosíntesi.

Aquest fet, juntament amb la informació publicada en l'article de Amzallag i Goloubinoff,<sup>247</sup> fa pensar que poden ser bons candidats per a emprar-los com a inhibidors de l'activitat brassinoesteroide. Aquesta fou la raó per la qual es va decidir avaluar l'activitat de la geldanamicina en el test de la làmina d'arròs del laboratori d'Esteroides (en procés). L'elecció d'aquest inhibidor es va realitzar tenint en compte que presentava uns índexs de similitud amb 9 força bons (0.920 de Carbó i 5.287 de Hodgkin), tot i que no els millors, era el producte emprat en l'article mencionat i, a més, era comercialment assequible. De tota

manera, l'inhibidor amb major similitud amb el KM-01 (9) és el PU3 amb uns valors d'índex de 0.941 i 5.887; fet que ja s'observa en la **Taula 32** ja que, al comparar-lo amb la brassinolida (1), presentava uns valors molt similars als del KM-01 (9). El PU3 presentava 0.890 i 4.870 de valors d'índex de similitud de Carbó i Hodgkin respectivament i el KM-01 (9), 0.896 i 4.857.

També es va alinear amb el programa MOE el KM-01 (9) i la brassinolida (1) amb la geldanamicina (**Figura 108**), ja que és l'inhibidor que s'avalua la seva activitat en el RLIT. L'alineament es va realitzar permetent a la geldanamicina mobilitat conformacional i mantenint fixes els confòrmers actius de 9, trobat anteriorment en l'equip,<sup>138</sup> i el de 1, trobat mitjançant GRID flexible (bl\_mvp).



**Figura 108.** A l'esquerra, superposició del KM-01 (9), en color lila, i la geldanamicina, en color groc. A la dreta, superposició de la brassinolida (1), en color verd, i la geldanamicina, en groc.

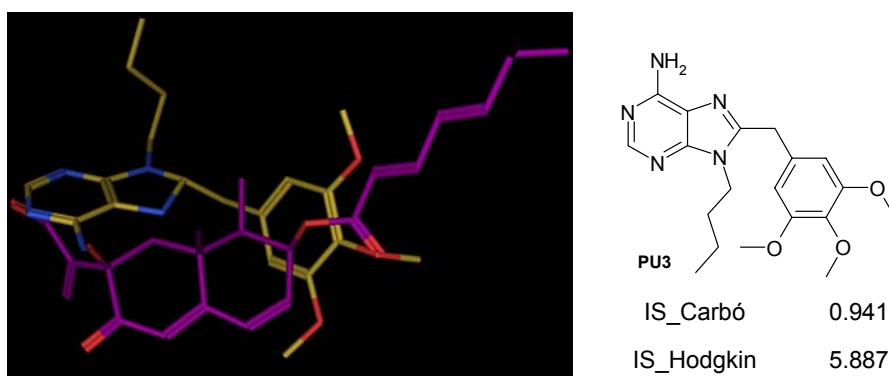
La geldanamicina presenta un bon alineament amb l'hidroxil a C7 i el carbonil de l'ester de la cadena lateral del KM-01 (9), i fins i tot existeix una certa bona aproximació en la zona carbonil insaturat de 9. També hi ha un bon solapament en la zona del doble enllaç dels carbonis C11-C12. Però, per altra banda, l'aldehid o la cadena lateral de 9 no se solapen amb cap funcionalitat de la geldanamicina. Així com una part de la geldanamicina no s'alinea amb cap funcionalitat del KM-01 (9).

La geldanamicina presenta un bon alineament amb els quatre hidroxils de la brassinolida (1), tant en el diol de l'anell A com de la cadena lateral però la lactona de 1 no es troba alineada amb cap funcionalitat de l'inhibidor. Tampoc hi ha un bon solapament en la zona dels anells B i C de la brassinolida (1) però sí en la zona de la cadena lateral. A més, tal com s'observa en la superposició de la dreta de la **Figura 108**, hi ha una zona de la geldanamicina que tampoc s'alinea amb 1. Per tant, es pot afirmar que hi ha una major similitud estructural amb la brassinolida (1) que amb el KM-01 (9). Aquest fet ja quedava reflexat amb els valors d'índex de similitud que es van obtenir: 0.920 i 5.287 quan es va comparar amb 9 (**Taula 33**) i 0.958 i 5.716 en comparar-la amb 1 (**Taula 32**).

Finalment, es presenta en la **Figura 109** la superposició de l'inhibidor PU3 amb el KM-01 (9) ja que aquest és el qui va presentar més similitud amb 9. La metodologia emprada és la mateixa que l'anterior. En la

**Figura 109** s'observa un bon solapament en les zones de l'aldehid, de l'hidroxil a C7 i de l'èster de la cadena lateral del KM-01 (9) però, en canvi, la cetona insaturada de 9 no se solapa amb cap funcionalitat de PU3. A més, ni els anells ni la part hidrofòbica de la cadena lateral del KM-01 (9) se solapen amb el PU3.

En resum, es pot dir que els inhibidors de Hsp90, tot i presentar uns índexs de similitud de Carbó i de Hodgkin molt elevats, no s'aconsegueixen alinear adequadament amb el KM-01 (9), sobretot en la part de la cadena lateral de 9, que no s'alinea amb cap funcionalitat dels inhibidors en estudi. De totes maneres, com ja s'ha comentat, els elevats índexs de similitud, el solapament entre la geldanamicina i la brassinolida (1) (**Figura 108**) i els resultats publicats en l'article de Amzallag i Goloubinoff,<sup>247</sup> fan pensar que poden ser bons candidats per inhibir l'acció dels brassinoesteroides.



**Figura 109.** Superposició de l'inhibidor PU3, en groc, amb el KM-01 (9), en lila.

#### 6.4.3. Anàlegs de la PR toxina (19)

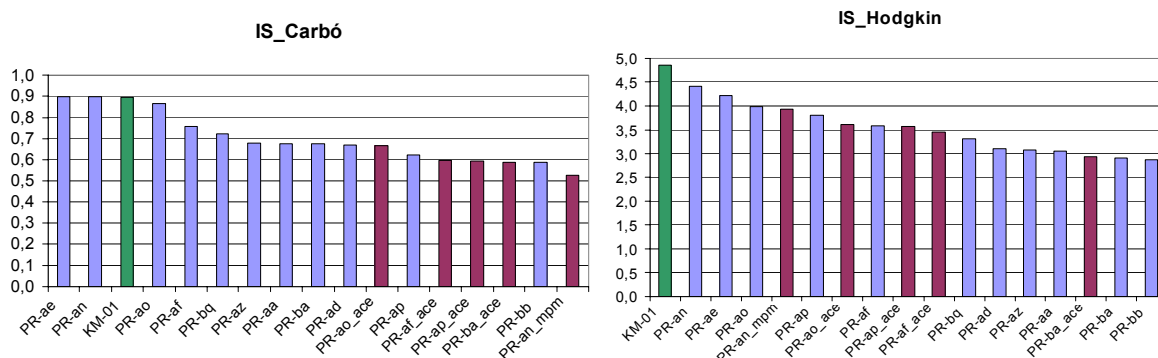
Els valors dels índexs de similitud de Hodgkin i de Carbó per als anàlegs de la PR toxina (19) es presenten en la **Taula 34** i la **Figura 110**. Aquests valors es troben, en la **Taula 34**, ordenats per ordre decreixent d'índex de similitud de Carbó.

Anàlegs de 19	IS_Carbó	IS_Hodgkin
PR-ae	0.898	4.223
PR-an	0.897	4.418
KM-01	0.896	4.857
PR-ao	0.865	3.982
PR-af	0.758	3.592
PR-bq	0.722	3.309
PR-az	0.680	3.075
PR-aa	0.677	3.050
PR-ba	0.676	2.904
PR-ad	0.670	3.111
PR-ao_ace	0.669	3.607
PR-ap	0.623	3.812
PR-af_ace	0.598	3.455
PR-ap_ace	0.595	3.568
PR-ba_ace	0.590	2.937

<b>PR-bb</b>	0.590	2.873
<b>PR-an_mpm</b>	0.528	3.930

**Taula 34.** Valors dels índexs de similitud de Carbó i Hodgkin per als anàlegs de la PR toxina (19).

Tots els compostos de la **Taula 34** presenten uns valors d'índex, tant de Carbó com de Hodgkin, inferiors als del KM-01 (9), que és un inhibidor. La única excepció es troba en els anàlegs PR-ae i PR-an i només quan es fa referència a l'índex de similitud de Carbó. Però, tot i així, els valors d'aquests anàlegs (0.898 per a PR-ae i 0.897 per a PR-an) són molts similars als de 9 (0.896). Per tant, es pot concloure que tots ells presenten una baixa similitud amb la brassinolida (1). És a dir, són mals candidats per a emprar-los com a hormones de creixement vegetal.



**Figura 110.** Representació gràfica dels valors d'índexs de similitud dels anàlegs de PR toxina (19) comparats amb 9, en verd. En color blau es presenten els anàlegs sense protegir i en grana els protegits.

A més, s'observa que els anàlegs de 19 que tenen l'hidroxil de la cadena lateral protegit, ja sigui amb acetat o amb p-metoxibenziloxi, presenten els valors d'índexs de Carbó o Hodgkin per sota dels corresponents anàlegs sense protegir. Aquesta diferència és considerable, 0.168 per a l'índex de Carbó i 0.242 per al de Hodgkin (**Taula 35**). Per tant, aquests anàlegs protegits, tot i tractar-se d'intermedis sintètics, no resulta interessant avaluar-ne la seva activitat. De fet, en la **Figura 110** aquestes diferències també s'aprecien gràficament. En la representació dels dos índexs s'observa com els anàlegs protegits (en grana) es troben per sota dels corresponents anàlegs sense protegir (en blau), amb l'única excepció del compost PR-ba per a l'índex de Hodgkin. Fins i tot, en la representació de l'índex de Carbó tots els anàlegs protegits s'agrupen en la part dreta del gràfic.

compost	IS_Carbó	Diferència entre anàlegs	IS_Hodgkin	Diferència entre anàlegs
PR-af	0.758	0.160	3.592	0.137
PR-af_ace	0.598		3.455	
PR-an	0.897	0.369	4.418	0.488
PR-an_mpm	0.528		3.930	
PR-ao	0.865	0.196	3.982	0.375
PR-ao_ace	0.669		3.607	
PR-ap	0.623	0.028	3.812	0.244
PR-ap_ace	0.595		3.568	
PR-ba	0.676	0.086	2.904	-0.033

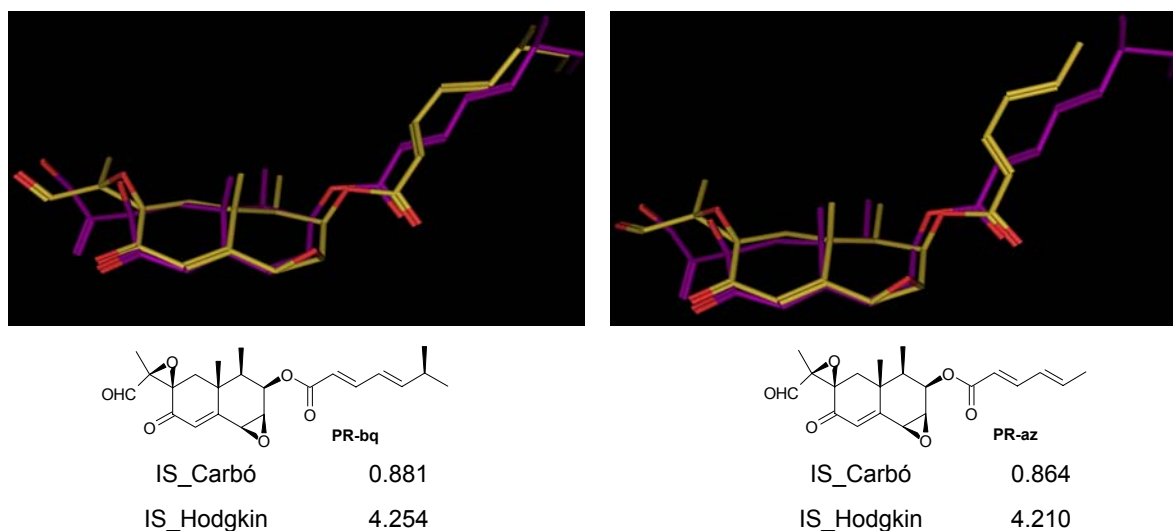
<b>PR-ba_ace</b>	0.590		2.937	
<b>Mitjana</b>		0.168		0.242

**Taula 35.** Taula on es presenten les diferències de valors entre els índexs de similitud dels anàlegs protegits i els no protegits.

Els resultats de l'anterior estudi pel que fa referència a mimètics del KM-01 (9) amb esquelet de PR toxina (19) conclouïen que, tot i presentar uns índexs de similitud baixos, no eren mals candidats per emprar-los com a promotors del creixement vegetal donada la seva similitud amb 1. En l'estudi preliminar els valors que s'obtenien per a aquests anàlegs eren inferiors als que s'obtenien amb altres esquelets. Tot i així, la diferència de valors dels índexs de similitud de Carbó era petita (0.009). Aquí, aquesta diferència es veu incrementada (0.032) i per tant, no sembla que puguin arribar a presentar elevada activitat en el RLIT.

De totes maneres, amb l'esquelet de PR toxina (19) es va decidir dissenyar, avaluar computacionalment i sintetitzar PR-bq i PR-az, dos possibles inhibidors de l'acció dels BRs. A continuació, en la **Figura 111**, es mostra la superposició d'aquests anàlegs amb el KM-01 (9).

S'observa que tant PR-bq com PR-az (en groc) s'alineen força bé amb el KM-01 (9), en lila, i per tant, tots dos tenen altes possibilitats de contrarestar l'acció biològica dels brassinoesteroides. El PR-bq únicament no presenta un bon alineament amb el doble enllaç de C11-C12 i el PR-az, en aquesta mateixa zona i en la part hidrofòbica final de la cadena lateral. Aquest mal alineament en la part final de la cadena demostra que la cadena **az** no és suficientment llarga per mimetitzar perfectament la cadena de 9.



**Figura 111.** Superposició dels anàlegs PR-bq (esquerra) i PR-az (dreta), en color groc, amb 9, en color lila.

#### 6.4.4. Mimètics del KM-01 (9)

##### 6.4.4.1. Resultats generals

Donada la seva extensió, les taules i els gràfics amb els 182 mimètics de 9 es presenten en l'annex B. En la **Taula 36** i en la **Figura 112** es presenten els 30 mimètics amb major índexs de similitud de Carbó i de Hodgkin. El número que acompanya els índexs de similitud indica la posició que ocupa l'anàleg en el llistat dels 182 anàlegs ordenats segons l'índex de similitud corresponent.



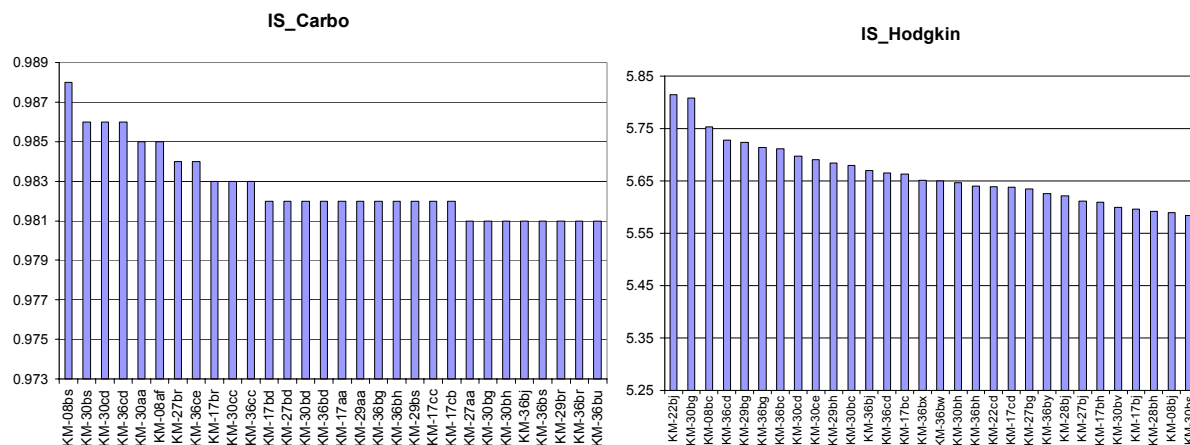
A part de trobar les millors cadenes laterals i esquelets per al disseny de molècules anàlogues a **9** capaces de mimetitzar la brassinolida (**1**), aquest estudi també serveix per trobar algunes característiques que han de complir aquests esquelets i cadenes per tal de maximitzar la similitud amb **1**.

D'aquests mimètics n'hi ha nou (KM-36cd, KM-30cd, KM-36ce, KM-30bh, KM-36bg, KM-36bj, KM-30bg, KM-36bh i KM-30bs) que es troben presents en els dos grups, és a dir, quan la llista s'ordena seguint l'índex de Carbó i quan s'ordena seguint l'índex de Hodgkin. Però, de tots ells, únicament els dos primers (KM-36cd i KM-30cd) es troben entre els deu primers en ambdós grups.

Compost	IS	Carbó	IS	Hodgkin
KM-08bs	1	0.988	84	5.348
KM-30bs	2	0.986	30	5.584
KM-30cd	3	0.986	8	5.697
KM-36cd	4	0.986	4	5.728
KM-30aa	5	0.985	43	5.527
KM-08br	6	0.985	83	5.350
KM-27br	7	0.984	55	5.468
KM-36ce	8	0.984	13	5.665
KM-17br	9	0.983	106	5.277
KM-30cc	10	0.983	39	5.540
KM-36cc	11	0.983	58	5.465
KM-17bd	12	0.982	97	5.302
KM-27bd	13	0.982	78	5.368
KM-30bd	14	0.982	70	5.438
KM-36bd	15	0.982	74	5.392
KM-17aa	16	0.982	110	5.267
KM-29aa	17	0.982	61	5.458
KM-36bg	18	0.982	6	5.714
KM-36bh	19	0.982	18	5.640
KM-29bs	20	0.982	35	5.553
KM-17cc	21	0.982	85	5.342
KM-17cb	22	0.982	87	5.337
KM-27aa	23	0.981	94	5.313
KM-30bg	24	0.981	2	5.808
KM-30bh	25	0.981	17	5.647
KM-36bj	26	0.981	12	5.669
KM-36bs	27	0.981	95	5.311
KM-29br	28	0.981	60	5.460
KM-36br	29	0.981	84	5.353
KM-36bu	30	0.981	54	5.478

Compost	IS	Carbó	IS	Hodgkin
KM-22bj	53	0.977	1	5.814
KM-30bg	24	0.981	2	5.808
KM-08bc	70	0.973	3	5.753
KM-36cd	4	0.986	4	5.728
KM-29bg	64	0.975	5	5.724
KM-36bg	18	0.982	6	5.714
KM-36bc	79	0.972	7	5.711
KM-30cd	3	0.986	8	5.697
KM-30ce	98	0.968	9	5.691
KM-29bh	80	0.972	10	5.684
KM-30bc	99	0.967	11	5.680
KM-36bj	26	0.981	12	5.669
KM-36ce	8	0.984	13	5.665
KM-17bc	78	0.972	14	5.663
KM-36bx	41	0.979	15	5.651
KM-36bw	38	0.98	16	5.650
KM-30bh	25	0.981	17	5.647
KM-36bh	19	0.982	18	5.640
KM-22cd	104	0.967	19	5.639
KM-17cd	57	0.977	20	5.638
KM-27bg	35	0.98	21	5.634
KM-36by	37	0.98	22	5.625
KM-28bj	81	0.972	23	5.621
KM-27bj	43	0.978	24	5.611
KM-17bh	36	0.98	25	5.609
KM-30bv	110	0.964	26	5.599
KM-17bj	54	0.977	27	5.596
KM-28bh	52	0.977	28	5.591
KM-08bj	55	0.977	29	5.589
KM-30bs	2	0.986	30	5.584

**Taula 36.** Els 30 mimètics amb major índexs de similitud de Carbó (esquerra) i de Hodgkin (dreta). El número que els acompanya indica la posició que ocupen aquests mimètics dins la sèrie dels 182 anàlegs ordenats segons l'índex corresponent



**Figura 112.** Representació gràfica dels valors d'índex de similitud dels 30 millors mimètics.

Si se centra l'atenció en els esquelets dels mimètics s'observa que els tres que permeten obtenir uns valors d'índex de similitud majors són el **KM-36**, **KM-30** i el **KM-17**, encara que els dos primers sembla que siguin millors que el **KM-17**. En la **Taula 37** es presenten tots els esquelets que apareixen en els mimètics seleccionats en la tria d'aquests 30 primers de la **Taula 36** o la **Figura 112** i la seva cadència. S'observa com els esquelets que apareixen més vegades són **KM-36** i **KM-30**, que coincideix amb els esquelets dels nou anàlegs (KM-36cd, KM-30cd, KM-36ce, KM-30bh, KM-36bg, KM-36bj, KM-30bg, KM-36bh i KM-30bs) presents en els dos grups.

Esquelets	Carbó	Hodgkin	Total
<b>KM-36</b>	10	9	19
<b>KM-30</b>	7	7	14
<b>KM-17</b>	5	4	9
<b>KM-27</b>	3	2	5
<b>KM-29</b>	3	2	5
<b>KM-08</b>	2	2	4
<b>KM-22</b>	0	2	2
<b>KM-28</b>	0	2	2

**Taula 37.** Es presenta el nombre de vegades que apareix cadascun dels esquelets indicats en les llistes d'anàlegs dels 30 primers mimètics amb major índex de similitud de Carbó o Hodgkin.

Si se centra l'atenció en les cadenes laterals dels mimètics s'observa que les quatre que permeten obtenir uns valors d'índex de similitud majors són **bh**, **bj**, **cd** i **bg**. Encara que, a diferència dels esquelets, el nombre de vegades que apareixen les cadenes és molt gradual, i per tant, no hi ha una barrera tant clara com en els esquelets (**Taula 38**). Així doncs, es podrien considerar igualment interessants les cadenes **bs**, **br** i fins i tot, **aa**, **bd** o **bc**, **ce** i **cc**.

Cadenes	Carbó	Hodgkin	Total
<b>bh</b>	2	5	7
<b>bj</b>	1	6	7
<b>cd</b>	2	4	6
<b>bg</b>	2	4	6
<b>bs</b>	4	1	5
<b>br</b>	5	0	5

<b>aa</b>	4	0	4
<b>bd</b>	4	0	4
<b>bc</b>	0	4	4
<b>ce</b>	1	2	3
<b>cc</b>	3	0	3
<b>cb</b>	1	0	1
<b>bu</b>	1	0	1
<b>bx</b>	0	1	1
<b>bw</b>	0	1	1
<b>by</b>	0	1	1
<b>bv</b>	0	1	1

**Taula 38.** Es presenta el nombre de vegades que apareix cadascuna de les cadenes de les llistes d'anàlegs dels 30 primers mimètics amb major índex de similitud de Carbó o Hodgkin.

De fet, si únicament ens fixem en els 10 primers mimètics de la **Taula 36**, les cadenes que apareixen major nombre de vegades són **cd** (4) seguida de **bg**, **br** i **bc** amb tres, **bj**, **ce** i **bs** amb dos i finalment **bh**, **aa** i **cc** amb una. La cadena **bd** no es troba present en cap de les dues llistes si únicament ens fixem en els 10 mimètics amb major similitud amb la brassinolida (1). Per tant, el que sembla clar és que les millors cadenes laterals són **cd** i **bg** ja que són les úniques presents en la part alta de la taula tant si s'analitzen els 10 com els 30 primers mimètics de la llista de 10 mimètics i, a més, són les que més apareixen, juntament amb **bh**, en els 9 anàlegs citats (KM-36cd, KM-30cd, KM-36ce, KM-30bh, KM-36bg, KM-36bj, KM-30bg, KM-36bh i KM-30bs).

Davant d'aquests resultats, es mostra a la **Taula 39** els valors d'índexs de similitud per als mimètics que permeten obtenir millors resultats. Aquests mimètics s'escullen combinant les millors cadenes (**cd**, **bg** i **bh**) amb els millors esquelets (**KM-36** i **KM-30**).

	KM-36		KM-30	
	Carbó	Hodgkin	Carbó	Hodgkin
<b>bh</b>	0.982	5.640	0.981	5.647
<b>cd</b>	0.986	5.728	0.986	5.697
<b>bg</b>	0.982	5.714	0.981	5.808
<b>br</b>	0.981	5.353	0.978	5.486
<b>bc</b>	0.972	5.711	0.967	5.680

**Taula 39.** Valors d'índexs de similitud per als millors candidats.

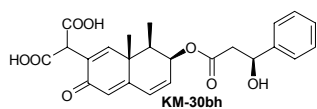
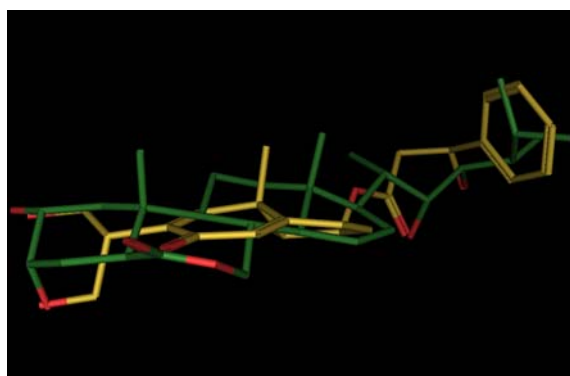
Tots ells presenten uns índexs de similitud, tant de Carbó com de Hodgkin, molt semblants i, per aquesta raó, es va decidir, per tal de determinar el millor candidat per a desencadenar activitat brassinoesteroide en el RLIT, superposar aquests mimètics amb la brassinolida (1). Aquesta superposició també s'ha realitzat emprant el programa MOE, amb el *Force Field* MMFF94, deixant fix el confòrmer de la brassinolida (1) i flexible el del mimètic (**Figura 113**).

De tots ells, els que presenten un millor alineament amb la brassinolida (1) són els mimètics KM-30br, KM-30bh i KM-30cd. El KM-30br presenta un bon solapament en totes les zones, tant les polars com les apolars. En canvi, els altres dos, tot i presentar un bon alineament en la majoria de regions, el KM-30bh presenta únicament una aproximació en la zona de la lactona de l'anell B de la brassinolida (1) i el KM-30cd

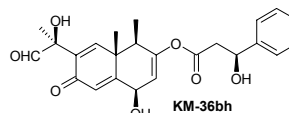
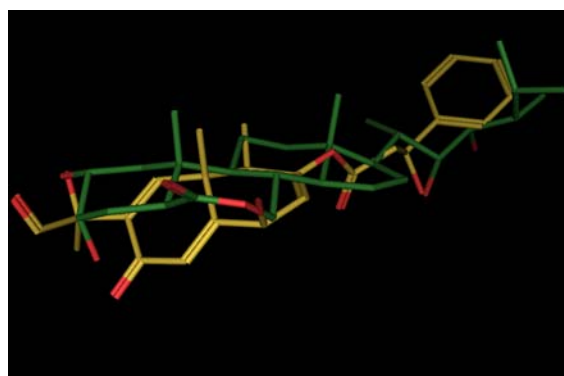
una aproximació a la regió de l'hidroxil 22*R*-OH de **1**.

El mimètic KM-30bg tampoc presenta un mal alineament ja que se solapa força bé amb l'hidroxil 22*R*-OH i amb les funcionalitats polars dels anells A i B i, fins i tot, la part hidrofòbica de la cadena lateral s'alinea parcialment. Tot i així, no s'observa cap alineament en la zona de l'hidroxil 23*R*-OH de la brassinolida (**1**).

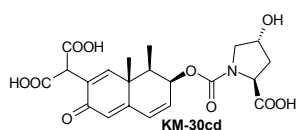
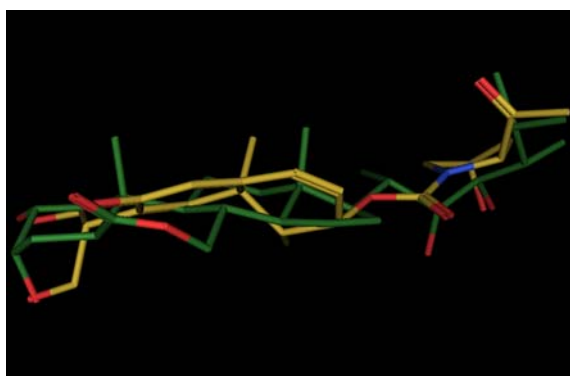
La resta de mimètics ja empitjoren força el seu alineament amb la brassinolida (**1**). Així doncs, els anàlegs KM-36bh, KM-36cd i KM-36bg no presenten una bona superposició en la regió de la lactona de l'anell B, en la part hidrofòbica de la cadena lateral ni en la dels hidroxils 3 $\alpha$ -OH i 23*R*-OH. Els mimètics KM-36br i KM-30bc no presenten un bon alineament en la zona de l'hidroxil 2 $\alpha$ -OH, en la regió de la lactona ni en la part hidrofòbica de la cadena lateral; inclús, en el KM-36br no s'observa alineament en la regió de 23*R*-OH. Finalment, el mimètic KM-36bc no presenta cap alineament en la zona hidrofòbica de la cadena lateral i només una aproximació en la zona de la lactona i en la zona de l'hidroxil 3 $\alpha$ -OH de **1**.



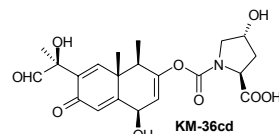
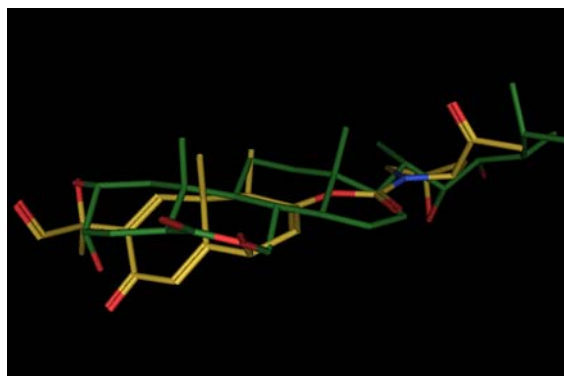
IS_Carbó	0.981
IS_Hodgkin	5.647



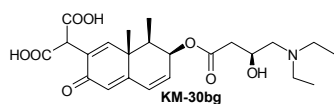
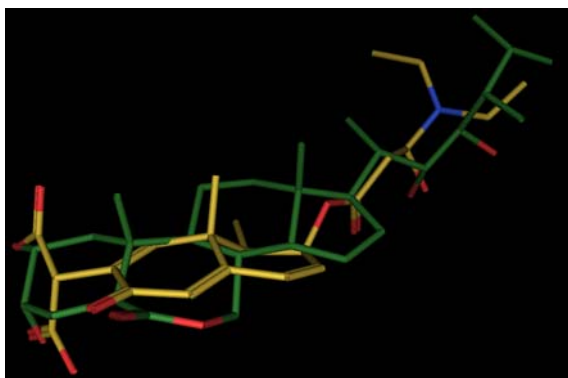
IS_Carbó	0.982
IS_Hodgkin	5.640



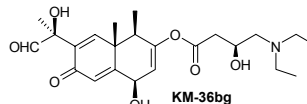
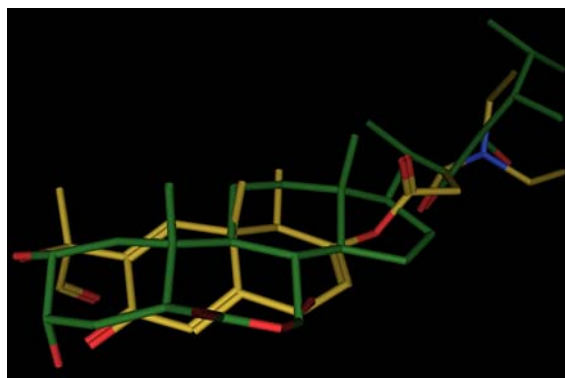
IS_Carbó	0.986
IS_Hodgkin	5.697



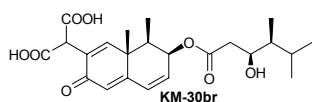
IS_Carbó	0.986
IS_Hodgkin	5.728



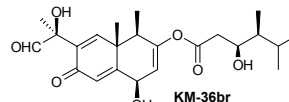
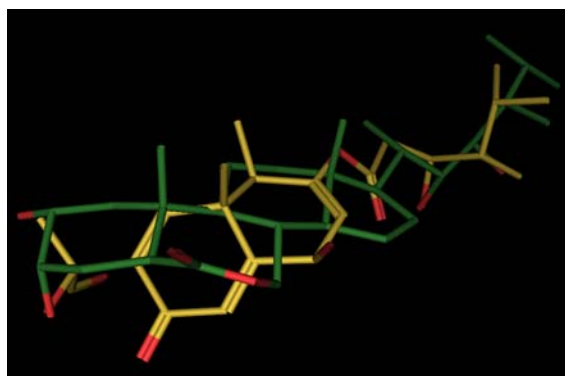
IS\_Carbó            0.981  
IS\_Hodgkin        5.808



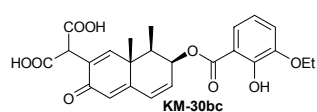
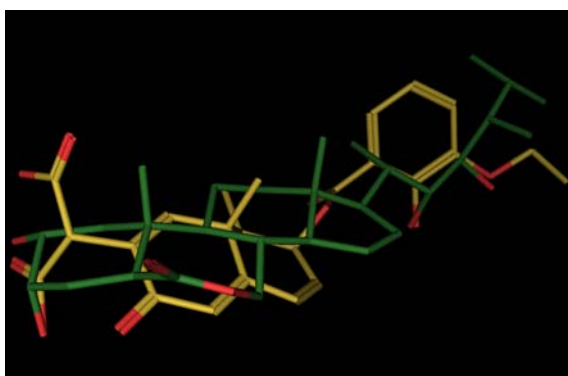
IS\_Carbó            0.982  
IS\_Hodgkin        5.714



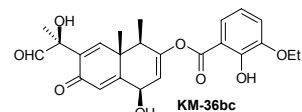
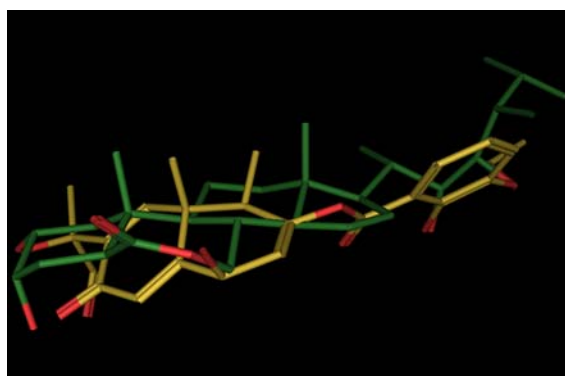
IS\_Carbó            0.978  
IS\_Hodgkin        5.486



IS\_Carbó            0.981  
IS\_Hodgkin        5.353



IS\_Carbó            0.967  
IS\_Hodgkin        5.680



IS\_Carbó            0.972  
IS\_Hodgkin        5.711

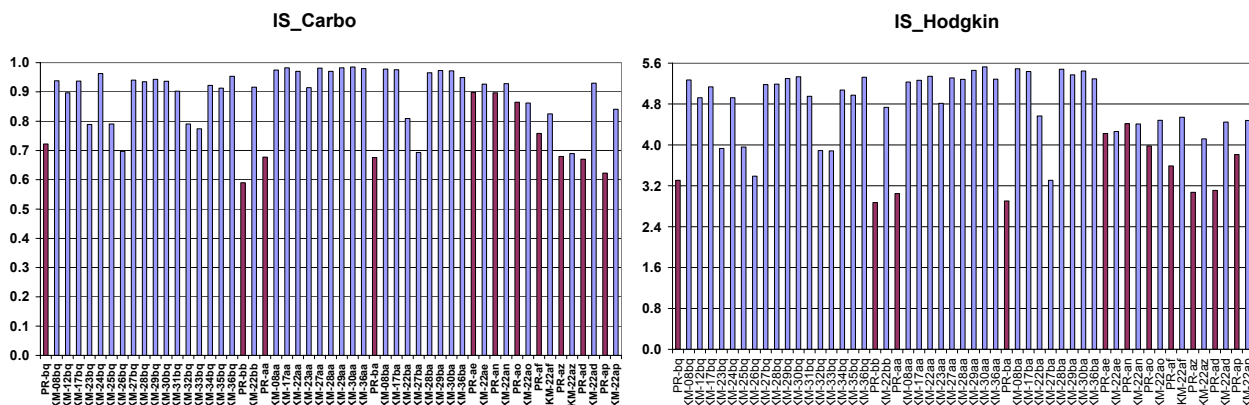
**Figura 113.** Superposició dels millors mimètics del KM-01 (9) amb la brassinolida (1).

En vista de les superposicions de la **Figura 113**, el mimètic amb un major interès és el **KM-30br**, que presenta uns elevats índexs de similitud i un bon alineament amb la brassinolida (1).

També cal comentar que, amb aquests anàlegs, es corrobora que l'esquelet de PR toxina (19) no és interessant per a emprar-lo com a esquelet en la síntesi de mimètics del KM-01 (9) amb possible activitat brassinoesteroide. Si s'analitzen els anàlegs de 19 i els de 9 que únicament difereixen en la part de l'esquelet (mantenen la cadena lateral) s'observen diferències importants en els valors dels seus índexs. En la **Taula 40** i en la **Figura 114** s'observa com tots els valors d'índexs de similitud, tant de Carbó com de Hodgkin, són superiors per als mimètics de 9 que no pas per als anàlegs de 19. Les dues úniques excepcions, però amb valors molt semblants, són les parelles de compostos PR-bq (0.722) amb KM-26bq (0.697) i PR-ao (0.865) amb KM-22ao (0.862) per a valors dels índexs de similitud de Carbó (indicats en roig a la **Taula 40**).

Compost	IS_Carbó	IS_Hodgkin	Compost	IS_Carbó	IS_Hodgkin	Compost	IS_Carbó
PR-bq	0.722	3.309	PR-aa	0.677	3.050	PR-ae	0.898
KM-08bq	0.938	5.271	KM-08aa	0.975	5.232	KM-22ae	0.927
KM-12bq	0.897	4.926	KM-17aa	0.982	5.267	PR-an	0.897
KM-17bq	0.937	5.136	KM-22aa	0.970	5.342	KM-22an	0.928
KM-23bq	0.789	3.932	KM-23aa	0.915	4.815	PR-ao	0.865
KM-24bq	0.963	4.925	KM-27aa	0.981	5.313	KM-22ao	0.862
KM-25bq	0.790	3.959	KM-28aa	0.970	5.285	PR-af	0.758
KM-26bq	0.697	3.389	KM-29aa	0.982	5.458	KM-22af	0.825
KM-27bq	0.940	5.181	KM-30aa	0.985	5.527	PR-az	0.680
KM-28bq	0.935	5.193	KM-36aa	0.980	5.290	KM-22az	0.689
KM-29bq	0.943	5.301	PR-ba	0.676	2.904	PR-ad	0.670
KM-30bq	0.936	5.335	KM-08ba	0.978	5.491	KM-22ad	0.930
KM-31bq	0.903	4.955	KM-17ba	0.976	5.439	PR-ap	0.623
KM-32bq	0.790	3.891	KM-22ba	0.809	4.566	KM-22ap	0.841
KM-33bq	0.774	3.883	KM-27ba	0.693	3.309		
KM-34bq	0.922	5.077	KM-28ba	0.965	5.481		
KM-35bq	0.913	4.975	KM-29ba	0.973	5.374		
KM-36bq	0.953	5.325	KM-30ba	0.972	5.447		
PR-bb	0.590	2.873	KM-36ba	0.949	5.294		
KM-22bb	0.916	4.738					

**Taula 40.** Comparació dels índexs de similitud entre els mimètics del KM-01 (9) i els de la PR toxina (19). En roig s'indiquen aquells valors en que el mimètic de 9 té un valor d'índex de similitud inferior al de l'anàleg de 19.



**Figura 114.** Representació conjunta dels valors d'índex de similitud de Carbo i Hodgkin dels mimètics del KM-01 (9), en blau, i els de la PR toxina (19), en grana. Es compara l'esquelet de 19 amb els esquelets mimètics de 9.

#### 6.4.4.2. Cadenes laterals

Es confirma, en aquest estudi, que les cadenes laterals amb un hidroxil en  $\beta$  de carbonil són les que millor permeten mimetitzar la cadena lateral de 1 per a aquest tipus d'esquelets. En la **Taula 38**, on es mostren les millors cadenes laterals, totes les que hi apareixen són  $\beta$ -hidroxiàcids a excepció de les cadenes **cd** i **ce** (cadenes atípiques obtingudes en l'estudi d'àcids comercials).

Els quatre  $\gamma$ -hidroxiàcids **ag**, **an**, **ao** i **aq** no presenten tant bons resultats com els  $\beta$ -hidroxiàcids i per tant, ja es poden descartar.

Els dos diols de cadena avaluats en aquest estudi, **as** i **ax**, també presenten valors d'índex de similitud inferiors als  $\beta$ -hidroxiàcids quan estan units a l'esquelet del KM-01 (9). De totes maneres, seguint la mateixa tendència de l'estudi preliminar, s'obtenen uns valors d'índex més elevats per al mimètic KM-22as, que presenta un diol en  $\beta, \gamma$  de carbonil, que no pas per al mimètic KM-22ax, que presenta el diol en  $\alpha, \beta$ .

En la **Figura 115** es presenta la superposició de KM-22bt amb la brassinolida (1). La cadena **bt** únicament té interès teòric però, en aquest cas concret, ens permet confirmar que la distància idònia on situar l'hidroxil de la cadena lateral del KM-01 (9) és en  $\beta$  de carbonil.

Un cop escollits els  $\beta$ -hidroxiàcids com a cadenes idònies per unir a esquelets anàlegs del KM-01 (9) s'avaluen més a fons els resultats obtinguts per definir les característiques d'aquestes cadenes.

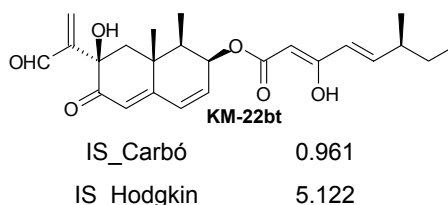
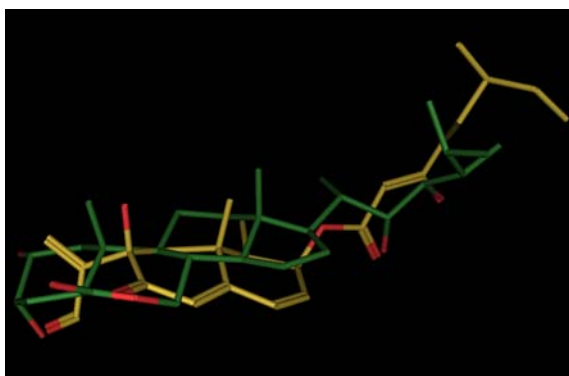


Figura 115. Superposició del KM-22bt amb la brassinolida (1).

Si es comparen les cadenes laterals **ad**, **ae**, **bj-bm**, **bu-bz** i **ca** quan es troben unides a un mateix esquelet, KM-22, es pot trobar la llargària idònia de la part hidrofòbica d'aquests  $\beta$ -hidroxiàcids. En la **Taula 41** es presenten les característiques d'aquestes cadenes.

Nom	Cadena lateral	IS_Carbó	IS_Hodgkin
KM-22bu		0.967	5.290
KM-22ad		0.930	4.449
KM-22bv	X = 1	0.967	5.251
KM-22bw	X = 2	0.962	5.290
KM-22bx	X = 3	0.962	5.359
KM-22by	X = 4	0.962	5.451
KM-22bj	X = 5	0.977	5.814
KM-22bk	X = 6	0.968	5.053
KM-22bl	X = 7	0.656	3.469
KM-22bz	X = 8	0.664	3.065
KM-22ca	X = 9	0.942	5.331
KM-22bm	X = 10	0.899	4.769

Taula 41. Anàlegs amb variacions en la llargària de la cadena lateral.

La llargària que permet obtenir uns majors índexs de similitud és per a la cadena **bj**, X = 5 (0.977 en l'índex de Carbó i 5.814 en el de Hodgkin). Per altra banda, les cadenes que no permeten mimetitzar correctament la cadena de la brassinolida (1) quan s'empra l'esquelet del KM-01 (9) són **ad**, **bl**, **bz** i **bm**, que en cap cas obtenen valors d'índex de Carbó per sobre de 0.900 ni de Hodgkin per sobre de 5.000. Si se centra l'atenció en l'índex de Hodgkin, les altres cadenes laterals d'interès són **bx**, **by** i **ca** però també **bu**, **bv**, **bw** i **bk**; en canvi, si se centra l'atenció en el de Carbó, les altres cadenes més interessants són **bu**, **bv** i **bk**, i en segon terme **ad**, **bw**, **bx**, **by** i **ca**. Per tant, sembla que la longitud idònia és la de l'àcid nonanoic tot i que un eslavó metilè de més o de menys també permet obtenir uns elevats índexs de similitud.

En la **Taula 42** es presenta la comparació entre mimètics que únicament difereixen en la part hidrofòbica de la cadena lateral, els anàlegs de l'esquerra de la taula tenen l'hidroxil en  $\beta$  de carbonil unit a una cadena saturada o a un doble enllaç i els de la dreta a un anell benzènic.

	OH no unit a anell benzènic			OH unit a anell benzènic	
	IS_Carbó	IS_Hodgkin		IS_Carbó	IS_Hodgkin
KM-22an	0.928	4.410	KM-22ao	0.862	4.484
KM-22bn	0.969	5.149	KM-22bp	0.951	5.288
KM-22bo	0.901	4.833			
KM-22bt	0.961	5.122			
KM-22ad	0.930	4.449	KM-22ba	0.809	4.566
KM-22ae	0.927	4.264			

Taula 42. Comparació de mimètics equivalents que únicament varien en la part final de la cadena lateral. Aquest està unit a un anell benzènic o bé a una cadena saturada o doble enllaç.



En l'estudi preliminar semblava que els anàlegs units a un anell benzènic presentaven resultats pitjors que la resta, però això no és així en aquest nou estudi. Si es fa referència a l'índex de similitud de Hodgkin tots els mimètics que tenen l'hidroxil unit a anell benzènic presenten majors valors que la resta. En canvi, si hom es fixa amb els de Carbó s'observa que són majors els valors dels mimètics que no tenen l'hidroxil a un anell benzènic, a excepció del KM-22bo. En conseqüència, tant bons candidats poden ser els uns com els altres. És a dir, no és crític que l'hidroxil en  $\beta$  de carbonil estigui unit o no a un anell benzènic.

Tot i que si hom es fixa en els índexs de similitud de la **Taula 43** sembla que la configuració *R* de l'hidroxil en  $\beta$  de carbonil permeti obtenir uns valors majors que la *S*, no es pot afirmar rotundament. Per una banda, hi ha una excepció en els mimètics KM-22cb i KM-22cc, i per altra, les diferències entre ells no són, en general, significatives. Així doncs, a excepció de la parella KM-22bn i KM-22bo els valors dels índexs de la resta són molt similars. Per tant, en aquest nou estudi tampoc es pot definir quina configuració és l'adequada per a aquest hidroxil.

	Configuració <i>R</i> del $\beta$ -OH			Configuració <i>S</i> del $\beta$ -OH	
	IS_Carbó	IS_Hodgkin		IS_Carbó	IS_Hodgkin
KM-22ad	0.930	4.449	KM-22ae	0.927	4.264
KM-22ac	0.970	5.177	KM-22ab	0.967	5.046
KM-22bn	0.969	5.149	KM-22bo	0.901	4.833
KM-22bs	0.938	4.602	KM-22br	0.937	4.491
KM-22cb	0.973	5.265	KM-22cc	0.974	5.275

**Taula 43.** Comparació entre mimètics que únicament difereixen en la configuració de l'hidroxil en  $\beta$  de carbonil.

Les cadenes **az** i **bq**, a part d'ancorar-se a l'esquelet de la PR toxina (19) com s'ha observat en la **Figura 111**, també s'ancoren a l'esquelet del KM-01 (9), per tal d'observar la seva viabilitat com a possibles inhibidors de l'acció brassinoesteroide. En aquest cas, també s'obté per al mimètic KM-01 (9), que conté la cadena **bq** (0.896 i 4.857), uns valors d'índexs superiors al KM-22az (0.689 i 4.118), fet que torna a confirmar que la cadena **az** és massa curta per mimetitzar la cadena de **9**.

#### 6.4.4.3. Esquelets

En aquest estudi més exhaustiu es confirma que la posició idònia on situar les funcionalitats polars en l'esquelet són C12 i C13. Això s'aprecia en la **Taula 38** on 6 dels 8 millors esquelets presenten les noves funcionalitats sobre aquestes posicions C12 i C13, les úniques excepcions són l'esquelet del KM-01 (9) i l'esquelet **KM-36**. Cal recordar que aquestes funcionalitats, com s'havia observat en l'estudi preliminar, és interessant que siguin iguals per a evitar la formació d'un nou centre quiral a C11.

Tal com s'observa en el conjunt d'esquelets **KM-08**, **KM-12**, **KM-17**, **KM-25** – **KM-30** dels mimètics de la **Taula 44** les funcionalitats  $-\text{CH}_2\text{OH}$  o  $-\text{COOH}$  són millors que no pas l'aldehid. Així doncs, els mimètics amb esquelets que contenen un aldehid (**KM-12**, **KM-25** i **KM-26**) presenten uns valors d'índexs inferiors a la resta. Per altra banda, entre els que tenen la doble funcionalitat  $-\text{CH}_2\text{OH}$  (**KM-08**, **KM-27**, **KM28**) o  $-\text{COOH}$  (**KM-17**, **KM-29**, **KM-30**) no s'observen diferències significatives. Tot i així, cal dir que els resultats obtinguts amb la funcionalitat aldehid també són força elevats i, donat que no es pot donar la ciclació mostrada en la **Figura 26**, no es poden descartar aquests esquelets.

		OH a C7			H a C7			Doble enllaç C6-C7	
		Carbó	Hodgkin		Carbó	Hodgkin		Carbó	Hodgkin
-CH <sub>2</sub> OH a C12 i C13	KM-08bq	0.938	5.271	KM-27bq	0.940	5.181	KM-28bq	0.935	5.193
	KM-08br	0.985	5.350	KM-27br	0.984	5.468	KM-28br	0.969	5.244
	KM-08bs	0.988	5.348	KM-27bs	0.978	5.217	KM-28bs	0.973	5.290
-CHO a C12 i C13	KM-12bq	0.897	4.926	KM-25bq	0.790	3.959	KM-26bq	0.697	3.389
	KM-12br	0.941	4.638	KM-25br	0.933	5.059	KM-26br	0.894	4.363
	KM-12bs	0.965	5.044	KM-25bs	0.928	4.977	KM-26bs	0.923	5.032
-COOH a C12 i C13	KM-17bq	0.937	5.136	KM-29bq	0.943	5.301	KM-30bq	0.936	5.335
	KM-17br	0.983	5.277	KM-29br	0.981	5.460	KM-30br	0.978	5.486
	KM-17bs	0.979	5.330	KM-29bs	0.982	5.553	KM-30bs	0.986	5.584

**Taula 44.** En les files es mostren mimètics que únicament presenten diferències a C7 i per columnes difereixen en les funcionalitats a C12 i C13.

Si en aquesta mateixa taula es para atenció en les diferències per files, és a dir, en les variacions dels mimètics a C7, no s'observen diferències significatives entre l'hidroxil, l'hidrogen o el doble enllaç endocíclic. Aquests resultats confirmen els resultats de l'estudi preliminar. Aquesta afirmació és certa sempre que hi hagi dues funcionalitats polars a C12 i C13. Doncs, si s'analitzen els valors dels índexs dels anàlegs KM-22bt, KM-23bt i KM-24bt l'hidroxil a C7 adquireix molta importància (**Taula 45**). Per tant, els esquelets **KM-23** i **KM-24** es poden descartar dels possibles candidats.

	IS Carbó	IS Hodgkin
<b>KM-22bt</b>	0.961	5.122
<b>KM-23bt</b>	0.894	4.779
<b>KM-24bt</b>	0.900	4.819

**Taula 45.** Valors dels índexs de similitud dels mimètics KM-22bt, KM-23bt i KM-24bt.

Per altra banda, es confirmen els mals resultats que s'havien obtingut en l'estudi preliminar amb els esquelets que tenien un doble enllaç exocíclic sobre els carbonis C7-C11 ja que els esquelets **KM-32** i **KM-33** són dels que presenten pitjors valors d'índexs de similitud. També es confirmen els mals resultats que s'havien obtingut amb esquelets amb les funcionalitats polars a C11 i C12 mitjançant els valors d'índexs de similitud obtinguts en aquest nou estudi amb els esquelets **KM-31** i **KM-34**.

Finalment, s'ha de mencionar el sorprenent resultat que s'ha obtingut amb l'esquelet **KM-36**. Aquest, tot i situar les funcionalitats polars sobre els carbonis C11 i C12 permet obtenir els mimètics amb els millors índexs de similitud. Això és conseqüència de la presència d'un hidroxil sobre el carboni C1 que ajuda a mimetitzar la lactona de l'anell B de la brassinolida (**1**) tal i com es mostra en la **Figura 113**.

L'esquelet que havia donat millors resultats en l'estudi preliminar és el **KM-16**. Aquest no s'ha inclòs en aquest estudi però es presenta, en la **Figura 116**, el mimètic KM-16cd superposat amb la brassinolida (**1**). En ella s'observa, tot i que el mimètic s'orienta a la inversa del que es podia pensar en un primer moment, un bon solapament en totes les zones a excepció de la regió de l'hidroxil 2 $\alpha$  de l'anell A i de la part hidrofòbica final de la cadena lateral de **1**

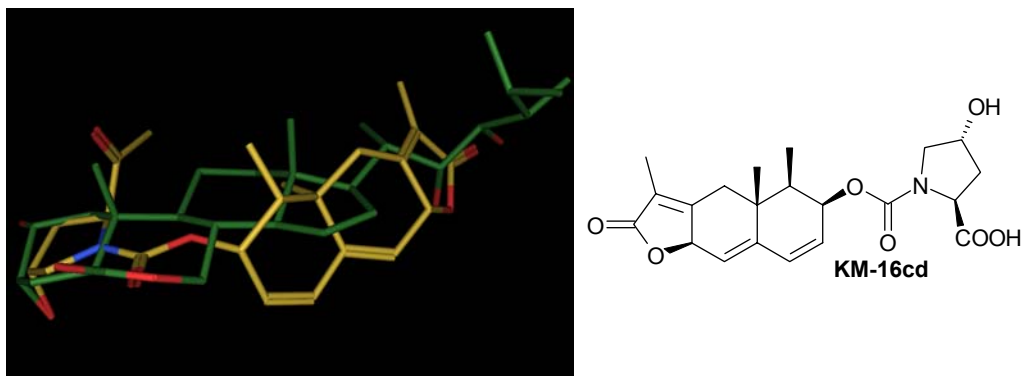


Figura 116. Superposició del mimètic KM-16cd amb la brassinolida (1).

## 6.5. Conclusions

Les hormones de creixement vegetal ABA, IAA, GA<sub>3</sub> (**Figura 2**) tenen una baixa similitud estructural amb la brassinolida (1). Per tant, no sembla que en principi actuïn sobre el mateix receptor dels brassinoesteroides.

Els metabòlits secundaris produïts en el cultiu del fong *Penicillium roquefortii* també presenten una baixa similitud estructural amb la brassinolida (1), fins i tot menor que la del KM-01 (9). Això fa pensar que no siguin esquelets idonis per emprar-los en la síntesi de mimètics brassinoesteroides. De totes maneres, si es desitjés realitzar una síntesi ràpida, d'aquest estudi es dedueix que l'esquelet de l'eremofortina D (27) és millor que el de la PR toxina (19) estructuralment parlant, però presenta l'inconvenient que es produeix en quantitats molt inferiors. L'eremofortina C (20), que també es produeix en quantitats semblants a les de 19, també és millor que el de la PR toxina (19) però només lleugerament ja que, tot i que la forma ciclada de 20 presenta una similitud força gran amb la brassinolida (1), la forma no ciclada d'aquesta presenta una similitud equivalent a la de 19. Per tant, l'esquelet de 19, tot i no ser l'ídoni, és el més adequat per a emprar-lo com a esquelet dels mimètics de 9 de síntesi ràpida.

Els inhibidors biosintètics, com era d'esperar, presenten una similitud amb la brassinolida (1) i el KM-01 (9) inferior a la dels inhibidors de Hsp90. Els primers, s'uneixen a un receptor diferent del dels brassinoesteroides i els darrers, es creu que poden actuar sobre el mateix receptor brassinoesteroide.

Els inhibidors de Hsp90, tot i presentar uns índexs de similitud de Carbó i de Hodgkin molt elevats, són força diferents en la part de la cadena lateral del KM-01 (9), però presenten un bon alineament de les zones polars de 9.

Els resultats de l'estudi preliminar, pel que fa referència a anàlegs del KM-01 (9) amb esquelet de PR toxina (19), deien que, tot i presentar uns índexs de similitud baixos, no eren mals candidats per emprar-los com a promotors del creixement vegetal donada la seva similitud amb 1. Però ara s'observa que, tot i haver-se ja sintetitzat dos mimètics d'aquestes característiques, no resulten interessants donada la seva baixa similitud estructural amb la brassinolida (1). Per altra banda, els anàlegs de 19 que tenen l'hidroxil de la cadena lateral protegit, ja sigui amb acetat o amb p-metoxibenziloxi, presenten els valors d'índexs de Carbó o Hodgkin per sota dels corresponents anàlegs sense protegir. Per tant, aquests anàlegs protegits, tot i tractar-se d'intermedis sintètics, no resultaria interessant avaluar-ne la seva activitat.

Els mimètics del KM-01 (9) presenten una bona similitud amb la brassinolida (1), fet que queda corroborat en els elevats índexs de similitud obtinguts per aquests anàlegs. Per tant, semblen bons candidats per a emprar-los com a hormones de creixement vegetal.

Les cadenes laterals que han permès obtenir uns majors índexs de similitud són **bh**, **bj**, **cd** i **bg**, tot i que **bs** i **br** també són força adequades. També cal afegir que la posició idònia on situar el nou hidroxil en la cadena lateral és en  $\beta$  de carbonil, que la configuració d'aquest hidroxil no queda definida i que la llargària ideal de la cadena lateral és la corresponent a la de l'àcid nonanoic.

Els esquelets que han permès obtenir uns majors índexs de similitud són **KM-36** i **KM-30**. Tot i així, l'esquelet **KM-16**, que és el que havia donat millors resultats en l'estudi preliminar, també és un bon candidat. També cal tenir en compte els esquelets **KM-17**, **KM-27**, **KM-29** i **KM-08**. La posició idònia on situar les funcionalitats polars és en els carbonis C12 i C13. Si aquestes dues funcionalitats són iguals s'evita la formació d'un nou centre quiral a C11 i un  $-\text{CH}_2\text{OH}$  o  $-\text{COOH}$  en aquestes posicions, a pesar de que es genera un equilibri entre la forma ciclada i la no ciclada, permet obtenir uns índexs de similitud amb la brassinolida (1) majors que situant-hi un  $-\text{CHO}$ . Un hidroxil a C7 es pot substituir per un hidrogen o per un doble enllaç endocíclic entre els carbonis C6 i C7 sense disminuir la similitud amb la brassinolida (1).

El compost més interessant a sintetitzar a resultat ser el KM-30br.

Els dos estudis de mimètics del KM-01 (9), preliminar i exhaustiu, permeten arribar a resultats equivalents.

## 7. Anàlisi computacional d'àcids comercials

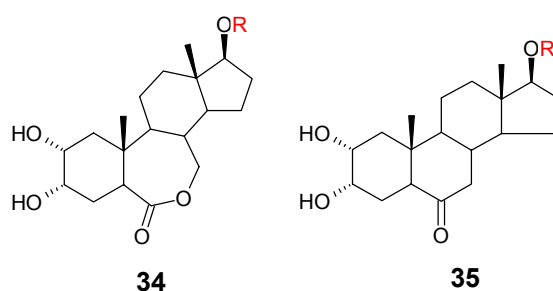
### 7.1. Introducció

Un cop escollits els millors mimètics de l'inhibidor KM-01 (**9**) amb possibilitats de desencadenar activitat brassinoesteroide, es decideix fer un nou estudi, però únicament de les cadenes laterals d'aquests mimètics. Per dur-lo a terme s'emprà una nova metodologia (SHOP (Scaffold HOPing))<sup>178</sup> desenvolupada per l'empresa MOLECULAR LEAD DESIGN S.L. i amb la que es col·laborà per a validar-la.

Pel que fa a les estructures analitzades, la diferència bàsica amb l'estudi anterior és que ara es pretén analitzar les cadenes laterals sense cap tipus de determinisme. En l'estudi anterior, s'intentava mimetitzar les funcionalitats polars de la cadena lateral de la brassinolida (**1**) amb la qual cosa totes les cadenes laterals eren hidroxilàcids. En aquest estudi, es parteix de bases de dades d'àcids carboxílics comercials que es puguin ancorar per esterificació a un esquelet eremofilànic. A més, aquest estudi no únicament permet trobar cadenes laterals per als mimètics de **9**, sinó que a més aquestes cadenes laterals són útils per ancorar-les a un esquelet androstànic com el que es mostra en la **Figura 117** o inclús a qualsevol altra estructura que presenti un hidroxil o un grup amina i mimetitzi l'esquelet de **1**.

Cal comentar un cop més que els brassinoesteroides són presents en les plantes en molt baixes concentracions i la seva síntesi requereix de moltes etapes sintètiques, s'obté un baix rendiment i té un alt cost econòmic donat que en algun pas sintètic, com és el cas de la dihidroxilació catalítica asimètrica de Sharpless de la cadena lateral,<sup>256</sup> s'empen reactius cars. Per aquests motius, en aquesta tesi s'està treballant amb els mimètics del KM-01 (**9**) i en l'equip amb altres molècules assequibles econòmicament amb activitat brassinoesteroide: els androstans.<sup>257,258</sup>

Els androstans difereixen en la cadena lateral dels BRs usuals i permeten aprofundir en els requisits estructurals mínims d'un BR per a que desencadeni activitat. Aquest estudi es realitza en col·laboració amb el grup de L. Kohout de l'Institut de Química Orgànica i Bioquímica de l'Acadèmia de Ciències de la República Txeca.



**Figura 117.** Esquelets androstànics als que es poden ancorar àcids carboxílics per esterificació.

### 7.2. Metodologia

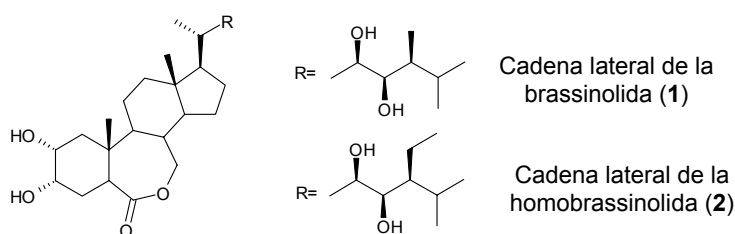
#### 7.2.1. Metodologia computacional

Després de posar a punt la nova metodologia SHOP, s'han estudiat computacionalment una base de dades d'àcids carboxílics comercials de sis proveïdors per tal d'estudiar les propietats estructurals d'aquests, agrupar-los segons les propietats químiques que tinguin i, finalment, comparar-los amb les cadenes laterals dels brassinoesteroides més actius coneguts fins al moment (brassinolida (**1**) i homobrassinolida (**2**)).<sup>16,19</sup>

Les bases de dades dels àcids carboxílics s'obtenen dels següents proveïdors:

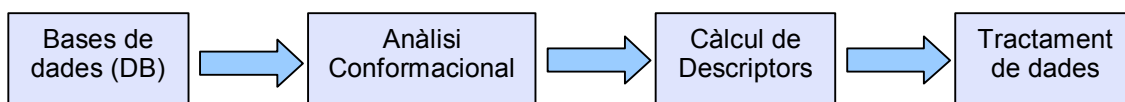
- Aldrich (2988 compostos)
- Asinex (1795 compostos)
- IBS (71 compostos)
- Key Organics (336 compostos)
- Maybridge (1807 compostos)
- Specs (491 compostos)

Paral·lelament a l'estudi realitzat dels àcids carboxílics comercials, es realitza una anàlisi conformacional mitjançant la fusió simulada de les cadenes laterals de la brassinolida (**1**) i de la homobrasinolida (**2**), ja que aquests dos compostos són els que presenten uns valors d'activitat més elevats. Un cop finalitzat, es guarden les conformacions de les cadenes laterals d'aquests brassinoesteroides (**Figura 118**) i es realitza una anàlisi de similitud, mitjançant l'índex de similitud de Carbó, entre els àcids carboxílics estudiats i les cadenes laterals dels brassinoesteroides mencionats.



**Figura 118.** Cadenes laterals que s'extreuen de la brassinolida (**1**) i de l'homobrasinolida (**2**).

Les bases de dades en format electrònic s'han de preparar, fent un canvi de format, per tal de poder generar els confòrmers de cada un dels compostos. Un cop es tinguin els confòrmers es realitzarà el càlcul de descriptors i, finalment, es farà el tractament de les dades (**Figura 119**).



**Figura 119.** Esquema de la metodologia per a realitzar l'estudi d'àcids carboxílics.

Es presenta ara d'una manera genèrica la metodologia emprada i en l'apartat 7.2.2 es mostrarà un exemple concret d'aquesta.

Les bases de dades dels àcids es disposen en format SDF (*Structure Data File format*).<sup>235</sup> Aquest format inclou l'estructura química bidimensional (matriu de coordenades i matriu d'adjacència) i informació del compost (nom, pes molecular, identificador, ...). Les **figures 120-124** mostren un exemple concret.

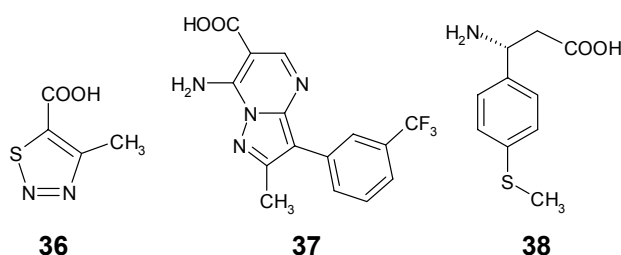
En primer lloc, per tal que el programa que s'utilitza per realitzar l'anàlisi conformacional entengui l'arxiu d'entrada (*input*) s'ha de realitzar un canvi de format de SDF a *smiles format* (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*)<sup>236</sup> amb el programa Penguins.<sup>234</sup> El format *smiles* (**Figura 125**) s'utilitza per representar estructures químiques bidimensionals emprant una notació lineal.

A continuació, el programa XConfort<sup>194</sup> transforma el format *smiles* a mol2. Seguidament, amb el mateix programa es realitza l'anàlisi conformacional de cada un dels compostos (mol2) per tal de generar els

diferents confòrmers que s'estudiaran.

Aplicant aquest mètode es generen de cada compost confòrmers de màxima diversitat. S'obtenen dos arxius de sortida o *output*: el primer mostra, per a cada compost, informació sobre el nombre d'angles de torsió, així com el nombre de confòrmers que s'han generat i els que s'han escollit (**Figura 126**). En el segon arxiu, s'obtenen en format mol2 tots els confòrmers generats (**Figura 127**).

La bondat dels resultats de l'anàlisi conformacional realitzat amb el programa XConfort s'ha corroborat amb l'anàlisi per fusió simulada i per anàlisi sistemàtic. S'ha realitzat la fusió simulada de tres àcids escollits a l'atzar (**36**, **37** i **38**) de la base de dades Key Organics. L'anàlisi sistemàtic s'ha dut a terme amb dos àcids (**36** i **37**), també triats a l'atzar, de la mateixa base de dades.



**Figura 120.** Estructura dels 3 àcids (**36**, **37** i **38**) de la base de dades Key Organics emprats per corroborar la bondat de l'anàlisi conformacional realitzat amb el programa XConfort.

A mode d'exemple, es mostren els valors dels angles díedres de l'àcid **37** obtinguts amb les tres metodologies (XConfort, anàlisi sistemàtic i fusió simulada) obtenint-se els mateixos valors per a totes tres.

T1	T2	T3
0, 180	0, 180	60, 180, 300

**Taula 46.** Valors dels angles díedres de l'àcid **37**.

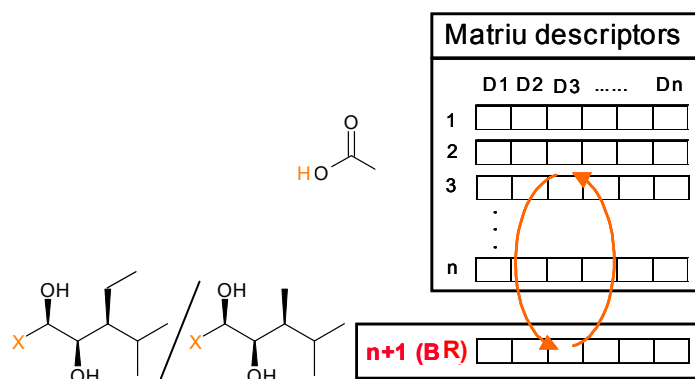
A continuació, per a cada un dels confòrmers obtinguts per a cada compost, es realitza el càlcul de descriptors, mitjançant l'*script* "descriptor.pl".<sup>259</sup> L'*script* permet obtenir 7 descriptors (3 de tipus GRID-SHOP segons les sondes emprades (N1, O, DRY), 3 del tipus SHOP-Fingerprint emprant les mateixes sondes i el descriptor del volum molecular SHAPE-SHOP) per a cada àcid, únicament a partir d'un arxiu d'entrada que conté la informació dels àcids i del punt d'ancoratge. L'arxiu d'entrada (*input*) a l'*script* conté els confòrmers generats en el pas anterior per cada un dels àcids comercials, un al darrera de l'altre i en format mol2 (multi-mol2).

Pel càlcul de descriptors GRID-SHOP s'obtenen tres arxius de sortida, un per a cada sonda: DRY.txt, N1.txt i O.txt. El mateix *script* també permet obtenir tres arxius de sortida més: finger\_DRY, finger\_N1 i finger\_O. L'últim *output* que s'obté és el shape.txt, el qual ens dóna una idea del volum molecular de cada un dels àcids estudiats, calculat mitjançant la sonda N1.

Els descriptors calculats es guarden en format de vector. D'aquesta manera s'obté un vector de descriptors per a cada un dels confòrmers de cada molècula.

Un cop es disposa de tots els descriptors dels àcids, s'han de calcular aquests mateixos descriptors per a les cadenes dels brassinoesteroides actius i així poder comparar-los. Abans però, s'han de preparar les cadenes laterals dels brassinoesteroides. Després d'obtenir, per fusió simulada, els confòrmers dels dos brassinoesteroides que s'estudiaran (brassinolida (1) i homobrassinolida (2)), s'han d'extreure les cadenes laterals (**Figura 118**) d'aquests. Per realitzar aquesta separació s'empra l'*script* "extract\_chain.pl". A continuació, es realitza el mateix tractament del càlcul de descriptors (*script* "descriptor.pl") realitzat amb els àcids.

Cada vector de descriptors obtingut, se separa en 7 parts, de 100 valors cada una, els corresponents a cada descriptor calculat. Després, es comparen, mitjançant l'índex de similitud de Carbó, els 700 valors (dividits en grups de 100) obtinguts de cada confòrmer dels àcids amb els 700 de cada un dels 47 confòrmers de la brassinolida (1) i dels 69 de la homobrassinolida (2) (**Figura 121**). És a dir, per a cada parella de compostos (àcid–brassinolida (1) o bé, àcid–homobrassinolida (2)) es calculen 7 índexs de similitud emprant cada vegada 1 descriptor diferent. Finalment, es calcula la mitjana aritmètica dels índexs de Carbó de cada una de les 7 parts per obtenir els índexs de similitud finals. Es realitza aquest càlcul dels 7 índexs de similitud amb la posterior mitjana aritmètica ja que no tots els valors de descriptors tenen el mateix pes, doncs, la sonda *shape* té valors molt superiors a la resta de sondes.



**Figura 121.** Comparació dels índexs de similitud entre els n compostos de la base de dades i la cadena lateral de la brassinolida (1).

Per a cada confòrmer dels àcids carboxílics s'obtenen els índex de Carbó corresponents a cada una de les conformacions de les cadenes laterals dels brassinoesteroides actius.

Finalment, es fa un rànquing dels compostos i es mostren els candidats amb major índex de similitud, que seran els més adients per a realitzar la síntesi d'esterificació de l'àcid carboxílic amb l'esquelet.

En la **Figura 122** es mostra la metodologia exposada anteriorment. Tant els àcids com els brassinoesteroides són sotmesos a un mateix tipus d'anàlisi. En tots dos es calcula el mateix tipus de descriptor i l'índex de similitud de Carbó que permetrà, en comparar els àcids amb els brassinoesteroides, establir una llista d'àcids que poden mimetitzar millor la cadena lateral dels brassinoesteroides.



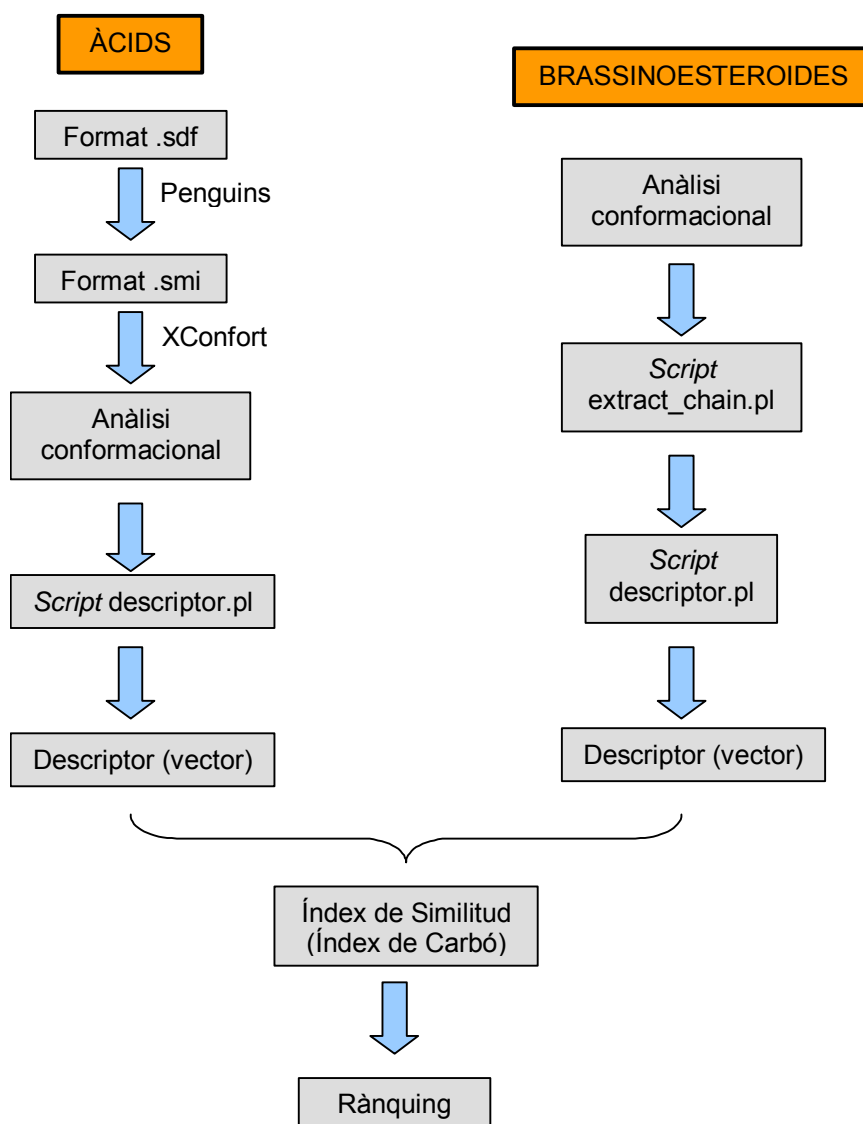


Figura 122. Metodologia detallada de l'estudi d'àcids carboxílics.

### 7.2.2. Exemple detallat

A continuació, es mostra un exemple detallat d'un dels àcids carboxílics estudiats (Figura 1223), per tal d'entendre millor la metodologia explicada en l'apartat anterior. S'escull a l'atzar l'àcid salicílic (Str17) de la base de dades Aldrich.

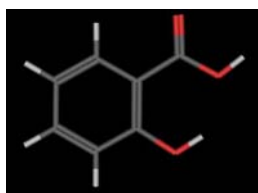


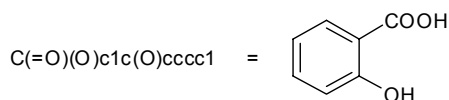
Figura 123. Àcid carboxílic (Str17) de la base de dades Aldrich.

El format electrònic del qual es parteix és el format SDF (*Structure Data File format*) que es mostra a continuació en la Figura 124.

3.4954	2.7385	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.4954	4.5779	0.0000	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.6692	2.0578	0.0000	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.4182	2.1187	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.4182	0.7062	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.2093	2.8198	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.5921	0.0253	0.0000	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.2093	0.0000	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.0000	2.1187	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.0000	0.7062	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	2	0	0	0	0									
1	3	1	0	0	0	0									
1	4	1	0	0	0	0									
4	5	2	0	0	0	0									
4	6	1	0	0	0	0									
5	7	1	0	0	0	0									
5	8	1	0	0	0	0									
6	9	2	0	0	0	0									
8	10	2	0	0	0	0									
9	10	1	0	0	0	0									
M	END														
<Mol_ID>	(17)														
184															
<Formula>	(17)														
C7H6O3															
<MolWeight>	(17)														
138.1226															
<COPYRIGHT>	(17)														
(C) 2001 SIGMA-ALDRICH CO.															
<CAT_NO>	(17)														
105910															

Figura 124. Format SDF (Structure Data File).

Primerament, s'ha de realitzar un canvi de format a *smiles format* que es realitza amb el programa Penguins, ja que el programa XConfort (emprat en l'anàlisi conformacional posterior) no entén el format SDF. S'obté la notació lineal de la **Figura 125**.

Figura 125. Notació *smiles format* i la corresponent estructura.

A continuació, s'ha de realitzar una anàlisi conformacional del compost per tal de generar un *set* de confòrmers de màxima diversitat. La generació dels confòrmers es realitza amb el programa XConfort i, com s'ha comentat anteriorment, s'obtenen dos arxius de sortida després de canviar el format *smiles* a mol2. El primer *output* dóna informació sobre els angles de torsió, en aquest cas 3 angles díedres en cadena (**Figura 126**).

En el cas que hi haguessin angles díedres en anells també es mostraria el seu valor. També mostra el

nombre de confòrmers generats i els que s'han escollit en funció de les restriccions realitzades: en aquest exemple el nombre de confòrmers generats i els escollits coincideixen. En aquest treball s'han realitzat dues restriccions: la primera restricció és que el nombre de confòrmers obtinguts de cada compost sigui com a màxim 10, i la segona realitza un *cut-off* de 10 kcal/mol a partir del confòrmer de mínima energia.

```

compound 17: Str17
  42 optimization variables
  7 relaxation variables

  3 search rotors
    0 rotors in rings
    3 rotors in chains

  3 is largest number of concurrently searched rotors

  4 conformers were identified

  4 lower energy conformers remaining
    Emin(relax)=4.812, Emax(relax)=7.006
  4 conformers available for optimization and output
  4 conformers were optimized
  0 optimized conformers eliminated by final filters

  4 optimized conformers output

  Emin( TFF )=3.206, Emax( TFF )=4.028

```

**Figura 126.** Exemple de l'arxiu de sortida (1) del compost Str17 emprant el programa XConfort.

En el segon arxiu de sortida s'obtenen tots els confòrmers generats en format mol2 (**Figura 127**).

El següent pas a realitzar és el càlcul de descriptors. Tal i com s'ha comentat anteriorment, s'obtenen 7 tipus de descriptors de cada confòrmer (DRY.txt, N1.txt, O.txt, finger\_DRY.txt, finger\_N1.txt, finger\_O.txt i shape.txt). A mode d'exemple, es mostra a continuació els valors d'energia obtinguts pels descriptors SHOP-Fingerprint (O) i SHOP-Fingerprint (N1) (**Figura 128**) per l'àcid salicílic (Str17) de la base d'Aldrich.

En la **Figura 129** es mostren en roig els valors corresponents a les distàncies del SHOP-Fingerprint (O) i en blau els valors del SHOP-Fingerprint (N1). Aquests valors es relacionen amb les distàncies del punt d'ancoratge (H, de l'àcid carboxílic) als àtoms dels grups funcionals polars que té la molècula en funció de la sonda que s'estigui emprant. Per exemple, el SHOP-Fingerprint (O) (en roig) representa les distàncies des de l'hidrogen (*anchor point*) als àtoms que siguin acceptors de pont d'hidrogen (en aquest cas, l'oxigen hidroxílic de l'àcid salicílic), mentre que el SHOP-Fingerprint (N1) (en blau) representa les distàncies entre l'hidrogen i els àtoms donadors de pont d'hidrogen (l'àtom d'hidrogen de l'hidroxil de l'àcid salicílic).

Cal notar que la distància entre H i O del grup àcid carboxílic no es veu representada ja que s'efectua un filtratge de les distàncies presents en aquest grup perquè aquest el presenten tots els compostos estudiats i, per tant, no és característic d'un compost concret.

