



Universitat Ramon Llull

TESI DOCTORAL

Títol DESENVOLUPAMENT DE NOUS COMPOSTOS
AMB ACTIVITAT BRASSINOESTEROIDE
MITJANÇANT MODELITZACIÓ MOLECULAR I SÍNTESI

Realitzada per ENRIC CAPDEVILA URBANEJA

en el Centre ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR IQS

i en el Departament QUÍMICA ORGÀNICA

Dirigida per Dra. CARME BROSA BALLESTEROS
Dr. ISMAEL ZAMORA RICO

*A la Isabel,
al meu germà Xavier,
i als meus Pares*

Més lluny, heu d'anar més lluny (...)
més lluny del demà que ara ja s'acosta.
I quan creieu que arribeu, sapigheu trobar noves sendes.

Viatge a Itaca (fragment), Lluís Llach.

Adaptat del poema original de Konstantin Kavafis

Sapere Aude

Immanuel Kant

Abans de res, m'agradaria molt agrair l'ajuda de les següents persones en la realització d'aquest treball.

A la Dra. Carme Brosa, en primer lloc per haver-me donat la oportunitat de realitzar la Tesi Doctoral a la Secció d'Esteroides del IQS. Però, sobretot, per la teva gran proximitat i amistat que has tingut amb mi per poder anar comentant tot allò que ha anat sorgint durant aquests anys de feina i, en especial, per la dosi de llibertat que m'has concedit per encarar aquest treball.

Al Dr. Ismael Zamora, per la teva gran disponibilitat per resoldre els dubtes que han anat sorgint en l'àmbit computacional, per les teves voluoses contribucions i per la gran quantitat de mètodes innovadors de que m'has permès disposar per desenvolupar aquest treball.

Als meus TFCs, el Miguel, l'Edu, l'Anna i el Jaume, per tot allò que m'heu permès aprendre al vostre costat, per la vostra confiança i per la qualitat de la feina que heu fet al laboratori, amb els ordinadors i a la cambra de bioassajos.

A tots els companys del Laboratori d'Esteroides, amb qui he compartit moments molt bonics durant aquests darrers anys. Voldria agrair al Dr. Iban Jové els seus consells i la seva ajuda en la meva època de TFC, i als Drs. Meritxell Molist i Marc Vilaplana, el seu suport i el seu recolzament en els darrers anys de Tesi. Així mateix, voldria fer una menció al nostre entranyable Laboratori d'Esteroides, pel caràcter especial que crec que confereix a tots els que hi hem passat i per la seva ànima, de *ciència* acumulada al llarg de dècades, que desprenia.

I want to thank a lot Dr. Cruciani, to have offered me the possibility to perform a stage in the Laboratorio di Chimimetria of the Università Degli Studi di Perugia. To work in your laboratory, with such a creative atmosphere ready to develop new ideas, have been an amazing experience that I will always remember. Thanks a lot to Dr. Emanuele Carosati, for your great daily help, to Dr. Massimo Baroni, Dr. Paolo Benedetti and to the rest of the laboratory members.

Al Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i el Fons Social Europeu, per haver-me concedit la beca predoctoral amb la que s'ha pogut dur a terme aquest treball.

Al Dr. Xavier Batllori, per la gran disponibilitat i la seva ajuda en la interpretació d'espectres de RMN.

Al Dr. Guillem Plasencia i a en Xavier Rovira, per la vostra ajuda i la vostra cordial atenció quan he vingut a Sant Cugat a resoldre algun dubte o a realitzar càlculs.

A tots els amics que m'heu acompanyat durant tots aquests anys. Gràcies per la vostra amistat i pels bons moments que hem compartit.

A tots els professors i altre personal docent que he tingut en els dos centres que m'han format i m'han vist créixer: als de l'Institut Químic de Sarrià, per haver-me fet apreciar i entendre la química, i sentir-la com a vocació; i, amb un record molt especial, als del Col·legi Jesús, Maria i Josep, per la base formativa i, sobretot, personal, que em van donar.

A tota la meva família, pel recolzament i l'estimació que sempre m'ha donat.

Al meu germà Xavier, per haver-me fet sentir sempre que t'he tingut al meu costat.

A la Isabel, pels teus ànims diaris i el teu suport durant tots aquests darrers anys. Per la teva comprensió en les èpoques més dures i de més feina, en les que sempre has estat amb mi i m'ha motivat a seguir endavant. Pels moments que hem viscut plegats durant aquesta Tesi, especialment els dies inolvidables a la Umbria i a Perugia (hi tornarem!) i, en especial, pel teu amor i per tot allò que vindrà i que tinc moltes ganes de viure al teu costat.

I, especialment, als meus pares, per la possibilitat que m'heu donat de realitzar aquesta Tesi Doctoral, per les comoditats i les facilitats que sempre m'heu ofert. Per estar, ara i desde sempre, incondicionalment al meu costat, per haver animat a seguir endavant amb aquest projecte i a portar-lo a bon terme. Així mateix, moltes gràcies, pare, per la teva companyia cada matí al acompanyar-me al laboratori.

ABREVIATURES USADES EN LA DISCUSSIÓ DE RESULTATS

AC	Conformació Activa <i>Active Conformation</i>
BL	Brassinolida (1) <i>Brassinolide (1)</i>
BR	Brassinoesteroide <i>Brassinosteroid</i>
CS	Castasterona (2) <i>Castasterone (2)</i>
HBL	28-homobrassinolida (3) <i>28-homobrassinolide (3)</i>
HCS	28-homocastasterona (11) <i>28-homocastasterone (11)</i>
MIF	Camp d'interacció molecular <i>Molecular Interaction Field</i>
PCA	Anàlisi de Components Principals <i>Principal Component Analysis</i>
PLS	Mínims Quadrats Parcials <i>Partial Least Squares</i>
QSAR	Relació Quantitativa Estructura-Activitat <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RLIT	Test d'inclinació de la làmina d'arròs <i>Rice Lamina Inclination Test</i>
SAR	Relació Estructura-Activitat <i>Structure-Activity Relationship</i>
SI	Índex de similitud <i>Similarity Index</i>
VRS	Lloc d'unió virtual <i>Virtual Receptor Site</i>

SUMARI

SUMARI

Els brassinoesteroides són fitohormones naturals que ofereixen un potencial molt prometedor per a ser aplicats a l'agricultura. L'elevat cost d'obtenció d'aquests compostos ha estimulat la recerca d'anàlegs que ofereixin una bona relació entre la seva activitat biològica i el seu cost d'obtenció.

En aquest sentit, es creu interessant la cerca de compostos d'estructura no esteroïdal amb activitat brassinosteroides mitjançant mètodes computacionals. S'han plantejat dos enfocaments: per una banda, trobar noves molècules i, per l'altra, buscar estructures que puguin mimetitzar només l'esquelet esteroïdal d'anàlegs brassinoesteroides androstànics actius per a, posteriorment, ancorar-hi la cadena addient.

Amb la primera aproximació s'han realitzat processos de *virtual screening* sobre bases de dades de *screening compounds* comercials mitjançant tan un model de QSAR desenvolupat amb descriptors independents de l'alineament, amb el programa ALMOND, com l'aplicació de la metodologia FLAP. Després d'un procés de filtració, s'han proposat una sèrie de candidats, l'activitat dels quals ha estat avaluada amb el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT). En total, s'han trobat 7 *hits*, 4 dels quals formen una sèrie en la que comparteixen l'estructura de *N*-(2-hidroxiètil)piperazina. Aquests compostos es plantegen com a nous referents per obtenir estructures no esteroïdals amb activitat brassinosteroides.

Per altra banda, amb la segona aproximació, s'ha aplicat la metodologia de *scaffold hopping* amb el programa SHOP per trobar estructures que puguin mimetitzar esquelets androstànics brassinoesteroides. Aquesta metodologia s'ha aplicat sobre dues bases de dades: una de *building blocks* comercials i una dissenyada *ad hoc* prenent com a referència estructures basades en coneixements previs. Després d'una etapa de selecció mitjançant alineaments flexibles efectuats amb el programa MOE, 11 estructures han estat proposades per a la síntesi d'anàlegs.

S'ha intentat la síntesi de 3 nous compostos a partir d'estructures anàlogues de l'esquelet androstànic escollides preliminarment. Els grups protectors escollits i les condicions de reacció assajades no han rendit els compostos desitjats però han proporcionat informació per afrontar la síntesi de futurs anàlegs brassinoesteroides amb estructures no esteroïdals.