Finalment, s'obté per a cada confòrmer un vector que conté tots els descriptors calculats.

```

Name:                               Str17_2
Creating user name:                  iqs
Creation time:                       Thu Jun 12 12:02:41 2003
Compost n° 17_ confòrmer n° 2

Modifying user name:                iqs
Modification time:                  Thu Jun 12 12:02:41 2003

@<TRIPOS>MOLECULE
Str17_2
  16   16   0   0   0
SMALL
GAST_HUCK
@<TRIPOS>ATOM
  Matriu de coordenades
  1 C1      -0.9816  0.0008  -0.8792  C.2      1 SUB      0.2547
  2 O2      -0.7996  -0.0178  -2.0880  O.2      1 SUB      -0.3637
  3 O3      -2.2235   0.0191  -0.3817  O.3      1 SUB      -0.2952
  4 C4       0.2068   0.0004   0.0611  C.ar     1 SUB       0.0900
  5 C5       0.0578  -0.0000   1.4564  C.ar     1 SUB       0.1106
  6 O6      -1.2031   0.0000   2.0715  O.3      1 SUB      -0.3274
  7 C7       1.1928  -0.0005   2.2761  C.ar     1 SUB      -0.0267
  8 C8       2.4743  -0.0009   1.7204  C.ar     1 SUB      -0.0659
  9 C9       2.6248  -0.0008   0.3328  C.ar     1 SUB      -0.0668
 10 C10      1.4940  -0.0002  -0.4884  C.ar     1 SUB      -0.0490
 11 H11      3.6176  -0.0012  -0.1063  H        1 SUB       0.0537
 12 H12      3.3494  -0.0013   2.3625  H        1 SUB       0.0627
 13 H13      1.0741  -0.0006   3.3546  H        1 SUB       0.0556
 14 H14      1.6309   0.0001  -1.5643  H        1 SUB       0.0643
 15 H15     -1.9402   0.0000   1.4745  H        1 SUB       0.2510
 16 H16     -2.8977   0.0061  -1.0533  H        1 SUB       0.2520

@<TRIPOS>BOND
  Matriu de connectivitat
  1  1  2  2
  2  1  3  1
  3  1  4  1
  4  3 16  1
  5  4  5  ar
  6  4 10  ar
  7  5  6  1
  8  5  7  ar
  9  6 15  1
 10  7  8  ar
 11  7 13  1
 12  8  9  ar
 13  8 12  1
 14  9 10  ar
 15  9 11  1
 16 10 14  1

@<TRIPOS>SUBSTRUCTURE
  1 SUB 1

```

Figura 127. Exemple arxiu de sortida (2) del confòrmer 2 del compost Str17, en format mol2, del programa XConfort.

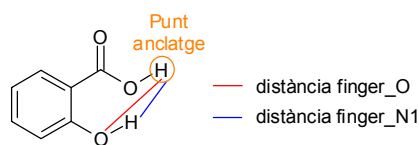
```

Str17_2:
finger_O
  0,000 0,006 0,056 0,278 0,732 1,056 1,004 1,004 1,056 0,732 0,278 0,056
  0,006 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000

finger_N1
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,006 0,056 0,278 0,726 1,000 0,726 0,278 0,056
  0,006 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000
  0,000 0,000 0,000 0,000

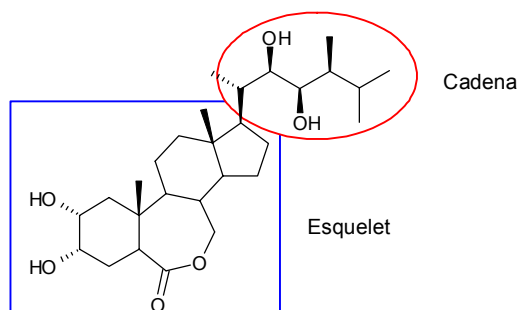
```

**Figura 128.** Exemple de descriptors finger\_O i finger\_N1 pel confòrmer explicat detalladament.



**Figura 129.** Distàncies relacionades amb els finger\_O i finger\_N1.

Aquesta metodologia es realitza també amb les cadenes laterals de brassinólida (1) i homobrasinólida (2). L'anàlisi conformacional del qual es parteix està realitzat per a tota la molècula: esquelet i cadena. Per tant, el primer que s'ha de realitzar és la separació de la cadena de l'esquelet (**Figura 130**). Com s'ha explicat anteriorment en l'apartat de metodologia (7.2), en aquest pas s'empra l'script *extract\_chain.pl*. Els següents passos es faran només amb les cadenes laterals (**Figura 118**).



**Figura 130.** Esquelet i cadena de la brassinólida (1).

Un cop obtingudes les cadenes laterals, es calculen els descriptors tal i com s'ha fet amb els àcids carboxílics comercials. S'obté per a cada confòrmer de cada cadena un vector (**Figura 131**). Finalment, es comparen els vectors descriptors calculats dels àcids carboxílics i de les cadenes laterals dels

brassinosteroides seguint el procediment explicat en l'apartat 7.2.

Vector = (DRY<sub>1,1</sub>, DRY<sub>1,2</sub>, ... , DRY<sub>1,100</sub>, O<sub>2,1</sub>, O<sub>2,2</sub>, ... , O<sub>2,100</sub>, N1<sub>3,1</sub>, N1<sub>3,2</sub>, ... , N1<sub>3,100</sub>, finger\_DRY<sub>4,1</sub>, finger\_DRY<sub>4,2</sub>, ... , finger\_DRY<sub>4,100</sub>, finger\_O<sub>5,1</sub>, finger\_O<sub>5,2</sub>, ... , finger\_O<sub>5,100</sub>, finger\_N1<sub>6,1</sub>, finger\_N1<sub>6,2</sub>, ... , finger\_N1<sub>6,100</sub>, shape<sub>7,1</sub>, shape<sub>7,2</sub>, ... , shape<sub>7,100</sub>)

**Figura 131.** Vector tipus que s'obté després del càlcul de descriptors.

En la **Taula 47** es mostren els màxims valors de l'índex de Carbó, calculats per a tots els confòrmers del compost d'aquest exemple (Str17\_2 de la base de dades d'Aldrich = Ald\_17\_2) respecte cada una de les conformacions de la brassinólida (1) i de la homobrasinólida (2).

Compost	Índex de Carbó	
	brassinólida (1)	homobrasinólida (2)
Ald_17_2	0.947	0.950

**Taula 47.** Índexs de Carbó calculats.

### 7.2.3. Validació de la metodologia

Donat que s'està treballant amb una nova metodologia, abans d'aplicar-la al *set* d'àcids carboxílics per comparar-los amb les cadenes laterals de la brassinólida (1) i l'homobrasinólida (2), es comprova que funciona per a tres bases de dades diferents. El primer *set* de molècules conté 32 anàlegs de l'àcid abscíic (ABA, 39) que foren sintetitzats i avaluats per Todoroki *et al.*<sup>260</sup> per estudiar el receptor d'aquests. El segon *set* inclou 31 antagonistes antiplaquetaris del receptor GPIIb/IIIa, emprats per a la prevenció de trombosis.<sup>261</sup> Finalment, l'últim *set* inclou 27 derivats de l'adenosina substituïts en N6 amb activitat antimalària.<sup>262,263</sup> Les dos primeres empen un àcid carboxílic per interaccionar amb el receptor (anàlegs de l'ABA i compostos antiplaquetaris) i en la tercera l'àcid carboxílic s'ancora a un grup amina per rendir amides actives (anàlegs amb activitat antimalària).

L'estratègia emprada per validar aquesta metodologia s'ha realitzat en dues etapes per als tres *sets*:

- Primer, s'han classificat les molècules de cada *set* en funció de la seva activitat experimental i s'han comparat amb la seva activitat predita (índex de similitud de Carbó). Aquest índex s'obté en comparar totes les molècules del *set* amb el cap de sèrie del conjunt. La bona relació entre elles validarà la metodologia i indicarà la bondat d'aquests descriptors per a predir l'activitat.
- Després, s'introdueixen tots els anàlegs del *set* en la base de dades d'àcids carboxílics comercials i s'ordenen segons el seu valor d'índex de similitud per a construir la corba d'enriquiment (representació del % de compostos ordenats segons aquest índex front el % de compostos actius), fet que permetrà l'elecció dels àcids carboxílics òptims per a desencadenar activitat.

Per altra banda, es calculen diversos paràmetres per avaluar la significança estadística del model desenvolupat:

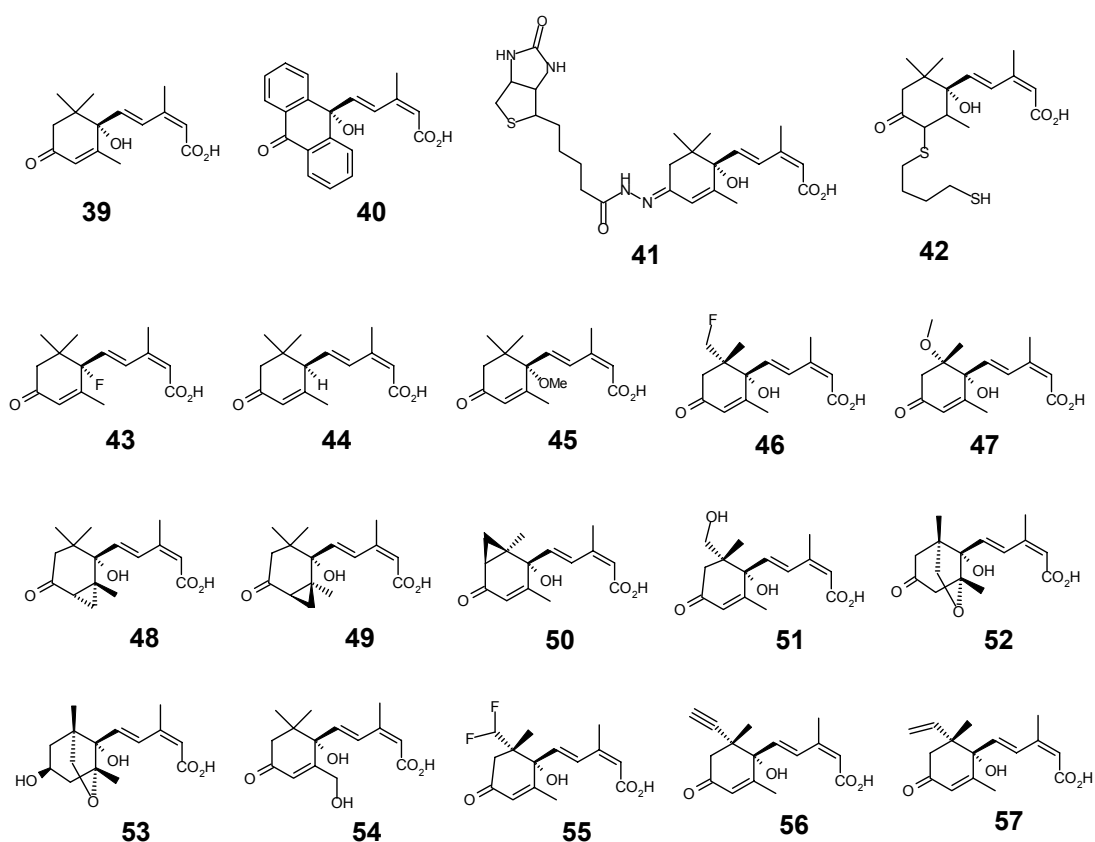
- Percentatge d'exactitud global: nombre total de compostos correctament assignats a cada classe dividit entre el nombre total de compostos del *set*. On els compostos correctament assignats a cada classe són aquells compostos amb elevada activitat experimental que també presenten un elevat índex de similitud, i aquells que presenten a la vegada una baixa activitat experimental i un baix

índex de similitud.

- Percentatge d'exactitud entre classes: per a cada classe es calcula el percentatge entre el nombre de compostos correctament assignats a la seva classe d'activitat experimental i el nombre total de compostos d'aquesta classe.
- Percentatge de precisió: per a cada classe es calcula el percentatge entre el nombre de compostos correctament assignats a la seva classe de l'índex de similitud de Carbó i el nombre total de compostos d'aquesta classe.

### A. Anàlegs de l'àcid abscísic (39)

L'àcid abscísic (39) és una hormona que promou reaccions adaptatives per protegir les plantes de l'estrès ambiental com ara la dessecació o les gelades. L'ABA (39) ha contribuït enormement en l'agricultura, tot i que la búsqueda d'anàlegs resulta interessant donada la seva curta vida a l'aplicar-lo així com la dificultat d'identificar un temps i una concentració òptims per aplicar-lo a plantes. Per validar la metodologia SHOP s'ha emprat 32 dels 51 anàlegs descrits en l'article de Todoroki *et al.*<sup>260</sup> En la **Figura 129** es mostren els anàlegs emprats, i en la **Taula 48** els seus valors d'activitat predita (índex de similitud de Carbó) i d'activitat experimental al comparar-los amb el cap de sèrie **56**. En aquesta taula els compostos s'ordenen segons el valor de l'índex de similitud. L'activitat dels anàlegs de la **Taula 48** indica el nombre de vegades que són mes actius que l'àcid abscísic (39).



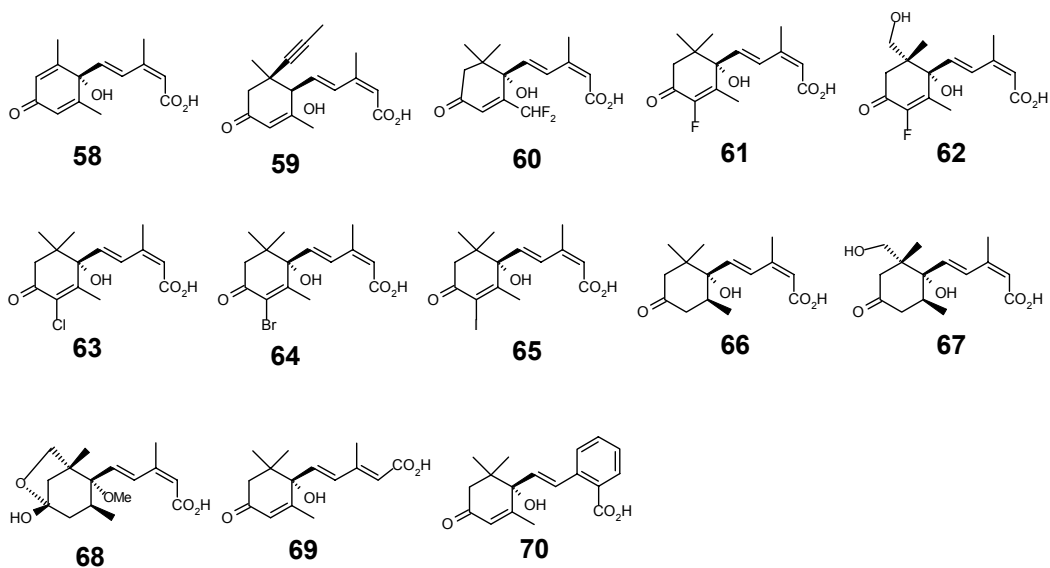


Figura 132. Anàlegs de l'ABA emprats en aquest estudi.

Anàlegs	Índex de Carbó (cap de sèrie 56)	Activitat	Anàlegs	Índex de Carbó (cap de sèrie 56)	Activitat
56	1.000	50	55	0.983	5
39	0.997	1	50	0.980	0
57	0.996	5	69	0.980	0
47	0.995	5	52	0.979	0.005
59	0.993	10	71	0.978	0
54	0.990	0.5	42	0.978	0.01
51	0.989	0.1	58	0.976	0.5
60	0.989	0.1	61	0.976	0.5
73	0.989	0.5	40	0.974	0.1
46	0.988	1	49	0.962	0.05
62	0.988	1	43	0.955	0.05
72	0.988	0.5	44	0.951	0.05
48	0.987	0	53	0.951	0
74	0.987	1	41	0.949	0.05
70	0.987	0.01	68	0.940	0
75	0.985	1	45	0.931	0.05

Taula 48. Activitat i índex de similitud dels anàlegs de l'àcid abscísic.

Aquests mateixos resultats es presenten en percentatges en la Taula 49, mitjançant l'anàlisi d'exactitud en relacionar l'activitat predita i l'experimental a través de l'índex de similitud directament, sense la necessitat d'ajustar cap tipus de model matemàtic.

Activitat experimental	Índex de Carbó		% Exactitud entre classes	% Precisió	%Exactitud global
	1 - 0.983	0.983 - 0			
50-0.5	13	2	87	76	81
0.5-0	4	13	76	87	

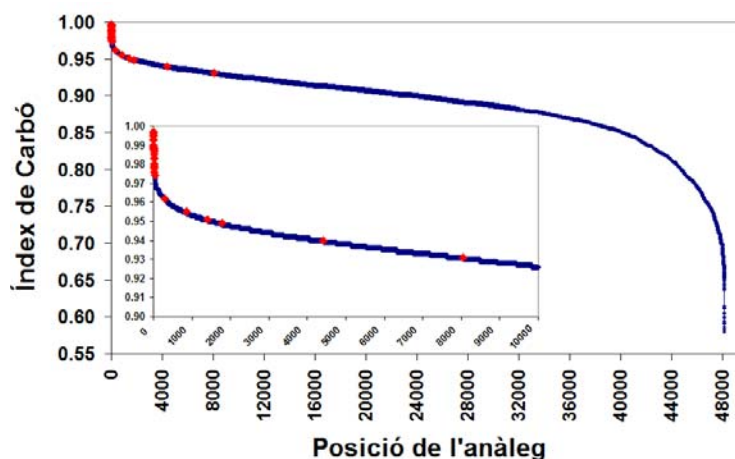
Taula 49. Anàlisi d'exactitud dels derivats de 46 en relacionar l'activitat predita i l'experimental.



L'exactitud global del model és del 81%. A més, el model és capaç de seleccionar compostos amb elevada activitat (superior a 0.5) amb una precisió del 76% i una exactitud del 87% i, a l'hora de descartar els que presenten baixa activitat (0.5-0), ho fa amb una precisió del 87% i una exactitud del 76%.

Per tant, en vista d'aquests resultats es considera que els descriptors emprats en aquesta nova metodologia (SHOP), són capaços de caracteritzar l'estructura de les molècules d'estudi amb una exactitud força bona (81%). Sembla que es tracti d'una bona metodologia per a poder seleccionar una sèrie de derivats de l'àcid abscísic (**39**) amb possibilitats de presentar elevada activitat. Per corroborar-ho, s'han introduït els derivats de **39** en la base de dades de 7488 àcids carboxílics comercials.

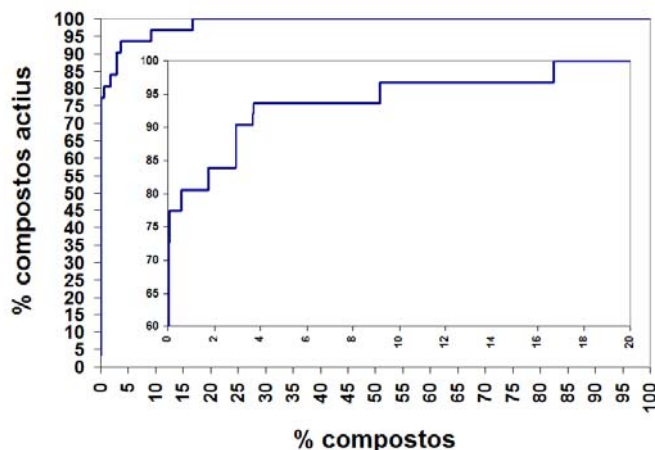
En la **Figura 133** es representa la corba d'enriquiment dels derivats de l'àcid abscísic (**39**). En roig es mostren els derivats de **39** i en blau tots els compostos de la base de dades d'àcids comercials.



**Figura 133.** Corba d'enriquiment dels derivats de l'àcid abscísic (**46**). En roig es mostren els derivats de **39**.

S'observa com la majoria dels derivats de **39** es troben en les primeres posicions del llistat d'anàlegs, fet que indica que la metodologia és adequada per a seleccionar els millors àcids carboxílics d'una base de dades comercial per a desencadenar l'activitat de l'àcid abscísic (**39**). Evidentment, els anàlegs amb baixos valors d'índexs de similitud (inferiors a 0.983) es troben lleugerament desplaçats de la part esquerra del gràfic de la **Figura 133**.

Aquestes observacions queden recolzades pel gràfic de la **Figura 134** on s'observa que el 93% d'anàlegs actius ja es troba present dins el primer 4% d'àcids carboxílics comercials, que serien els àcids interessants d'avaluar-ne l'activitat.



**Figura 134.** Representació dels compostos de la base de dades d'àcids comercials front els derivats actius de l'àcid absèsic (39).

### B. Antagonistes antiplaquetaris

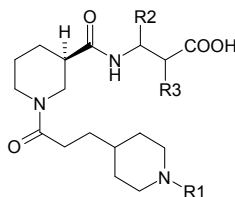
Els seriosos desordres cardiovasculars estan associats amb l'activació i la subseqüent agregació de plaquetes. Aquestes juguen un paper crucial en la coagulació de la sang. Problemes plaquetaris poden predisposar un individu a augmentar les possibilitats d'hemorràgies. Per altra banda, l'acumulació d'aquestes pot provocar la trombosis arterial.

L'etapa final de l'agregació de plaquetes involucra una proteïna que s'uneix a la glicoproteïna (GP) receptora del fibrinogen IIb/IIIa. Per tant, compostos que competeixin eficientment amb el fibrinogen en el seu receptor poden servir com potents agents antitrombòtics. Per aquesta raó, tot i haver-se ja desenvolupat antagonistes efectius quan s'administren via intravenosa, s'està treballant en el disseny i síntesi de compostos efectius oralment. En aquest sentit, William Hoekstra *et al.* ha desenvolupat una sèrie d'antagonistes de GPIIb/IIIa actius per via oral.<sup>261</sup>

Per tal de reforçar els resultats trobats anteriorment amb els anàlegs de l'ABA, s'han emprat 31 antagonistes antiplaquetaris per acabar de validar la metodologia en estudi (classificats atenent la seva estructura a la **Taula 50**, la **Taula 51** i la **Taula 52**).

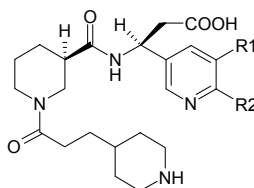
L'activitat biològica d'aquests antagonistes es va mesurar emprant dos procediments *in vitro* diferents: un assaig d'unió amb el receptor del fibrinogen GPIIb/IIIa en fase sòlida i un d'inhibició d'agregació plaquetària.<sup>264</sup> En ambdós processos es desitja, per a aquests antagonistes, una potent inhibició. Alta afinitat amb el receptor s'obté amb valors de  $IC_{50} = 0.50-0.10$  nM, mentre que resultats òptims contra l'agregació plaquetària dels humans s'obté amb  $IC_{50} = 20-90$  nM.

Els resultats que s'obtenen amb aquest set són també molt satisfactoris, tant si es centra en la seva capacitat d'unir-se al receptor GPIIb/IIIa (**Taula 53**) com si es centra l'atenció en l'activitat com a inhibidors de l'agregació plaquetària en humans (**Taula 54**). Així doncs, l'exactitud global per ambdós assaigs és del 80%.



Composts	R1	R2	R3	Índex Carbó (cap de sèrie: 78)	Afinitat per GPIIb/IIIa (nM)	Inhibició a l'agregació (nM)
76	H	H	H	0.979	4.8 ± 2.0	0.27 ± 0.08
77	H	(S)-3-piridil	H	0.998	0.36 ± 0.27	0.06 ± 0.01
78	H	(S)-3,4-metilendioxi-Ph	H	0.996	0.50 ± 0.20	0.02 ± 0.01
79	Me	(S)-3,4-metilendioxi-Ph	H	0.950	0.24 ± 0.14	0.84 ± 0.67
80	H	(R)-C≡C-Ph	H	0.983	0.29 ± 0.06	3.5 ± 0.5
81	H	(S)-C≡C-Ph	H	0.984	0.22 ± 0.13	0.08 ± 0.08
82	H	(R)-C≡C- <i>t</i> -Bu	H	0.980	5.6 ± 1.7	31 ± 18
83	H	(S)-C≡C- <i>t</i> -Bu	H	0.980	42 ± 10	0.08 ± 0.02
84	H	(R)-3-quinolinil	H	0.995	0.18 ± 0.05	0.02 ± 0.03
85	H	(S)-3-quinolinil	H	0.988	0.37 ± 0.11	1.2 ± 0.40
86	H	(S)-2-tienil	H	0.996	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.02
87	H	(S)-5-Cl-2-tienil	H	0.996	0.10 ± 0.03	0.04 ± 0.00
88	H	(R)-Me	H	0.963	13.5 ± 8.5	8.0
89	H	(R)-CH <sub>2</sub> Ph	H	0.984	0.37 ± 0.24	0.97 ± 0.33
90	H	(S)-3-Cl-5-CF <sub>3</sub> -2-piridil	H	0.993	66.8 ± 7.5	11.8 ± 2.7

Taula 50. Dades per diversos antagonistes de GPIIb/IIIa.

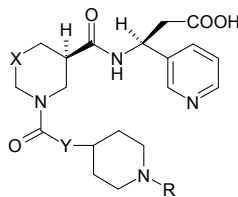


Compostos	R1	R2	Índex Carbó (cap de sèrie: 78)	Afinitat per GPIIb/IIIa (nM)	Inhibició a l'agregació (nM)
91	H	Me	1.000	0.13 ± 0.04	0.03 ± 0.01
92	Br	H	0.999	0.21 ± 0.07	0.02 ± 0.00
93	H	Cl	1.000	0.14 ± 0.01	0.02 ± 0.00
94	H	3-tienil	0.994	0.37 ± 0.07	0.20 ± 0.05
95	Cl	Cl	0.999	0.34 ± 0.11	0.22 ± 0.08
96	Cl	OMe	0.999	3.8 ± 2.9	0.090
97	Ph	H	0.993	0.52 ± 0.02	0.07 ± 0.01
98	PhC≡C	H	0.990	0.85 ± 0.05	0.04 ± 0.00
99	PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	0.990	0.66 ± 0.22	0.03 ± 0.00
100	HC≡C	H	0.999	0.24 ± 0.06	0.03 ± 0.00

Taula 51. Dades per antagonistes de GPIIb/IIIa substituïts en l'anell de piridil.

En la **Taula 53** s'observa que l'exactitud entre classes és del 75% i la precisió del 865% per a anàlegs amb elevada activitat (0-0.5 nM), en canvi, per a anàlegs amb baixa activitat (superior a 0.5 nM) és del 85% l'exactitud i del 73% la precisió.

Pel que fa referència a la capacitat d'inhibir l'agregació de plaquetes en humans, s'obté, al relacionar l'activitat experimental i l'índex de similitud, una precisió del 67% i una exactitud del 91% per a compostos amb elevada activitat (0-90 nM) i per a compostos amb baixa activitat (superior a 90 nM) un 72% d'exactitud entre classes i un 93% de precisió (**Taula 54**).



Compostos	X	Y	R	Índex Carbó (cap de sèrie: 78)	Afinitat per GPIIb/IIIa (nM)	Inhibició a l'agregació (nM)
101	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH=NH	0.985	0.75 ± 0.54	0.35 ± 0.05
102	CH <sub>2</sub>	(E)-CH=CH	H	0.992	0.81 ± 0.15	0.16 ± 0.04
103	NH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	0.988	1.7 ± 0.3	0.60 ± 0.24
104	CH <sub>2</sub>	(E)-CH=CH	H	0.989	0.58 ± 0.03	0.14 ± 0.07
105	CH <sub>2</sub>	4-piperidina	H	0.987	0.65 ± 0.55	0.45

Taula 52. Dades per diversos pirdil antagonistes GPIIb/IIIa.

Afinitat per GPIIb/IIIa	Índex de similitud		% Exactitud entre classes	% Precisió	%Exactitud global
	1 - 0.995	0.995 - 0			
0-0.5 nM	12	4	75	86	80
0.5-66.8 nM	2	11	85	73	

Taula 53. Anàlisi d'exactitud dels antagonistes antiplaquetaris en funció de la seva afinitat per GPIIb/IIIa.

Inhibició a l'agregació	Índex de similitud		% Exactitud entre classes	% Precisió	%Exactitud global
	1 - 0.995	0.995 - 0			
0-90 nM	10	1	91	67	80
90-31000 nM	5	13	72	93	

Taula 54. Anàlisi d'exactitud dels antagonistes en funció de la seva capacitat d'inhibir la formació d'agregats plaquetaris.

Aquests resultats indiquen, de la mateixa manera que succeïa amb els valors dels derivats de l'ABA (39), que la metodologia SHOP es capaç d'escollir compostos amb possibilitats de desencadenar elevada activitat i de descartar aquells en que les possibilitats són baixes o nul·les.

Si també s'introdueixen aquestes molècules en la base de dades dels àcids carboxílics comercials s'obtenen altre cop uns resultats molt bons. Fins i tot millors que els que es van obtenir amb els derivats de l'ABA (39). Tots els anàlegs antiplaquetaris (en roig) es troben a la part esquerra del gràfic de la **Figura 135**, on es representen tots els àcids de la base de dades comercials ordenats per ordre decreixent del seu valor d'índex de similitud de Carbó. Aquest fet indica la bondat d'aquesta metodologia.

Centrant l'atenció en qualsevol de les activitats avaluades per aquestes molècules, s'observa que amb menys del 0.25% dels àcids carboxílics comercials ordenats per l'índex de similitud ja apareix el 100% dels antagonistes antiplaquetaris actius (**Figura 136**).

Per tant, es pot concloure que la metodologia SHOP és idònia per a la selecció de molècules actives a partir d'una biblioteca virtual de compostos ja que l'exactitud global d'aquesta predicció és del 80-81%. De fet, la seva precisió es mou en un marge del 67-93% tant per a la selecció de compostos amb elevada activitat com per a descartar anàlegs inactius i, la seva exactitud entre classes en un marge del 71-93%.

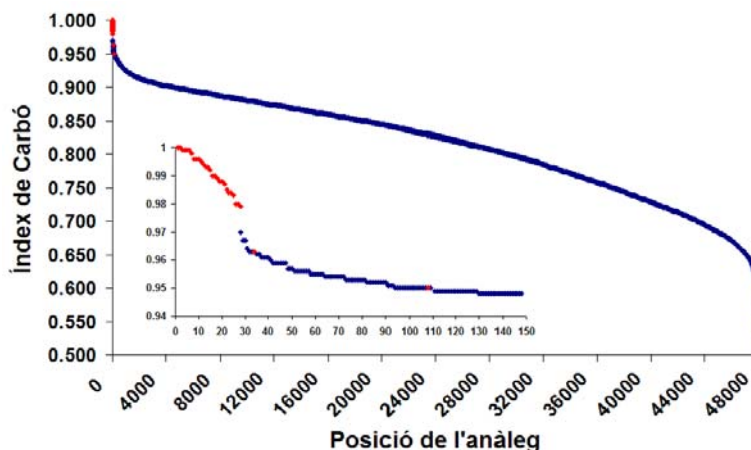


Figura 135. Corba d'enriquiment dels anàlegs antiplaquetaris.

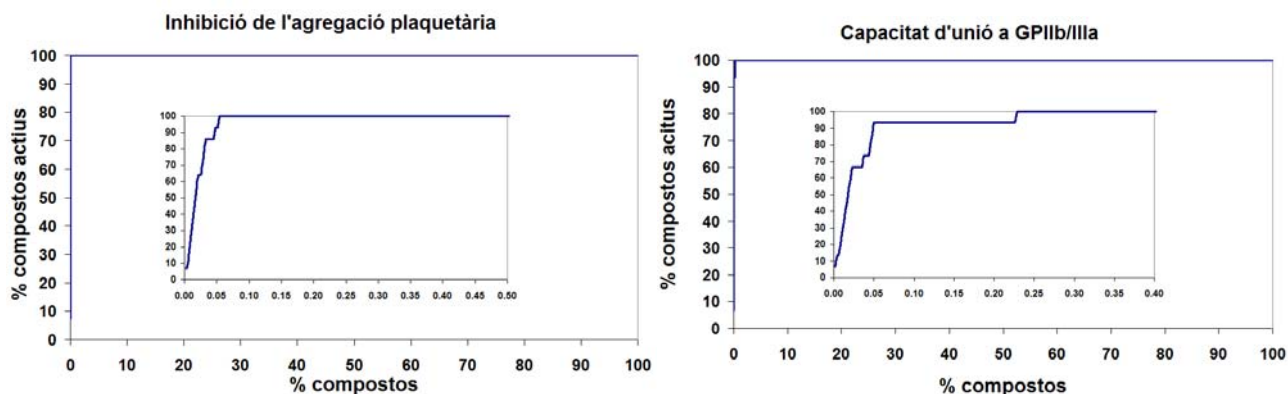


Figura 136. Representació dels compostos de la base de dades d'àcids comercials front els antagonistes antiplaquetaris actius, per a l'activitat inhibidora de l'agregació plaquetària (esquerra) i per a la seva capacitat d'unió al receptor (dreta).

### C. Derivats adenosínics

Un cop vist que aquesta metodologia funciona per a molècules on l'*anchor point* d'aquestes s'ancora directament al receptor, s'analitzen subestructures de molècules actives per validar la utilitat d'aquesta metodologia en la selecció de reactius (Figura 137). Per tant, calculant els descriptors SHOP dels 27 àcids (Figura 138) que formen els derivats adenosínics substituïts descrits per Andreas Link *et al.*<sup>262,263</sup> es podran escollir els reactius òptims per a sintetitzar-los.

L'any 2000, 3.5 bilions de persones sofriren alguna infecció provocada per paràsits, sent la malària la principal causa de mortalitat.<sup>265</sup> Aproximadament 300 milions de persones de tot el món es veuen afectats per la malària, es donen més de 120 milions de casos per any i entre 1-1.5 milions moren per la seva causa cada any. Els problemes de controlar la malària i de curar-ne la gent es veuen agreujats per l'augment de la resistència a fàrmacs que s'empraven per combatre el paràsit que provoca aquesta malaltia. Conseqüentment, la necessitat de nous fàrmacs per lluitar contra el multiresistent *Plasmodium falciparum* són inqüestionables. En aquest sentit, Andreas Link *et al.* van preparar unes noves subunitats adenosíniques per ajudar a desenvolupar fàrmacs per tractar la malària.<sup>262,263,266</sup> L'activitat d'aquests compostos és una mesura *in vitro* de la inhibició en el creixement de *P. falciparum*, soca Dd2.<sup>267-269</sup>

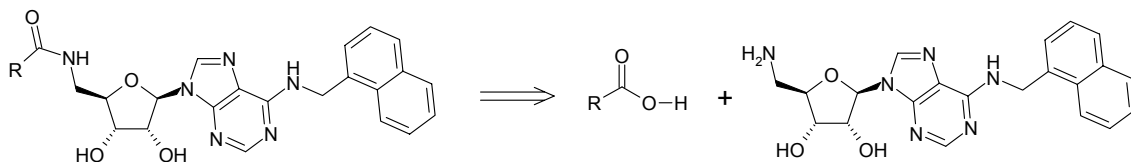


Figura 137. Esquema retrosintètic general dels derivats adenosítics.

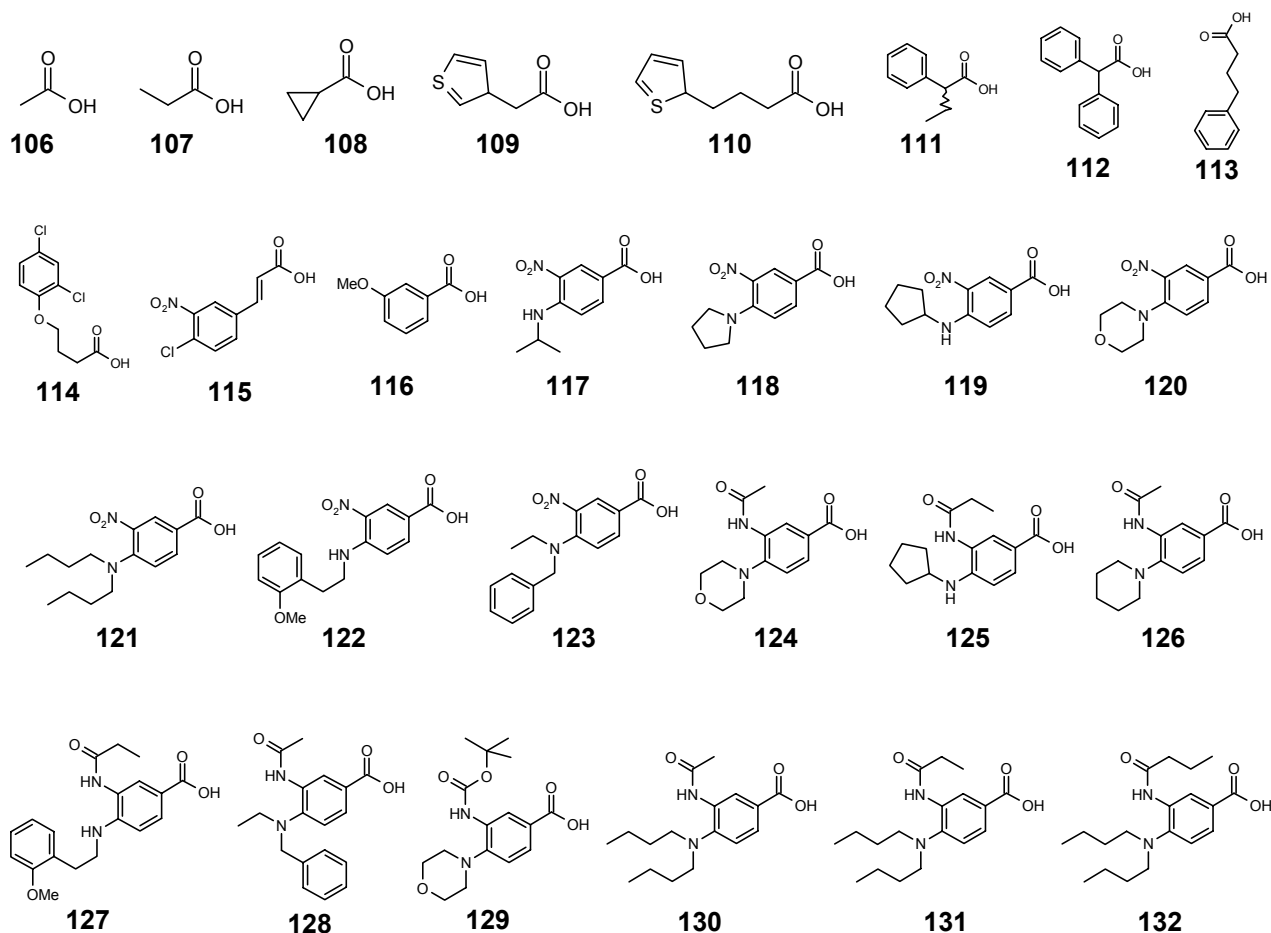


Figura 138. Subunitats d'àcids dels derivats adenosítics substituïts (R).

Compostos	Índex Carbó (cap de sèrie 106)	Activitat
106	1.000	23
107	0.989	15
108	0.974	11
109	0.918	11
110	0.897	7
111	0.869	6.2
113	0.868	4.1
116	0.845	11
112	0.810	6.2
114	0.800	10
117	0.754	4.1
115	0.751	5.3
118	0.748	15
121	0.705	4.2

Compostos	Índex Carbó (cap de sèrie 106)	Activitat
120	0.703	4.8
123	0.687	nd
119	0.675	4.8
126	0.672	4.2
130	0.656	3.7
125	0.651	nd
131	0.648	nd
124	0.645	5
129	0.643	3.1
132	0.643	3.2
128	0.634	3.3
127	0.62	2.7
122	0.616	1.3

Taula 55. Activitat i índex de similitud dels derivats adenosítics. (nd: no detectat)

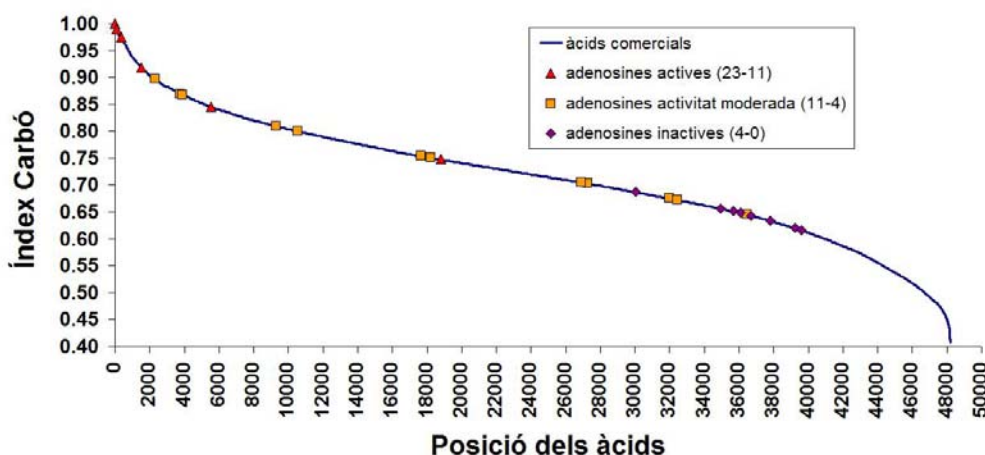
Atenent a la **Taula 55**, es pot concloure que, inclús emprant diferents subunitats per ancorar en una mateixa estructura, la metodologia computacional que s'està avaluant és útil per predir compostos amb altes probabilitats d'expressar activitat. Això es fa palès en observa la bona relació entre l'activitat i l'índex de Carbó en aquest set d'anàlegs. L'única excepció és el compost **118** que presenta una activitat de 15 i es troba en el centre de la **Taula 55**. Tot i així, els compostos més actius (**106-109**) són els compostos amb major índex de Carbó així com els de menor activitat (inferior a 5) són els 13 darrers compostos de la **Taula 55**.

Aquestes observacions queden reforçades pels elevats percentatges obtinguts en l'anàlisi d'exactitud d'aquestes molècules (**Taula 56**). L'exactitud global per a aquest set és del 85%, inclús superior a la que s'havia obtingut per a molècules actives (derivats de l'ABA (**39**) i antagonistes antiplaquetaris). Aquest cop, enlloc de dividir l'activitat en dos marges, es divideix en tres (elevada activitat (23-11), baixa activitat (11-4) i inactius (4-0)). L'exactitud entre classes és del 67% per als compostos amb alta activitat, del 92% pels d'activitat intermèdia i del 89% per als inactius i, la precisió és del 100%, 79% i 89% respectivament. Per tant, els valors que s'obtenen són equivalents als obtinguts amb molècules que usen l'àcid carboxílic de la seva estructura per unir-se al receptor.

Activitat experimental	Índex de similitud			% Exactitud entre classes	% Precisió	%Exactitud global
	1 - 0.90	0.90 – 0.67	0.67 - 0			
23-11	4	2	0	67	100	85
11-4	0	11	1	92	79	
4-0	0	1	8	89	89	

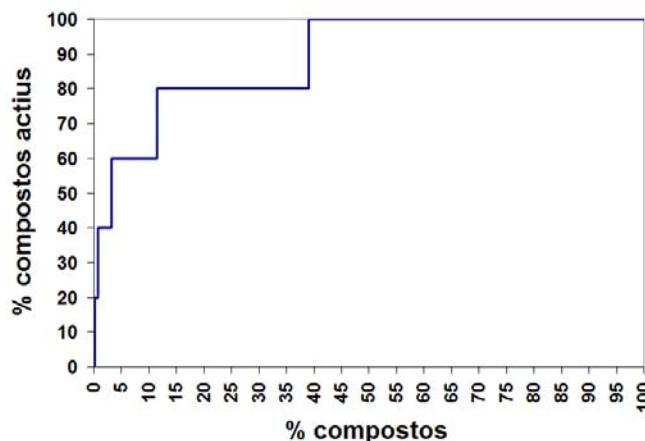
**Taula 56.** Anàlisi d'exactitud dels derivats antimalàrics.

Altre cop s'inclouen les molècules en estudi (adenosines) en la base de dades d'àcids carboxílics comercials. En la **Figura 139** es presenta la corba d'enriquiment dels anàlegs antimalàrics. Aquest cop, els resultats no són tant espectaculars com era el cas dels anteriors compostos però, les adenosines actives es troben representades en un 80% en el primer 10% dels àcids carboxílics (**Figura 140**), fet que indica que la metodologia SHOP, inclús treballant amb subunitats de molècules actives, és capaç de seleccionar un conjunt de molècules amb elevades possibilitats d'expressar activitat.



**Figura 139.** Corba d'enriquiment dels anàlegs antimalàrics (indicats en roig).

En vista d'aquests resultats, es pot concloure que la metodologia SHOP és una bona metodologia per predir compostos amb alta possibilitat de desencadenar activitat, tant per a compostos que empenen l'*anchor point* com un punt d'unió amb el receptor o com un grup funcional per a reaccionar amb un grup d'una altra molècula. En conseqüència, aquesta pot emprar-se per conèixer les millors cadenes per ancorar a esquelets eremofilànics o androstànics i així escollir mimètics amb possibilitats de presentar elevada activitat brassinoesteroide.



**Figura 140.** Representació dels compostos de la base de dades d'àcids comercials front els derivats adenosínics actius.

### 7.3. Discussió de resultats

Tal i com s'ha comentat, la base de dades d'àcids carboxílics amb la que es treballa conté 6 proveïdors diferents. En la **Taula 57** es mostra el nom dels proveïdors, així com el nombre de compostos i de confòrmers generats per a cada un.

Proveïdor	Nº Compostos	Nº Confòrmers generats
Asinex	1795	15020
IBS	71	435
Maybridge	1807	12531
Specs	491	2965
Key Organics	336	2577
Aldrich	2988	15057
<b>TOTAL</b>	<b>7488</b>	<b>48585</b>

**Taula 57.** Proveïdors, nombre de compostos i de confòrmers estudiats.

Dels 7488 compostos estudiats no tots són diferents ja que, com provenen de diferents cases comercials, poden estar alguns d'ells repetits. L'esforç, en quan a temps de càlcul, que representa eliminar abans de començar l'estudi els compostos repetits, és molt superior a eliminar-los al final del càlcul, si algun d'ells surt per duplicat.

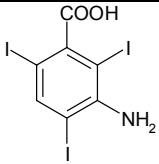
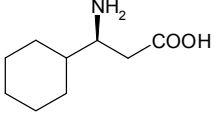
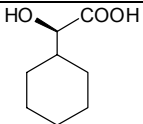
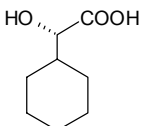
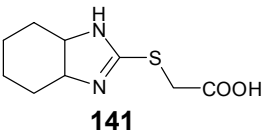
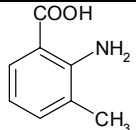
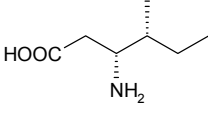
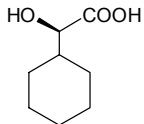
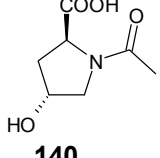
Un cop es tenen calculats els índexs de similitud dels 48585 confòrmers es procedeix a discutir els resultats obtinguts, per tal d'avaluar quina és la cadena lateral amb possibilitat de desencadenar activitat brassinoesteroide un cop unida amb l'esquelet d'androstà o d'eremofilà.

S'ordenen els confòrmers de major a menor índex de similitud obtenint-se un índex de Carbó màxim per a la



brassinolida (**1**) de 0.988, i per la homobrassinolida (**2**) de 0.985. S'aplica arbitràriament un *cut-off* de 0.981 en el valor d'índex de Carbó. El nombre de compostos obtinguts aplicant aquest *cut-off* varia segons si s'ha calculat amb la cadena lateral de la brassinolida (**1**), 20 compostos, o amb la cadena de la homobrassinolida (**2**), 12 compostos.

Per tal d'escollir l'àcid que s'ancorarà en l'esquelet androstànic o eremofilànic, s'analitzen els resultats obtinguts i es comprova si hi ha algun àcid que presenti un índex superior a 0.981 per a les dues cadenes laterals (brassinolida (**1**) i homobrassinolida (**2**)). En la **Figura 142** es mostren els 9 àcids obtinguts.

Àcid	Índex amb 1	Índex amb 2
 <p><b>133</b></p>	0.985	0.983
 <p><b>135</b></p>	0.986	0.985
 <p><b>137</b></p>	0.985	0.981
 <p><b>139</b></p>	0.985	0.981
 <p><b>141</b></p>	0.985	0.985
 <p><b>134</b></p>	0.983	0.984
 <p><b>136</b></p>	0.986	0.985
 <p><b>138</b></p>	0.985	0.981
 <p><b>140</b></p>	0.988	0.984

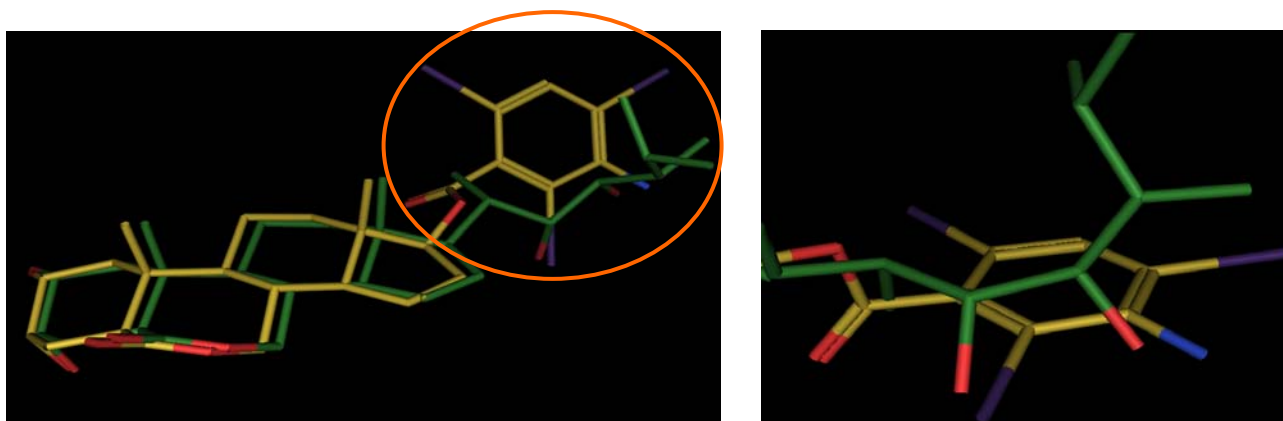
**Figura 141.** Àcids seleccionats (**133-141**) per tenir un índex de similitud superior a 0.981 tant quan es compara amb **1** com amb **2**.

Finalment, aquestes cadenes laterals s'ancoraran a l'esquelet androstànic ja que, a diferència d'un esquelet eremofilànic, se'n disposa al laboratori en quantitats suficients. Per tant, queda decidir l'ordre de prioritats d'aquests àcids per a sintetitzar l'anàleg androstànic corresponent. Els compostos **133-136** tenen el grup funcional amina primària i, **137-140**, tenen un hidroxil en la seva estructura. El compost **141** presenta un sofre i una amina secundària.

El compost **138** s'exclou ja que és el mateix que el **137**, encara que, en un primer moment, es consideren separats perquè provenen de diferents bases de dades.

Per tal d'establir un ordre de prioritat dels vuit àcids per a ancorar en l'esquelet i sintetitzar-lo, es decideix fer un alineament flexible de cada compost (**133-137**, **139-141**), unit amb l'esquelet d'androstà **34**, fixant com a conformer actiu de la brassinolida (**1**) el trobat seguint el mètode d'anàlisi de mapes de GRID no flexibles (indicat en color groc a la **Figura 57**). Els alineaments realitzats, així com l'ampliació de la zona seleccionada (en taronja) per tal de veure millor el solapament de la cadena, es mostren a les **Figura 142- Figura 158**.

En un principi, els dos estereoisòmers **137** i **139** no es poden diferenciar mitjançant la metodologia emprada (descriptors GRIND), ja que, al treballar amb valors de distàncies, no es distingeixen. Tot i així, es pot observar en la **Figura 146** i la **Figura 147** que els compostos **137** i **139** presenten ambdós, un bon solapament tant dels esquelets com de la part hidrofílica de la cadena: els dos hidroxils de **1** se solapen perfectament bé amb el carbonil i l'hidroxil de l'àcid respectivament. Pel que fa a la part hidrofòbica de la cadena, el compost **137** queda millor solapat que el **139**.



**Figura 142.** Alineament del compost **133** (groc) i la brassinolida (**1**), en verd.



**Figura 143.** Alineament del compost **134** (groc) i la brassinolida (**1**), en verd.

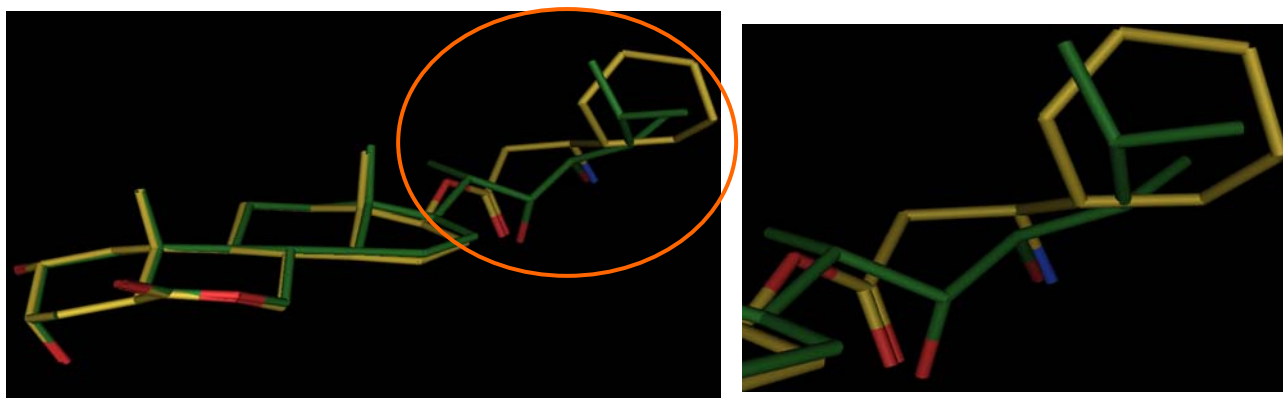


Figura 144. Alineament del compost 135 (groc) i la brassinolida (1), en verd.

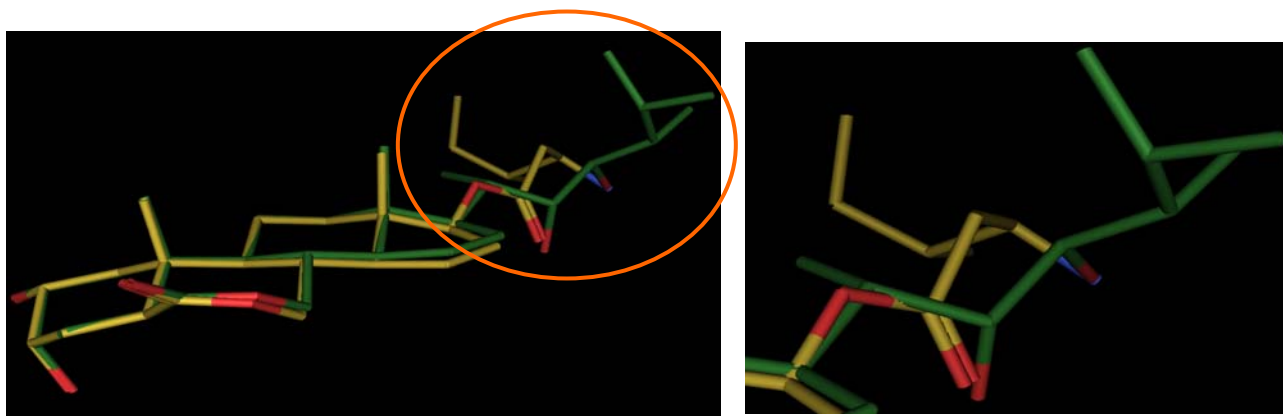


Figura 145. Alineament del compost 136 (groc) i la brassinolida (1), en verd.

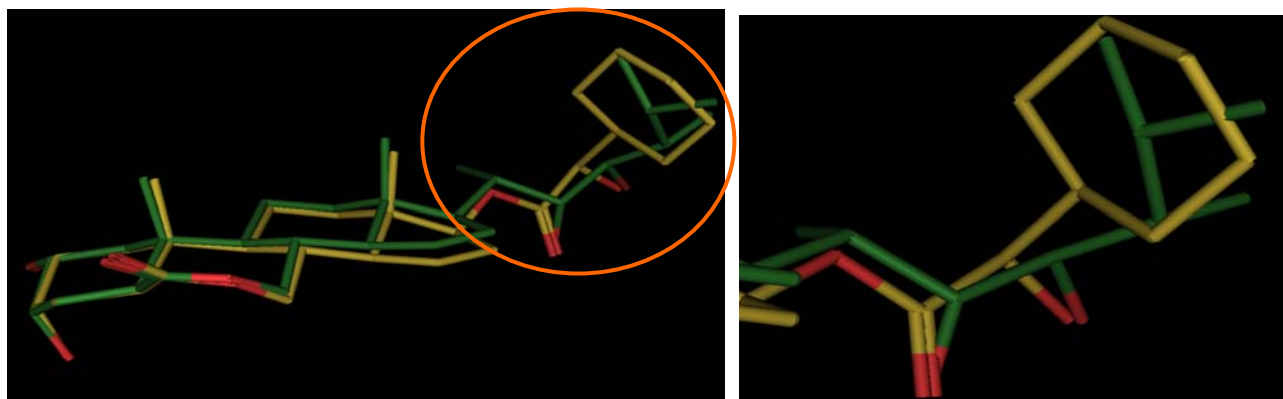


Figura 146. Alineament del compost 137 (groc) i la brassinolida (1), en verd.

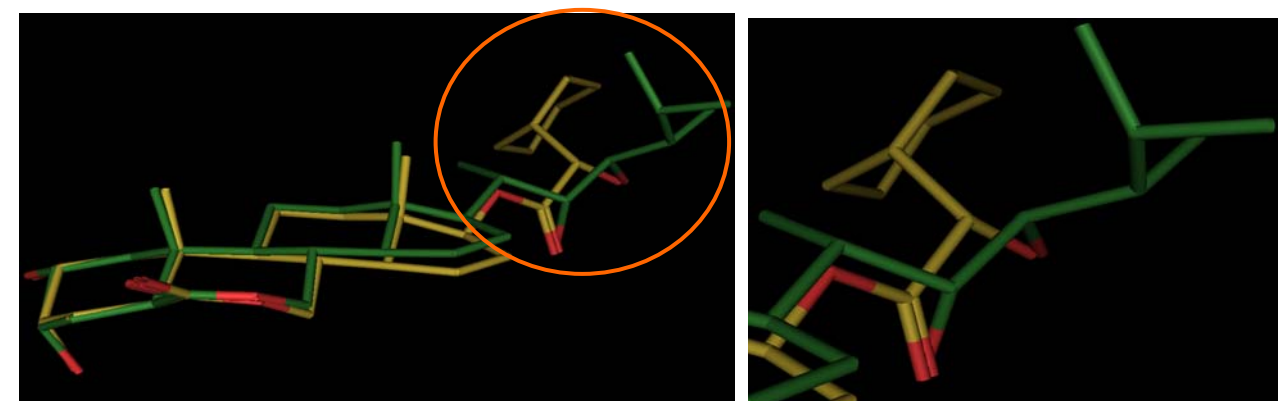


Figura 147. Alineament del compost 139 (groc) i la brassinolida (1), en verd.

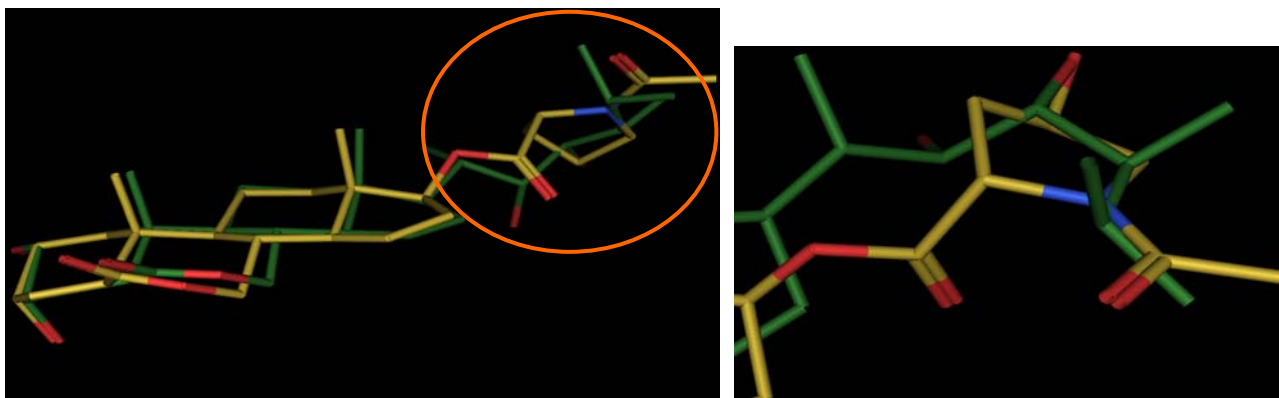


Figura 148. Alineament del compost **140** (groc) i la brassinolida (**1**), en verd.

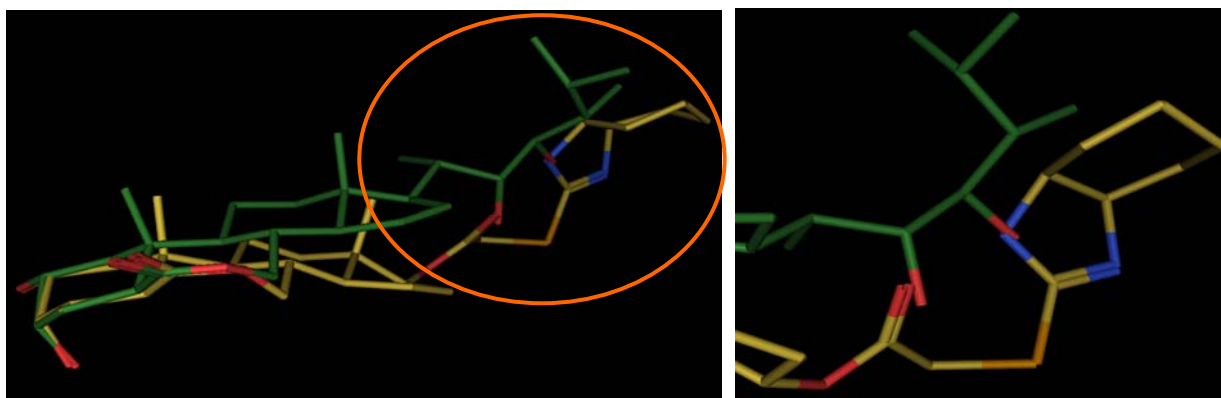


Figura 149. Alineament del compost **141** (groc) i la brassinolida (**1**), en verd.

Tots els anàlegs presenten un bon alineament en la zona de l'esquelet de la brassinolida (**1**) i en la zona del diol de la cadena lateral. Les úniques excepcions són els mimètics **140** i **141**, que, tot i presentar un bon alineament en la zona dels anells, no el presenten en la regió polar de la cadena lateral. Per tant, aquest dos mimètics, en principi, es poden descartar com a candidats ja que la resta presenten un solapament millor. De totes maneres, s'alinea millor **140** que **141** amb la brassinolida (**1**).

Si ara es centra l'atenció en **133-139**, únicament presenten un bon alineament en la part hidrofòbica de la cadena lateral els anàlegs **135** i **137**. Per tant, els anàlegs amb un millor solapament amb la brassinolida (**1**) són **135** i **137**.

Aquests dos mimètics (**135** i **137**) s'han sintetitzat en el laboratori d'Esteroides. Actualment s'està avaluant l'activitat en el test d'inclinació de la làmina d'arròs del primer i del segon ja s'ha avaluat la seva activitat. A més, també s'ha avaluat l'activitat de **139** ja que és l'estereoisòmer de **137** i d'aquesta manera es pot observar la importància del centre quiral que suporta l'hidroxil de l'àcid carboxílic que mimetitzava l'hidroxil 23*R*-OH de la brassinolida (**1**) (veure apartat 7.4 de la pàgina 175).

També cal afegir que, com es va predir en un començament, aquest estudi convergeix amb l'estudi exhaustiu d'anàlegs del KM-01 (**9**), doncs, en tots dos casos s'obté que les cadenes laterals més interessants són els  $\beta$ -hidroxiàcids. A més a més, en aquest estudi s'obtenen també, com a cadenes laterals capaces de mimetitzar la cadena lateral de la brassinolida (**1**) o l'homobrasinolida (**2**),  $\alpha$ -hidroxiàcids i  $\beta$  o  $\gamma$ -aminoàcids i, fins i tot, cadenes com les **140** i **141**, difícils d'imaginar a priori. Amb aquests resultats s'evidencia que aquest estudi explora un gran ventall de possibles àcids carboxílics capaços de mimetitzar

la cadena lateral de **1** o de **2**. Aquest estudi no està determinat ni influenciat per idees preconcebudes, raó per la qual s'obtenen cadenes com les **140** i **141**.

#### 7.4. Activitat dels mimètics androstrònics i conclusions

Els valors d'activitat dels mimètics androstrònics **137** i **139** avaluats en el test d'inclinació de la làmina d'arròs en el laboratori d'Esteroides es presenten en la **Taula 58**.

Mimètic androstrònic	1 µg/planta	0.5 µg/planta	-log(dosi(45°))
<b>137</b>	84°	78°	1.80
<b>139</b>	0	-	-

**Taula 58.** Valors d'activitat dels mimètics androstrònics **137** i **139**.

La bona activitat de **137** permet concloure que la metodologia SHOP és una bona tècnica per a l'elecció de molècules o fragments d'aquestes amb possibilitats de desencadenar activitat. En aquest cas, ha permès seleccionar unes cadenes que han conduït a la síntesi de mimètics androstrònics actius. En conseqüència, també es pot afirmar que els descriptors SHOP permeten caracteritzar les molècules adequadament per a seleccionar-les o descartar-les com a possibles candidates a desencadenar activitat.

Tot i així, també es poden observar les deficiències d'aquesta metodologia. L'androstrò **139** ha presentat una activitat nul·la a pesar de que la metodologia SHOP va seleccionar la seva cadena com una de les que tenien més possibilitats de desencadenar activitat brassinoesteroide un cop ancorada a l'esquelet. Com ja s'ha comentat, això és una conseqüència del fet que aquesta tècnica no pugui distingir entre isòmers quan es treballa amb molècules que únicament presenten un punt d'ancoratge. També cal esmentar que l'alineament amb el programa MOE va permetre solventar, prèviament a la seva síntesi, la limitació de la metodologia SHOP en aplicar-la sobre les cadenes laterals.

Per tant, es pot concloure que la metodologia SHOP combinada amb l'alineament amb el programa MOE permet seleccionar molècules com a candidates actives de manera ràpida i eficient, tal i com s'ha comprovat amb els anàlegs de l'àcid abscísic, els derivats adenosínics amb activitat antimalària, els inhibidors antiplaquetaris i els mimètics androstrònics.

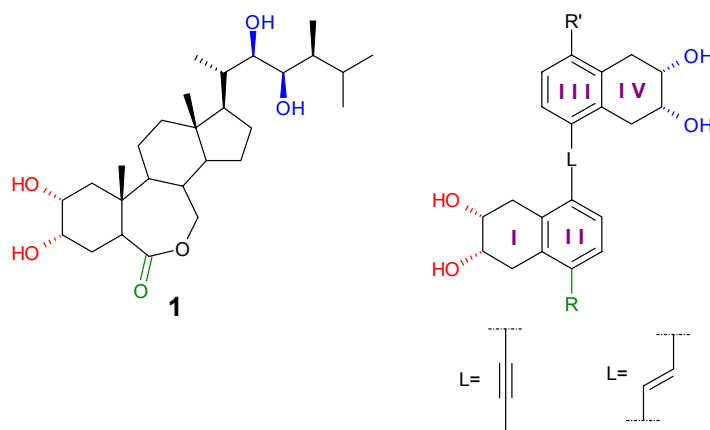
## 8. Estudi teòric sobre els anàlegs no esteroidals de Thomas Back

### 8.1. Introducció

De la mateixa manera que el nostre equip, Back *et al.*<sup>139</sup> també van trobar interessant començar a estudiar anàlegs més fàcils d'obtenir que els brassinoesteroides i que tinguessin la capacitat de mimetitzar la seva activitat biològica natural ja que la síntesi de **1** és molt llarga i costosa, i a més s'obté en baix rendiment.

Estudis d'estructura-activitat dels brassinoesteroides han demostrat que els diols veïnals i la configuració dels centres estereogènics que aquests compostos tenen són importants per mantenir l'elevada bioactivitat.<sup>48,270,271</sup> Tenint en compte aquesta informació, Back *et al.*<sup>139</sup> van dissenyar els primers anàlegs no-esteroidals que consisteixen en dues subunitats rígides, que contenen cada una d'elles un diol veinal, unides per un connector L (**Figura 150**). L'objectiu d'aquests anàlegs és assemblar-se estructuralment a la brassinolida (**1**). Per tant, els van dissenyar a partir de la conformació de mínima energia global de la brassinolida (**1**) (trobada amb els mètodes MM2, Monte Carlo i *ab initio*).

En la **Figura 150** també es mostra la numeració que s'emprarà en aquest treball per a nombrar els anells dels anàlegs no-esteroidals.



**Figura 150.** Estructura de la brassinolida (**1**) i dels anàlegs remarcant els diols veïnals (en roig i blau) i la funcionalitat corresponent a la lactona de **1** (en verd). La numeració dels anells es presenta en lila.

Aquests compostos (**Figura 151**) no tenen activitat per si sols, però, quan es coapliquen amb l'auxina àcid indol-3-acètic (IAA), alguns d'ells (**143** i **150**), mostren efecte sinèrgic en el bioassaig de la làmina d'arròs.<sup>139,224</sup> Aquests resultats es van obtenir en coaplicar-los amb 1000 ng de IAA en una solució 8:89.5:2.5 (v/v/v) de DMSO, aigua i Atlas G-1086 (hexaoleat de sorbitol). Els BRs que sí són actius per si sols, també mostren aquest efecte sinèrgic quan es coapliquen amb la mateixa auxina IAA.<sup>272-274</sup>

Els resultats exposats per Back *et al.* indiquen que és possible preparar anàlegs no-esteroidals biològicament actius (**143** i **150**) que estiguin constituïts per un esquelet relativament rígid, excepte per possibles rotacions dels connectors, i que tinguin els grups funcionals claus en l'orientació espacial anàloga a l'estructura i geometria de la brassinolida (**1**). De tota manera, l'explicació del perquè els altres compostos no són actius és en alguns casos contradictòria. A més a més, Back *et al.* no van discernir el perquè alguns dels anàlegs no presentaven activitat (**142**, **145**, **149** i **151**) i d'altres sí (**143** i **150**), fet que també ens va portar a estudiar aquests compostos.

Així, la manca d'activitat dels compostos **144** i **146** pot explicar-se per no presentar una funcionalitat polar que correspongui a la lactona de l'anell B de **1**. Els anàlegs **147** i **148**, que tenen com a connector un etil (-

CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), tot i tenir funcionalitat polar que es correspon amb la lactona de **1**, tampoc presenten activitat. Això podria ser degut a l'elevada mobilitat conformacional que té aquest grup, cosa que dificultaria la unió amb el teòric receptor de la brassinolida (**1**). En el cas del mimètic **142** el resultat és contradictori, doncs, es podria esperar una possible activitat ja que conté un grup hidroxil que mimetitzava la lactona de l'anell B de **1** i a més, té com a connector un grup acetilè que no pot rotar lliurement impedit així una gran mobilitat conformacional. El mateix raonament es pot seguir amb l'anàleg **145**, que conté les mateixes subunitats que el **142** però té com a connector un *trans*-etilè el qual també disminueix la mobilitat conformacional. Els compostos **149** i **151** també semblen presentar un resultat contradictori, contenen com a connector un acetilè i una azina respectivament, i tampoc presenten activitat.

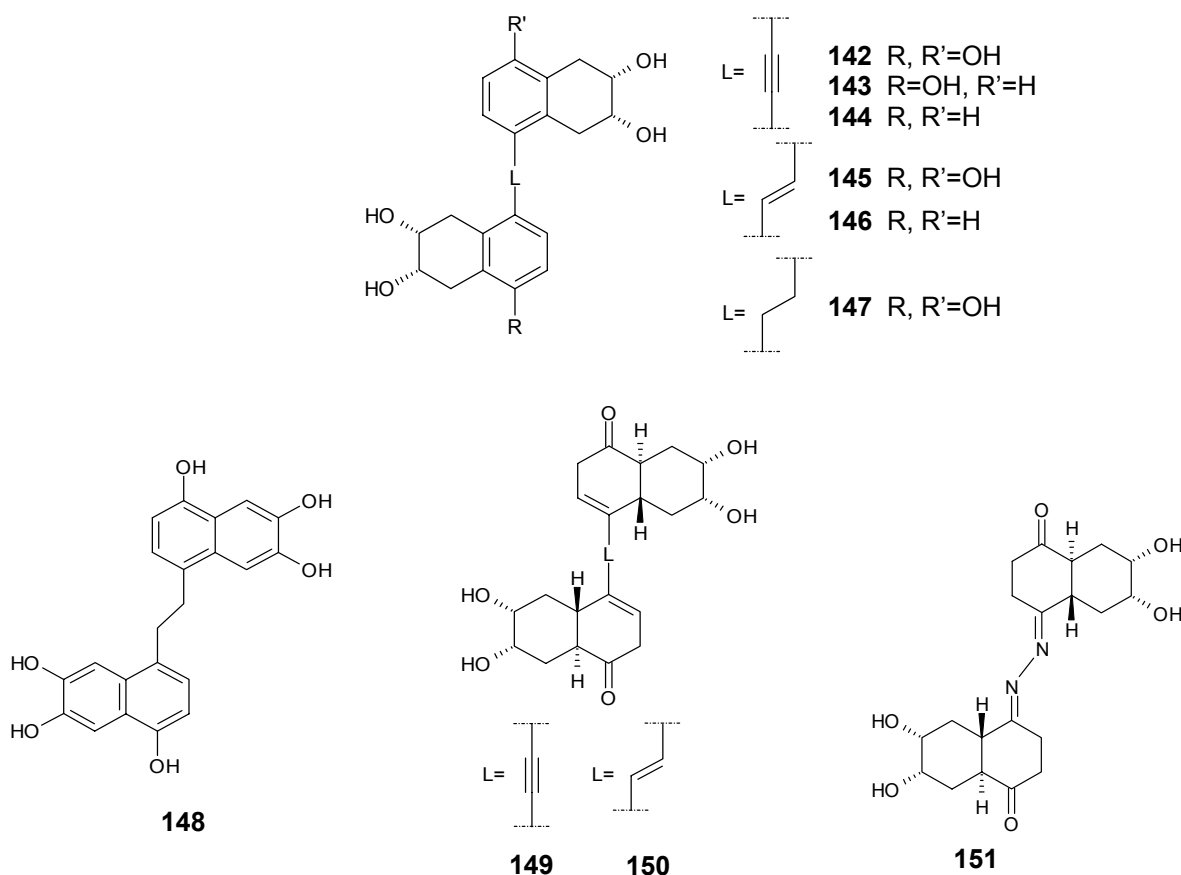


Figura 151. Estructura dels anàlegs 142-151.

Per tant, es realitzarà un estudi dels anàlegs proposats per Thomas Back amb l'objectiu d'extreure més informació sobre la interacció existent entre els substrats i el receptor dels brassinoesteroides. Aquest objectiu global es concretarà en els següents punts:

- Confirmació que els diols veïnals i la configuració dels centres estereogènics són importants per mantenir la bioactivitat.
- Veure per què aquests compostos no-esteroidals no són actius per si sols.
- Estudi del per què els anàlegs **143** i **150** són actius quan es coapliquen amb àcid indol-3-acètic (IAA) i els altres no ho són.

L'estudi computacional dels anàlegs no es realitzarà amb totes les estructures proposades (**Figura 151**) sinó seleccionant **142**, **143**, **145** i **149-151**, perquè tenen una funcionalitat polar corresponent a la lactona de l'anell B de la brassinolida (**1**) i com a connector no tenen el grup etil que augmentaria la mobilitat conformacional del compost, fet que faria més complicada la unió amb el receptor. Els anàlegs que no s'estudien no compleixen les propietats estructurals anteriors, **Taula 59**.

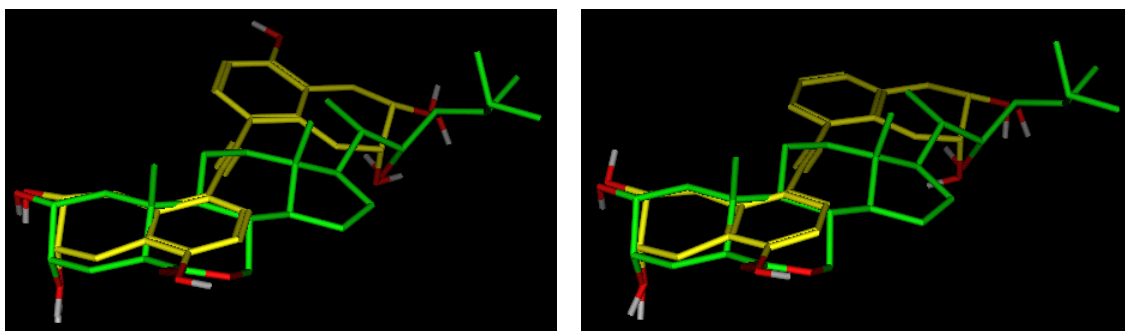
Anàlegs descartats	Motiu
<b>144</b>	R=H
<b>146</b>	R=H
<b>147</b>	Connector -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
<b>148</b>	Connector -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -

**Taula 59.** Motiu pel qual es descarten els anàlegs no estudiats.

## 8.2. Solapament amb la brassinolida (**1**)

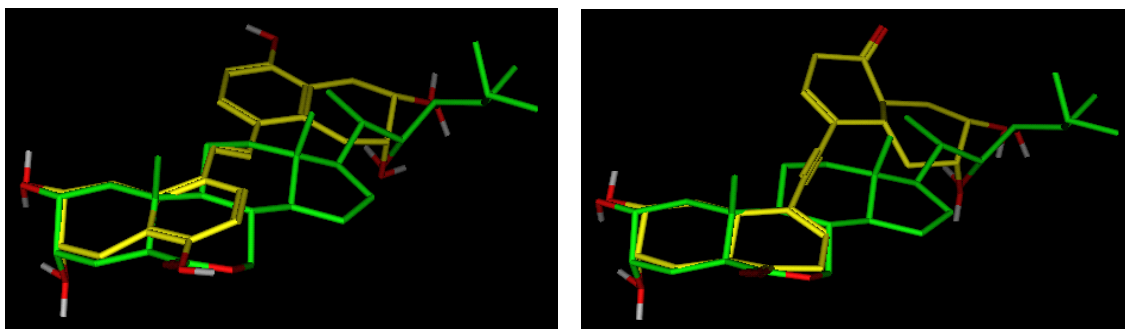
En aquest treball, seguint un mètode indirecte donat que no es coneix l'estructura del receptor, es realitza l'alineament flexible, amb el programa MOE, de cadascuna de les molècules d'estudi (**142**, **143**, **145**, **149-151**) fixant com a confòrmer actiu de la brassinolida (**1**) el primer confòrmer trobat seguint el mètode d'anàlisi de mapes de GRID flexible (bl\_pfs).<sup>131</sup> Els resultats obtinguts s'ordenen de menor a major *score* (S), perquè, tal i com s'ha comentat en l'apartat 2.2.1, els valors més baixos de *score* (S) són els que presenten millor solapament. Per tant, s'escull el confòrmer de mínim *score* de cada base de dades. En la **Figura 152** es mostren els alineaments realitzats. Com s'observa en aquesta figura, els hidroxils de l'anell I dels anàlegs (nomenclatura en la **Figura 151**) se solapen molt bé amb els hidroxils 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$  de l'anell A de la brassinolida (**1**), així com el grup polar de l'anell II amb la 7-oxolactona de l'anell B de **1**. També hi ha un bon alineament del diol veïnal de l'anell IV amb el diol 22*R*,23*R* de la cadena lateral de **1**. En canvi, no es presenta cap solapament dels anàlegs estudiats amb els anells C i D de la brassinolida (**1**), així com tampoc amb la cadena lateral d'aquesta, és a dir, no hi ha alineament amb la part hidrofòbica de **1**.

Tot i el bon alineament en les zones polars, la manca de superposició en la part hidrofòbica podria ser un dels motius pel qual aquests anàlegs no tinguessin activitat per si sols. Inclús, l'anell III d'aquests anàlegs, que s'aparta molt de l'esquelet hidrocarbonat de la brassinolida (**1**), podria excedir el volum d'exclusió.

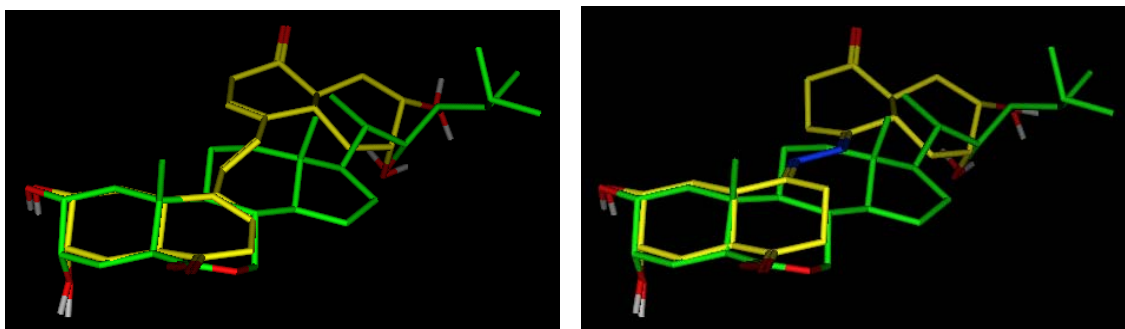


Alineament dels anàlegs **142** i **143** (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.





Alineament dels anàlegs **145** i **149** (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

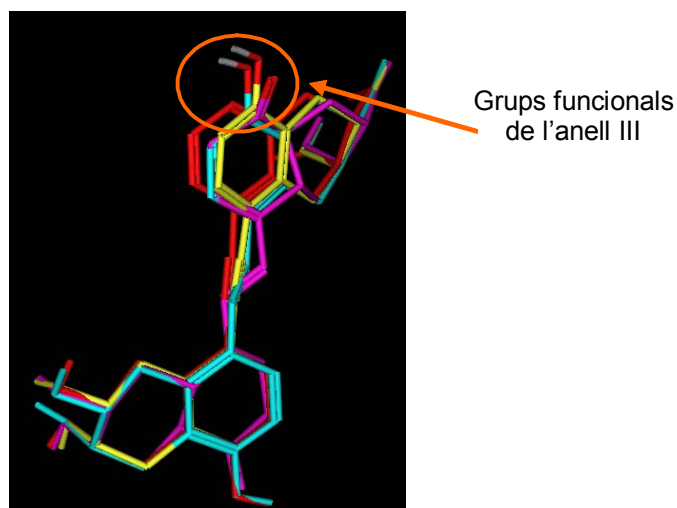


Alineament dels anàlegs **150** i **151** (en groc) amb la brassinolida (**1**), en verd.

**Figura 152.** Alineament dels anàlegs no esteroidals en estudi, en groc, amb la brassinolida (**1**), en verd.

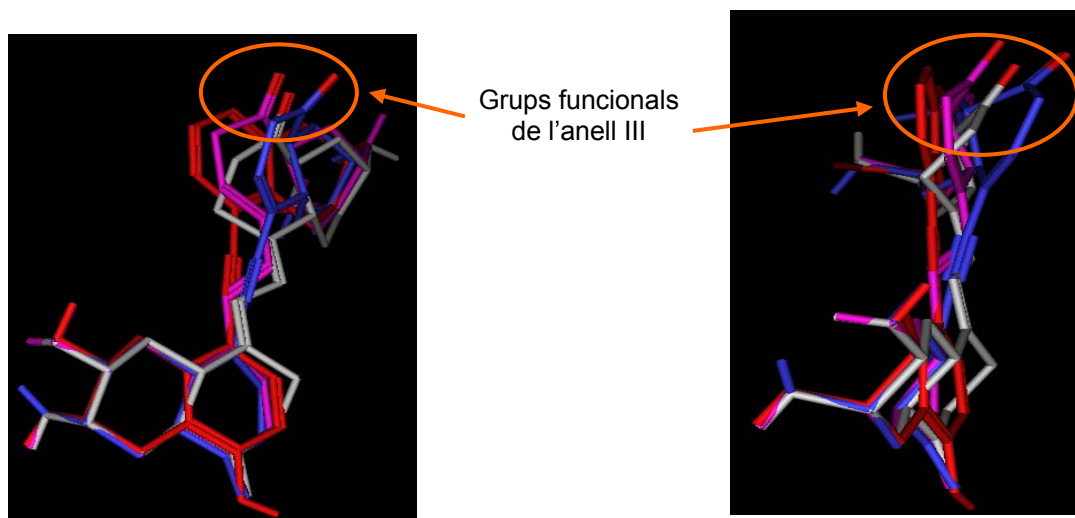
Per altra banda, i amb la finalitat d'esbrinar la diferència d'activitat, en el moment de la coaplicació amb IAA, entre els anàlegs actius (**143** i **150**) i els no actius (**142**, **145**, **149** i **151**), es creu convenient comparar els anàlegs entre ells per veure si existeixen diferències. Si es comparen els anàlegs **142**, **143**, **145** i **150**, dos actius i dos inactius, s'observa que la part que no queda ben solapada és la que correspon a la funcionalitat de l'anell III (**Figura 153**). Per tant, cal fixar-se en aquesta regió de la molècula per explicar les diferències d'activitat entre aquests mimètics de la brassinolida (**1**).

Els dos anàlegs inactius (**142** i **145**) tenen un hidroxil en aquest anell mentre que els dos actius no el tenen, **143** no té funcionalitat i **150** té un grup cetònic. Per tant, es formula la hipòtesi que la presència d'un grup hidroxil en l'anell III porta com a conseqüència la pèrdua d'activitat dels anàlegs.



**Figura 153.** Solapament dels anàlegs **142** (groc), **143** (vermell), **145** (blau) i **150** (rosa).

Finalment, si ara se centra l'atenció en la regió de l'anell III dels anàlegs **149** i **151**, la seva manca d'activitat contrasta amb l'activitat de **150**, tots ells amb un grup cetònic en l'anell III. Per tal d'extreure més informació d'aquesta zona, es realitza l'alineament d'aquests amb l'anàleg actiu **143**, que no presenta cap funcionalitat polar en l'anell III (**Figura 154**).



**Figura 154.** Solapament, en dues perspectives, dels anàlegs **143** (vermell), **149** (blau marí), **150** (rosa) i **151** (gris).

S'observa com els anells III dels anàlegs **149** i **151**, que són els inactius, estan desplaçats respecte els dos anàlegs actius (**143** i **150**) i per tant, ocupen una altra regió en l'espai. Motiu pel qual podria decaure l'activitat de **149** i **151**.

Així doncs, es pot resumir que la manca d'activitat d'alguns d'aquests mimètics podria ser conseqüència de les diferències existents en la zona de l'anell III. Més concretament, sembla que la manca d'activitat vingui motivada per la presència d'un hidroxil en aquesta regió o bé, per un desplaçament d'aquest anell respecte el pla central de la molècula. Per intentar corroborar aquesta hipòtesi es realitzen dos nous anàlisis:

- Comparació energètica.
- Càlcul de descriptors GRIND mitjançant el programa ALMOND<sup>238</sup> i posterior anàlisi de similitud.

### 8.3. Comparació energètica

L'objectiu d'aquest anàlisi és determinar si els anàlegs no-esteroidals sintetitzats per Thomas Back *et al.*, poden unir-se al receptor dels brassinoesteroides. Per assolir aquest objectiu es realitzarà una comparació energètica entre la conformació que adopten els anàlegs quan es troben units al receptor o conformació activa i la que adopten quan es troben en el medi biològic de la planta. La conformació activa dels anàlegs es determina alineant aquestes molècules amb la brassinolida (**1**) (**Figura 155**). La conformació que adopten en el medi biològic s'obté realitzant una anàlisi conformacional de cadascun dels anàlegs estudiats (**142**, **143**, **145**, **149-151**) per poder explorar totes les conformacions possibles que pot adoptar un compost. Posteriorment, es determina l'energia mínima d'aquests confòrmers emprant la constant dielèctrica de l'aigua per al medi. Així, es pot comparar cadascun dels valors d'energia de cada anàleg quan està alineat amb **1**. D'aquesta manera, se sabrà si els confòrmers que s'han obtingut en el solapament realitzat en l'apartat anterior són molt energètics o si són energèticament estables, per saber si aquests tenen probabilitat que es pugui donar interacció amb el receptor.

Les interaccions hidrofòbiques, així com les interaccions per pont d'hidrogen, tenen una elevada importància biològica degut a que són responsables, en gran part, de la integritat estructural de les macromolècules biològiques.<sup>277</sup> Segons Davis *et al.*<sup>278</sup> separar una superfície hidrofòbica de l'aigua, en el procés de solvatació-desolvatació, contribueix a  $0.68 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , per un grup metil, mentre que la formació d'un pont d'hidrogen entre dos àtoms neutres contribueix en  $0.5\text{-}1.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Per tant, referent als anàlegs estudiats (**142**, **143**, **145** i **150**) i tenint en compte que aquests tenen 22 àtoms de carboni i 4-6 funcionalitats amb capacitat per formar ponts d'hidrogen, s'ha calculat que la formació d'aquest complex comporta el cost energètic d'aproximadament  $25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Tenint en compte que aquest valor es correspon amb la contribució energètica al formar el complex lligand-receptor, la diferència energètica entre els confòrmers obtinguts per fusió simulada i els confòrmers alineats amb la brassinolida (**1**), té que ser inferior a  $25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  per a que puguin considerar-se aptes per ancorar-se al receptor.

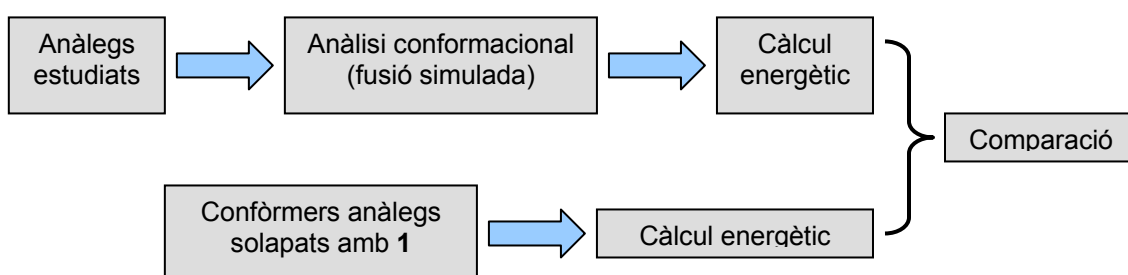


Figura 155. Metodologia per avaluar l'estabilitat dels confòrmers.

### 8.3.1. Exploració conformacional

Es realitza la dinàmica molecular (fusió simulada) emprant el mòdul Discover 3<sup>186</sup> implementat dins del programa de modelització molecular Insight II.<sup>182</sup>

Les condicions que s'empren per a realitzar la fusió simulada dels anàlegs són les mateixes que s'han explicat en l'apartat 6.2.1. Amb el mòdul DeCipher<sup>275</sup> del mateix programa es recullen les dades de manera que es pot construir la taula d'angles de torsió front el confòrmer, així com l'energia de cada confòrmer. A continuació, amb la macro d'Excel "Anàlisi de la Dinàmica Molecular"<sup>130</sup> s'avalua la freqüència amb la que apareixen els diferents valors d'angle de torsió en el transcurs de la simulació. La selecció dels confòrmers es realitza per comparació entre els valors dels angles díedres dels confòrmers obtinguts en cada iteració amb un pas d'angle de  $15^\circ$  per tant, els resultats que s'obtenen són valors discrets.

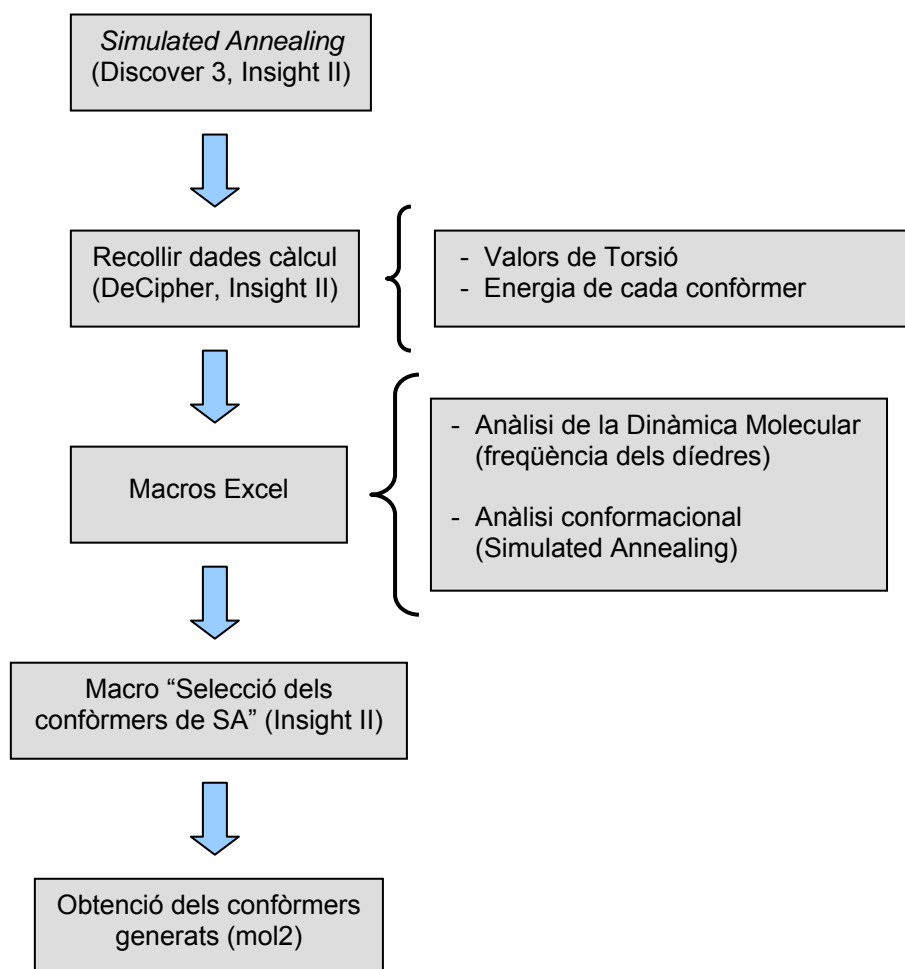
També es realitza el gràfic de l'energia front l'angle díedre. Posteriorment, sobre els gràfics s'avaluen els valors més estables per a cadascuna de les torsions.

La macro d'Excel "Anàlisi conformacional (Simulated Annealing)"<sup>130</sup> permet agrupar els confòrmers generats en el pas anterior, agrupant els que són similars entre si i deixant només un de cada grup. D'aquesta manera, s'aconsegueix disminuir el nombre de confòrmers inicials (3000) ja que s'eliminen els que tenen angles díedres iguals i se simplifica l'anàlisi posterior. Aquesta macro es pot emprar amb *cut off* de  $5 \text{ kcal/mol}$  o sense *cut off*,<sup>276</sup> que representa un límit superior a partir del qual no es tenen en compte les interaccions entre les partícules.

Amb la macro d'Insight II "seleccio\_dels\_confòrmers\_de\_SA"<sup>130</sup> s'extreuen, en format mol2, tots els confòrmers resultants de la selecció prèvia.

Finalment, es defineix el conjunt de confòrmers possibles de cada anàleg, eliminant aquells confòrmers i/o grups de confòrmers que, o bé per criteris energètics o bé per criteris estructurals, no tenen sentit.

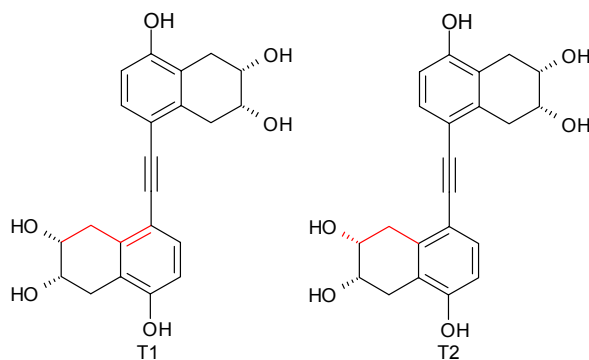
Seguint aquesta metodologia s'obté un conjunt de confòrmers estables a 298 K i la seva freqüència en la simulació. Els confòrmers obtinguts, després de realitzar tota la metodologia explicada anteriorment (**Figura 156**), varien en funció de l'anàleg estudiat. Per l'anàleg **142** es troben 56 confòrmers, per l'anàleg **143** 43 confòrmers, per l'anàleg **145** s'obtenen 47 confòrmers i per l'anàleg **150** es troben 8 confòrmers.



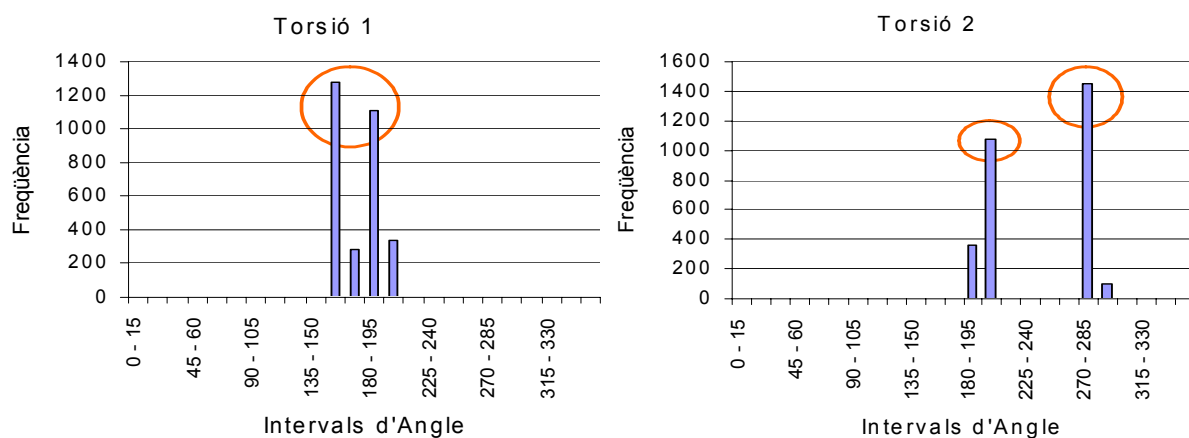
**Figura 156.** Metodologia per a realitzar l'anàlisi conformacional amb la tècnica de Fusió Simulada.

A continuació, i a mode d'exemple, es mostren els resultats obtinguts per l'anàleg **142**. Els resultats dels altres anàlegs es troben en l'annex C.

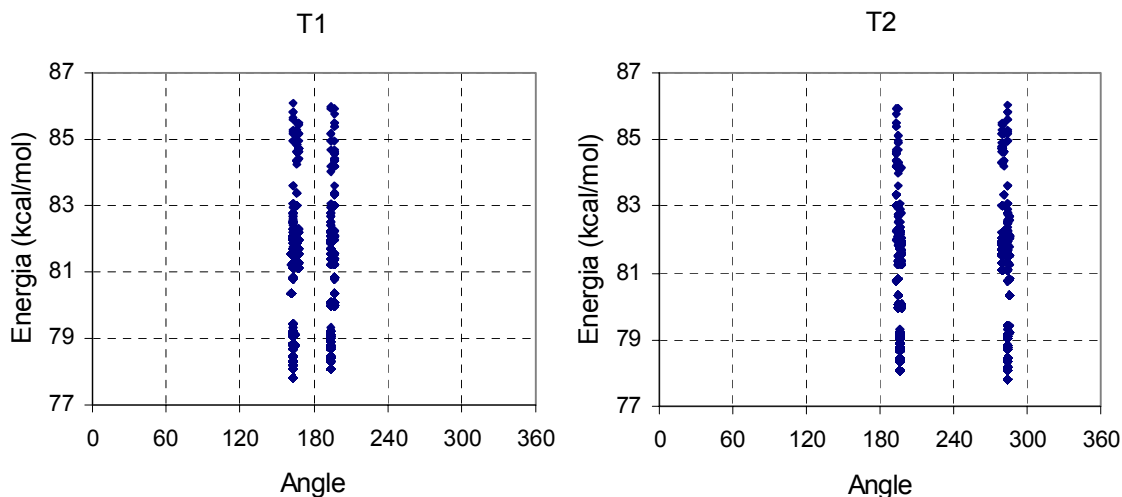
També a mode d'exemple, es mostra la definició dels angles díedres T1 i T2, els gràfics de la freqüència dels angles díedres de les dues primeres torsions (**Figura 158**) i els gràfics d'energia front angle díedre (**Figura 159**).



**Figura 157.** Angles dièdres de les dues primeres torsions, remarcades en vermell, de l'anàleg **142**.



**Figura 158.** Freqüència dels angles de torsió (T1 i T2) per l'anàleg **142**. S'assenyala l'interval més freqüent.



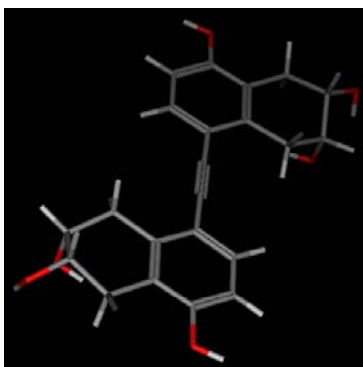
**Figura 159.** Valors energètics per cada valor d'angle dièdre de les torsions T1 i T2 de l'anàleg **142**.

L'energia dels 3000 conformers generats en la fusió simulada oscil·la entre 77.7 kcal/mol i 86.1 kcal/mol.

Un cop realitzada la metodologia (**Figura 156**) s'obtenen 77 conformers, si no s'aplica el *cut-off* de 5 kcal/mol, amb valors d'angles de torsió diferents. Aquest nombre disminueix a 56 conformers a l'aplicar-se el *cut-off*.

Tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, l'exploració conformacional realitzada serveix per comparar els valors energètics trobats dels anàlegs pel mètode de fusió simulada amb el valor d'energia d'aquests quan estan alineats amb la brassinolida (**1**) (**Figura 153**). Aquesta comparació es realitza per saber si la conformació obtinguda del solapament és estable energèticament (**Figura 155**) i si aquestes poden donar-se en la unió amb el receptor.

En la **Figura 160** s'exposa un dels confòrmers obtinguts.



**Figura 160.** Confòrmer obtingut després de realitzar la fusió simulada.

### 8.3.2. Alineament amb la brassinolida (**1**)

Per poder realitzar la comparació energètica, el càlcul de les energies s'ha d'haver realitzat amb les mateixes condicions, és a dir, amb el mateix *Force-Field*. Aquest càlcul energètic es realitza amb el programa MOE.<sup>205</sup>

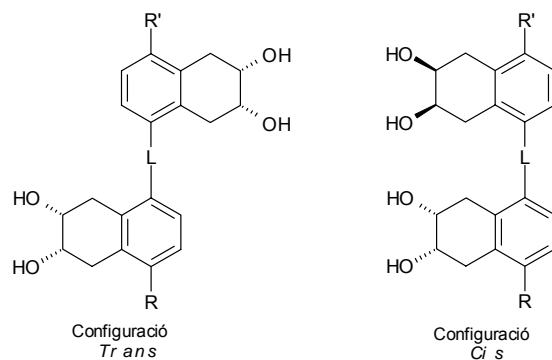
Per calcular l'energia de cadascun dels anàlegs quan estan solapats amb la brassinolida (**1**) s'han de seguir els següents passos:

- Fixar el *force-field* = MMFF94.
- Calcular les càrregues parcials dels àtoms segons el *force-field* escollit.
- Realitzar el càlcul de l'energia potencial.

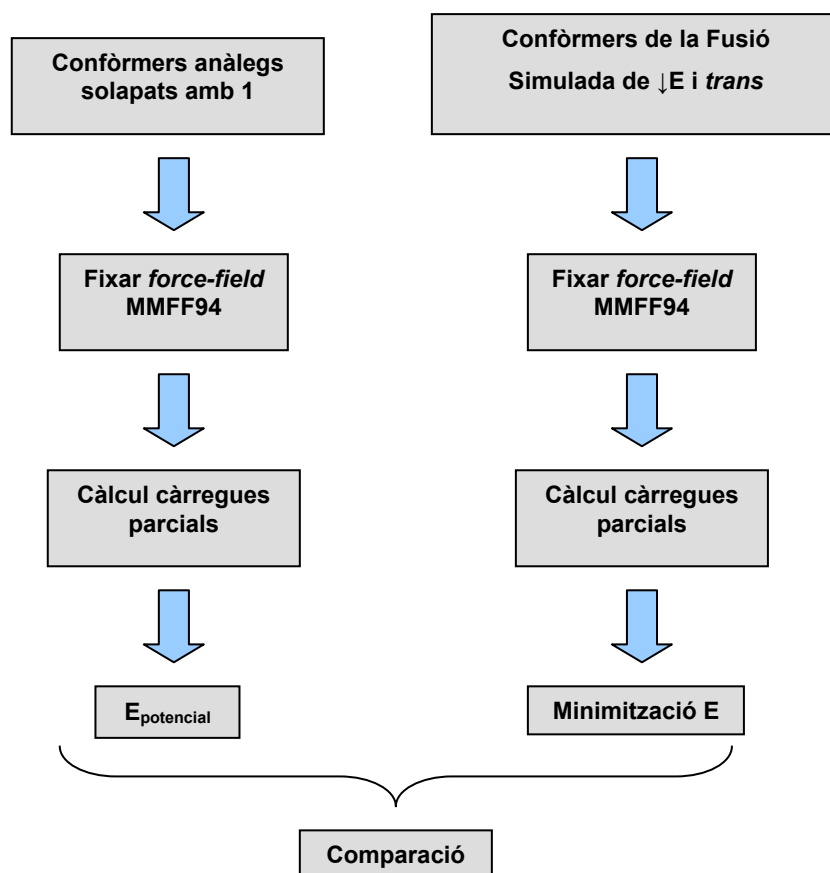
Per altra banda, de cada anàleg del que s'ha fet la fusió simulada (**142**, **143**, **145** i **151**) es tria el confòrmer més estable amb configuració *trans* (**Figura 161**). Sobre el confòrmer escollit se segueixen els mateixos passos:

- Fixar el *force-field* = MMFF94.
- Calcular les càrregues parcials dels àtoms segons el *force-field* escollit.
- Realitzar una minimització energètica.

Com es pot observar, la única diferència existent entre els dos procediments anteriors per calcular l'energia és com es calcula aquesta. En el primer, es fa un càlcul de l'energia potencial del confòrmer solapat amb **1**, ja que no ens interessa canviar l'estructura del confòrmer. En canvi, en el segon es realitza una minimització energètica donat que interessa que el confòrmer estigui en un pou d'energia perquè sigui el més estable possible. El procediment a seguir queda esquematitzat en la **Figura 162**.



**Figura 161.** Esquema on es mostra les dues configuracions genèriques possibles, *trans* o *cis*.



**Figura 162.** Metodologia per realitzar la comparació energètica.

Els resultats obtinguts d'aplicar la metodologia anteriorment explicada (**Figura 162**) es mostren en la **Taula 60**, on es pot observar els valors energètics ( $E_{\text{potencial}}$ ) dels anàlegs solapats amb la brassinòlida (**1**) i l'energia dels confòrmers més estables en configuració *trans* obtinguts amb la fusió simulada.

Anàleg	$E_{\text{potencial}}$ confòrmers solapats amb 1 / kcal mol <sup>-1</sup>	Minimització E confòrmers fusió simulada / kcal mol <sup>-1</sup>	$\Delta E$ / kcal mol <sup>-1</sup>
142	119.32	116.78	2.54
143	127.66	117.41	10.25
145	134.23	133.42	0.81
150	177.24	168.12	9.12

**Taula 60.** Valors energètics dels anàlegs no esteroidals en estudi.

Recordant que la formació d'aquest complex comporta el cost energètic d'aproximadament  $25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  i que la diferència energètica ( $10.25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  com a màxim) dels anàlegs estudiats (**142**, **143**, **145** i **150**) que s'obté al comparar l'energia d'aquests amb el mètode de la fusió simulada amb els valors d'aquests quan estan alineats amb la brassinolida (**1**) es veu compensada per aquestes contribucions al formar el complex lligand-receptor ( $25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Tenint en compte les dades expressades anteriorment, es conclou, que les conformacions de tots els anàlegs avaluats són estables energèticament quan estan solapats amb la brassinolida (**1**).

Una altra manera d'intentar veure si la conformació obtinguda en l'alineament amb la brassinolida (**1**) de cada anàleg és semblant o no amb l'obtinguda amb la fusió simulada és realitzar el càlcul del RMSD (*Root Mean Square Deviation*, error quadràtic mig).<sup>279,280</sup> El RMSD és una mesura per calcular la diferència entre les posicions atòmiques equivalents, per tant, permet obtenir un valor matemàtic que mesura la similitud entre dues estructures tridimensionals; quan aquest valor és proper a zero significa que les dues conformacions comparades són gairebé idèntiques, a mesura que aquest valor es va allunyant del zero la similitud va disminuint.<sup>281,282</sup>

Per tant, es calcula el RMSD dels anàlegs (**143** i **150**) quan estan solapats amb la brassinolida (**1**) i el confòrmer d'aquests anàlegs que s'obté del mètode de la fusió simulada. Per tal de tenir una referència objectiva i numèrica dels valors de RMSD obtinguts per als anàlegs, també s'ha realitzat aquest càlcul entre el primer confòrmer actiu de la brassinolida (**1**) obtingut amb el mètode de GRID flexible (en color groc a la **Figura 57**, bl\_p1s),<sup>131</sup> i el confòrmer de **1** obtingut mitjançant el mètode de la fusió simulada. Els resultats es mostren en la **Taula 61**.

	RMSD / Å
<b>Anàleg 143</b>	0.26
<b>Anàleg 150</b>	0.39
<b>Brassinolida (1)</b>	1.17

**Taula 61.** Valors obtinguts de RMSD.

Com es pot observar en la **Taula 61**, els valors de RMSD obtinguts pels anàlegs **143** i **150** són inferiors que el valor de la brassinolida (**1**). Per tant, les conformacions dels anàlegs **143** i **150** sí que poden tenir lloc en la unió amb el receptor, ja que els valors de RMSD d'aquests són inferiors al de **1**.

#### 8.4. Càlcul de descriptors GRIND i anàlisi de similitud

Es pretén corroborar la hipòtesi obtinguda en l'apartat 8.2 mitjançant el càlcul dels índexs de similitud de Carbó, dels anàlegs estudiats (**142**, **143**, **145** i **150**) amb la brassinolida (**1**), emprant com a propietat a comparar els descriptors GRIND (*Grid-INdependent Descriptors*) explicats en l'apartat 2.2.3.

Un cop es disposa dels índexs de similitud, es procedeix a discutir els resultats obtinguts. A la **Taula 62** es mostren els màxims valors dels índexs de similitud de Carbó calculats per a totes les conformacions dels anàlegs d'interès (fusió simulada) respecte cada una de les tres conformacions actives trobades per la brassinolida (**1**) en l'equip (apartat 2.1.4), i per a la resta de conformacions de la brassinolida (**1**) trobades pel mètode de fusió simulada. A la darrera columna hi ha el valor màxim d'índex de similitud trobat per a cada anàleg.

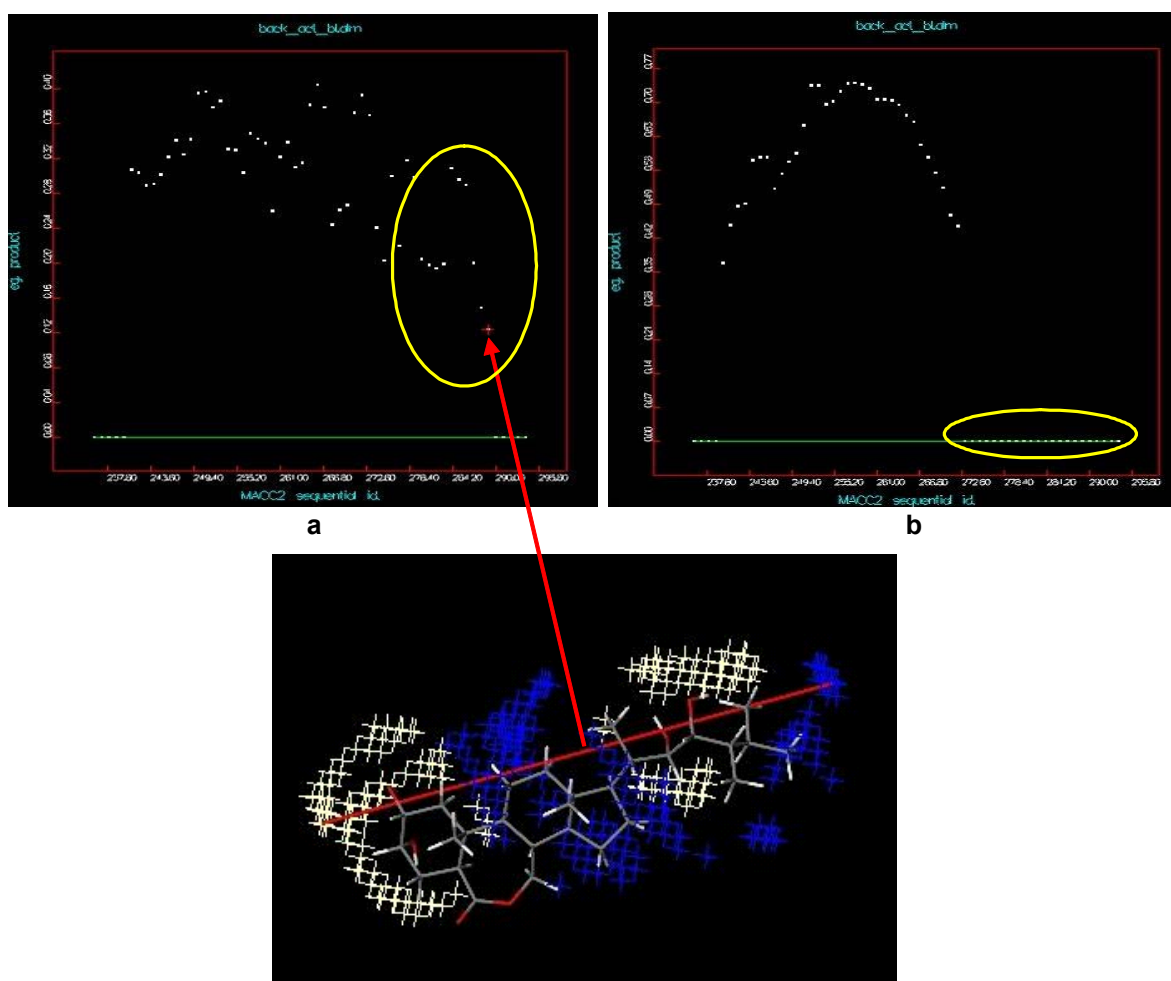


Anàleg	Índex de Carbó			
	bl_mvp	bl_pls	bl_sqr	Màxim
142	0.900	0.922	0.890	0.965
143	0.922	0.927	0.912	0.964
145	0.929	0.948	0.919	0.979
150	0.925	0.944	0.913	0.977

**Taula 62.** Valors dels índexs de Carbó calculats per als anàlegs d'estudi.

Com s'observa en la **Taula 62**, no es pot discriminar entre els anàlegs actius i els que no ho són, donat que s'obtenen valors d'índex de Carbó molt semblants entre ells.

Tot i així, mitjançant el programa ALMOND<sup>238</sup> es pot observar gràficament (**Figura 163**) com les distàncies més llargues (a la dreta del correlograma **a**) de la brassinolida (**1**) no apareixen en els anàlegs no esteroidals en estudi (correlograma **b**). Aquestes distàncies corresponen als parells de nodes entre els grups funcionals de l'anell A de la brassinolida (**1**) i la part hidrofòbica de la cadena. Això concorda amb els resultats de l'apartat 8.2, que feien referència a que no hi havia una regió apolar en els anàlegs estudiats (**142**, **143**, **145** i **150**) que pogués solapar-se amb la cadena lateral de la brassinolida (**1**). Per tant, es reafirma que la manca d'activitat per ells mateixos és conseqüència de la manca d'una zona hidrofòbica en la part final de la molècula.



**Figura 163.** Correlació entre un valor d'energia obtingut per la brassinolida (**1**) i el parell de nodes corresponent (en vermell), en blau es mostra la sonda O i en beix la DRY. En groc se selecciona les distàncies llargues de **1** (correlograma a) que no les presenta l'anàleg **143** (correlograma b).

Després d'analitzar aquests mimètics, disposem de dos tipus de molècules que no presenten activitat per si mateixes, el KM-01 (**9**) i els mimètics de Back *et al.*<sup>139</sup> En el KM-01(**9**), no hi ha una funcionalitat polar en la cadena lateral que es pugui alinear amb el diol de cadena de la brassinolida (**1**) i, en els mimètics, tot i tenir un bon alineament en la regió polar de la cadena de **1**, els manca una regió hidrofòbica per solapar-se amb la part final de la cadena de **1**. Així, amb aquests compostos es fa pal·lesa la importància tant de les regions polars com de les regions apolars per a que un compost pugui desencadenar activitat brassinoesteroide.

## 8.5. Conclusions

Un cop realitzat l'alineament dels anàlegs **142**, **143**, **145** i **149-151** amb la brassinolida (**1**) es podria concloure que l'absència d'activitat d'aquests anàlegs per si sols és degut a que no presenten cap zona de la molècula que se solapi adequadament amb les zones hidrofòbiques de la brassinolida (**1**), és a dir, amb els anells C i D, així com amb la cadena lateral d'aquesta. Per altra banda, la zona de l'anell III dels anàlegs estudiats, podria excedir el volum molecular de la brassinolida (**1**).

Aquesta conclusió es veu corroborada amb el càlcul de descriptors GRIND realitzat amb el programa ALMOND, ja que gràficament s'observa que les distàncies més llargues que s'obtenen en la brassinolida (**1**) no s'observen en els anàlegs estudiats. Aquestes distàncies són les que corresponen als parells de nodes entre els grups funcionals de l'anell A i la part hidrofòbica de la cadena de **1**. S'ha de mencionar tot i així, el bon solapament dels hidroxils dels anells I i IV dels anàlegs amb els hidroxils 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  de l'anell A i el diol 22R i 23R, respectivament, de la brassinolida (**1**), i l'alineament del grup polar de l'anell II dels mimètics amb la 7-oxolactona de l'anell B de **1**.

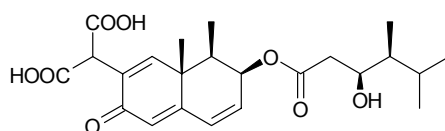
Per tant, aquests resultats computacionals donen una explicació de la inactivitat, observada per Back *et al.*,<sup>139</sup> dels anàlegs no-esteroidals en el test de la làmina d'arròs. S'evidencia, amb aquests estudis teòrics, la importància de la part hidrofòbica dels brassinoesteroides i, en especial, de la cadena lateral d'aquests. Aquest fet permet suggerir la síntesi de nous anàlegs no-esteroidals, de característiques semblants als sintetitzats per Back *et al.*,<sup>139</sup> però incorporant una part hidrofòbica que permeti mimetitzar la cadena lateral de la brassinolida (**1**), per tal d'obtenir uns anàlegs no-esteroidals amb activitat brassinoesteroide.

Per altra banda, cal tenir en compte que Back *et al.*<sup>139</sup> van obtenir uns anàlegs no-esteroidals (**143** i **150**) que, tot i que no desencadenen activitat brassinoesteroide en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT), van presentar una certa activitat en coaplicar-los amb l'auxina àcid indol-3-acètic (IAA). Tenint en compte aquesta consideració, la hipòtesi que es formula és que certes característiques de l'anell III podrien comportar una disminució de l'activitat dels anàlegs, ja sigui motivada per la presència d'un hidroxil en l'anell III o bé per un desplaçament d'aquest anell respecte el pla de la molècula. Així doncs, si es realitza l'alineament dels anàlegs actius (**143** i **150**) i dels inactius (**142** i **145**) s'observa com els dos inactius presenten un hidroxil en aquest anell, mentre que els actius presenten un grup cetònic (**150**) o cap funcionalitat (**143**) (**Figura 153**). Si per altra banda s'alinea **149** i **151**, que són inactius, amb els dos anàlegs actius (**143** i **150**), s'observa que l'anell III d'aquests dos primers anàlegs està desplaçat respecte els dos actius (**143** i **151**) (**Figura 154**), i per tant, ocupen una altra regió de l'espai, raó per la qual el mal solapament en aquesta zona podria fer decaure l'activitat d'aquests dos anàlegs.

## 9. Conclusions

S'han realitzat quatre estudis computacionals amb la finalitat de conèixer quins són els mimètics del KM-01 (**9**) amb majors possibilitats de desencadenar activitat brassinoesteroide i per tal d'aprofundir en el coneixement de la interacció entre els brassinoesteroides i el seu receptor.

S'han realitzat dos estudis per a determinar l'estructura del mimètic del KM-01 (**9**) més semblant a la de la brassinolida (**1**). Aquests han generat resultats complementaris permetent concloure que els mimètics amb major possibilitat de desencadenar activitat brassinoesteroide són aquells que presenten un  $\beta$ -hidroxiéster en la cadena lateral i una doble funcionalitat polar a C12 i C13 de l'esquelet. Entre els diferents mimètics estudiats, el KM-30br és qui ha permès obtenir uns millors resultats (**Figura 164**). Aquest compost també presenta un  $\beta$ -hidroxiéster en la cadena lateral per mimetitzar les funcionalitats 22*R*-OH i 23*R*-OH de **1** i dues funcionalitats àcid carboxílic a C12 i C13 per mimetitzar el diol de l'anell A de **1**.



**Figura 164.** KM-30br.

S'ha treballat amb una nova metodologia, la tècnica SHOP que, després de validar-la i aplicar-la sobre una base de dades d'àcids comercials, ha permès determinar aquell àcid comercial més capaç de mimetitzar la cadena lateral de la brassinolida (**1**) i l'homobrassinolida (**2**). Aquestes cadenes són de gran utilitat, no únicament per als mimètics del KM-01 (**9**), sinó per a qualsevol tipus d'esquelet capaç de mimetitzar els anells de **1** i que presenti una funcionalitat amina o hidroxil en la seva estructura per ancorar-hi per esterificació o amidació un d'aquests àcids comercials.

Cal també mencionar que l'elevada activitat obtinguda per a l'androstà **137** posa de manifest la bondat de la metodologia SHOP per a la selecció de molècules amb possibilitats de ser actives.

Finalment, s'han analitzat els mimètics no esteroidals dissenyats pel grup de Thomas Back on s'ha posat de manifest la gran importància de la part hidrofòbica de la cadena lateral dels brassinoesteroides.

## **SÍNTESI D'ANÀLEGS DEL KM-01 (9)**

## SÍNTESI DE MIMÈTICS DEL KM-01 (9)

### 1. Introducció

L'objectiu d'aquest capítol, com ja s'ha vist en els apartats anteriors, és la síntesi de mimètics del KM-01 (9) amb activitat brassinoesteroide. L'estructura d'aquests compostos implica dues transformacions respecte l'estructura del KM-01 (9) per tal d'assolir una estructura del tipus 10 (Figura 21): una transformació a la part de l'esquelet i una altra a la part de la cadena.

Per una banda, s'empren dos tipus d'esquelets, el de la PR toxina (19) i un esquelet anàleg al del KM-01 (9). Cal recordar que l'esquelet de 19 no és el més idoni per a mimetitzar la brassinolida (1), però la poca quantitat de 19 que es disposava, en un principi, per a transformar-la en un esquelet anàleg al de 9 i la major facilitat sintètica dels mimètics de 19, van motivar sintetitzar alguns anàlegs d'aquestes característiques. En quan a la cadena, s'empren la del KM-01 (9), bq i, les cadenes comercials que millor han mimetitzat la cadena de la brassinolida (1) i la homobrassinolida (2). La cadena bq es creu que pot conduir a la síntesi de mimètics del KM-01 (9), inhibidors de l'activitat brassinoesteroide, que aportarien informació sobre el receptor d'aquests. En canvi, les cadenes del tipus 155 incorporen una funcionalitat polar que permet mimetitzar l'hidroxil 23R-OH de la brassinolida (1) i, per tant, conduir a anàlegs amb activitat BR.

L'estratègia sintètica plantejada en aquest treball es mostra a la Figura 165.

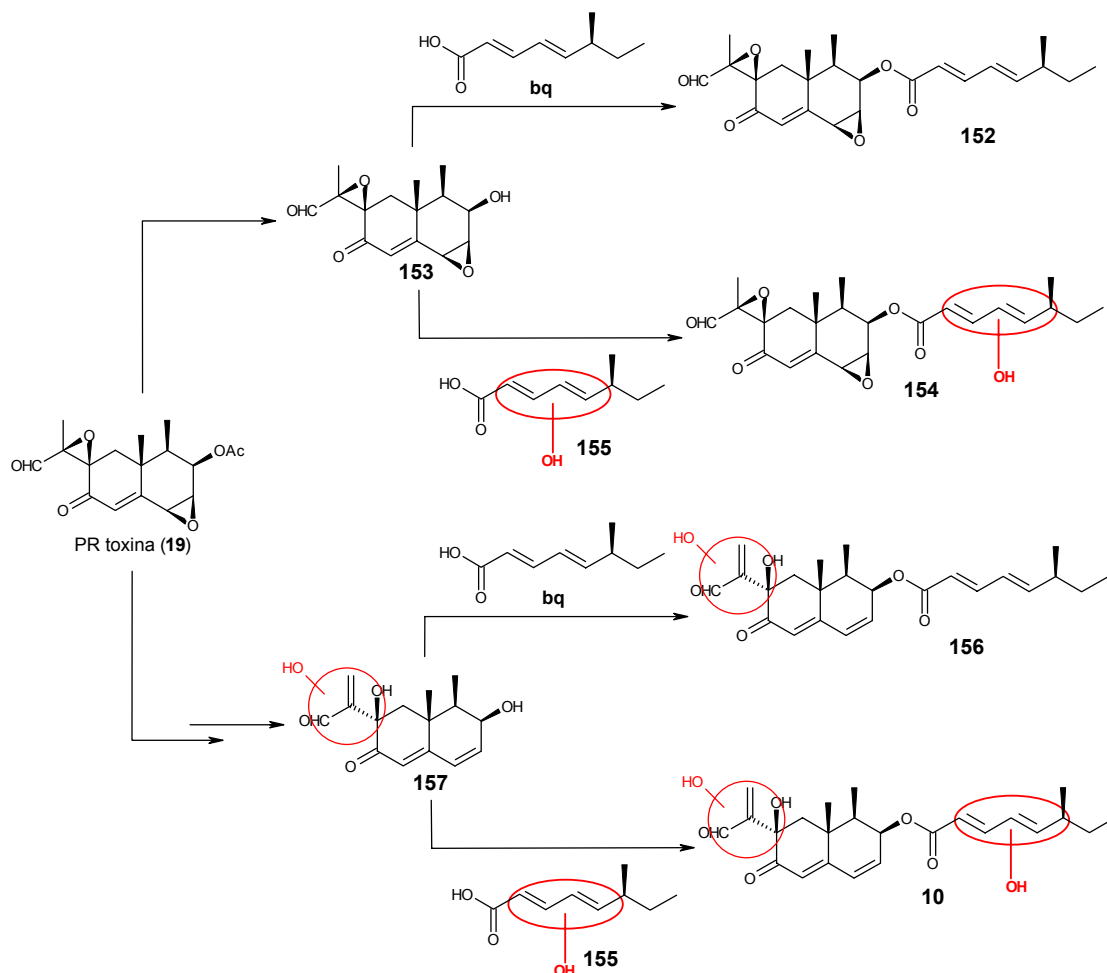


Figura 165. Esquema de la síntesi de mimètics del KM-01 (9) a partir de PR toxina (19).

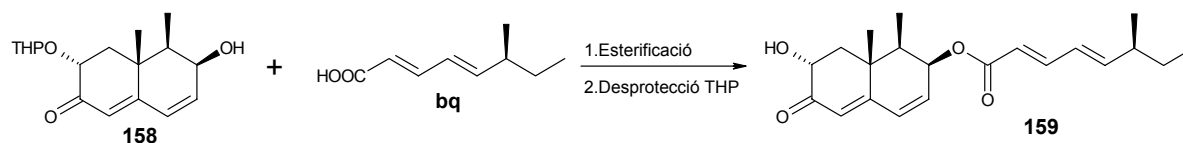
En primer lloc, la PR toxina (**19**) s'hidrolitza per rendir PR alcohol (**153**) o es transforma per rendir un anàleg de l'esquelet del KM-01 (**9**), **157**. A continuació, té lloc l'esterificació d'aquests esquelets amb les cadenes d'interès. Per una banda, es poden esterificar amb la cadena del KM-01 (**9**), l'àcid dendrifièlic A (**bq**), rendint compostos que s'espera que presentin activitat antagonista front els brassinoesteroides (mimètics del tipus **152** o **156**). Per l'altra, es poden esterificar amb una cadena pertinentment funcionalitzada (**155**), rendint compostos amb una estructura del tipus **154** o del tipus **10**, amb possible activitat BR.

En la síntesi d'aquests compostos cal tenir en compte que algunes de les funcionalitats que presenta l'esquelet de la PR toxina (**19**) podrien interferir en les transformacions que es pretén efectuar. Entre totes elles, les que mereixen una especial atenció són els epòxids. Aquests són susceptibles de reaccionar amb nucleòfils o en medis de reacció àcids o bàsics. Per tant, les transformacions sintètiques que es duren a terme amb compostos que tinguin l'esquelet de PR toxina (**19**) requeriran de condicions de reacció neutres, àcides o bàsiques molt diluïdes. També cal evitar la presència de nucleòfils en el medi de reacció.

Pel que fa a l'esterificació dels esquelets amb les corresponents cadenes laterals es busca un mètode general per ancorar qualsevol esquelet amb un grup hidroxil amb qualsevol cadena lateral que sigui un àcid carboxílic. Entre ells, com ja s'ha comentat, s'inclou el delicat esquelet de la PR toxina (**19**). Per tant, els mètodes d'esterificació convencionals, com l'esterificació de Fischer o la síntesi a través d'un clorur d'acil, no poden ser emprats, doncs transcorren en medis àcids i per tant, podrien obrir els epòxids de **19**.

L'ús de diciclohexilcarbodiimida (DCC) i 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) tampoc és útil amb alcohols situats a 3 $\beta$  en l'esquelet eremofilànic.<sup>283</sup> En aquest cas, s'ha postulat que els baixos rendiments obtinguts són deguts a l'impediment estèric donat al carboni C3-OH per la interacció 1,3-diaxial amb el metil axial situat a C5. A més, si no es controlen estrictament les condicions de reacció, es generen N-acilurees com a subproductes que en disminueixen considerablement el rendiment.

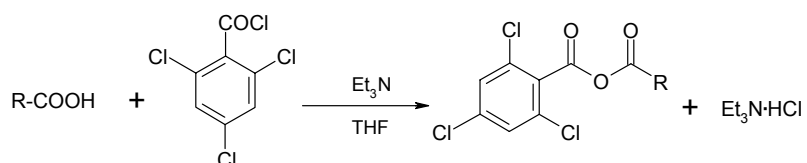
Un altre mètode d'esterificació és el de Yamaguchi,<sup>284</sup> que planteja una reacció directa entre àcids i alcohols en condicions molt suaus, sense alterar altres funcionalitats presents, amb rendiments molt alts. Aquest mètode activa l'àcid a través de la formació d'un anhidrid mixt i catalitza l'atac nucleòfil de l'alcohol amb DMAP. Aquesta reacció ha estat emprada en la síntesi de macrolactones i de productes naturals polifuncionalitzats.<sup>283-285</sup> Kitahara *et al.*<sup>283</sup> van realitzar l'esterificació entre **bq** i el compost d'estructura eremofilànica **158** per procedir a la síntesi de la dendrifielina C (**159**) a través del mètode de Yamaguchi (**Figura 166**). Van obtenir l'ester d'interès amb un 79% de rendiment. Els mateixos autors havien realitzat l'esterificació dels mateixos compostos emprant DCC per rendir el producte d'interès **161** únicament amb un rendiment del 23%. Per tant, el mètode de Yamaguchi fou l'escollit per esterificar ja que té lloc en condicions suaus i l'exemple de la **Figura 166** es realitza entre estructures molt similars a les que es desitja sintetitzar.



**Figura 166.** Síntesi de la dendrifielina C (**159**) pel mètode de Yamaguchi.

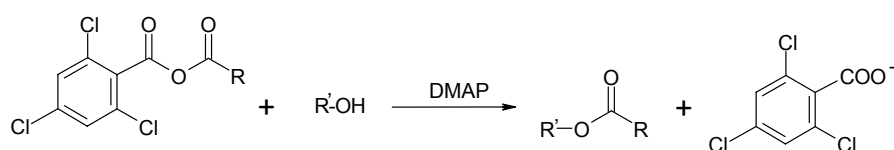
Aquesta esterificació té lloc en dues etapes. La primera etapa consisteix en l'activació de l'àcid en forma

d'anhídrid mixt. L'àcid es tracta amb trietilamina i clorur de 2,4,6-triclorobenzoil, a t.a. durant 30 minuts, per rendir l'anhídrid mixt corresponent (**Figura 167**). Al finalitzar la reacció, s'elimina el clorhidrat de trietilamina per filtració, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i sobre l'oli resultant es duu a terme la segona etapa.



**Figura 167.** Primera etapa de la reacció de Yamaguchi.

La segona etapa consisteix en tractar l'anhídrid amb l'alcohol que es vol esterificar en presència de N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP) durant 1.5 h a t.a. i emprant benzè o toluè com a dissolvent (**Figura 168**).



**Figura 168.** Segona etapa de la reacció de Yamaguchi.

Yamaguchi *et al.*<sup>284</sup> estudiaren diversos clorurs de benzoïl amb diferents substituents per determinar el que proporcionava millor rendiment i velocitat de ruptura de l'anhídrid mixt. En l'elecció del clorur de benzoïl s'ha de contemplar que el compost utilitzat sigui un bon grup sortint i el carbonil del compost ha d'estar impedit estèricament per evitar un atac nucleòfil no desitjat. El compost que els va proporcionar rendiments més elevats fou el clorur de 2,4,6-triclorobenzoïl. Aquests mateixos autors també comprovaren que la velocitat de reacció augmentava en incrementar la temperatura fins a 80-100 °C, però el rendiment era el mateix que treballant a temperatura ambient. Per altra banda, Höfle *et al.*<sup>286</sup> estudiaren 4-dialquilaminopiridines com a catalitzadors de reaccions de transferència de grups acil. Demostraren que aquests catalitzadors, en l'acilació de grups hidroxil impeditos estèricament, són més eficients que la piridina o altres amines terciàries.

Cal tenir en compte que el grup hidroxil d'aquestes cadenes s'ha de protegir abans d'ancorar-lo a l'esquelet per evitar la formació de subproductes fruit de l'autocondensació d'aquestes cadenes amb sí mateixes. El grup protector emprat serà diferent si la cadena lateral és un fenol o un hidroxil alifàtic, ja que la reactivitat d'aquests grups és molt diferent però, en qualsevol cas, el grup protector té que romandre inalterat en el medi bàsic de l'esterificació i, un cop ancorada la cadena, la desprotecció té que ser suau per evitar modificar l'estructura del mimètic.

A continuació es descriurà el procés sintètic seguit per a l'obtenció de mimètics de **19** i, després, es descriurà el procés de síntesi pels mimètics amb esquelet anàleg al del KM-01 (**9**).

## 2. Síntesi d'anàlegs de la PR toxina (19)

El primer pas per a l'obtenció d'aquests mimètics és la saponificació de la PR toxina (19) per rendir el PR alcohol (153). D'aquesta manera, ja es disposa de l'esquelet al que s'hi vol ancorar la cadena lateral convenientment desprotegit. A continuació, s'ha d'ancorar una cadena lateral per esterificació. En la present tesi s'han sintetitzat tres anàlegs d'aquestes característiques (Figura 169).

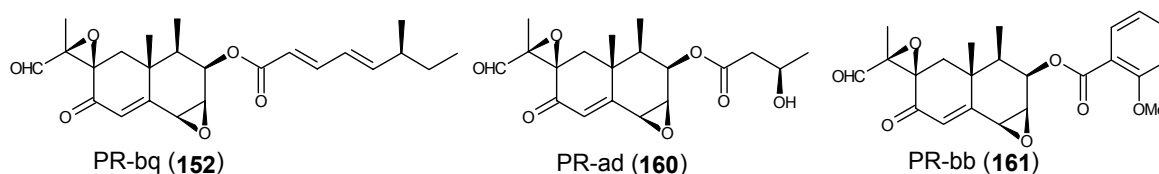


Figura 169. Mimètics de PR toxina (19) sintetitzats durant la present tesi.

L'anàleg 152 se sintetitza per poder disposar d'un possible compost inhibidor de l'acció biològica dels BRs. Després, se sintetitzen dos mimètics (160 i 161) amb unes de les millors cadenes laterals comercials obtingudes en l'estudi computacional (ad i bb).

### 2.1. Síntesi del PR alcohol (153)

Segons Wei *et al.*,<sup>145</sup> es pot obtenir PR alcohol (153) per hidròlisi del grup acetat de la PR toxina (19), amb un rendiment del 63%, emprant una dissolució 0.02 N d'hidròxid potàssic en metanol/aigua, en una proporció subestequiomètrica, durant 3 hores a 40 °C (Figura 170).

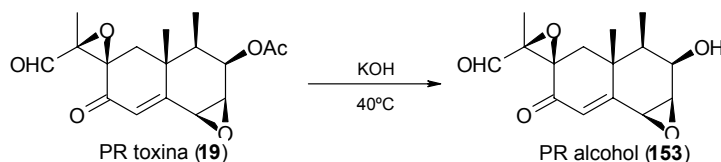


Figura 170. Hidròlisi de la PR toxina (19) per rendir PR alcohol (153).

En aquest treball, es va dur a terme aquesta reacció en les condicions de la bibliografia<sup>145</sup> obtenint-se un cru que contenia PR alcohol (153) (rendiment del 50%) com a producte més polar i producte de partida 19. Aquest cru es va purificar per cromatografia preparativa.

Amb la idea de millorar aquests resultats es realitzaren dues proves emprant hidròxid potàssic més concentrat, 0.05 N i 0.1 N. Ambdues proves es realitzaren amb 5 mg de PR toxina (19) per fer, únicament, un seguiment per CCF i determinar si eren les condicions adequades per a millorar el rendiment en l'obtenció del PR alcohol (153).

La saponificació amb hidròxid potàssic 0.1 N va rendir un cru complex on diversos productes, probablement provinents de l'obertura dels epòxids presents a 19, presentaven un temps de retenció similar. En canvi, l'ús d'hidròxid potàssic 0.05 N va conduir, després d'una hora de reacció, a la conversió total del producte de partida i, a més, pràcticament no van generar-se subproductes de reacció. La millora va ser deguda a l'ús de quantitats estequiomètriques de reactiu, mantenint un medi prou diluït com per no afectar els epòxids de 19. Donat els bons resultats obtinguts en aquestes condicions, en aquest treball també es plantejà realitzar la reacció amb una concentració d'hidròxid potàssic 0.02 N, com la que van usar Wei *et al.*,<sup>145</sup> però emprant

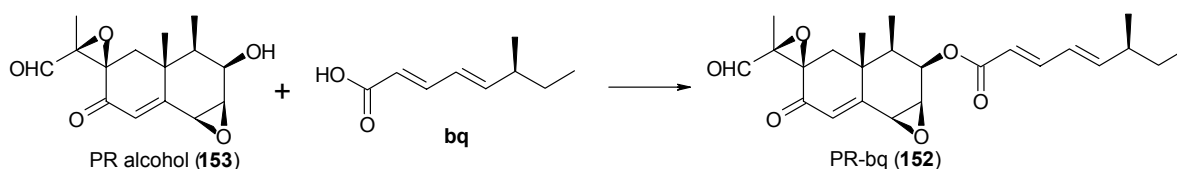


un volum tal que la proporció d'equivalents entre hidròxid sòdic i **19** fos 1:3. Així, es va tractar PR toxina (**19**) amb una dissolució d'hidròxid potàssic 0.02 N en una mescla metanol:aigua (4:1) a 40 °C durant 90 min mantenint una proporció 1:1 d'equivalents de **19** i d'hidròxid potàssic, rendint el PR alcohol (**153**) amb un rendiment del 94%.

Cal concloure doncs, que el PR alcohol (**153**) es pot obtenir amb rendiments gairebé quantitius tant si es treballa amb una concentració d'hidròxid potàssic 0.02 N com 0.05 N, però emprant en el primer cas una proporció 1:3 d'equivalents entre NaOH i PR toxina (**19**) i en el segon cas una proporció 1:6.

## 2.2. Síntesi del mimètic PR-bq (**152**)

Tal com s'ha descrit anteriorment, el PR-bq (**152**) s'obté a través de l'esterificació de l'àcid dendrifièlic A (**bq**) amb PR alcohol (**153**), **Figura 171**.



**Figura 171.** Síntesi del mimètic PR-bq (**152**).

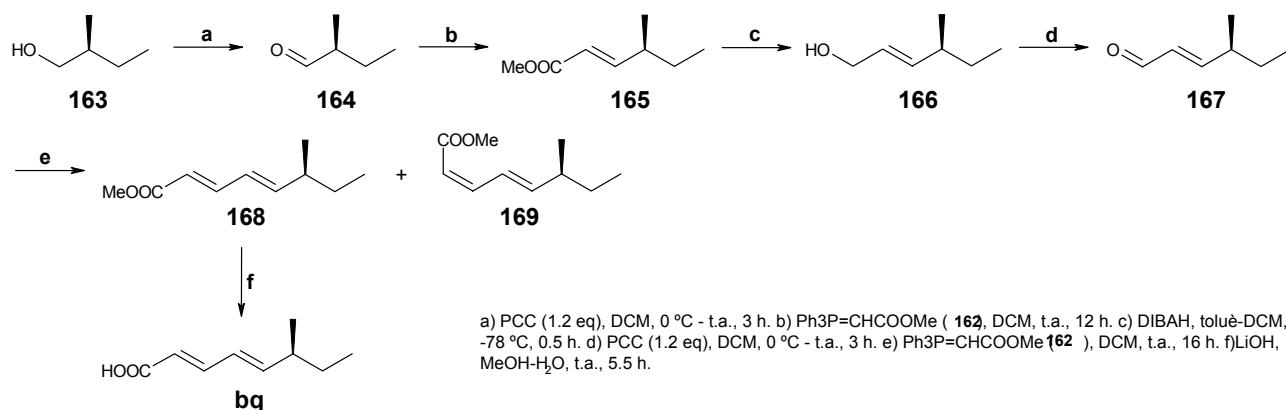
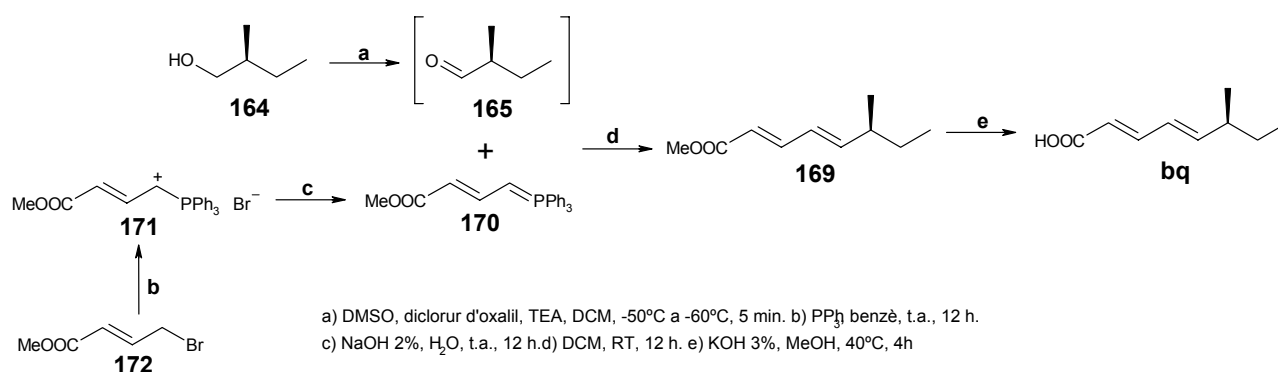
A continuació es descriu la síntesi de l'àcid dendrifièlic A (**bq**) i, tot seguit, l'esterificació amb **153**.

### 2.2.1. Síntesi de l'àcid dendrifièlic A (**bq**)

La síntesi de l'àcid dendrifièlic A (**bq**) ha estat descrita per varis autors.<sup>134,283</sup> Es descriuen principalment dues vies sintètiques basades, totes dues, en l'obtenció dels dobles enllaços mitjançant reaccions de Wittig entre els sintons pertinents. Així mateix, totes dues incorporen el centre quiral present a **bq** a través del 2S-metilbutanol (**163**).

La primera d'aquestes estratègies<sup>283,287</sup> (**Figura 172**) planteja la síntesi de **bq** a través de dues reaccions de Wittig successives a partir de l'alcohol quiral **163**. Així, l'alcohol **163** s'oxida a l'aldehid **164** amb PCC, i aquest es fa reaccionar amb el fosforà **162** rendint l'ester  $\alpha,\beta$ -insaturat **165**. Aquests passos es repeteixen per formar anàlogament l'altre doble enllaç: l'ester **165** es redueix a l'alcohol primari **166** i s'oxida a continuació per formar l'aldehid **167**, que reacciona de nou amb el fosforà **162** per rendir el dendrifielat A de metil (**168**). Es detecta la formació de l'isòmer geomètric **169**. L'ester **168** se saponifica i s'obté així l'àcid dendrifièlic A (**bq**). El rendiment descrit per aquesta ruta és del 18%.<sup>283</sup>

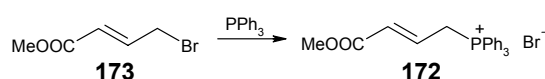
La segona ruta sintètica plantejada<sup>134</sup> (**Figura 173**) proposa l'obtenció del dendrifielat A de metil (**168**) a través d'una única reacció de Wittig entre l'il·lur de fosfoni **170** i l'aldehid **164**, obtingut per oxidació de Swern de l'alcohol quiral **163**, emprat també en l'estratègia sintètica anterior. El fosforà **170** se sintetitza a partir del bromur de fosfoni **171**, que s'obté a partir del bromoèster **172**. El rendiment descrit per aquesta ruta és del 15%.

Figura 172. Primera ruta sintètica per a la síntesi de **bq**.<sup>283,287</sup>Figura 173. Segona ruta sintètica per a la síntesi de **bq**.<sup>134</sup>

En aquest treball s'opta per la segona via sintètica descrita per reproduir la síntesi de l'àcid dendrifièlic A (**bq**). Tot i el lleuger menor rendiment que presenta respecte a la primera opció plantejada, el seu menor nombre de passos fa decantar-se per la seva elecció. Ara bé, es decideix realitzar l'oxidació de l'alcohol **163** a l'aldehid **164** emprant PCC, tal com es descriu per la primera estratègia plantejada, en lloc d'optar per l'oxidació de Swern, doncs les condicions d'aquesta són més dràstiques i requereix l'ús de diclorur d'oxalil, reactiu volàtil molt tòxic.

### 2.2.1.1. Síntesi de (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenoiat de metil (170)

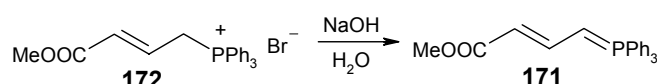
El primer pas per a la síntesi del fosforà (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenoiat de metil (**170**) és la síntesi del bromur de (4-metoxi-4-oxo-2-butenil)trifenilfosfoni (**171**). Aquest s'obté per tractament del 4-bromocrotonat de metil (**172**) amb trifenilfosfina (Figura 174), seguint el procediment descrit per Kim *et al.*<sup>134</sup>

Figura 174. Síntesi del bromur de (4-metoxi-4-oxo-2-butenil)trifenilfosfoni (**171**).

La reacció es dona a través d'una substitució nucleòfila bimolecular (S<sub>N</sub>2) de la trifenilfosfina sobre el bromoester **172** protegit de la llum, a t.a. i en atmosfera inerta.

Es realitzen dos experiments amb aquesta reacció. En la primera experiència, el sòlid blanc precipitat després de 10 h de reacció es filtra i les aigües mares, en les quals es forma una terbolesa blanca, es descarten obtenint un rendiment del 78%. En la segona, el sòlid blanc precipitat es separa per filtració a les 24 h de reacció. S'obté un rendiment del 98% després de recuperar la terbolesa blanca que no s'aconsegueix filtrar just després de finalitzar la reacció.

El bromur de (4-metoxi-4-oxo-2-butenil)trifenilfosfoni (**171**) rendeix el fosforà (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenoiat de metil (**170**) per tractament del amb hidròxid sòdic aquós (**Figura 175**), seguint el procediment descrit per Kim *et al.*<sup>134</sup>



**Figura 175.** Síntesi del fosforà **170**.

La presència, en l'il·lur de fòsfor, d'acceptors mesòmers forts, com el grup 4-metoxi-4-oxo-2-butenil, que deslocalitza la càrrega negativa generada en l'il·lur de fòsfor, permet emprar una base feble, hidròxid sòdic aquós,<sup>288</sup> per desprotonar la sal de fosfoni **171** i generar així el fosforà **170**.

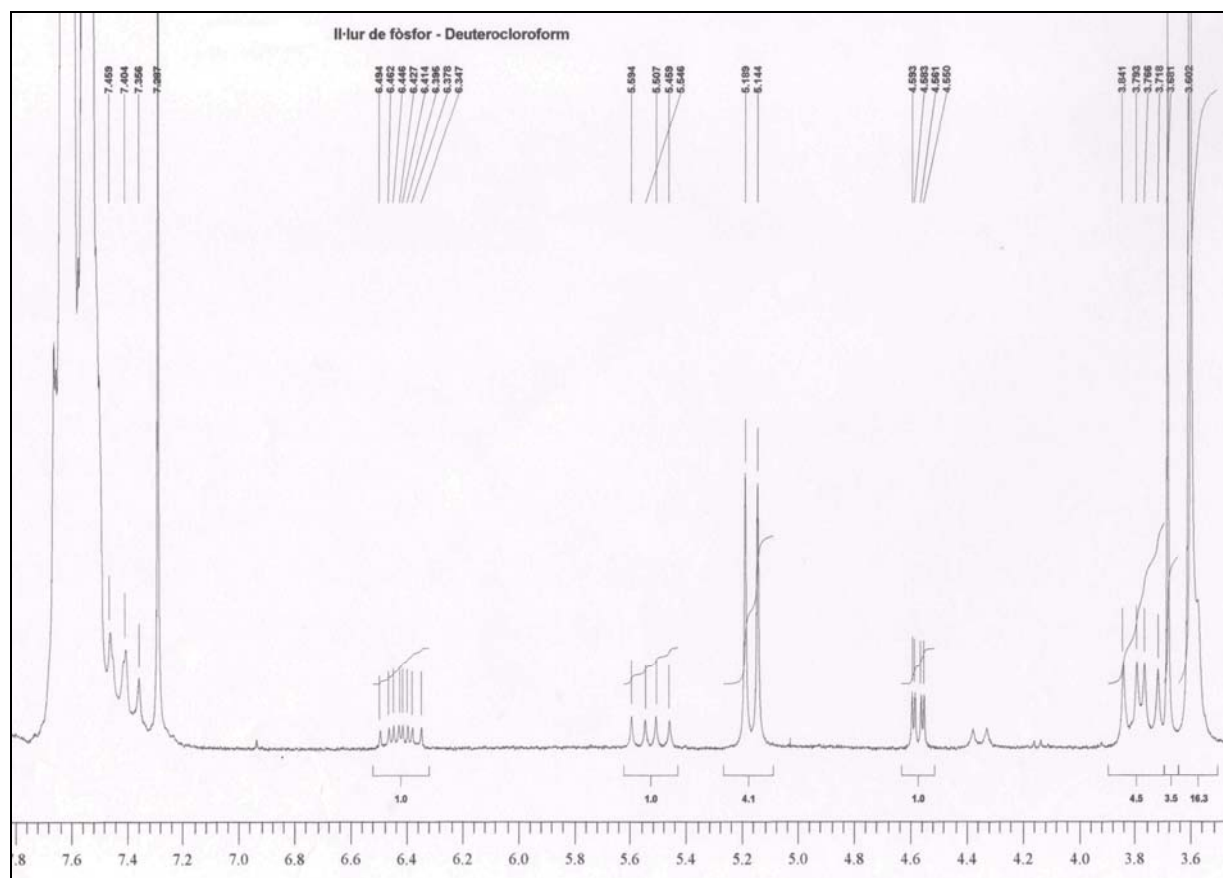
Generalment, però, l'obtenció d'il·lurs de fòsfor no substituïts amb grups acceptors mesòmers a partir de les corresponents sals de fosfoni té lloc amb l'ús d'una base forta tal com butilliti, amidur sòdic, hidrur sòdic o un alcòxid sòdic.<sup>289</sup> A més, l'il·lur de fòsfor estabilitzat **171** és estable en aigua freda, i això possibilita la formació de **170** en medi aquós.<sup>290</sup>

En aquest treball, després de 12 h de reacció, es van separar per filtració uns cristalls grocs que van precipitar en el medi de reacció. L'espectre de <sup>1</sup>H-RMN realitzat en CDCl<sub>3</sub> semblava indicar que no es tractava del producte **170** pur ja que s'observaven més senyals dels esperats al voltant de la zona de protons olefínics (7.5-3.5 ppm) (**Figura 176**).

Davant la sospita que l'aspecte complex de l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN pogués ser degut a impureses o a la descomposició de l'il·lur de fòsfor, els cristalls grocs es van purificar per recristal·lització d'acetat d'etil.<sup>291</sup> L'espectre de <sup>1</sup>H-RMN dels nous cristalls fou idèntic a l'obtingut amb els cristalls sense recristal·litzar. Així mateix, fou idèntic a l'espectre realitzat sobre els cristalls grocs obtinguts en repetir la reacció. Aquest fet semblà indicar que els cristalls ja eren prou purs i que la complexitat de l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN era degut a peculiaritats inherents en la molècula sintetitzada.

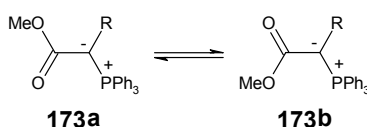
Per poder interpretar correctament l'espectre obtingut es va realitzar una recerca bibliogràfica sobre dades espectroscòpiques d'espècies similars.

Zeliger *et al.*<sup>292</sup> varen estudiar la rotació interna impedita de metoxicarbonilmetiltriphenilfosforans substituïts a la posició carbanionica (**Figura 177**) a través de tècniques de RMN de temperatura variable. Aquestes tècniques permeten estudiar cinèticament processos relacionats amb la mobilitat molecular (rotacions, inversions, etc.) i amb transformacions intramoleculares en els quals es disposa d'equilibris entre dos o més confòrmers o bé entre tautòmers.<sup>293</sup>



**Figura 176.** Espectre dels cristalls obtinguts en tractar **171** amb sosa.

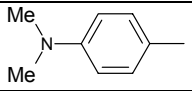
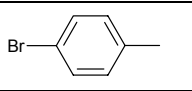
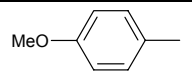
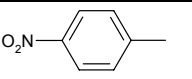
Zeliger *et al.*<sup>292</sup> també van publicar temperatures de coalescència ( $T_c$ ) (temperatura a la qual col·lapsen els senyals corresponents a nuclis anàlegs entre les espècies en equilibri) mesurades pel procés de rotació interna impedida dels metoxycarbonilmetilentrifenilfosforans **173** (Taula 63).



**Figura 177.** Rotació interna de l'estructura **173**.

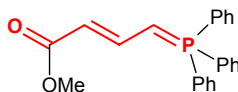
Segons els valors de  $T_c$  de la Taula 63, s'observa com els substituents alquílics ofereixen un impediment estèric important i, per tant, dificulten la rotació, augmenten la temperatura de coalescència. Per altra banda, la presència de substituents aromàtics rebaixa considerablement la  $T_c$  degut a la deslocalització de la càrrega negativa de l'il·lur en l'anell aromàtic. Això repercuteix en una pèrdua important del caràcter de doble enllaç de l'angle díedre implicat en el gir. Així, els substituents aromàtics, tot i el potencial impediment estèric que poden oferir, afavoreixen la rotació interna de la molècula. Aquest efecte no només no es dona en substituents alquílics, sinó que és potenciat en sentit contrari per la cessió inductiva que ofereixen.

Aquests resultats posen de manifest la presència, en il·lurs de fòsfor del tipus **173**, de rotació interna impedida, que pot donar lloc a un desdoblament de senyals en espectres de  $^1\text{H}$ -RMN quan es registren per sota de la temperatura de coalescència. La rotació interna impedida es dona per la conjugació del carbonil de l'ester metílic amb el carbaní de l'il·lur de fòsfor, que estabilitza preferentment les dues posicions en que els dos àtoms del carbonil i els dos de l'il·lur de fòsfor són coplanaris.

R	Tc ± 3° C	R	Tc ± 3° C
H	35	<i>n</i> -pentil	60
Me	68	<i>i</i> -butil	65
Et	62	<i>i</i> -propil	36
Propil	58	Fenil	-48
	-17		-59
	-19		< -65

**Taula 63.** Tc per als metoxicarbonilmetilentrifenilfosforans **173** amb diferents substituents (R).

En el cas que ens ocupa, **170**, que es diferencia de **173** en que incorpora un grup vinilen entre el carboni i l'ester metílic, pot patir també rotacions internes impedides per conjugació de l'ester metílic i el carboni a través del grup vinilen. Els rotàmers que puguin estar en equilibri han de tenir coplanaris els àtoms que es mostren en roig en la **Figura 178**. Aquests són els dos àtoms del carbonil, els dos àtoms de carboni del grup vinilen i els dos de l'il·lur de fòsfor.

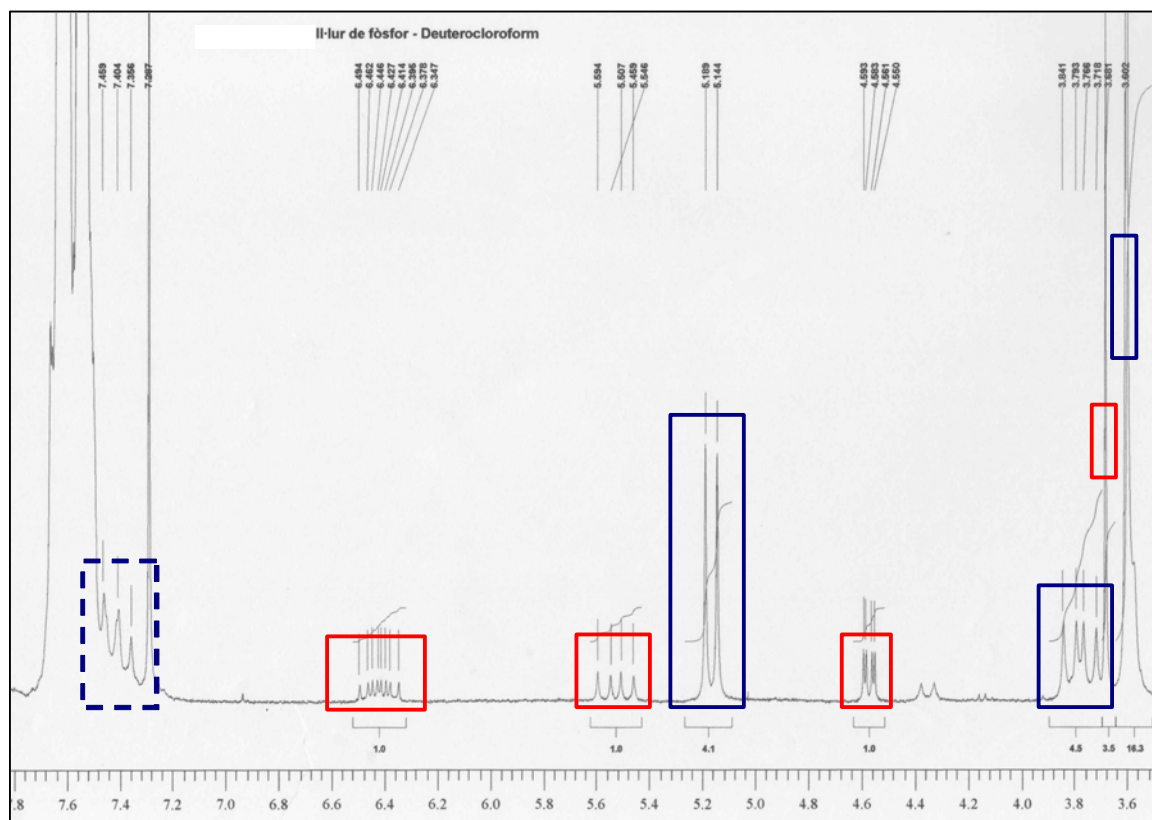


**Figura 178.** Àtoms de **170** que han d'estar coplanaris per a que els rotàmers puguin estar en equilibri (en roig).

Sota aquesta suposició, es realitza un anàlisi acurat de l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN dels cristalls grocs obtinguts en el tractament de **171** amb hidròxid sòdic aquós. Cada rotàmer ha de presentar tres senyals d'integral relativa 1 corresponents als tres protons olefínics, un senyal d'integral relativa 3 corresponent a l'ester metílic i un darrer senyal d'integral relativa 15 corresponent als protons aromàtics.

S'identifiquen dos grups de senyals d'aspecte anàleg. Es creu que corresponen a dos rotàmers de **170**, que s'anomenaren A i B. En la **Figura 179** els senyals corresponents al rotàmer A s'enquadren de color roig i els senyals corresponents al rotàmer B de color blau. Els protons aromàtics dels dos rotàmers se solapen entre 7.63 i 7.47 ppm. No es consideren en la següent discussió.

El rotàmer A presenta 4 senyals. Tres d'ells, dos dobles de dobles i un doblet de dobles de dobles, situats a 6.40, 5.50 i 4.55 ppm, respectivament, i d'integral relativa 1, s'assignen als tres protons olefínics. El quart senyal, un singlet d'integral relativa 3 situat a 3.66 ppm, s'assigna a l'ester metílic. El rotàmer B presenta un singlet d'integral relativa 3 situat a 3.58 ppm, assignable a l'ester metílic, i dos senyals, un doblet i un doblet de dobles, situats a 5.14 i 3.76 ppm, respectivament, i d'integral relativa 1, assignables a dos protons olefínics, i sembla que manqui un senyal que pugui ser atribuït al tercer protó olefínic. Es creu que pot correspondre al senyal, enquadrat amb una línia blava discontinua, solapat parcialment amb el senyal corresponent als protons aromàtics.



**Figura 179.** Espectre de **170** en deuterocloroform, en roig s'enquadren els senyals del rotàmer A i en blau els del B.

Per tal d'identificar els dos rotàmers en equilibri cal separar aquest senyal del multiplet corresponent als protons aromàtics. Es recorre a l'estratègia de realitzar l'espectre emprant diferents dissolvents esperant que aleatòriament n'hi hagi algun que pugui separar els dos senyals.

L'espectre es registra primerament en una mescla de cloroform deuterat amb perdeuterobenzè ( $\text{CDCl}_3 + \text{C}_6\text{D}_6$ ), però no s'obté el resultat esperat. Per altra banda, es realitza l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN dissolent el compost sintetitzat en perdeutoacetona. Aquest dissolvent, per la seva baixa viscositat, afavoreix els moviments de les molècules. S'obté un espectre en que el senyal del tercer protó olefínic se separa del multiplet corresponent als protons aromàtics. Ara bé, la resolució del senyal no és bona. Finalment, es realitza l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del compost sintetitzat en perdeuterodimetilsulfòxid. S'obté un espectre en que s'assoleix la separació del senyal del protó olefínic que mancava amb una resolució apta per a procedir a la identificació dels dos rotàmers en equilibri. Els altres senyals romanen a desplaçaments químics semblants als anteriors i mantenen el seu aspecte (**Figura 180**). Els senyals corresponents al rotàmer A es troben enquadrats en roig i els corresponents al rotàmer B en blau.

A continuació, es procedeix a identificar els dos rotàmers. Per identificar de quins 2 rotàmers es tracta, en primer lloc cal considerar totes les possibilitats que hi pot haver. L'il·lur de fòsfor **170** té 3 angles diedres que poden estar implicats en processos de rotació interna impedita (**Figura 181**). Cada angle diedre pot prendre com a valor  $0^\circ$  o bé  $180^\circ$ , és a dir, hi ha 2 valors per a cada un dels 3 angles diedres. Això genera un total de 8 possibilitats (**Figura 182**).