ÍNDEX

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	7
1. ELS BRASSINOESTEROIDES (BRS)	9
1.1. Generalitats	9
1.2. Relacions estructura-activitat (SAR)	10
1.3. Relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR)	12
2. CERCA DE NOUS ANÀLEGS AMB DESCRIPTORS INDEPENDENTS DE L'ALINEAMENT ..	15
OBJECTIUS	19
CHAPTER 1: COMPUTATIONAL CHEMISTRY	23
1. THEORY AND METHODS	25
1.1. Molecular modelling	25
1.1.1. Energy	25
1.1.2. Molecular mechanics: the force field	25
1.1.3. Conformational analysis	26
1.2. Drug discovery methods	26
1.3. Molecular descriptors	28
1.3.1. GRID descriptors	28
1.3.2. GRIND descriptors (<i>GRid-INdependent Descriptors</i>)	29
1.3.3. SHOP descriptors	33
1.3.4. FLAP methodology	36
1.3.4.1. New version of FLAP	37
1.4. Data processing	38
1.4.1. Similarity indexes	38
1.4.1.1. Carbó similarity index	38
1.4.1.2. Hodgkin similarity index	38
1.4.1.3. Tanimoto similarity index	39
1.4.2. Multivariate analysis	39
1.4.2.1. Principal Component Analysis (PCA)	39
1.4.2.2. Partial Least Square (PLS)	40
1.5. Molecular alignment	41
2. APPLICATION OF COMPUTATIONAL METHODS TO FIND NEW BR-LIKE COMPOUNDS ..	43
2.1. Introduction	43
2.2. 3D-QSAR model for brassinosteroids (BRs) using GRIND descriptors	45
2.2.1. Data set	45
2.2.2. Compound selection for the training set	53
2.2.2.1. Conformer generation	53
2.2.2.2. Choice of the compounds for the training set	53
2.2.2.3. Conformer selection of the compounds of the training set	54
2.2.3. Quantitative models	54
2.2.4. Virtual Screening	60
2.2.4.1. Compound database pre-treatment	60
2.2.4.2. First step: similarity index calculation	60
2.2.4.3. Second step: Activity prediction with a QSAR model	62
2.2.4.4. Third step: Flexible alignment with BL (1)	63
2.2.4.5. Activity evaluation	68
2.3. Use of FLAP methodology to find new BR analogues	71
2.3.1. Definition of the template BL (1)	71
2.3.2. Setting of the calculation configuration for the virtual screening	73
2.3.2.1. Generic criterion calculation	73
2.3.2.2. Specific criterion calculation	75
2.3.3. Comparison of the two methods	78
2.3.4. Ligand-based virtual screening using 1 st generation FLAP	78
2.3.5. Refining of the candidates using a more recent FLAP procedure	79

ÍNDIX

2.3.6. Activity evaluation with the Rice Lamina Inclination Test (RLIT)	84
2.4. Application of the SHOP methodology to find new BR-like compounds.....	87
2.4.1. Aim	87
2.4.2. Database generation.....	88
2.4.2.1. <i>Ad hoc</i> designed database.....	89
2.4.2.2. Commercial building blocks database.....	90
2.4.3. Methodology.....	94
2.4.3.1. Database generation.....	94
2.4.3.2. Search procedure.....	94
2.4.3.3. Analysis of the results and refining	94
2.4.3.3.1. Analysis of the results given by the <i>ad hoc</i> designed database	95
2.4.3.3.1.1. Compound 233 as template	95
2.4.3.3.1.2. Compound 234 as template	101
2.4.3.3.2. Analysis of the results given by the commercial compounds database.....	104
2.4.3.3.2.1. Compound 233 as template	104
2.4.3.3.2.2. Compound 234 as template	109
2.4.3.4. List of candidates	113
2.4.4. Study of the groups of the <i>ad hoc</i> database	114
<u>CAPÍTOL 2: SÍNTESI</u>	119
1. SUBSTITUCIÓ DE L'ESQUELET ESTEROÏDAL DELS COMPOSTOS 6 I 7.....	121
2. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 283.....	123
2.1. Protecció de la cadena lateral.....	123
2.1.1. Intent de protecció selectiva de l'hidroxil de 5	123
2.1.2. Síntesi d'àcid (<i>R</i>)-2-benziloxi-2-ciclohexilacètic (287)	125
2.2. Protecció de l'esquelet	125
2.3. Síntesi del compost 291	125
2.3.1. Intent de síntesi del compost 291 pel mètode de Yamaguchi	126
2.3.2. Intent de síntesi del compost 291 pel mètode de Steglich	127
2.3.3. Intent de síntesi del compost 291 amb 1,1'-carbonildiimidazole (CDI).....	128
2.3.4. Esterificació via clorur d'acil.....	129
2.4. Intent de síntesi del compost 283	129
3. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 284.....	131
3.1. Síntesi de benzoilacetat de metil (302)	133
3.2. Intent de síntesi del compost 300	133
3.3. Intent de síntesi del compost 305	135
4. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 285.....	136
4.1. Síntesi de l'àcid (<i>R</i>)-2-ciclohexil-2-metoxiacètic (307).....	136
4.1.1. Síntesi de 308	137
4.1.2. Síntesi de 307	137
4.2. Síntesi del compost 309	138
4.3. Síntesi del compost 312	138
4.4. Intent de síntesi del compost 285	139
5. MESURA DE L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DE 291, 312 I DE 316 AMB EL RLIT	143
<u>CONCLUSIONS</u>.....	145
<u>PART EXPERIMENTAL</u>	151
Agraïments.....	153

ÍNDIX

1. Abreviatures	154
2. Purificació de dissolvents	154
3. Control de reacció	154
4. Atmosfera inerta	155
5. Separació cromatogràfica	155
5.1. Cromatografia convencional.....	155
5.2. Cromatografia flash	155
5.3. Cromatografia líquida de baixa pressió.....	156
5.4. Cromatografia preparativa.....	156
6. Dades espectroscòpiques.....	156
6.1. Espectres d'infraroig (IR).....	156
6.2. Espectres de ressonància magnètica nuclear de protó (¹ H-RMN)	156
6.3. Espectres de ressonància magnètica nuclear de carboni 13 (¹³ C-RMN)	156
6.4. Espectre de masses de ionització química d'alta resolució (EM-AR)	157
7. Dades físiques.....	157
7.1. Rotació òptica.....	157
7.2. Punt de fusió.....	157
1. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 283.....	158
1.1. Intent de síntesi d'àcid (<i>R</i>)-benziloxiciclohexilacètic (287).....	158
1.2. Síntesi de (<i>R</i>)-hexahidromandelat de metil (288)	158
1.3. Síntesi de (<i>R</i>)-2-benziloxi-2-ciclohexilacetat de metil (289).....	158
1.4. Síntesi de l'àcid (<i>R</i>)-2-benziloxi-2-ciclohexilacètic (287).....	159
1.5. Síntesi del compost 290	160
1.6. Síntesi del compost 291	160
1.6.1. Síntesi de propionat de fenil.....	160
1.6.2. Intent de síntesi del compost 291 pel mètode de Yamaguchi en toluè	160
1.6.3. Intent de síntesi del compost 291 pel mètode de Yamaguchi en piridina	161
1.6.4. Intent de síntesi del compost 291 pel mètode de Yamaguchi en THF	162
1.6.5. Intent de síntesi del compost 291 amb el mètode de Steglich	162
1.6.6. Intent de síntesi del compost 291 amb 1,1'-carbonildiimidazole (CDI).....	163
1.6.7. Síntesi del compost 291 amb diclorur d'oxalil i DMF	163
1.6.8. Intent de síntesi del compost 283	164
1.6.8.1. Desprotecció del compost 290	164
1.6.8.2. Intent de desprotecció completa del compost 291	164
2. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 284.....	165
2.1. Síntesi de benzoïlacetat de metil (302).....	165
2.2. Intent de síntesi del compost 300	165
2.2.1. Preparació del parell Zn/Cu	165
2.2.2. Intent de síntesi del compost 300	165
2.2.3. Síntesi del compost 304	165
2.2.4. Intent de síntesi del compost 300	166
2.2.5. Intent de síntesi del compost 305	167
3. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 285.....	168
3.1. Síntesi del compost 308	168
3.2. Síntesi del compost 307	169
3.3. Síntesi del compost 309	169
3.4. Síntesi del compost 312	170
3.5. Desprotecció de metoxils del compost 312	171
3.5.1. Síntesi de 3,4-dihidroxiacetofenona (313).....	171
3.5.2. Intent de síntesi del compost 285	172
ANNEX: BIOASSAJOS	175
1. INTRODUCCIÓ	177
1.1. Variants del test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT).....	177
1.2. Protocol	178