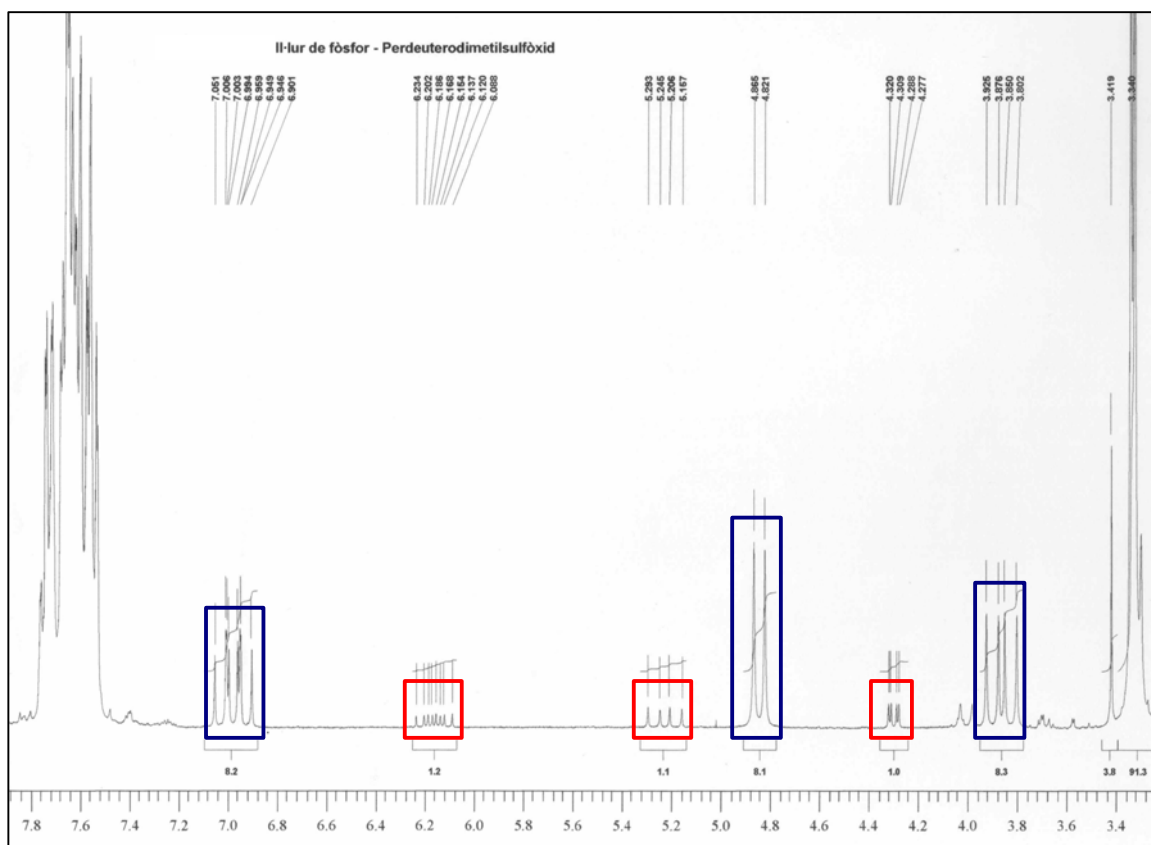


Figura 180. Espectre de **170** en perdeuterodimetilsulfòxid, en roig s'enquadren els senyals de A i en blau els de B.

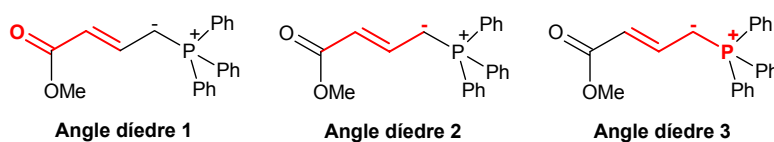


Figura 181. Possibles angles dièdres implicats en la rotació interna impedida de **170**.

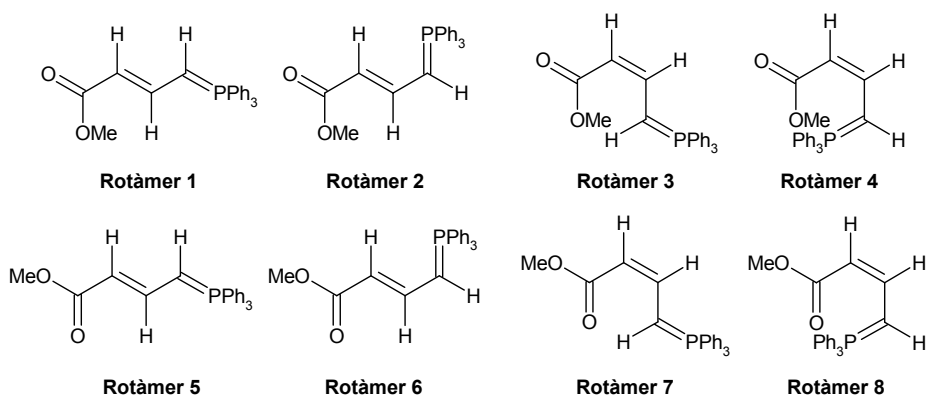


Figura 182. Els 8 rotàmers possibles de la molècula **170**.

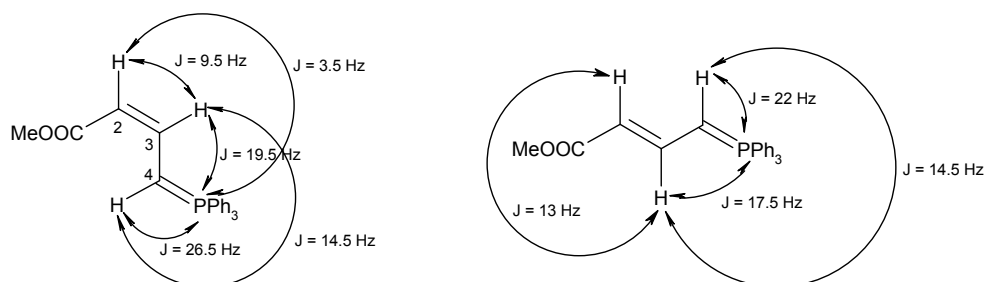
Ara bé, es creu viable equiparar el comportament de l'angle dièdre 1 de **170** amb el de **173** quan aquest té una R = H, donada la seva similitud estructural. En aquest cas, la Tc de **173** és de  $35 \pm 3$  °C (Taula 63). Segons Zeliger *et al.*,<sup>292</sup> aquesta és una temperatura massa baixa com per distingir dos rotàmers que presentin una rotació impedida en aquest angle dièdre a 25 °C, temperatura a la que s'ha registrat l'espectre

de  $^1\text{H}$ -RMN. Així, es conclou que l'angle diedre 1 presenta rotació lliure a aquesta temperatura i, per tant, es poden descartar els rotàmers 5-8.

Per discernir a quins rotàmers corresponen els dos grups de senyals identificats es procedeix a l'anàlisi de les seves constants d'acoblament.

El rotàmer A presenta dos doblets de doblets (dd) i un doblet de doblets de doblets (ddd). Degut a la seva multiplicitat, el ddd s'assigna al protó en posició 3. Aquest senyal presenta amb els dos dd com a constants d'acoblament els valors de 9.5 Hz i 19.5 Hz. El primer valor es correspon amb el que presenten 2 protons situats en posició *cis* en un doble enllaç (4-12 Hz).<sup>294</sup> El segon valor es correspon amb el que presenten 2 protons situats en posició *trans* en un doble enllaç (14-19 Hz). Per tant, el rotàmer A pot correspondre o al rotàmer 2 o al 3, ja que els dos presenten un doble enllaç *trans* i l'altre doble enllaç *cis*. La diferenciació entre les dues estructures es realitza a través de les constants d'acoblament dels protons amb l'àtom de fòsfor ( $J_{\text{HP}}$ ). Les constants d'acoblament respectives disminueixen a mesura que augmenta la distància respecte l'àtom de fòsfor (26.5 Hz, 19,5 Hz i 3.5 Hz). A través d'aquesta apreciació, es poden assignar unívocament els senyals a cadascun dels 3 protons. Així, es conclou que el doble enllaç entre els protons situats a les posicions 2 i 3 és *cis*, i que el situat entre els protons de les posicions 3 i 4 és *trans* (rotàmer 3, **Figura 183**). L'acoblament  $J_{\text{HP}} = 3.5$  Hz s'observa per la disposició en W dels enllaços entre els dos nuclis.

Pel que fa al rotàmer B, a aquest li corresponen un doblet (d), un doblet de doblets (dd) i un doblet de doblets de doblets (ddd). De nou, degut a la seva multiplicitat, el ddd s'assigna al protó en posició 3. Aquest senyal presenta amb els dos dd com a constants d'acoblament els valors de 13 Hz i 14.5 Hz. Per tant, els dos dobles enllaços presents a la molècula presenten geometria *trans*. Amb la qual cosa el rotàmer B correspon al rotàmer 1 (**Figura 183**).



**Figura 183.** Acoblaments, observats en l'espectre, pels protons olefínics i el nucli de  $^{31}\text{P}$ . A l'esquerra es mostra el rotàmer 3 i a la dreta, el rotàmer 1.

Es creu que per l'angle diedre 3 no s'observa rotació en cap dels dos rotàmers degut a l'impediment estèric donat pel grup trifenilfosforaniliden.

Així, el (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenoat de metil (**170**) té rotació interna impedida al voltant de l'angle diedre 2. Això implica l'existència de dos rotàmers en equilibri (**Figura 184**), detectables per  $^1\text{H}$ -RMN.

Pel que fa a les poblacions relatives dels dos rotàmers de **170** a t.a., a la **Taula 64** es mostren els resultats obtinguts a partir de la comparació de les àrees relatives dels senyals obtinguts en els diferents espectres de  $^1\text{H}$ -RMN realitzats amb varis dissolvents. D'aquests resultants es desprèn que el rotàmer **170b** és el majoritari i que la proporció entre els dos rotàmers varia amb el dissolvent, oscil·lant entre 4:1 i 9:1.



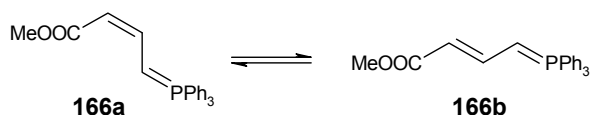


Figura 184. Rotàmers de 170 en equilibri.

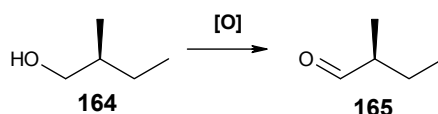
Espectre	Dissolvent	Proporció 170a	Proporció 170b
1	CDCl <sub>3</sub>	1	4
2	CDCl <sub>3</sub> + C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	1	4
3	CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub>	1	4
4	CD <sub>3</sub> SOCD <sub>3</sub>	1	9

**Taula 64.** Poblacions relatives dels rotàmers **170a:170b** segons el dissolvent emprat en registrar l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN.

Per tant, s'ha assolit la síntesi de **170**, intermedi per la síntesi de la cadena **bq**, amb un rendiment del 81%, superior al descrit (72%).<sup>134</sup> Per altra banda, cal mencionar que no cal purificar els cristalls que es filtren del medi de reacció, doncs el producte és prou pur per emprar-lo en el següent pas de síntesi, malgrat la complexitat de l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN.

### 2.2.1.2. Síntesi de (S)-2-metilbutiraldehid (164)

El (S)-2-metilbutiraldehid (**164**) s'obté per oxidació de l'alcohol quiral (S)-2-metilbutanol (**163**), **Figura 185**.

Figura 185. Oxidació de (S)-2-metilbutanol (**163**) per rendir (S)-2-metilbutiraldehid (**164**).

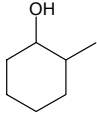
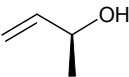
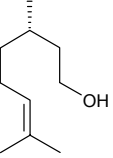
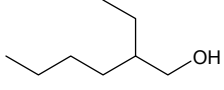
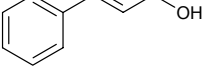
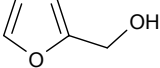
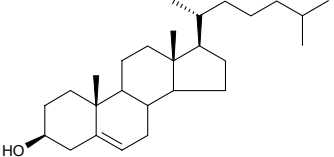
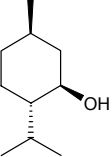
S'han descrit nombrosos processos per realitzar l'oxidació de **163** a **164**. S'han emprat com a oxidants clorocromat de piridini (PCC),<sup>294,296</sup> 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO),<sup>297-299</sup> DMSO en diclorur d'oxalil (oxidació de Swern),<sup>300,301</sup> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>,<sup>302</sup> CrO<sub>3</sub><sup>287</sup> o Ni Raney.<sup>303</sup>

Akao *et al.*<sup>283</sup> descriuen l'oxidació amb una suspensió de PCC i sílice en diclorometà durant 3 h a t.a. però realitzant l'addició de reactius a 0 °C. Les condicions del medi han de ser anhidres per evitar la formació de l'hidrat de l'aldehid, que ràpidament evoluciona a l'àcid carboxílic corresponent. El procés de purificació consisteix en la separació per filtració del PCC i de la sílice. No es descriu el rendiment obtingut en la reacció, doncs s'empra directament la dissolució de **164** en diclorometà, obtinguda en la filtració, en el següent pas de síntesi.

En la **Taula 65** es mostra els rendiments obtinguts per aquest autor<sup>283</sup> per l'oxidació amb PCC adsorbit sobre suport sòlid d'altres substrats corresponents. Es mostren els valors de rendiment determinats per CG i els rendiments de producte aïllat entre parèntesi.

En la present tesi, es va treballar amb PCC adsorbit en suport sòlid ja que ofereix una reacció més neta i elimina problemes relacionats amb el caràcter àcid del PCC.<sup>304</sup>

En el primer experiment realitzat es van posar de manifest la impossibilitat de monitoritzar per CCF **163** i **164**, ja que són substàncies volàtils i no queden adsorbides a la placa de cromatografia. A més el seu baix punt d'ebullició impedeix aïllar-los del cru de reacció si es vol eliminar el dissolvent a pressió reduïda. Per aquest motiu s'empra la dissolució de **164** en diclorometà directament en el següent pas de síntesi.

Alcohol	Rdt./%	Alcohol	Rdt./%
 2-metilciclohexanol	99 (83)	 Alcohol β-metilal·lic	98
 Citronel·lol	97 (82)	 2-etilhexanol	97 (87)
 Alcohol cinam·lic	98 (84)	 Alcohol furfur·lic	98 (45)
 Colesterol	97 (80)	 Mentol	97 (94)

**Taula 65.** Rendiments obtinguts en oxidar diversos alcohols amb PCC. Es mostra, per a cada producte, el rendiment determinat per CG i, entre parèntesi, el rendiment de producte aïllat.

Així, es va dur a terme la reacció sense fer-ne el seguiment per CCF. Sobre una suspensió uniforme de PCC i sílice en diclorometà s'addicionà **163** a 0 °C. A les 3 h de reacció, el PCC i la sílice se separaren per filtració. La dissolució de diclorometà obtinguda s'emprà en el següent pas de síntesi sense cap altre tractament (dissolució 1).

Així, s'assajà la reacció de Wittig entre la dissolució de diclorometà del pressuposat al·dehid **164** format i l'il·lur de fòsfor **170** per obtenir el dendrifielat A de metil (**168**). Seguint el procediment que es descriu a l'apartat 2.2.1.3 d'aquest capítol, es va obtenir **168** amb un rendiment del 10%. Tot i que el rendiment descrit per aquesta reacció és del 20%, un rendiment del 10% es considerarà suficientment baix per estudiar-ne les causes. Aquestes poden ser:

- Baix rendiment en la formació de **164**. La mala monitorització de la conversió de **163** a **164** o la defectuosa elaboració del reactiu de PCC sobre suport sòlid.
- La reacció de Wittig.

Per aquest raó es va decidir valorar l'eficiència de la preparació del PCC, assajant-lo sobre un substrat

fàcilment monitoritzable, i posar a punt un mètode de seguiment per CG de l'oxidació de **163** a **164**.

### A. Preparació de PCC sobre $\text{Al}_2\text{O}_3$ o $\text{SiO}_2$

Es va preparar el PCC adsorbit sobre suport sòlid prèviament tal com descriuen Cheng *et al.*<sup>304</sup> Aquests autors sintetitzen el PCC en dissolució aquosa àcida. A continuació hi addicionen alúmina i escalfen la dissolució a 40 °C. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. El reactiu obtingut es pot mantenir durant varies setmanes en la foscor a pressió reduïda sense perdre activitat.

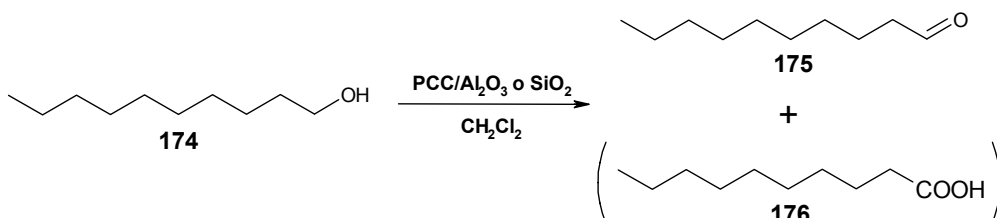
En aquest treball es va dissoldre el PCC en acetona. S'hi addicionà a continuació un suport sòlid, alúmina o sílice. El sistema s'escalfà fins arribar a ebullició. Posteriorment, es deixà refredar i el dissolvent s'eliminà a pressió reduïda.

### B. Síntesi de capraldehid (**175**) a partir de 1-decanol (**174**)

Com a substrat fàcilment monitoritzable sobre el qual assajar l'oxidació es va escollir el 1-decanol (**175**) perquè no és volàtil (p.eb. = 229 °C)<sup>305</sup> i perquè té una estructura, de naturalesa alquíllica, anàloga a **163**.

Cheng *et al.*<sup>304</sup> descriuen el tractament d'alcohols en diclorometà durant 2 h amb una relació compresa entre 1.6 i 3 vegades superior a l'equimolar de PCC adsorbit sobre suport sòlid.

En aquest treball, es realitzaren dos experiments de l'oxidació de **175** a **176** emprant PCC adsorbit sobre suport sòlid com a agent oxidant (**Figura 186**) i variant el temps de reacció.



**Figura 186.** Oxidació de **174** a **175** emprant PCC com a agent oxidant.

En els dos casos es va suspendre PCC adsorbit sobre suport sòlid, preparat com s'ha indicat en l'apartat anterior, en diclorometà i s'hi addicionà **174**. Les reaccions es deixaren evolucionar a t.a. per proporcionar els resultats de la **Taula 66**. La primera reacció es va deixar reaccionant 210 minuts i la segona únicament 50 minuts per tal d'evitar la sobreoxidació de l'alcohol **174** a àcid capric (**176**).

Experiment	Temps/min	% 174	% 175	% 176
1	210	5	40	55
2	50	10	90	-

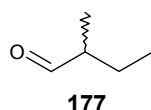
**Taula 66.** Proporció de productes en el cru de reacció determinat per integrals relatives en l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN.

La formació de **176** en un 55% en la primera reacció indicà la necessitat de controlar el temps de reacció per evitar la formació de productes de sobreoxidació no desitjats. Així, quan la reacció es va dur a terme

durant 50 minuts, es va obtenir l'aldehid desitjat amb un 90% de rendiment, sense detectar-se subproductes. Amb aquests resultats queda comprovat que el mètode d'oxidació emprant PCC adsorbit sobre un suport sòlid funciona i que un temps de reacció massa alt comporta la sobreoxidació d'aldehid a àcid carboxílic.

### C. Monitorització de l'oxidació de 163 a 164 per CG

La monitorització de la reacció d'oxidació de **163** a **164** per cromatografia de gasos (CG) permeté una determinació quantitativa del rendiment de la reacció. No obstant, això requeria la disponibilitat de patrons. Es disposava de patrons de **163**, però no de **164**. Ara bé, el racemat de **164**, el ( $\pm$ )-2-metilbutiraldehid (**177**), és comercial i donat que la columna cromatogràfica on es duqué a terme la separació era aquiral, aquesta no distingeix entre **164** i **177**, es considerà que una recta patró efectuada amb **177** podia ser emprada per a la determinació quantitativa de **164**.

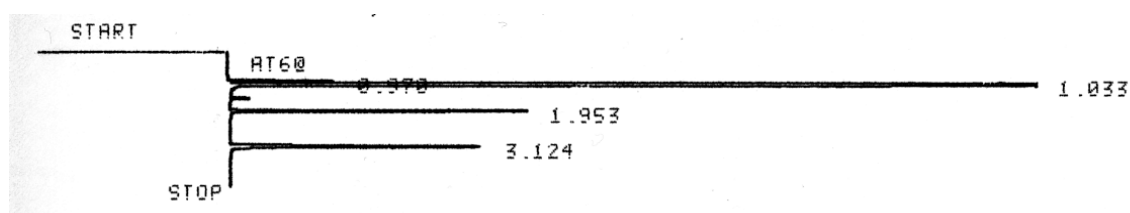


**Figura 187.** ( $\pm$ )-2-metilbutiraldehid (**177**), racemat de **164**.

En primer lloc, es posaren a punt condicions cromatogràfiques per detectar i quantificar **163** i **177**, la mescla racèmica de **164**. Es prepararen 3 dissolucions en diclorometà, una amb la concentració inicial de **163** en el medi, la segona amb la mateixa concentració de **177** i la tercera amb **163** i **177** amb aquestes concentracions i es determinaren els temps de retenció ( $t_R$ ) emprant una temperatura de forn de 40 °C i 50 °C, **Taula 67**. La resolució més alta es va obtenir emprant una temperatura de forn de 50 °C, **Figura 188**.

Temperatura forn/ °C	$t_R$ (177)	$t_R$ (163)
40	1.624	2.384
50	1.953	3.124

**Taula 67.** Temps de retenció de **163** i **177** en el cromatògraf de gasos.



**Figura 188.** Cromatograma de gasos de **163** i **177**. El pic a 1.033 correspon al diclorometà.

Per a determinar el rendiment de la reacció de **163** a **164**, es va suspendre PCC adsorbit sobre un suport sòlid en diclorometà. Sobre aquesta suspensió s'hi addicionà el (*S*)-2-metilbutanol (**163**). Cada interval de temps que es volia mesurar, es prenia mostra del medi de reacció i els resultats obtinguts en el cromatograma s'interpolaven a les rectes patrons de **163** i **177**.

En una primera experiència, la mostra s'injectà directament a l'equip proporcionant resultats incorrectes degut a la seva heterogeneïtat, per la presència de PCC adsorbit sobre suport sòlid, i a que, al no eliminar

l'agent oxidant de la mostra, la reacció no s'aturava. Per tant, les concentracions mesurades no corresponien exactament al temps de presa de mostra. Per tant, es va decidir eliminar l'agent oxidant abans d'injectar la mostra. Així, amb una xeringa s'agafava un volum homogeni del medi de reacció i aquest s'enrasava amb 5 mL de diclorometà. El sòlid que s'havia arrossegat en la presa de mostra es deixava decantar i la dissolució sobrenedant s'introduïa en un vial, des d'on s'injectà al cromatògraf.

Cal tenir en compte que les quantitats mesurades a partir dels cromatogrames obtinguts no es podien referir al volum total de 5 mL en que s'havia dissolt la mostra, doncs un volum considerable dels 5 mL totals l'ocupava el sòlid del medi de reacció. Davant aquesta circumstància, es va decidir aproximar el rendiment de la reacció al quocient de la concentració de **164** mesurada directament en el cromatograma respecte a la suma de les corresponents concentracions de **163** i de **164** (**Equació 16**), doncs no es detectava la formació de subproductes.

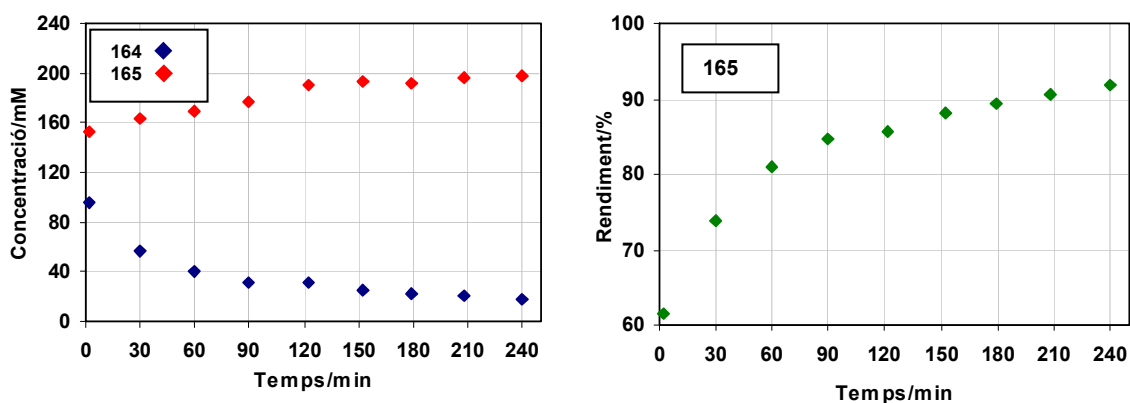
$$\text{Rendiment (\%)} \approx \frac{\text{concentració 165}}{\text{concentració 165} + \text{concentració 164}}$$

**Equació 16.** Rendiment de la reacció d'oxidació de **163** mesurat com el quocient de la concentració de **164** entre la suma de concentracions de **163** i de **164**.

Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 68** i a la **Figura 189**.

Temps/min	[164]/mM	[163]/mM	Rdt./%
2	154	96	62
30	163	58	74
60	170	40	81
90	177	32	85
122	190	32	86
152	194	26	88
179	191	23	89
208	196	21	91
240	198	18	92

**Taula 68.** Concentració i rendiment de la reacció de **163** i de **164** monitoritzada per CG.



**Figura 189.** Gràfics de la concentració i rendiment de la reacció de **163** i de **164** monitoritzada per CG.

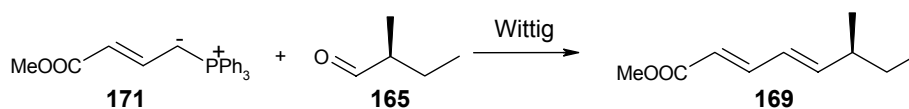
S'observa com la gràfica del rendiment presenta una tendència asimptòtica respecte el temps de reacció. Davant d'una tendència d'aquest tipus cal establir un compromís entre el temps de reacció i el rendiment

que se n'obté, considerant adequat un rendiment 92% després de 4 hores de reacció. Així, es disposa d'un mètode per dur a terme el seguiment de la reacció d'oxidació de **163** a **164** i avaluar-ne el rendiment. La dissolució de **164** en diclorometà obtinguda, després de la filtració del reactiu sòlid, s'emprà en el següent pas de síntesi sense cap tractament posterior (dissolució 2).

La monitorització d'aquesta reacció ha permès concloure que en obtenir **164** amb alt rendiment, el baix rendiment de la síntesi del dendrifielat A de metil (**168**) ha de ser conseqüència de la pròpia reacció de Wittig.

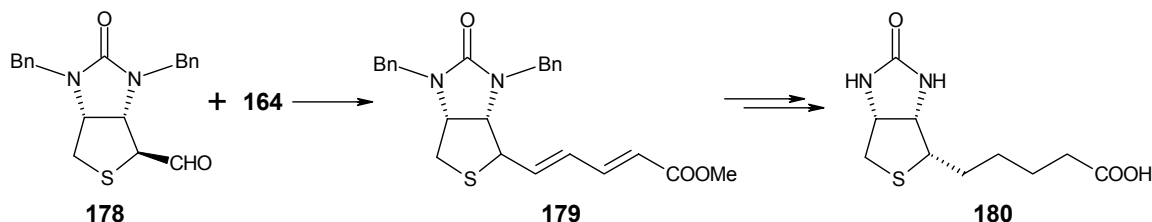
### 2.2.1.3. Síntesi de dendrifielat A de metil (**168**)

Un cop sintetitzats el fosforà **170** i l'aldehid **164**, ja es poden fer reaccionar per rendir el dendrifielat A de metil (**168**), **Figura 190**.



**Figura 190.** Reacció de Wittig entre **170** i **164** per rendir **168**.

L'ús del fosforà **170** ha estat descrit en reaccions de Wittig en diverses ocasions.<sup>305-308</sup> Com a exemple cal destacar que s'ha emprat en la síntesi de D-(+)-biotina (**180**).<sup>306</sup> En aquest cas, l'aldehid **178** es tracta amb **170** en diclorometà durant 12 h a t.a. i s'obté l'ester **179** amb un 89% de rendiment (**Figura 191**).



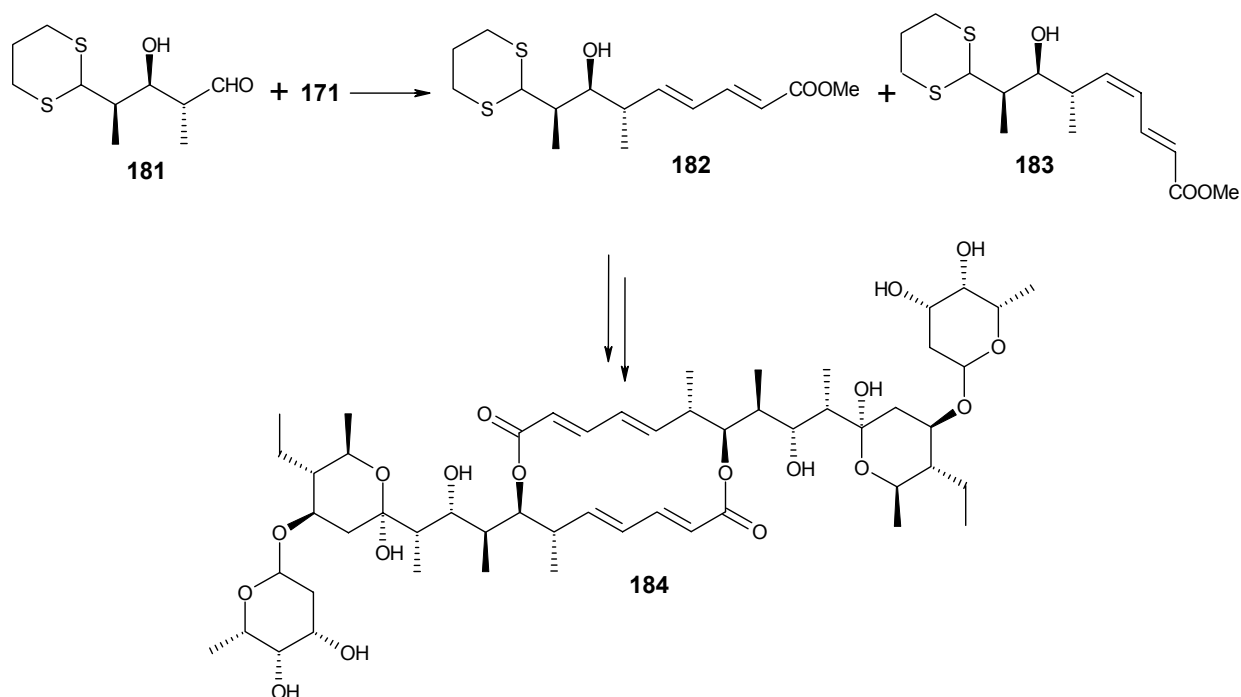
**Figura 191.** Síntesi de D-(+)-biotina (**180**).

El fosforà **170** també s'ha emprat en una reacció de Wittig en la síntesi total de l'antibiòtic elaiofilina (**184**).<sup>307</sup> Així, el tractament de l'aldehid **181** amb **170** en toluè a 80 °C durant 30 minuts rendeix l'ester dienoic **182** i el seu isòmer **183** amb rendiments respectius del 51 i del 21% (**Figura 192**).

Per altra banda, l'aldehid **164** també ha estat emprat en diverses reaccions de Wittig.<sup>287,300,309,310</sup> Un exemple el tenim en el seu ús en la síntesi de la (+)-avermectina B1a.<sup>309</sup>

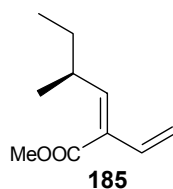
Pel que fa a la síntesi del compost d'interès, el dendrifielat A de metil (**168**), Kim *et al.*<sup>134</sup> descriuen el tractament d'una dissolució de l'aldehid **164** en diclorometà amb **170** a t.a. durant una nit. Obtenen **168** amb un rendiment del 20%. Seguint aquest procediment, en una primera experiència es va tractar la dissolució de **164** en diclorometà obtinguda prèviament (dissolució 1) (veure pàgina 197) amb **170** durant 14 h i 15 minuts a t.a. El cru obtingut es purificà per cromatografia flash i, posteriorment, per cromatografia líquida de baixa pressió, aïllant-se el dendrifielat A de metil (**168**) amb un rendiment del 10%. S'aïllà també l'isòmer resultant de la formació del doble enllaç en *cis* a la reacció de Wittig, el (2*Z*,4*E*,6*S*)-6-metil-2,4-octadienoat de metil (**169**), amb un rendiment del 4%. Això, representa una proporció de 3:1 de **168** (isòmer *E*):**169**

(isòmer *Z*), determinat per  $^1\text{H-RMN}$ .



**Figura 192.** síntesi total de l'antibiòtic elaiofilina (**184**).

També es va detectar i allar un altre isòmer de **168**, el (4*S*,2*Z*)-4-metil-2-vinil-2-hexenoat de metil (**185**), amb un rendiment del 2%. No s'ha trobat una justificació clara per a la seva formació.



**Figura 193.** (4*S*,2*Z*)-4-metil-2-vinil-2-hexenoat de metil (**185**).

Seguint el mateix procediment es va realitzar altre cop la reacció. Aquest cop es va emprar la dissolució de **164** en diclorometà (dissolució 2) de la qual se n'havia mesurat un rendiment d'obtenció de **164**, per cromatografia de gasos, del 92% (veure pàgina 201). Es va obtenir un cru que, després de varies purificacions cromatogràfiques, va rendir el producte d'interès **168** amb un 8%, acompanyat dels isòmers **169** i **185**.

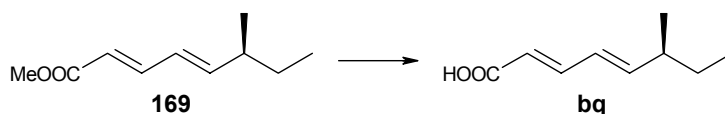
A continuació, es mostra el rendiment dels isòmers aïllats en les reaccions de Wittig realitzades (**Taula 69**).

Reacció	Rdt 168	Rdt 169	Rdt 185
1	10%	4%	2%
2	8%	0.5%	2%

**Taula 69.** Rendiments dels isòmers aïllats en les dues reaccions de Wittig.

### 2.2.1.4. Hidròlisi del dendrifielat A de metil (168)

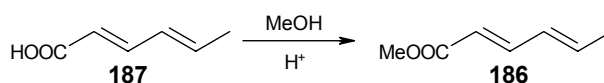
L'àcid dendrifielat A (**bq**) s'obté per hidròlisi del grup ester del dendrifielat A de metil (**168**), **Figura 194**.



**Figura 194.** Hidròlisi del dendrifielat A de metil (**168**) per rendir l'àcid **bq**.

Aquesta reacció ha estat descrita per dos autors. Akao *et al.*<sup>283</sup> saponifiquen **168** amb LiOH en una mescla metanol:aigua (4:1) tota una nit a t.a. però realitzant l'addició a 0 °C. Posteriorment, acidulen la solució resultant amb àcid acètic i obtenen **bq** amb un rendiment del 68%. Guerriero *et al.*<sup>287</sup> tracten **168** amb una dissolució de KOH al 3% en metanol a 40 °C durant 4 h. Després de l'acidulació del medi de reacció amb àcid acètic, obtenen **bq** amb un rendiment del 78%.

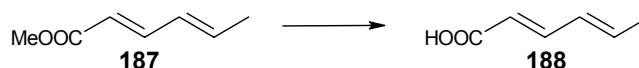
Abans de realitzar la reacció sobre el dendrifielat A de metil (**168**) es va creure oportú realitzar una sèrie de proves amb una molècula d'estructura anàloga a **168**, el sorbat de metil (**186**), doncs, la quantitat de dendrifielat A de metil (**168**) de que es disposava era baixa. L'ester metílic **186** es va sintetitzar, amb un 96% de rendiment, a partir de l'àcid sòrbic (**187**) per mitjà de l'esterificació de Fischer, tractament de l'àcid carboxílic amb excés de metanol en medi àcid (**Figura 195**).<sup>289</sup>



**Figura 195.** Síntesi del sorbat de metil (**186**).

En disposar de l'ester **186**, es va assajar la seva hidròlisi (**Figura 196**) sota les condicions descrites per Guerriero *et al.*<sup>287</sup> que havien assolit amb un rendiment del 78% la síntesi de l'àcid dendrifielat A (**bq**) a partir del dendrifielat A de metil (**168**).

Al laboratori d'Esteroides, el sorbat de metil (**186**) es va fer reaccionar amb hidròxid potàssic al 3% en metanol a 50 °C durant 4 h. Les extraccions del cru de reacció van rendir una fracció, que equivalia a un 70% de recuperació, on es detectà **187** amb nombroses impureses. Per altra banda, es va recuperar una altra fracció, que equivalia a un 5% de recuperació, on es detectà **186**, també impurificat. També es van obtenir crus complexos quan es va repetir la reacció en les mateixes condicions i purificant el cru directament per tècniques cromatogràfiques.

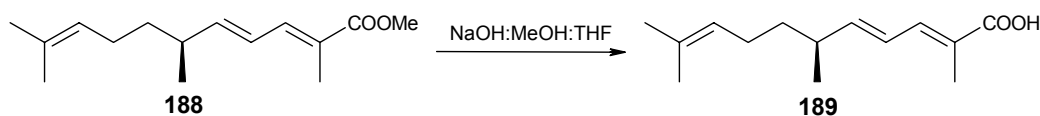


**Figura 196.** Hidròlisi del sorbat de metil (**186**) per rendir l'àcid sòrbic (**187**).

Davant els resultats obtinguts en les dues reaccions anteriors, es va decidir reproduir les condicions de Takikawa *et al.*<sup>311</sup> emprades per a la hidròlisi de l'ester **188**. Aquests autors descriuen la hidròlisi de l'ester metílic **188** a l'àcid **189** (**Figura 197**) emprant una mescla de NaOH 1 N, MeOH i THF (1:1:1) durant una nit a t.a. El cru de reacció s'acidula amb àcid clorhídric diluït fins a un pH de 3. Finalment, després d'extraccions del cru amb acetat d'etil i la seva posterior purificació per una columna cromatogràfica, s'obté



**189** amb un rendiment del 87%.



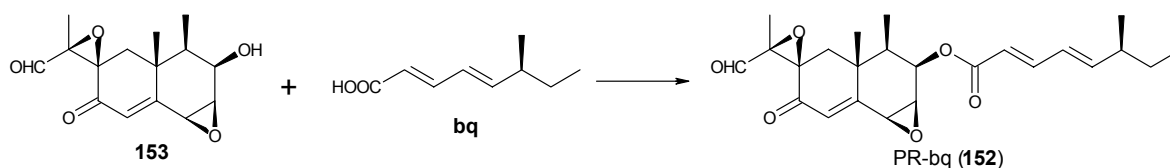
**Figura 197.** Hidròlisi de l'ester metílic **188** per rendir l'àcid **189**.

Es reproduïren aquestes condicions sobre el sorbat de metil (**186**) i s'obtingueren uns cristalls blancs que s'identificaren com a **187** pur. El rendiment obtingut fou del 93% sense necessitat d'una purificació cromatogràfica posterior.

Finalment, en fer reaccionar **168** sota aquestes mateixes condicions es va obtenir la cadena d'interès **bq** amb un 98% de rendiment (**Figura 194**).

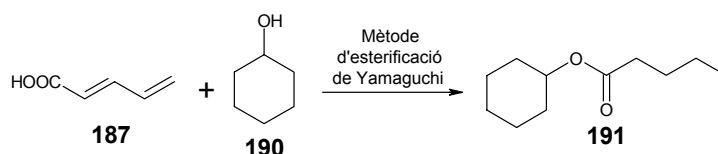
### 2.2.2. Esterificació del PR alcohol (**153**) i l'àcid dendrifièlic A (**bq**)

Tal com s'ha dit, el PR-bq (**152**) es pot obtenir pel mètode d'esterificació de Yamaguchi<sup>284</sup> entre l'àcid dendrifièlic A (**bq**) i el PR alcohol (**153**) (**Figura 198**).



**Figura 198.** Esterificació entre l'àcid dendrifièlic A (**bq**) i el PR alcohol (**153**) per rendir PR-bq (**152**).

En aquest treball, es va realitzar una síntesi prèvia a la del PR-bq (**152**). Es van esterificar l'àcid sòrbic (**187**), assimilable a dendrifièlic A (**bq**), i el ciclohexanol (**190**), assimilable al PR alcohol (**153**), per rendir el sorbat de ciclohexil (**191**), **Figura 199**.



**Figura 199.** Síntesi del sorbat de ciclohexil (**191**).

Pel mètode d'esterificació de Yamaguchi<sup>284</sup> es va obtenir el sorbat de ciclohexil (**191**) amb un rendiment del 54%, que, tot i no ser molt elevat, es considerarà suficient per sintetitzar PR-bq (**152**) amb les mateixes condicions (**Figura 198**). Es va obtenir un oli que, després de successives purificacions cromatogràfiques, va rendir PR-bq (**152**) amb un rendiment del 15%.

Per tal d'avaluar l'activitat de **152**, i obtenir una dada d'activitat el més acurada possible, en les separacions cromatogràfiques realitzades es va recollir **152** en cinc fraccions, i es destinà la central, la més pura de totes, per avaluar-ne l'activitat biològica amb el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT) (veure pàgina 218).

### 2.3. Síntesi de PR-ad (160)

Per sintetitzar aquest mimètic, després de desprotegir la PR toxina (19), s'ha de protegir la cadena lateral **ad** per ancorar-la al PR alcohol (153) evitant atacs nucleòfils no desitjats. Un cop s'hagi protegit i ancorat la cadena lateral **ad** a 153, s'haurà de desprotegir.

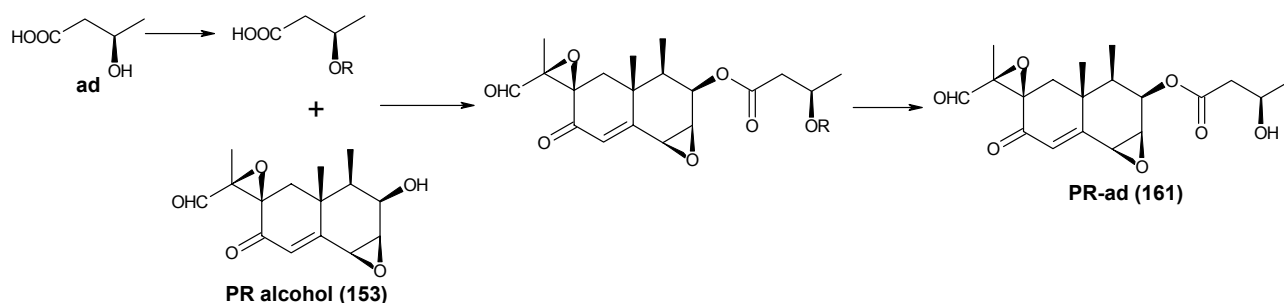


Figura 200. Síntesi de PR-ad (160) a partir de PR-alcohol (153) i la cadena lateral **ad**.

#### 2.3.1. Protecció de l'àcid (S)-3-hidroxibutíric (ad)

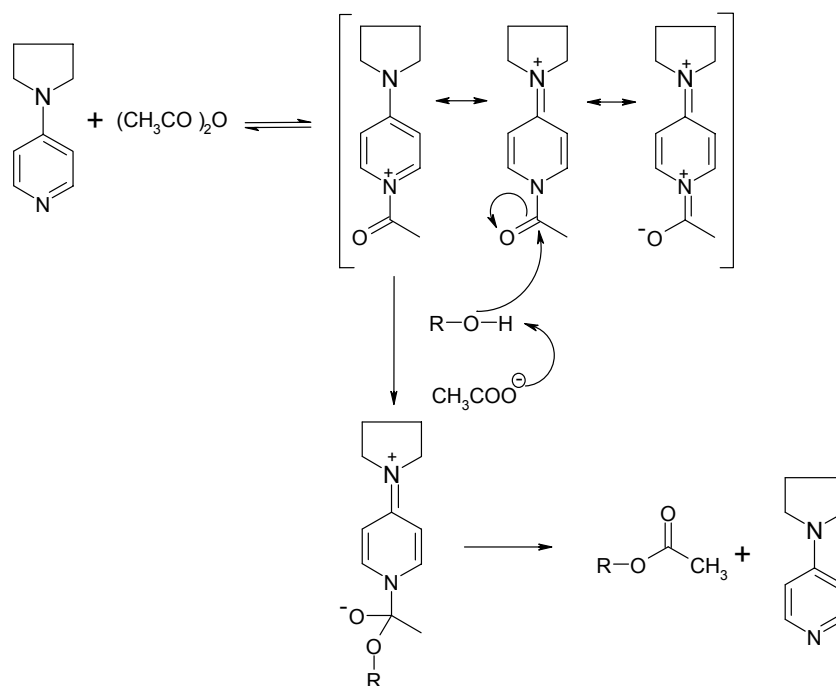
##### 2.3.1.1. Protecció via acetat

La protecció del grup hidroxil amb acetat és un procediment habitual en la protecció d'aquests grups i àmpliament utilitzat en el Laboratori d'Esteroides<sup>312</sup> i fins i tot en aquest mateix treball (acetilació de l'eremofortina C (20)). De fet, en un treball anterior es va dur a terme l'acetilació de l'àcid 2-hidroxivalèric amb un rendiment del 78%. Aquest àcid presenta similituds estructurals amb el compost que es desitja protegir, l'àcid (S)-3-hidroxibutíric (ad).

Per a protegir amb acetat un hidroxilàcid, es tracta amb anhídrid acètic i piridina emprant 4-(N-pirrolidin)-piridina (PPy) com a catalitzador. La presència del grup pirrolidínic en el catalitzador suposa un fort efecte cesor mesòmer que augmenta la nucleofília del nitrogen piridínic afavorint així la formació de la sal de N-acilpiridini i estabilitza per ressonància el catió format. Per altra banda, la deslocalització de la càrrega debilita l'atracció entre el par iònic salí, format pel catió i l'anió acetat facilitant l'atac nucleòfil del grup hidroxil (Figura 201).

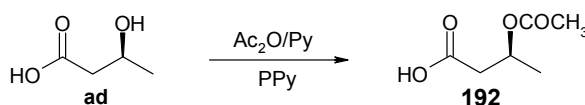
A més, durant l'ús d'acetat com a grup protector s'han de tenir en compte les següents precaucions:

- Reacció de protecció: el medi bàsic de la reacció d'acetilació (piridina o catalitzador) pot provocar l'eliminació del grup hidroxil del  $\beta$ -hidroxilàcid seguint un mecanisme E1cB (eliminació a través de la base conjugada), rendint l'àcid  $\alpha,\beta$ -insaturat corresponent.
- Reacció de desprotecció: té lloc en les mateixes condicions de saponificació del grup acetat de la PR toxina (19). Aquestes condicions suaus no provoquen l'obertura d'epòxids però podrien saponificar la cadena lateral ancorada, és a dir, hidrolitzar l'ester format en l'última etapa de desprotecció del mimètic del KM-01 (9).



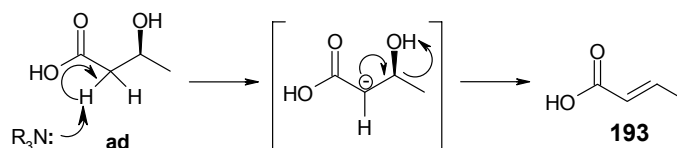
**Figura 201.** Mecanisme d'acetilació, amb anhídrid acètic i piridina, d'un grup hidroxil.

En aquest treball, es va tractar l'àcid (*S*)-3-hidroxi-butíric (**ad**) amb anhídrid acètic i piridina emprant 4-(*N*-pirrolidin)-piridina (PPy) com a catalitzador (**Figura 202**).



**Figura 202.** Acetilació de l'àcid (*S*)-3-hidroxi-butíric (**ad**).

En acabar la reacció es va eliminar la piridina i l'àcid acètic a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia Lobar però espectroscòpicament no es va apreciar la formació del producte d'interès, **193**. El producte majoritari d'aquest cru fou l'àcid crotònic (**193**), format per eliminació de l'hidroxil que es desitjava protegir mitjançant un mecanisme d'eliminació E1cB (**Figura 203**), ja que l'àcid **ad** té un hidrogen àcid en posició  $\alpha$  del grup sortint i l'hidroxil és un mal grup sortint.<sup>289</sup>



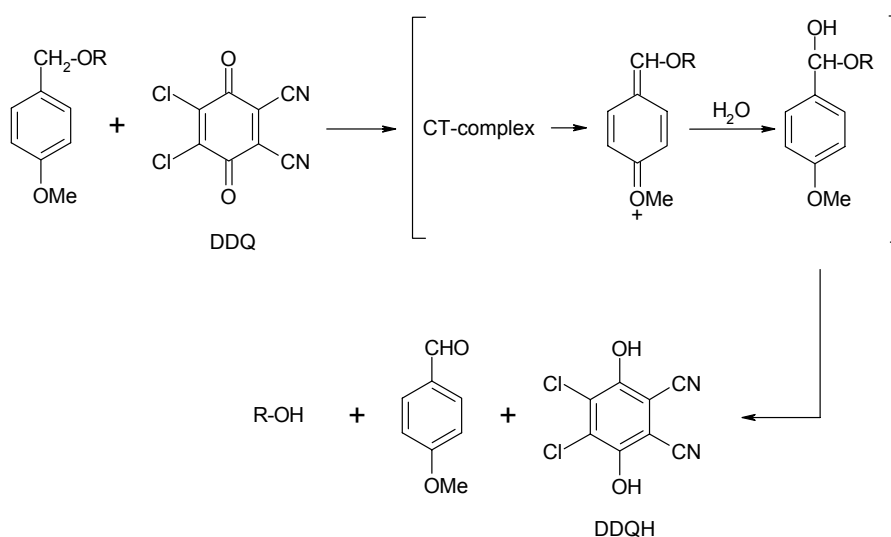
**Figura 203.** Mecanisme d'eliminació E1cB del grup hidroxil de **ad**.<sup>291</sup>

Per evitar l'eliminació de l'hidroxil, existeix un procediment per a  $\beta$ -hidroxiàcids diferent de la protecció convencional amb anhídrid acètic i piridina. Segons Mohrig *et al.*,<sup>313</sup> l'àcid (*S*)-3-hidroxi-butíric (**ad**) es pot acetilar amb clorur d'acetil en èter etílic amb un rendiment del 90%. Tot i així, aquesta acetilació s'ha de dur a terme sobre la sal sòdica ja que si es realitza directament sobre l'àcid s'alliberaria àcid clorhídric que hidrolitzaria l'ester format. De totes maneres, el fet que el medi àcid generat durant l'acetilació també pugui donar problemes d'eliminació i els baixos rendiments en l'etapa de desprotecció, es va decidir canviar el grup protector. El grup protector escollit fou el *p*-metoxibenzil (MPM) que no presenta el problema de

l'eliminació.

### 2.3.1.2. Protecció amb *p*-metoxibenzil (MPM)

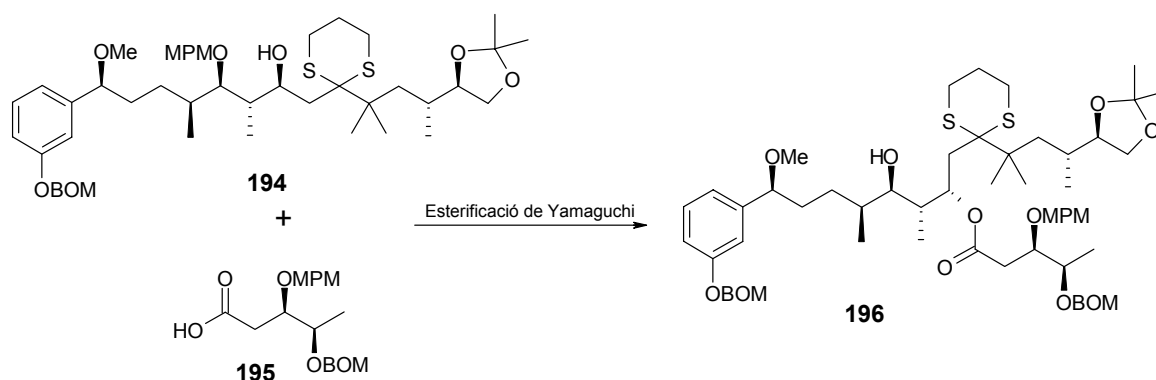
El grup *p*-metoxibenzil (MPM) s'empra per a la protecció de grups hidroxil en forma d'èter benzílic. La desprotecció té lloc per oxidació benzílica amb 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) a t.a. en dissolució de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O durant 40 minuts, condicions en les que grups funcionals com carbonils, dobles enllaços o epòxids ( presents en mimètics del KM-01 (**9**) amb esquelet de PR toxina (**19**)) romanen inalterats.<sup>314,315</sup> Segons Horita *et al.*<sup>314</sup> i Oikawa *et al.*,<sup>315</sup> el mecanisme de la desprotecció (**Figura 204**) consisteix en la formació d'un complex de transferència de càrrega entre l'anell aromàtic del MPM (donador d'electrons) i la DDQ (acceptora d'electrons), seguit d'una deshidrogenació en la posició benzílica del MPM per rendir, en presència d'aigua, el producte d'interès amb l'hidroxil lliure, anisaldehid i 2,3-dicloro-5,6-dicianohidroquinona (DDQH). L'avantatge d'aquesta desprotecció consisteix en que el medi roman neutre tot i que la DDQH tingui cert caràcter àcid ja que aquesta és insoluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O i, per tant, precipita a mesura que la reacció avança.



**Figura 204.** Mecanisme de desprotecció del *p*-metoxibenzil (MPM).

A més, Okamura *et al.*<sup>316</sup> empraren la reacció de Yamaguchi<sup>284</sup> per a esterificar el grup hidroxil d'un precursor de la aplysiatoxina (**194**) amb un àcid de gran similitud al (*S*)-3-hidroxibutíric (**ad**), **Figura 205**. L'àcid **195** emprat per Okamura presenta un grup hidroxil en β de carbonil protegit amb *p*-metoxibenzil i aconseguix esterificar-lo amb un rendiment del 70%. El fet d'assolir amb èxit l'esterificació i que el grup protector romanguí inalterat confirmen tant que l'esterificació de Yamaguchi com el *p*-metoxibenzil poden ser útils per a sintetitzar el producte d'interès PR-ad (**160**).

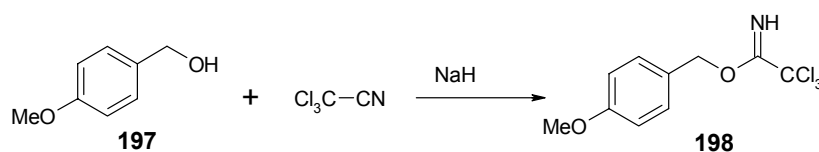
Generalment, la protecció d'hidroxils amb MPM consisteix en un tractament del compost a protegir amb hidrur sòdic per generar l'alcòxid corresponent, seguit de tractament amb clorur o bromur de *p*-metoxibenzil (MPMCl) que es ataca nucleofílicament per l'alcòxid format, rendint l'èter benzílic desitjat i clorur sòdic. Els rendiments d'aquesta reacció oscil·len entre un 65% i un 81%.<sup>314,317,318</sup> Aquestes condicions es descartaren a favor de la protecció via cloromidat ja que el tractament amb hidrur sòdic també podria conduir a l'eliminació del grup hidroxil.



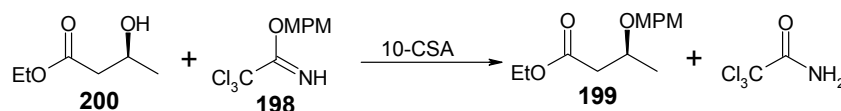
**Figura 205.** Síntesi d'un precursor de l'aplysiatoxina.

La protecció de grups hidroxil amb *p*-metoxibenzil èter també es pot realitzar emprant tricloroacetimidat de *p*-metoxibenzil en presència d'un catalitzador.<sup>319-321</sup> La protecció per aquesta via té lloc en condicions àcides suaus, de manera que els grups sensibles a condicions alcalines i condicions àcides fortes queden inalterats.

En aquest treball, seguint la metodologia descrita per Wessel *et al.*,<sup>321</sup> es va obtenir (amb un rendiment del 95%) tricloroacetimidat de *p*-metoxibenzil (**198**) a partir de l'alcohol *p*-metoxibenzílic (**197**), que s'ionitza en presència d'hidrur sòdic, (**Figura 206**). Tot seguit, segons el treball de Nakajima *et al.*<sup>320</sup> es va emprar **198** per a protegir el grup hidroxil del (*S*)-3-hidroxi-butirat d'etil (**200**) enlloc de l'àcid corresponent (**ad**), **Figura 207**. Es va tractar **200** amb un excés de tricloroacetimidat de *p*-metoxibenzil (**198**) en presència de catalitzador (àcid 10-canforsulfònic) durant 30 hores per rendir **200**. Després de filtrar la tricloroacetamida generada i eliminar el dissolvent a pressió reduïda, el cru resultant es va separar per cromatografia flash (rdt. 92%) aïllant-se l'ester protegit **199** amb un rendiment del 59%. També es va aïllar una fracció de **199** impurificat i subproductes com la tricloroacetamida i la *N*-(*p*-metoxi)beziloxitricloroacetamida (fruit del reordenament de **198**).

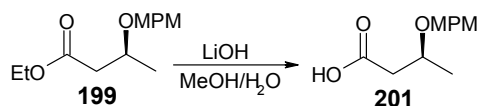


**Figura 206.** Formació del tricloroacetimidat de *p*-metoxibenzil (**198**).



**Figura 207.** Protecció de (*S*)-3-hidroxi-butirat d'etil (**200**) amb MPM.

Donat que enlloc de realitzar la protecció sobre l'àcid (*S*)-3-hidroxi-butíric (**ad**) es va realitzar sobre l'ester **201**, el darrer pas per a l'obtenció de l'àcid **ad** protegit fou la hidròlisi de **199** (**Figura 208**).

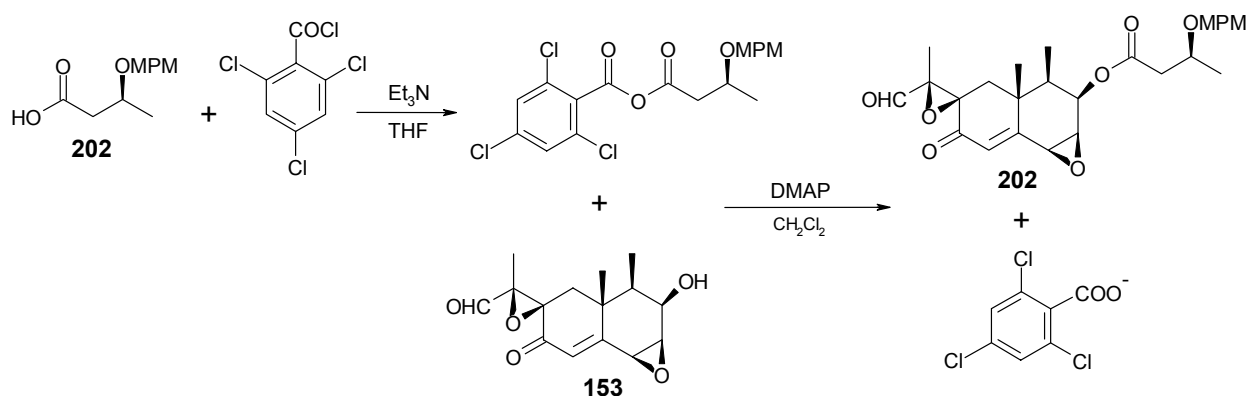


**Figura 208.** Hidròlisi (S)-3-(*p*-metoxi)benziloixibutirat d'etil (**199**).

Eh *et al.*<sup>319</sup> descriuen la saponificació de **199** amb hidròxid de liti monohidratat per rendir (S)-3-(*p*-metoxi)benziloixibutirat d'etil (**201**) amb un 88% de rendiment. En aquest treball, es va reproduir el treball d'aquest autor per rendir el compost d'interès amb un 81% de rendiment.

### 2.3.2. Esterificació del PR alcohol (**153**) i l'àcid (S)-3-(*p*-metoxi)benziloixibutíric (**201**)

En aquest treball, seguint el procediment de Yamaguchi,<sup>283,284</sup> es va esterificar PR alcohol (**153**) i l'àcid (S)-3-(*p*-metoxi)benziloixibutíric (**201**). El tractament de l'àcid **201** amb trietilamina i clorur de 2,4,6-triclorobenzoil va rendir l'anhídrid mixt corresponent. A continuació, l'eliminació del clorhidrat de trietilamina per filtració i l'addició de PR alcohol (**153**) en presència de DMAP va rendir un cru que en purificar-lo per cromatografia flash va permetre obtenir **202** amb un rendiment del 42% (**Figura 209**).



**Figura 209.** Esterificació del PR alcohol (**153**) i l'àcid (S)-3-(*p*-metoxi)benziloixibutíric (**201**).

La desprotecció final de **202** per rendir el producte d'interès PR-ad (**160**) no es va dur a terme per la poca quantitat de producte que es disposava, 147 mg. Tot i així, se'n va avaluar la seva activitat en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT, *Rice Lamina Inclination Test*) (veure pàgina 218).

## 2.4. Síntesi de PR-bb (**161**)

Paral·lelament a la síntesi de PR-ad (**160**) i abans de finalitzar l'estudi computacional, es va sintetitzar PR-bb (**161**). Tot i que en un principi es podria pensar que el grup metoxil no mimetitzava adequadament l'hidroxil 23 de la brassinolida (**1**), ja ha estat demostrada la seva utilitat en anàlegs brassinoesteroides actius. Així, Luo *et al.*<sup>322</sup> van descriure la síntesi i l'activitat de l'anàleg brassinoesteroide **205**, amb dos metoxils a les posicions 22 i 23, **Figura 211**. L'alta activitat donada per **205**, junt amb el fet que se sap que la brassinolida (**1**) pateix una glicosidació a l'hidroxil 23-OH que inicia la seva degradació,<sup>20</sup> va fer pensar en que el bloqueig de l'hidroxil a C23, en el compost **205**, inhibia la seva degradació i, per tant, mantenia una certa activitat. Aquests arguments fan pensar que la cadena **bb** pot ser adequada per a la síntesi de mimètics brassinoesteroides actius i, fins i tot, es pot creure que el mimètic PR-bb (**161**) pot desencadenar tanta o més activitat que el mimètic PR-ba (**204**).

A més, donada la poca quantitat de PR toxina (19) de que es disposava en aquell moment i que la síntesi del mimètic PR-bb (161) únicament requereix l'etapa de condensació de la cadena amb l'esquelet. En canvi, la síntesi de l'anàleg PR-ba (204), tot i que al tenir l'hidroxil de cadena lliure pot actuar tant com acceptor com donador de pont d'hidrogen, la seva síntesi es va descartar perquè són necessàries dues etapes sobre el PR alcohol (153): la condensació de la cadena amb l'hidroxil protegit, rendint el compost 203, i la posterior desprotecció de l'hidroxil rendint 204. A la Figura 210 es mostren les estratègies sintètiques pels dos compostos plantejats.

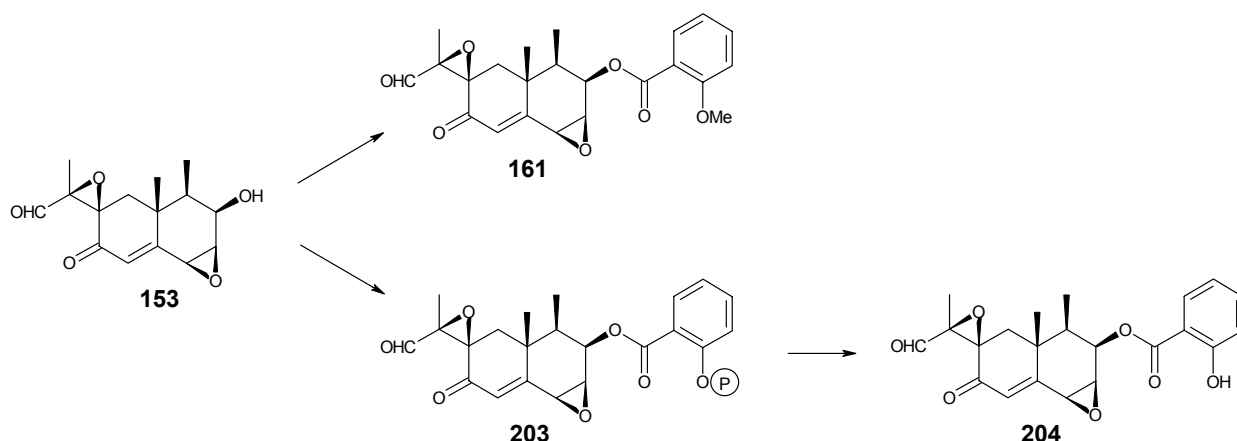


Figura 210. Estratègia sintètica per a PR-bb (161) i PR-ba (204).

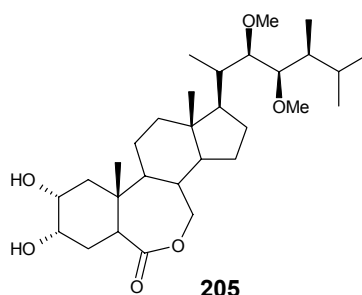


Figura 211. Brassinoesteroide d'activitat elevada amb el diol de cadena protegit amb metoxils.

El PR-bb (161) es va obtenir per esterificació de Yamaguchi<sup>284</sup> entre el PR alcohol (153) i l'àcid  $\alpha$ -metoxibenzoic (bb) després de purificar-lo per mitjà de diverses columnes cromatogràfiques (Figura 212). També es va aïllar, en aquesta reacció, l'anhídrid 2,4,6-triclorobenzoic (206) i àcid 2,4,6-triclorobenzoic.

L'aïllament de PR-bb (161) del cru de reacció fou molt costosa. En una fracció de les separacions cromatogràfiques realitzades, es detectà PR-bb (161) impurificat amb dos compostos més de naturalesa semblant, detectats en eluir el cru amb cloroform:acetat d'etil (1:1). Aquesta fracció, tot i la seva impuresa, es va avaluar en el test del RLIT (fracció 1) (veure pàgina 218). La presència d'aquestes impureses es va atribuir al caràcter àcid de la sílice, que podria degradar el producte lentament.

Motivats per aquests resultats es va purificar la fracció de PR-bb (161) per cromatografia líquida de baixa pressió emprant una fase reversa. Així doncs, es va aconseguir separar una fracció de PR-bb (161). Si bé

els senyals presents a camp baix a l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN eren compatibles amb **161**, a camp alt s'observava la presència d'impureses, tot i que menys que en el cas anterior. La massa d'aquesta fracció (1.5 mg) no va permetre continuar purificant-la. Per tant, també s'avaluà l'activitat d'aquesta fracció amb el RLIT (**fracció 2**) (veure pàgina 218).

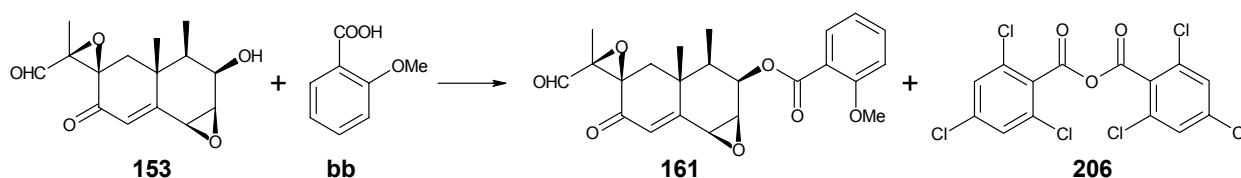


Figura 212. Síntesi de PR-bb (**161**).

## 2.5. Activitat de mimètics de PR toxina (19)

Els tres mimètics de la PR toxina (**19**) sintetitzats (**152**, **202** i **161**) s'avaluaren en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT) de que es disposa en el Laboratori d'Esteroides. Tots ells presentaren una activitat nul·la en aquest bioassaig (**Taula 70**) ja que presentaren un valor d'angle inferior a  $45^\circ$  a una dosi de  $1 \mu\text{g/planta}$  i, per tant, no s'estava en disposició de construir la corba angle front a dosi. Els valors que es mostren en la **Taula 70** són el resultat de promitjar tres bioassaigs diferents d'unes 20 plàntules cadascun.

Mimètic	Dosi/ $\mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$	Angle/ $^\circ$	
PR-bq ( <b>152</b> )	1	8.5	
PR-ad_mpm ( <b>202</b> )	1	4.7	
PR-bb ( <b>161</b> )	Fracció 1	1.25	
	Fracció 2	1	7.7
		0.5	7.1

Taula 70. Angles mesurats per als mimètics de la PR toxina (**19**).

Per una banda, tant l'anàleg PR-ad\_mpm (**202**) com el PR-bb (**161**) confirmen els resultats obtinguts en l'estudi computacional exhaustiu dels mimètics del KM-01 (**9**) (veure pàgina 122). En ell s'arribava a la conclusió que l'esquelet de PR toxina (**19**) era força pitjor que els esquelets modificats del KM-01 (**9**) o el propi esquelet d'aquest. El PR-bb (**161**) es va avaluar a tres dosis diferents per confirmar que la baixa activitat obtinguda no era conseqüència de l'elevada dosi de mimètic injectada.

Per altra banda, el mimètic PR-bq (**152**) ja s'esperava que presentés una activitat nul·la en aquest bioassaig ja que es va sintetitzar esperant una activitat inhibidora dels brassinoesteroides. Per aquesta raó, es va avaluar l'activitat d'aquest mimètic coaplicat amb l'homocastasterona (**207**), brassinoesteroide de referència d'activitat 2.80 (**Figura 213**). Tampoc es va observar cap efecte en aquest experiment, amb el que es pot considerar que el mimètic PR-bq (**152**) no té activitat inhibidora ni promotora de l'acció biològica dels brassinoesteroides (**Taula 71**).



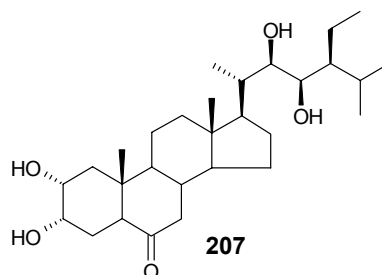


Figura 213. Homocasterona (207).

Producte	Dosi/ $\mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$	Angle/ $^{\circ}$
PR-bq (152)	1	6.9
Homocasterona (207)	$5\cdot 10^{-4}$	30.6
	$7\cdot 10^{-5}$	19.9
PR-bq (152) a $1\ \mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$ i homocasterona (207)	$5\cdot 10^{-4}$	21.5
	$7\cdot 10^{-5}$	14.6

Taula 71. Angles obtinguts en el RLIT per a PR-bq (152), l'homocasterona (207) i la coaplicació dels dos.

Els resultats de la **Taula 71** van en contra de la bona superposició de la **Figura 111**. En el supòsit que PR-bq (152), per qüestions de solubilitat i transport, sigui capaç d'arribar al receptor dels brassinoesteroides, els valors obtinguts en el bioassaig podrien explicar-se per la manca de disposar d'un compost inhibidor que ens permeti afirmar que s'empra un protocol adequat per a determinar si un compost és inhibidor o bé que realment el PR-bq (152) no sigui inhibidor.

### 3. Esterificació de Yamaguchi

Donats els baixos rendiments obtinguts en les reaccions de Yamaguchi realitzades fins al moment es decideix aprofundir en aquesta reacció. El mimètic **202** es va obtenir amb un rendiment, en la reacció de Yamaguchi, del 42% però el rendiment de l'esterificació per rendir PR-bq (**152**) fou del 15% i gairebé no es va obtenir l'anàleg PR-bb (**161**).

Els motius que fan pensar en el baix rendiment obtingut per aquesta reacció són:

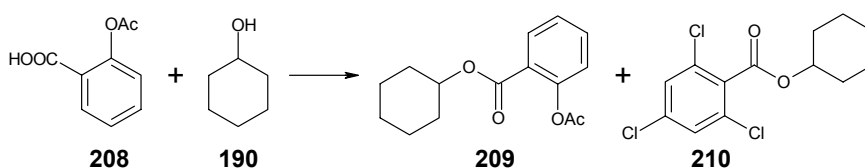
- Cadenes laterals amb el grup àcid impedit estèricament. Cal recordar que en el mecanisme de la reacció de Yamaguchi (**Figures 167-168**) la formació de l'ester desitjat s'aconsegueix amb l'ús del clorur de 2,4,6-triclorobenzoil ja que el carbonil d'aquest, per impediment estèric, es veu desafavorit en la reacció amb l'alcohol del medi. El problema apareix quan la cadena que es vol ancorar al PR alcohol (**153**) també presenta el grup àcid impedit perquè llavors, augmenta la competència entre el 2,4,6-triclorobenzoil i la cadena d'interès. Aquest és el cas de la síntesi del compost PR-bb (**161**) ja que la cadena **bb** presenta l'àcid carboxílic força impedit.<sup>284</sup>
- Inestabilitat de l'alcohol emprat. L'esquelet de la PR toxina (**19**) sembla presentar certa inestabilitat en el propi medi de la reacció de Yamaguchi,<sup>284</sup> i també podria presentar-la en la sílice de la columna cromatogràfica. De totes maneres, després d'haver-se comprovat mitjançant CCF de doble elució que **19** no es degrada després d'una hora en una placa cromatogràfica de sílice, es creu que el principal motiu pot ser la inestabilitat en el medi de reacció.
- Descomposició de l'anhídrid mixt, intermedi de reacció, per descarboxilació.<sup>323</sup>

Es va decidir realitzar una sèrie de reaccions augmentant la relació molar àcid:alcohol, emprant altres alcohols i altres cadenes laterals per estudiar aquests possibles factors.

Es va sintetitzar l'*o*-acetilsalicilat de ciclohexil (**209**) ja que conté un alcohol senzill (**190**) i l'àcid, convenientment protegit, necessari per a la síntesi del mimètic PR-ba (**204**). També es va sintetitzar l'*o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**), aquest cop emprant l'àcid **bb**, equivalent a **208** però amb menys impediment estèric i, un alcohol fàcil de monitoritzar per CCF (**3**) enlloc del ciclohexanol (**190**). Finalment, es va sintetitzar l'octanoat de *p*-metoxibenziloxi (**214**) emprant altre cop un alcohol fàcil de monitoritzar per CCF però més assequible que el brassinoesteroide **3** i un àcid lineal que presentés certes similituds amb la cadena **bq**.

#### 3.1. Síntesi de *o*-acetilsalicilat de ciclohexil (**209**)

L'*o*-acetilsalicilat de ciclohexil (**209**) es va obtenir per esterificació de Yamaguchi entre l'àcid *o*-acetilsalicílic (**208**) i el ciclohexanol (**190**) emprant un excés d'àcid respecte l'alcohol de 5 equivalents a 1 enlloc de la proporció 1 a 0.8 que s'havia emprat fins al moment (**Figura 214**).



**Figura 214.** Síntesi de l' *o*-acetilsalicilat de ciclohexil (**209**).

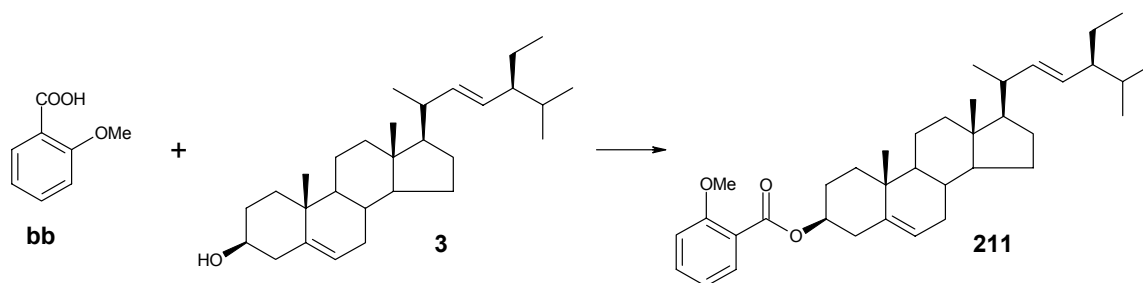
La reacció no es va poder monitoritzar bé per CCF donat que **190**, el reactiu limitant, no es podia detectar. S'obté l'ester d'interès **209** amb un rendiment del 27%.

L'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN realitzat sobre el cru de reacció, que posteriorment es va separar per cromatografia de columna, mostrà la presència de 3 multiplets al voltant de 5 ppm: a 4.74 ppm, 4.97 ppm i a 5.11 ppm. Aquests senyals poden correspondre al protó en *ipso* del ciclohexanol (**190**) quan aquest es troba esterificat amb un àcid. Així en el cru de reacció es detecten 3 esters d'aquest tipus. Un d'ells, el que correspon al senyal a 4.97 ppm, s'identifica com a *o*-acetilsalicilat de ciclohexil (**209**), l'ester d'interès. La integral relativa d'aquest protó respecte a la dels altres dos és de 0.7 a 1. Es creu així que la formació d'aquests altres dos esters pot ser una explicació del baix rendiment obtingut a la reacció. L'ester que presenta el senyal a 5.11 ppm s'identificà com a 2,4,6-triclorobenzoat de ciclohexil (**210**) per comparació amb l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN d'una mostra independent sintetitzada. Es va sintetitzar **210** amb un 25% de rendiment a través d'una esterificació de Fischer destil·lant azeotròpicament l'aigua formada.<sup>324</sup> Pel que fa a l'ester que presenta el senyal a 4.74 ppm, amb un temps de retenció similar a **210**, no s'arribà a identificar. Per altra banda, s'aïllà l'anhídrid 2,4,6-triclorobenzoic (**206**).

Davant d'aquests resultats, sembla que l'impediment estèric que ofereix el grup salicil pot ser prou alt com per que no s'eviti l'atac nucleòfil en l'altre carbonil. D'aquest fet es dedueix que el mètode d'esterificació de Yamaguchi pot tenir limitacions quan s'aplica a la síntesi d'esters en els quals el component àcid sigui aromàtic i estigui substituït en orto per substituents voluminosos. En aquest cas el rendiment de la reacció pot disminuir.

### 3.2. Síntesi de *o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**)

Es va realitzar una altra reacció amb el mètode d'esterificació de Yamaguchi, emprant les mateixes condicions de reacció, usant com a àcid l'*o*-metoxibenzoic (**bb**). L'esterificació de l'àcid *o*-metoxibenzoic (**bb**) i l'estigmasterol (**3**) va rendir l'*o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**) amb un rendiment del 66% emprant, altre cop, un excés d'àcid respecte l'alcohol de 5 equivalents a 1 (**Figura 215**).



**Figura 215.** Síntesi de l'*o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**).

També en aquest cas es va aïllar l'anhídrid 2,4,6-triclorobenzoic (**206**) i es recuperà clorur de 2,4,6-triclorobenzoil.

Aquesta mateixa reacció es va repetir emprant una relació d'equivalents entre l'àcid **bb** i l'estigmasterol (**3**) de 1:0.8, rendint el producte d'interès **211** amb un rendiment del 63%.

Centrant l'atenció en els rendiments d'aquestes reaccions no sembla que el grup metoxi en *orto* de l'àcid benzoic sigui un impediment per obtenir l'ester d'interès amb rendiments raonables. Fins i tot, un gran excés d'àcid respecte l'alcohol (5:1 equivalents) no sembla millorar significativament el rendiment.

### 3.3. Síntesi d'octanoat de *p*-metoxibenziloxi (214)

En aquesta reacció es va esterificar, amb una relació d'equivalents 1:0.8, l'àcid caprílic (213) amb l'alcohol *p*-metoxibenzilic (212) per obtenir l'ester 214 amb un 66% de rendiment (Figura 216). L'alcohol 212 pot ser fàcilment monitoritzat per CCF i no presenta l'impediment d'anteriors alcohols assajats, i l'àcid 213, tot i no ser fàcilment monitoritzable per CCF, no està impedit estèricament.

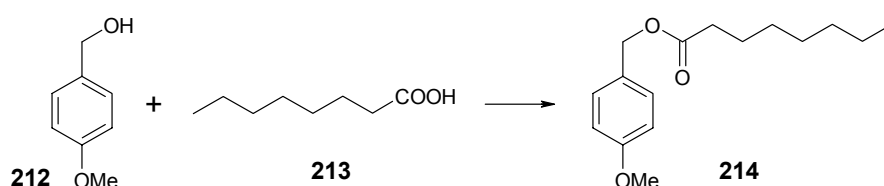


Figura 216. Síntesi de 214 per mitjà del mètode de Yamaguchi.

### 3.4. Conclusions

A continuació, es mostra un resum de les esterificacions realitzades en aquest treball amb el mètode de Yamaguchi (Taula 72).

Reacció	Producte	Àcid	Alcohol	Relació d'equivalents	Rdt./%
1	Sorbat de ciclohexil (191)	Àcid sòrbic (187)	Ciclohexanol (190)	1:0.8	54
2	PR-bq (152)	Àcid dendrifièlic A (bq)	PR alcohol (153)	1:0.8	15
3	PR-ad (161)	Àcid ( <i>S</i> )-3-( <i>p</i> -metoxi)benzil-oxibutíric (200)	PR alcohol (153)	1:0.8	42
4	PR-bb (161)	Àcid <i>o</i> -metoxibenzoic (bb)	PR alcohol (153)	1:0.8	0.3
5	<i>o</i> -acetilsalicilat de ciclohexil (209)	Àcid <i>o</i> -acetilsalicílic (208)	Ciclohexanol (190)	5:1	27
6	<i>o</i> -metoxibenzoat d'estigmasteril (211)	Àcid <i>o</i> -metoxibenzoic (bb)	Estigmasterol (3)	5:1	66
7	<i>o</i> -metoxibenzoat d'estigmasteril (211)	Àcid <i>o</i> -metoxibenzoic (bb)	Estigmasterol (3)	1:0.8	63
8	Octanoat de <i>p</i> -metoxibenziloxi (214)	Àcid caprílic (213)	Alcohol <i>p</i> -metoxibenzilic (212)	1:0.8	66

Taula 72. Esterificacions de Yamaguchi realitzades en aquest treball.

Si es comparen les reaccions 1 i 5 s'observa com l'ús de l'àcid sòrbic (187) proporciona un rendiment més alt (54%) que l'ús de l'àcid *o*-acetilsalicílic (208) (27%) quan s'esterifica amb ciclohexanol (190). Tal com s'ha comentat, sembla que la causa pugui ser el possible impediment estèric que ofereix 208 en l'anhídrid mixt intermedi de la reacció ja que, inclús en la reacció 5, s'afegeix l'àcid en excés (5:1). De totes maneres, el rendiment obtingut en la reacció 6 ó 7 (66% i 63%) fa palès que l'àcid *o*-metoxibenzoic (bb) no presenta un impediment estèric suficient com per evitar que la reacció tingui lloc, conclusió a la qual es podria haver arribat si es centrés l'atenció únicament en la reacció 4.

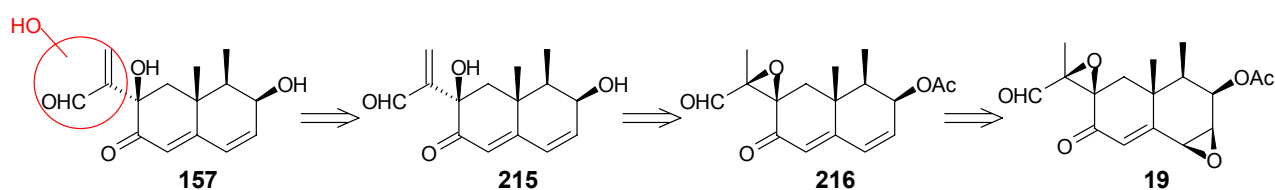
Per altra banda, l'ús de l'àcid *o*-metoxibenzoic (**bb**) amb estigmasterol (**3**), reacció 6 i 7, ha rendit l'ester corresponent amb un rendiment més elevat que els anteriors (66% i 63%). Les causes poden ser la facilitat de monitorització de l'alcohol respecte el que succeïa amb el ciclohexanol (**190**) i/o el menor impediment estèric que sembla que ofereix l'àcid *o*-metoxibenzoic (**bb**) respecte l'àcid *o*-acetilsalicílic (**208**). A més, l'obtenció de rendiments equivalents en les reaccions 6 i 7 indica que un gran excés d'àcid respecte l'alcohol no millora significativament el rendiment de l'ester obtingut.

Les reaccions 2, 3 i 4 presenten un alcohol fàcilment monitoritzable però, en tots els casos, s'obtenen rendiments inferiors als que s'obtenen en les reaccions 6, 7 i 8. Es creu que la disminució del rendiment ve donada per l'alcohol emprat. En aquestes reaccions (2, 3 i 4) s'empra el PR alcohol (**153**) que pot descomposar parcialment en les condicions de reacció, tot i ser molt suaus, i durant el procés de purificació cromatogràfica; en canvi, en les reaccions 6 i 7 s'empra l'estigmasterol (**3**) i en la reacció 8 l'alcohol *p*-metoxibenzílic (**212**) que tots dos són estables en les condicions de treball. Aquesta suposició es fa pal·lesa en comparar les reaccions 4 i 7 ja que l'única diferència entre elles és l'alcohol emprat. En la reacció 4 s'empra el PR alcohol (**153**) i en la 7, l'estigmasterol (**3**) obtenint-se rendiments força superiors en la reacció 7 (66% front a 0.3%).

Resumint es pot concloure que, tot i que el rendiment disminueix en alguns àcids que estan impeditos estèricament, es poden emprar àcids com el (*S*)-3-(*p*-metoxi)benciloxibutíric (**200**) o l'*o*-metoxibenzoic (**bb**). Interessa utilitzar un alcohol que permeti seguir-lo per CCF per saber com avança la reacció i poder augmentar el rendiment final però tampoc és un punt crític, doncs en la reacció 1 s'obté l'ester desitjat amb un 54%. Finalment, cal afegir que augmentar la proporció d'equivalents àcid:alcohol no suposa una avantatge sobre el rendiment de la reacció.

#### 4. Síntesi d'anàlegs del KM-01 (9)

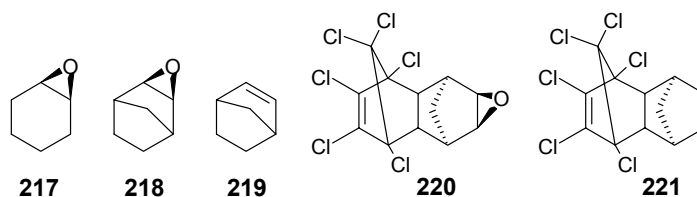
Donat que els compostos eremofilànics que mantenen l'estructura de la PR toxina (**19**) no presenten, computacionalment, resultats satisfactoris i mostren una activitat pràcticament nul·la en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, en la part final d'aquesta tesi es va intentar modificar aquest esquelet per tal que els compostos fossin susceptibles de presentar activitat brassinoesteroide. La síntesi d'un esquelet del tipus **157** a partir de la PR toxina (**19**) presenta la dificultat de realitzar una doble reducció selectiva sobre una estructura molt sensible a les condicions de reacció per la presència d'epòxids. La primera reducció ha de reduir l'epòxid entre C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> de la PR toxina (**19**) a doble enllaç, restant inalterat l'epòxid entre C<sub>7</sub> i C<sub>11</sub>. Posteriorment, aquest epòxid, s'ha d'obrir per formar un alcohol al·lílic (**Figura 217**).



**Figura 217.** Anàlisi retrosintètic de la síntesi de **157**.

Donada la baixa quantitat de PR toxina (**19**) disponible i el seu laboriós procés d'aïllament, es va decidir, en un primer moment, assajar les reaccions descrites en compostos comercials d'estructura similar a **19**. Davant la impossibilitat de trobar un compost amb dos epòxids de característiques similars als de **19**, es va decidir treballar amb un compost que tingués un grup epòxid sobre un anell de ciclohexà assimilable a l'epòxid entre C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> de **19** i, amb un compost que tingués un epòxid tetrasubstituint amb una funció carbonílica en  $\alpha$  assimilable a l'epòxid entre C<sub>7</sub> i C<sub>11</sub> de **19**.

El compost més senzill que presenta un epòxid assimilable al de C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> de la PR toxina (**19**) és l'òxid del ciclohexè (**217**), però, en tractar-se d'un reactiu líquid (el seu punt de fusió és de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>305</sup>), les condicions de reacció variarien de les que s'emprarien per a **19**, sòlida a la temperatura de treball. Per aquest motiu, es va decidir emprar el *exo*-2,3-epoxinorbornè (**218**), que té un punt de fusió de  $129\text{-}130\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>305</sup> (**Figura 218**). Malauradament, després d'intentar diverses reduccions sobre **218** no es detectà la formació del producte desitjat, el norbornilè (**219**). Així es va decidir assajar aquesta reacció sobre un altre substrat assimilable, el Dieldrin o 1,2,3,4,10,10-Hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-endo-*exo*-5,8-dimetanonaftalè (**220**), que té un punt de fusió de  $176\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>305</sup> i un punt d'ebullició de  $385\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>305</sup>. A més, el producte resultant d'aquesta reacció, Aldrin o 1,2,3,4,10,10-Hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4:5,8-dimetanonaftalè (**221**), té un punt d'ebullició de  $145\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>305</sup>.

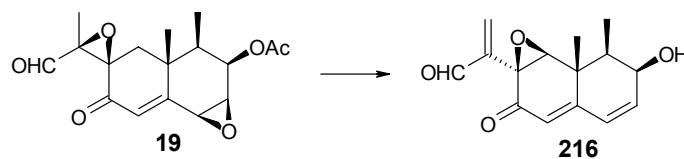


**Figura 218.** Compostos amb característiques per poder mimetitzar l'epòxid entre C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> de la PR toxina (**19**).

##### 4.1. Reducció selectiva de l'epòxid C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> de la PR toxina (**19**)

Com s'ha comentat a l'anàlisi retrosintètic (**Figura 217**), partint de la PR toxina (**19**) es pretén obtenir el

compost **216**, mitjançant una reducció regioselectiva de l'epòxid entre C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> (**Figura 219**).



**Figura 219.** Síntesi de **216**.

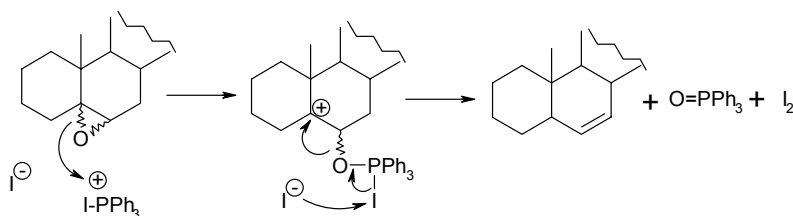
Existeixen multitud de reactius per tal de reduir un epòxid a doble enllaç<sup>241,325-333</sup> però els reactius més adients per a la reducció de l'epòxid disubstituint entre C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> sense alterar l'epòxid tetrasubstituint entre C<sub>7</sub> i C<sub>11</sub> són els següents:

- Trifenilfosfina/iode:<sup>241,327</sup> reacció que permet amb un rendiment del 70-100% diferenciar epòxids amb diferent substitució, sent més reactius els epòxids menys substituïts.
- Selenoamides:<sup>329,332</sup> reacció ràpida en presència de quantitats catalítiques d'àcid trifluoroacètic per a epòxids mono-, di- o trisubstituïts però els epòxids tetrasubstituïts romanen inalterats.
- KSeCN:<sup>328</sup> reacció en condicions suaus, medi neutre o lleugerament alcalí (pH = 8-9) a temperatura ambient, que permet reduir epòxids amb rendiments del 60-100%.
- Compostos de tel·luri:<sup>330</sup> permet diferenciar entre epòxids amb diferent grau de substitució i, fins i tot, permet diferenciar isòmers *cis* i *trans* en epòxids disubstituïts amb rendiments del 80-90%.

En aquesta tesi s'empren els dos primers mètodes per a intentar sintetitzar el compost **216** ja que la primera està descrita per a anàlegs molt similars a la PR toxina (**19**) i la segona no permet que reaccionin epòxids tetrasubstituïts, com és el cas de l'epòxid entre C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>.

#### 4.1.1. Reducció emprant trifenilfosfina/iode

Aquesta reducció és funció del grau de substitució de l'epòxid, sent preferent en epòxids disubstituïts (epòxid entre C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> de la PR toxina (**19**)) que no pas en epòxids tetrasubstituïts (epòxid entre C<sub>7</sub> i C<sub>11</sub> de **19**). La quantitat de iode present en el medi de reacció és crítica, ja que un excés pot produir la formació de la corresponent iodohidrina. El mecanisme més acceptat és el proposat per Paryzek *et al.*<sup>327</sup> que proposa la formació d'un complex iode-trifenilfosfina que ataca a l'epòxid, i una posterior eliminació com a iode i òxid de trifenilfosfina per rendir l'alquè desitjat (**Figura 220**).



**Figura 220.** Mecanisme de la reducció d'epòxid a doble enllaç emprant PPh<sub>3</sub>/I<sub>2</sub>.

Harimaya *et al.*<sup>241</sup> van realitzar aquesta reacció sobre PR àcid ciclat (**222**) i sobre el compost **224**. En el primer cas van aconseguir reduir l'epòxid d'interès per obtenir **223** amb un rendiment del 37% i, en el segon, van obtenir **225** i **226** amb rendiments del 5% i del 6% respectivament (**Figura 221**). Aquests resultats són els que motivaren assajar, en un primer moment, l'ús de trifenilfosfina/iode per reduir l'epòxid.

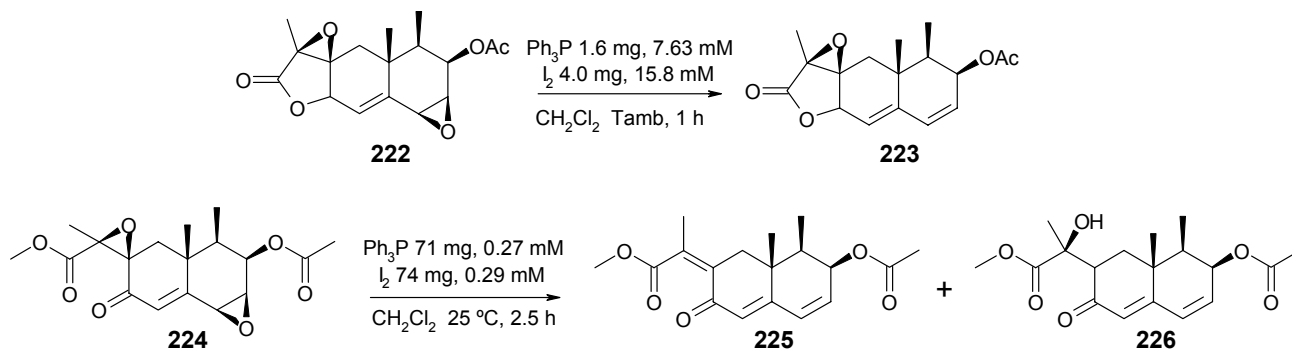


Figura 221. Tractament de **222** i **224** amb trifenilfosfina i iode.

Seguint la metodologia proposada per Harimaya *et al.*<sup>241</sup> i el treball de Garlaschelli *et al.*<sup>331</sup> s'intentà realitzar la reducció de l'epòxid de l'*exo*-2,3-epoxinorbornè (**218**). Garlaschelli proposa la utilització d'acetonitril com a dissolvent i una addició lenta de l'epòxid sobre una dissolució de trifenilfosfina i iode per obtenir l'alquè desitjat. A l'hora de realitzar les extraccions amb aigua per tal d'eliminar l'excés de iode s'observà una certa miscibilitat entre l'acetonitril i l'aigua que en dificultà el procés. Per tant, es va decidir eliminar l'acetonitril a pressió reduïda abans de realitzar les extraccions, i redissoldre el cru de reacció en cloroform per continuar amb aquestes. Posteriorment, es va variar el dissolvent de la reacció, tot hi que l'acetonitril presenta rendiments majors,<sup>334</sup> ja que l'eliminació a pressió reduïda de l'acetonitril podia eliminar el producte de reacció de l'*exo*-2,3-epoxinorbornè (**218**), el norbornilè (**219**), que té un punt d'ebullició 96 °C.<sup>305</sup> Anàlogament al que realitzen altres autors<sup>335,336</sup> es canvià el dissolvent per clorur de metilè, més volàtil i controlable la seva eliminació a pressió reduïda.

Un altre factor crític a controlar és el temps i temperatura de reacció, ja que en la bibliografia es troben una gran diversitat de valors. Segons l'autor les condicions varien des de 15 minuts a 80 °C fins a 48 hores a 0 °C.<sup>333</sup> Per tant, es realitzaren diferents reaccions, des de 30 minuts fins a 7 dies, i des de 25 °C fins a 70 °C. Les condicions de reacció de cada una de les proves realitzades es mostren en la **Taula 73**.

Prova	Temps de reacció	Dissolvent	Temperatura
1	1 h 30 min	Acetonitril	t. a.
2	1h 30 min	Acetonitril	t. a.
3	48 h	Acetonitril	t. a.
4	30 min	Clorur de metilè	t. a.
5	48 h	Clorur de metilè	Reflux
6	7 dies	Clorur de Metilè	t. a.

Taula 73. Condicions de reacció de les proves realitzades sobre l'*exo*-2,3-epoxinorbornè (**218**).

Tot hi que per cromatografia de capa fina s'observa la presència d'un nou compost, juntament amb òxid de trifenilfosfina i trifenilfosfina, cap espectre de <sup>1</sup>H-RMN mostrà la presència dels protons olefínics desitjats. Per tant, es va decidir realitzar la mateixa reacció sobre el Dieldrin (**220**), ja que aquest no presenta els problemes de volatilitat de **219**. En totes les reaccions s'emprà l'acetonitril com a dissolvent. Les condicions de reacció de cada una de les proves realitzades es mostren en la **Taula 74**.

Prova	Temps de reacció	Dissolvent	Temperatura
7	7 dies	Acetonitril	t. a.
8	6 dies	Acetonitril	t. a.
9	7 hores	Acetonitril	Reflux

Taula 74. Condicions de reacció de les proves realitzades sobre el Dieldrin (**220**).



En aquestes proves tampoc s'observà, en cap espectre de  $^1\text{H-RMN}$ , la presència dels protons olefínics desitjats. Llavors, de la prova 8 es va decidir realitzar una columna Lobar per tal de purificar el nou producte format de la trifenilfosfina i altres subproductes de reacció i així poder determinar el producte format. S'obtingueren tres fraccions: la primera era trifenilfosfina i la tercera fracció no es va poder determinar, ja que s'obtingué en molt baixa quantitat. L'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  de la segona fracció semblà indicar la presència d'una iodohidrina. Tot i el defecte de iode emprat en la reacció, proporció de trifenilfosfina:iode 2:1, potser era massa elevada per a reduir l'epòxid amb èxit i per aquesta raó podria haver-se format la iodohidrina. Tot i així, cal considerar que és la mateixa proporció emprada per Harimaya *et al.*<sup>245</sup> sobre PR àcid ciclat (**222**) per rendir **223** (Figura 221).

Degut als resultats poc satisfactoris derivats de la utilització de iode i trifenilfosfina per a la reducció d'epòxids a alquens, es van utilitzar les selenoamides per intentar reduir l'epòxid a doble enllaç.

#### 4.1.2. Reducció emprant selenoamides

Caló *et al.*<sup>329</sup> proposen la reducció d'epòxids amb un compost de seleni, el 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (**228**), que s'obté fent reaccionar iodur de 3-metilbenzotiazol (**227**) amb seleni metall tal com es mostra a la Figura 222. L'obtenció del reactiu **228** es realitza sense problemes, amb un rendiment del 65%, inferior al de Caló *et al.*, que era del 90%.<sup>329</sup>

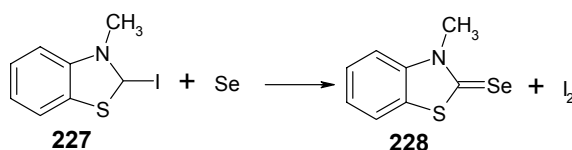


Figura 222. Síntesi de 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (**228**).

Emprant 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (**228**) es realitzaren tres proves variant el temps de reacció (5 minuts, 1.5 hores i 72 hores) per intentar reduir l'epòxid del Dieldrin (**220**) a doble enllaç (Figura 223).

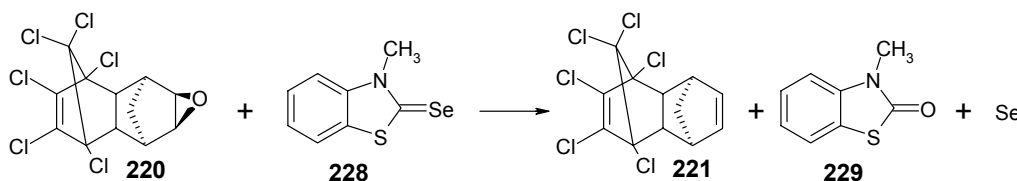
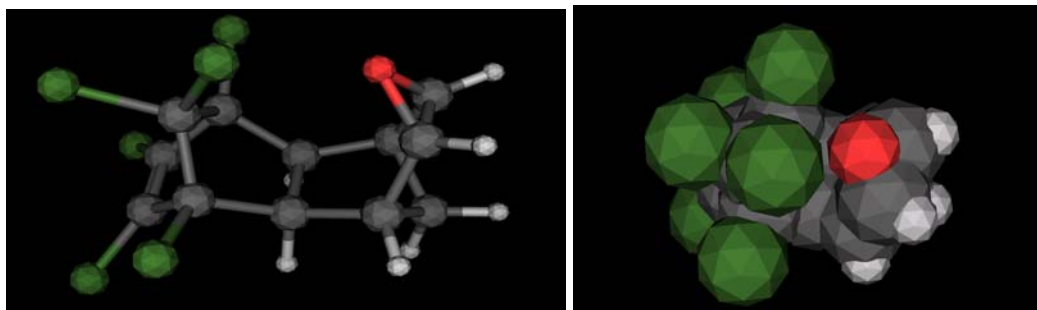


Figura 223. Síntesi d'Aldrin (**221**) emprant 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (**228**) com a agent reductor.

Malauradament, tot hi que el seleni precipità com a metall, cap de les tres proves realitzades mostrà la presència dels nous protons olefínics per  $^1\text{H-RMN}$ . En les dues primeres restà el Dieldrin (**220**) inalterat mentre que a la tercera reacció s'obtingué un cru complex.

Donat que existeix nombrosa bibliografia, en la que s'obtenen bons rendiments amb reaccions amb trifenilfosfina/iode i selenoamides, per a la reducció d'epòxids a doble enllaç, es pensà que el problema es pot trobar en el substrat. El Dieldrin (**220**) presenta uns grups clor que poden impedir la reacció amb molècules grans com la trifenilfosfina o les selenoamides. Per tal d'observar aquesta possibilitat es realitzà

una minimització d'energia de **220** amb el programa MOE 2001.01 (Forcefield MMFF94).<sup>204</sup> Els resultats obtinguts es presenten a la **Figura 224**. En aquesta figura, es pot veure que el grup epòxid (en roig) es troba pròxim als clors, que el fan parcialment inaccessible per la part superior, mentre que per la part inferior, el grup metilè anteriorment citat també pot ser susceptible d'impedir l'atac.



**Figura 224.** Estructura del Dieldrin (**220**) en un mínim d'energia.

Per tant, davant de la impossibilitat de trobar reactius assimilables a la PR toxina (**19**) per dur a terme la reducció de l'epòxid a doble enllaç amb èxit, es va decidir treballar directament amb ella.

#### 4.1.3. Reducció sobre PR toxina (**19**)

En un primer moment es va intentar reduir l'epòxid de C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> de la PR toxina (**19**) emprant trifenilfosfina/iode com s'ha descrit en l'apartat 4.1.1 de la pàgina 225. En la **Taula 75** es mostren les proves realitzades a temperatura ambient i emprant acetonitril com a dissolvent.

Prova	Temps de reacció	PR toxina ( <b>19</b> )/mg	PPh <sub>3</sub> /mg	I <sub>2</sub> /mg
<b>1</b>	10 min	70	65	31
<b>2</b>	3 h	95	87	42
<b>3</b>	5 h	70	123	118

**Taula 75.** Reaccions amb trifenilfosfina/iode per reduir l'epòxid de C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> de **19**.

Les dues primeres reaccions, es realitzaren amb una proporció de iode inferior a la descrita per evitar formar la iodohidrina corresponent tal com havia succeït en l'apartat 4.1.1 de la pàgina 225 i, en cas de no reaccionar, poder recuperar la PR toxina (**19**). De fet, es va aconseguir evitar formar la iodohidrina però malauradament tampoc es va formar el doble enllaç desitjat, quedant la PR toxina (**19**) inalterada. Per això, es va realitzar una columna flash dels crus d'aquestes dues reaccions que va permetre recuperar un 80% del producte de partida.

En la darrera prova, donat que un augment del temps de reacció (de 10 minuts a 3 hores) continuava deixant la PR toxina (**19**) inalterada, es va augmentar la proporció de iode respecte la trifenilfosfina. En aquest cas es va emprar una proporció 1:0.96 enlloc de 1:0.48 com s'havia emprat en les dues anteriors (PR toxina (**19**) inalterada). A més, també es va augmentar el temps de reacció fins a 5 hores però, tot i obtenir un cru complex, no es va observar la presència de doble enllaç.

Paral·lelament a aquesta darrera prova amb trifenilfosfina/iode es va realitzar un darrer intent de reducció de l'epòxid de C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> de la PR toxina (**19**) emprant 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (**228**). Es va fer reaccionar 57

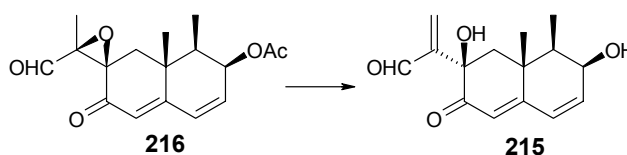
mg de PR toxina (**19**) amb 30 mg de **228** en presència de 14 mL d'àcid trifluoracètic durant 10 minuts. El cru resultant es va purificar per cromatografia flash. En la tercera fracció d'aquesta columna es va obtenir una mescla de dos productes, un dels quals podria ser el producte desitjat. Tant en l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN com en el de  $^{13}\text{C}$ -RMN, s'aprecia la desaparició dels senyals característics de l'epòxid de C1-C2 que es desitja reduir i l'aparició de senyals propis d'un doble enllaç conjugat (**Taula 76**). De totes maneres, faltaria treballar més a fons aquesta reacció.

	$^1\text{H}$ -RMN		$^{13}\text{C}$ -RMN	
	PR toxina ( <b>19</b> )	PR toxina ( <b>19</b> ) reduïda	PR toxina ( <b>19</b> )	PR toxina ( <b>19</b> ) reduïda
H1/C1	3.96, dd	6.94, d, J = 10.2 Hz	55.9/d	121.8 o 125.9
H2/C2	3.45, d	6.40, d, J = 10.2 Hz	55.5/d	121.8 o 125.9

**Taula 76.** Desplaçaments dels protons i carbonis de C1 i C2 en la PR toxina (**19**) i en el producte resultant del tractament amb 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (**228**).

#### 4.2. Reducció de l'epòxid C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub> de la PR toxina (**19**)

Cas que es pogués disposar de **216** en assolir amb èxit la primera reducció, i seguint amb l'anàlisi retrosintètic mostrat a la **Figura 217**, el següent pas seria la transformació de l'epòxid entre C<sub>7</sub> i C<sub>11</sub> de la PR toxina (**19**) a alcohol al·lílic (**Figura 225**).



**Figura 225.** Síntesi de **215**.

Existeixen dos estratègies sintètiques per tal d'obtenir un alcohol al·lílic a partir d'un epòxid:

- Tractament amb base forta: permet l'extracció d'un  $\beta$ -protó i la formació de l'alcohol al·lílic desitjat. Els reactius més utilitzats són el dietil amidur de liti (LDA),<sup>337-340</sup> i el metil liti,<sup>341</sup> aconseguint dirigir l'obertura si es treballa amb bases quirals de liti.<sup>342,343</sup>
- Tractament amb nucleòfil: el nucleòfil ataca l'epòxid obrint-lo i, posteriorment, l'eliminació del nucleòfil produeix la formació del doble enllaç, rendint l'alcohol al·lílic desitjat. Els reactius més emprats són els compostos organoselènics,<sup>344</sup> els trifluorometanosulfonats de dialquilbor<sup>345</sup> o compostos d'alumini.<sup>346</sup>

En el cas que ens ocupa la reacció més adient és l'ús d'una base forta, doncs es tracta d'una reacció estereoselectiva ja que el doble enllaç es forma al costat menys substituït. En canvi, en les reaccions amb nucleòfils el doble enllaç es forma en el costat més substituït. Per una altra banda el tractament amb base forta provoca la hidròlisi de l'ester en C<sub>3</sub>, deixant ja el substrat preparat per a ancorar-hi una altra cadena lateral.

## 5. Conclusions

S'han sintetitzat tres mimètics de la PR toxina (**19**): el PR-bq (**152**), el PR-ad (**160**) i el PR-bb (**161**). El primer, es va sintetitzar per intentar disposar d'un inhibidor de l'activitat brassinoesteroide diferent del KM-01 (**9**) i els altres dos per a que desencadenessin activitat brassinoesteroide. Malauradament, cap d'ells va resultar actiu en el test d'inclinació de la làmina d'arròs. Aquests resultats, juntament amb els resultats computacionals sobre mimètics de **19**, van permetre concloure que els mimètics de la PR toxina (**19**) eren uns mals candidats per a mimetitzar la brassinolida (**1**) o el KM-01 (**9**).

S'ha estudiat a fons la reacció d'esterificació de Yamaguchi. Aquesta reacció permet esterificar en condicions suaus sense alterar altres grups presents en l'estructura de les molècules a reaccionar. S'han sintetitzat 8 compostos emprant aquesta esterificació: el sorbat de ciclohexil (**191**), el PR-bq (**152**), el PR-ad (**160**), el PR-bb (**161**), l'*o*-acetilsalicilat de ciclohexil (**209**), l'*o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**), l'*o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**) i l'octanoat de *p*-metoxibenziloxi (**214**). Els rendiments d'aquestes reaccions han permès concloure que, tot i que el rendiment disminueix quan s'empren àcids que estan impeditos estèricament, es poden emprar àcids com el (*S*)-3-(*p*-metoxi)benziloxibutíric (**200**) o l'*o*-metoxibenzoic (**bb**). De fet, els baixos rendiments obtinguts en la síntesi d'alguns d'aquests productes es creu que és degut a l'ús de PR toxina (**19**) que es degrada amb relativa facilitat.

Finalment, en la part final de la tesi es van realitzar uns primers intents de sintetitzar mimètics del KM-01 (**9**) a partir de la PR toxina (**19**). Es va intentar modificar l'esquelet de **19** sense èxit.

## **BIOASSAIG ANTIESTRÈS**

---

## **BIOASSAIG ANTIESTRÈS**

### **1. Introducció**

Els brassinoesteroides, com ja s'ha explicat en la introducció del treball (pàgina 12), són un grup de fitohormones que es caracteritzen per regular l'activitat d'una planta<sup>20,22,86</sup> i per tenir efecte antiestrès<sup>347-350</sup> en situacions adverses, ajudant a la planta a superar situacions desfavorables front herbicides, temperatures extremes, concentracions salines o àcides elevades... Així, els estudis efectuats per Mandava<sup>87</sup> mostren aquests efectes antiestrès contra temperatures baixes i elevades, sequera i infecció d'agents químics. Les propietats antiestrès dels brassinoesteroides són tant importants que, fins i tot, els tomàquets i l'arròs tractats amb brassinoesteroides creixen millor a temperatures baixes que en condicions òptimes pel creixement.<sup>351</sup>

Davant la importància de l'activitat antiestrès dels brassinoesteroides, en aquest treball, com ja s'ha comentat a la pàgina 12, es pretén posar a punt un bioassaig antiestrès per avaluar l'activitat dels nous anàlegs que se sintetitzen al laboratori. D'aquesta manera, es disposarà de més informació per valorar la possible activitat d'aquestes fitohormones a nivell de camp i conèixer-ne més a fons les seves propietats. Aquest nou bioassaig es pretén que sigui diferent del test d'inclinació de la làmina d'arròs de que ja disposa l'equip. Per aquest motiu, es va decidir realitzar un test antiestrès ja que és una de les propietats més importants d'aquestes fitohormones i, en el RLIT, únicament s'avalua la capacitat de creixement que els brassinoesteroides confereixen a les plantes. A més, per tal de tenir en compte tot el regne de les angiospermes amb un representant de cadascun dels dos principals grups (monocotiledònies i dicotiledònies) es va creure interessant treballar amb una planta dicotiledònia ja que l'arròs és monocotiledoni. Es va escollir el rave però, enlloc de treballar amb la planta crescuda, com els bioassaigs mencionats en la **Taula 1**, es va decidir treballar sobre l'etapa de germinació per la seva alta rapidesa i sensibilitat.

L'efecte antiestrès que es pretén estudiar en aquest treball és la capacitat de les fitohormones de superar l'efecte negatiu provocat per elevades concentracions salines en el sòl. Les plantes absorbeixen les sals solubles en aigua presents en el sòl però, si aquestes es troben en concentracions elevades, poden suprimir el creixement de la planta. Aquesta excessiva salinitat pot afectar a la germinació de les llavors, al seu creixement, al rendiment i productivitat de les collites,<sup>352</sup> alhora que també pot inhibir la divisió cel·lular.<sup>353</sup> Altres efectes causats per aquest estrès salí són alteracions en la composició de pigments i la inhibició de la síntesi de proteïnes.<sup>354</sup> De fet, un dels factors limitants en l'agricultura en zones àrides i semiàrides és el contingut salí de l'aigua emprada per al reg. Els danys salins ocasionats poden ser deguts a efectes osmòtics, ja que la presència elevada de sals dificulta l'absorció d'aigua i provoca la deshidratació de les cèl·lules. A més, si la planta té dificultats per absorbir aigua, aquesta haurà d'utilitzar energia per aconseguir-ho, enlloc d'emprar-la per al seu creixement o maduració dels fruits.

#### **1.1. Germinació de llavors**

Les llavors són, en general, capaces de romandre en un estat en que les activitats vitals es redueixen al mínim, en espera de condicions ambientals favorables que permetin la germinació. La recuperació de l'activitat biològica per part de la llavor constitueix el procés de germinació i es dona en tres fases

successives. La primera d'elles és la fase d'hidratació, que correspon a una intensa absorció d'aigua per part dels diferents teixits que formen la llavor. La segona fase és la de germinació i és on tenen lloc les transformacions metabòliques imprescindibles per al desenvolupament de la planta. Per últim queda la fase de creixement, que és on es donen els canvis morfològics visibles, com l'elongació de la radícula.

Els factors externs que més influeixen en el procés de germinació són la humitat, la temperatura i l'aireació. Per tal que la llavor torni a tenir un metabolisme actiu cal que els teixits s'hidratin, per tant aquesta ha d'estar en contacte físic amb l'aigua. La temperatura és un factor decisiu en el procés de germinació, ja que influeix en la velocitat de les reaccions bioquímiques que es donen en la llavor després de la seva rehidratació. Existeix una temperatura mínima per sota de la qual no té lloc la germinació i un màxima per sobre de la qual tampoc es dona aquest procés. La temperatura òptima es troba entre aquestes dues i es defineix com la més adequada per aconseguir el major percentatge de germinació en el mínim de temps possible, que per a les espècies originàries de la zona mediterrània es troba entre 15-20 °C. Per últim, el procés d'aireació és essencial perquè l'embrió necessita oxigen suficient per a l'obtenció d'energia per mantenir les seves activitats metabòliques.

## 1.2. Antecedents

L'any 2003, Anuradha *et al.*<sup>355</sup> van realitzar dos estudis sobre els efectes d'alguns brassinoesteroides durant el procés de germinació de l'arròs quan les llavors havien estat tractades amb sal.

En el primer d'ells, les llavors s'esterilitzaven amb hipoclorit sòdic i, després de netejar-les amb abundant aigua, es deixaven 24 hores en remull en aigua destil·lada (control), en una dissolució 150 mM de NaCl (per observar l'efecte d'estrès) o en aquesta mateixa dissolució salina juntament amb brassinoesteroide (24-epibrassinolida o homobrassinolida (**2**)) (per observar l'efecte d'antiestrès) a concentracions entre 0.5-3.0 µM. Després de dipositar-les en plaques de Petri, es deixaven a la foscor a 20 °C. Transcorregudes 24 i 36 hores es comptava el nombre de llavors germinades. En les plaques tractades amb concentracions de brassinoesteroide entre 0.5 µM i 1 µM s'observava un menor efecte d'antiestrès que en les tractades amb una concentració 3 µM. Els resultats obtinguts mostraven que l'aplicació de brassinoesteroide contrarestavava l'efecte provocat per la sal i, alhora, provocava una estimulació del creixement.

Anuradha *et al.* van realitzar un segon estudi variant algunes condicions del bioassaig anterior. En aquest cas, després de deixar les llavors en remull durant 24 hores en aigua destil·lada o dissolucions de brassinoesteroide 3 µM, es dipositaven en plaques que s'introdueixen a una cambra a 25 °C enlloc de 20 °C i amb un fotoperíode de 12 hores de llum i 12 hores de foscor enlloc de deixar-les tota l'estona a la foscor. Durant aquesta etapa de tres dies enlloc de les 24 hores anteriors, afegien una dissolució de clorur sòdic durant l'experiment en totes les plaques excepte la de control i, en algunes d'elles, també s'afegia brassinolida (**1**), epibrassinolida o homobrassinolida (**2**). En les llavors tractades amb qualsevol de les dissolucions de brassinoesteroide, s'observava que el creixement de les llavors i la quantitat de clorofil·les també augmentava respecte les llavors tractades només amb NaCl, però era inferior al control. Per tant, l'aplicació de brassinoesteroide reduïa considerablement l'impacte de l'estrès salí en el creixement de les llavors.

Un altre estudi de l'efecte dels brassinoesteroides durant el procés de germinació, però aquest cop front

l'estrès causat pel polietilenglicol, és el realitzat per Vardhini *et al.*<sup>357</sup> també l'any 2003. En aquest bioassaig, es van esterilitzar llavors d'un cereal (*Sorghum vulgare*) amb hipoclorit sòdic i, seguidament, es van dipositar en plaques que contenien aigua destil·lada, polietilenglicol o polietilenglicol en presència de brassinoesteroides (epibrassinolida o homobrassinolida (**2**)). Es van deixar germinar les llavors a 25 °C per mesurar el nombre de llavors germinades al cap de 12, 24, 36 i 48 hores. També es van analitzar els nivells d'algunes proteïnes, aminoàcids o enzims. Amb els resultats obtinguts es va poder concloure que ambdós brassinoesteroides contraresten els efectes d'estrès causat pel polietilenglicol i restaura els nivells de proteïnes.

Finalment, és interessant mencionar l'estudi de Muthukarasamy *et al.*,<sup>357</sup> que van estudiar com afectava l'estrès salí en el procés de germinació del cacauet emprant el triadimefon com a agent regulador del creixement i antiestressant. El procediment consistia en tractar les llavors amb concentracions de NaCl entre 10-50 mM, essent 30 mM la concentració de treball idònia, ja que provocava la germinació del 50% de les llavors. Aquestes es deixaven durant 12 hores en aigua, NaCl 30 mM o clorur sòdic en presència de triadimefon. Seguidament, es dipositaven les llavors en plaques i es deixaven en un germinador a 30 °C durant 16 hores en presència de llum i a 22 °C durant 8 hores a la foscor. Transcorreguts 15 dies, s'analitzava el contingut de clorofil·la, carotenoides, proteïnes, prolina, glicina i alguns enzims. Els resultats mostraven que les llavors tractades amb NaCl presentaven una disminució d'aquests compostos i, per tant, un menor creixement, mentre que les tractades amb el compost triadimefon creixien millor.



## 2. Posta a punt del bioassaig

### 2.1. Primers experiments amb llavors de rave

En aquests primer experiments només es pretenia obtenir una idea general de les condicions a emprar en aquest bioassaig.

El protocol d'aquest bioassaig consistia, en un principi, en posar en una placa de Petri de 9 cm de diàmetre, un paper de filtre de la mateixa mida impregnat amb 1 mL de la dissolució d'interès. Aquestes dissolucions eren tres: una de control que únicament contenia el dissolvent, una que contenia la dissolució salina i, la darrera que contenia la dissolució salina complementada amb brassinoesteroide. Seguidament, es triaven 20 llavors de rave per a cada placa, descartant-se aquelles que presentaven un color més fosc, i es distribuïen homogèniament per la superfície del paper de filtre. Després de diverses proves, les plaques que contenien les llavors es van introduir en una cambra d'humitat controlada a 24 °C i a la foscor ja que, si es deixaven fora d'aquest recipient, l'aigua de les plaques s'evaporava i les llavors no es podien hidratar. Posteriorment, es va incloure una nova etapa basant-se en els treballs descrits a la literatura de manera que, prèviament a la distribució de les llavors en plaques, aquestes es deixaven en remull a la foscor i a 24 °C durant 14 o 24 hores depenent del cas.

Els resultats es mesuraven comptant les llavors germinades en cada placa. L'efecte d'estrès provocat pel medi salí s'observava en comparar les llavors germinades en la placa que únicament contenia el dissolvent i la que contenia la dissolució salina. Mentre que, l'efecte d'antiestrès dels brassinoesteroides s'observava comparant les llavors germinades en la placa que contenia la dissolució salina i la que contenia la mateixa dissolució però complementada amb brassinoesteroide.

En aquests primers experiments es va intentar determinar la concentració salina que millor permetia observar l'efecte antiestrès dels brassinoesteroides, l'efecte que tenia emprar diferents volums d'aigua en la placa de Petri, l'efecte del dissolvent a emprar o l'efecte de la concentració de brassinoesteroide.

#### 2.1.1. Efecte de la concentració de NaCl

L'objectiu era trobar la concentració de NaCl a la qual només es donava un 40-50% de la germinació de les llavors de manera que, quan s'apliqués la dissolució amb brassinoesteroide, es pogués observar l'efecte antiestrès d'aquestes hormones.

En un primer estudi, es van preparar dissolucions des d'una concentració de 0.003 g/l ( $5.1 \cdot 10^{-5}$  M) de NaCl fins a una dissolució de 200 g/l (3.4 M) i es van impregnar els papers de filtre amb 1 mL d'aquestes dissolucions. Els resultats d'aquest estudi, fruit de realitzar dues repeticions per a cada concentració, mostraren que el rang idoni de treball es trobava al voltant de 10-15 g/l (0.17-0.26 M) si la lectura es realitzava a les 36 hores (**Taula 77 i Figura 226**).

Es realitzà un nou estudi afegint l'etapa ja esmentada de deixar les llavors 24 hores en remull en la dissolució corresponent abans de dipositar-les sobre la placa de Petri. Es prepararen dissolucions de 10, 15 i 20 g/l comptant el nombre de llavors de rave germinades a les 24 i 48 hores per a les sis repeticions realitzades (**Taula 78 i Figura 227**).

NaCl (g/l)	Germinació 36 h	% germinació 36 h
0	19	95
0.0032	19	95
0.016	20	100
0.08	19	95
0.4	18	90
2	19	95
10	13.5	68
15	6.5	33
20	0	0
25	0.5	3
50	0	0
100	0	0
200	0	0

Taula 77. Nombre de llavors de rave germinades al dipositar-les sobre una placa amb dissolució salina.

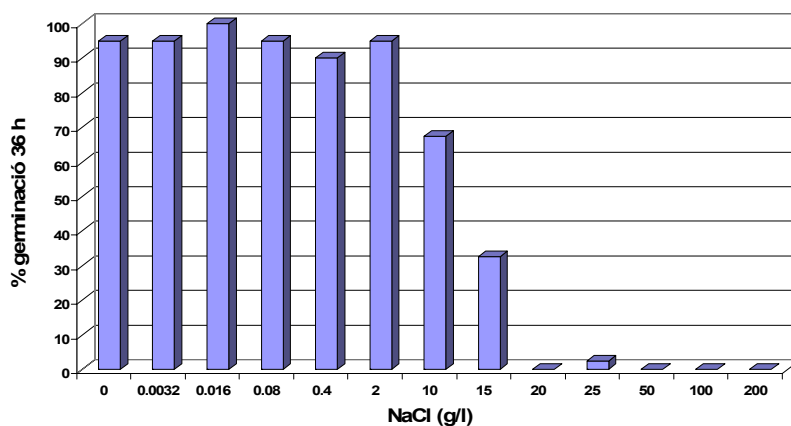


Figura 226. Efecte de la concentració de NaCl sobre la germinació de llavors.

NaCl (g/l)	Germinació 24 h	Germinació 48 h	% germinació 24 h	% germinació 48 h
0	18.5	19.5	92.5	97.5
10	8	13.5	40	67.5
15	4	11.5	20	57.5
20	1	7	5	35

Taula 78. Nombre de llavors de rave germinades al dipositar-les sobre una placa amb dissolució salina de 5-20 g/l.

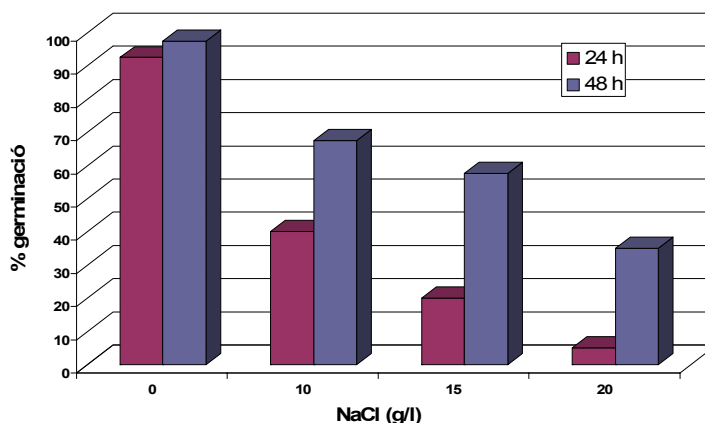


Figura 227. Efecte de la concentració de NaCl sobre la germinació de llavors.

Amb els resultats obtinguts d'aquests experiments sembla que la concentració de NaCl idònia per germinar al voltant del 50% de llavors es troba a 10-15 g/l. Sembla que l'òptim per a 24 hores es troba a 10 g/l i per a 48 hores a 15 g/l.

### 2.1.2. Efecte del volum de dissolució emprat en el paper de filtre

Per observar com afecta la quantitat de dissolució que es diposita en cada placa de Petri a la germinació de les llavors de rave, es van avaluar dos volums, 1 i 3 mL. Es van realitzar dues repeticions d'aquesta experiència per a plaques amb aigua i amb diferents concentracions salines. Les llavors germinades es contaren a 24, 48 i 72 hores de dipositar-les en plaques de Petri i, després de romandre 24 en remull en aigua (Taula 79 i Figura 228).

Dissolució	Nombre llavors germinades			% germinació		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Aigua (1 mL)	13	19	19	65	95	95
Aigua (3 mL)	17.5	18.5	18.5	88	93	93
NaCl 10 g/l (1 mL)	6.5	17.5	19	33	88	95
NaCl 10 g/l (3 mL)	6	16.5	18.5	30	83	93
NaCl 15 g/l (1 mL)	6	16	19	30	80	95
NaCl 15 g/l (3 mL)	0.5	9	13	3	45	65
NaCl 20 g/l (1 mL)	3	16.5	17.5	15	83	88
NaCl 20 g/l (3 mL)	1	9	11.5	5	45	58
NaCl 25 g/l (1 mL)	1.5	11	15.5	8	55	78
NaCl 25 g/l (3 mL)	0	4.5	8	0	23	40

Taula 79. Efecte del volum de dissolució emprat en el paper de filtre.

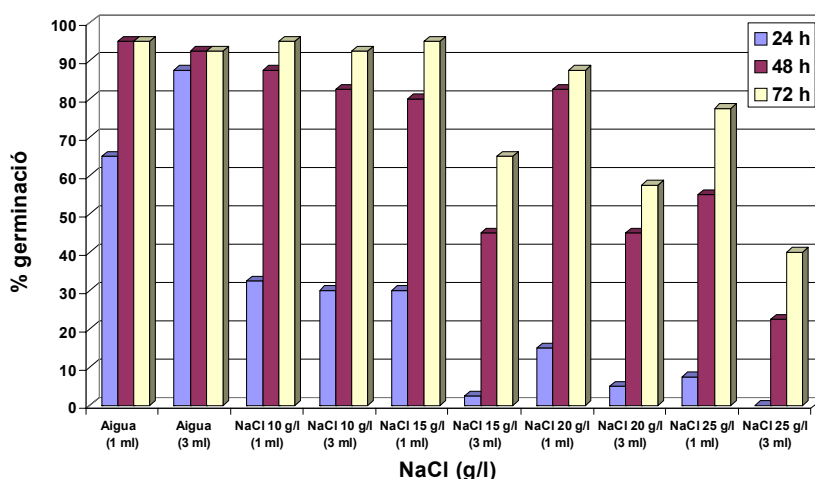


Figura 228. Efecte del volum de dissolució emprat en el paper de filtre.

En primer lloc, es pot observar que la germinació de les llavors en presència de 3 mL d'aigua és superior a la de 1 mL d'aigua. Això pot donar-se perquè la quantitat d'aigua en el cas de 1 mL no sigui suficient per a que la llavor tingui un metabolisme actiu, és a dir, l'aigua pot ser insuficient per a que els teixits de la llavor s'hidratin amb la mateixa efectivitat.

Per altra banda, en aplicar 3 mL de solució salina de concentració de 15-25 g/l es produeix un descens en la germinació, mentre que els resultats són molt similars per a una concentració de 10 g/l. Aquest descens podria ser degut a que, tot i que la concentració salina del medi quan s'apliquen 1 o 3 mL és la mateixa, la quantitat de sal per a cada llavor és major en el cas dels 3 mL.

Finalment, es pot observar que la concentració de sal idònia es troba al voltant de 10-15 g/l altre cop, confirmant els resultats ja obtinguts en l'apartat anterior. A les, 72 hores pràcticament totes les llavors estan germinades per a aquestes concentracions i per tant, no serveix aquesta mesura.

Per acabar de definir com afectava aquest factor en presència de brassinoesteroide, es va realitzar un nou experiment emprant una concentració de 0.02 g/l d'homocastasterona (**207**) (**Figura 213**). Els resultats que es mostren en la **Taula 80** reafirmen que quan s'apliquen 3 mL de solució salina es dona menys germinació que quan només se n'aplica 1 mL.

Dissolució	Nombre llavors germinades			% germinació		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Aigua (1 mL)	18.5	19	19.5	93	95	98
Aigua (3 mL)	19.5	19.5	20	98	98	100
NaCl 10 g/l (1 mL)	17	19.5	19.5	85	98	98
NaCl 10 g/l (3 mL)	7	15	15.5	35	75	78
NaCl 10 g/l + BR (1 mL)	10.5	19.5	19.5	53	98	98
NaCl 10 g/l + BR (3 mL)	5.5	12.5	15	28	63	75
NaCl 15 g/l (1 mL)	8	15.5	16	40	78	80
NaCl 15 g/l (3 mL)	0.5	11	13.5	3	55	68
NaCl 15 g/l + BR (1 mL)	5.5	14.5	16	28	73	80
NaCl 15 g/l + BR (3 mL)	1	9	11	5	45	55
NaCl 20 g/l (1 mL)	2	12	14	10	60	70
NaCl 20 g/l (3 mL)	0.5	1	2.5	3	5	13
NaCl 20 g/l + BR (1 mL)	0	7	8.5	0	35	43
NaCl 20 g/l + BR (3 mL)	0	4	9	0	20	45
NaCl 25 g/l (1 mL)	0	1	3.5	0	5	18
NaCl 25 g/l (3 mL)	0	0	0	0	0	0
NaCl 25 g/l + BR (1 mL)	0	0	0.5	0	0	3
NaCl 25 g/l + BR (3 mL)	0	0	0.5	0	0	3

**Taula 80.** Efecte del volum de dissolució en dissolucions amb brassinoesteroide.

En presència de sal, a concentracions de 15-25 g/l pràcticament no s'observa germinació a les 24 hores i, en el cas de 25 g/l, ni al cap de 72 hores s'aconsegueix la germinació de llavors. Sembla ser que, de les concentracions salines emprades, les més indicades per a realitzar l'estudi són 10 i 15 g/l, que és on s'observa una germinació al voltant del 50%. En el cas que es treballi a 10 g/l, s'haurien d'avaluar al cap de 24 hores com a màxim, ja que sinó el percentatge de germinació augmenta molt i resulta difícil veure'n l'efecte antiestrès dels brassinoesteroides. En canvi, si es treballa a 15 g/l, el temps idoni és a 48 hores i si es treballa a 20 g/l, el tempo idoni és de 72 hores.

L'efecte antiestrès dels brassinoesteroides no es pot determinar amb aquestes primeres experiències ja que únicament el percentatge de germinació augmenta en presència de brassinoesteroide en el cas en que s'ha treballat amb 3 mL de NaCl 20 g/l. En la resta de proves realitzades, el fet d'afegir brassinoesteroide produeix una disminució de la germinació de les llavors.

### 2.1.3. Efecte del dissolvent

Donada la insolubilitat dels brassinoesteroides en aigua es creu necessari trobar un dissolvent que dissolgui l'hormona a emprar en el bioassaig i que, alhora, no sigui tòxic per a les llavors. Per tal de determinar la toxicitat d'alguns dissolvents en l'etapa de germinació de les llavors de rave s'han efectuat algunes experiències amb etanol, dimetilsulfòxid, tetrahidrofurà i ATLAS. Aquest últim és un detergent aniónic líquid d'elevada viscositat, hexaoleat sorbitol de polioxietilè.

Per avaluar la toxicitat de l'etanol i del dimetilsulfòxid s'aplica 1 mL d'aquests dissolvents, a diferents concentracions, en el paper de filtre i es dipositen 20 llavors en ell. El nombre de llavors germinades a les 44 i 60 hores es mostra en la **Taula 81**. Els resultats obtinguts permeten concloure que únicament l'etanol a concentracions de 2.5% o 3% a les 44 hores és tòxic, és a dir, germinen menys del 80% de les llavors. Per tant, es pot emprar dimetilsulfòxid a concentracions de fins a 1% i d'etanol fins a 1.5%.

Dissolvent	Nombre llavors germinades		% germinació	
	44 h	62 h	44 h	62 h
Aigua	17	20	85	100
EtOH 1%	13	19	65	95
EtOH 1.5%	16	19	80	95
EtOH 2%	14	20	70	100
EtOH 2.5%	12	19	60	95
EtOH 3%	11	20	55	100
DMSO 0.05%	19	20	95	100
DMSO 0.0625%	18	20	90	100
DMSO 0.1%	20	20	100	100
DMSO 0.125%	16	18	80	90
DMSO 0.25%	12	18	60	90
DMSO 0.5%	17	20	85	100
DMSO 1%	20	20	100	100

**Taula 81.** Efecte de l'etanol i del dimetilsulfòxid sobre la germinació de les llavors de rave.

Finalment, es va avaluar la toxicitat del tetrahidrofurà i de l'ATLAS, aquest cop deixant en remull les llavors 24 hores abans de dipositar-les en la placa de Petri. Davant aquests resultats (**Taula 82**), cap d'ells és tòxic per a les llavors de rave a les concentracions estudiades a 44 hores. El THF no s'ha provat a concentracions superiors perquè a 1% ja es pot dissoldre el brassinoesteroide. En el cas de l'ATLAS, només es realitza l'estudi amb una única concentració perquè aquesta és la que s'utilitza habitualment<sup>139</sup> i és suficient per dissoldre l'hormona.

Dissolvent	Germinació 44 h	% germinació 44 h
Aigua	18	90
THF 0.1%	20	100
THF 0.5%	20	100
THF 1%	20	100
ATLAS 2.5%	20	100

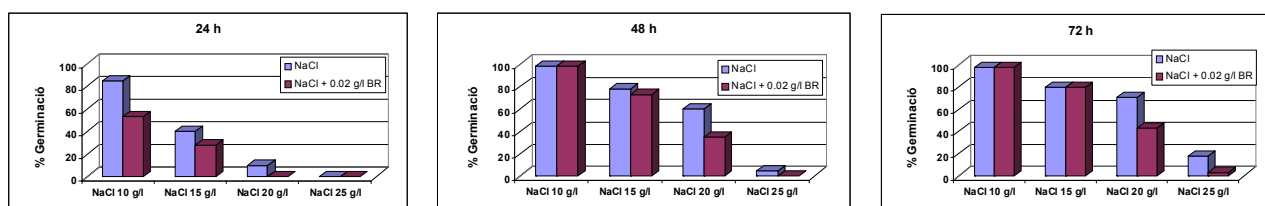
**Taula 82.** Efecte del THF i de l'ATLAS sobre la germinació.

### 2.1.4. Efecte de la concentració de brassinoesteroide

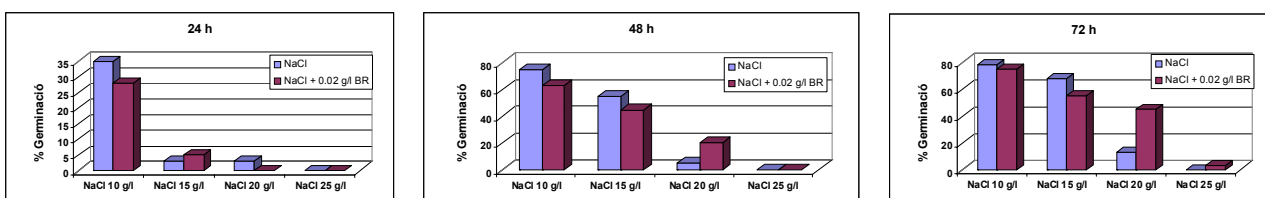
Es va intentar avaluar les concentracions més adequades per tal d'observar l'efecte antiestrès d'aquestes fitohormones.

En la primera experiència realitzada amb brassinoesteroide (**Taula 80**) es van obtenir uns resultats poc satisfactoris. Únicament es va observar un efecte antiestrès per part de l'homocastasterona (**208**) quan es va impregnar amb 3 mL el paper de filtre per a concentracions de 15 g/l de NaCl a les 24 hores, de 20 g/l a 48 i 72 hores i de 25 g/l a les 72 hores (**Figura 229**).

#### Aplicant 1 mL de dissolució sobre el paper de filtre de les plaques de Petri



#### Aplicant 3 mL de dissolució sobre el paper de filtre de les plaques de Petri



**Figura 229.** Germinació de les llavors de rave en dissolució de NaCl en presència de brassinoesteroide.

En una altra experiència, es va aplicar concentracions d'homocastasterona (**207**) de 0.2 g/l i 0.4 g/l per intentar augmentar el petit efecte antiestrès observat en l'experiment anterior. Aquest cop, donada la insolubilitat d'aquest producte en aigua, es va aplicar el brassinoesteroide dissolt en etanol abans d'introduir les llavors a la placa i es va deixar evaporar el dissolvent abans d'impregnar el paper de filtre amb 1 mL de la dissolució de NaCl de treball (**Taula 83**). L'experiment es va allargar fins a les 100 hores amb la intenció d'observar un major efecte sobre els brassinoesteroides i es va treballar amb concentracions de NaCl de 10, 12.5, 15 i 17.5 g/l.

Els resultats obtinguts no van permetre extreure conclusions sobre l'efecte dels brassinoesteroides en la germinació de llavors de rave estressades amb dissolucions salines, ja que no s'observa una tendència clara. Sembla que en treballar a concentracions salines de 15 i 17.5 g/l l'homocastasterona (**207**) augmenta el nombre de llavors germinades però, a concentracions inferiors de sal, es dona l'efecte contrari. A més, no en tots els casos s'observa que en augmentar la concentració de brassinoesteroide augmenti la germinació de les llavors. Així, si se centra l'atenció sobre la representació per a les 100 hores s'observa com a concentracions 10 i 17.5 g/l s'obté major germinació quan s'aplica 0.4 g/l d'homocastasterona (**207**) que no quan s'aplica 0.2 g/l, mentre que per a 15 g/l l'efecte és a d'inversa i per a 12.5 g/l, la germinació és la mateixa per a totes dues concentracions de **207**.

Dissolució	Nombre llavors germinades		% germinació	
	48 h	100 h	48 h	100 h
Aigua	20	20	100	100
NaCl 10 g/l	6	18	30	90
NaCl 10 g/l + BR 0.2 g/l	0	7	0	35
NaCl 10 g/l + BR 0.4 g/l	0	13	0	65
NaCl 12.5 g/l	2	18	10	90
NaCl 12.5 g/l + BR 0.2 g/l	1	9	5	45
NaCl 12.5 g/l + BR 0.4 g/l	0	9	0	45
NaCl 15 g/l	0	5	0	25
NaCl 15 g/l + BR 0.2 g/l	0	12	0	60
NaCl 15 g/l + BR 0.4 g/l	0	6	0	30
NaCl 17.5 g/l	0	4	0	20
NaCl 17.5 g/l + BR 0.2 g/l	0	8	0	40
NaCl 17.5 g/l + BR 0.4 g/l	0	12	0	60

Taula 83. Efecte de l'aplicació d'homocastasterona (207) sobre dissolucions de NaCl.

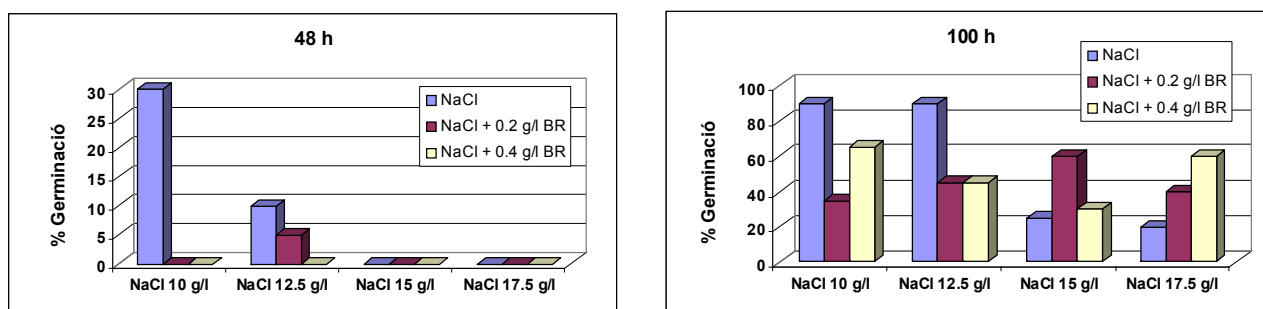


Figura 230. Efecte de l'homocastasterona (207) sobre la germinació de llavors de rave estressades amb NaCl.

Davant d'aquesta contradicció, es va pensar que, a l'emprar l'aigua com a dissolvent, el brassinoesteroide (insoluble en aigua) no podia arribar a la llavor i actuar sobre aquesta. En realitzar proves similars a les anteriors però emprant etanol i dimetilsulfòxid com a dissolvent es van obtenir també resultats contradictoris i, per aquest motiu, es va descartar aquesta hipòtesi. Així, es va decidir realitzar un disseny d'experiments per tal de trobar les condicions de treball òptimes.

## 2.2. Disseny d'experiències amb llavors de rave

Tot i el gran nombre d'experiments realitzats per a determinar la manera idònia d'efectuar aquest bioassaig no es va arribar a resultats satisfactoris i, per aquest motiu, es va decidir realitzar un disseny d'experiments. Sembla, amb els resultats que s'havien obtingut en aquell moment, que el protocol més adequat era deixar 24 hores en dissolució les llavors i després, dipositar-ne 20 sobre un paper de filtre humitejat amb la dissolució pertinent i contingut en una placa de Petri. La concentració salina més adequada per a germinar el 50% de les llavors semblava trobar-se al voltant de 10-15 g/l per a lectures de germinació a les 24 i 48 hores, tot i que les poques proves realitzades amb brassinoesteroides semblaven maximitzar el seu efecte antiestrès per a concentracions de 15-20 g/l i temps de lectura superiors. La quantitat idònia de dissolució a aplicar en el paper de filtre podria ser de 3 mL si es vol maximitzar l'efecte salí o de 1 mL si es vol minimitzar. El dissolvent podria ser aigua, etanol 1.5%, dimetilsulfòxid 1%, THF 1% o ATLAS 2.5% ja que tots dissolvent bé els brassinoesteroides i no són tòxics per a les llavors a les 44 hores. La concentració de

brassinosteroides a aplicar es desconeixia però semblava que concentracions entre 0.02 i 0.4 g/l podien ser suficients per observar l'efecte antiestrès d'aquestes fitohormones.

### 2.2.1. Factors i nivells del disseny

De totes maneres, aquestes proves realitzades van servir per a definir els factors a estudiar en el disseny i els nivells per a cada factor (**Taula 84**).

- Factor A: temps de remull de les llavors. Sembla que pot ser un punt crític ja que és la fase en que les llavors absorbeixen aigua i comencen a germinar. Els nivells d'aquest factor es fixen en 12 i 24 hores que són els temps de remull descrits en la literatura.
- Factor B: tria prèvia de llavors. Tot i que posteriorment a la fase de remull de les llavors s'efectua ja una tria descartant les que estan germinades o les que són massa fosques, es podria incloure un pas previ que consistís en descartar les llavors amb mal aspecte (color fosc, textura rugosa, tamany petit...) abans de deixar-les en remull. La importància d'aquest factor es considera baixa a priori. Els nivells d'aquest factor són la realització o no de la tria.
- Factor C: Mullat del paper de filtre. Aquest factor es considerava important en el protocol anterior en que les llavors no se sotmetien prèviament al remull doncs, en alguns casos, l'aigua que impregnava el paper de filtre no era suficient i les llavors se secaven, mesurant-se l'estrès salí i l'estrès produït per l'absència d'aigua. Un cop introduïda, la fase de remull, es considera un factor menys important. Els nivells a contemplar per a aquest factor són 1 mL, 3 mL o mullar tot el paper de filtre submergint-lo en la dissolució de treball.
- Factor D: Concentració de brassinosteroides. Un dels factors que es considera més important ja que només s'han observat alguns resultats positius a concentracions superiors de 0.01 g/l i es creu que concentracions de 0.0001 g/l també haurien de provocar un efecte positiu. Per tant, es fixen els nivells en  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  i  $10^{-5}$  g/l de brassinosteroides.<sup>362, 363</sup>
- Factor E: Dissolvent. Els autors que treballen amb bioassaigs d'antiestrès semblants a aquest no descriuen la manera d'aplicar el brassinosteroides. De totes maneres, es considera important aquest factor per a que el brassinosteroides quedi dissolt i l'assimili la llavor. Els nivells són els diferents dissolvents ja assajats que es consideren no tòxics: aigua, etanol, dimetilsulfòxid, THF i ATLAS.
- Factor F: Concentració de NaCl. Factor important per a obtenir una resposta adequada. Els nivells a estudiar es fixen en 10, 12.5 i 15 g/l.
- Factor G: Temps de lectura. D'ell depenen en gran mesura que les llavors estiguin germinades al 50 o al 100%. Malgrat tot, per facilitar la lectura, es creu convenient no incloure aquest factor en el disseny d'experiències ja que augmentaria notablement el nombre d'experiències a realitzar i contar el nombre de llavors germinades a les 24 i a les 48 hores.
- Factor H: Tipus de llavors. En la bibliografia s'ha descrit l'ús de llavors d'arròs,<sup>360,361</sup> de cacauet<sup>363</sup> o de mongeta<sup>362</sup> però en aquest treball s'escull, de moment, el rave per la seva rapidesa en la germinació, la facilitat de diferenciar les llavors germinades de les que no ho estan i perquè, com ja s'ha comentat, es tracta d'una planta dicotiledònia (l'equip ja disposa d'un bioassaig de creixement amb una monocotiledònia, l'arròs). Per aquests motius, tampoc s'inclou aquest factor en el disseny per a no augmentar considerablement el nombre d'experiments a realitzar.



Altres factors que podrien afectar són la temperatura de germinació i el fotoperíode de germinació però tampoc s'inclouen en el disseny i s'assumeixen com a valors prefixats.

Factors	Nivell 1	Nivell 2	Nivell 3	Nivell 4	Nivell 5
A	14 h	24 h			
B	Sí	No			
C	1 mL	3 mL	Mullat		
D	0.01 g/l	0.001 g/l	0.0001 g/l	0.00001 g/l	
E	Aigua	DMSO 1%	EtOH 1.5%	THF 1%	ATLAS 2.5%
F	10 g/l	12.5 g/l	15 g/l		

Taula 84. Factors i nivells a estudiar en el disseny d'experiments del bioassaig antiestrès.

### 2.2.2. Elecció del disseny

Donada la varietat de nivells que es tenen per als diferents factors es creu interessant emprar un disseny de Taguchi, doncs un disseny factorial complet representaria un nombre elevadíssim d'experiments impossible de realitzar a la pràctica i un disseny factorial no permetria estudiar aquests factors amb nivells tant dispersos.

Es calcula els graus de llibertat per a cada factor i per a les interaccions Dx E (brassinosteroides-dissolvent) i Dx F (brassinosteroides-NaCl) (Taula 85). S'escullen aquestes interaccions perquè el dissolvent emprat pot afectar en la capacitat d'arribar el brassinosteroides a la llavor depenent de la seva solubilitat i la concentració de NaCl pot variar segons la concentració de brassinosteroides emprada.

Factors i interaccions	Graus de llibertat
A	1
B	1
C	2
D	3
E	4
F	2
D x E	12
D x F	6
<b>Total</b>	<b>31</b>

Taula 85. Graus de llibertat dels factors i interaccions estudiats.

Per tant, els graus de llibertats mínim a estudiar per a tots els factors als nivells indicats és 31 i, la matriu ortogonal a emprar és elevadíssima. S'ha intentat construir una matriu nova amb 32 experiments però s'ha comprovat que no n'existeix cap. El nombre d'experiments a realitzar amb aquesta matriu impossibilita aplicar-ho i més si es té en compte que, per a cada experiment, s'han de preparar tres plaques: per cada placa sembrada amb dissolució de brassinosteroides s'ha de preparar una amb dissolució salina sense brassinosteroides i una amb dissolvent únicament. Per tant, es va decidir estudiar el factor E (dissolvent) a part. Aquest és el factor que més graus de llibertat aporta (4) i a més està present en la interacció Dx E augmentant en 12 el nombre de graus de llibertat.

Així, en un primer disseny d'experiments, es va creure interessant fixar el factor E com a aigua. El fet que el brassinosteroides no es dissolgui en aigua impossibilita la preparació de dissolucions a partir d'una dissolució mare, de manera que cada dissolució de brassinosteroides a estudiar s'hauria de preparar a partir d'una mostra sòlida de l'hormona. L'elevat consum d'hormona que això suposa (uns 2-3 mg

d'hormona per a cada prova) obliga a fixar el factor D en un únic nivell ja que no es disposa de grans quantitats d'aquesta.

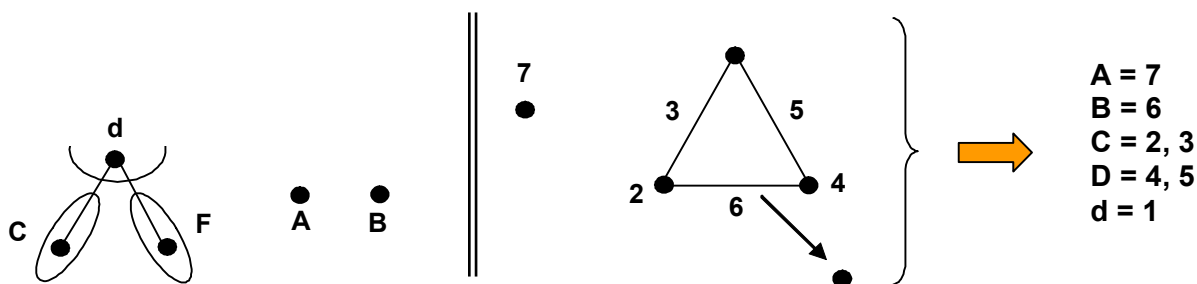
Per aquests motius, es van preparar dos dissenys. En el primer, es fixa el factor E com aigua i el factor D a 0.01 g/l i, en el segon, es pretén centrar els esforços en l'estudi d'aquests dos factors prefixats en el primer disseny (D i E).

Per al primer disseny d'experiments els nivells dels factors a estudiar i els graus de llibertat del disseny es mostren en la **Taula 86**. Donat que el nombre total de graus de llibertat és 6, es va escollir la matriu  $L_8(2^7)$  dels dissenys de Taguchi que, en correspondre a l'estudi de 2 factors a 7 nivells, es va ajustar per a estudiar el cas de 2 factors a 2 nivells i 2 a 3 nivells que ens ocupa.

Factors	Nivell 1	Nivell 2	Nivell 3	Graus de llibertat
A	14 h	24 h		1
B	Sí	No		1
C	1 mL	3 mL	Mullat	2
F	10 g/l	12.5 g/l	15 g/l	2
<b>Total</b>				<b>6</b>

**Taula 86.** Factors, nivells i graus de llibertat a estudiar en el primer disseny d'experiments.

El gràfic lineal per al nostre sistema en estudi es mostra a l'esquerra de la **Figura 231**. En ell, A i B són factors a 2 nivells, C i F són factors a 3 nivells i d representa la columna desocupada necessària per a poder transformar la matriu ortogonal  $L_8(2^7)$  en la nova matriu que ens interessa  $L_8(2^2 \times 3^2)$ . A la dreta de la **Figura 231** es mostra el diagrama lineal per al disseny de Taguchi  $L_8(2^7)$  que, en transformar-lo, permet arribar a la correspondència A = 7; B = 6; C = 2, 3; F = 4, 5 i d = 1.



**Figura 231.** Correspondència entre el diagrama lineal del nostre sistema i el del disseny de Taguchi  $L_8(2^7)$ .

La matriu del disseny d'experiments de Taguchi  $L_8(2^7)$  es mostra en la **Taula 87** i la matriu resultant de la transformació per a estudiar els 2 factors a 2 nivells i els 2 factors a 3 nivells es mostra en la **Taula 88**.

Finalment, en la **Taula 89** es mostra la matriu d'experiències final a realitzar per a aquest primer disseny d'experiments.

Experiència	d	C		F		B	A
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

Taula 87. Matriu del disseny d'experiments de Taguchi  $L_8(2^7)$ .

Experiència	2	3	C	4	5	F	B	A
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	3	2	2
3	2	2	3	1	1	1	2	2
4	2	2	3	2	2	3	1	1
5	1	2	1	1	2	1	1	2
6	1	2	1	2	1	2	2	1
7	2	1	2	1	2	1	2	1
8	2	1	2	2	1	2	1	2

Experiència	C	F	B	A
1	1	1	1	1
2	1	3	2	2
3	3	1	2	2
4	3	3	1	1
5	1	1	1	2
6	1	2	2	1
7	2	1	2	1
8	2	2	1	2

Taula 88. Matriu del disseny a estudiar un cop transformada.

Experiència	Mullat del paper de filtre	[NaCl]	Tria de llavors prèvia	Temps en remull
1	Mullat	10 g/l	Sí	14 h
2	Mullat	15 g/l	No	24 h
3	3 mL	10 g/l	No	24 h
4	3 mL	15 g/l	Sí	14 h
5	Mullat	10 g/l	Sí	24 h
6	Mullat	12.5 g/l	No	14 h
7	1 mL	10 g/l	No	14 h
8	1 mL	12.5 g/l	Sí	24 h

Taula 89. Matriu d'experiències per al primer disseny a realitzar.

Per al segon disseny d'experiments es van mantenir, en un primer moment, tots els factors i interaccions que s'havien definit al principi però eliminant el nivell aigua del factor dissolvent (E). Encara es mantenia un elevat nombre de graus de llibertat (27) i, per tant, continua resultant inviable realitzar un disseny amb tants experiments. Els graus de llibertat es disminueixen eliminant algun dels factors o nivells ja estudiats en l'anterior estudi per poder treballar amb la matriu  $L_{16}(2^{15})$  que és la matriu més gran amb la que es pot treballar experimentalment.

Es van proposar una sèrie de matrius de les que es va escollir la matriu de la **Taula 90**. Es va escollir aquesta matriu perquè es volia estudiar el factor F, un dels més importants, i els factors D i E, factors no estudiats en el disseny anterior, a tres o quatre nivells encara que fos en detriment de la interacció DxF. Però, aquesta matriu no es va arribar a aplicar experimentalment perquè els resultats obtinguts en el disseny d'experiments de Taguchi  $L_8(2^7)$  van servir per concloure que les llavors de rave no eren adequades per a observar l'efecte antiestrès dels brassinoesteroides en aquestes condicions.

Factors	Nivell 1	Nivell 2	Nivell 3	Nivell 4	Graus de llibertat
A	14 h	24 h			1
D	0.01 g/l	0.001 g/l	0.0001 g/l		2
E	DMSO 1%	EtOH 1.5%	THF 1%	ATLAS 2.5%	3
F	10 g/l	12.5 g/l	15 g/l		2
D x E					6
Total					14 + d

**Taula 90.** Factors, nivells i graus de llibertat a estudiar en el segon disseny d'experiments.

### 2.2.3. Disseny de Taguchi $L_8(2^7)$

Els resultats que s'obtenen s'expressen mitjançant la diferència de llavors germinades en presència de brassinoesteroide i el nombre de llavors germinades sense fitohormona (**Taula 101**). Si aquests resultats són positius, indicarà que el brassinoesteroide té un efecte antiestrès en la germinació de les llavors però, en molts casos, s'han obtingut resultats negatius. Aquest fet demostra que el brassinoesteroide no es capaç de superar l'efecte estressant del NaCl en algunes de les condicions de treball. Això fa pensar que la rapidesa de germinació del rave, 48 hores, no permet al brassinoesteroide actuar i, per tant, el més convenient seria substituir aquestes llavors per altres amb un període de germinació major, com la mongeta o l'arròs.

Experiència	Repeticions a 24 hores						Repeticions a 48 hores					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	7	-1	1	-6	1	-3	5	1	1	-2	0	-1
2	-1	-3	2	0	0	2	0	-11	2	-3	-3	1
3	-4	-3	-2	1	1	-6	0	-1	0	-1	0	-2
4	1	-2	-1	1	3	-3	2	-5	-1	0	4	-2
5	1	-7	6	3	-1	9	1	-6	-1	2	2	0
6	0	1	1	3	5	-1	3	1	1	3	1	-1
7	-1	-6	-1	-1	4	0	1	-1	-1	2	-1	-1
8	1	1	0	7	5	1	0	0	1	6	1	0

**Taula 91.** Resultats obtinguts en el disseny de Taguchi  $L_8(2^7)$ .

De totes maneres, donat que ja es disposava dels resultats es va decidir analitzar-los per extreure'n algunes conclusions que facilitessin la feina en la definició del protocol del bioassaig per a les noves llavors. Cal tenir en compte els valors negatius obtinguts no poden analitzar-se mitjançant l'ANOVA de Pareto i és necessari realitzar un canvi d'escala per a convertir-los en nombres positius. El que es va fer va ser sumar 12 a tots els valors per tal que el nombre més petit fos el 1.

Els resultats s'analitzen, de la mateixa manera que s'ha realitzat en el disseny de Taguchi de la pàgina 55, mitjançant l'ANOVA de Pareto des del punt de vista de la mitjana, la desviació estàndard i la relació senyal soroll (s/n) (**Equació 1**). Aquest cop però, els resultats també s'avaluen en dos moments, a les 24 i les 48 hores de dipositar les llavors en les plaques de Petri, i per dos operaris diferents per a observar la reproductibilitat del bioassaig. Per tant, s'analitzen els resultats mitjançant la mitjana, la desviació estàndard i la relació senyal soroll per als resultats obtinguts:

- A les 24 hores per l'operari 1.
- A les 24 hores per l'operari 2.
- A les 24 hores pels operaris 1 i 2.

- A les 48 hores per l'operari 1.
- A les 48 hores per l'operari 2.
- A les 48 hores pels operaris 1 i 2.

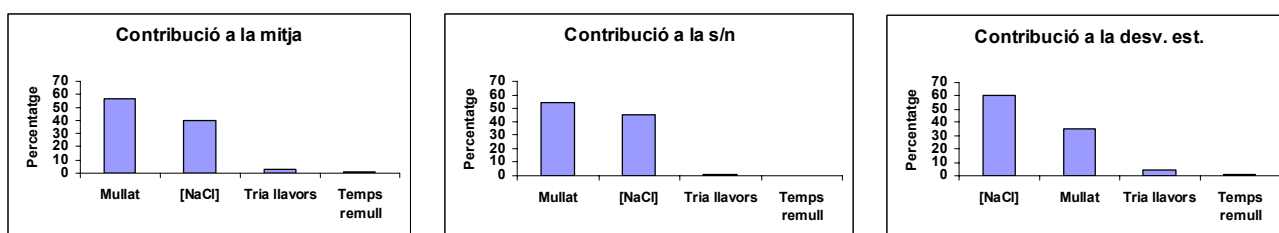
Tot i analitzar els resultats obtinguts per separat segons el temps que les llavors portaven en plaques, l'operari que ha realitzat l'experiència o el paràmetre escollit per al tractament de dades (mitjana, desviació estàndard, relació senyal soroll), s'han obtingut resultats molt similars en tots els casos. Per tant, a continuació, es mostra a mode d'exemple l'anàlisi efectuat a les 24 hores per l'operari 1 i, la resta de taules i gràfics es presenten en l'annex D.

Els resultats obtinguts per l'operari 1 després de 24 hores de dipositar les llavors en les plaques de Petri es mostren en la **Taula 92**.

Experiència	Repeticions			Mitjana	Desv. est.	s/n
	1	3	5			
1	19	13	13	15.0	3.5	23.1
2	11	14	12	12.3	1.5	21.7
3	8	10	13	10.3	2.5	19.8
4	13	11	15	13.0	2.0	22.1
5	13	18	11	14.0	3.6	22.4
6	12	13	17	14.0	2.6	22.6
7	11	11	16	12.7	2.9	21.7
8	13	12	17	14.0	2.6	22.6

**Taula 92.** Resultats obtinguts per l'operari 1 a les 24 hores.

En la **Figura 232** es mostra, després d'analitzar segons l'ANOVA de Pareto els resultats, la contribució a la mitjana, desviació estàndard i a la relació senyal soroll de cadascun dels factors estudiats.



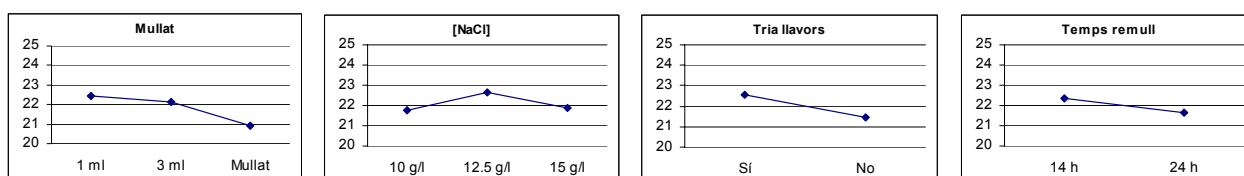
**Figura 232.** Contribució dels diferents factors a la mitjana, a la desviació estàndard i a la relació senyal soroll.

En funció dels gràfics de la **Figura 232** sembla que els factors més influents per observar una resposta d'antiestrès per part de l'homocastaterona (207) són el la concentració de NaCl i la quantitat d'aigua emprada per a mullar el paper de filtre sobre el que es dipositen les llavors. En els tres gràfics són els dos factors més influents. Si se centra l'atenció en la contribució dels factors a la relació senyal/soroll (gràfic que conté informació tant de la mitjana com de la desviació estàndard), s'aprecia que el factor mullat contribueix en més del 54% i el factor NaCl en més del 44%, mentre que la resta contribueixen en menys d'un 0.5%. Si se centra l'atenció en altres dos gràfics, el de la mitjana segueix la mateixa tendència que el de la relació s/n però en el de la desviació estàndard els dos factors més influents varien els papers perquè en ells el factor NaCl influeix en més del 60% i el factor mullat en més del 35%. De totes maneres, el que sí que és evident en qualsevol dels tres gràfics és que únicament afecten, i amb gran diferència, els factors NaCl i mullat.

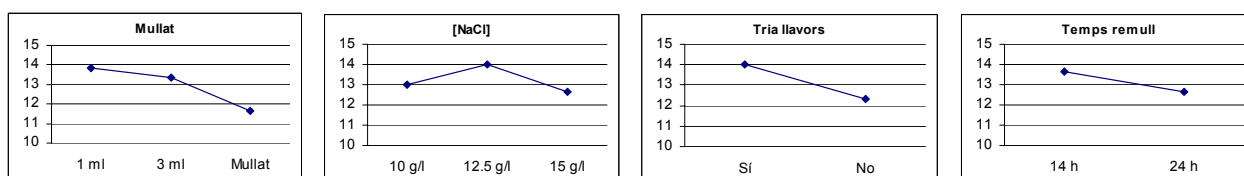
Aquests resultats concorden amb les hipòtesis realitzades, ja que s'esperava una gran influència del factor [NaCl]. També s'esperava, com bé a succeït, que la tria de llavors no tingués molta importància donat que, posteriorment a l'etapa en remull, ja es fa una tria de llavors.

També s'han elaborat els gràfics factorials dels factors per tal de determinar quin era el nivell més convenient en cada cas (**Figura 233**).

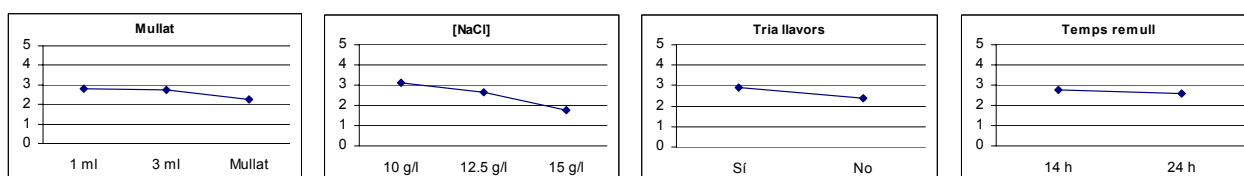
#### Gràfics factorials calculats a partir de la relació senyal/soroll



#### Gràfics factorials calculats a partir de la mitjana



#### Gràfics factorials calculats a partir de la desviació estàndard



**Figura 233.** Gràfics factorials on es representa el promig del nombre de llavors germinades.

Els gràfics factorials, tant si s'efectuen calculant els valors promigs de la relació senyal/soroll, de la mitjana o de la desviació estàndard la tendència dels gràfics és similar.