ÍNDEX

2. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES	179
2.1. Per a cada experiment (BA ##).....	179
2.2. Per a cada compost a una dosi determinada	181
2.3. Factors que poden introduir un error en els resultats	183
3. REPRESENTACIÓ DE LA CORBA DOSI – RESPOSTA	185
4. PRESENTACIÓ DELS RESULTATS	187
4.1. Anàlegs proposats per mètodes de <i>Virtual Screening</i>	187
4.1.1. Anàlegs proposats pel model QSAR desenvolupat amb descriptors GRIND	187
4.1.2. Anàlegs proposats per la metodologia FLAP.....	192
4.2. Anàlegs derivats de 6 i 7 : compostos 291 , 312 i 316	201
4.3. dades dels bioassajos realitzats.....	202
<u>BIBLIOGRAFIA</u>.....	215

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

1. Els brassinoesteroides (BRs)

1.1. Generalitats

Els brassinoesteroides (BRs) són una família de fitohormones naturals.¹⁻³ Les fitohormones, o hormones vegetals, són substàncies endògenes que tenen un paper molt important en la regulació del creixement i del desenvolupament de les plantes.^{4,5} Les 5 famílies clàssiques de fitohormones són les auxines,⁶ les gibberel·lines,⁷ les citoquinines,⁸ l'etilè⁹ i l'àcid abscísic.¹⁰ Altres grups classificats com a fitohormones, a part dels BRs, són les poliamines, els jasmonats, l'àcid salicílic i la sistemina.¹¹

Els nivells hormonals de certes espècies vegetals poden ser alterats per modificar-ne característiques. Així, l'ús de reguladors del creixement vegetal exògens és una tècnica emprada a l'agricultura per augmentar la producció agrícola i optimitzar l'ús dels recursos disponibles. En aquest sentit, els BRs, actius a concentracions molt baixes (0.1-1 ppm), estimulen el creixement vegetal,^{1,12} augmenten el rendiment i la producció de biomassa en diferents cultius, augmenten el rendiment i la qualitat de les llavors¹³ i acceleren la maduració de la collita. Per altra banda, confereixen a les plantes resistència contra factors mediambientals adversos tals com una elevada salinitat del medi,¹⁴ sequera,¹⁵ temperatures extremes,^{14,16,17} o l'estrès causat per herbicides o insecticides.¹⁸ Tot això, juntament amb el fet que la seva toxicitat és extremadament baixa i que són compostos que posseeixen un ampli marge de seguretat mediambiental,¹⁹ fa que els BRs presentin una elevat potencial per a la seva aplicació a l'agricultura. Els BRs naturals més actius són la brassinolida (BL) (1), aïllada del pol·len de la colza (*Brassica napus* L.) l'any 1979,²⁰ i la castasterona (CS) (2), aïllada del castanyer japonés (*Castanea crenata* Siebold & Zucc.) l'any 1982 (figura 1).²¹ Ambdós compostos són esteroides polihidroxilats amb una cadena lateral cadestànica.

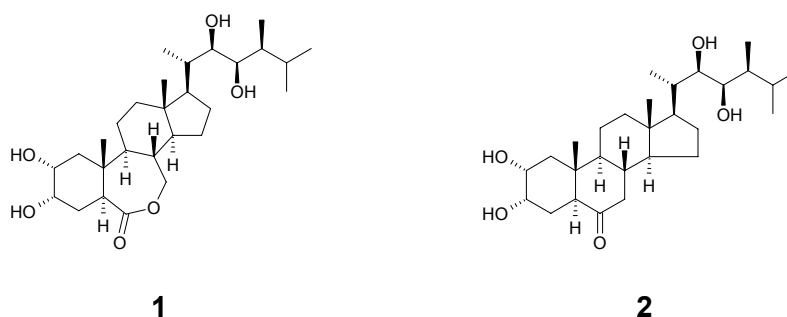


Figura 1. BL (1) i CS (2)

S'han trobat BRs en monocotiledònies, dicotiledònies i gimnospermes,² fet que posa de manifest la seva ubiqüitat en el medi natural. Tot i això, són presents en les plantes en quantitats molt petites, de l'ordre de ppm o ppb. Això fa que la seva obtenció a través d'extracció del medi natural sigui inviable des d'un punt de vista pràctic i econòmic. Per altra banda, la seva síntesi és força complexa. Aquesta, ja sigui a nivell de síntesi total o a nivell de síntesi parcial a partir d'altres esteroides, requereix de diverses etapes sintètiques, algunes de les quals empen reactius molt cars, fet pel qual aquesta via d'obtenció tampoc és econòmicament viable.

Actualment els esforços es centren en el disseny i síntesi de nous anàlegs actius assequibles econòmicament. Així, el coneixement dels requisits estructurals per que un BR presenti activitat com a promotor del creixement vegetal és molt important per a dissenyar nous anàlegs que puguin presentar una bona relació entre la seva activitat i

el cost sintètic. Per altra banda, aquest coneixement permetria aprofundir en el mode d'acció dels BRs a nivell molecular. Això permetria preveure quins BRs serien els més interessants per a desencadenar activitat abans de ser sintetitzats.

1.2. Relacions 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 bioassajos.²²⁻²⁵ Entre aquests, en destaquen dos per la seva alta sensibilitat: el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT), tant en la variant de planta tallada²⁶ com en la de planta sencera,²⁷ i el test del segon entrenús de la mongeta sensibilitzat.²⁸

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.- Una 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 22*R*,23*R*.
- 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.*,²⁴ que postulen que la funcionalitat 22*R*,23*R*-diol és més important que la 22*S*,23*S* en el test del tomàquet o del rave, mentre que en el RLIT les dues configuracions en *cis* d'aquest diol, 22*R*,23*R* i 22*S*,23*S*, són acceptades.²³

Per altra banda, Yokota *et al.*²⁹ van concloure que els requisits estructurals pels restes alquil en C_{24} són menys rigorosos quan s'empra el RLIT. Ara bé, aquests autors accepten com a actius compostos amb substituents metil, etil, metilè o etilè en C_{24} , així com un metil en C_{25} , tot i l'alta variabilitat dels valors d'activitat d'aquests compostos.

Altres contradiccions trobades van ser descrites per Kohout *et al.*,²⁸ que van sintetitzar compostos amb amides i esters de tipus androscànic³⁰⁻³³ i en van avaluar la seva activitat en els bioassajos del primer i del segon entrenús de la mongeta. Aquests autors varen observar que, mentre alguns d'ells presenten una gran activitat en el bioassaig del segon entrenús de la mongeta, la seva activitat en el bioassaig del primer entrenús va resultar marginal. Es va observar que el perfil d'activitat d'altres anàlegs BRs també era contrari en aquests dos bioassajos, apreciand un cop més la dificultat de definir la seva especificitat hormonal.

En conclusió, els diferents estudis de SAR descrits en la literatura i les contradiccions que es troben en aquests revelen la poca solidesa de les seves propostes respecte als requisits estructurals per que un BR presenti alta activitat. Brosa *et al.*³⁴ varen mostrar, a través d'un 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:

1.- En primer lloc, els grups funcionals dels BRs no haurien de ser considerats independentment tal i com s'ha fet en els diferents estudis de SAR realitzats, doncs s'ha trobat que els efectes de les funcionalitats estan estretament lligats entre ells.

2.- En segon lloc, l'aplicabilitat dels requisits postulats queda limitada a les funcionalitats implicades en el conjunt de BRs assajat. Així, si bé des d'un principi es va fixar com a requisit estructural una fusió A/B *trans* i un 2 α ,3 α -diol, tal com succeix en els BRs naturals més actius com la BL (1), la CS (2) o la 28-homobrassinolida (HBL) (3), encara no s'havia avaluat cap BR amb aquestes funcionalitats oposades. Brosa *et al.*^{35,36} sintetitzaren compostos d'aquest tipus i varen obtenir un valor d'activitat molt alt pel compost 4, de 2.49,^{37,38} que presenta alhora un 2 β ,3 β -diol i una fusió A/B *cis* (figura 2). Cal considerar que l'activitat en el RLIT ve expressada com el logaritme negatiu de la dosi que provoca un angle d'inclinació de les làmines d'arròs de 45° (-log[dosi]_{45°}) (veure Annex). L'activitat mesurada per 3 amb el RLIT és de 3.32.^{37,38} La BL (1) i la CS (2), els BRs naturals més actius, tenen una activitat de 4.01 i de 3.54, respectivament.

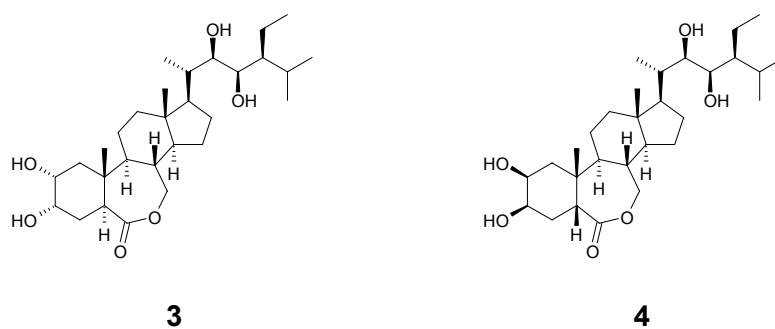


Figura 2. HBL (3) i 4

Tal com s'observa a la figura 2, aquests dos compostos només difereixen en l'estereoquímica del diol de l'anell A i en la fusió A/B. S'observa com 3 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 4 no els presenta, ja que té un 2 β ,3 β -diol i una fusió A/B *cis*, presenta un valor d'activitat força elevat en el RLIT.

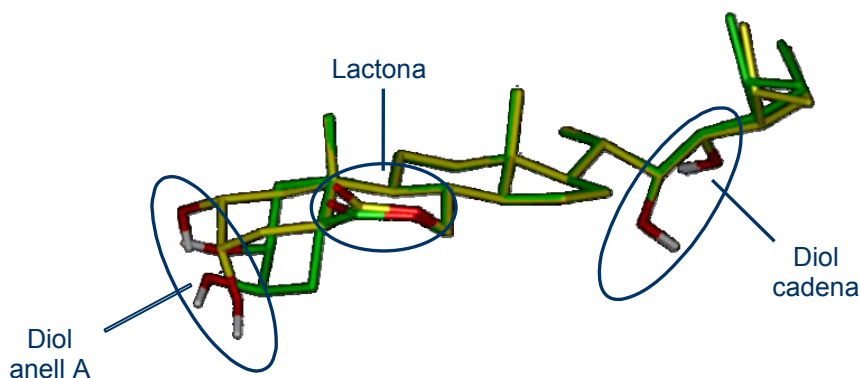


Figura 3. Solapament de 3, en groc, amb 4, en verd. Es destaca el bon solapament mostrat per les funcionalitats polars de les dues molècules.

Una explicació intuïtiva de l'alta activitat mostrada per 4 la trobem a la figura 3, on es mostra la superposició de 3, en groc, amb 4, en verd. S'observa com, tot i que les dues molècules mostren les diferències estructurals esmentades, les funcionalitats polars de

les dues molècules es troben ben solapades en l'espai. Així, s'observa com el 2 β ,3 β -diol de **4**, en verd, es situa en una zona molt pròxima al 2 α ,3 α -diol de **3**. S'observa així mateix com les altres funcionalitats, la lactona i el diol a 22 R ,23 R , es solapen molt bé. El bon solapament mostrat pels dos compostos implicaria que interaccionen d'una manera similar amb el seu entorn en el potencial lloc d'unió, i que per tant la seva activitat biològica seria equivalent, tot i que **3** compleix tots els requisits estructurals que s'havien postulat en els estudis de SAR per que un BR presenti una alta activitat i **4** no en compleix dos.

Per tant, aquest resultat posa de manifest que l'activitat d'un BR està íntimament relacionada amb l'estructura tridimensional de la molècula, és a dir, en la disposició global dels diversos grups funcionals presents a la molècula a través de l'espai.

1.3. Relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR)

Degut a la feblesa dels requisits postulats a la literatura per obtenir una alta activitat brassinoesteroide, a la Secció d'Esteroides de l'Institut Químic de Sarrià (IQS) es va desenvolupar una metodologia per estudiar les relacions entre l'estructura i l'activitat dels BRs tenint en compte la seva estructura molecular tridimensional. Aquesta metodologia ha permès l'obtenció d'un bon model de relació quantitativa estructura-activitat (QSAR) a través de tècniques de modelització molecular.^{34,39}

Els objectius que es busquen amb aquesta metodologia són, per una banda, dirigir la síntesi de BRs cap a nous anàlegs amb una bona relació entre l'activitat i el cost sintètic i, per l'altra, aprofundir en el coneixement de la seva interacció amb el receptor a través del coneixement dels requisits estructurals necessaris per a que el BR presenti activitat.

Donat que no es coneix l'estructura del receptor dels BRs, el BR1,⁴⁰ de moment no es poden emprar mètodes directes, basats en l'estructura d'aquest. Així, per obtenir informació cal recórrer a mètodes indirectes, basats en la comparació de l'estructura d'un conjunt de lligands del receptor d'activitat coneguda.

La metodologia general per obtenir un model QSAR s'esquemmatitza a la figura 4.

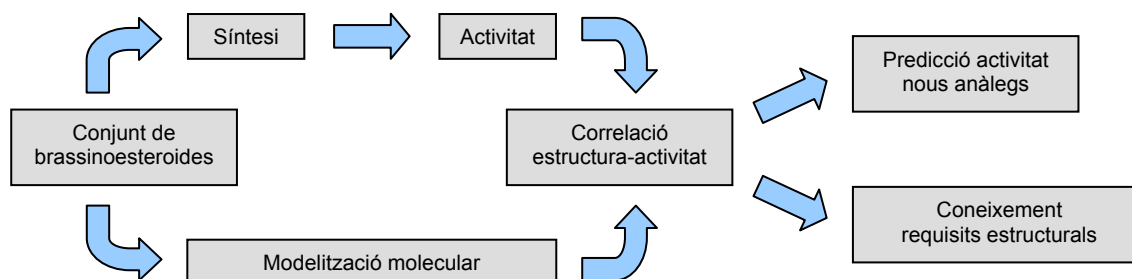


Figura 4. Metodologia general per obtenir un model QSAR

Es proposa un conjunt d'entrenament o *training set* de compostos d'estructura el més diversa possible i d'activitat coneguda i homogènia. Al Laboratori d'Esteroides del IQS es van fer servir compostos que havien estat sintetitzats en l'equip i dels quals se'n va mesurar l'activitat amb el RLIT,²⁷ bioassaig que es va posar a punt.^{37,38} Tot seguit, es calculen una sèrie de descriptors per a cada una d'aquestes estructures, és a dir, una sèrie de valors numèrics relacionats amb alguna propietat químic-física de la molècula. Aquesta etapa pot requerir-ne d'una de prèvia de modelització molecular. La

correlació dels valors obtinguts pels descriptors del conjunt de compostos amb les corresponents dades d'activitat permet obtenir un model QSAR. Es vol que el model tingui una bona capacitat predictiva de l'activitat de compostos que no s'hagin emprat per elaborar el model. Els compostos que mostrin una activitat predita alta, poden ser proposats per la seva síntesi o obtenció. Si l'activitat biològica que puguin mostrar aquests és interessant, poden ser incorporats en el conjunt d'entrenament del model per realitzar un nou model QSAR amb una potencial major capacitat predictiva.

La tècnica de modelització molecular que ha donat resultats més bons a l'equip és la metodologia GRID.^{34,39,41} Aquesta tècnica⁴² 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, en cada un dels punts de la malla, es calcula l'energia d'interacció de la molècula d'estudi amb una sonda. (figura 5). Una sonda equival a una molècula o grup funcional que interacciona d'una manera determinada amb la molècula d'estudi. Exemples de sondes són la sonda DRY, que mimetitza interaccions hidrofòbiques, la sonda O, que mimetitza la interacció donada per l'oxigen d'un carbonil (principalment acceptora de pont d'hidrogen) i la sonda N1, que mimetitza les interaccions ofertes per l'àtom de nitrogen d'una amida amb un àtom d'hidrogen (principalment donadora de pont d'hidrogen). A partir d'aquest càlcul s'obtenen camps d'interacció molecular (MIF). Els MIFs són la representació gràfica dels punts de la malla on l'energia d'interacció entre la molècula sonda i la molècula d'estudi pren un valor determinat.