Per als factors mullat, tria de llavors i temps en remull, el nivell que maximitza la resposta és el nivell 1 per a qualsevol dels tres anàlisis. En canvi, el factor [NaCl] presenta una resposta màxima en el nivell 2 (12.5 g/l) per als gràfics factorials calculats a partir de la mitjana o la relació senyal soroll i en el nivell 1 (10 g/l) per al gràfic calculat a partir de la desviació estàndard. El que sí que es fa pal·lès és que la concentració que dona una resposta menor és 15 g/l de NaCl. Per tant, les condicions que permeten maximitzar l'efecte antiestrès dels brassinoesteroides són quan es treballa amb concentracions de 12.5 g/l de NaCl i 1 mL de dissolució per humitejar el paper de filtre. Els altres dos factors, tot i que sembla millor triar prèviament les llavors i deixar-les 14 hores en remull, es pot escollir qualsevol dels dos nivells ja que la seva influència en la resposta final és molt petita (**Figura 232**). De fet, aquests factors, per comoditat a l'hora de realitzar el bioassaig, es fixen en 24 hores de remull i s'elimina la tria prèvia de llavors.

Si se centra l'atenció en el nombre de llavors germinades, en l'experiència 8 (12.5 g/l i 1 mL) és la més alta en la majoria dels anàlisis realitzats i una de les més elevades en la resta. En la **Taula 103** es mostra la posició que ocupa l'experiment 8 dins dels vuit experiments realitzats quan s'analitza segons els operaris o els temps de lectura.

	Posició
Operari 1 a les 24 hores	2º
Operari 2 a les 24 hores	1º
Operari 1 a les 48 hores	3º
Operari 2 a les 48 hores	1º
Operaris 1 i 2 a les 24 hores	1º
Operaris 1 i 2 a les 48 hores	1º

Taula 93. Posició de l'experiment 8 segons la resposta antiestrès en aquestes condicions.

### 2.3. Experiments amb llavors d'arròs

Com s'ha comentat a l'inici de l'apartat 2.2.3 del bioassaig, es va decidir, en els darrers experiments, substituir les llavors de rave per les llavors d'arròs que són de germinació més lenta. Es va emprar com a dissolvent Atlas a una concentració de 0.5% i, es va treballar a una concentració de 9 g/l de NaCl. Es van realitzar dues proves per determinar el tipus d'arròs més idoni. Es va avaluar l'arròs de varietat *Indica* i de varietat *Bahia* (tots dos amb closca). D'aquestes proves es va observar que s'obtenien resultats similars amb les dues varietats però que la lectura de les llavors germinades era més senzilla amb la varietat *Bahia* (Taula 95).

Prova 1		24 h	42 h	45 h	48 h	68 h
<i>Bahia</i>	Atlas 0.5%	13.3	95.0	96.7	96.7	96.7
	NaCl 9 g/l	0.0	11.7	20.0	33.3	75.0
	BR (3.0E-4 M)	0.0	16.7	26.7	40.0	78.3

Prova 2		24 h	30 h	44 h	48 h	52 h
<i>Bahia</i>	Atlas 0.5%	7.5	77.5	95.0	95.0	95.0
	NaCl 9 g/l	0.0	8.3	38.3	51.7	58.3
	BR (2.7E-4 M)	0.0	8.3	46.7	58.3	65.0
<i>Indica</i>	Atlas 0.5%	0.0	57.5	95.0	95.0	95.0
	NaCl 9 g/l	0.0	0.0	1.7	5.0	6.7
	BR (2.7E-4 M)	0.0	3.3	8.3	13.3	16.7

Taula 94. Germinació de les llavors expressat en %.

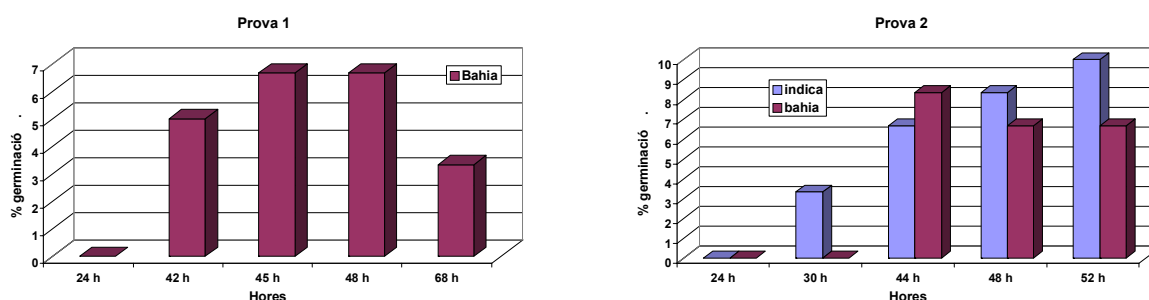


Figura 234. Gràfics on es representa la diferència de germinació (%) quan les llavors es cultiven en presència de brassinoesteroides i sal o quan es cultiven únicament en presència de sal, tant per a la varietat *Bahia* com *Indica*.

En aquests gràfics de la Figura 234 s'observa que, en cultivar l'arròs en presència d'homocastasterona (207), la germinació es veu incrementada un 8-10% després de 48 hores. Per tant, sembla que la lectura òptima es pot realitzar a les 48 hores i que l'arròs és una llavor que permet veure l'efecte antiestrès dels brassinoesteroides.

### 3. Conclusions

S'ha dissenyat un bioassaig antiestrès per avaluar la capacitat de les hormones vegetals de superar l'estrès provocat per concentracions salines elevades.

En un primer moment, es va intentar posar a punt aquest bioassaig en l'etapa de germinació del rave sense èxit. La ràpida germinació de les llavors de rave no permetia als brassinoesteroides, en menys de 72 hores, actuar sobre aquestes per superar l'efecte estressant del NaCl. Fins i tot, es va realitzar un disseny de Taguchi per intentar optimitzar-ne les condicions idònies però la incapacitat de superar l'estrès salí per part dels brassinoesteroides no va permetre extreure unes condicions adequades per al bioassaig del rave. Tot i així, va servir per determinar algunes variables en estudi: 1 mL de dissolució sobre el paper de filtre de les plaques, 24 hores en remull abans de dipositar les llavors en plaques, que no era necessari una tria prèvia de llavors i que la concentració salina més adequada era de 10-15 g/l.

Aquest bioassaig s'ha posat a punt emprant llavors d'arròs enlloc de rave.



## **CONCLUSIONS**

---

## CONCLUSIONS

S'ha posat a punt un mètode per a produir PR toxina (**19**), producte de partida per a la síntesi de mimètics del KM-01 (**9**). S'ha produït més de 6 g d'aquest metabòlit en 34 cultius, assolint-se una producció màxima de 789 mg per litre de medi de cultiu del fong *Penicillium roquefortii*. Tot i així, cal remarcar que, en tractar-se d'un metabòlit secundari, per produir-lo és necessari que el fong se sotmeti a unes condicions d'estrès molt específiques i, per tant, no és gens fàcil reproduir-les. Aquest fou el motiu pel qual s'elaboraren dos dissenys d'experiències per determinar les condicions idònies per maximitzar la producció de **19**. Aquestes són cultivar la soca ATCC 48936 en un medi de suc de taronja complementat amb un 1% d'extracte de llevat, un 5% de sucre i tamponar el medi amb citrat-fosfat 25 mM. De tota manera, es pot substituir el medi de suc de taronja pel d'extracte de cereals ja que els resultats també són força bons.

S'ha col·laborat en la validació de la nova metodologia Scaffold HOPing (SHOP) desenvolupada per l'empresa LEAD MOLECULAR DESIGN, que permet seleccionar compostos actius d'una base de dades emprant descriptors basats en la geometria de la molècula i els camps d'interacció molecular (MIF). En aplicar aquesta metodologia sobre una base de dades d'àcids comercials, ha permès seleccionar aquells àcids amb major capacitat de mimetitzar la cadena lateral de la brassinolida (**1**). Aquestes cadenes són de gran utilitat, no únicament per als mimètics del KM-01 (**9**), sinó per a qualsevol tipus d'esquelet capaç de mimetitzar els anells de **1** i que presenti una funcionalitat amina o hidroxil en la seva estructura per ancorar-hi per esterificació o amidació un d'aquests àcids comercials. Així doncs, ha servit per a la síntesi de mimètics androstànics actius que han permès validar la metodologia SHOP.

També s'han realitzat dos estudis per a determinar l'estructura del mimètic del KM-01 (**9**) més semblant a la de la brassinolida (**1**), essent el KM-30br el que ha proporcionat millors resultats. Finalment, s'han analitzat els mimètics no esteroidals dissenyats pel grup de Thomas Back on s'ha posat de manifest la gran importància de la part hidrofòbica de la cadena lateral dels brassinoesteroides.

S'han sintetitzat tres mimètics de la PR toxina (**19**): el PR-bq (**152**), el PR-ad (**160**) i el PR-bb (**161**). El primer, és el resultat d'esterificar l'esquelet de **19** amb la cadena lateral del KM-01 (**9**) i, els altres dos, són el resultat d'esterificar aquest mateix esquelet amb les millors cadenes laterals obtingudes en l'estudi computacional. L'esquelet de **19** no és el més idoni per a mimetitzar la brassinolida (**1**), però la poca quantitat de **19** que es disposava, en un principi, per a transformar-la en un esquelet anàleg al de **9** i la major facilitat sintètica dels mimètics de **19**, en van motivar la seva síntesi. La manca d'activitat d'aquests anàlegs en el test d'inclinació de la làmina d'arròs, juntament amb els resultats computacionals sobre mimètics de **19**, van permetre concloure que els mimètics de la PR toxina (**19**) eren uns mals candidats per a mimetitzar la brassinolida (**1**) o el KM-01 (**9**).

En la part final de la tesi, donats els resultats d'activitat dels mimètics de la PR toxina (**19**) i la disponibilitat d'una major quantitat d'aquest metabòlit per l'èxit en el terreny microbiològic, es van realitzar uns primers intents de sintetitzar mimètics del KM-01 (**9**) a partir de la PR toxina (**19**). Malauradament, no es van poder sintetitzar, en aquestes primeres proves, els esquelets dissenyats en la part computacional i, per aquesta raó, al laboratori d'Esteroides encara es continua treballant en aquest sentit.

Finalment, s'ha dissenyat un bioassaig antiestrès per avaluar la capacitat de les hormones vegetals de superar l'estrès provocat per concentracions salines elevades. Aquest bioassaig s'ha posat a punt en l'etapa de germinació de les llavors d'arròs.

## **PART EXPERIMENTAL**

Desitjo expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que han contribuït a la realització d'aquesta part experimental.

“Mariàngels”, Enric, Cristina, Mireia, Jordi; vosaltres sou els qui heu portat el pes d'aquesta part de la tesi.

Montse, merci per la teua disponibilitat, amabilitat i per les xerrades microbiològiques i sobre disseny d'experiments. Iván, gràcies por tu ayuda con el microscopio y con las fotos. Carlos, gràcies por tus consejos de cultivo en medio sólido y por animar-me a introducir-me en el campo de los bioensayos.

A tot el departament de Bioquímica per la seua acollida i l'ajuda en tot el terreny microbiològic, especialment a l'Anna que va introduir-me, amb la seua alegria, en el món dels fongs, i al Carlos Peláez per la implicació i l'entusiasme que va mostrar en el treball amb els cultius del fong i en el terreny dels bioassaigs.

Isma, quanta paciència amb nosaltres!! Tota la feina en el terreny computacional és gràcies a tu.

Francesc, moltes gràcies per fer tant fàcil la col·laboració entre seccions que a vegades resulta tant difícil. Cristina Ribas, gràcies per l'ajuda amb la cromatografia de gasos.

Laura i Xavier és un gust col·laborar amb vosaltres. Cada cop que venia al despatx sortia molt content. Qui hauria dit que m'agradaria tant això del disseny d'experiments?

Al Dr. Xavier Batllori, per tots els espectres de ressonància magnètica nuclear i les xerrades amb els espectres, a la M<sup>a</sup> Carmen pels infrarojos i a la Núria per les seves rotacions òptiques i pesades mil·limètriques. Al Dr. Fernando Lafont del Servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Córdoba, per l'elaboració de l'espectre de ionització química d'alta resolució.

**ÍNDIX DE LA PART EXPERIMENTAL**

<b>OBSERVACIONS GENERALS .....</b>	<b>257</b>
<b>1. ABREVIATURES .....</b>	<b>257</b>
<b>2. PURIFICACIÓ DE DISSOLVENTS.....</b>	<b>257</b>
<b>3. CONTROL DE REACCIÓ .....</b>	<b>258</b>
3.1. Cromatografia de capa fina (CCF).....	258
3.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) .....	258
3.3. Cromatografia de gasos (CG) .....	258
<b>4. ATMOSFERA INERTA.....</b>	<b>259</b>
<b>5. SEPARACIÓ CROMATOGRÀFICA .....</b>	<b>259</b>
<b>6. DADES ESPECTROSCÒPIQUES.....</b>	<b>260</b>
6.1. Espectres d'infraroig (IR) .....	260
6.2. Espectres ultraviolat-visible (UV-vis).....	260
6.3. Espectres de ressonància magnètica nuclear de protó ( <sup>1</sup> H-RMN).....	260
6.4. Espectres de ressonància magnètica nuclear de carboni 13 ( <sup>13</sup> C-RMN).....	260
6.5. Espectre de masses de ionització química d'alta resolució (EM-AR) .....	260
<b>7. CONSTANTS FÍSQUES .....</b>	<b>260</b>
7.1. Punt de fusió.....	260
7.2. Rotació òptica.....	260
<b>TÈCNiques MICROBIOLÒGIQUES .....</b>	<b>261</b>
<b>1. CONDICIONS D'ESTERILITAT .....</b>	<b>261</b>
<b>2. SOQUES I MEDIS DE CULTIU.....</b>	<b>261</b>
2.1. Rehidratació de soques liofilitzades .....	261
2.2. Soques .....	261
2.3. Conservació de soques .....	262
2.4. Medis de cultiu del <i>Penicillium roquefortii</i> .....	262
2.4.1. Medi de manteniment (PDA).....	262
2.4.2. Medi de cultiu sòlid de cereals.....	262
2.4.3. Medi de cultiu d'extracte de cereal .....	263
2.4.4. Medi de cultiu de suc .....	263
2.4.5. Medi de cultiu d'arròs FDA.....	263
2.5. Medis de cultiu del <i>Bipolaris cynodontis</i> .....	264
2.5.1. Medi de manteniment (V8 Agar).....	264
2.5.2. Medi de cultiu líquid .....	264
<b>3. DESENVOLUPAMENT DE CULTIUS .....</b>	<b>264</b>
3.1. Sembra a medi de manteniment .....	265
3.1.1. Sembra del glicerinat a medi de manteniment .....	265
3.1.2. Sembra del fong rehidratat a medi de manteniment .....	265
3.1.3. Sembra a medi de manteniment a partir de cultius del fong .....	265
3.2. Inoculació dels fongs en els medis de cultiu .....	265
3.2.1. Medi de cultiu líquid .....	265
3.2.2. Medi de cultiu sòlid .....	265
3.3. Incubació dels fongs.....	266
<b>4. EXTRACCIÓ DELS METABOLITS DEL MEDI DE CULTIU.....</b>	<b>266</b>
4.1. <i>Penicillium roquefortii</i> .....	266
4.2. <i>Bipolaris cynodontis</i> .....	266
<b>5. TÈCNiques MICROSCÒPIQUES .....</b>	<b>266</b>
<b>6. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PRT (19) PER HPLC .....</b>	<b>266</b>
6.1. Mètode analític .....	266
6.2. Recta de calibració.....	266
6.3. Tractament de mostra.....	267
6.3.1. Medi de cultiu líquid .....	267
6.3.2. Medi de cultiu sòlid .....	267
6.3.3. Medi de FDA .....	268
<b>EXPERIÈNCIES MICROBIOLÒGIQUES.....</b>	<b>269</b>
<b>1. RECOMPTE DE CONIDIS .....</b>	<b>269</b>
1.1. Concentració de la dissolució a inocular al medi de cultiu líquid .....	269

1.2.	Verificació de l'ús de SDS en la dissolució a inocular.....	270
2.	<b>CULTIUS REALITZATS.....</b>	<b>272</b>
2.1.	<i>Penicillium roquefortii</i> .....	272
2.2.	<i>Bipolaris cynodontis</i> .....	279
3.	<b>EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ DE METABOLITS DEL <i>P. ROQUEFORTII</i>.....</b>	<b>279</b>
3.1.	Cultiu 1 .....	279
3.2.	Cultiu 2 .....	280
3.3.	Cultiu 3 .....	281
3.4.	Cultiu 4 .....	282
3.5.	Cultius 5 i 8 .....	282
3.6.	Extracció i purificació d'eremofortina C (20) .....	284
3.7.	Cultiu 17 .....	284
3.8.	Cultius 18-20 .....	285
3.9.	Cultius 21-25 .....	285
3.10.	Cultius 26-28 .....	285
3.11.	Cultius 29-30 .....	286
4.	<b>SÍNTESI DE L'ACETAT DE L'EREMOFORTINA C (30) .....</b>	<b>286</b>
5.	<b>REDUCCIÓ DE PR TOXINA (19) A EREMOFORTINA C (20) .....</b>	<b>287</b>
6.	<b>INTENT DE SÍNTESI DE PR TOXINA (19) A PARTIR D'EREMOFORTINA C (20) .....</b>	<b>287</b>
	<b>SÍNTESI D'ANÀLEGS DEL KM-01 (9).....</b>	<b>288</b>
1.	<b>SÍNTESI DE PR ALCOHOL (153) .....</b>	<b>288</b>
2.	<b>SÍNTESI DE PR-BQ (152).....</b>	<b>288</b>
2.1.	<b>Síntesi de l'àcid dendrifièlic A (bq) .....</b>	<b>288</b>
2.1.1.	Síntesi de bromur de (3-metoxicarbonil-2-propenil)trifenilfosfoni (172) .....	288
2.1.2.	Síntesi de ( <i>E</i> )-4-trifenilfosforaniliden-2-butenolat de metil (171) .....	289
2.1.3.	Oxidació de 1-decanol (175) a capraldehid (176) .....	289
2.1.4.	Síntesi de ( <i>S</i> )-2-metilbutiraldehid (165) .....	290
2.1.5.	Síntesi de dendrifielat A de metil (169).....	292
2.1.6.	Síntesi de sorbat de metil (187).....	294
2.1.7.	Síntesi d'àcid sòrbic (188).....	294
2.1.8.	Hidròlisi del dendrifielat A de metil (169) .....	295
2.2.	<b>Esterificació del PR alcohol (153) i l'àcid dendrifièlic A (bq).....</b>	<b>295</b>
3.	<b>SÍNTESI DE PR-AD (161).....</b>	<b>296</b>
3.1.	<b>Protecció de l'àcid (<i>S</i>)-3-hidroxi-butíric (ad).....</b>	<b>296</b>
3.1.1.	Protecció via acetat.....	296
3.1.2.	Protecció amb <i>p</i> -metoxibenzil (MPM).....	297
3.2.	<b>Esterificació del PR alcohol (153) i l'àcid (<i>S</i>)-3-(<i>p</i>-metoxi)benciloxibutíric (202) .....</b>	<b>298</b>
4.	<b>SÍNTESI DE PR-BB (162).....</b>	<b>299</b>
5.	<b>ESTERIFICACIONS DE YAMAGUCHI.....</b>	<b>299</b>
5.1.	<b>Síntesi de <i>o</i>-acetilsalicilat de ciclohexil (210) .....</b>	<b>299</b>
5.1.1.	Síntesi de 2,4,6-triclorobenzoat de ciclohexil (211).....	300
5.2.	<b>Síntesi de <i>o</i>-metoxibenzoat d'estigmasteril (212).....</b>	<b>300</b>
5.3.	<b>Síntesi d'octanoat de <i>p</i>-metoxibenziloxi (215) .....</b>	<b>301</b>
6.	<b>SÍNTESI D'ANÀLEGS DEL KM-01 (9) .....</b>	<b>302</b>
6.1.	<b>Intent de síntesi de norbornilè (220) i Aldrin (222) .....</b>	<b>302</b>
6.1.1.	Trifenilfosfina/iode .....	302
6.1.2.	3-metil-2-selenoxobenzotiazol (232).....	302
6.2.	<b>Intent de reducció de l'epòxid entre C1-C2 de la PR toxina (19).....</b>	<b>303</b>
6.2.1.	Trifenilfosfina/iode .....	303
6.2.2.	3-metil-2-selenoxobenzotiazol (232).....	303

**OBSERVACIONS GENERALS****1. Abreviatures**

ACN	Acetonitril
AcOEt	Acetat d'etil
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
c.c.	Cru complex
CCF	Cromatografia de capa fina
CG	Cromatografia de gasos
CHCl <sub>3</sub>	Cloroform
Cy	Ciclohexà
DCM	Diclorometà
DMAP	4-N,N-dimetilaminopiridina
DMP	2,2-dimetoxipropà
EC	Eremofortina C ( <b>20</b> )
ED	Eremofortina D ( <b>27</b> )
Et <sub>2</sub> O	Èter etílic
EtOH	Etanol
h	Hora
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
imp.	Impuresa
MeOH	Metanol
PCC	Clorocromat de piridini
PDA	Agar de dextrosa i patata
Pf	Punt de fusió
PRT	PR toxina ( <i>Penicillium roquefortii</i> toxina) ( <b>19</b> )
Py	Piridina
PTSA	Àcid p-toluensulfònic
PPTS	p-toluensulfonat de piridini
MeCOMe	Acetona
min	Minut
p.p.	Producte de partida
Rdt.	Rendiment
Rf	Factor de retenció
Rpm	Revolucions per minut
SDS	Dodecilsulfat sòdic
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambient
<i>t</i> -ButOH	Alcohol <i>terc</i> -butílic
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurà
THP	Tetrahidropiranil
TsOH	Àcid p-toluensulfònic

**2. Purificació de dissolvents**

En cas que no s'indiqui el contrari, els dissolvents emprats en les reaccions es preparen com s'indica a continuació:

- Acetat d'etil (AcOEt): S'asseca sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidre i es destil·la.
- Acetona (MeCOMe): S'asseca sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidre i es destil·la.

- Ciclohexà (Cy): S'asseca sobre  $\text{CaCl}_2$  anhidre i es destil·la.
- Cloroform ( $\text{CHCl}_3$ ): S'asseca sobre  $\text{CaCl}_2$  anhidre i es destil·la.
- Diclorometà (DCM): S'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra i es destil·la sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$ .
- Èter etílic ( $\text{Et}_2\text{O}$ ): S'elueix per una columna d'alúmina i es destil·la sobre sodi.
- Piridina (Py): S'asseca sobre KOH y es destil·la.
- Tetrahidrofurà (THF): S'elueix per una columna d'alúmina, s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra i es destil·la sobre  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{CaH}_2$  o Na.
- Toluè: S'asseca sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  i es destil·la.
- Trietilamina (TEA): S'asseca sobre  $\text{CaH}_2$  i es destil·la.

### 3. Control de reacció

Els mètodes emprats per a observar l'evolució i resultat dels diferents cultius i reaccions, així com la puresa de les diferents fraccions eluïdes en les columnes cromatogràfiques per a la seva posterior recombinació són la cromatografia de capa fina (CCF), la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i la cromatografia de gasos (CG).

#### 3.1. Cromatografia de capa fina (CCF)

La cromatografia de capa fina es realitza amb plaques de plàstic Macherey-Nagel (MN) Silicagel Polygram UV<sub>254</sub> de 0.20 mm de gruix. Després de la seva elució, les taques es detecten, en primer lloc, per observació directa amb llum ultraviolada a 254 i 360 nm i, posteriorment, després de ser revelades mitjançant la polvorització amb  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 50% seguit de calefacció a 120 °C durant 3 min, per observació amb llum visible i llum ultraviolada de 360 nm. En el cas dels àcids carboxílics s'utilitza un revelador específic, verd de bromocresol al 0.3% en  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (1:4) i l'addició de 8 gotes de NaOH al 30% fins observar-se un canvi de coloració (els àcids carboxílics presenten una coloració groguenca que difereix del color blau verdós de tota la capa fina).

També es pot realitzar un altre tipus d'identificació amb aquestes plaques, però impregnades amb nitrat de plata. En un cristal·litzador es submergeixen les plaques cromatogràfiques de sílice sobre un suport no metàl·lic en una dissolució de  $\text{AgNO}_3$  0.1N i es deixen reposar en absència de llum durant 20 min. A continuació, les plaques s'escalfen en una estufa a 125 °C durant 10 min a les fosques. Un cop les plaques es troben altre cop a t.a., poden emprar-se com una placa de sílica convencional. Les plaques que no s'utilitzen de seguida es guarden a les fosques un màxim de 48 hores. Després de l'elució de les taques, aquestes es detecten primer per observació directa amb llum UV a 254 nm i, posteriorment, es revelen mitjançant la polvorització amb  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 50% seguit de calefacció a 120 °C durant 3 min, per observació amb llum visible i llum ultraviolada de 360 nm.

#### 3.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

S'utilitza un cromatògraf Waters 600E equipat amb un detector de UV Waters 486 (UV,  $\lambda = 254$  nm), un injector Rheodyne UK6 i un integrador Waters 746. Les columnes emprades, de Waters, són: una columna NovaPak<sup>®</sup> Sílica i una NovaPak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> de mida de partícula de 4  $\mu\text{m}$  i de dimensions 3.9 x 150 mm i, Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 250 mm). Les condicions de treball són les següents: flux de 1.5  $\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$  (a excepció de la Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> que s'empra a 0.8  $\text{mL}/\text{min}$ ), volum d'injecció de 10  $\mu\text{l}$  i la fase mòbil emprada s'especifica en cada una de les experiències realitzades.

#### 3.3. Cromatografia de gasos (CG)

S'utilitza un equip HP 6890 series GC system amb un injector Agilent 6890 series. La columna emprada és una columna capil·lar Fused silica capillary column Supelco SPB<sup>TM</sup>-5 de 15 m de llarg, 0.53 mm de diàmetre intern i 1.5  $\mu\text{m}$  de gruix de film. La temperatura del forn és de 40 °C i la temperatura d'injecció i de detecció és de 250 °C. El gas portador és He. S'empra una relació de *splitter* de 70. La pressió de cap de



columna és de 2.5 psi. El *glassliner* és de llana de vidre. El detector és un FID.

#### 4. Atmosfera inerta

En les reaccions realitzades sota atmosfera inerta s'ha utilitzat argó. Consisteix en omplir un globus amb argó, que es connecta al muntatge de reacció. A continuació, es purga el sistema d'aire seguint la següent seqüència d'operacions: es tanca la clau de pas del globus, es fa el buit al sistema, s'obre la clau de pas del globus i es repeteix el procés un parell de vegades més.

#### 5. Separació cromatogràfica

En aquest treball s'empren les tècniques cromatogràfiques que es descriuen a continuació. La fase mòbil o l'eluent emprat es detalla en cada cas concret.

- Cromatografia convencional: Columna recta emprant sílice SDS de mida de partícula compresa entre 70 i 200  $\mu\text{m}$ . La sílice es mulla amb la fase mòbil, es desgasifica, s'introdueix a la columna i es compacta per gravetat. La relació cru:adsorbent és de 1:100 en pes.
- Cromatografia flash: Columna recta emprant sílice SDS de mida de partícula compresa entre 35 i 70  $\mu\text{m}$  que s'introdueix en sec i es compacta per succió. A continuació, la fase estacionària es mulla amb l'eluent i el cru que es vol separar es carrega i s'elueix, sota pressió de nitrogen, a un flux aproximat de 50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . En cas que no s'indiqui el contrari, la relació cru:adsorbent emprada és de 1:50 en pes.

Per a realitzar una columna flash impregnada amb nitrat de plata se segueix el següent procediment. Sobre 200 mL d'una dissolució aquosa de nitrat de plata 0.1 N s'aboquen 75 g de sílice de tamany de partícula 35-70  $\mu\text{m}$ . La mescla s'agita fins a homogeneïtzació i es deixa reposar 20 min a la foscor. La sílice impregnada de nitrat de plata es filtra i s'asseca a 140 °C durant 30 min. Es deixa refredar a temperatura ambient.

- Cromatografia líquida de baixa pressió: S'han emprat les columnes preparades de fase normal Merck Lobar Lichroprep Si 60(40-63  $\mu\text{m}$ ) de mides A (10 x 240 mm), B (25 x 310 mm) i C (37 x 440 mm). També s'ha emprat la columna preparada de fase reversa Merck Lobar Lichroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) de mida A (10 x 240 mm). La circulació de l'eluent es realitza mitjançant l'ús d'una bomba dosificadora de polsos Duramat amb amortiguador, que permet seleccionar la freqüència dels polsos i el flux d'eluent.
- Cromatografia de buit: Columna recta utilitzant gel de sílice Merck de tamany de partícula 0.015 mm. L'adsorbent s'introdueix en sec i es compacta per succió. Després de carregar la mescla a separar, s'elueix emprant succió. La relació cru/adsorbent és de 1:50.
- Cromatografia esglaonada: S'empren columnes formades per quatre o cinc segments de diàmetre decreixent. El disseny presenta, per un flux determinat d'eluent, una sèrie de velocitats creixents en cada segment de manera que el front cromatogràfic és accelerat respecte el que el segueix al passar d'un esglaó a l'immediatament inferior, obtenint-se així una separació addicional a la que s'obtindria en una columna recta convencional amb el mateix volum d'adsorbent.
- Cromatografia preparativa: Plaques de sílice Macherey-Nagel (MN) SIL G-25 UV<sub>254</sub> amb indicador fluorescent UV<sub>254</sub> de 0.25 mm de gruix. La mida de les plaques és de 20 x 20 cm.

Per a carregar el cru a la columna hi ha dos tipus de càrregues, en dissolució i seca. En el cas de la càrrega en dissolució el cru es dissol en la mínima quantitat d'eluent a utilitzar en la cromatografia o menys polar que aquest, s'afegeix sobre la capa de sorra introduïda prèviament sobre la sílice mullada i es deixa que s'elueixi a la columna. S'empra la càrrega seca quan la dissolució del cru en l'eluent amb el qual es treballa és difícil. En aquest tipus de càrrega el cru es dissol en el dissolvent adequat i s'afegeix sílice, amb una relació cru:pes sílice 1:5. S'agita a ultrasons, s'elimina el dissolvent mitjançant destil·lació a pressió reduïda i

s'asseca al buit. Una vegada sec es diposita sobre la capa de sorra i a continuació, s'afegeix una segona capa de sorra. Finalment, un cop introduït el cru, s'afegeix l'eluent i es procedeix a l'elució.

## 6. Dades espectroscòpiques

### Espectres d'infraroig (IR)

Es registren en un espectrofotòmetre Nicolet Magna IR 560. Les mostres s'han realitzat en un film evaporat de cloroform. Es fa constar la posició de les bandes d'absorció més significatives de cada espectre en  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.1. Espectres ultraviolat-visible (UV-vis)

Es registren en un espectrofotòmetre Unicam Helios  $\alpha$ . S'indica el dissolvent emprat. Els màxims d'absorció s'expressen en valors de  $\lambda_{\text{màx}}$  en nm, seguits del valor del coeficient d'absorció molar ( $\epsilon$ ) en  $\text{M}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$ .

### 6.2. Espectres de ressonància magnètica nuclear de protó ( $^1\text{H}$ -RMN)

Es registren amb un instrument Varian Gemini-300 (300 MHz). La mostra es dissol en el corresponent dissolvent deuterat: deuterocloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), perdeuteroacetona ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) o perdeuterodimetilsulfòxid ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ). La posició de les senyals es dona en valor de desplaçaments químics ( $\delta$ ) en ppm, prenent com a referència interna la senyal dels protons de tetrametilsilà (TMS) ( $\delta = 0$ ). Entre parèntesi s'indica el nombre de protons mesurats mitjançant integració electrònica, el tipus de senyal caracteritzat com s (singlet), d (doblet), dd (doblet de doblets), ddd (doblet de doblets de doblets), t (triplet), m (multiplet), s.a. (senyal ample), s.c. (senyal complex), seguit de la/les constant/s d'acoblament (J) i, finalment, l'assignació del senyal.

### 6.3. Espectres de ressonància magnètica nuclear de carboni 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN)

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de carboni ( $^{13}\text{C}$ -RMN) s'han realitzat en un aparell Varian Gemini-300 (75 MHz). En cada cas s'indica el dissolvent utilitzat. Els espectres es registren en condicions de desacoblament de protó (WALTZ-16) i la multiplicitat dels senyals es determina mitjançant l'ús de la seqüència DEPT (*Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer*). La posició dels senyals es dona en valor de desplaçaments químics ( $\delta$ ) en ppm, prenent com a referència interna el senyal dels carbonis del tetrametilsilà ( $\text{CH}_3)_4\text{Si}$  ( $\delta=0$ ), seguit de la multiplicitat del senyal s (singlet), d (doblet), t (triplet) i q (quadruplet) i finalment, la seva assignació.

Els espectres bidimensionals HETCOR i COSY també es registren amb un instrument Varian Gemini-300.

### 6.4. Espectre de masses de ionització química d'alta resolució (EM-AR)

Ha estat realitzat en un instrument Hewlett-Packard 5988-A utilitzant metà com a gas portador. S'indica la massa calculada i la massa trobada en  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

## 7. Constants físiques

### 7.1. Punt de fusió

S'han realitzat amb un instrument Stuart Scientific SMP3 amb un bany d'aire, en capil·lar obert i sense correcció posterior.

### 7.2. Rotació òptica

Es registren en un polarímetre Perkin Elmer 241. S'empra radiació de  $\lambda$  de 589 nm (línia D del sodi). S'indica la concentració de la dissolució en  $10^{-2} \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , el dissolvent emprat i la rotació específica calculada en  $^\circ$ .

## TÈCNiques MICROBIOLÒGiques

### 1. Condicions d'esterilitat

Els medis de cultiu i el material de laboratori que s'empra en el cultiu del fong *Penicillium roquefortii* s'esterilitzen amb una autoclau amb vapor d'aigua saturat a pressió de 1.5 bar durant 15-20 min a 120 °C. A l'autoclau també s'esterilitza el material de laboratori que s'empra en el cultiu del fong *Penicillium roquefortii*, després de netejar-lo i precintat-lo amb cotó i paper d'alumini. Les peces que no poden suportar aquestes condicions dràstiques s'esterilitzen submergint-les en etanol i deixant-les assecar dins de la campana de flux laminar amb radiació ultraviolada.

També és important prendre les degudes precaucions durant la manipulació posterior del medi de cultiu i del material de laboratori estèril per tal d'evitar possibles contaminacions de microorganismes presents en el medi ambient. Per aquesta raó, la manipulació de qualsevol medi de cultiu inoculat o per inocular, així com del material ja esterilitzat, es realitza dins d'una campana de flux laminar, treballant prop de la flama d'un bec de Bunsen.

Abans d'emprar la campana de flux laminar, aquesta s'irradia amb llum ultraviolada durant 20 min i a continuació es tracta la seva superfície amb etanol. Un cop realitzades les manipulacions dins de la campana de flux laminar, es procedeix a la seva desinfecció seguint el mateix tractament: irradiació amb llum ultraviolada durant 20 min i tractament de la seva superfície amb etanol.

Immediatament després de retirar el tap de les boques dels recipients (tubs, matrassos d'Erlenmeyer,...) i abans de tornar-lo a posar, es flamegen aquestes amb un bec de Bunsen. La nansa de sembra s'escalfa al roig viu amb la flama del bec de Bunsen abans i després de cada sembra individual.

Les plaques Petri s'incuben amb el medi a la part inferior i la tapa a la superior, ja que així es disminueixen les possibilitats de contaminació.

### 2. Soques i medis de cultiu

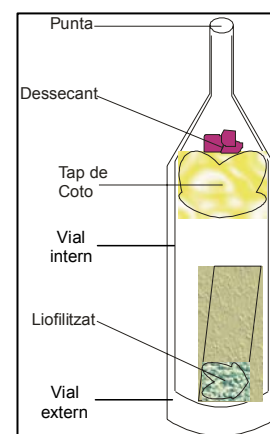
#### 2.1. Rehidratació de soques liofilitzades

Les tres soques de *Penicillium roquefortii* i la soca de *Bipolaris cynodontis* emprades en aquesta tesi es reben liofilitzades a l'interior d'un doble vial (**Figura 235**). Per obrir els vials d'aquest tipus cal treballar en condicions estèrils tot seguint els passos següents:

- 1.-S'escalfa la punta del vial extern a la flama.
- 2.-S'aboquen unes gotes d'aigua sobre la punta del vial extern.
- 3.-S'acaba de trencar la punta amb unes pinces o un llapis.
- 4.-Es treu l'aïllant i el vial intern amb unes pinces.
- 5.-Es treu el tap de cotó del vial intern.

Un cop obert el vial, es procedeix a la rehidratació de la soca liofilitzada a través de la següent seqüència de passos:

- 1.-S'afegeixen uns 300 µl d'aigua estèril al fong liofilitzat amb una pipeta Pasteur.
- 2.-Amb la mateixa pipeta es transvasa el contingut del vial intern a un tub que conté uns 5 mL d'aigua estèril
- 3.-Es deixa rehidratar el fong durant 24 h a la foscor a t.a.



**Figura 235.** Doble vial amb les soques liofilitzades.

#### 2.2. Soques

Les tres soques emprades de *Penicillium roquefortii* són la ATCC 6989, ATCC 48936 i ATCC 48778. Les tres s'obtenen de la *American Type Culture Collection* (ATCC), que les aïlla del formatge anglès Blue Cheshire.

La soca de *Bipolaris cynodontis* emprada és la CBSnr 109894 obtinguda al *Centraalbureau voor Schimmelcultures*.

### 2.3. Conservació de soques

Les diferents soques de treball del fong *Penicillium roquefortii* i *Bipolaris cynodontis* s'han de conservar amb especial cura per tal d'evitar la seva contaminació i degeneració. El procés de conservació escollit depèn del temps d'emmagatzematge requerit:

- **Liofilització:** S'afegeix al cultiu una substància protectora (dimetilsulfòxid, lactosa, glicerina,...) per pal·liar els efectes del fred. A continuació, es congela ràpidament (amb una mescla d'acetona i neu carbònica) per tal que els cristalls que es formin siguin el més petits possibles i s'eviti així la mort del microorganisme. Finalment, el sistema es desseca al buit (el gel sublima a vapor d'aigua) i es tanca el recipient a la flama. Els cultius liofilitzats es poden conservar durant anys.
- **Glicerinats:** Es prepara una dissolució aquosa del microorganisme amb un 15% de glicerina i un 2% de glucosa. S'introdueix en tubs Eppendorf uns 100 µL d'aquesta dissolució i, finalment, es congelen en càmeres frigorífiques a -80 °C.<sup>361</sup>
- **Sembra en un sol punt:** El cultiu es pot conservar en medi de manteniment durant alguns mesos en una placa Petri tancada amb Parafilm a 4 °C.

En aquest treball es treballa amb tres soques de *Penicillium roquefortii*, que es van rebre liofilitzades de la ATCC: ATCC 6989, ATCC 48936 i ATCC 48778. La ATCC 48936 es va rebre a l'inici de la present tesi. Dos anys després, quan va deixar de produir PR toxina (**19**) degut a la seva degeneració, es va demanar un nou liòfil de la soca ATCC 48936, juntament amb les altres dues (ATCC 6989 i ATCC 48778).

La soca de *Bypolaris cynodontis* es va rebre el darrer any de la tesi.

El primer cop que es va rebre la soca ATCC 48936 es va rehidratar i es va emprar per sembrar en una placa Petri i per preparar glicerinats. Els glicerinats únicament es van emprar en aquesta soca durant el primer any de tesi per la degeneració que sembla que sofrien els fongs.

Quan es vol sembrar el fong en una placa Petri a partir d'un glicerinat, es deixa descongelar la mescla del tub Eppendorf i se sembra, amb l'ajut d'una nansa de Drigalsky, en la placa que conté agar de dextrosa i patata. Aquesta s'incuba a 24 °C durant 7 dies i, posteriorment, es conserva a 4 °C un mes. El cultiu del medi de manteniment es resembrava cada mes per tal de conservar-lo pertinentment. Un cop s'ha resseminat cinc o sis vegades, per tal d'evitar possibles mutacions, el cultiu s'elimina i s'inicia el seu procés de conservació a partir d'una nova soca liofilitzada. Aquest mateix tractament és el que reben la resta dels fongs un cop estan hidratats.

Les tres soques de *Penicillium roquefortii* també es van dipositar a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) a través d'un conveni, vigent durant la realització d'aquest treball, mitjançant el qual el Laboratori d'Esteroides podia disposar sempre que ho requerís de qualsevol de les tres soques, liofilitzades o cultivades amb medi de manteniment de PDA en tubs.

### 2.4. Medis de cultiu del *Penicillium roquefortii*

#### 2.4.1. Medi de manteniment (PDA)

S'esterilitza una dissolució aquosa d'agar de dextrosa i patata al 3.9% preparada dissolent-ne 3.9 g en 100 mL d'aigua desionitzada. Abans de la gelificació de l'agar (a uns 45 °C, i en condicions estèrils), s'omplen les plaques de Petri que es conserven a 4 °C tancades amb Parafilm.

#### 2.4.2. Medi de cultiu sòlid de cereals

Es bullen 1250 g de llavors d'arròs certificades Castells (Deltebre) de varietat *Indica* TAI BONET en 3 L d'aigua desionitzada en 1 matràs d'Erlenmeyer de 5000 mL amb agitació mecànica. L'ebullició té lloc durant 3 h. Durant l'ebullició s'afegeixen 500 mL més d'aigua desionitzada. L'arròs es filtra. Es diposita en 1 matràs d'Erlenmeyer de 5000 mL i s'autoclava.

Determinació del % en aigua del pes d'arròs: Una massa d'arròs mullat s'asseca sobre un vidre a 105 °C durant 4 h i posteriorment es pesa. De la relació entre les dues masses s'obté el % d'arròs en pes.

Determinació de la densitat de l'arròs: Es pesa una quantitat d'arròs que es diposita per gravetat en una proveta. De la relació entre la massa mesurada i el volum que ocupa l'arròs a la proveta se'n determina la densitat.

#### 2.4.3. Medi de cultiu d'extracte de cereal

La composició del medi és la següent. Els percentatges estan referits a un volum total (extracte de cereals + dissolució tampó).

- Extracte de cereal 60-90% (v/v)
- Sacarosa 7.5% (p/v)
- Extracte de llevat 1% (p/v)

Extracte de cereal: Es bullen 1180 g de llavors d'arròs certificades Castells (Deltebre) de varietat *Indica* (*Oryza sativa* L.) amb 3 L d'aigua desionitzada en un matràs d'Erlenmeyer de 5 L amb agitació mecànica. L'ebullició té lloc durant 3 h. Durant l'ebullició s'afegeixen 500 mL més d'aigua desionitzada. Quan l'arròs està bullit, aquest es filtra amb un col·lador de 40 cm de diàmetre i 1 mm de pas de malla. L'extracte aquós es centrifuga a 6000 rpm durant 10 min. L'extracte d'arròs s'enrasa fins a 1800 mL.

A aquest medi s'hi afegeixen 18 g d'extracte de llevat i 135 g de sacarosa. A continuació, es preparen 2 litres de medi de cultiu tamponat afegint 200 mL de la dissolució tampó corresponent.

El medi de cultiu líquid resultant s'autoclava.

Dissolució tampó: Es preparen dues dissolucions tampó citrat-fosfat a pH=3.69, una de concentrada i una altra de diluïda.

La dissolució tampó citrat-fosfat concentrada té una concentració 500 mM en les dues espècies. Es dissolen 14.20 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidre 98% i 19.34 g d'àcid cítric anhidre 100% en 200 mL d'aigua.

La dissolució tampó citrat-fosfat diluïda té una concentració 50 mM en les dues espècies. Es prepara per dilució 1:10 de la dissolució tampó citrat-fosfat concentrada.

Si s'empra la dissolució tampó concentrada s'obté un pH pel medi de cultiu líquid de 4.01. Si s'empra la dissolució tampó diluïda s'obté un pH pel medi de cultiu líquid de 4.53.

Dissolució dispersant: Es dissolen 10 mg de SDS en 100 mL d'aigua. S'obté així una dissolució aquosa de SDS 0.01%.

#### 2.4.4. Medi de cultiu de sucs

La composició del medi de cultiu, en els casos en que no s'indica el percentatge de sacarosa i d'extracte de llevat, és la següent. Els percentatges estan referits a un volum total (suc + dissolució tampó).

- Suc 90% (v/v)
- Dissolució tampó 10% (v/v)
- Sacarosa 7.5% (p/v)
- Extracte de llevat 1% (p/v)

Els sucs es centrifuguen, segons el cas, a 6000 rpm durant 10 min.

La dissolució tampó és la mateixa dissolució 500 mM que en l'apartat anterior.

El medi de cultiu líquid resultant s'autoclava.

#### 2.4.5. Medi de cultiu d'arròs FDA

S'afegeix 150 g d'arròs varietat *Indica* i 150 mL d'aigua desionitzada en un matràs d'Erlenmeyer de 1 L de capacitat. El matràs es tapa amb cotó flux i s'autoclava 20 minuts a 120 °C

## 2.5. Medis de cultiu del *Bipolaris cynodontis*

### 2.5.1. Medi de manteniment (V8 Agar)

El medi V8 agar és un medi no comercial que es prepara partint com a base de un suc de 8 vegetals comercialitzat als E.E.U.U. per Campbell's® anomenat "V8 Juice". La composició del medi es la següent:

- 200 mL de suc V8 marca Campbell's®
- 2 g CaCO<sub>3</sub>
- 15 g Agar
- 1 L d'aigua desionitzada

Aquesta mescla es fa bullir, s'autoclava i, abans de la gelificació de l'agar, s'emplaca. Les plaques de Petri es mantenen a 4 °C tancades amb Parafilm.

### 2.5.2. Medi de cultiu líquid

El medi en el que es cultiva el *Bipolaris cynodontis* és un medi sintètic amb la següent composició:

- 1 L aigua desionitzada
- 2% Glucosa
- 0.2% Extracte de Llevat
- 0.05% Triptona
- 0.5% MgSO<sub>4</sub>
- % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Aquesta mescla es fa bullir, s'autoclava i, abans de la gelificació de l'agar, s'emplaca. Les plaques de Petri es mantenen a 4 °C tancades amb Parafilm.

## 3. Desenvolupament de cultius

Pel desenvolupament d'un cultiu dels fongs emprats en aquesta tesi (*Penicillium roquefortii* o *Bypolaris cynodontis*) s'ha de seguir l'esquema de la

Figura 236.

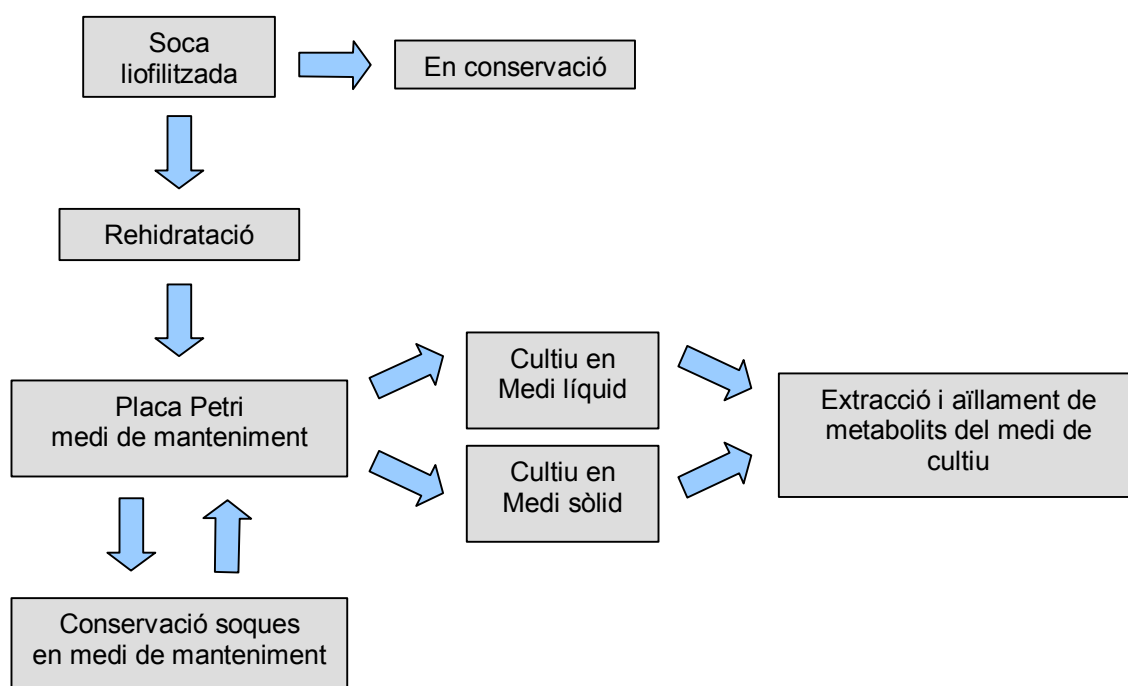


Figura 236. Esquema a seguir per al desenvolupament d'un cultiu.

### 3.1. Sembra a medi de manteniment

#### 3.1.1. Sembra del glicerinat a medi de manteniment

El glicerinat conservat a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  es descongela de forma lenta fins a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuació, amb l'ajut d'una micropipeta estèril, es dipositen  $100\text{ }\mu\text{l}$  de l'inòcul en el centre d'una placa Petri, i es distribueix amb una nansa de Drigalsky estèril. Es deixa incubar a temperatura ambient ( $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durant 7 dies.

#### 3.1.2. Sembra del fong rehidratat a medi de manteniment

El fong rehidratat se sembra amb la nansa de Drigalsky a una placa de Petri amb medi de manteniment (PDA o V8 Agar). S'aboca  $1\text{ mL}$  de la dissolució del fong a la superfície de la placa de Petri que conté el medi i, tot seguit, la dissolució es reparteix per tota la placa amb la nansa de Drigalsky. A continuació, la placa de Petri s'incuba a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 7 dies a la foscor.

#### 3.1.3. Sembra a medi de manteniment a partir de cultius del fong

Es realitza una sembra en un sol punt al medi de manteniment des dels cultius del fong en medi de manteniment conservats a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i a la foscor.

El fong s'incuba a temperatura ambient durant 7 dies a la foscor.

### 3.2. Inoculació dels fongs en els medis de cultiu

#### 3.2.1. Medi de cultiu líquid

*Penicillium roquefortii*: Amb la boca ampla d'una pipeta Pasteur es marca un disc de  $0.5\text{ cm}$  de diàmetre en el medi de manteniment de la placa de Petri amb conidis de *Penicillium roquefortii* incubats durant 7 dies a temperatura ambient a la foscor. El disc s'introdueix, amb la nansa de Kolle, en un tub de test amb  $2\text{ mL}$  de la dissolució dispersant de SDS  $0.01\%$  o bé amb  $2\text{ mL}$  d'aigua. La suspensió s'agita amb l'ajuda d'un vòrtex. A continuació, el fong s'inocula en el medi de cultiu líquid per addició de  $1\text{ mL}$  de la suspensió de conidis al recipient que el contingui.

*Bypolaris cynodontis*: Mitjançant una nansa de Kolle s'agafa directament una tira del medi de manteniment (V8 Agar) que conté conidis del fong *Bypolaris cynodontis*. Aquesta tira s'introdueix directament al medi de cultiu.

El glicerinat conservat a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  es descongela de forma lenta fins a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuació, amb l'ajut d'una micropipeta estèril, es dipositen  $100\text{ }\mu\text{l}$  de l'inòcul en el centre d'una placa Petri, i es distribueix amb una nansa de Drigalsky estèril. Es deixa incubar a temperatura ambient ( $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durant 7 dies.

El fong rehidratat se sembra amb la nansa de Drigalsky a una placa de Petri amb medi de manteniment (PDA o V8 Agar). S'aboca  $1\text{ mL}$  de la dissolució del fong a la superfície de la placa Petri que conté el medi i, tot seguit, la dissolució es reparteix per tota la placa amb la nansa de Drigalsky. A continuació, la placa Petri s'incuba a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 7 dies a la foscor.

Es realitza una sembra en un sol punt al medi de manteniment des dels cultius del fong en medi de manteniment conservats a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i a la foscor.

El fong s'incuba a temperatura ambient durant 7 dies a la foscor.

#### 3.2.2. Medi de cultiu sòlid

Amb la nansa de Kolle s'agafen dues tires del medi de manteniment de la soca ATCC 48936 mantinguda a la nevera i s'introdueixen en un tub d'assaig on prèviament s'hi han afegit  $5\text{ mL}$  d'aigua desionitzada esterilitzada. El tub s'agita vigorosament i el contingut s'aboca en els matrassos d'Erlenmeyer amb medi de cultiu sòlid. Aquests es tapen i s'agiten vigorosament fins a homogeneïtzació del contingut.

### 3.3. Incubació dels fongs

Els cultius de *Penicillium roquefortii*, es desenvolupin aquests en medi líquid o sòlid, s'incuben durant un període comprès entre 12 i 14 dies a la foscor a 24 °C.

En el cas dels cultius realitzats en medi sòlid, cal agitar els matrassos d'Erlenmeyer que contenen el cultiu vigorosament periòdicament per homogeneïtzar el contingut i afavorir un bon creixement del fong.

Els cultius de *Bipolaris cynodontis* es realitzen en dues etapes, un primer precultiu en 100 mL de medi sintètic contingut en un matràs d'Erlenmeyer de 500 mL que s'incuba amb agitació mecànica a 200 rpm, a 25 °C durant 3 dies. Aquest precultiu s'addiciona a un matràs d'Erlenmeyer de 5 L que conté 1 L de medi sintètic, s'incuba amb agitació mecànica a 200 rpm, a 25 °C durant 7 dies.

## 4. Extracció dels metabòlits del medi de cultiu

### 4.1. *Penicillium roquefortii*

Liofilització: Es parteix de 500 mL de medi de cultiu líquid, aquests es congelen amb acetona i neu carbònica i, finalment, es liofilitzen. El liòfil sòlid es macera posteriorment dos cops amb 300 mL de cloroform, la fase orgànica s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

Extracció amb cloroform: En un embut d'extracció de 10 L s'introdueixen 2 L de medi líquid i la mateixa quantitat de cloroform o bé la meitat segons els casos, s'agita i es recull la fase orgànica. Es repeteix l'operació fins que a la fase orgànica no hi ha presència de mostra per CCF. La fase orgànica s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

### 4.2. *Bipolaris cynodontis*

En un embut d'extracció de 10 L s'introdueix 1 L de medi líquid i la mateixa quantitat d'acetat d'etil, s'agita i es recull la fase orgànica, es repeteix l'operació fins que a la fase orgànica no hi ha presència de mostra per CCF. La fase orgànica s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

El residu oliós de l'extracte orgànic es purifica mitjançant cromatografia flash, fent servir com a eluent una mescla ciclohexà:acetat d'etil:cloroform en proporció 5:4:1.

## 5. Tècniques microscòpiques

Per a l'observació microscòpica dels fongs s'utilitza un microscopi Ivymen Optic System i les fotografies es realitzen amb una càmera Pentax MZ-50.

Els frotis per a l'observació microscòpica de fongs es realitzen fàcilment col·locant una petita mostra del fong a observar sobre un portaobjectes, s'addicionen dues gotes d'aigua i es cobreix amb un cobreobjectes.

## 6. Determinació de la concentració de PRT (19) per HPLC

### 6.1. Mètode analític

S'utilitza una columna de fase normal NovaPak Sílica (Waters) i una fase mòbil THF:*n*-hexà (15:85) amb un cabdal de 1.5 mL·min<sup>-1</sup>. La longitud d'ona de mesura és de 254 nm. El temps de retenció de la PRT (19) en aquestes condicions és de 7.8 min.

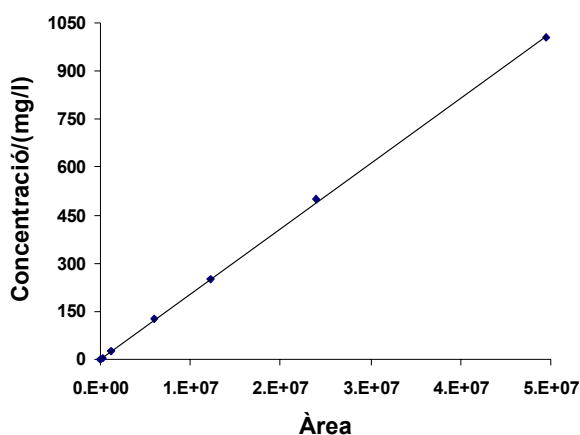
### 6.2. Recta de calibració

A continuació, es mostra una de les rectes patró que s'han realitzat al llarg de la tesi per a poder determinar quantitativament 19 en el medi de cultiu del fong *P. roquefortii* (Figura 237). La recta de calibració es realitza cada 6 mesos obtenint resultants equivalents en totes elles.

Es preparen 7 dissolucions patró de 19 a partir d'una dissolució mare que s'obté dissolent 2.007 mg de 19 en 2 mL de CHCl<sub>3</sub>. A partir d'aquesta dissolució, s'obtenen tres dissolucions més mitjançant tres dilucions



1:2 successives. A continuació, a partir de la dissolució més diluïda s'obtenen tres dissolucions més per tres diluïcions 1:5 successives. Cada una d'elles s'injecta dues vegades (**Taula 95**).



**Figura 237.** Recta de calibrat de la PRT (19).

$$[\text{PRT}] \text{ (mg/l)} = 2.043 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Àrea} \quad R^2 = 0.9997$$

Patrò	c/(mg/l)	c/ $\mu\text{M}$	Àrea
1	1004	3136	49455412
2	502	1568	23887661
3	251	784	12296346
4	125	392	5925968
5	25	78	1142721
6	5	16	245674
7	1	3	58229

**Taula 95.** Concentracions dels patrons emprats per la recta de calibrat.

### 6.3. Tractament de mostra

El tractament de mostra, per a injectar-la a l'HPLC, ha diferit segons el medi de cultiu utilitzat.

#### 6.3.1. Medi de cultiu líquid

El tractament de la mostra segueix els següents passos:

1. El recipient que conté el medi de cultiu s'agita. S'agafa 1 mL de medi de cultiu i aquest s'introdueix en vials topazis.
2. Liofilització.
3. Extracció del medi de cultiu liofilitzat amb  $\text{CHCl}_3$  mitjançant agitació i ultrasons.
4. L'extracte obtingut es filtra amb una xeringa per un filtre amb mida de porus de 0.4  $\mu\text{m}$ .
5. La dissolució orgànica obtinguda s'enrasa a 5 mL.

#### 6.3.2. Medi de cultiu sòlid

El tractament de la mostra segueix els següents passos:

1. El sòlid provinent dels extractes orgànics del medi de cultiu sòlid es dissol en una quantitat coneguda de  $\text{CHCl}_3$  (50-100 mL).
2. Una alíquota de la dissolució orgànica obtinguda es filtra amb una xeringa per un filtre amb mida de porus de 0.4  $\mu\text{m}$ .

**6.3.3. Medi de FDA**

El tractament de mostra utilitzat en el cas del medi proposat per la FDA<sup>177</sup> utilitzat en el Disseny d'Experiències, consisteix en els següents passos:

1. El medi semisòlid es macera amb cloroform, s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda.
2. Posteriorment l'extracte sòlid es redissol amb cloroform, es filtra amb una xeringa per un filtre amb mida de porus de 0.4  $\mu\text{m}$  i s'enrasa a 25 mL.

**EXPERIÈNCIES MICROBIOLÒGIQUES****1. Recompte de conidis****1.1. Concentració de la dissolució a inocular al medi de cultiu líquid**

Un cop s'ha incubat la soca de *Penicillium roquefortii*, en el medi de manteniment, es necessari preparar una suspensió de concentració  $10^7$ - $10^8$  conidis per mil·lilitre que s'inocularà en el medi de cultiu preparat anteriorment. Per conèixer la concentració d'aquesta suspensió és necessari comptar els conidis presents en el medi, comptatge que es realitza amb l'ajut d'una cambra de Bürker.

Per determinar aquesta concentració es realitzen dues experiències on es prepara una suspensió de conidis de *Penicillium roquefortii* de la soca ATCC 48936 dispersant 1 disc d'agar del medi de manteniment de 0.5 cm de diàmetre en 2 mL de la dissolució dispersant de dodecil sulfat sòdic (SDS).

Experiència 1: A partir de la suspensió de conidis, en el primer cultiu d'aquesta tesi, es preparen dues dissolucions. En la primera, es preparen dues cambres de Bürker (cambra 1 i 2) i, en la segona, dues més (cambres 3 i 4). Els resultats es mostren en la **Taula 96**.

Quadre	Nombre de conidis/quadre				Quadre	Nombre de conidis/quadre			
	Cambra 1	Cambra 2	Cambra 3	Cambra 4		Cambra 1	Cambra 2	Cambra 3	Cambra 4
1	9	47	64	32	22	5	42	63	33
2	11	59	69	27	23	5	59	84	24
3	11	37	62	29	24	18	53	82	49
4	18	38	75	21	25	13	34	68	24
5	5	57	68	35	26	16	39	62	45
6	5	43	78	39	27	26	43	63	37
7	10	58	63	26	28	9	38	66	43
8	8	43	69	31	29	8	32	70	28
9	16	46	61	28	30	11	57	60	38
10	14	52	73	26	31	13	49	67	36
11	12	47	62	37	32	10	30	74	29
12	13	45	56	27	33	5	34	86	47
13	12	51	76	33	34	7	43	73	22
14	5	38	74	33	35	16	41	81	33
15	11	43	82	42	36	18	37	72	25
16	12	53	86	35	37	5	48	71	36
17	23	45	59	41	38	25	36	65	38
18	12	47	57	28	39	13	52	66	40
19	17	41	78	33	40	11	38	59	31
20	15	55	71	20	41	5	42	63	33
21	9	43	75	47					

**Taula 96.** Resultats obtinguts en el recompte de conidis de cadascun dels 41 quadrats de 4 cambres de Bürker.

A continuació es presenta, a la **Taula 97**, la mitja aritmètica de conidis per quadrat presents a cada cambra, la corresponent desviació estàndard i la concentració de conidis·ml<sup>-1</sup>.

Cambra de Bürker	Mitja de conidis per quadrat	Desviació estàndard	Concentració (conidis/ml)
1	11	5.3	$4.4 \cdot 10^7$
2	41	7.9	$1.6 \cdot 10^8$
3	63	8.1	$2.5 \cdot 10^8$
4	30	7.6	$1.2 \cdot 10^8$

**Taula 97.** Concentració de conidis presents en cada cambra de Bürker.

Amb aquest mètode de recompte de conidis s'observa que si es dispersa 1 disc d'agar que conté conidis de *Penicillium roquefortii* envellides 7 dies, en 2 mL d'una dissolució de dodecil sulfat sòdic al 0.01%, s'obté una suspensió de concentració mitja al voltant de  $1.5 \cdot 10^8$  conidis/mL.

Experiència 2: A partir de la suspensió de conidis, en el cultiu catorze d'aquesta tesi, es preparen tres cambres de Bürker, els resultats de les quals es mostren en la **Taula 98**. En aquest cultiu es revisa altre cop la concentració de conidis per descartar factors que puguin afectar la baixa producció de PR toxina (19).

Quadre	Nombre de conidis/quadre			Quadre	Nombre de conidis/quadre		
	Cambra 1	Cambra 2	Cambra 3		Cambra 1	Cambra 2	Cambra 3
1	16	7	14	21	7	10	6
2	8	13	9	22	9	5	14
3	8	10	11	23	10	11	10
4	11	11	2	24	16	13	9
5	10	10	4	25	7	7	3
6	12	11	7	26	8	2	3
7	9	5	5	27	11	9	7
8	12	8	9	28	10	5	15
9	8	11	7	29	10	9	2
10	6	10	11	30	6	7	13
11	7	7	17	31	9	8	14
12	8	5	7	32	20	7	10
13	3	11	7	33	8	8	7
14	12	15	7	34	7	4	14
15	9	14	6	35	7	2	16
16	3	10	10	36	9	7	4
17	9	14	14	37	7	3	3
18	27	14	11	38	13	3	7
19	15	6	8	39	7	6	7
20	12	4	18	40	19	8	5

**Taula 98.** Resultats obtinguts en el recompte de conidis de cadascun dels 40 quadrats de tres cambres de Bürker.

A la **Taula 99** es presenta la mitjana aritmètica de conidis per quadrat presents a cada cambra, la desviació estàndard i la concentració de conidis·mL<sup>-1</sup>.

Cambra de Bürker	Mitjana de conidis per quadre	Desviació estàndard	Concentració (conidis/mL)
1	10	4.6	$4.1 \cdot 10^7$
2	8	3.5	$3.3 \cdot 10^7$
3	9	4.3	$3.5 \cdot 10^7$

**Taula 99.** Concentració de conidis presents a cada cambra de Bürker.

La concentració mitjana mesurada en les tres cambres de Bürker realitzades és de  $3.6 \cdot 10^7$  conidis/mL.

## 1.2. Verificació de l'ús de SDS en la dissolució a inocular

Es prepara una suspensió de conidis de *Penicillium roquefortii* per a cada una de les tres soques: ATCC 48936, ATCC 48778 i ATCC 6989. Es dispersa 1 disc d'agar del medi de manteniment de 0.5 cm de diàmetre, on ha crescut el fong durant 7 dies, en 2 mL d'aigua enlloc de SDS. El procés es repeteix per les tres soques. De cada una de les tres suspensions se'n preparen tres cambres de Bürker, els resultats de les quals es mostren a la **Taula 100**.

Quadre	Nombre de conidis·quadre <sup>-1</sup>								
	Soca ATCC 6989			Soca ATCC 48778			Soca ATCC 48936		
	Cambra 1	Cambra 2	Cambra 3	Cambra 1	Cambra 2	Cambra 3	Cambra 1	Cambra 2	Cambra 3
1	6	14	15	30	35	20	30	17	15
2	14	8	12	26	17	27	11	22	20
3	8	12	7	19	33	13	11	28	22
4	12	10	20	26	23	30	22	22	18
5	9	13	11	26	22	14	16	15	15
6	8	13	12	28	38	32	16	20	24
7	12	15	20	30	29	19	11	20	34
8	12	3	12	31	38	30	14	11	16
9	16	11	13	28	20	33	39	24	13
10	7	14	17	33	27	19	30	16	27
11	7	12	20	24	24	28	39	16	15
12	11	14	15	22	48	29	25	15	20
13	12	12	15	22	32	31	24	27	29
14	15	12	8	26	27	30	34	23	23
15	7	5	13	34	37	33	13	19	12
16	9	7	9	32	33	19	18	13	22
17	7	14	16	17	23	23	17	16	17
18	14	11	19	22	23	40	16	8	29
19	10	7	20	23	34	37	20	30	22
20	12	8	23	35	33	50	26	22	29
21	14	6	20	33	30	35	17	19	19
22	15	7	21	33	27	29	21	21	29
23	10	18	20	31	24	23	25	41	30
24	7	13	12	38	29	35	20	23	17
25	16	8	15	28	27	29	8	20	27
26	15	8	16	29	33	16	21	23	21
27	16	15	10	19	45	42	30	19	30
28	13	13	13	33	32	18	33	29	27
29	13	10	9	27	43	26	22	10	12
30	10	16	10	22	40	32	36	12	17
31	18	16	20	30	38	35	22	14	21
32	11	13	21	15	30	34	23	23	37
33	18	10	20	23	27	24	16	11	15
34	27	6	9	20	32	38	19	40	22
35	16	12	21	25	43	30	20	12	24
36	9	7	8	22	32	32	12	35	27
37	24	5	17	28	23	20	29	20	15
38	11	8	13	25	27	34	18	40	17
39	11	11	9	28	27	18	15	18	27
40	19	10	11	32	23	32	20	21	28

Taula 100. Resultats obtinguts en el recompte de conidis de cadascun dels 40 quadrats de tres cambres de Bürker.

A la Taula 101 es presenta per a cada una de les tres soques, la mitjana aritmètica de conidis per quadrat presents a cada cambra, la desviació estàndard i la concentració de conidis·mL<sup>-1</sup> calculada.

Cambra de Bürker per a la soca ATCC 6989	Mitjana nombre de conidis·quadre <sup>-1</sup>	Desviació estàndard	Concentració (conidis·mL <sup>-1</sup> )
1	13	4.6	5.0·10 <sup>7</sup>
2	11	3.5	4.3·10 <sup>7</sup>
3	15	4.6	5.9·10 <sup>7</sup>

Cambra de Bürker per a la soca ATCC 48778	Mitjana nombre de conidis·quadre <sup>-1</sup>	Desviació estàndard	Concentració (conidis·mL <sup>-1</sup> )
1	27	5.3	1.1·10 <sup>8</sup>
2	31	7.2	1.2·10 <sup>8</sup>
3	28	8.1	1.1·10 <sup>8</sup>

Cambra de Bürker per a la soca ATCC 48936	Mitjana nombre de conidis·quadre <sup>-1</sup>	Desviació estàndard	Concentració (conidis·mL <sup>-1</sup> )
1	21	7.9	8.6·10 <sup>7</sup>
2	21	8.1	8.4·10 <sup>7</sup>
3	22	6.3	8.8·10 <sup>7</sup>

Taula 101. Concentració de conidis presents a cada cambra de Bürker.

Per tant, per a la soca ATCC 6989 s'obté una suspensió de  $5.1 \cdot 10^7$  conidis·mL<sup>-1</sup> d'aigua; per a la soca ATCC 48778, una suspensió de  $1.2 \cdot 10^8$  conidis·mL<sup>-1</sup> i per a ATCC 48936 una concentració de  $8.6 \cdot 10^7$  conidis·mL<sup>-1</sup> (Taula 102).

Soca <i>Penicillium roquefortii</i>	Mitjana N° conidis·mL <sup>-1</sup>	Desviació estàndard
ATCC 6989	$5.1 \cdot 10^7$	$8.3 \cdot 10^6$
ATCC 48778	$1.2 \cdot 10^8$	$7.7 \cdot 10^6$
ATCC 48936	$8.6 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^6$

Taula 102. Resum de la concentració de conidis per a cada soca.

## 2. Cultius realitzats

### 2.2. *Penicillium roquefortii*

Tots els cultius segueixen el mateix procediment si no s'indica el contrari: en el medi de manteniment contingut en una placa de Petri se sembra en un sol punt la soca corresponent el fong *Penicillium roquefortii*. S'incuba a la foscor a 24 °C durant 7 dies. Es prepara un tub amb 2 mL d'una dissolució estèril de dodecil sulfat sòdic al 0.01%. S'introdueix, amb l'ajut d'una pipeta Pasteur, un disc d'agar de la placa de Petri que conté els conidis del fong *Penicillium roquefortii*, els quals es dispersen agitant la suspensió amb un vòrtex. Finalment, s'inoculen 0.5 mL d'aquesta suspensió en diversos flascons d'Erlenmeyer que contenen el medi de cultiu. Aquests flascons, en cas que no s'indiqui, s'incuben 13 dies a 24 °C i sense agitació en absència de llum.

**Cultiu 1:** La soca ATCC 48936 es cultiva en dos flascons d'Erlenmeyer d'un litre amb 140 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó. S'incuben a 30 °C, per manca d'una cambra a 24 °C durant 9 dies. Es detecta la presència de PR toxina (19) per CCF.

**Cultiu 2:** La soca ATCC 48936 es cultiva en tres flascons d'Erlenmeyer d'un litre que contenen 120 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal cadascun, a un pH inicial de 4 tamponat amb citrat/fosfat 25mM/25mM. Es detecta la presència de PR toxina (19) per CCF.

**Cultiu 3:** La soca ATCC 48936 es cultiva, durant 15 dies, en 5 flascons d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 110 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal cadascun i en 2 de 2 L que en contenen 220 mL. Tots ells es cultiven amb tampó diluït. Se n'extreuen mostres els dies 11-15 per tal d'establir, mitjançant HPLC, quin és el període necessari per a produir la màxima quantitat de PR toxina (19). La concentració màxima de PR toxina (19) és de 217 mg/l, detectada per HPLC el dia 13.

**Cultiu 4:** La soca ATCC 48936 es cultiva en 12 flascons d'Erlenmeyer, 6 de 1 L i 6 de 0.5 l, introduint en cadascun d'ells 200 mL de medi de cultiu d'extracte de cereals amb tampó diluït. La meitat (3 de cada tipus) es van incubar centrifugant l'extracte de cereals com s'havia fet fins al moment i l'altra meitat sense

centrifugar. La concentració de PR toxina (**19**) aïllada és de 246 mg/l. A més, es detecta i s'aïllen les eremofortines C (**20**) i D (**27**).

**Cultiu 5:** La soca ATCC 48936 es cultiva en 8 flascons d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 200 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó diluït, on s'havia substituït l'arròs de varietat *Indica* per *Bahia*. Es determina la concentració de **19** de tres matrassos d'Erlenmeyer detectant, per HPLC, concentracions de 143, 100 i 132 mg/l.

**Cultiu 6:** La soca ATCC 48936 es cultiva, durant 15 dies, en 6 ampolles Roux, 3 de 0.6 L i 3 de 1 L, introduint 120 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal en cadascuna amb tampó diluït. No es detecta la presència de PR toxina (**19**) per HPLC en els flascons els dies 12-15.

**Cultiu 7:** La soca ATCC 48936 es cultiva en 6 ampolles Roux, 3 de 0.6 L que contenen 90 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal en cadascuna amb tampó diluït, i 3 de 1 L que en contenen 120 mL. No es detecta la presència de PR toxina (**19**) per HPLC en els flascons els dies 11-13.

**Cultiu 8:** La soca ATCC 48936 es cultiva en 2 ampolles Roux, una de 0.6 L i l'altra de 1 L que contenen 200 i 350 mL de medi d'extracte de cereal respectivament. A més, es cultiva en 8 flascons d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 250 mL de medi d'extracte de cereal, 5 flascons amb la varietat d'arròs *Indica* i 3 amb la varietat *Bahia*. Tots ells es preparen amb tampó diluït. Per HPLC no es va detectar **19** en els recipients que contenen la varietat *Bahia* i en la resta únicament 0-40 mg/l.

**Cultiu 9:** La soca ATCC 48936 es cultiva en 6 ampolles Roux, 3 de 0.6 L que contenen 250 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal, i 3 de 1 L que en contenen 350 mL. També s'incuben 5 flascons d'Erlenmeyer de 1 L amb 300 mL del mateix medi. Les ampolles Roux i 2 flascons d'Erlenmeyer es preparen amb tampó citrat/fosfat 50mM/25mM (pH inicial = 4) i la resta de flascons d'Erlenmeyer amb tampó KCl/HCl 25mM/25mM (pH inicial = 3.5). Tots els recipients s'incuben sota llum blanca. Per HPLC únicament es va detectar **19** amb una concentració inferior a 20 mg/l.

**Cultiu 10:** La soca ATCC 48936 es cultiva en 2 ampolles Roux, una de 0.6 L i l'altra de 1 L que contenen 250 i 350 mL de medi d'extracte de cereal respectivament. A més, es cultiva en 6 flascons d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 300 mL del mateix medi. Tots ells s'han preparat amb tampó citrat/fosfat 540mM/60mM (pH inicial = 4). No es detecta la presència de PR toxina (**19**) per HPLC.

**Cultiu 11:** La soca ATCC 48936 es cultiva en 2 ampolles Roux, una de 0.6 L i l'altra de 1 L que contenen 250 i 350 mL de medi d'extracte de cereal respectivament. A més, es cultiva en 6 flascons d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 250 mL del mateix medi. Tots ells s'han preparat amb tampó citrat/fosfat 540mM/60mM (pH inicial = 4). No es detecta la presència de PR toxina (**19**) per HPLC.

**Cultiu 12:** La nova soca ATCC 48936 (segona) es cultiva en 4 ampolles Roux, dues de 0.6 L i les altres dues de 1 L que contenen 250 i 350 mL de medi d'extracte de cereal respectivament. A més, es cultiva en 12 flascons d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 250 mL del mateix medi. Tots ells s'han preparat amb tampó citrat/fosfat 420mM/180mM (pH inicial = 4). No es detecta la presència de PR toxina (**19**) per HPLC.

**Cultiu 13:** La segona soca ATCC 48936 es cultiva en 4 ampolles Roux, dues de 0.6 L i les altres dues de 1 L que contenen 250 i 350 mL de medi d'extracte de cereal amb tampó diluït respectivament. A més, es cultiva en 2 flascons d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 250 mL del mateix medi. No es detecta la presència de PR toxina (**19**) per HPLC.

**Cultiu 14:** La segona soca ATCC 48936 es cultiva en 4 ampolles Roux, dues de 0.6 L i les altres dues de 1 L que contenen 120 i 200 mL de medi d'extracte de cereal respectivament. A més, es cultiva en 2 flascons

d'Erlenmeyer de 1 L que contenen 140 mL del mateix medi. Tots ells s'incuben durant 12 dies amb tampó citrat/fosfat 420mM/180mM (pH inicial = 4). Es determina la concentració de **19** d'un matràs d'Erlenmeyer i d'un flascó Roux per HPLC. En els dos casos s'obté una concentració nul·la de **19**.

**Cultiu 15:** La segona soca ATCC 48936 es cultiva, per addició de dues tires de cultiu del fong en medi de manteniment, en un flascó d'Erlenmeyer de 5 L que conté 1250 g de medi de cultiu sòlid. Es detecta la presència de **19** per CCF.

**Cultiu 16:** La segona soca ATCC 48936 es cultiva, per addició de dues tires de cultiu del fong en medi de manteniment, en dos flascons d'Erlenmeyer de 5 L que contenen 1250 g de medi de cultiu sòlid cadascun. Els cultius s'incuben agitant els matrassos de manera discontinua per homogeneïtzar el contingut durant 12 dies. L'arròs provinent del matràs d'Erlenmeyer 1 es separa en dues fraccions. De la primera se'n realitzen dues extraccions consecutives amb un Soxhlet amb DCM durant 4 h. La segona fracció s'esmicola amb una picadora i se'n realitza una extracció amb un Soxhlet amb DCM durant 4 h. L'arròs del matràs d'Erlenmeyer 2 es separa en tres fraccions. Cada fracció s'esmicola amb una picadora i se'n realitza, de cada una, una extracció amb un Soxhlet amb DCM durant 4 h. La concentració de PRT (**19**) per HPLC és de 5 mg·kg arròs<sup>-1</sup>.

**Cultiu 17:** S'incuben 12 flascons d'Erlenmeyer amb 150 mL de medi d'extracte de cereal amb tampó concentrat. A sis matrassos s'hi inocula la soca de *Penicillium roquefortii* ATCC 48778 i als altres sis la segona soca ATCC 48936. Els cultius s'incuben durant 12 dies. S'obtenen 532 mg de PRT (**19**).

**Cultiu 18:** Es preparen 2000 mL de medi de cultiu líquid emprant tampó citrat-fosfat concentrat. 150 mL del medi de cultiu s'addicionen a 12 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L. A sis matrassos s'hi inocula la soca de *Penicillium roquefortii* ATCC 48778 i als altres sis la soca ATCC 48936. Els cultius s'incuben durant 12 dies. La determinació de la concentració de PRT (**19**) per HPLC es presenta en la **Taula 117**.

Matràs	Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>	
	ATCC 48936	ATCC 48778
1	22	5
2	5	87
3	12	8
4	58	27
5	161	161
6	16	173

**Taula 103.** Resum de la concentració de PRT (**19**) en el cultiu 18 per a cada soca.

**Cultiu 19:** S'incuben 12 flascons d'Erlenmeyer amb 150 mL de medi d'extracte de cereal emprant tampó diluït per a 6 d'ells i concentrat per als altres 6. A 3 matrassos amb medi que conté tampó concentrat i a 3 matrassos amb medi que conté tampó diluït s'hi inocula la segona soca ATCC 48936 i a la resta l'ATCC 48778. La determinació de la concentració de PRT (**19**) per HPLC es mostra a la **Taula 104**.

Soca de <i>P. roquefortii</i>	Matràs	Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>	
		Tampó diluït	Tampó concentrat
ATCC 48936	1	653	149
	2	573	0
	3	467	0
ATCC 48778	1, 2 i 3	0	0

**Taula 104.** Resum de la concentració de PRT (**19**) en el cultiu 19.

**Cultiu 20:** S'incuben, durant 12 dies, 12 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat diluït. A sis matrassos s'hi inocula la soca de ATCC 48778 i als



altres sis l'ATCC 48936. No es detecta PRT (19) per HPLC.

**Cultiu 21:** S'incuben, durant 12 dies, 12 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat diluït. A quatre matrassos s'hi inocula la soca ATCC 48778, a quatre més la soca ATCC 6989 i als quatre restants l'ATCC 48936. Les concentracions dels flascons es mostren en la **Taula 105**.

**Cultiu 22:** S'incuben, durant 12 dies, 12 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. A quatre matrassos s'hi inocula la soca ATCC 48778, a quatre més la soca ATCC 6989 i als quatre restants l'ATCC 48936. Les concentracions dels flascons es mostren en la **Taula 105**.

Soca <i>Penicillium roquefortii</i>	Matràs	Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>	
		Tampó diluït	Tampó concentrat
ATCC 6989	1	28	7
	2	31	6
	3	5	18
	4	13	6
ATCC 48778	1	7	3
	2	4	5
	3	5	4
	4	0	4
ATCC 48936	1	4	8
	2	4	3
	3	3	5
	4	0	5

**Taula 105.** Resum de la concentració de PRT (19) en els cultius 21 i 22.

**Cultiu 23:** S'incuben, durant 12 dies, 13 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. A sis matrassos s'hi inocula la soca ATCC 48778 i als altres set la soca ATCC 6989. Les concentracions dels 6 flascons inoculats amb la soca ATCC 48778 i 3 amb la soca 6989 es mostren en la **Taula 106**.

Soca <i>Penicillium roquefortii</i>	Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>	
ATCC 6989	18	
	18	
	17	
ATCC 48778	29	17
	16	17
	46	21

**Taula 106.** Resum de la concentració de PRT (19) en el cultiu 23.

**Cultiu 24:** S'incuben, durant 12 dies, 13 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. A sis matrassos s'hi inocula la soca ATCC 48778 i als altres set la soca ATCC 6989. En aquest cultiu no s'avalua per HPLC la producció de PR toxina (19) i es cromatografia directament.

**Cultiu 25:** S'incuben, durant 12 dies, 13 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. A sis matrassos s'hi inocula la soca ATCC 48778 i als altres set la soca ATCC 6989. En aquest cultiu no s'avalua per HPLC la producció de PR toxina (19) i es cromatografia directament.