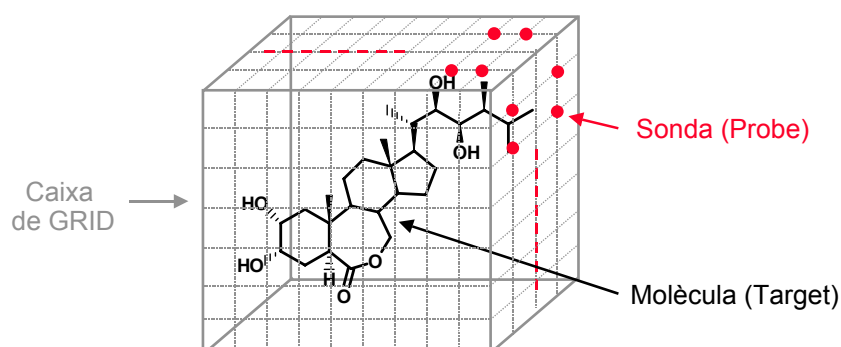


Figura 5. Càlcul de l'energia d'interacció entre una molècula i una sonda en cada un dels punts definits en la caixa de GRID

A 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 igual o menor a $-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.^{34,39} 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 amb la molècula d'estudi. Que aquest MIF hagi estat el que hagi donat resultats més bons suggereix que hi ha una relació molt estreta entre l'activitat d'un BR i la capacitat que tingui aquest d'interaccionar per pont d'hidrogen en determinades regions de l'espai.^{34,39}

A la figura 6 es mostra el MIF per la BL (1) per una energia d'interacció igual o inferior a $-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ emprant la sonda d'aigua. Així, les àrees representades en groc corresponen a aquelles regions de l'espai amb una alta probabilitat d'interaccionar per punts d'hidrogen. A través d'un estudi comparatiu dels mapes de GRID realitzat entre la BL (1) i uns 20 anàlegs BRs s'ha postulat que les zones que es creuen més importants per tal que un BR expressi activitat (en color vermell) són les zones corresponents als hidroxils en C₃ i en C₂₃ 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 C₂ i en C₂₂ i la zona corresponent a la part baixa del carbonil lactònic.

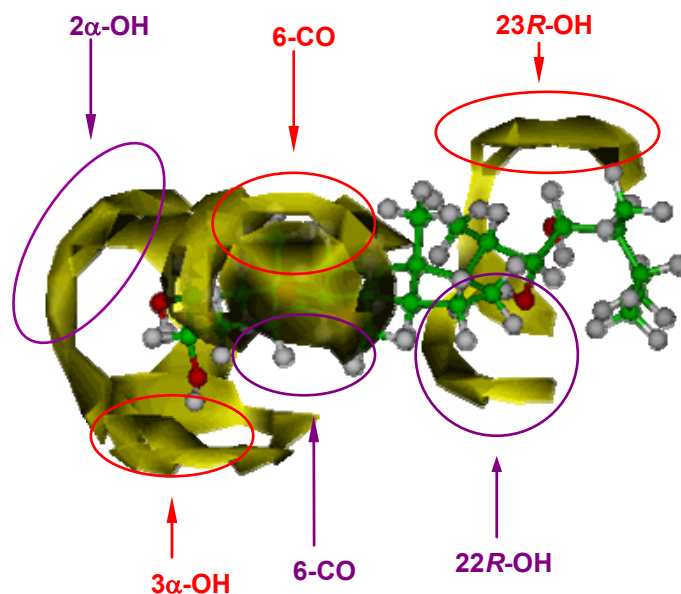


Figura 6. Punts del MIF calculat per la BL (1) amb la sonda d'aigua amb una energia no superior a -3 kcal/mol. En vermell es destaquen aquelles zones considerades essencials perquè 1 sigui activa i en lila aquelles que no es consideren tan importants.

Per altra banda, altres estudis realitzats han permès concloure que l'extrem hidrofòbic de la cadena lateral dels BRs té un paper decisiu en l'activitat biològica d'aquests.^{34,41}

Cal fer un incís en que quan es treballa amb molècules que tinguin una part flexible, com és el cas de la cadena lateral dels BRs, cal definir una conformació activa (AC) de referència. La AC equivaldria a aquella conformació preferent que adoptaria un lligand en el lloc d'unió del receptor proteic corresponent. El procés per obtenir una AC acostuma a ser costós, especialment en el cas de que no es disposi de l'estructura tridimensional del receptor amb el lligand unit al lloc d'unió, com és el cas dels BRs. Actualment, es disposa de 3 ACs de la BL (1), obtingudes per varis mètodes: anàlisi sistemàtic en forma d'arbre (BL-SQR),³⁹ comparació entre diversos índexs de similitud molecular (SQR, RMS i MOV) (BL-PLS)³⁹ i la trobada per GRID flexible (BL-MVP).⁴¹

2. Cerca de nous anàlegs amb descriptors independents de l'alineament

Els estudis i els models de QSAR obtinguts amb la metodologia GRID en l'Equip van rendir informació molt important per enfocar la síntesi de nous BRs i per conèixer requisits estructurals que els mètodes de SAR anteriors no havien pogut descriure. Malgrat tot, la metodologia GRID presenta un inconvenient molt important: l'etapa d'alineament de les molècules d'estudi. Cal tenir present que, per dues molècules diferents situades a la malla de GRID, cal que els mateixos punts de la malla siguin equivalents. Per tant, cal orientar les molècules de forma que aquestes quedin sobreposades. Aquesta etapa és una etapa lenta i que pot introduir fàcilment predisposicions per part de l'usuari. Addicionalment, aplicar un model de QSAR per predir l'activitat d'un compost que no sigui anàleg estructuralment als BRs, dificulta i fa encara més subjectiva l'etapa d'alineament, fet que impossibilita la predicció sistemàtica de l'activitat de compostos d'estructures diferents a les que s'han fet servir per elaborar el model.

Aquesta problemàtica ha estat solucionada amb el desenvolupament de mètodes de càlculs de descriptors independents de l'alineament derivats dels MIFs. Les principals metodologies desenvolupades són els descriptors GRIND,^{43,44} i les metodologies SHOP^{45,46} i FLAP.^{47,48} Aquests mètodes seran descrits en detall al capítol 1 d'aquest treball. Tots ells permeten efectuar processos de *virtual screening* o de *scaffold hopping* sobre extenses bases de dades de compostos comercials d'estructures molt variades. Aquests processos rendeixen un conjunt de compostos candidats que són susceptibles de ser actius.

Una mostra de les possibilitats que ofereixen la tenim en l'aplicació de la metodologia SHOP en la recerca d'una estructura que mimetitzés la cadena lateral de la BL (1) en els BRs androstànics.⁴⁹ Els BRs androstànics són compostos que presenten un esquelet androstànic, pertinentment funcionalitzat, amb un hidroxil en la posició 17 β on hi ha unit per esterificació una grup acil, que pretén mimetitzar la cadena lateral de la BL (1) i de la CS (2). La metodologia SHOP es va aplicar sobre una base de dades d'àcids carboxílics comercials i es van escollir 8 àcids carboxílics com a candidats. Amb ells es van sintetitzar els corresponents anàlegs androstànics. El millor resultat es va obtenir amb l'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (5), amb el que es van obtenir els compostos 6 i 7 (figura 7), pels quals es va mesurar una activitat de 1.70 i de 1.06, respectivament, en el RLIT, equivalent a la de BRs d'activitat mitjana.^{50,51} Tal com es pot observar, la cadena de 6 i de 7 comprèn aquells requisits estructurals que s'havien postulat com a necessaris per obtenir BRs androstànics actius: una funcionalitat polar en la posició α del carbonil i un extrem hidrofòbic.⁵² Cal destacar que els compostos 6 i 7 van ser sintetitzats a partir d'una cadena lateral comercial i van rendir uns dels valors d'activitat més alts obtingut en l'equip per BRs androstànics, amb la qual cosa es poden prendre com a referència pel disseny de futurs anàlegs d'aquest tipus.^{50,51}

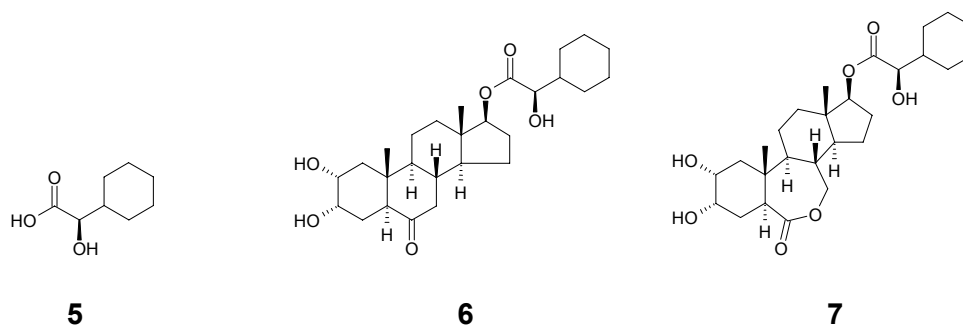


Figura 7. Àcid (*R*)-hexahidromandèlic (5), 6 i 7.

Aquest resultat mostra que la metodologia SHOP és molt útil en la substitució de subestructures d'una molècula per d'altres que, presentant un perfil d'interacció equivalent amb l'entorn, ofereixin característiques més interessants, com una major disponibilitat comercial o accessibilitat sintètica. Això permetria estalviar nombroses etapes sintètiques, facilitant d'aquesta manera el procés d'obtenció de nous anàlegs d'estructures actives ja conegudes.

Prenent aquests punts en consideració, es planteja que seria interessant, ara, prenent com a referència els compostos **6** i **7**, substituir l'esquelet esteroide per una estructura de síntesi més fàcil o amb disponibilitat comercial aplicant la metodologia SHOP a una base de dades d'alcohols. Cal esmentar que la síntesi de l'esquelet dels BRs androstànics requereix de 8 etapes sintètiques, en el cas de l'esquelet de **6**, i de 9, en el cas del de **7**.^{50,51,53} Així, trobar una estructura comercial que pogués estalviar aquestes etapes suposaria un estalvi de recursos molt importants.

Per altra banda, seria molt interessant aplicar les metodologies que fan servir els descriptors GRIND i FLAP en el desenvolupament de mètodes de recerca sistemàtica sobre bases de dades de compostos comercials que permetin trobar estructures anàlogues als BRs actius. En aquest cas, la recerca no s'enfocaria a trobar anàlegs a subestructures de la BL (**1**), sinó a trobar molècules que la mimetitzessin completament i poguessin ser actives per elles mateixes. Això permetria trobar nous anàlegs sintètics no-esteroïdals, fet que permetria allunyar-se de totes aquelles implicacions d'un esquelet esteroide. El fet que dues molècules diferents puguin desenvolupar activitats biològiques equivalents a través de la seva unió amb un receptor, es basa en que comparteixen aquells requisits farmacofòrics que fan que siguin complementàries en el lloc d'unió del receptor.

Un antecedent de molècules no esteroidals mimètiques de la BL (**1**) el trobem en els anàlegs dissenyats i sintetitzats per Back *et al.*⁵⁴ Aquests autors van proposar estructures amb dos sistemes d'anells fusionats amb funcionalitats polars units per un *linker* com a possibles candidats a ser actius. De tots els compostos assajats, els compostos **8** i **9** (figura 8) varen mostrar activitat en el RLIT amb coaplicació amb l'àcid indolacètic (IAA), una auxina. Se sap que la BL (**1**) mostra un efecte sinèrgic quan és coaplicada amb el IAA. Ara bé, ni **8** ni **9** varen mostrar activitat per si mateixos.

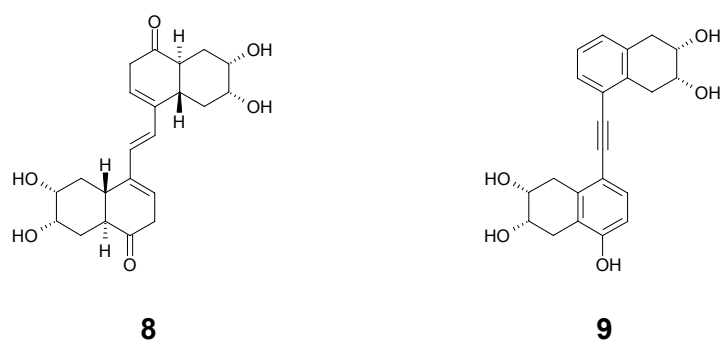


Figura 8. Compostos **8** i **9**.

A l'Equip es va realitzar un estudi per aprofundir en les causes estructurals que podien explicar aquest comportament.⁴⁹ Es van buscar aquells trets estructurals comuns amb la BL (**1**), que explicaven l'activitat de **8** i **9**, i aquelles peculiaritats estructurals que diferien de la BL (**1**), que explicaven per què **8** i **9** no eren actius per ells mateixos. Els resultats d'aquest estudi es poden explicar a través de l'alineament de **8** i **9** amb la BL (**1**) (figura 9).

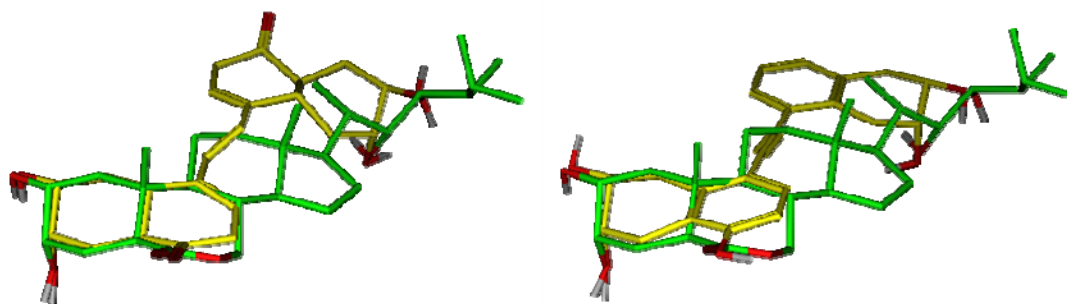


Figura 9. Solapament de la BL (**1**), en verd, amb **8**, en groc, a l'esquerra, i amb **9**, en groc, a la dreta.

Així, es va observar que els diols de **8** i **9** quedaven molt ben solapats amb els diols $2\alpha,3\alpha$ i $22R,23R$ de la BL (**1**). Així mateix, el carbonil de **1** troba un solapament molt bo amb funcionalitats polars presents a **8** i **9**. Addicionalment, **8** i **9** tenen una part central hidrofòbica i rígida, com **1**. Es va concloure que aquests trets estructurals poden justificar l'activitat d'aquests dos compostos en ser coaplicats amb el IAA. Per altra banda, **8** i **9** no presenten cap part hidrofòbica que es solapi amb l'extrem hidrofòbic de la cadena lateral de la BL (**1**) i tenen parts que sobrepassen el volum de la BL (**1**). Es va creure que aquest era el motiu pel qual **8** i **9** no eren actius per ells mateixos en el RLIT.⁴⁹

Aquest resultat posa de manifest la necessitat de trobar d'una forma més sistemàtica estructures comercials que puguin compartir amb els BRs actius aquells requisits farmacofòrics que fan que es puguin unir de manera efectiva amb el receptor biològic. Això equival a que compleixin la majoria dels requisits estructurals postulats perquè un BR desencadeni activitat biològica.

OBJECTIUS

Objectius

1. Trobar compostos amb activitat brassinoesteroide mitjançant cerques sobre bases de dades de *screening compounds* comercials emprant tan un model de QSAR desenvolupat amb descriptors GRIND com la metodologia FLAP.
2. Trobar compostos que puguin ser anàlegs als esquelets esteroidals dels compostos **6** i **7** mitjançant cerques amb la metodologia SHOP sobre bases de dades de *building blocks* comercials.
3. Sintetitzar els corresponents anàlegs amb els esquelets trobats en el punt anterior.
4. Avaluar l'activitat dels compostos obtinguts en els punts 1 i 3 amb el Test d'Inclinació de la Làmina d'Arròs (RLIT).

Objectives

1. *To find compounds with brassinosteroid activity by a screening procedure over commercial screening compounds databases using both a QSAR model developed with GRIND descriptors and FLAP methodology.*
2. *To find compounds analogous to the steroidal skeletons of compounds **6** and **7** by a screening procedure with the SHOP methodology over commercial building block databases.*
3. *To sintetize the corresponding compounds with the skeletons found in the previous point.*
4. *To evaluate the biological activity of the compounds obtained in the points 1 and 3 with the Rice Lamina Inclination Test (RLIT).*

CHAPTER 1 COMPUTATIONAL CHEMISTRY

1. Theory and methods

1.1. Molecular modelling

Molecular modelling is defined as the computer representation, description and evaluation of the structure or properties of a chemical system.^{55,56}

1.1.1. Energy

One of the main points in the theoretical study of a molecule or chemical system is the calculation of its energy. The aim is the quantification of the intra- and intermolecular interactions of the molecules, reflecting these as the free energy, ΔG , of the system under study. This energy calculation can be made according to 3 groups of methods, depending on the level of theory used: molecular mechanics, semiempirical methods and *ab initio* methods.^{55,56} The last one uses quantum mechanics to perform calculations that involve the electrons and the nuclei of the atoms. In contrast, the methods based on molecular mechanic consider only the position of the nuclei and the electrons are considered in an implicit way. Semiempirical methods use an intermediate level of theory. From the three groups, the molecular mechanics one has been widely used, due to its calculation speed, much faster than the other ones. This allows the study of complex systems, such as protein-ligand interaction or macromolecules, with an intuitive interpretation of results.