**Cultiu 26:** S'incuben, durant 12 dies, 27 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. Les soques inoculades en cada matràs es presenta en la **Taula 107**. Les concentracions dels flascons analitzats per HPLC es mostren en la **Taula 108**.

Nombre de matrassos	Soques inoculades
6	ATCC 6989
6	ATCC 48936
6	ATCC 48778
3	ATCC 6989 + ATCC 48936
3	ATCC 6989 + ATCC 48778
3	ATCC 48778 + ATCC 48936

**Taula 107.** Soques inoculades en cada matràs en el cultiu 26.

Soques <i>Penicillium roquefortii</i>	Matràs	Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>
ATCC 6989	1	20
	2	15
ATCC 48936	1	252
	2	163
ATCC 48778	1	17
ATCC 48936/48778	1	209
	2	238
	3	226
ATCC 48936/6989	1	145
	2	26
	3	168
ATCC 48778/6989	1	0
	2	0

**Taula 108.** Resum de la concentració de PRT (19) en els cultius 26.

**Cultiu 27:** S'incuben, durant 12 dies, 28 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. La inoculació de les soques en cada matràs es mostra en la **Taula 109**. Les concentracions dels flascons analitzats per HPLC es mostren en la **Taula 110**.

Nombre de matrassos	Soques inoculades
11	ATCC 48778
11	ATCC 48936
6	ATCC 48936 + ATCC 48778

**Taula 109.** Soques inoculades en cada matràs en el cultiu 27.

Soques <i>Penicillium roquefortii</i>	Matràs	Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>
ATCC 48778	1	19
	2	0
ATCC 48936	1	62
ATCC 48936/48778	1	21
	2	42
	3	35
	4	26
	5	18
	6	22

**Taula 110.** Resum de la concentració de PRT (19) en els cultius 27.

**Cultiu 28:** S'incuben, durant 12 dies, 28 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. La inoculació de les soques en cada matràs es mostra en la **Taula 109**. Les concentracions dels flascons analitzats per HPLC es mostren en la **Taula 111**.

Soques <i>Penicillium roquefortii</i>	Matràs	Concentració PR toxina (19)/mg·L <sup>-1</sup>
ATCC 48778	1	19
	2	26
	3	0
ATCC 48936	1	79
	2	112
	3	190
ATCC 48936/48778	1	53
	2	64
	3	91

**Taula 111.** Resum de la concentració de PRT (19) en els cultius 28.

**Cultiu 29:** La segona soca ATCC 48936 s'inocula a 26 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. Tots ells s'incuben durant 12 dies. En aquest cultiu no s'avalua per HPLC la producció de PR toxina (19) i es cromatografia directament.

**Cultiu 30:** La segona soca ATCC 48936 s'inocula a 15 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L amb 150 mL de medi de cultiu d'extracte de cereal amb tampó citrat/fosfat concentrat. Tots ells s'incuben durant 12 dies. En aquest cultiu no s'avalua per HPLC la producció de PR toxina (19) i es cromatografia directament.

**Cultiu 31:** Es preparen 4 litres de medi de cultiu totals amb diferents suc, alguns centrifugats a 6000 rpm durant 10 minuts. S'utilitza tampó citrat-fosfat concentrat. 150 mL de medi de cultiu s'addicionen a 26 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L. Els cultius s'incuben durant 12 dies. El nombre de matrassos usats i la soca inoculada per a cada medi es mostra en la **Taula 112**. Les concentracions es mostren en la **Taula 114**.

Nombre d'Erlenmeyers	Sucs utilitzats de medi	Soca inoculada
3	Poma	ATCC 48936
3	Poma	ATCC 48778
3	Préssec i Raïm	ATCC 48936
3	Préssec i Raïm	ATCC 48778
3	Taronja Centrifugat	ATCC 48936
3	Taronja Centrifugat	ATCC 48778
3	Tomàquet Centrifugat	ATCC 48936
3	Tomàquet Centrifugat	ATCC 48778
2	Barreja dels suc's anteriors	ATCC 48936

**Taula 112.** Soques i medis de cada matràs en el cultiu 31.

**Cultiu 32:** Disseny d'experiments dels suc's. Es preparen 4 litres de medi de cultiu totals amb diferents suc's de fruita, alguns centrifugats a 6000 rpm durant 10 minuts. S'utilitza tampó citrat-fosfat concentrat. 150 mL de medi de cultiu s'addicionen a 27 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L. Els cultius s'incuben durant 12 dies. El nombre d'Erlenmeyers utilitzats i la soca inoculada per a cada medi es mostra en la **Taula 113**. Les concentracions dels flascons per a la soca ATCC 48936 es mostren en la **Taula 114**.

Nombre d'Erlenmeyers	Sucs utilitzats de medi	Soca inoculada
3	Poma Centrifugat	ATCC 48936
3	Poma Centrifugat	ATCC 48778
3	Préssec i Raïm Centrifugat	ATCC 48936
3	Préssec i Raïm Centrifugat	ATCC 48778
3	Taronja	ATCC 48936
3	Taronja	ATCC 48778
3	Tomàquet	ATCC 48936
3	Tomàquet	ATCC 48778
3	Barreja dels suc's anteriors	ATCC 48936

**Taula 113.** Soques i medis de cada matràs en el cultiu 32.

Suc	Centrifugat	mg PRT (19)/L	Mitjana mg/l	Suc	Centrifugat	mg PRT (19)/L	Mitjana mg/l
Taronja	Sí	518	536	Tomàquet	Sí	14	5
		581				0	
		508				0	
Taronja	No	789	672	Tomàquet	No	0	0
		469				0	
		758				0	
Préssec i raïm	Sí	510	480	Poma	Sí	36	23
		476				10	
		455				22	
Préssec i raïm	No	361	249	Poma	No	243	148
		336				67	
		49				134	

Taula 114. Concentració de PRT (19) en els cultius 31 i 32.

**Cultiu 33:** Disseny d'experiments final. Es realitzen 4 litres de medi de cultiu suc de taronja, emprant també citrat-fosfat concentrat. 150 mL del medi de cultiu s'addicionen a 26 matrassos d'Erlenmeyer de 1 l, 14 matrassos s'inoculen amb la soca ATCC 48936 i els 12 restants amb la soca ATCC 48778. Els cultius s'incuben durant 12 dies. En aquest cultiu no s'avalua per HPLC la producció de PR toxina (19).

**Cultiu 34:** Es realitzen 27 cultius diferents amb dues repeticions de cadascun, 150 mL de cada medi de cultiu s'addicionen a 54 matrassos d'Erlenmeyer de 1 L. Les característiques de cada medi, la concentració de tampó citrat-fosfat, la concentració d'extracte de llevat i la de sacarosa es detallen a la Taula 115, així com la soca inoculada en cadascun d'ells. Les concentracions dels flascons es mostren en la Taula 116.

Experiència	Medi	Soca inoculada	Ext. Llev. (%)	Sacarosa (%)	Tampó (mM)
1	Extracte de Cereal	ATCC 48936	0	0	0
2	Extracte de Cereal	ATCC 48936	1	5	250
3	Extracte de Cereal	ATCC 48936	2	10	500
4	Extracte de Cereal	ATCC 48778	0	5	500
5	Extracte de Cereal	ATCC 48778	1	10	0
6	Extracte de Cereal	ATCC 48778	2	0	250
7	Extracte de Cereal	ATCC 6989	0	10	250
8	Extracte de Cereal	ATCC 6989	1	0	500
9	Extracte de Cereal	ATCC 6989	2	5	0
10	FDA	ATCC 48936	0	0	0
11	FDA	ATCC 48936	1	5	250
12	FDA	ATCC 48936	2	10	500
13	FDA	ATCC 48778	0	5	500
14	FDA	ATCC 48778	1	10	0
15	FDA	ATCC 48778	2	0	250
16	FDA	ATCC 6989	0	10	250
17	FDA	ATCC 6989	1	0	500
18	FDA	ATCC 6989	2	5	0
19	Suc de Taronja	ATCC 48936	0	0	0
20	Suc de Taronja	ATCC 48936	1	5	250
21	Suc de Taronja	ATCC 48936	2	10	500
22	Suc de Taronja	ATCC 48778	0	5	500
23	Suc de Taronja	ATCC 48778	1	10	0
24	Suc de Taronja	ATCC 48778	2	0	250
25	Suc de Taronja	ATCC 6989	0	10	250
26	Suc de Taronja	ATCC 6989	1	0	500
27	Suc de Taronja	ATCC 6989	2	5	0

Taula 115. Experiències realitzades en el cultiu 34.

Experiència	Concentració PRT (19) (mg/l)		
	Repetició 1	Repetició 2	Mitjana
1	17	13	15
2	32	37	34
3	13	38	25
4	16	13	14
5	13	13	13
6	15	13	14
7	17	13	15
8	16	13	15
9	13	13	13
10	3	7	15
11	27	6	16
12	54	31	43
13	1	1	1
14	1	1	1
15	0	1	1
16	25	6	15
17	25	19	22
18	9	27	18
19	20	59	40
20	83	70	76
21	29	18	24
22	19	13	16
23	13	13	13
24	16	13	15
25	13	13	13
26	19	13	16
27	16	13	15

Taula 116. Concentració de PR toxina (19) en el cultiu 34.

## 2.2. *Bipolaris cynodontis*

Es preparen tres precultius de 100 mL de medi líquid en matrassos d'Erlenmeyer de 500 mL. Aquests precultius s'inoculen amb la soca de *Bipolaris cynodontis* CBSnr 109894 i s'incuben durant 3 dies a 200 rpm a 25 °C. Cada precultiu es transvasa a un matràs d'Erlenmeyer de 5 L que conté un litre de medi líquid i s'incuba durant 5 dies a 200 rpm a 25 °C.

## 3. Extracció i purificació de metabòlits del *P. roquefortii*

A continuació es descriuen les extraccions realitzades i els metabòlits aïllats. Cal observar que no es realitza una columna cromatogràfica per a cada cultiu sinó que els crus obtinguts s'agrupen per purificar-los quan se'n disposa de quantitats suficients.

### 3.1. Cultiu 1

Es filtren els 280 mL de medi de cultiu i, després de rentar el microorganisme amb aigua i cloroform, s'extreu tres cops amb el mateix volum de cloroform. S'obtenen 42 mg de cru després de secar la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> anhidre i eliminar el dissolvent a pressió reduïda. En la fase intermèdia emulsionada s'obtenen 29 mg de cru després de filtrar-ho a través d'un filtre Rossich del nº 4, decantar, secar i eliminar el cloroform a pressió reduïda. En ambdues fraccions de cru es detecta PR toxina (19) per CCF.

El fong *Penicillium roquefortii* es macera amb cloroform durant 1 hora, es filtra, s'asseca i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 197 mg d'un cru sec on no es detecta 19 per CCF

### 3.2. Cultiu 2

Després d'extreure el medi de cultiu tres cops amb 360 mL de cloroform, s'obtenen 835 mg d'un cru complex. Per a la purificació d'aquest cru es realitzen una sèrie de columnes. Després de realitzar dues columnes flash i una de buit, s'aïlla 97 mg de PR toxina (**19**). La primera d'elles s'elueix amb CHCl<sub>3</sub>:MeOH (98:2, v/v) i, de les nou fraccions que s'obtenen, únicament en la primera (633 mg) s'observa PR toxina (**19**) per CCF. La segona columna flash (100 %), eluïda amb ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (1:1:1, v/v/v), permet obtenir en la quarta fracció 87 mg de la toxina **19**, i els 10 mg restants s'obtenen, en la quinta fracció, després de realitzar una columna de buit (83 %) emprant com a eluent ciclohexà:acetat d'etil (3:2, v/v).

- **PR toxina (19)**

Pf (èter etílic): 155 – 157 °C (descriu 155-157 °C).<sup>147</sup>

UV (EtOH): λ<sub>max</sub> 249 nm, ε = 14198 (descriu 15278).<sup>147</sup>

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 2832, 1738, 1724, 1678, 1619, 1377, 1242, 1032, 999, 898, 865, 844 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 9.71 (1H, s, CHO), 6.42 (1H, s, H9), 5.14 (1H, dd, J = 5.1, 5.1 Hz, H3), 3.96 (1H, dd, J = 3.6, 4.8 Hz, H2), 3.65 (1H, d, J = 3.6 Hz, H1), 2.17 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 2.15 (1H, d, J ≈ 13 Hz, Ha6), 1.83 (1H, d, J = 14.1, Hb6), 1.82-1.74 (1H, m, H4), 1.48 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>), 1.44 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 198.6/d C12, 191.6/s C8, 170.6/s C16, 164.5/s C10, 129.9/d C9, 69.8/d C3, 67.4/s C7, 67.3/s C11, 55.9/d C1, 55.5/d C2, 42.8/d C4, 41.6/t C6, 38.1/s C5, 21.8/q C13, 20.7/q C17, 13.7/q C15, 10.1/q C14.

HETCOR <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)-<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>): 198.6 (C12)-9.71 (CHO), 129.9 (C9)-6.42 (H9), 69.8 (C3)-5.14 (H3), 55.9 (C1)-3.65 (H1), 55.5 (C2)-3.96 (H2), 42.8 (C4)-1.78 (H4), 41.6 (C6)-2.15 (H6a) + 1.83 (H6b), 21.8 (C13)-1.48 (13-CH<sub>3</sub>), 20.7 (C17)-2.17 (17-CH<sub>3</sub>), 13.7 (C15)-1.44 (15-CH<sub>3</sub>), 10.1 (C14)-1.02 (14-CH<sub>3</sub>).

- **Fracció 3 de la columna de buit:** S'obté 15 mg d'un altre sesquiterpè eremofilà que no s'aconsegueix identificar.

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3421, 1739, 1661, 1625, 1611 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.86 (1H, s), 4.35 (1H, t), 2.91 (1H, d, J = 14.1 Hz), 2.12 (3H, s), 2.1 (1H, s), 2.0 (2H, dq), 1.87 (3H, s), 1.57 (3H, s), 1.5 (1H, m), 1.16 (3H, s), 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 192.4/s, 165.7/s, 144.3/s, 129.0/d, 128.0/s, 72.5/d, 42.3/d, 42.3/t, 41.0/s, 32.7/t, 24.8/t, 22.8/q, 22.4/q, 18.1/q, 15.5/q.

HETCOR <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)-<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>): 129.0-5.86, 72.5-4.35, 42.3-(2.91 + 2.1), 32.7-2.0, 24.8-1.5, 22.8-2.11, 22.4-1.87, 18.1-1.16, 15.5-0.99.

S'intenten aïllar i identificar, de la resta de fraccions, altres metabòlits que puguin resultar interessants per a ésser emprats com a producte de partida per a la síntesi d'anàlegs actius del KM-01 (**9**) com per exemple l'eremofortina C (**20**). Després de realitzar diferents columnes cromatogràfiques (recta, flash, buit, esglaonada), no s'aconsegueix aïllar ni identificar cap altre sesquiterpè eremofilà. Únicament sembla que l'eremofortina C (**20**) es troba en la darrera fracció (cru de 38 mg) de la segona columna flash ja mencionada.

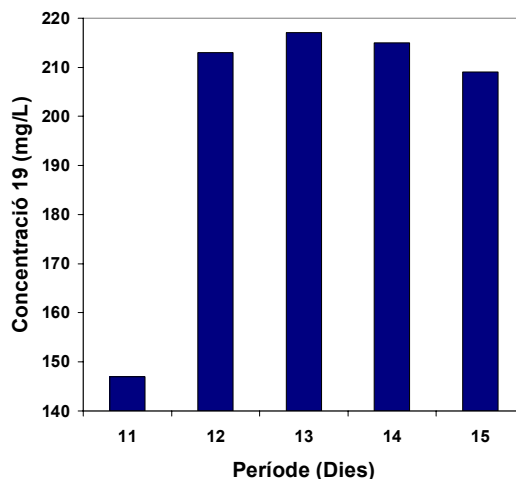
### 3.3. Cultiu 3

Per a quantificar per HPLC la producció de PR toxina (**19**) en el medi de cultiu durant el període de creixement, es requereix una preparació de mostra que es du a terme de manera similar al work-up que es realitza quan es retira el cultiu. S'extreuen, segons cada cas, 15-20 mL del medi de cultiu els dies 11-15 i, després de filtrar, s'extreu tres cops amb la mateixa quantitat de cloroform. A continuació, se seca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i, just abans de la injecció, es redissol la mostra amb 15-25 mL de cloroform.

Els resultats es presenten en la **Taula 117** i la **Figura 238**.

Temps / dies	Concentració de 19/ $\mu\text{M}$	Concentració de 19/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
11	459	147
12	665	213
13	677	217
14	671	215
15	653	209

**Taula 117.** Avaluació de la concentració de PR toxina (**19**) en el medi de cultiu.



**Figura 238.** Quantitat de PR toxina (**19**), en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , produïda en el medi de cultiu de *P. roquefortii*.

Dels 269 mg de cru obtinguts a partir de 350 mL de medi de cultiu provinents dels flascons d'Erlenmeyer de 2 L inoculats, s'obtenen 17 fraccions després de realitzar una columna recta (95%) eluïda amb ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (10:1:1). En la novena d'aquestes fraccions es troben presents 32 mg de PR toxina (**19**) pura i en les fraccions 8-11 50 mg de **19** impurs. A més s'aïllen, de la setena fracció, uns altres 4 mg del sesquiterpè eremofilà descrit però no identificat en el cultiu 2.

- **Fracció 14:** S'aïllen 34 mg d'un altre sesquiterpè eremofilà que no s'aconsegueix identificar.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.44 (1H, d), 5.22 (1H, d, J = 3 Hz), 4.46 (1H, t, J = 2.1 Hz), 3.85 (2H, s), 2.92 (1H, dt, J = 13.8 Hz), 2.40 (1H, d, J = 13.8 Hz), 2.13 (3H, s), 1.95 (1H, d, J = 13.5 Hz), 1.8 (1H, m), 1.68 (1H, d, J = 13.5 Hz), 1.48 (3H, s), 1.29 (3H, s), 1.16 (3H, s), 1.05 (3H, d, J = 8.4 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 172.1/s, 141.5/s, 125.3/d, 101.6/s, 74.4/d, 70.0/t, 68.4/s, 67.7/d, 62.1/s, 41.3/d, 40.6/t, 39.4/s, 35.7/t, 21.1/q, 19.7/q, 12.8/q, 11.4/q.

HETCOR <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)-<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>): 125.3-5.44, 74.4-5.22, 70.0-3.85, 67.7-4.46, 41.3-1.8, 40.6-(2.92 + 2.40), 35.7-(1.95 + 1.68), 21.1-2.13, 19.7-1.29, 12.8-1.05, 11.4-1.48.

### 3.4. Cultiu 4

Per una banda, es disposa de 1.2 litres de medi centrifugat, que es filtra i s'extreu tres cops amb el mateix volum de cloroform amb un embut d'extracció. L'emulsió generada s'elimina per filtració al mateix temps que se satura la fase aquosa amb sal. Per altra banda, el medi no centrifugat s'intenta filtrar en mesura de lo possible, però la gran quantitat de midó dificulta l'operació generant unes emulsions difícils d'eliminar. Ambdues fases s'agrupen, s'assequen amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtren i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Després d'extreure els 2.4 litres de medi, es van obtenir 2.16 g. Aquests es van purificar per cromatografia flash amb una mescla de ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (1:1:1, v/v/v) (**Taula 118**).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	124	c.c.
F2	590	<b>19</b>
F3	88	<b>19</b> impur
F4	99	c.c.
F5	844	<b>20 i 27</b>
F6	181	c.c.

**Taula 118.** Cromatografia flash del cru del cultiu 4. Rdt columna = 89%.

En la segona fracció es va aïllar 590 mg de PR toxina (**19**) pura i en la tercera fracció 88 mg de **19** impur. Aquesta quantitat correspon a 246 mg/l de PR toxina (**19**) aïllada.

Posteriorment, es du a terme una cromatografia Lobar (tamany B) de la fracció 5 que conté les eremofortines C (**20**) i D (**27**). Se sotmeten a purificació 522 mg d'aquesta fracció 5 emprant com a eluent ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (1:3:1, v/v/v) per rendir quatre noves fraccions (**Taula 119**).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	74	<b>19</b> impur
F2	56	<b>20 i 27</b> impurs
F3	291	<b>20 i 27</b>
F4	68	c.c.

**Taula 119.** Cromatografia flash de la F5 de la columna flash anterior. Rdt columna = 94%.

A la **Taula 120** s'indiquen els factors de retenció de PR toxina (**19**) i les eremofortines C (**20**) i D (**27**).

Eluent	Rf PR toxina ( <b>19</b> )	Rf Eremofortina C ( <b>20</b> )	Rf Eremofortina D ( <b>27</b> )
CHCl <sub>3</sub> : MeOH (95:5)	0.73	0.51	0.51
Cy : AcOEt (1:1)	0.36	0.13	0.13
AcOEt 100 %	0.63	0.41	0.41

**Taula 120.** Factors de retenció per als metabòlits produïts pel fong *P. roquefortii*.

### 3.5. Cultius 5 i 8

Els extractes dels cultius 5 i 8, on es va observar la producció de PR toxina (**19**), es van agrupar rendint un cru de 3.75 g. A la vegada, es van agrupar 480 mg que contenen fraccions impures de PR toxina (**19**) procedents de cultius anteriors. El cru resultant es va sotmetre a un procés separatiu per cromatografia flash emprant com a eluent ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (1:1:1, v/v/v) (**Taula 121**).

Es van sotmetre 1.39 g de PR toxina (**19**) a un procés de recristal·lització amb èter etílic (rdt. 50%) i, després de 4 cristal·litzacions, es va obtenir 713 mg de PR toxina (**19**).

Altres cops, la fracció F5 de la columna flash anterior, rica en eremofortina C (**20**), es va purificar per



cromatografia Lobar (tamany B). Es van separar 928 mg de F5 i es van cromatografiar emprant com eluent ciclohexà:acetat d'etil:cloroform (1:3:1, v/v/v) (**Taula 122**).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	88	c.c.
F2	996	<b>19</b>
F3	33	<b>19</b> impur
F4	304	c.c.
F5	992	<b>20 i 27</b>
F6	897	c.c.

**Taula 121.** Cromatografia flash del cru dels cultius 5 i 8 junt amb 480 mg de **19** impura. Rdt columna = 78%.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	36	<b>19</b> impur
F2	211	<b>20 i 27</b> impurs
F3	600	<b>20 i 27</b>
F4	31	c.c.

**Taula 122.** Cromatografia Lobar de la F5 de la columna flash anterior. Rdt columna = 94%.

Donat que no es podien separar per cromatografia les eremofortines **20** i **27**, l'eremofortina D (**27**) es va aïllar cristal·litzant la fracció F3 de la **Taula 122** en èter etílic. A partir de 600 mg es van obtenir, en dues cristal·litzacions successives, 60 mg d'eremofortina D (**27**).

- **Eremofortina D (27)**

Pf (èter dietílic): 202 - 203.5 °C (descriu 209 - 211 °C).<sup>159</sup>

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3345, 1732, 1245 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.24 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3), 3.83 (1H, d, J = 11 Hz, Ha12), 3.83 (1H, d, J = 11 Hz, Ha12), 3.46 (1H, dd, J = 4, 4.5 Hz, H2), 3.16 (1H, d, J = 4 Hz, H1), 2.29 (1H, d, J = 11 Hz, Ha9), 2.27 (1H, d, J = 4 Hz, H10), 2.13 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 1.92 (1H, d, J = 11 Hz, Hb9), 1.79 (1H, d, J = 13 Hz, Ha6), 1.65 (1H, q, J = 7 Hz, H4), 1.45 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>), 1.37 (1H, d, J = 13 Hz, Hb6), 1.16 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.8/s C16, 101.9/s C8, 71.3/d C3, 69.8/t C12, 68.3/s C11, 61.1/s C7, 57.5/d C1, 50.3/d C2, 44/d C4, 41.7/d C10, 38.4/s C5, 35.7/t C6, 34.4/t C9, 21/q C17, 15.6/q C15, 11.4/q C13, 9.8/q C14.

HETCOR <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz)-<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>): 71.2 (C3)-5.24 (H3), 69.8 (C12)-3.83 (H12), 57.5 (C1)-3.16 (H1), 50.3 (C2)-3.46 (H2), 44 (C4)-1.65 (H4), 41.7 (C10)-2.27 (H10), 35.7 (C6)-1.79 (Ha6) + 1.37 (Hb6), 34.4 (C9)- 2.29 (Ha9) + 1.92 (Hb9), 21 (C17)-2.13 (17-CH<sub>3</sub>), 15.6 (C15)-1.16 (15-CH<sub>3</sub>), 11.4 (C13)-1.45 (13-CH<sub>3</sub>), 9.8 (C14)-0.91 (14-CH<sub>3</sub>).

Per a poder identificar l'eremofortina C (**20**) es va sintetitzar l'acetat de l'eremofortina C (**30**) a partir de les aigües mare de cristal·lització de l'eremofortina D (**27**) ja que plaques de sílice impregnades amb nitrat de plata indicaven que contenien les dues eremofortines (**Taula 123**). A més es va sintetitzar **20** a partir de **19**.

	PR toxina (19)	Eremofortina C (20)	Eremofortina D (27)
Rf	0.61	0.39	0.34

**Taula 123.** Factors de retenció per als metabòlits produïts pel fong *P. roquefortii* per a plaques impregnades amb AgNO<sub>3</sub> i AcOEt:Cy (1:1, v/v) com a eluent.

### 3.6. Extracció i purificació d'eremofortina C (20)

Es realitza CCF (silicagel, AcOEt) de 16 fraccions procedents de separacions cromatogràfiques d'extractes dels cultius anteriors. S'escullen les que tenen eremofortina C (20). Se n'escullen quatre, d'una massa total de 825 mg, les quals s'agrupen i se'n duu a terme una separació per cromatografia flash emprant com a fase estacionària sílice impregnada amb nitrat de plata i com a eluent Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (2:2:1).

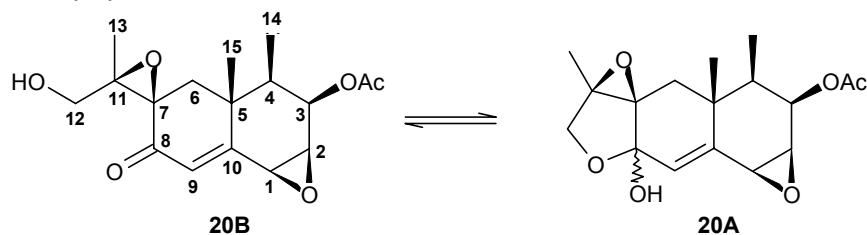
Les fraccions obtingudes es mostren a la **Taula 124**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	142	c.c.
F2	95	20 + Imp.
F3	359	20 (80%) + 27 (20%)*
F4	52	20 (55%) + 27 (45%)*
F5	11	20 (45%) + 27 (55%)*
F6	60	27 + Imp.
F7	13	c.c.

**Taula 124.** Cromatografia flash d'un cru que conté EC (20). \*La proporció dels productes es determina per comparació d'integrals relatives per <sup>1</sup>H-RMN. Rdt columna = 92%.

Les fraccions F3 i F4 s'empren en les transformacions químiques posteriors, per intentar sintetitzar PR toxina (19) a partir d'eremofortina C (20).

- **Eremofortina C (20)**



IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3448, 2970, 2935, 1735, 1679, 1374, 1244, 1026, 996, 895, 756 cm<sup>-1</sup>.

UV (EtOH): λ<sub>màx</sub> 248 nm, ε = 7419.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.39 (1H, s, H9, B), 5.99 (1H, s, H9, A), 5.23 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3, A), 5.14 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3, B), 4.05 (1H, d, J = 10.5 Hz, Ha12, B), 3.92 (2H, m, Hb12, A i B), 3.92 (1H, m, H2, B), 3.63 (1H, m, Ha12, A), 3.63 (1H, m, H2, A), 3.63 (2H, m, H1, A i B), 2.15 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>, B), 2.14 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>, A), 2.07 (1H, d, J = 15 Hz, Ha6, A ó B), 2.06 (1H, d, J = 15 Hz, Ha6, A ó B), 1.89 (1H, d, J = 15 Hz, Hb6, A ó B), 1.84 (1H, d, J = 15 Hz, Hb6, A ó B), 1.81-1.68 (2H, m, H4, A i B), 1.49 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.40 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.39 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.34 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.01 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>, B), 0.98 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>, A).

### 3.7. Cultiu 17

Del procés d'extracció realitzat sobre el cultiu 17 s'obtenen 1.253 g que es purifiquen per cromatografia flash emprant com a eluent una mescla Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (1:1:1, v/v/v). Les fraccions obtingudes es descriuen a la **Taula 125**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	44	c.c.
F2	532	19
F3	304	19 + imp.

**Taula 125.** Cromatografia flash del cultiu 17. Rdt columna = 70%.

La fracció F2 es recristal·litza d'èter etílic. S'obtenen 204 mg de PR toxina (**19**) recristal·litzada (Rdt. 38%).

### 3.8. Cultius 18-20

Es va dur a terme una separació per cromatografia flash dels extractes procedents dels cultius 18-20 on s'hi va afegir certes fraccions dels cultius 9, 15 i 16, tot i haver-se detectat per HPLC una concentració de PR toxina (**19**) inferior a 20 mg/l. Es va obtenir una fracció rica en PR toxina (**19**) de 1.71 g.

A continuació, es van agrupar aquests 1.71 g de **19** amb la fracció F3 del cultiu 17 (**Taula 125**) i es va realitzar una separació per cromatografia líquida de baixa pressió emprant com a eluent Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (2:1:1). Les fraccions obtingudes es mostren a la **Taula 126**.

La fracció F2 es recristal·litza d'èter etílic. S'obtenen 648 mg de PR toxina (**19**) (Rdt. 70%).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	102	Imp.
F2	930	<b>19</b>
F3	119	<b>19</b> + Imp.
F4	303	Imp.

**Taula 126.** Cromatografia líquida de baixa pressió d'una fracció rica en **19** procedent de la fracció F3 del cultiu 17, dels cultius 18-20 i fraccions dels cultius 9, 15 i 16. Rdt columna = 74%.

### 3.9. Cultius 21-25

Es va realitzar una columna flash (60 %) dels extractes procedents dels cultius 21-25 (63.74 g) emprant com a eluent Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (2:1:1). Es va obtenir una fracció rica en PR toxina (**19**) de 449 mg, una d'impura de 796 mg i una d'eremofortina C (**20**) impura de 701 mg (**Taula 127**).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	35810	Imp.
F2	449	<b>19</b>
F3	796	<b>19</b> + imp.
F4	701	<b>20</b> + imp.
F5	720	Imp.

**Taula 127.** Cromatografia flash dels cultius 21-25. Rdt columna = 60%.

### 3.10. Cultius 26-28

Es va realitzar una columna flash (80 %) dels extractes procedents dels cultius 26-28 (6.91 g) emprant com a eluent Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (2:1:1). Es va obtenir una fracció rica en PR toxina (**19**) de 657 mg, una d'impura de 1992 mg i una d'eremofortina C (**20**) impura de 188 mg (**Taula 128**).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	1942	<b>19</b> + imp.
F2	657	<b>19</b>
F3	50	<b>19</b> + imp.
F4	188	<b>20</b> + imp.
F5	2683	Imp.

**Taula 128.** Cromatografia flash dels cultius 26-28. Rdt columna = 80%.

S'agrupen les fraccions F2 (fraccions riques en PR toxina (**19**), 1105 mg) de les dues cromatografies anteriors (cultius 21-28) i es recristal·litzen d'èter etílic. S'obtenen 235 mg de PR toxina (**19**) (Rdt. 21%).

### 3.11. Cultius 29-30

Es va realitzar una columna flash (60 %) dels extractes procedents dels cultius 29 i 30 emprant com a eluent Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (2:1:1). Es va obtenir una fracció rica en PR toxina (**19**) de 449 mg, una d'impura de 796 mg i una d'eremofortina C (**20**) de 701 mg (**Taula 129**).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	449	<b>19</b>
F2	796	<b>19</b> + imp.
F3	701	<b>20</b> + imp.

**Taula 129.** Cromatografia flash dels cultius 29 i 30. Rdt columna = 60%.

## 4. Síntesi de l'acetat de l'eremofortina C (**30**)

Es dissolen 212 mg (0.66 mmol) de les aigües mare de cristal·lització, riques en eremofortina C (**20**), en 1 mL de piridina seca. S'afegeix 1 mL d'anhidrid acètic i s'agita la mescla durant 6 hores en atmosfera d'argó i protegit de la llum, a temperatura ambient.

Un cop finalitzada la reacció, s'elimina la piridina a pressió reduïda mitjançant adicions successives de toluè (4 x 2 mL + 2 x 1 mL). Es dissol el cru en 2 mL de AcOEt, s'extreu amb bicarbonat sòdic 5 % (3 x 3 mL) i, a continuació, es renta amb aigua fins que el seu pH sigui 7. Les fases aquoses s'extreuen amb AcOEt (2 x 3 mL cadascuna). Les fases orgàniques s'agrupen, s'assequen amb sulfat magnèsic anhidre i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

S'obtenen 224 mg (0.61 mmol, rdt. 93%) d'acetat d'eremofortina C (**30**). Posteriorment es recristal·litza en èter etílic (rdt. 37%), obtenint-se 82 mg.

- **Acetat d'eremofortina C (**30**)**

Pf (èter etílic): 121-122 °C (descriu 122-124 °C).<sup>153</sup>

UV (EtOH):  $\lambda_{\max}$  248 nm,  $\epsilon = 16319$  (descriu 16960).<sup>153</sup>

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 1743, 1706, 1675 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.42 (1H, s, H9), 5.14 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3), 4.56 (1H, d, J = 12 Hz, Ha12), 4.48 (1H, d, J = 12 Hz, Hb12), 3.91 (1H, dd, J = 3.5, 5 Hz, H2), 3.65 (1H, d, J = 3.5 Hz, H1), 2.15 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 2.14 (1H, d, J = 15 Hz, Ha6), 2.08 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 1.90 (1H, d, J = 15 Hz, Hb6), 1.78 (1H, m, J = 7 Hz, H4), 1.41 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>), 1.33 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>), 1.01 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 192.6/s C8, 170.5/s C16 ó C18, 170.4/s C16 ó C18, 161/s C10, 131.2/d C9, 69.9/d C3, 65.3/t C12, 64.1/s C11, 61.9/s C7, 55.8/d C1, 55.2/d C2, 42.3/d C4, 41.8/t C6, 37.3/s C5, 22.6/q C13, 20.8/q C17 ó C19, 20.8/q C17 ó C19, 16.4/q C15, 10.4/q C14.

HETCOR <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz)-<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>): 131.2 (C9)-6.42 (H9), 69.9 (C3)-5.14 (H3), 65.3 (C12)-4.56 (Ha12) + 4.48 (Hb12), 55.8 (C1)-3.65 (H1), 55.2 (C2)-3.91 (H2), 42.3 (C4)-1.78 (H4), 41.8 (C6)- 2.14 (Ha6) + 1.90 (Hb6), 22.6 (C13)-1.33 (13-CH<sub>3</sub>), 20.8 (C17)-2.15 (17-CH<sub>3</sub>), 20.8 (C19)-2.08 (19-CH<sub>3</sub>), 16.4 (C15)- 1.41 (15-CH<sub>3</sub>), 10.4 (C14)-1.01 (14-CH<sub>3</sub>).

### 5. Reducció de PR toxina (19) a eremofortina C (20)

Es dissolen 240 mg (0.75 mmol) de PR toxina (19) en 25 mL de metanol. S'afegeix 17 mg (0.45 mmol) de borohidruir sòdic dissolts en 15 mL de metanol i s'agita la dissolució resultant a -5 °C (gel/sal en proporció 9:1) durant 40 min.

S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obté 247 mg d'un cru que es purifica per cromatografia Lobar de tamany B (rdt. 66%), emprant com a eluent Cy:AcOEt en proporció 1:1 (v/v). S'obté 47 mg (0.15 mmol) d'eremofortina C (20) (rdt. 20%) i queden per reaccionar 93 mg de PR toxina (19) (grau de conversió del 61%).

- **Eremofortina C (20)**

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3456, 1735, 1679 cm<sup>-1</sup>.

UV (EtOH): λ<sub>max</sub> 248 nm, ε = 7419.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.39 (1H, s, H9, B), 5.99 (1H, s, H9, A), 5.23 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3, A), 5.14 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3, B), 4.05 (1H, d, J = 10.5 Hz, Ha12, B), 3.92 (2H, m, Hb12, A y B), 3.92 (1H, m, H2, B), 3.63 (1H, m, Ha12, A), 3.63 (1H, m, H2, A), 3.63 (2H, m, H1, A y B), 2.15 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>, B), 2.14 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>, A), 2.07 (1H, d, J = 15 Hz, Ha6, A ó B), 2.06 (1H, d, J = 15 Hz, Ha6, A ó B), 1.89 (1H, d, J = 15 Hz, Hb6, A ó B), 1.84 (1H, d, J = 15 Hz, Hb6, A ó B), 1.81-1.68 (2H, m, H4, A y B), 1.49 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.40 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.39 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.34 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>, A ó B), 1.01 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>, B), 0.98 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>, A).

### 6. Intent de síntesi de PR toxina (19) a partir d'eremofortina C (20)

Es dissolen 1.28 g (16.2 mmol) de py en 20.5 mL de DCM. Amb agitació magnètica s'hi addicionen 820 mg (8.2 mmol) d'anhídrid cròmic (CrO<sub>3</sub>). El sistema es manté en agitació durant 15 min en atmosfera inerta a temperatura ambient. A continuació, les fraccions F3 i F4 obtingudes en l'aïllament de EC (20) d'extractes del medi de cultiu del fong *Penicillium roquefortii*, que equivalen conjuntament a 315 mg (1.36 mmol) de EC (20) i a 86 mg (0.37 mmol) de ED (27) (puresa (p/p): 76%), es dissolen en 5 mL de DCM i s'addicionen a la solució del complex anhídrid cròmic – piridina. El sistema es manté en agitació a temperatura ambient sota atmosfera inerta durant 15 min.

A continuació, el medi de reacció es decanta i el sòlid romanent es renta amb 30 mL de Et<sub>2</sub>O. Tot seguit, les fases orgàniques obtingudes s'ajunten i es renten amb 3 x 15 mL de NaOH 5%, 3 x 15 mL HCl 5%, 30 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% i 15 mL de salmorra. La fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

S'obtenen 94 mg que corresponen a un cru complex que no s'investiga posteriorment.

## SÍNTESI D'ANÀLEGS DEL KM-01 (9)

### 1. Síntesi de PR alcohol (153)

#### A. KOH 0.02 N en metanol/aigua 4:1 (v/v)

Es dissolen 50 mg (0.16 mmol) de PR toxina (19) en 2.5 mL de dissolució d'hidròxid potàssic 0.02 N en metanol/aigua 4:1 (v/v) i s'agita a 40 °C durant 3 hores. Un cop finalitzada la reacció, s'elimina el metanol a pressió reduïda, s'afegeix 10 mL d'aigua i s'extreu amb cloroform (4x15 mL). S'agrupen les fases orgàniques, s'assequen i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es purifica per cromatografia preparativa (rdt. 66%) emprant com a eluent CHCl<sub>3</sub>:MeOH 96:4 (v/v).

S'obtenen 22 mg (0.08 mmol) de PR alcohol (153) (rdt. 50%) i 6 mg de PR toxina (19).

#### B. KOH 0.1 N en metanol/aigua 4:1 (v/v)

Es dissolen 5 mg (0.01 mmol) de PR toxina (19) en 0.3 mL de dissolució d'hidròxid potàssic 0.1 N en metanol/aigua 4:1 (v/v) i s'agita a 40 °C durant 1 hora. Per CCF s'observa un cru complex en el que es detecta el producte d'interès 153 però no s'investiga posteriorment.

#### C. KOH 0.05 N en metanol/aigua 4:1 (v/v)

Es dissolen 232 mg (0.73 mmol) de PR toxina (19) en 2.5 mL de dissolució d'hidròxid potàssic 0.05 N en metanol/aigua 4:1 (v/v) i s'agita a 40 °C durant 1 hora. Un cop finalitzada la reacció, s'elimina el metanol a pressió reduïda, s'afegeix 50 mL d'aigua i s'extreu amb cloroform (4x50 mL). S'agrupen les fases orgàniques, s'assequen i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 229 mg de PR alcohol (153) (rdt. 100%).

- **PR alcohol (153)**

Pf (èter etílic): 114-119 °C (descriu 113.5-115 °C).<sup>147</sup>

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3474, 2968, 2940, 2881, 1718, 1676, 1620, 1245, 1034, 978, 845, 759 cm<sup>-1</sup>

UV (EtOH): λ = 248 nm, ε = 16767. λ<sub>max</sub> = 228 nm, ε = 26902.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 9.71 (1H, s, CHO), 6.43 (1H, s, H9), 4.15 (1H, ddd, J = 5, 5, 9.5 Hz, H3), 3.93 (1H, dd, J = 3.5, 5 Hz, H2), 3.77 (1H, d, J = 3.5 Hz, H1), 2.11 (1H, d, J = 14 Hz, Ha6), 1.86 (1H, d, J = 14 Hz, Hb6), 1.78 (1H, d, J = 9.5 Hz, OH), 1.53 (1H, m, H4), 1.48 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>), 1.43 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>), 1.13 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 198.4/d C12, 191.5/s C8, 164.2/s C10, 130.1/d C9, 67.8/d C3, 67.4/s C7, 67.3/s C11, 58.4/d C1, 57.9/d C2, 44.9/d C4, 41.7/t C6, 38.2/s C5, 22.4/q C13, 13.8/q C15, 10.4/q C14.

#### D. KOH 0.02 N en metanol/aigua 4:1 (v/v)

Es dissolen 192 mg (0.60 mmol) de PR toxina (19) en 39 mL d'una dissolució d'hidròxid potàssic 0.02 N en MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 (v/v). El sistema es manté en agitació a 40 °C durant 1 h i 30 min. S'elimina el metanol a pressió reduïda, s'hi afegeixen 50 mL d'aigua i es realitzen extraccions amb cloroform (4x50 mL). La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 157 mg (0.56 mmol) de cristalls blancs que corresponen al PR alcohol (153) (rdt. 94 %).

### 2. Síntesi de PR-bq (152)

#### 2.1. Síntesi de l'àcid dendrifièlic A (bq)

##### 2.1.1. Síntesi de bromur de (3-metoxicarbonil-2-propenil)trifenilfosfoni (171)

Es dissolen 17.78 g (66.4 mmol) de trifenilfosfina 98% en 105 mL de toluè anhidre. S'hi addicionen, gota a

gota, 7.6 mL (11.389 g, 60.4 mmol) de 4-bromocrotonat de metil (**172**) 95% sota atmosfera inerta i en la foscor. El sistema es manté en agitació a t.a. durant 24 h. Els cristalls blancs obtinguts es filtren a pressió reduïda. Es renten amb 140 mL de toluè i posteriorment amb 20 mL de Cy. S'obtenen 26.150 g (59.3 mmol) de bromur de (3-metoxicarbonil-2-propenil)trifenilfosfoni (**171**) (rdt. 98 %).

- **Bromur de (3-metoxicarbonil-2-propenil)trifenilfosfoni (171)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.91-7.69 (15H, m,  $H_{ar}$ ), 6.80-6.68 (1H, m, H2), 6.50 (1H, dd, J = 4.5, 15.5 Hz, H3), 5.27 (2H, dd, J = 7.5, 16.5 Hz, H1), 3.67 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

### 2.1.2. Síntesi de (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenolat de metil (170)

Es dissolen 5.174 g (11.7 mmol) de bromur de (3-metoxicarbonil-2-propenil)trifenilfosfoni (**171**) en 268 mL d'aigua freda. S'hi addicionen, gota a gota, 27 mL de NaOH 2% (13.8 mmol). El sistema es manté en agitació a t.a. durant 12 h. El sòlid groc precipitat es filtra a pressió reduïda. Es renta amb aigua refredada amb gel.

S'obtenen 3.432 g (9.5 mmol) de (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenolat de metil (**170**) (rdt. 81%).

- **(*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenolat de metil (170)**

IR (film evap.  $\text{CHCl}_3$ ): 3053, 1972, 1918, 1828, 1733,  $1651\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.63-7.47 (15H, m,  $H_{ar}$ ), 6.40 (1H, ddd, J = 10, 14.5, 24 Hz, H2b), 5.50 (1H, dd, J = 14.5, 26 Hz, H1b), 5.14 (1H, d, J = 13.5 Hz, H3a), 4.55 (1H, dd, J = 3, 10 Hz, H3b), 3.75 (1H, dd, J = 14.5, 22.5 Hz, H1a), 3.66 (3H, s,  $\text{OCH}_3\text{b}$ ), 3.58 (3H, s,  $\text{OCH}_3\text{a}$ ).

La relació entre la forma transoide (**170b**) i la cisoide (**170a**) és 4.5:1.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 7.76-7.53 (15H, m,  $H_{ar}$ ), 6.99 (1H, ddd, J = 13, 14.5, 17.5 Hz, H2a), 6.17 (1H, ddd, J = 9.5, 14.5, 19.5 Hz, H2b), 5.24 (1H, dd, J = 14.5, 26.5 Hz, H1b), 4.85 (1H, d, J = 13 Hz, H3a), 4.31 (1H, dd, J = 3.5, 9.5 Hz, H3b), 3.87 (1H, dd, J = 14.5, 22 Hz, H1a), 3.42 (3H, s,  $\text{OCH}_3\text{b}$ ), 3.34 (3H, s,  $\text{OCH}_3\text{a}$ ).

La relació entre la forma transoide (**170b**) i la cisoide (**170a**) és 8:1.

### 2.1.3. Oxidació de 1-decanol (175) a capraldehid (176)

Adsorció de PCC sobre alúmina: Es dissolen 5 g (22.7 mmol) de PCC 98% en 25 mL d'acetona anhidra. S'hi afegixen 19.23 g d'alúmina. El sistema s'escalfa a ebullició. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. El sòlid obtingut es manté en la foscor a pressió reduïda.

A. Se suspenen 9.16 g de PCC suportat sobre alúmina (8.6 mmol) en 13 mL de DCM sec. S'hi addiciona, gota a gota, a 0 °C sota atmosfera inerta una dissolució de 0.81 g (5.1 mmol) de 1-decanol (**175**) en 8 mL de DCM. Es deixa evolucionar el sistema fins a t.a. 3 h i 30 min amb agitació. El contingut del baló es filtra sobre un coixí de florissil. Es renta amb 120 mL de DCM. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 0.86 g d'un oli incolor que s'identifica per  $^1\text{H-RMN}$  com a mescla d'àcid càpric (**176**), capraldehid (**176**) i 1-decanol (**175**) en una proporció de 24:18:1.

IR (film evap.  $\text{CHCl}_3$ ): 3580-2320, 2700,  $1720\text{cm}^{-1}$

En la mescla es va aconseguir identificar àcid càpric (**176**), capraldehid (**176**) i 1-decanol (**175**).

- **Àcid càpric (176)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.35 (2H, t, J = 7.5 Hz, H2), 1.63 (2H, m, H3), 1.27 (12H, m, H4-H9), 0.88 (3H, t, J = 6.5 Hz, H10).

- **Capraldehid (176)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.77 (1H, t, J = 2 Hz, CHO), 2.42 (2H, dt, J = 2, 7.5 Hz, H2), 1.63 (2H, m, H3), 1.27 (12H, m, H4-H9), 0.88 (3H, t, J = 6.5 Hz, H10).

- **1-decanol (175)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3.64 (2H, t, J = 7 Hz, H1), 1.70 (1H, s, OH), 1.57 (2H, m, H2), 1.27 (14H, m, H3-H9), 0.88 (3H, t, J = 6.5 Hz, H10).

B. Se suspenen 4.60 g de PCC suportat sobre alúmina (Síntesi 2.1.3.1) (4.3 mmol) en 6.5 mL de DCM sec. S'hi addiciona, gota a gota, a 0 °C sota atmosfera inerta una dissolució de 0.41 g (2.6 mmol) de 1-decanol (**175**) en 4 mL de DCM. Es deixa evolucionar el sistema fins a t.a. 50 min amb agitació. El contingut del baló es filtra sobre un coixí de florisil. Es renta amb 80 mL de DCM. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 0.31 g d'un oli que s'identifica per  $^1\text{H-RMN}$  com a mescla de capraldehid (**176**) i 1-decanol (**175**) en una proporció de 9:1, respectivament.

IR (film evap.  $\text{CHCl}_3$ ): 3700-3250, 2700, 1725  $\text{cm}^{-1}$

#### 2.1.4. Síntesi de (S)-2-metilbutiraldehid (164)

A. Se suspenen 3.396 g (15.4 mmol) de PCC 98% i 3.453 g de sílice en 27 mL de DCM sec. Amb agitació forta, s'hi addicionen a 0 °C 1.214 g (13.6 mmol) de (S)-2-metilbutanol (**163**) 99 % dissolts en 6 mL de DCM. Es deixa evolucionar el sistema fins a t.a. 3 h amb agitació. El contingut del baló es filtra sobre un coixí de florisil. Es renta amb 12 mL de DCM. La dissolució obtinguda (dissolució 1) s'empra en el següent pas de síntesi sense cap tractament posterior.

B. Se suspenen 9.16 g de PCC suportat sobre alúmina (8.6 mmol) (síntesi 2.1.3.1) en 13 mL de DCM sec. S'hi addiciona, gota a gota, a 0 °C sota atmosfera inerta una dissolució de 462 mg (5.2 mmol) de (S)-2-metilbutanol (**163**) 99% en 8 mL de DCM. Es deixa evolucionar el sistema fins a t.a. amb agitació. La reacció es monitoritza per CG (dissolució 2).

#### Determinació de la temperatura de forn:

Per determinar la temperatura de forn de treball es preparen 3 dissolucions:

1. Una dissolució 0.25 M de **163** en diclorometà.
2. Una dissolució 0.25 M de ( $\pm$ )-2-metilbutiraldehid (**177**) en diclorometà.
3. Una dissolució de 0.25 M de **163** i 0.25 M de **177** en diclorometà.

Les tres dissolucions preparades s'injecten en l'equip de CG i amb les condicions cromatogràfiques descrites a la pàgina 258 a dues temperatures de forn diferents, 40 °C i 50 °C. Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 130**.

Temperatura forn/ °C	$t_R$ ( <b>177</b> )	$t_R$ ( <b>163</b> )
40	1.624	2.384
50	1.953	3.124

**Taula 130.** Temps de retenció de (S)-2-metilbutiraldehid (**164**) segons la temperatura de forn.

#### Recta de calibrat:

Per tal de realitzar determinacions quantitatives de (S)-2-metilbutanol (**163**) i de ( $\pm$ )-2-metilbutiraldehid (**177**) en el seguiment de la reacció d'oxidació de **163** a **164** es realitza una recta patró de **163** i una de **177**, la mescla racèmica de **164**.



Es dissolen 221 mg (2.51 mmol) de **163** i 213 mg (2.47 mmol) de **177** en 25 de DCM sec. A partir d'aquesta dissolució s'obtenen quatre dissolucions més per quatre dilucions 1:3 successives. Cada una d'elles s'injecta tres vegades (Taula 131). La recta patró de **163** i de **177** es presenta en la Figura 239.

$$[\mathbf{163}] \text{ (mM)} = 1.323 \cdot 10^{-2} \cdot \text{Àrea} - 0.8025$$

$$R^2 = 0.9995$$

$$[\mathbf{177}] \text{ (mM)} = 1.693 \cdot 10^{-2} \cdot \text{Àrea} - 0.8466$$

$$R^2 = 0.9994$$

Patró	[163]/mM	Àrea	[177]/mM	Àrea
1	100.3	7603	98.9	5863
2	33.4	2683	33.0	2082
3	11.1	937	11.0	698
4	3.7	305	3.7	251
5	1.2	97	1.2	84

Taula 131. Concentracions i àrees dels patrons per a la recta de calibrat.

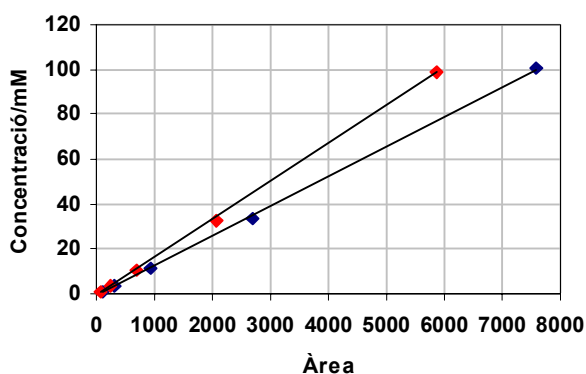


Figura 239. Rectes de calibrat de **163**, en roig, i **177**, en blau.

#### Monitorització de la síntesi de (S)-2-metilbutiraldehid (**164**):

La progressió de la reacció es monitoritza per CG. Per la presa de mostra, amb una xeringa s'agafa 1 mL homogeni del medi de reacció i aquest s'enrasa fins a 5 mL amb diclorometà. El sòlid que s'ha arrossegat en la presa de mostra es deixa decantar i la dissolució sobrenedant s'injecta al cromatògraf. A la Taula 132 es mostren les àrees obtingudes en els cromatogrames i el càlcul de conversió realitzat en funció del temps. A la Figura 240 s'il·lustren els resultats obtinguts.

Temps/min	[164]/mM	[163]/mM	Conversió/%
2	154	96	62
30	163	58	74
60	170	40	81
90	177	32	85
122	190	32	86
152	194	26	88
179	191	23	89
208	196	21	91
240	198	18	92

Taula 132. Concentració de **164** i **163** en el medi de reacció.

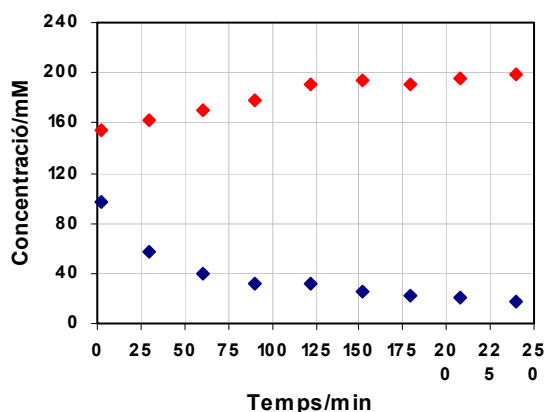


Figura 240. Concentració de **164**, en roig, i **163**, en blau, en el medi de reacció.

### 2.1.5. Síntesi de dendrifielat A de metil (**168**)

A. Sobre la dissolució de **164** en DCM obtinguda a la pàgina 290 (dissolució 1) s'afegeixen 3.432 g (9,5 mmol) de (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenoat de metil (**170**). El sistema es manté en agitació a t.a. durant 14 h i 15 min. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 5.69 g d'un oli taronja que es purifica per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (95:1 v/v). Les fraccions obtingudes es descriuen a la **Taula 133**.

Fracció	Massa/g	Productes
F1	0.031	Imp.
F2	0.052	Trifenilfosfina + <b>168</b> + <b>169</b> + <b>185</b>
F3	0.924	Trifenilfosfina + <b>168</b> + <b>169</b> + <b>185</b> + Imp.
F4	0.211	<b>168</b>
F5	0.271	Imp.
F6	1.799	Òxid de trifenilfosfina
F7	0.199	Imp.

**Taula 133.** Cromatografia flash del cru obtingut en la síntesi del dendrifielat A de metil (**168**). Rdt. Columna: 61%.

La fracció F3 es purifica per cromatografia Lobar (columna tipus B) fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (30:1 v/v). Les fraccions obtingudes es mostren a la .

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	36	Imp.
F2	29	Trifenilfosfina
F3	75	Trifenilfosfina + <b>185</b> + Imp.
F4	89	<b>185</b> + Imp.
F5	25	<b>185</b> + <b>169</b> + Imp.
F6	170	<b>169</b> + <b>185</b>
F7	79	<b>168</b> + <b>169</b>
F8	62	<b>168</b>

**Taula 134.** Cromatografia Lobar de la fracció F3 de l'anterior columna flash. Rdt. Columna: 65%.

S'obtenen 0.273 g (1.6 mmol) d'un oli incolor que correspon a dendrifielat A de metil (**168**). El rendiment obtingut partint del fosforà i després de tres separacions cromatogràfiques és del 17%.

B. Sobre la dissolució de **164** en DCM obtinguda a la pàgina 290 (dissolució 2) s'addiciona una dissolució de

11.00 g (30.5 mmol) de (*E*)-4-trifenilfosforaniliden-2-butenolat de metil (**170**) dissolt en 52 mL de DCM anhidre sota atmosfera inerta. El sistema es manté en agitació a t.a. durant 12 h i 15 min. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 24.84 g d'un oli taronja que s'elueix per una columna empaquetada amb uns 50 g de silicagel (diàmetre de partícula 35 – 70 µm) fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (95:1 v/v).

L'oli incolor obtingut es purifica per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (95:1 v/v). Les fraccions obtingudes es descriuen a la **Taula 135**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	18	Trifenilfosfina
F2	151	Trifenilfosfina + <b>185</b> + Imp.
F3	230	Trifenilfosfina + <b>185</b> + <b>169</b> + Imp.
F4	794	Trifenilfosfina + <b>168</b> + <b>169</b> + <b>185</b> + Imp.
F5	341	<b>168</b>
F6	224	Imp.

**Taula 135.** Cromatografia flash del cru obtingut en la síntesi del dendrifielat A de metil (**168**). Rdt. Columna: 31%.

La fracció F4 es purifica per cromatografia Lobar (columna tipus B) fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (30:1 v/v). Les fraccions obtingudes es mostren a la **Taula 136**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	155	Trifenilfosfina + Imp.
F2	90	Imp. + <b>185</b>
F3	79	Imp. + <b>185</b> + <b>169</b>
F4	137	<b>185</b> + <b>169</b>
F5	205	<b>168</b> + <b>169</b>

**Taula 136.** Cromatografia Lobar de la fracció F4 de l'anterior columna flash. Rdt. Columna: 84%.

La fracció F5 es purifica per cromatografia Lobar (columna tipus B) fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (30:1 v/v). Les fraccions obtingudes es mostren a la **Taula 137**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	2	Imp.
F2	28	<b>169</b>
F3	78	<b>168</b> + <b>169</b>
F4	56	<b>168</b>

**Taula 137.** Cromatografia Lobar de la fracció F4 de l'anterior columna flash. Rdt. Columna: 81%.

S'obtenen 397 mg (2.4 mmol) d'un oli incolor que correspon a dendrifielat A de metil (**168**). El rendiment obtingut partint del fosforà i després de tres separacions cromatogràfiques és del 8%.

- **Dendrifielat A de metil (168)**

$$[\alpha]_D^{20} = +46.60^\circ \text{ (c = 0.3, CHCl}_3\text{)} \text{ (descriu } +52.8^\circ \text{, c = 0.3, CHCl}_3\text{)}^{135}$$

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 2963, 2929, 2875, 1722, 1644, 1306, 1262, 1241, 1229, 1146, 1001 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.27 (1H, dd, J = 10.5, 15.5 Hz, H3), 6.14 (1H, dd, J = 10.5, 15 Hz, H4), 6.01 (1H, dd, J = 7.5, 15 Hz, H5), 5.80 (1H, d, J = 15.5 Hz, H2), 3.74 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 2.17 (1H, m, H6), 1.37 (2H, dq, J = 7.5, 7.5 Hz, H7), 1.03 (3H, d, J = 7 Hz, 6-CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, t, J = 7.5 Hz, H8).

- **(2Z,4E,6S)-6-metil-2,4-octadienoat de metil (169)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.60 (1H, dd, J = 12, 15.5 Hz, H3), 6.09 (1H, dd, J=11, 12 Hz, H4), 5.87 (1H, d, J=15.5 Hz, H2), 5.62 (1H, dd, J=10.5, 11 Hz, H5), 3.75 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 2.68 (1H, m, H6), 1.40 (2H, m, H7), 1.00 (3H, d, J = 7 Hz, 6- $\text{CH}_3$ ), 0.85 (3H, t, J = 7.5 Hz, H8).

- **(4S,2Z)-4-metil-2-vinil-2-hexenoat de metil (185)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6.52 (1H, d, J = 11 Hz, H3), 6.49 (1H, ddd, J = 0.5, 11.5, 18, H1'), 5.62 (1H, dd, J = 2, 18 Hz, H2'cis), 5.37 (1H, ddd, J = 1, 2, 11.5, H2'trans), 3.79 (1H, s,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 2.64 (1H, m, H4), 1.44 (2H, m, H5), 1.05 (3H, d, J = 6.5 Hz, 4- $\text{CH}_3$ ), 0.89 (3H, t, J = 7.5 Hz, H6).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{C}_6\text{D}_6$ ): 6.49 (1H, d, J = 10.5 Hz, H3), 6.45 (1H, ddd, J = 0.5, 11.5, 17.5, H1'), 5.61 (1H, ddd, J = 0.5, 2, 17.5 Hz, H2'cis), 5.32 (1H, ddd, J = 1, 2, 11.5, H2'trans).

### 2.1.6. Síntesi de sorbat de metil (186)

Es dissolen 8.98 g d'àcid sòrbic (**187**) 99% (79.3 mmol) en 150 mL de MeOH. S'hi afegeixen 3 g d'àcid sulfúric 96% (29.4 mmol). El sistema s'escalfa a reflux durant 48 h. A continuació, el cru de reacció es neutralitza amb una dissolució saturada de bicarbonat sòdic (fins que cessa l'efervescència) i s'hi afegeixen 150 mL d'una dissolució saturada de clorur sòdic. Es realitzen extraccions amb acetat d'etil (3 x 400 mL). La fase orgànica resultant s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 9.69 g d'un oli que correspon a sorbat de metil (**186**) (76.8 mmol) (rdt. 97 %).

- **Sorbat de metil (186)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.26 (1H, dd, J = 10.5, 14.5 Hz, H3), 6.20 (1H, dd, J = 9, 15.5 Hz, ), 6.11 (1H, dd, J = 6.5, 15 Hz, H5 ), 5.78 (1H, d, J = 15.5 Hz), 3.74 (3H, s, O- $\text{CH}_3$ ), 1.86 (3H, d, J = 5.5 Hz, H6).

### 2.1.7. Síntesi d'àcid sòrbic (187)

A. Es dissolen 1.02 g (8.1 mmol) de sorbat de metil (**186**) en 160 mL de KOH/MeOH 3%. El sistema es manté en agitació durant 4 hores a 50 °C. Es realitzen extraccions amb DCM (3 x 300 mL). La fase orgànica resultant s'asseca amb 300 mL de salmorra i amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 56 mg (0.5 mmol) d'àcid sòrbic (**187**) impurificat. Per altra banda, la fase aquosa resultant de les extraccions es neutralitza amb àcid clorhídric concentrat i se'n realitzen extraccions amb DCM (3 x 300 mL). La fase orgànica resultant es renta amb 300 mL de salmorra i s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 632 mg de sorbat de metil (**186**) impurificat (5 mmol).

B. Es dissolen 1.00 g de sorbat de metil (**186**) (8.0 mmol) en 160 mL de KOH/MeOH 3%. El sistema es manté en agitació durant 4 hores a 50 °C. La dissolució es neutralitza amb 4.9 mL d'àcid acètic glacial. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. L'oli viscos resultant s'aplica sobre una columna empaquetada amb uns 50 g de silicagel i s'elueix emprant com a eluent EtOH. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda de la dissolució resultant. S'obtenen 385 mg d'un oli que correspon a una mescla de sorbat de metil (**186**) i àcid sòrbic (**187**) impurificats.

C. Es dissolen 0.99 g (7.8 mmol) de sorbat de metil (**186**) en una mescla formada per 17 mL de MeOH, 17 mL de THF i 17 mL de NaOH 1N. El sistema es manté en agitació a temperatura ambient durant 12 h. La dissolució es neutralitza amb una dissolució de HCl 10% fins a pH = 3. Es realitzen extraccions amb AcOEt (5 x 30 mL AcOEt). La fase orgànica resultant es renta amb 200 mL d'aigua desionitzada i amb 200 mL de salmorra. S'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 819 mg de cristalls blancs que corresponen a àcid sòrbic (**187**) (rdt. 93 %).

- **Àcid sòrbic (187)**

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3400-2100, 1695, 1678, 1637, 1264, 999 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.39-7.30 (1H, m, H5), 6.28-6.13 (1H, m, H3), 6.28-6.13 (1H, m, H4), 5.78 (1H, d, J = 15.5 Hz, H2), 1.88 (1H, d, J = 5 Hz, H6).

### 2.1.8. Hidròlisi del dendrifielat A de metil (168)

Es dissolen 393 mg (2.4 mmol) de dendrifielat A de metil (**168**) en una mescla formada per 5 mL de MeOH, 5 mL de THF i 5 mL de NaOH 1N (5 mmol). El sistema es manté en agitació a t.a. durant 13 h. La dissolució es neutralitza amb una dissolució de HCl 10% fins a pH = 3. Es realitzen extraccions amb AcOEt (5x10 mL AcOEt). La fase orgànica resultant es renta amb 50 mL d'aigua desionitzada i amb 50 mL de salmorra. S'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 357 mg d'un oli incolor que correspon a àcid dendrifièlic A (**bq**) (2.3 mmol) (rdt. 98 %).

- **Àcid dendrifièlic A (bq)**

$[\alpha]_D^{20} = +40.4^\circ$  (c = 0.17, EtOH) (descrit +52.2°, c = 0.17, EtOH 95%)<sup>293</sup>

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3600-2300, 1680, 1630, 1610, 1450, 1410, 1300, 1270, 1150, 950 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.35 (1H, dd, J = 10.5, 15 Hz, H3), 6.18 (1H, dd, J = 10.5, 15.5 Hz, H4), 6.07 (1 H, dd, J = 7.5, 15 Hz, H5), 5.80 (1H, d, J = 15.5 Hz, H2), 2.19 (1H, m, H6), 1.38 (2H, dq, J = 7.5, 7.5, H7), 1.04 (3H, d, J = 7 Hz, 9-CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, t, J = 7.5, H8).

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 172.4/s C1, 151.5/d C5, 147.6/d C3, 126.5/d C4, 118.2/d C2, 38.9/d C6, 29.3/t C7, 19.5/q C6-CH<sub>3</sub>, 11.8/q C8.

HETCOR <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C-RMN (75.5. MHz)-<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>): 151.1 (C5)-6.07 (H5), 147.6 (C3)-7.35 (H3), 126.5 (C4)-6.18 (H4), 118.2 (C2)- 5.80 (H2), 38.9 (C6)- 2.19 (H6), 29.3 (C7)- 1.38 (H7), 19.5 (C9)- 1.04 (9-CH<sub>3</sub>), 11.8 (C8)- 0.88 (H8).

### 2.2. Esterificació del PR alcohol (153) i l'àcid dendrifièlic A (bq)

Es dissolen 142 mg (0.92 mmol) d'àcid dendrifièlic A (**bq**) en 5.5 mL de THF sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 130 µl de TEA (0.92 mmol) i, a continuació, 150 µl de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil 97% (0.92 mmol). El sistema es manté en agitació a temperatura ambient durant 1 h. El sòlid blanc que ha precipitat es filtra a pressió reduïda. El dissolvent de la dissolució resultant s'elimina a pressió reduïda. L'oli incolor obtingut es dissol sota atmosfera inerta en 2.75 mL de toluè sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 4 mL d'una dissolució de 194 mg (1.59 mmol) de DMAP i 212 mg (0.76 mmol) de PR-alcohol (**153**) en toluè. El sistema es manté en agitació a temperatura ambient sota atmosfera inerta durant 4 h. El cru de reacció es dilueix amb 20 mL d'èter etílic. Aquesta fase orgànica es renta successivament 3 vegades amb 30 mL d'una dissolució aquosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl, 3 vegades amb 30 mL d'aigua, 3 vegades amb 30 mL d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, amb 30 mL d'aigua i amb 30 mL de salmorra. S'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

S'obtenen 134 mg d'un oli incolor que s'elueix per una columna empaquetada amb uns 5 g de sílice (diàmetre de partícula 70 – 200 µm) fent servir com a eluents AcOEt i posteriorment acetona.

S'obtenen 130 mg d'un oli incolor que es purifica per cromatografia Lobar (columna tipus B) de fase normal fent servir com a eluent una mescla Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (3:3:1). Les fraccions obtingudes es descriuen a la **Taula 138**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	28	Imp.
F2	14	<b>152</b> + imp.
F3	31	<b>152</b>
F4	34	Imp.

**Taula 138.** Cromatografia Lobar del cru de reacció de la síntesi de PR-bq (**152**). Rdt. Columna: 84%.

La fracció F3 s'intenta recristal·litzar sense èxit de Et<sub>2</sub>O.

La fracció F3 i 3 mg de la fracció F2 es purifiquen per cromatografia Lobar (columna tipus A) de fase normal fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (4:1). S'obtenen 7 mg de **152** i 13 mg de **152** impur.

S'obté així el PR-01 (**152**) en varies fraccions que equivalen a 31 mg (0.075 mmol) (rdt. 10%).

- **PR-bq (152)**

UV-vis (MeOH):  $\lambda_{\max} = 264 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 11433 \text{ M}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$ .

$[\alpha]_D^{20} = +377.78^\circ$  (c = 0.3, MeOH).

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 1715, 1679, 1640, 1258, 1141 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 9.71 (1H, s, CHO), 7.30 (1H, dd, J = 10.5, 15.5 Hz, H3'), 6.43 (1H, s, H9), 6.18 (1H, dd, J = 10.5, 15 Hz, H4'), 6.05 (1 H, dd, J = 7.5, 15 Hz, H5'), 5.87 (1H, d, J = 15.5 Hz, H2'), 5.25 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3), 3.98 (1H, dd, J = 3.5, 5 Hz, H2), 3.65 (1H, d, J = 3.5 Hz, H1), 2.19 (1H, m, H6'), 2.11 (1H, d, J = 14 Hz, H6a), 1.84 (1H, d, J = 14 Hz, H6b), 1.82 (1H, m, H4), 1.49 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>), 1.49 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>), 1.38 (2H, dq, J = 7.5, 7.5, H7'), 1.04 (3H, d, J = 6.5 Hz, 9'-CH<sub>3</sub>), 1.03 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, t, J = 7.5, H8').

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 198.4/d C12, 191.4/s C8, 166.5/s C1', 164.6/s C10, 151.1/d C5', 146.3/d C3', 129.8/d C9, 126.5/d C4', 118.2/d C2', 69.4/d C3, 67.4/s C7, 67.4/s C11, 55.9/d C1, 55.8/d C2, 43.2/d C4, 41.6/t C6, 38.9/d C6', 38.2/s C5, 29.3/t C7', 22.0/q C13, 19.6/q C9', 13.8/q C15, 11.8/q C8', 10.3/q C14.

HETCOR <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C-RMN (75.5. MHz)-<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz), CDCl<sub>3</sub>): 198.4 (C12)-9.71(CHO), 151.1 (C5')-6.05 (H5'), 146.3 (C3')-7.30 (H3'), 129.8 (C9)-6.43 (H9), 126.5 (C4')-6.18 (H4'), 118.2 (C2')-5.87 (H2'), 69.4 (C3)- 5.25 (H3), 55.9 (C1)- 3.65 (H1), 55.5 (C2)- 3.98 (H2), 43.2 (C4)- 1.82 (H4), 41.6 (C6)- 2.11 (H6a) + 1.84 (H6b), 38.9 (C6')- 2.19 (H6'), 29.3 (C7')- 1.38 (H7'), 22.0 (C13)- 1.49 (13-CH<sub>3</sub>), 19.6 (C9')- 1.04 (9'-CH<sub>3</sub>), 13.8 (C15)- 1.49 (15-CH<sub>3</sub>), 11.8 (C8')- 0.88 (H8'), 10.3 (C14)- 1.02 (14-CH<sub>3</sub>).

EM-AR: trobat 415.2119 [M+1]<sup>+</sup>, (calculat 415.4815, C<sub>29</sub>H<sub>51</sub>O<sub>4</sub>N).

EM-IQ: 415 ([M+1]<sup>+</sup>, 100), 107 (85), 80 (76), 25 (31), 16 (178).

### 3. Síntesi de PR-ad (160)

#### 3.1. Protecció de l'àcid (S)-3-hidroxibutíric (ad)

##### 3.1.1. Protecció via acetat

Es dissolen 915 mg (8.8 mmols) d'àcid (S)-3-hidroxibutíric (**ad**) en 4 mL de piridina seca. S'afegeixen 4 mL d'anhidrid acètic i 340 mg de N-pirrolidinpiridina mantenint-se en agitació durant 6 hores a temperatura ambient, atmosfera d'argó i protegit de la llum.

Un cop finalitzada la reacció, s'elimina la piridina a pressió reduïda mitjançant successives addicions de toluè (4 x 2 mL + 2 x 1 mL). S'obté 1.65 g d'un cru que se sotmet a una primera separació per cromatografia flash emprant com eluent cloroform:acetat d'etil en proporció 3:1 (v/v) on s'aconsegueix aïllar la 4-pirrolidinpiridina del cru. Posteriorment, es realitza una segona separació en una columna Lobar de tamany B (rdt. 93%) obtenint-se diferents fraccions, totes elles mescles de compostos. El majoritari d'aquests és l'àcid crotònic (**193**) impurificat amb àcid acètic i producte de partida en petita proporció.

- **Àcid crotònic (193)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.09 (1H, m, J = 7 Hz, H3), 5.86 (1H, dq, J = 15, 2 Hz, H2), 1.92 (3H, dd, J = 7, 2 Hz, 4- $\text{CH}_3$ )

### 3.1.2. Protecció amb p-metoxibenzil (MPM)

#### Primera etapa: síntesi del tricloroacetimidat de MPM (**198**)

Se suspenen 50 mg (2.1 mmol) d'hidrur sòdic en 2 mL d'èter etílic anhidre i s'afegeix, gota a gota, una dissolució de 2.9 g (21 mmol) d'alcohol p-metoxibenzílic (MPMOH) en 8 mL d'èter etílic. La mescla s'agita a temperatura ambient i en atmosfera d'argó durant 20 minuts. Es refreda la mescla a 0 °C i s'afegeix, gota a gota, 4.2 mL (20 mmol) de tricloroacetnitril durant 15 minuts. Seguidament, la mescla es deixa reaccionar a 20 °C durant 1 hora i 30 minuts.

Un cop finalitzada la reacció, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'afegeix pentà (2 mL) i metanol anhidre (0.1 mL), que provoca la precipitació d'un sòlid marró (MPMONa) que s'elimina per filtració. Finalment, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda per rendir 5.38 g (19 mmol) de tricloroacetimidat de MPM (**198**) amb un rendiment del 95%.

- **Tricloroacetimidat de MPM (198)**

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.37 (1H, s, NH), 7.38 (2H, d, J = 9 Hz,  $H_{ar}$ (2,6)), 6.92 (2H, d, J = 9 Hz,  $H_{ar}$ (3,5)), 5.28 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 3.83 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

#### Segona etapa: protecció del grup hidroxil

Es dissolen 960 mg (7.2 mmol) de (S)-3-hidroxi-butirat d'etil (**200**) en 7 mL de clorur de metilè i s'afegeixen, en agitació, 4.07 g (14.4 mmol) de tricloroacetimidat de MPM (**198**), 14 mL de ciclohexà i 167 mg (0.72 mmol) de ( $\pm$ )-àcid-10-canforsulfònic. Es deixa reaccionar a 20 °C, en agitació, durant 30 hores. El cru de reacció es filtra per a eliminar la tricloroacetamida formada i el filtrat s'extreu amb 3 x 30 mL de dissolució saturada de bicarbonat sòdic i amb 3 x 30 mL d'aigua. La fase orgànica se seca, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 2.75 g d'un oli que es purifica per cromatografia flash tot i que, abans de realitzar la separació, cristal·litza un sòlid blanc (198 mg) que conté, com a producte majoritari, N-(p-metoxi)benziloxitricloroacetamida (**230**).

Finalment, 2.5 g de l'oli obtingut es purifiquen per cromatografia flash utilitzant com a eluent ciclohexà:èter diisopropílic en proporció 5:1 (v/v), obtenint-se les fraccions de la **Taula 139**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	270	c.c.
F2	208	<b>230</b>
F3	1068	<b>199</b>
F4	482	<b>199</b> impur
F5	280	c.c.

**Taula 139.** Cromatografia flash del cru de la síntesi de (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutirat d'etil (**199**). Rdt. Columna: 92%.

S'obtenen 1.07 g (4.2 mmol) (rdt. 59%) d'un producte líquid que s'identifica com (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutirat d'etil (**199**).

- **(S)-3-(p-metoxi)benziloxibutirat d'etil (199)**

IR (film evap.  $\text{CHCl}_3$ ): 1725  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.25 (2H, d, J = 9 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$  (2,6)), 6.88 (2H, d, J = 9 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ (3,5)), 4.50 (1H, d, J = 11.5 Hz,  $\text{CH}_{2\text{a-Ar}}$ ), 4.41 (1H, d, J = 11.5 Hz,  $\text{CH}_{2\text{b-Ar}}$ ), 4.09 (2H, q, J = 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.95 (1H, m, J = 6 Hz, H3), 3.78 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 2.54 (1H, dd, J = 7.5, 15 Hz, H2a), 2.41 (1H, dd, J = 6, 15 Hz, H2b), 1.21 (3H, d, J = 6 Hz, 4- $\text{CH}_3$ ), 1.20 (3H, t, J = 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ).

**Tercera etapa: saponificació del (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutirat d'etil (199)**

Es suspenen 990 mg (3.92 mmol) de (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutirat d'etil (199) en 3 mL de metanol/aigua 3:1 (v/v), es refreda a 0 °C i s'afegeixen 420 mg (10 mmol) d'hidròxid de liti monohidratat. Es deixa reaccionar a temperatura ambient, en agitació, durant tres hores i mitja.

Un cop finalitzada la reacció, s'elimina el metanol i l'etanol alliberat a pressió reduïda. A continuació, s'acidula el cru fins a pH = 1 amb una dissolució d'àcid clorhídric 6 N, se satura amb clorur sòdic i s'extreu amb 3 x 50 mL d'acetat d'etil. S'agrupen les fases orgàniques, se sequen, es filtren i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda obtenint-se 900 mg d'un oli que es purifica per cromatografia flash (rdt. 97%) utilitzant com a eluent ciclohexà:acetat d'etil en proporció 3:1 (v/v). S'obtenen 715 mg (3.19 mmol) d'àcid (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutíric (201) (rdt. 81%).

- **Àcid (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutíric (201)**

IR (film evap.  $\text{CHCl}_3$ ): 2960, 1705  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.25 (2H, d, J = 9 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ (2,6)), 6.87 (2H, d, J = 9 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ (3,5)), 4.55 (1H, d, J = 11 Hz,  $\text{CH}_{2\text{a-Ar}}$ ), 4.45 (1H, d, J = 11 Hz,  $\text{CH}_{2\text{b-Ar}}$ ), 3.99 (2H, m, J = 7 Hz, H3), 3.79 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 2.65 (1H, dd, J = 7, 15 Hz, H2a), 2.50 (1H, dd, J = 5.5, 15 Hz, H2b), 1.28 (3H, d, J = 6 Hz, 4- $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 175.5/s C1, 159.1/s C4<sub>ar</sub>, 129.8/s C1<sub>ar</sub>, 129.3/d C2,6<sub>ar</sub>, 113.8/d C3,5<sub>ar</sub>, 71.2/d C3, 70.6/t  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ , 55.3/q  $\text{CH}_3\text{O}$ , 41.6/t C2, 19.7/q C4.

### 3.2. Esterificació del PR alcohol (153) i l'àcid (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutíric (201)

Es dissolen 194 mg (0.87 mM) d'àcid (S)-3-(p-metoxi)benziloxibutíric (201) en 5 mL de tetrahidrofurà anhidre, s'afegeixen 0.12 mL (0.87 mM) de trietilamina seca i 0.14 mL (0.87 mM) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoïl. Es deixa reaccionar a temperatura ambient, sota atmosfera d'argó durant 40 minuts. S'elimina el clorhidrat de trietilamina per filtració, es renta el sòlid amb THF i s'elimina el dissolvent del filtrat a pressió reduïda. El residu obtingut es dissol en 3.2 mL de clorur de metilè anhidre i s'afegeixen 200 mg (0.72 mM) de PR alcohol (153) y 217 mg (1.7 mM) de N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP) dissolts en 3.2 mL de clorur de metilè anhidre. La mescla es deixa reaccionar durant dues hores, a temperatura ambient sota atmosfera d'argó.

Un cop finalitzada la reacció, s'afegeixen 20 mL de clorur de metilè i aquesta fase orgànica s'extreu amb 3 x 30 mL de dissolució saturada de clorur amònic, 3 x 30 mL d'aigua, el mateix volum de bicarbonat sòdic saturat, aigua i clorur sòdic saturat. La fase orgànica se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda obtenint-se 384 mg d'un cru que se sotmet a un procés de separació per cromatografia flash (rdt. 71%). L'eluent emprat és ciclohexà:acetat d'etil:cloroform en proporció 1:1:1 (v/v/v). S'obtenen 147 mg (0.3 mM) de l'anàleg protegit 202 (rdt. 42%) i 29 mg (0.1 mM) de PR alcohol (153). El producte d'interès s'intenta recristal·litzar en èter dietílic i en acetona:èter de petroli sense èxit.

- **PR-ad\_mpm (203)**

IR (film evap.  $\text{CHCl}_3$ ): 1731, 1677  $\text{cm}^{-1}$ .



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 9.71 (1H, s, CHO), 7.26 (2H, d, J = 9 Hz, H<sub>ar</sub>(2,6)), 6.86 (2H, d, J = 9 Hz, H<sub>ar</sub>(3,5)), 6.41 (1H, s, H9), 5.16 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3), 4.52 (1H, d, J = 11 Hz, CH<sub>2a</sub>-Ar), 4.45 (1H, d, J = 11 Hz, CH<sub>2b</sub>-Ar), 4.03 (1H, m, J = 6 Hz, H18), 3.95 (1H, dd, J = 3, 5 Hz, H2), 3.80 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 3.63 (1H, d, J = 3 Hz, H1), 2.72 (1H, dd, J = 7.5, 15 Hz, H17a), 2.53 (1H, dd, J = 6, 15 Hz, H17b), 2.13 (1H, d, J = 14 Hz, Ha6), 1.80 (1H, d, J = 14, Hb6), 1.57 (1H, m, H4), 1.48 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>), 1.42 (3H, s, 13-CH<sub>3</sub>), 1.29 (3H, d, J = 6 Hz, 19-CH<sub>3</sub>), 0.97 (3H, d, J = 7 Hz, 14-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 198.4/d C12, 191.4/s C8, 171.0/s C16, 164.4/s C10, 159.0/s C4<sub>ar</sub>, 130.4/s C1<sub>ar</sub>, 129.8/d C9, 129.2/d C2,6<sub>ar</sub>, 113.6/d C3,5<sub>ar</sub>, 71.8/d C18, 70.7/t, CH<sub>2</sub>-Ar, 69.9/d C3, 67.4/s C7, 67.3/s C11, 55.9/d C1, 55.5/d C2, 55.3/q CH<sub>3</sub>O, 42.9/d C4, 42.0/t C6, 41.6/t C17, 38.2/s C5, 21.9/q C13, 19.9/q C19, 13.8/q C15, 10.3/q C14.