1.1.2. Molecular mechanics: the force field

The force field is the group of equations and parameters coherently structured used for the energy calculation of a system from its atomic coordinates. The choice of a force field depends on the kind and size of the system to study, and also on the calculation capacity available. The expression of a force field comprises different terms, which describe different kind of energy contributions to the total energy of the system (Equation 1).

$$E_{FF} = E_{str} + E_{bend} + E_{oop} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross}$$

Equation 1. Generic expression of a force field.

The first four terms describe energy interactions associated with atoms covalently bound. The term E_{str} corresponds to the stretching of bonds between two atoms. The term E_{bend} corresponds to the bending of the angle between three atoms bound one after the other. The term E_{oop} corresponds to the out of plane flexion, formed by four atoms. E_{tors} is associated with the torsion of dihedral angles, formed by four atoms bound one after the other. E_{vdw} and E_{el} are two terms associated with atoms not bound covalently. The former describes Van der Waals interactions, while the latter corresponds to electrostatic ones. Finally, the term E_{cross} , shows the coupling between different terms, mainly the stretching, bending and torsion ones.

To define the geometric features associated with the energy of a system, the force field uses a series of parameters which depend on the atom type. The atom types are labels assigned to each atom that try to describe the structural features (bond distance, bond angles...) and the chemical ones as well (hibridation, aromaticity...), keeping in mind the chemical atom that is being considered.

1.1.3. Conformational analysis

The conformation of a molecule is the three-dimensional arrangement of its atoms associated to a energy value.⁵⁷ Molecules can have bonds with rotational movement, being this free or restricted. The turn of these bonds generates a series of conformations that define the conformational space of molecules. Conformational analysis methods analyse the different conformational states available to a molecule and determine the most stable or the most populated one. In the conformational space, the thermodynamically stable states correspond to minimum energy conformations. There are several methods to perform the computational analysis of molecules. Two of the most common ones are the systematic analysis and the molecular dynamics simulations.

Systematic analysis allows an exhaustive exploration of the conformational space of a molecule and so it has been widely used.⁵⁸⁻⁶⁰ This method is based on the ordered and sequential variation of relevant geometric parameters, such as torsion angles. The energy is screened in the rotational space, defined by an angle step, of each one of the torsion angles of interest of the molecule. The main problem of this methodology is the combinatorial explosion of the possible conformations that is given when the number of dihedral angles increases. However, structures that violate certain predefined criteria can be eliminated, thus reducing the conformational space of the compound under study. This method was previously applied in our group to perform conformational analysis of side chains of brassinosteroids (BRs).³⁹

Molecular dynamics uses the equations of the movement of classical mechanics to simulate the behaviour along the time of a chemical system through the potential energy defined by a fixed force field.⁶¹⁻⁶³ These methods can perform generation of random conformers.

An alternative to those time-consuming methods is given by rule-based programs.^{64,65} These methods allow the automatic generation of three-dimensional atomic coordinates considering for each rotor the most probable values using a database of structural parameters such as bond lengths, angles and ring conformations. For example, for the bond Csp3-Csp3, only the three alternated possible conformations are considered (60°, 180° and 300°). This method allows the generation of a set of conformers of maximum diversity with a good reliability reducing the calculation time.

1.2. Drug discovery methods

Depending on the information available about the receptor, there are two big methodologies to design new analogues taking into consideration the binding between a biological receptor and a ligand:

- Direct methods: They are used when the structure of the receptor is known through experimental data (X-ray diffraction or NMR) or predicted by protein homology modelling. These methods can be applied in the performance of SBDD (Structure-Based Drug Design).
- Indirect methods: They are used when the structure of the receptor is unknown and the information is obtained from the comparison between different ligands with a range of activity. These methods can be applied in the performance of LBDD (Ligand-Based Drug Design).

In the second ones, it is assumed that the whole information necessary to explain the activity of a group of compounds is found on its structure assuming the hypothesis that they interact with the receptor with the same binding mode. So, the comparison of the properties for different compounds enables the identification of which functional groups (binding points) would make possible the binding with the receptor. In addition, it must be taken into consideration that the compounds possess certain flexibility and thus they can adopt different conformations. Nevertheless, only a fixed conformation, or a small group of them, called active conformation (AC), binds with the receptor. In this sense, the AC has the hypothetical spatial orientation for the binding mode of the compound to interact with the receptor. Moreover, factors as possible ligand interaction through water molecules are typically difficult to consider.

In the field of brassinosteroids (BRs) only indirect methods can be applied to find new analogues because, although the big advances being achieved last years,⁴⁰ the three-dimensional structure of the binding site of the receptor is still unknown. So, defining an AC for brassinolide (BL) (**1**), the most active BR, is needed to use as a template to efficiently compare the rest of the molecules. During the last years, our group has defined three active conformations of **1**, found by different methodologies:

BL_sqr: The conformation of BL (**1**) common to 6 active BRs was found attending to several similarity criteria: SQR (geometrical criterion based on the comparison of distances between particular atoms of the molecule), RMS (geometrical criterion based on the calculation of the distances of equivalent atoms between different conformers once the molecules were overlapped) and MOV (geometrical criterion based on the comparison of the shape of the molecules with a similarity index computed by obtaining the common volume of the side chains when atoms C11, C12 and C14 are overlapped). This conformation is shown in green colour in figure 10.³⁹

BL_pls: To find this AC the conformers of the BRs, found by random conformational analysis, were manually overlapped by rings C and D, the rigid part common to brassinosteroids. Then the first torsion angle of the side chain was fixed to an angle of 180° and the rest of the torsion angles of the molecule were considered as degrees of freedom, which were fixed in an iterative way where a PLS model was derived from GRID MIFs considering the rotation of the non-fixed bonds (flexible GRID-MIFs). In this model a set of rigid conformations were interpolated for each ones of the BRs. Finally, by comparing the values of the torsion of the selected conformations, the degrees of freedom were fixed and the conformation where the predicted activity was closest to the real one was selected. This conformation is shown in yellow colour in figure 10.³⁹

BL_mv: The methodology used in this case is the same as the last one. The difference stays in the conformational analysis performed (the conformers used in the comparison were obtained from molecular dynamics techniques through simulated annealing) and in the number of BRs used in the comparison (4 new BRs were included and the measured activity of BL (**1**) was redefined). Also, the alignment was redefined (overlapping of GRID MIFs using the water probe), when the polar functional groups were once fixed. This conformation is shown in purple colour in figure 10.⁴¹

The three different active conformations of BL (**1**) found in the Steroids Laboratory of the IQS are shown in figure 10. As it can be seen, the differences in the skeleton are inappreciable, while in the side chain, due to its higher flexibility, differences in the region of the hydroxyl 23*R*-OH and in the hydrophobic extreme of the side chain can be appreciated.

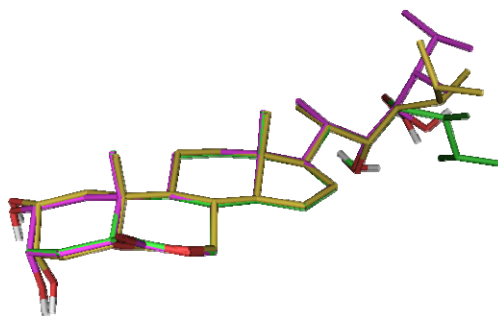


Figure 10. Overlap of the 3 AC of BL (1): BL-sqr, in green, BL-pls, in yellow, and BL-mvp, in purple.

These 3 ACs of BL (1) are taken as a reference in some steps of this project.

1.3. Molecular descriptors

Historically, Hansch introduced the use of QSAR to predict the activity of a series of structurally related compounds according to structural features.⁶⁶ Since then in the drug discovery field many mathematical molecular descriptors have been developed to obtain correlations with the biological activity of compounds. Single-value descriptors (for example, log P), and vectors and matrixes explaining both chemical (Free-Wilson analysis,^{67,68} topological indexes⁶⁹⁻⁷¹) and chemical-physical features⁷² (hydrophobic,^{73,74} steric^{75,76} and electrostatic descriptors^{77,78}) have been used in this way. In addition, the development of molecular interaction fields (MIFs)^{42,79} and the use of the three-dimensional structure of the molecule to obtain molecular descriptors⁸⁰ supposed a considerable advance in the QSAR field.