#### 4. Síntesi de PR-bb (161)

Es dissolen 842 mg (5.5 mmol) d'àcid *o*-metoxibenzoic (**bb**) 99% en 11 mL de THF sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 760 µl de TEA seca (5.5 mmol) i a continuació 890 µl de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil 97% (5.5 mmol). El sistema es manté en agitació a temperatura ambient durant 1 h i 30 min. El sòlid blanc que ha precipitat es filtra a pressió reduïda. El dissolvent de la dissolució resultant s'elimina a pressió reduïda. L'oli incolor obtingut es dissol sota atmosfera inerta en 18 mL de toluè sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 12.5 mL d'una dissolució de 275 mg (2.2 mmol) de DMAP 98% i 306 mg (1.1 mmol) de PR-alcohol (**153**) en toluè sec. El sistema es manté en agitació a temperatura ambient sota atmosfera inerta durant 2 h. El cru de reacció es dilueix amb 20 mL de AcOEt. Aquesta fase orgànica es renta successivament 4 vegades amb 50 mL d'una dissolució aquosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl, 3 vegades amb 50 mL d'aigua, 3 vegades amb 50 mL d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, amb 50 mL d'aigua i amb 50 mL de salmorra. La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 1.23 g d'un oli groguenc que es purifica per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:CHCl<sub>3</sub> (1:1). Les fraccions obtingudes es descriuen a la **Taula 140**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	713	Clorur de 2,4,6-triclorobenzoil + anhídrid 2,4,6-triclorobenzoic ( <b>206</b> ) + Imp.
F2	90	<b>161</b> + Imp.
F3	102	c.c.

**Taula 140.** Cromatografia flash del cru de la síntesi de PR-bb (**161**). Rdt. columna: 75%.

La fracció F2 es purifica per cromatografia Lobar de fase normal emprant com a eluent Cy:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (3:3:1). S'obtenen 32 mg de **161** impur.

Finalment, la fracció anterior de **161** es purifica per cromatografia líquida de baixa pressió emprant una fase reversa C<sub>18</sub> i com a eluent una mescla H<sub>2</sub>O:ACN (2:1). S'obtenen 5 mg d'un oli incolor que s'identifica com a PR-bb (**161**) impur, en l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN del qual es detecten els senyals descrits a continuació.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 9.72 (1H, s, CHO), 7.91 (1H, dd, J = 2, 8 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7.53 (1H, m, H<sub>4Ar</sub>), 7.01 (2H, m, H<sub>3Ar</sub>, H<sub>5Ar</sub>), 6.44 (1H, s, H9), 5.39 (1H, dd, J = 5, 5 Hz, H3), 4.10 (1H, dd, J = 3.5, 5 Hz, H2), 3.92 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (1H, d, J = 3.5 Hz, H1).

#### 5. Esterificacions de Yamaguchi

##### 5.1. Síntesi de *o*-acetilsalicilat de ciclohexil (**209**)

Es dissolen 1.388 g (7.7 mmol) d'àcid *o*-acetilsalicílic (**208**) en 15 mL de THF sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 1.07 mL de TEA (7.7 mmol) i a continuació 1.24 mL de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil 97% (7.7 mmol). El sistema es manté en agitació a temperatura ambient durant 1 h. El sòlid blanc que ha precipitat es

filtra a pressió reduïda. El dissolvent de la dissolució resultant s'elimina a pressió reduïda. L'oli incolor obtingut es dissol sota atmosfera inerta en 3 mL de toluè sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 5 mL d'una dissolució de 386 mg (3.1 mmol) de DMAP i 159 mg (1.5 mmol) de ciclohexanol (**190**) en toluè. El sistema es manté en agitació a temperatura ambient sota atmosfera inerta durant 3 h. El cru de reacció es dilueix amb 60 mL d'èter etílic. Aquesta fase orgànica es renta successivament 4 vegades amb 30 mL d'una dissolució aquosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl, 4 vegades amb 30 mL d'aigua, 4 vegades amb 30 mL d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, amb 50 mL de d'aigua i amb 50 mL de salmorra. S'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 1.380 g d'un oli groguenc que es purifica per cromatografia convencional fent servir com a eluent una mescla Cy:CHCl<sub>3</sub> (1:1). Les fraccions obtingudes es descriuen a la **Taula 141**. En la fracció F3 es detecta per <sup>1</sup>H-RMN una puresa de **209** del 70%, que equival a un rendiment del 27%.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	78	<b>206</b>
F2	61	2,4,6-triclorobenzoat de ciclohexil ( <b>210</b> ) + <b>206</b> + subproductes
F3	143	<b>208</b> (30%) + <b>209</b> (70%)*
F4	834	Subproductes

**Taula 141.** Cromatografia convencional del cru de la síntesi de **209**. Rdt. columna: 94%. \*Quantificats per <sup>1</sup>H-RMN.

- **Anhidrid 2,4,6-triclorobenzoic (206)**

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3087, 1815, 1756, 1081, 1005, 985 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.40 (s, H3,H3',H5,H5')

- **o-Acetilsalicilat de ciclohexil (209)**

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.02 (1H, dd, J = 2, 8 Hz, H6), 7.54 (1H, ddd, J = 2, 7.5, 8 Hz, H4), 7.31 (1H, ddd, J = 1, 7.5, 8 Hz, H5), 7.09 (1H, dd, J = 1, 8 Hz, H3), 4.97 (1H, m, H1'), 2.35 (1H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.98-1.26 (5H, m, H2'-H6').

- **Àcid o-acetilsalicílic (208)**

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.08 (1H, dd, J = 2, 8.5 Hz, H6), 7.69 (1H, ddd, J = 2, 7.5, 8 Hz, H4), 7.37 (1H, dd, J = 1, 7.5, 8 Hz, H5), 7.20 (1H, dd, J = 1, 8 Hz, H3), 2.35 (1H, s,

### 5.1.1. Síntesi de 2,4,6-triclorobenzoat de ciclohexil (210)

Es dissolen 1.585 g d'àcid 2,4,6-triclorobenzoic (7.0 mmol) i 475 mg de ciclohexanol (**190**) (4.8 mmol) en 5 mL de toluè. S'hi addicionen 3 gotes d'àcid sulfúric 96%. El sistema s'escalfa a reflux en un sistema equipat amb un *Dean-Stark* durant 24 h. El sistema es deixa refredar. El toluè del *Dean-Stark* i el cru de reacció s'ajunten. La fase orgànica resultant es renta 3 vegades amb 20 mL d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> i 1 vegada amb 20 mL de salmorra. La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 372 mg d'un oli que correspon a 2,4,6-triclorobenzoat de ciclohexil (**210**) (1.2 mmol) (rdt. 25%).

- **2,4,6-triclorobenzoat de ciclohexil (210)**

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.34 (2H, s, H3, H5), 5.11 (1H, m, H1'), 2.02-1.23 (5H, m, H2'-H6').

### 5.2. Síntesi de o-metoxibenzoat d'estigmasteril (211)

Es dissolen 186 mg (1.2 mmol) d'àcid o-metoxibenzoic (**bb**) 99% en 5 mL de THF sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 170 µl de TEA seca (1.2 mmol) i a continuació 200 µl de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil 97% (1.2 mmol). El sistema es manté en agitació a temperatura ambient durant 1 h i 20 min. El sòlid blanc que ha

precipitat es filtra a pressió reduïda. El dissolvent de la dissolució resultant s'elimina a pressió reduïda. L'oli incolor obtingut es dissol sota atmosfera inerta en 2.75 mL de toluè sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 4 mL d'una dissolució de 63 mg (0.5 mmol) de DMAP i 105 mg (0.3 mmol) d'estigmasterol (**3**) en toluè. El sistema es manté en agitació a temperatura ambient sota atmosfera inerta durant 1 h i 20 min. El cru de reacció es dilueix amb 15 mL de AcOEt. Aquesta fase orgànica es renta successivament 3 vegades amb 25 mL d'una dissolució aquosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl, 3 vegades amb 25 mL d'aigua, 3 vegades amb 25 mL d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, amb 25 mL de d'aigua i amb 30 mL de salmorra. S'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 449 mg d'un sòlid que es purifica per cromatografia convencional fent servir com a eluent una mescla Cy:CHCl<sub>3</sub> (1:1). Les fraccions obtingudes es descriuen a la **Taula 142**.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	10	Clorur de 2,4,6-triclorobenzoil
F2	10	Clorur de 2,4,6-triclorobenzoil + <b>206</b>
F3	119	<b>206</b>
F4	5	Impureses
F5	92	<b>211</b>
F6	178	Subproductes

**Taula 142.** Cromatografia convencional del cru de la síntesi de **211**. Rdt. columna: 92%.

Després de la separació cromatogràfica s'obtenen 92 mg (1.7 mmol) d'un sòlid blanc que correspon a *o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**) (rdt. 66 %).

- ***o*-metoxibenzoat d'estigmasteril (**211**)**

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.76 (1H, dd, J = 2, 8 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7.45 (1H, ddd, J = 2, 7.5, 8.5 Hz, H<sub>4Ar</sub>), 6.97 (2H, m, H<sub>3Ar</sub>, H<sub>5Ar</sub>), 5.41 (1H, d, J = 5 Hz, H<sub>6</sub>), 5.16 (1H, dd, J = 15.5, 8.5 Hz, H<sub>22</sub>), 5.02 (1H, dd, J = 15.5, 8.5 Hz, H<sub>23</sub>), 4.86 (1H, m, H<sub>3</sub>), 3.90 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, d, J = 6.3 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), [0.85 (3H, d, J = 6.3 Hz) + 0.80 (3H, d, J = 6.3 Hz) 26-CH<sub>3</sub>], 0.81 (3H, t, J = 7.2 Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.71 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

### 5.3. Síntesi d'octanoat de *p*-metoxibenziloxi (**214**)

Es dissolen 206 mg (1.43 mmol) d'àcid caprílic (**213**) en 8.6 mL de THF sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 153 mg de TEA seca (1.51 mmol) i a continuació 347 mg de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil 97% (1.42 mmol). El sistema es manté en agitació a temperatura ambient durant 1 h i 15 min. El sòlid blanc que ha precipitat (clorhidrat de trietilamina) es filtra a pressió reduïda. El dissolvent de la dissolució resultant s'elimina a pressió reduïda. L'oli incolor obtingut es dissol sota atmosfera inerta en 4.6 mL de clorur de metilè sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 4.6 mL d'una dissolució de 169 mg (2.78 mmol) de DMAP i 192 mg (1.39 mmol) d'alcohol *p*-metoxibenzílic (**212**) en clorur de metilè. El sistema es manté en agitació a temperatura ambient sota atmosfera inerta durant 1 h i 20 min. El cru de reacció es dilueix amb 15 mL de AcOEt. Aquesta fase orgànica es renta successivament 3 vegades amb 15 mL d'una dissolució aquosa de HCl 3%, 3 vegades amb 15 mL d'aigua, 3 vegades amb 15 mL d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> i 3 vegades amb 15 mL d'aigua. S'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

S'obtenen 257 mg d'octanoat de *p*-metoxibenziloxi (**214**) (rdt. 66%).

- **Octanoat de *p*-metoxibenziloxi (**214**)**

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 2955, 2930, 2856, 1736, 1516, 1249, 1163, 1063, 822 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.29 (2H, dd, J = 5.4, 8.7 Hz, H<sub>3Ar</sub> i H<sub>5Ar</sub>), 6.89 (2H, dd, J = 5.4, 8.7 Hz, H<sub>2Ar</sub> i H<sub>6Ar</sub>), 5.04 (3H, s, CH<sub>2</sub>O), 3.81 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 2.32 (2H, t, J = 7.5 Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 1.60 (2H, m, 3-

CH<sub>2</sub>), 1.26 (8H, m, 4-CH<sub>2</sub>, 5-CH<sub>2</sub>, 6-CH<sub>2</sub>, 7-CH<sub>2</sub>), 0.87 (3H, t, J = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173.4/s C1, 159.3/s C4<sub>Ar</sub>, 129.8/d C2,6<sub>Ar</sub>, 128.1/s C1<sub>Ar</sub>, 113.7/d C3,5<sub>Ar</sub>, 65.7/t CH<sub>2</sub>O, 55.1/q CH<sub>3</sub>O, 34.3/t C2, 31.6/t C6, 29.0/t C5, 28.9/t C4, 24.9/t C3, 22.6/t C7, 14.0/q C8.

## 6. Síntesi d'anàlegs del KM-01 (9)

### 6.1. Intent de síntesi de norbornilè (219) i Aldrin (221)

#### 6.1.1. Trifenilfosfina/iode

**Procediment general:** Una mescla de trifenilfosfina (0.925 mmol) i iode (0.46 mmol) en 8 mL d'acetonitril s'agita a temperatura ambient durant 15 minuts. S'addiciona, gota a gota, una dissolució de l'epòxid (0.925 mmol) en 2 mL d'acetonitril i es deixa reaccionar. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda i el residu sòlid es redissol en cloroform. La fase orgànica es renta amb 2 x 10 mL de dissolució al 10% de bisulfit sòdic per a eliminar l'excés de iode i, posteriorment, amb 2 x 10 mL de dissolució saturada de bicarbonat sòdic, 2 x 10 mL d'una dissolució saturada de clorur sòdic i 2 x 10 mL d'aigua. La fase orgànica s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

Les experiències realitzades es mostren a la **Taula 143**.

Experiència	Epòxid	t de reacció	Dissolvent	Temperatura
1	exo-2,3-epoxinorbornè (218)	1 h 30 min	Acetonitril	t. a.
2	exo-2,3-epoxinorbornè (218)	1h 30 min	Acetonitril	t. a.
3	exo-2,3-epoxinorbornè (218)	48 h	Acetonitril	t. a.
4	exo-2,3-epoxinorbornè (218)	30 min	Clorur de metilè	t. a.
5	exo-2,3-epoxinorbornè (218)	48 h	Clorur de metilè	Reflux
6	exo-2,3-epoxinorbornè (218)	7 dies	Clorur de Metilè	t. a.
7	Dieldrin (220)	7 dies	Acetonitril	t. a.
8	Dieldrin (220)	6 dies	Acetonitril	t. a.
9	Dieldrin (220)	7 hores	Acetonitril	Reflux

**Taula 143.** Experiències realitzades sobre 218 i 220 per intentar reduir l'epòxid a doble enllaç.

El residu sòlid obtingut en l'experiència 9 es purifica mitjançant una columna Lobar de mida C utilitzant una mescla acetat d'etil:hexà (20:80, v/v) com a eluent. S'obtenen tres fraccions, la primera corresponent a la trifenilfosfina, una segona corresponent a un cru on sembla haver-hi la iodohidrina de l'Aldrin (221) de pes 67 mg i un cru complex (avaluat per <sup>1</sup>H-RMN) en la tercera fracció de 4 mg.

#### 6.1.2. 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228)

**Síntesi de 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228):** Es dissolen 2.935 g de iodur de 3-metilbenzotiazol (227) (10.83 mmol) i 856 mg de seleni (10.83 mmol) en 11 mL de piridina seca. Es porten a reflux durant 2 h. La solució es filtra per a eliminar el seleni no reaccionat i es refreda amb un bany d'aigua-gel. El producte es filtra, es renta amb aigua freda i es recristal·litza amb etanol. S'obté el 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228) amb un rendiment del 61% (1.51 g).

- **3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228)**

IR (film evap. CHCl<sub>3</sub>): 3071, 3048, 3022, 2999, 2938, 1580, 1461, 1422, 1345 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.78 (1H, d, J = 7.2 Hz, H2<sub>Ar</sub>), 7.63 (1H, d, J = 8.4 Hz, H5<sub>Ar</sub>), 7.55 (1H, dd, J = 1.2, 7.2 Hz, H3<sub>Ar</sub>), 7.55 (1H, dd, J = 1.2, 8.4 Hz, H3<sub>Ar</sub>), 3.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**Intent de síntesi d'Aldrin (221) amb 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228):** Una dissolució sota agitació de 57 mg de Dieldrin (220) (0.52 mmol) i 186 mg de 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228) (0.52 mmol) en 11 mL de diclorometà es manté refredada amb un bany de gel i sal. S'afegeix, gota a gota, 59 mg d'àcid trifluoroacètic (0.52 mmol). Quasi instantàniament el seleni precipita com un sòlid vermell. El metall es filtra i es renta amb diclorometà. El dissolvent de la fase orgànica s'elimina a pressió reduïda.

Es realitzen tres repeticions d'aquesta reacció variant únicament el temps de reacció (1.5 hores, 72 hores i 5 minuts) però no s'aconsegueix reduir l'epòxid a doble enllaç.

## 6.2. Intent de reducció de l'epòxid entre C1-C2 de la PR toxina (19)

### 6.2.1. Trifenilfosfina/iode

Una mescla de trifenilfosfina i iode en 8 mL d'acetonitril s'agita a temperatura ambient durant 15 minuts. S'addiciona, gota a gota, una dissolució de PR toxina (19) en 2 mL d'acetonitril i es deixa reaccionar. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda i el residu sòlid es redissol en cloroform. La fase orgànica es renta amb 2 x 10 mL de dissolució al 10% de bisulfat sòdic per a eliminar l'excés de iode i, posteriorment, amb 2 x 10 mL de dissolució saturada de bicarbonat sòdic, 2 x 10 mL d'una dissolució saturada de clorur sòdic i 2 x 10 mL d'aigua. La fase orgànica s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda.

Les experiències realitzades es mostren a la **Taula 144**.

Prova	Temps de reacció	PR toxina (19)/mg	PPh <sub>3</sub> /mg	I <sub>2</sub> /mg
1	10 min	70	65	31
2	3 h	95	87	42
3	5 h	70	123	118

**Taula 144.** Reaccions amb trifenilfosfina/iode per reduir l'epòxid de C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> de 19.

El residu sòlid obtingut de les experiències 1 i 2 es purifica mitjançant una columna flash (rdt. 80%) utilitzant 3 L d'una mescla ciclohexà:cloroform:acetat d'etil (3:2:1, v/v) i 1 L de ciclohexà:acetat d'etil (1:1, v/v) com a eluent. S'obtenen 8 fraccions, identificant-se per <sup>1</sup>H-RMN PR toxina (19) en les fraccions 5, 6 i 7.

### 6.2.2. 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228)

Una dissolució sota agitació de 57 mg de PR toxina (19) (0.16 mmol) i 29 mg de 3-metil-2-selenoxobenzotiazol (228) (0.18 mmol) en 6 mL de diclorometà es manté refredada amb un bany de gel i sal. S'afegeix gota a gota 14 mg d'àcid trifluoroacètic (0.18 mmol). Quasi instantàniament el seleni precipita com un sòlid vermell. El metall es filtra i es renta amb diclorometà. El dissolvent de la fase orgànica s'elimina a pressió reduïda.

El residu obtingut se sotmet a cromatografia flash (rdt. 75%) emprant 2 L de ciclohexà:cloroform:acetat d'etil (3:1:1, v/v) i 1 L de ciclohexà:cloroform:acetat d'etil (3:2:1, v/v) com a eluent. En la fracció 3 s'identifica una mescla de dos productes, per <sup>1</sup>H-RMN, un dels quals podria ser el producte desitjat.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**BIBLIOGRAFIA**

1. Johri, M. M.; Mitra, D. Action of plant hormones. *Current Science* **2001**, *80*, 199-205.
2. Gray, W. M. Primer: Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology* **2004**, *2*, 1270-1273.
3. Peng, J.; Richards, D. E.; Hartley, N. M.; Murphy, G. P.; Devos, K. M.; Flintham, J. E.; Beales, J.; Fish, L. J.; Worland, A. J.; Pelica, F.; Sudhakar, D.; Christou, P.; Snape, J. W.; Gale, M. D.; Harberd, N. P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature (London)* **1999**, *400*, 256-261.
4. Dharmasiri, N.; Estelle, M. Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science* **2004**, *9*, 302-308.
5. Gomi, K.; Matsuoka, M. Gibberellin signalling pathway. *Current Opinion in Plant Biology* **2003**, *6*, 489-493.
6. Guo, H.; Ecker, J. R. The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology* **2004**, *7*, 40-49.
7. Himmelbach, A.; Yang, Y.; Grill, E. Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **2003**, *6*, 470-479.
8. Kakimoto, T. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **2003**, *54*, 605-627.
9. Turner, J. G.; Ellis, C.; Devoto, A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **2002**, *14*, S153-S164.
10. Wang, Z. Y.; He, J. X. Brassinosteroid signal transduction: Choices of signals and receptors. *Trends in Plant Science* **2004**, *9*, 91-96.
11. Napier, R. Plant hormone binding sites. *Annals of Botany (Oxford, United Kingdom)* **2004**, *93*, 227-233.
12. Mitchell, J. W.; Whitehead, M. R. Responses of vegetative parts of plants following application of extract of pollen from *Zea mays*. *Botanical Gazette* **1941**, *102*, 770-790.
13. Mitchell, J. W.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Plimmer, J. R.; Smith, M. V. Brassins--a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature (London, United Kingdom)* **1970**, *225*, 1065-1066.
14. Mandava, N.; Mitchell, J. W. New plant hormones. Chemical and biological investigations. *Indian Agriculturist* **1971**, *15*, 19-31.
15. Mandava, N.; Mitchell, J. W. Structural elucidation of brassins. *Chemistry & Industry (London, United Kingdom)* **1972**, 930-931.
16. Cutler, H. G.; Yokota, T.; Adam, G.; Editors. Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications. ACS Symposium Series 474. EUA. **1991**, 358.
17. Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen, J. D., Jr.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Cook, J. C., Jr. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **1979**, *281*, 216-217.
18. Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen,

- J. D., Jr.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Cook, J. C., Jr. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **1979**, *281*, 216-217.
19. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; De Groot, A. E.; Editors. Brassinosteroids: A new class of plant hormones. Academic Press. EUA. **1998**, 464.
  20. Sakurai, A. *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*; Springer: Tokyo, **1999**.
  21. Altmann, T. Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta* **1999**, *208*, 1-11.
  22. Clouse, S. D.; Sasse, J. M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1998**, *49*, 427-451.
  23. Sasse, J. M. Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update. *Journal of Plant Growth Regulation* **2003**, *22*, 276-288.
  24. Khripach, V.; Zhabinskii, V.; de Groot, A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany* **2000**, *86*, 441-447.
  25. Mandava, N. B.; Sasse, J. M.; Yopp, J. H. Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays. *Physiologia Plantarum* **1981**, *53*, 453-461.
  26. Yopp, J. H.; Mandava, N. B.; Sasse, J. M. Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassays. *Physiologia Plantarum* **1981**, *53*, 445-452.
  27. Halliday, K. J. Plant hormones: The interplay of brassinosteroids and auxin. *Current Biology* **2004**, *14*, R1008-R1010.
  28. Cerana, R.; Bonetti, A.; Marre, M. T.; Romani, G.; Lado, P.; Marre, E. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls. *Physiologia Plantarum* **1983**, *59*, 23-27.
  29. Romani, G.; Marre, M. T.; Bonetti, A.; Cerana, R.; Lado, P.; Marre, E. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in maize root segments. *Physiologia Plantarum* **1983**, *59*, 528-532.
  30. Braun, P.; Wild, A. The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants. *Journal of Plant Physiology* **1984**, *116*, 189-196.
  31. Dhaubhadel, S.; Chaudhary, S.; Dobinson, K. F.; Krishna, P. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Molecular Biology* **1999**, *40*, 333-342.
  32. Wilen, R. W.; Sacco, M.; Gusta, L. V.; Krishna, P. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiologia Plantarum* **1995**, *95*, 195-202.
  33. Anuradha, S.; Rao, S. S. R. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* **2001**, *33*, 151-153.
  34. Hamada, K. Brassinolide in crop cultivation. *FFTC Book Series* **1986**, *34*, 188-197.



35. Sasse, J.; Smith, R.; Hudson, I. Effect of 24-epibrassinolide on germination of seeds of *Eucalyptus camaldulensis* in saline conditions. *Proceedings of the Plant Growth Regulator Society of America* **1995**, *22nd*, 136-141.
36. Sairam, R. K. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regulation* **1994**, *14*, 173-181.
37. Schilling, G.; Schiller, C.; Otto, S. Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants. In *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications*. Cutler, H. G.; Yokota, T.; Adam, G.; Editors. ACS Symposium Series 474. EUA. **1991**, 208-219.
38. Szekeres, M.; Nemeth, K.; Koncz-Kalman, Z.; Mathur, J.; Kauschmann, A.; Altmann, T.; Redei, G. P.; Nagy, F.; Schell, J.; Koncz, C. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell (Cambridge, Massachusetts)* **1996**, *85*, 171-182.
39. Guan, M.; Roddick, J. G. Epibrassinolide-inhibition of development of excised, adventitious and intact roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*): comparison with the effects of steroidal estrogens. *Physiologia Plantarum* **1988**, *74*, 720-726.
40. Guan, M.; Roddick, J. G. Comparison of the effects of epibrassinolide and steroidal estrogens on adventitious root growth and early shoot development in mung bean cuttings. *Physiologia Plantarum* **1988**, *73*, 426-431.
41. Runkova, L. V. Editor. *Effect of Growth Regulators on Ornamental Plants*. Nauka, Moscow (USSR). **1985**, 150.
42. Clouse, S. D. Recent Advances in Brassinosteroid Research: From Molecular Mechanisms to Practical Applications. *Journal of Plant Growth Regulation* **2003**, *22*, 273-275.
43. Bhat, Z. A.; Srihari, D.; Reddy, Y. N. Influence of brassinosteroid and CPPU alongwith BA on brix: Acid ratio and brix yield in grape cv. Flame Seedless. *Annals of Biology* **2004**, *20*, 75-77.
44. Bhat, Z. A.; Srihari, D.; Reddy, Y. N. Effect of new generation growth regulators brassinosteroid and CPPU along with benzyladenine on quality of seedless grape CV Flame seedless for export. *Environment and Ecology* **2004**, *22*, 52-55.
45. Tambe, T. B. Effect of gibberellic acid in combination with brassinosteroid on berry size, yield and quality of Thompson Seedless grapes. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* **2002**, *27*, 151-153.
46. Fujioka, S.; Noguchi, T.; Yokota, T.; Takatsuto, S.; Yoshida, S. Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 595-599.
47. Schmidt, J.; Porzel, A.; Adam, G. Brassinosteroids and a pregnane glucoside from *Daucus carota*. *Phytochemical Analysis* **1998**, *9*, 14-20.
48. Yokota, T.; Higuchi, K.; Takahashi, N.; Kamuro, Y.; Watanabe, T.; Takatsuto, S. Identification of brassinosteroids with epimerized substituents and/or the 23-oxo group in pollen and anthers of Japanese cedar. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1998**, *62*, 526-531.
49. Altmann, T. A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue. *Trends in Genetics* **1998**, *14*, 490-495.

50. Bishop, G. J.; Nomura, T.; Yokota, T.; Harrison, K.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Jones, J. D. G.; Kamiya, Y. The tomato DWARF enzyme catalyzes C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 1761-1766.
51. Choe, S.; Dilkes, B. P.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Sakurai, A.; Feldmann, K. A. The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **1998**, *10*, 231-243.
52. Choe, S.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Tissier, C. P.; Gregory, B. D.; Ross, A. S.; Tanaka, A.; Yoshida, S.; Tax, F. E.; Feldmann, K. A. The *Arabidopsis* *dwf7/ste1* mutant is defective in the D7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **1999**, *11*, 207-221.
53. Choe, S.; Dilkes, B. P.; Gregory, B. D.; Ross, A. S.; Yuan, H.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Tanaka, A.; Yoshida, S.; Tax, F. E.; Feldmann, K. A. The *Arabidopsis* *dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology* **1999**, *119*, 897-907.
54. Ephritikhine, G.; Fellner, M.; Vannini, C.; Lalous, D.; Barbier-Brygoo, H. The *sax1* dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. *Plant Journal* **1999**, *18*, 303-314.
55. Klahre, U.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Nomura, T.; Yoshida, S.; Chua, N. H. The *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* **1998**, *10*, 1677-1690.
56. Nomura, T.; Kitasaka, Y.; Takatsuto, S.; Reid, J. B.; Fukami, M.; Yokota, T. Brassinosteroid/sterol synthesis and plant growth as affected by *lka* and *lkb* mutations of pea. *Plant Physiology* **1999**, *119*, 1517-1526.
57. Peng, L.; Li, Y.; Li, W. Z. A concise and stereoselective synthesis of the brassinolide and related compounds' side chains. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 3991-3993.
58. Back, T. G.; Blazicka, P. G.; Krishna, M. V. A new synthesis of castasterone and brassinolide from stigmaterol. A concise and stereoselective elaboration of the side chain from a C-22 aldehyde. *Canadian Journal of Chemistry* **1993**, *71*, 156-163.
59. Zhou, W.; Jiang, B.; Pan, X. A novel synthesis of brassinolide and related compounds. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1989**, 612-614.
60. Ishiguro, M.; Takatsuto, S.; Morisaki, M.; Ikekawa, N. Synthesis of brassinolide, a steroidal lactone with plant-growth promoting activity. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1980**, 962-964.
61. Vazquez, M. N.; Rodriguez, C. R.; Manchado, F. C. Synthesis and practical applications of brassinosteroid analogs. *Brassinosteroids* **2003**, 87-117.
62. Takeuchi, Y.; Ogasawara, M.; Konnai, M.; Takematsu, T. Application of brassinosteroids in agriculture in Japan. *Proceedings - Plant Growth Regulation Society of America* **1992**, *19th*, 343-352.
63. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; Malevannaya, N. N. Recent advances in brassinosteroids study and application. *Proceedings of the Plant Growth Regulator Society of America* **1997**, *24th*, 101-106.

64. Kamuro, Y.; Takatsuto, S.; Watanabe, T.; Noguchi, T.; Kuriyama, H.; Suganuma, H. Practical effects of brassinosteroid compound [TS303]. *Proceedings of the Plant Growth Regulator Society of America* **1997**, *24th*, 111-116.
65. Arteca, R. N. Calcium(2+) acts synergistically with brassinosteroid and indole-3-acetic acid in stimulating ethylene production in etiolated mung bean hypocotyl segments. *Physiologia Plantarum* **1984**, *62*, 102-104.
66. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Abe, H. Synthesis of (24R)-28-homobrassinolide analogs and structure-activity relationships of brassinosteroids in the rice-lamina inclination test. *Phytochemistry (Elsevier)* **1983**, *22*, 1393-1397.
67. Thompson, M. J.; Mandava, N. B.; Meudt, W. J.; Lusby, W. R.; Spaulding, D. W. Synthesis and biological activity of brassinolide and its 22 $\beta$ ,23 $\beta$ -isomer: novel plant growth-promoting steroids. *Steroids* **1981**, *38*, 567-580.
68. Thompson, M. J.; Meudt, W. J.; Mandava, N. B.; Dutky, S. R.; Lusby, W. R.; Spaulding, D. W. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids* **1982**, *39*, 89-105.
69. Meudt, W. J.; Bennett, H. W. Rapid bioassay for auxin. *Physiologia Plantarum* **1978**, *44*, 422-428.
70. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Takematsu, T.; Takeuchi, Y.; Koguchi, M. Structure-activity relationship of brassinosteroids. *Phytochemistry (Elsevier)* **1983**, *22*, 2437-2441.
71. Terricabras, E. Tesi doctoral, **1998**. IQS CETS.
72. Brosa, C. Structure-Activity Relationship. In *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*; Sakurai, A.; Yokota, T.; Clouse, S. D. Eds.; Springer: Tokyo, 1999.
73. Geuns, J. M. C. Steroid hormones and plant growth and development. *Phytochemistry (Elsevier)* **1978**, *17*, 1-14.
74. Jones, J. L.; Roddick, J. G. Steroidal estrogens and androgens in relation to reproductive development in higher plants. *Journal of Plant Physiology* **1988**, *133*, 510-518.
75. Mussig, C.; Altmann, T. Brassinosteroid signaling in plants. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2001**, *12*, 398-402.
76. Beato, M.; Herrlich, P.; Schuetz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell (Cambridge, Massachusetts)* **1995**, *83*, 851-857.
77. McEwen, B. S. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends in Pharmacological Sciences* **1991**, *12*, 141-147.
78. Yamamoto, K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annual Review of Genetics* **1985**, *19*, 209-252.
79. Yang, G.; Komatsu, S. Brassinosteroid signaling: From perception to gene expression. *Recent Research Developments in Plant & Cell Physiology* **2003**, *1*, 7-17.
80. Bishop, G. J.; Yokota, T. Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant & cell physiology* **2001**, *42*, 114-120.
81. Friedrichsen, D.; Chory, J. Steroid signaling in plants: from the cell surface to the

- nucleus. *BioEssays* **2001**, 23, 1028-1036.
82. Li, J.; Chory, J. Brassinosteroid actions in plants. *Journal of Experimental Botany* **1999**, 50, 275-282.
83. Schumacher, K.; Chory, J. Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Current Opinion in Plant Biology* **2000**, 3, 79-84.
84. Szekeres, M.; Koncz, C. Biochemical and genetic analysis of brassinosteroid metabolism and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)* **1998**, 36, 145-155.
85. Adam, G.; Marquardt, V. Brassinosteroids. *Phytochemistry* **1986**, 25, 1787-1799.
86. Clouse, S. D. Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. *Physiologia Plantarum* **1997**, 100, 702-709.
87. Mandava, N. B. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1988**, 39, 23-52.
88. Sakurai, A.; Fujioka, S. The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids: a review. *Plant Growth Regulation* **1993**, 13, 147-159.
89. Kim, G. T.; Fujioka, S.; Kozuka, T.; Tax, F. E.; Takatsuto, S.; Yoshida, S.; Tsukaya, H. CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **2005**, 41, 710-721.
90. He, J.-X.; Gendrom, J. M.; Sun, Y.; Gampala, S. S. L.; Gendron, N.; Wang, Z.-Y. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* **2005**, 307, 1634-1638.
91. Li, J.; Nagpal, P.; Vitart, V.; McMorris, T. C.; Chory, J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science (Washington, D.C.)* **1996**, 272, 398-401.
92. Clouse, S. D.; Langford, M.; McMorris, T. C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology* **1996**, 111, 671-678.
93. Li, J.; Chory, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell (Cambridge, Massachusetts)* **1997**, 90, 929-938.
94. Li, J.; Nam, K. H. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science (Washington, DC, United States)* **2002**, 295, 1299-1301.
95. Koka, C. V.; Cerny, R. E.; Gardner, R. G.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yoshida, S.; Clouse, S. D. A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology* **2000**, 122, 85-98.
96. Li, J.; Nam, K. H.; Vafeados, D.; Chory, J. BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **2001**, 127, 14-22.
97. Asami, T.; Min, Y. K.; Nagata, N.; Yamagishi, K.; Takatsuto, S.; Fujioka, S.; Murofushi, N.; Yamaguchi, I.; Yoshida, S. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiology* **2000**, 123, 93-99.
98. Nagata, N.; Asami, T.; Yoshida, S. Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants

- (*Lepidium sativum*). *Plant and Cell Physiology* **2001**, *42*, 1006-1011.
99. Friedrichsen, D. M.; Joazeiro, C. A.; Li, J.; Hunter, T.; Chory, J. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiology* **2000**, *123*, 1247-1256.
  100. Noguchi, T.; Fujioka, S.; Choe, S.; Takatsuto, S.; Yoshida, S.; Yuan, H.; Feldmann, K. A.; Tax, F. E. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiology* **1999**, *121*, 743-752.
  101. Li, J.; Lease, K. A.; Tax, F. E.; Walker, J. C. BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 5916-5921.
  102. Li, J.; Wen, J.; Lease, K. A.; Doke, J. T.; Tax, F. E.; Walker, J. C. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell (Cambridge, MA, United States)* **2002**, *110*, 213-222.
  103. Kinoshita, T.; Cano-Delgado, A.; Seto, H.; Hiranuma, S.; Fujioka, S.; Yoshida, S.; Chory, J. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature (London, United Kingdom)* **2005**, *433*, 167-171.
  104. Zhou, A.; Wang, H.; Walker, J. C.; Li, J. BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Journal* **2004**, *40*, 399-409.
  105. Nam, K. H.; Li, J. The *Arabidopsis* transthyretin-like protein is a potential substrate of BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1. *Plant Cell* **2004**, *16*, 2406-2417.
  106. Kauschmann, A.; Jessop, A.; Koncz, C.; Szekeres, M.; Willmitzer, L.; Altmann, T. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant Journal* **1996**, *9*, 701-713.
  107. Clark, S. E.; Williams, R. W.; Meyerowitz, E. M. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell (Cambridge, Massachusetts)* **1997**, *89*, 575-585.
  108. Song, W. Y.; Wang, G. L.; Chen, L. L.; Kim, H. S.; Pi, L. Y.; Holsten, T.; Gardner, J.; Wang, B.; Zhai, W. X. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science (Washington, D.C.)* **1995**, *270*, 1804-1806.
  109. Torii, K. U.; Mitsukawa, N.; Oosumi, T.; Matsuura, Y.; Yokoyama, R.; Whittier, R. F.; Komeda, Y. The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **1996**, *8*, 735-746.
  110. He, Z.; Wang, Z. Y.; Li, J.; Zhu, Q.; Lamb, C.; Ronald, P.; Chory, J. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science (Washington, D.C.)* **2000**, *288*, 2360-2363.
  111. Wang, Z. Y.; Seto, H.; Fujioka, S.; Yoshida, S.; Chory, J. BRI1 is a critical component of a plasma membrane receptor for plant steroids. *Nature (London, United Kingdom)* **2001**, *410*, 380-383.
  112. Alvarez, J. C. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 365-370.
  113. Chen, Y. Z.; Li, Z. R.; Ung, C. Y. Computational method for drug target search and

- application in drug discovery. *Journal of Theoretical & Computational Chemistry* **2002**, *1*, 213-224.
114. Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **2002**, *47*, 409-443.
115. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3*, 935-949.
116. Krumrine, J.; Raubacher, F.; Brooijmans, N.; Kuntz, I. Principles and methods of docking and ligand design. *Methods of Biochemical Analysis* **2003**, *44*, 443-476.
117. Arteca, R. N.; Bachman, J. M.; Yopp, J. H.; Mandava, N. B. Relationship of steroidal structure to ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiologia Plantarum* **1985**, *64*, 13-16.
118. Takatsuto, S.; Ikekawa, N. Synthesis and activity of plant growth-promoting steroids, (22R,23R,24S)-28-homobrassinosteroids, with modifications in rings A and B. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1984**, 439-447.
119. Yokota, T.; Mori, K. Molecular structure and biological activity of brassinolide and related brassinosteroids. In *Molecular structure and biological activity of steroids*. Bohl, M.; Duax, W. L. Editors. CRC, Boca Raton. **1992**, 317-340.
120. Kohout, L.; Strnad, M.; Kaminek, M. Types of brassinosteroids and their bioassays. In *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. Cutler, H. G.; Yokota, T.; Adam, G. Editors. ACS Symposium Series 474, **1991**, 56-73.
121. Brosa, C.; Nusimovich, S.; Peracaula, R. Synthesis of new brassinosteroids with potential activity as antiecdysteroids. *Steroids* **1994**, *59*, 463-467.
122. Brosa, C.; Capdevila, J. M.; Zamora, I. Brassinosteroids: a new way to define the structural requirements. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2435-2448.
123. Brosa, C.; Modolell, A. Comunicació personal, **1998**.
124. Ogihara, N. Drawing out drugs: quantitative structure-activity analysis works to isolate drug candidates from the vast well of data. *Modern Drug Discovery* **2003**, *6*, 28-30, 32.
125. Oprea, T. I. 3D QSAR modeling in drug design. *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery* **2004**, 571-616, 6.
126. Selassie, C. D.; Mekapati, S. B.; Verma, R. P. QSAR: then and now. *Current Topics in Medicinal Chemistry (Hilversum, Netherlands)* **2002**, *2*, 1357-1379.
127. So, S. S. Quantitative structure-activity relationships. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* **2000**, *8*, 71-97.
128. Cosentino, U.; Moro, G.; Scolastico, S.; Todeschini, R.; Scolastico, C. Pharmacophore identification by molecular modeling and chemometrics: the case of HMG-CoA reductase inhibitors *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1996**, *6*, 47.
129. Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, *28*, 849-857.

130. Brosa, C.; Vilaplana, M. Comunicació personal, **2001**.
131. Zamora, I. Tesi doctoral, **1998**. IQS CETS.
132. Goodford, P. General principles and problems of rational drug design. *Alfred Benzon Symposium* **1988**, 26, 11-19.
133. Kim, S. K.; Mizuno, K.; Hatori, M.; Marumo, S. A brassinolide-inhibitor KM-01, its isolation and structure elucidation from a fungus *Drechslera avenae*. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, 1731-1734.
134. Kim, S. K.; Hatori, M.; Ojika, M.; Sakagami, Y.; Marumo, S. KM-01, a brassinolide inhibitor, its production, isolation and structure from two fungi *Drechslera avenae* and *Pycnoporus coccineus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1998**, 6, 1975-1982.
135. Kim, S. K.; Asano, T.; Marumo, S. Biological activity of brassinosteroid inhibitor KM-01 produced by a fungus *Drechslera avenae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1995**, 59, 1394-1397.
136. Cruciani, G.; Goodford, P. J. A search for specificity in DNA-drug interactions. *Journal of Molecular Graphics* **1994**, 12, 116-129.
137. Pastor, M.; Cruciani, G. A novel strategy for improving ligand selectivity in receptor-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **10-11-1995**, 38, 4637-4647.
138. Brosa, C.; Canicio, R. Comunicació personal, **2000**.
139. Andersen, D. L.; Back, T. G.; Janzen, L.; Michalak, K.; Pharis, R. P.; Sung, G. C. Y. Design, synthesis, and bioactivity of the first nonsteroidal mimetics of brassinolide. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 7129-7141.
140. Watanabe, N.; Fujita, A.; Ban, N.; Yagi, A.; Etoh, H.; Ina, K.; Sakata, K. Bipolar: anti-microbial compound isolated as a candidate for marine antifouling produced by *Bipolaris* sp. F5206. *Journal of natural products* **1995**, 58, 463-466.
141. Lim, C. H. Structure elucidation of sesquiterpenoid from pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Analytical Science & Technology* **1996**, 9, 107-111.
142. Sugawara, F.; Strobel, G.; Fisher, L. E.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, 82, 8291-8294.
143. Strunz, G. M.; Bethell, R.; Sampson, G.; White, P. On the Baylis-Hillman reaction of acrylate, acrylonitrile, and acrolein with some non-enolizable  $\alpha$ -dicarbonyl compounds: synthesis of phytotoxic bipolaroxin models. *Canadian Journal of Chemistry* **1995**, 73, 1666-1674.
144. Moreau, C. *Penicillium roquefortii*, morphology, physiology, significance in the cheese industry, mycotoxins. *Lait* **1980**, 60, 254-271.
145. Wei, R. D.; Still, P. E.; Smalley, E. B.; Schnoes, H. K.; Strong, F. M. Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roquefortii*. *Applied Microbiology* **1973**, 25, 111-114.
146. Wei, R. D.; Schnoes, H. K.; Hart, P. A.; Strong, F. M. Structure of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roquefortii*. *Tetrahedron* **1975**, 31, 109-114.
147. Chang, S. C.; Wei, Y. H.; Wei, D. L.; Chen, Y. Y.; Jong, S. C. Factors affecting the

- production of eremofortin C and PR toxin in *Penicillium roquefortii*. *Applied and Environmental Microbiology* **1991**, *57*, 2581-2585.
148. Chang, S. C.; Lu, C. Y.; Li, S. Y.; Wei, Y. H. Potentiation effect of corn extract on the production of eremofortin C, EC oxidase, and PR toxin by *Penicillium roquefortii*. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences* **1991**, *15*, 153-159.
  149. Chang, S. C.; Wei, Y. H.; Liu, M. L.; Wei, R. D. Isolation and some properties of the enzyme that transforms eremofortin C to PR toxin. *Applied and Environmental Microbiology* **1985**, *49*, 1455-1460.
  150. Ratcliffe, R.; Rodehorst, R. Improved procedure for oxidations with the chromium trioxide-pyridine complex. *Journal of Organic Chemistry* **1970**, *35*, 4000-4002.
  151. Li, S. Y.; Chang, S. C.; Wei, R. D. Chemical transformation of eremofortin C into PR toxin. *Journal of the Chinese Biochemical Society* **1985**, *14*, 52-63.
  152. Moreau, S.; Cacan, M.; Lablache-Combiere, A. Eremofortin C, a new metabolite obtained from *Penicillium roquefortii* cultures and from biotransformation of PR toxin. *Journal of Organic Chemistry* **1977**, *42*, 2632-2634.
  153. Moreau, S.; Moule, Y.; Bousquet, J. F. Relationship between chemical structure and biological properties of some fungal metabolites of the eremophilane type. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* **1977**, *31*, 881-884.
  154. Chen, F. C.; Chen, C. F.; Wei, R. D. Acute toxicity of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roquefortii*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **1982**, *20*, 433-441.
  155. Moule, Y.; Moreau, S.; Aujard, C. Induction of cross-links between DNA and protein by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roquefortii*. *Mutation Research* **1980**, *77*, 79-89.
  156. Wei, R. D.; Ong, T. M.; Whong, W. Z.; Frezza, D.; Bronzetti, G.; Zeiger, E. Genetic effects of PR toxin in eukaryotic microorganisms. *Environmental Mutagenesis* **1979**, *1*, 45-53.
  157. Ueno, Y.; Kubota, K.; Ito, T.; Nakamura, Y. Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*. *Cancer research* **1978**, *38*, 536-542.
  158. Moreau, S.; Biguet, J.; Lablache-Combiere, A.; Baert, F.; Foulon, M.; Delfosse, C. Structures and stereochemistry of the sesquiterpenes of *Penicillium roquefortii*, PR toxin, and eremofortins A, B, C, D and E. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2989-2997.
  159. Moreau, S.; Lablache-Combiere, A.; Biguet, J. Production of eremofortins A, B, and C relative to formation of PR toxin by *Penicillium roquefortii*. *Applied and Environmental Microbiology* **1980**, *39*, 770-776.
  160. Chang, S. C.; Lu, K. L.; Yeh, S. F. Secondary metabolites resulting from degradation of PR toxin by *Penicillium roquefortii*. *Applied and Environmental Microbiology* **1993**, *59*, 981-986.
  161. Scott, P. M.; Kanhere, S. R. Instability of PR toxin in blue cheese. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* **1979**, *62*, 141-147.
  162. Siemens, K.; Zawistowski, J. Determination of *Penicillium roquefortii* toxin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **1992**, *609*, 205-211.



163. Scott, P. M.; Kennedy, B. P. C.; Harwig, J.; Blanchfield, B. J. Study of conditions for production of roquefortine and other metabolites of *Penicillium roquefortii*. *Applied and Environmental Microbiology* **1977**, *33*, 249-253.
164. Moreau, S.; Masset, A.; Biguet, J. Resolution of *Penicillium roquefortii* toxin and eremofortins A, B, and C by high-performance liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* **1979**, *37*, 1059-1062.
165. Piva, M. T.; Guiraud, J.; Crouzet, J.; Galzy, P. Effect of culture conditions on the excretion of a mycotoxin by some strains of *Penicillium roquefortii*. *Lait* **1976**, *56*, 397-406.
166. Boysen, M.; Skouboe, P.; Frisvad, J.; Rossen, L. Reclassification of the *Penicillium roquefortii* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology (Reading, United Kingdom)* **1996**, *142*, 541-549.
167. Frisvad, J. C.; Filtenborg, O. *Terverticillate penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* **1989**, *81*, 837-861.
168. Bhatnagar, D.; Lillehoj, E. B.; Arora, D. K.; Editors. Handbook of Applied Mycology, Vol. 5: Mycotoxins in Ecological Systems. **1992**, 443.
169. van den Tempel, T.; Nielsen, M. S. Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology* **2000**, *57*, 193-199.
170. Nielsen, M. S.; Frisvad, J. C.; Nielsen, P. Colony interaction and secondary metabolite production of cheese-related fungi in dual culture. *Journal of Food Protection* **1998**, *61*, 1023-1029.
171. Moeller, T.; Aakerstrand, K.; Massoud, T. Toxin-producing species of *Penicillium* and the development of mycotoxins in must and homemade wine. *Natural Toxins* **1997**, *5*, 86-89.
172. Jelen, H. H. Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roquefortii* strains producing PR toxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 6569-6574.
173. Bouthelier, V.; Burbano, C. Production of toxin PR by *Penicillium roquefortii* strains isolated from Cabrales cheese. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie: Ganadera (Spain)* **1982**, *13*, 121-133.
174. Bacteriological analytical manual, 7th edition. By the U.S. Food and Drug Administration. Blackwell. *International Journal of Food Science and Technology* **1994**, *29*, 623-624.
175. Capasso, R.; Borrelli, V.; Iacobellis, N. S.; Basile, G. Preparation of derivatives of phomenone and PR toxin to study structure-biological activity correlations of eremophilanic sesquiterpenes. *Annali della Facolta di Scienze Agrarie della Universita degli Studi di Napoli, Portici* **1986**, *20*, 20-28.
176. Fetizon, M.; Golfier, M.; Louis, J. M. Oxidations by silver carbonate on celite. XIII. Preparations of lactones. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 171-176.
177. Coyne, J. A.; Orr, H. A. *Evolution* **1997**, *51*, 295-303.
178. Marie, M.; Ridderstroem, M.; Luthman, K.; Zamora, I. Virtual Screening and Scaffold Hopping Based on GRID Molecular Interaction Fields. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2005**, *45*, 1313-1323.

179. Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B.; Editors. Reviews in Computational Chemistry. VCH, Weinheim (Germany). **1990**, 419.
180. Cramer, C. J. Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models. John Wiley & Sons Ltd, Chichester (UK). **2002**, 562.
181. Leach, A. R. Molecular Modelling: Principles and Applications. Prentice Hall, Harlow (UK). **2000**, 720.
182. Insight 97.0. **1997**.
183. Discover 2.9.7. **1995**.
184. Osguthorpe, P.; Roberts, V. A.; Osguthorpe, D. J.; Wolff, J.; Genest, M.; Hagler, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1988**, *4*, 31-47.
185. Gaedt, K.; Holtje, H. D. Consistent valence force-field parameterization of bond lengths and angles with quantum chemical ab initio methods applied to some heterocyclic dopamine D3-receptor agonists. *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19*, 935-946.
186. Schweizer, W. B. Conformational analysis. In Structure correlation. Buergi, H.-B.; Dunitz, J. D. Editors. VCH, Weinheim (Germany). **1994**, *1*, 369-404.
187. Smellie, A.; Kahn, S. D.; Teig, S. L. Analysis of Conformational Coverage. 2. Applications of Conformational Models. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1995**, *35*, 295-304.
188. Reynolds, C. H.; Hormann, R. E. Theoretical Study of the Structure and Rotational Flexibility of Diacylhydrazines: Implications for the Structure of Nonsteroidal Ecdysone Agonists and Azapeptides. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 9395-9401.
189. Lavecchia, A.; Greco, G.; Novellino, E.; Vittorio, F.; Ronsisvalle, G. Modeling of k-opioid receptor/agonists interactions using pharmacophore-based and docking simulations. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 2124-2134.
190. De Clercq, P. J. Systematic conformational analysis. General method for rapid conformational evaluation. Its application to the hydroazulene system. *Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 667-675.
191. Bombasaro, J. A.; Zamora, M. A.; Baldoni, H. A.; Enriz, R. D. An Exhaustive Conformational Analysis of N-Acetyl-L-cysteine-N-methylamide. Identification of the Complete Set of Interconversion Pathways on the ab Initio and DFT Potential Energy Hypersurface. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 874-884.
192. Leach, A. R. A survey of methods for searching the conformational space of small and medium-sized molecules. *Reviews in Computational Chemistry* **1991**, *2*, 1-55.
193. Saunders, M. Stochastic exploration of molecular mechanics energy surfaces. Hunting for the global minimum. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 3150-3152.
194. [www.tripos.com](http://www.tripos.com). **2005**.
195. Balducci, R.; Pearlman, R. S. Confort: A rational conformation analysis tool. *Book of Abstracts, 217th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., March 21-25* **1999**,

COMP-011.

196. Bostroem, J. Reproducing the conformations of protein-bound ligands: A critical evaluation of several popular conformational searching tools. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2001**, *15*, 1137-1152.
197. Smith, G. D.; Jaffe, R. L.; Yoon, D. Y. Conformations of 1,2-Dimethoxyethane in the Gas and Liquid Phases from Molecular Dynamics Simulations. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 530-531.
198. Pristovsek, P.; Kidric, J.; Hadzi, D. Bioactive Conformations of Small Peptides: A Method for Selection of Candidates Based on Conformations of Active and Inactive Analogs and Its Application to Muramyl Dipeptide. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1995**, *35*, 633-639.
199. Wilson, S. R.; Cui, W.; Moskowitz, J. W.; Schmidt, K. E. Conformational analysis of flexible molecules: location of the global minimum energy conformation by the simulated annealing method. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 4373-4376.
200. Cosentino, U.; Moro, G.; Pitea, D.; Scolastico, S.; Todeschini, R.; Scolastico, C. Pharmacophore identification by molecular modeling and chemometrics: the case of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1992**, *6*, 47-60.
201. Todeschini, R.; Consonni, V. Handbook of Molecular Descriptors. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Berlin (Germany). **2000**, 500.
202. Cramer, R. D., III; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 5959-5967.
203. Monev, V. Introduction to similarity searching in chemistry. *MATCH* **2004**, *51*, 7-38.
204. Tools for Structure-Activity Relationship (T.S.A.R.). **1997**.
205. MOE 2001.01, C. C. G. I. **2001**.
206. Hansch, C. Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research* **1969**, *2*, 232-239.
207. Kubinyi, H.; Kehrhahn, O. H. Quantitative structure-activity relationships. 1. The modified Free-Wilson approach. *Journal of Medicinal Chemistry* **1976**, *19*, 578-586.
208. Free, S. M., Jr.; Wilson, J. W. A mathematical contribution to structure-activity studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **1964**, *7*, 395-399.
209. Klein, D. J.; Mihalic, Z.; Plavsic, D.; Trinajstic, N. Molecular topological index: a relation with the Wiener index. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1992**, *32*, 304-305.
210. Hansen, P. J.; Jurs, P. C. Chemical applications of graph theory. Part I. Fundamentals and topological indices. *Journal of Chemical Education* **1988**, *65*, 574-580.
211. Mihalic, Z.; Trinajstic, N. A graph-theoretical approach to structure-property relationships. *Journal of Chemical Education* **1992**, *69*, 701-712.
212. Dykstra, C. E.; Augspurger, J. D.; Kirtman, B.; Malik, D. J. Properties of molecules by direct calculation. *Rev.Comput.Chem.* **1990**, 83-118.

213. Amat, L.; Carbo-Dorca, R.; Ponec, R. Molecular quantum similarity measures as an alternative to log P values in QSAR studies. *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19*, 1575-1583.
214. Dai, J.; Jin, L.; Yao, S.; Wang, L. Prediction of partition coefficient and toxicity for benzaldehyde compounds by their capacity factors and various molecular descriptors. *Chemosphere* **2001**, *42*, 899-907.
215. Verloop, A.; Tipker, J. A comparative study of new steric parameters in drug design. *Pharmacochemistry Library* **1977**, *2*, 63-81.
216. Broto, P.; Moreau, G.; Vandycke, C. Molecular structures: perception, autocorrelation descriptor and SAR studies. Perception of molecules: topological structure and 3-dimensional structure. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1984**, *19*, 61-65.
217. Lien, E. J.; Guo, Z. R.; Li, R. L.; Su, C. T. Use of dipole moment as a parameter in drug-receptor interaction and quantitative structure-activity relationship studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1982**, *71*, 641-655.
218. Karelson, M.; Lobanov, V. S.; Katritzky, A. R. Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies. *Chemical Reviews (Washington, D.C.)* **1996**, *96*, 1027-1043.
219. Boobbyer, D. N. A.; Goodford, P. J.; McWhinnie, P. M.; Wade, R. C. New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. *Journal of Medicinal Chemistry* **1989**, *32*, 1083-1094.
220. Wade, R. C.; Clark, K. J.; Goodford, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, *36*, 140-147.
221. Wade, R. C.; Goodford, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, *36*, 148-156.
222. GRID v.17, M. D. L. **1999**.
223. Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 3233-3243.
224. Back, T. G.; Janzen, L.; Nakajima, S. K.; Pharis, R. P. Effect of Chain Length and Ring Size of Alkyl and Cycloalkyl Side-Chain Substituents upon the Biological Activity of Brassinosteroids. Preparation of Novel Analogues with Activity Exceeding that of Brassinolide. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 3047-3052.
225. Clementi, M.; Clementi, S.; Clementi, S.; Cruciani, G.; Pastor, M.; Nilsson, J. E. Chemometric detection of binding sites of 7TM receptors. *Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity, [Proceedings of the European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships: Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity], 12th, Copenhagen, Denmark, Aug.23-28, 1998* **2000**, 207-212.
226. Mason, J. S.; Morize, I.; Menard, P. R.; Cheney, D. L.; Hulme, C.; Labaudiniere, R. F.

- New 4-Point Pharmacophore Method for Molecular Similarity and Diversity Applications: Overview of the Method and Applications, Including a Novel Approach to the Design of Combinatorial Libraries Containing Privileged Substructures. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 3251-3264.
227. Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**, *16*, 710-718.
228. Goodman, M.; Zapf, C.; Rew, Y. New reagents, reactions, and peptidomimetics for drug design. *Biopolymers (Peptide Science)* **2005**, *60*, 29.
229. Li, H.; Jiang, X.; Ye, Y.-H.; Fan, C.; Romoff, T.; Goodman, M. 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (DEPBT): a new coupling reagent with remarkable resistance to racemization. *Organic Letters* **1999**, *1*, 91.
230. Tang, Y.-C.; Xie, H.-B.; Tian, G.-L.; Ye, Y.-H. Synthesis of cyclopentapeptides and cycloheptapeptides by DEPBT and the influence of some factors on cyclization. *Journal of Peptide Research* **2002**, *60*, 95.
231. Carbo, R.; Leyda, L.; Arnau, M. How similar is a molecule to another? An electron density measure of similarity between two molecular structures. *International Journal of Quantum Chemistry* **1980**, *17*, 1185-1189.
232. Meyer, A. Y.; Richards, W. G. Similarity of molecular shape. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1991**, *5*, 427-439.
233. Hodgkin, E. E.; Richards, W. G. Molecular similarity based on electrostatic potential and electric field. *International Journal of Quantum Chemistry, Quantum Biology Symposium* **1987**, *14*, 105-110.
234. Penguins 1.0, M. D. L. **1999**.
235. Richard, A. M.; Williams, C. R. Distributed structure-searchable toxicity (DSSTox) public database network: a proposal. *Mutation Research* **2002**, *499*, 27-52.
236. Weininger, D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1988**, *28*, 31-36.
237. SYBYL 6.0, T. A. I. **1993**.
238. ALMOND v.2.0, M. I. A. S. r. I. **2000**.
239. Multivariate Infometric Analysis (MIA). **2005**.
240. ASP v 3.2, O. M. L. **1997**.
241. Harimaya, K.; Magome, E.; Tabata, Y.; Sasaki, T.; Tsuruoka, T. Chemical conversion of PR toxin into new eremophilanolides as progesterone receptor ligands. *Meiji Seika Kenkyu Nenpo* **1997**, *36*, 19-27.
242. Brosa, C.; Tournier, L. Comunicació personal, **2002**.
243. Benedetti, P.; Mannhold, R.; Cruciani, G.; Ottaviani, G. GRIND/ALMOND investigations on CysLT1 receptor antagonists of the quinolinyl(bridged)aryl type. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 3607-3617.
244. Fontaine, F.; Pastor, M.; Sanz, F. Incorporating Molecular Shape into the Alignment-

- free GRid-INdependent Descriptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 2805-2815.
245. Kim, T. W.; Chang, S. C.; Lee, J. S.; Hwang, B.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Kim, S. K. Cytochrome P450-catalyzed brassinosteroid pathway activation through synthesis of castasterone and brassinolide in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry (Elsevier)* **2004**, *65*, 679-689.
246. Hong, Z.; Ueguchi-tanaka, M.; Umemura, K.; Uozu, S.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yoshida, S.; Ashikari, M.; Kitano, H.; Matsuoka, M. A rice brassinosteroid-deficient mutant, ebisu dwarf (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *Plant Cell* **2003**, *15*, 2900-2910.
247. Amzallag, G. N.; Goloubinoff, P. An Hsp90 inhibitor, geldanamycin, as a brassinosteroid antagonist: Evidence from salt-exposed roots of *Vigna radiata*. *Plant Biology* **2003**, *5*, 143-150.
248. Stancato, L. F.; Hutchison, K. A.; Krishna, P.; Pratt, W. B. Animal and Plant Cell Lysates Share a Conserved Chaperone System That Assembles the Glucocorticoid Receptor into a Functional Heterocomplex with hsp90. *Biochemistry* **1996**, *35*, 554-561.
249. Dymock, B. W.; Drysdale, M. J.; McDonald, E.; Workman, P. Inhibitors of HSP90 and other chaperones for the treatment of cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2004**, *14*, 837-847.
250. Soga, S.; Shiotsu, Y.; Akinaga, S.; Sharma, S. V. Development of radicicol analogues. *Current Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 359-369.
251. Tian, Z. Q.; Liu, Y.; Zhang, D.; Wang, Z.; Dong, S. D.; Carreras, C. W.; Zhou, Y.; Rastelli, G.; Santi, D. V.; Myles, D. C. Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 5317-5329.
252. Jones, D. T.; Addison, E.; North, J. M.; Lowdell, M. W.; Hoffbrand, A. V.; Mehta, A. B.; Ganeshaguru, K.; Folarin, N. I.; Wickremasinghe, R. G. Geldanamycin and herbimycin A induce apoptotic killing of B chronic lymphocytic leukemia cells and augment the cells' sensitivity to cytotoxic drugs. *Blood* **2004**, *103*, 1855-1861.
253. Uehara, Y. Natural product origins of Hsp90 inhibitors. *Current Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 325-330.
254. Wright, L.; Barril, X.; Dymock, B.; Sheridan, L.; Surgenor, A.; Beswick, M.; Drysdale, M.; Collier, A.; Massey, A.; Davies, N.; Fink, A.; Fromont, C.; Aherne, W.; Boxall, K.; Sharp, S.; Workman, P.; Hubbard, R. E. Structure-Activity Relationships in Purine-Based Inhibitor Binding to HSP90 Isoforms. *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 775-785.
255. Liu, H. C.; Lyu, P. C.; Leong, M. K.; Tsai, K. C.; Hsiue, G. H. 3D-QSAR studies on PU3 analogues by comparative molecular field analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 731-734.
256. Brosa, C.; Peracaula, R.; Puig, R.; Ventura, M. Use of dihydroquinidine 9-O-(9'-phenanthryl) ether in osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation in the synthesis of brassinosteroids. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 7057-7060.
257. Brosa, C.; Zamora, I.; Terricabras, E.; Kohout, L. The effect of electrostatic properties and ability to form hydrogen-bonds on the activity of brassinosteroid side-chain analogs. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1998**, *63*,

1635-1645.

258. Uesusuki, S.; Watanabe, B.; Yamamoto, S.; Otsuki, J.; Nakagawa, Y.; Miyagawa, H. Synthesis of brassinosteroids of varying acyl side chains and evaluation of their brassinolide-like activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2004**, *68*, 1097-1105.
259. Zamora, I. Comunicació personal, **2004**.
260. Todoroki, Y.; Hirai, N. Abscisic acid analogs for probing the mechanism of abscisic acid reception and inactivation. *Studies in Natural Products Chemistry* **2002**, *27*, 321-360.
261. Hoekstra, W. J.; Maryanoff, B. E.; Damiano, B. P.; Andrade-Gordon, P.; Cohen, J. H.; Costanzo, M. J.; Haertlein, B. J.; Hecker, L. R.; Hulshizer, B. L.; Kauffman, J. A.; Keane, P.; McComsey, D. F.; Mitchell, J. A.; Scott, L.; Shah, R. D.; Yabut, S. C. Potent, Orally Active GPIIb/IIIa Antagonists Containing a Nipecotic Acid Subunit. Structure-Activity Studies Leading to the Discovery of RWJ-53308. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 5254-5265.
262. Herforth, C.; Wiesner, J.; Franke, S.; Golisade, A.; Jomaa, H.; Link, A. Antimalarial Activity of N6-Substituted Adenosine Derivatives (Part 2). *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4*, 302-314.
263. Herforth, C.; Wiesner, J.; Heidler, P.; Sanderbrand, S.; Van Calenbergh, S.; Jomaa, H.; Link, A. Antimalarial activity of N6-substituted adenosine derivatives. Part 3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 755-762.
264. Hoekstra, W. J.; Beavers, M. P.; ndrade-Gordon, P.; Evangelisto, M. F.; Keane, P. M.; Press, J. B.; Tomko, K. A.; Fan, F.; Kloczewiak, M. Design and Evaluation of Nonpeptide Fibrinogen g Chain-Based GPIIb/IIIa Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 1582-1592.
265. Hirst, S., I; Stapley, L. A. Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitology today (Personal ed.)* **2000**, *16*, 1-3.
266. Heidler, P. H.; Herforth, C.; Link, A. Synthesis and Antimalarial Activity of Novel N6-Substituted Adenosine Derivatives. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, *22*, 977-979.
267. Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **20-8-1976**, *193*, 673-675.
268. Ancelin, M. L.; Calas, M.; Bompard, J.; Cordina, G.; Martin, D.; Bari, M. B.; Jei, T.; Druilhe, P.; Vial, H. J. Antimalarial activity of 77 phospholipid polar head analogs: close correlation between inhibition of phospholipid metabolism and in vitro Plasmodium falciparum growth. *Blood* **1998**, *91*, 1426-1437.
269. Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**, *16*, 710-718.
270. Brosa, C. Biological effects of brassinosteroids. In *Biochemistry and Function of Sterols*. Parish, E. J.; Nes, W. D. Editors. CRC, Boca Raton. **1997**, 201-220.
271. Adam, G.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Schneider, B.; Voigt, B. New developments in brassinosteroid research. *Studies in Natural Products Chemistry* **1996**, *18*, 495-549.
272. Takeno, K.; Pharis, R. P. Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf

- rice seedlings: an auxin-mediated phenomenon. *Plant and Cell Physiology* **1982**, 23, 1275-1281.
273. Baron, D. L.; Luo, W.; Janzen, L.; Pharis, R. P.; Back, T. G. Structure-activity studies of brassinolide B-ring analogs. *Phytochemistry* **1998**, 49, 1849-1858.
274. Back, T. G.; Janzen, L.; Nakajima, S. K.; Pharis, R. P. Synthesis and Biological Activity of 25-Methoxy-, 25-Fluoro-, and 25-Azabassinolide and 25-Fluorocastasterone: Surprising Effects of Heteroatom Substituents at C-25. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 5494-5498.
275. DeCIPHER 2.9.7. **1995**.
276. Miyagawa, H.; Mizugai, Y. Cut-off radius for diffusion molecular dynamics. *Bunko Kenkyu* **2003**, 52, 239-240.
277. Voet, D.; Voet, J. G. Editor. *Biochemistry: Second Edition*. Wiley, Nova York (EUA). **1995**, 1361.
278. Davis, A. M.; Teague, S. J. Hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and failure of the rigid receptor hypothesis. *Angewandte Chemie, International Edition* **1999**, 38, 736-749.
279. Maiorov, V. N.; Crippen, G. M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *Journal of Molecular Biology* **1994**, 235, 625-634.
280. Lesk, A. M. Extraction of well-fitting substructures: root-mean-square deviation and the difference distance matrix. *Folding & Design* **1997**, 2, S12-S14.
281. Goto, J.; Kataoka, R.; Hirayama, N. Ph4Dock: Pharmacophore-Based Protein-Ligand Docking. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, 6804-6811.
282. Rayan, A.; Senderowitz, H.; Goldblum, A. Exploring the conformational space of cyclic peptides by a stochastic search method. *Journal of molecular graphics & modelling* **2004**, 22, 319-333.
283. Akao, H.; Kiyota, H.; Nakajima, T.; Kitahara, T. Synthesis of dendryphiellin C, a trinorsesquiterpene from a marine source. *Tetrahedron* **1999**, 55, 7757-7770.
284. Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. A rapid esterification by mixed anhydride and its application to large-ring lactonization. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1979**, 52, 1989-1993.
285. Berger, M.; Mulzer, J. Total Synthesis of Tartrolon B. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 8393-8394.
286. Hoefle, G.; Steglich, W. 4-Dialkylaminopyridines as acylation catalysts. III. Acylation of sterically hindered alcohols. *Synthesis* **1972**, 619-621.
287. Guerriero, A.; D'Ambrosio, M.; Cuomo, V.; Vanzanella, F.; Pietra, F. Novel trinoreremophilanes (dendryphiellin B, C, and D), eremophilanes (dendryphiellin E, F, and G), and branched C9-carboxylic acids (dendryphiellin acid A and B) from the marine deuteromycete *Dendryphiella salina* (Sutherland) Pugh and Nicot. *Helvetica Chimica Acta* **1989**, 72, 438-446.
288. Ramirez, F.; Pilot, J. F.; Desai, N. B.; Smith, C. P.; Hansen, B.; McKelvie, N. New type of stable tetrapolar phosphorus ylide. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89, 6273-6276.



289. Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th Edition. **2000**, 1824.
290. Bestmann, H. J. New reactions of alkylidene phosphoranes and their preparative possibilities. I. Acid-base character of phosphonium salts and alkylidene phosphoranes. *Angew.Chem.* **1965**, *77*, 609-613.
291. Buchta, E.; Andree, F. A total synthesis of all-trans-crocetin dimethyl ester. *Chemische Berichte* **1960**, *93*, 1349-1353.
292. Zeliger, H. I.; Snyder, J. P.; Bestman, H. J. Ylide structure. II. Rotational dynamics of (methoxycarbonylmethylene)triphenylphosphoranes by N.M.R. *Tetrahedron Letters* **1969**, 2199-2202.
293. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.; Editors. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. **1995**, 364.
294. Pretsch, E.; Buehlmann, P.; Affolter, C. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, 3rd Completely Revised and Enlarged Edition. **2000**, 421.
295. Zarbin, P. H. G.; Yonashiro, M.; Perissini, W., Jr. An alternative route for the synthesis of (E)-(+)-(S)-5-methylhept-2-en-4-one (Filbertone). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1998**, *9*, 583-585.
296. Zarbin, P. H. G.; Arrigoni, E. D. B.; Reckziegel, A.; Moreira, J. A.; Baraldi, P. T.; Vieira, P. C. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *Journal of Chemical Ecology* **2003**, *29*, 377-386.
297. Tyrrell, E.; Skinner, G. A.; Janes, J.; Milsom, G. The use of chiral dithianes for the synthesis of chiral  $\alpha$ -oxo- $\beta$ -alkyl and chiral  $\alpha$ -oxo- $\beta$ -aryl esters. *Synlett* **2002**, 1073-1076.
298. Takano, D.; Nagamitsu, T.; Ui, H.; Shiomi, K.; Yamaguchi, Y.; Masuma, R.; Kuwajima, I.; Omura, S. Absolute configuration of nafuredin, a new specific NADH-fumarate reductase inhibitor. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 3017-3020.
299. Portonovo, P.; Liang, B.; Joullie, M. M. A practical stereoselective synthesis of (2R,3S)-alloisoleucine. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1451-1455.
300. El Hadrami, M.; Lavergne, J. P.; Viallefont, P.; Itto, M. Y. A.; Hasnaoui, A. Synthesis of (2S,4S,6S)-2-amino-6-hydroxy-4-methyl-8-oxodecanoic acid and (4S,E)-4-methylhex-2-enoic acid constituents of leucinostatins. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 3985-3988.
301. Fox, C. M.; Hiner, R. N.; Warrier, U.; White, J. D. An enantiospecific synthesis of the spiroketal portion of avermectin B1a. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 2923-2926.
302. Jauch, J.; Schmalzing, D.; Schurig, V.; Emberger, R.; Hopp, R.; Koepsel, M.; Silberzahn, W.; Werkhoff, P. Isolation, synthesis and absolute configuration of filbertone, the active principle of hazelnut aroma. *Angewandte Chemie* **1989**, *101*, 1039-1041.
303. Badin, E. J.; Pacsu, E. Mechanism of catalytic hydrogenation and dehydrogenation of aldehydes and alcohols. *Journal of the American Chemical Society* **1944**, *66*, 1963-1968.
304. Cheng, Y. S.; Liu, W. L.; Chen, S. H. Pyridinium chlorochromate adsorbed on alumina as a selective oxidant for primary and secondary alcohols. *Synthesis* **1980**, 223-224.

305. Weast, R. C.; Editor. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 68th Ed. **1987**, 2464.
306. Chavan, S. P.; Tejwani, R. B.; Ravindranathan, T. A Switch of Reactivity Profile in Ionic Intramolecular Annulation Reactions: A Short and Efficient Synthesis of D-(+)-Biotin. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 6197-6201.
307. Toshima, K.; Tatsuta, K.; Kinoshita, M. Total synthesis of elaiophyllin (azalomycin B). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1988**, *61*, 2369-2381.
308. Hanessian, S.; Botta, M. Methodology for the polyene and related antibiotics. Versatile and practical access to bifunctional all-trans polyolefinic systems. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 1151-1154.
309. Hanessian, S.; Ugolini, A.; Dube, D.; Hodges, P. J.; Andre, C. Synthesis of (+)-avermectin B1a. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 2776-2778.
310. Carballeira, N.; Thompson, J. E.; Ayanoglu, E.; Djerassi, C. Biosynthetic studies of marine lipids. 5. The biosynthesis of long-chain branched fatty acids in marine sponges. *Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 2751-2756.
311. Takikawa, H.; Nozawa, D.; Mori, K. Synthesis and absolute configuration of stelletadine A, a bisguanidinium alkaloid isolated from a marine sponge *Stelletta* sp. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2001**, 657-661.
312. Amri, H.; Rambaud, M.; Villieras, J.  $\alpha$ -Methylene esters from the substitution of ethers and acetates of ethyl  $\alpha$ -(hydroxymethyl)acrylates. *Journal of Organometallic Chemistry* **1990**, *384*, 1-11.
313. Mohrig, J. R.; Vreede, P. J.; Schultz, S. C.; Fierke, C. A. Stereospecific reduction of 2,3-epoxybutanoic acid. Synthesis of (R,R)- and (S,S)-3-hydroxybutanoic-2- $\delta$  acid and S-tert-butyl 3-acetoxythiobutanoate-2- $\delta$ . *Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 4655-4658.
314. Horita, K.; Yoshioka, T.; Tanaka, T.; Oikawa, Y.; Yonemitsu, O. On the selectivity of deprotection of benzyl, MPM (4-methoxybenzyl) and DMPM (3,4-dimethoxybenzyl) protecting groups for hydroxy functions. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3021-3028.
315. Oikawa, Y.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O. Specific removal of O-methoxybenzyl protection by DDQ oxidation. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*, 885-888.
316. Okamura, H.; Kuroda, S.; Ikegami, S.; Ito, Y.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. A formal total synthesis of aplysiatoxin. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 5141-5142.
317. Sviridov, A. F.; Ermolenko, M. S.; Yashundkii, D. V.; Borodkin, V. S.; Kochetkov, N. K. Total synthesis of erythronolide B. 2. Skeleton assembly in (C5-C9) + (C3-C4) + (C1-C2) + (C11-C13) sequence. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 3839-3842.
318. Marco, J. L.; Hueso-Rodriguez, J. A. Synthesis of optically pure 1-(3-furyl)-1,2-dihydroxyethane derivatives. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 2459-2462.
319. Eh, M.; Schomburg, D.; Schicht, K.; Kalesse, M. An efficient synthesis of radicinin analogs. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8983-8992.
320. Nakajima, N.; Horita, K.; Abe, R.; Yonemitsu, O. MPM (4-methoxybenzyl)-protection of hydroxy functions under mild acidic conditions. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 4139-4142.
321. Wessel, H. P.; Iversen, T.; Bundle, D. R. Acid-catalyzed benzylation and allylation by

- alkyl trichloroacetimidates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1985**, 2247-2250.
322. Luo, W.; Janzen, L.; Pharis, R. P.; Back, T. G. Bioactivity of brassinolide methyl ethers. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 637-642.
323. Allinger, N. L. *Organic Chemistry*. **1980**, 1618.
324. Brewster, R. Q.; Vanderwerf, C. A.; McEwen, W. E. *Unitized Experiments in Organic Chemistry*. 4th Ed. **1977**, 577.
325. Garlaschelli, L.; Vidari, G. Synthetic studies on biologically active natural compounds. Part I. Stereospecific transformation of uvidin A into (-)-cinnamodial. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7371-7378.
326. Marcos, I. S.; Oliva, I. M.; Diez, D.; Basabe, P.; Lithgow, A. M.; Moro, R. F.; Garrido, N. M.; Urones, J. G. Approach to the synthesis of diterpenes with the bicyclo[5.3.0]decane system: (+-) 10-epi-tormesol. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12403-12416.
327. Paryzek, Z.; Wydra, R. Reaction of some trisubstituted steroid epoxides with triphenylphosphine-iodine complex. Deoxygenation of epoxides. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 2601-2604.
328. Behan, J. M.; Johnstone, R. A. W.; Wright, M. J. Stereospecific conversion of epoxides into olefins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1975**, 1216-1217.
329. Caló, V.; Lopez, L.; Mincuzzi, A.; Pesce, G. 3-Methyl-2-selenoxobenzothiazole, a new reagent for the stereospecific deoxygenation of epoxides and the desulfurization of episulfides into olefins. *Synthesis* **1976**, 200-201.
330. Clive, D. L. J.; Menchen, S. M. Alkali Metal O,O-diethyl phosphorotelluroates, a reagent class for deoxygenation of epoxides, especially terminal epoxides. *Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45*, 2347-2354.
331. Garlaschelli, L.; Vidari, G. Direct conversion of epoxides into alkenes via iodohydrins by in situ generated hydriodic acid. *Gazzetta Chimica Italiana* **1987**, *117*, 251-253.
332. Ogawa, A.; Miyake, J. i.; Murai, S.; Sonoda, N. Selenocarboxamides as new reagents for stereospecific deoxygenation of epoxides under mild conditions. *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 669-672.
333. Sonnet, P. E. A convenient stereospecific reduction of epoxides and iodohydrins to alkenes. *Synthesis* **1980**, 828-830.
334. Campbell, K. N.; Sommers, A. H.; Campbell, B. K. Preparation of unsymmetrical secondary aliphatic amines. *Journal of the American Chemical Society* **1944**, *66*, 82-84.
335. Bonini, C.; Righi, G. A critical outlook and comparison of enantioselective oxidation methodologies of olefins. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4981-5021.
336. Smith, J. G. Synthetically useful reactions of epoxides. *Synthesis* **1984**, 629-656.
337. Xiong, Z.; Zhou, G.; Yang, J.; Chen, Y.; Li, Y. An efficient stereocontrolled synthesis of (-)-10-epi-5 $\beta$ ,11-dihydroxyeudesmane and (-)-4,10-epi-5 $\beta$ ,11-dihydroxyeudesmane. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1525-1530.

338. Rickborn, B.; Thummel, R. P. Stereoselectivity of the base-induced conversion of epoxides to allylic alcohols. *Journal of Organic Chemistry* **1969**, *34*, 3583-3586.
339. Rickborn, B.; Thummel, R. P. Base-induced rearrangement of epoxides to allylic alcohols. III. Alkylidenecycloalkane oxides. *Journal of Organic Chemistry* **1971**, *36*, 1365-1368.
340. Crandall, J. K.; Chang, L. H. Base-promoted reactions of epoxides. I. Isomerization of some cyclic and acyclic epoxides by lithium diethylamide. *Journal of Organic Chemistry* **1967**, *32*, 435-439.
341. Mayr, H.; Koschinsky, R.; Will, E.; Bauml, E. Acid- and base-catalyzed ring-opening reactions of a sterically hindered epoxide. *Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*, 1342-1344.
342. Hodgson, D. M.; Gibbs, A. R.; Lee, G. P. Enantioselective desymmetrization of achiral epoxides. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14361-14384.
343. Cox, P. J.; Simpkins, N. S. Asymmetric synthesis using homochiral lithium amide bases. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 1-26.
344. Sharpless, K. B.; Lauer, R. F. Mild procedure for the conversion of epoxides to allylic alcohols. First organoselenium reagent. *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 2697-2699.
345. Inoue, T.; Uchamaru, T.; Mukaiyama, T. Isomerization of oxiranes to allylic alcohols with dialkylboryl trifluoromethanesulfonates. *Chemistry Letters* **1977**, 1215-1218.
346. Terao, S.; Shiraishi, M.; Kato, K. A facile synthesis of allylic alcohols. *Synthesis* **1979**, 467-468.
347. Schilling, G.; Schiller, C.; Otto, S. Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants. *ACS Symposium Series* **1991**, *474*, 208-219.
348. Wilen, R. W.; Sacco, M.; Gusta, L. V.; Krishna, P. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiologia Plantarum* **1995**, *95*, 195-202.
349. Katsumi, M. Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth. *ACS Symposium Series* **1991**, *474*, 246-254.
350. He, R.; Wang, G.; Wang, X. Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings. *ACS Symposium Series* **1991**, *474*, 220-230.
351. Kamuro, Y.; Takatsuto, S. Capability for and problems of practical uses of brassinosteroids. *ACS Symposium Series* **1991**, *474*, 292-297.
352. Bernstein, L. Physiological basis of salt tolerance in plants. *Basic Life Sciences* **1977**, *8*, 283-290.
353. Amoabin, S.; Paleg, L. G.; Aspinall, D. The effect of 2-chloroethyltrimethyl ammonium chloride (CCC) on stomatal diffusive resistance in tomato. *Journal of Plant Physiology* **1986**, *122*, 437-444.
354. Hurkman, W. J.; Tanaka, C. K. The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiology* **1987**, *83*, 517-524.
355. Anuradha, S.; Ram Rao, S. S. Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic

- pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regulation* **2003**, *40*, 29-32.
356. Vardhini, B. V.; Rao, S. S. R. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation* **2003**, *41*, 25-31.
357. Muthukumarasamy, M.; Panneerselvam, R. Amelioration of NaCl stress by triadimefon in peanut seedlings. *Plant Growth Regulation* **1997**, *22*, 157-162.
358. Mitchell, J. W.; Gregory, L. E. Enhancement of overall plant growth, a new response to brassins. *Nature (London), New Biology* **1972**, *239*, 253-254.
359. Planas, A.; Durany, O. Comunicació personal, **1996**.