1.3.1. GRID descriptors

Goodford *et al.*⁷⁹ introduced the GRID force field, with which molecular interaction fields (MIFs) are calculated for a molecule. MIFs represent those favourable interaction areas that a molecule established with its surroundings.⁴² To calculate this, the molecule is placed inside a grid box defined by points regularly distributed around the space. Next, the interaction energy between the molecule and a defined probe is calculated in each point according to the sum of three factors: steric, electrostatic and hydrogen bond.

Depending on the selected probes, different MIFs can be calculated. More than 50 probes have been described and parameterized in the program GRID.⁸¹ They can be classified into five categories. The most representative probes are shown in table 1.

Probe type	Probe
Steric	C3, C1=, S1
Hydrogen bond donor	N1, N1=, NH=, N2, N:, N2:, N2+, N2=, N1+, N:=, OH2, O1, OH, O-, O:
Hydrogen bond acceptor	OC2, OES, O
Electrostatic	Na+, ZN+2
Hydrophobic	DRY

Table 1. The five different groups of probes according to the predominant interaction.

1.3.2. GRIND descriptors (*GRid-INdependent Descriptors*)

The drawback of using MIFs in QSAR studies is the alignment step between different molecules, as this step is time-consuming and subjective. On the other hand, some of the models developed are based on the use of correlation functions.⁸²⁻⁸⁵ This implies that the information from which the descriptors have been calculated, contained in the set of molecules of study, can not be reconstructed once they have been calculated. So, the structural interpretation of the results is not easy, given the difficulty on knowing which particular molecular parameters have generated the value obtained in the calculated descriptor.

A solution to these problems was proposed with the development of GRIND (*GRid-INdependent Descriptors*).^{86,87} These alignment-free descriptors give information based on the existing distance between the maximum interaction produced by different functional groups present in the molecule. This methodology, described as follows, makes easier the interpretation of the results, since the information obtained for the descriptor can be referred to the molecular features from which it has been generated.

The process used to obtain GRIND descriptors, calculated with program ALMOND 3.3.0,⁸⁸ comprises 3 steps, described as follows.

a) Molecular Interaction Field (MIF) computation

The first step to obtain GRIND descriptors is the calculation of MIFs for the molecule under study. With these fields, the Virtual Receptor Sites (VRSs) are defined. VRS is an abstract entity that defines an ideal binding site complementary for the molecule under study and represents its potential ability to bind to the receptor. GRIND descriptors are based on the computed VRS, since they represent the geometric relationships existing between the relevant regions in the VRS.

The process starts placing the molecule under study inside a three-dimensional grid, defined by nodes uniformly distributed in the space. Then, at each node, the interaction energy between the molecule and a probe is calculated, so that all the three-dimensional space around the molecule is considered (figure 11).

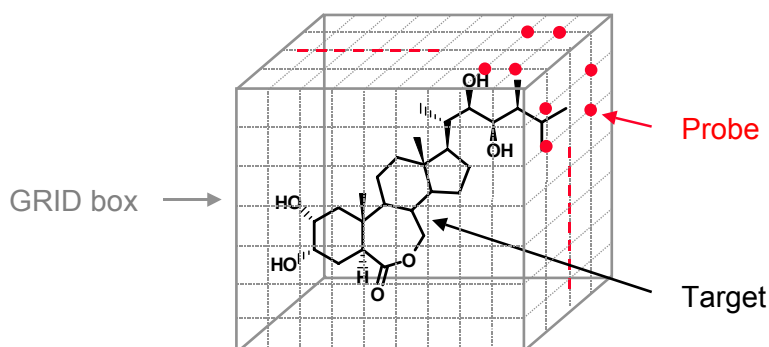


Figure 11. Graphical representation of the energy calculation between the molecule and a probe in the points defined in the GRID box.

The group of nodes with the same interaction energy between the molecule under study and the corresponding probe define molecular interaction fields (MIF).⁸⁹ MIF identify regions where certain functional groups of a molecule can interact favourably, suggesting positions where functional groups of the receptor can interact with the

ligand. A new kind of probe, called TIP, is available to calculate GRIND descriptors. This probe detects those points near convex regions of the molecule, thus giving a description of the shape of the structure under study.⁹⁰

As example, if the water probe is used hydrogen bond donor and acceptor groups of the molecule under study are evaluated. So, the representation of the MIFs obtained using the water probe with an energy minor than $-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ renders those areas of the molecule with a high probability to interact by hydrogen bonds with the water environment. Using several probes for a molecule, a set of favourable interaction positions that define the VRS can be obtained.

The MIF calculation is made with the program GRID.⁸¹ In order to obtain relevant VRS, the selected probes should represent functional groups potentially important in the binding site of the receptor. To study compounds that interact with proteins, the most reasonable probes to use are the probe DRY, which represents hydrophobic interactions, the probe O (carbonyl oxygen), that represents hydrogen bond acceptor interactions, and the probe N1 (amidic nitrogen), that represents hydrogen bond donor interactions. The space between the nodes is typically set to 0.5 \AA , and the GRID extends 5 \AA over the molecule under study.

b) Filtering of the MIF

Generally, the MIFs obtained with GRID methodology for a single compound comprise between 10^4 and 10^5 nodes. However, the information given by all these points sometimes is redundant and unevenly distributed being higher in some regions than in others. To avoid this, in this step a filtering of all the nodes obtained in the MIF computation is done, rendering only those points that possess information, independently from the others, about relevant interaction regions. Only the more interesting regions, defined by intense favourable interactions, are selected.

The filtering is made with a Fedorov type optimisation algorithm,⁹¹ which selects the more relevant points from each MIF through a weighting function where two criteria are reflected: the intensity of the field in a particular node and the distance between two nodes. By default, 100 nodes are selected in the filtering step, but this number can be increased depending on the size and interaction of the molecule.

This process is illustrated in figure 12. On the left, the MIF computed with O probe around brassinolide (BL) (1) is shown, representing the contour that includes points where the energy of interaction is minor than $-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. On the right there are the 150 nodes that are selected after the filtering process.

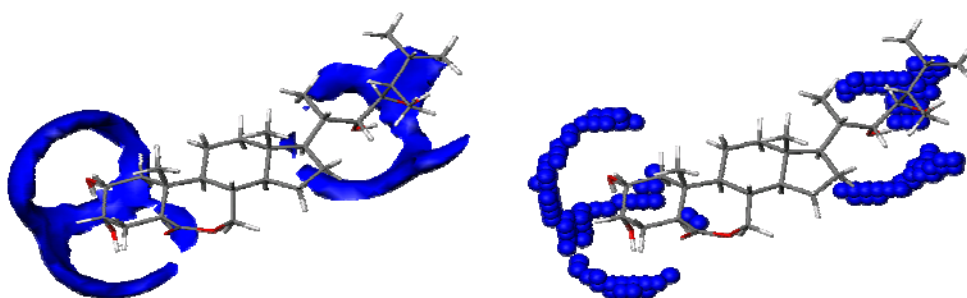


Figure 12. Point filtering process for BL (1)

c) Codification of the VRS to GRIND descriptors

Once the VRSs have been computed with the probes that have been chosen and the corresponding filtering of the points has been done for the MIF rendered by each probe, GRIND descriptors are obtained.

In first place, the product of the scaled energy between each pair of nodes is calculated. As scaled energy, we define the division of the energy calculated with a defined probe in a point by the maximum energy value given by this probe. The results can be graphically represented in graphics so-called correlograms, where the value of the products is represented respect to the distance that separates the points from which it has been calculated. A discrete number of distance ranges is considered. In each range of distances only the higher energy product is considered. When the energies between two nodes have been calculated for a single probe, the correlograms obtained are called auto-correlograms. When the nodes have been obtained with different probes they are called cross-correlograms. The number of correlograms (C) obtained depends on the number of probes selected (n) according to equation 2.

$$C = \frac{n!}{(n-2)! \cdot 2} + n$$

Equation 2. Number of correlograms generated by a *n* number of probes.

So, if 3 probes are considered, the total number of correlograms obtained will be 6, from which 3 will correspond to auto-correlograms and 3 will correspond to cross-correlograms, corresponding to the interactions between the first and the second probe, the second one and the third one, and the third one and the first one.

The calculated correlograms for a molecule of study with different probes are represented placing them one next to the other. Each correlogram has the minor distance values on the left and the major ones on the right. As example, the correlograms obtained for BL (1) using probes DRY and O are shown in figure 13.

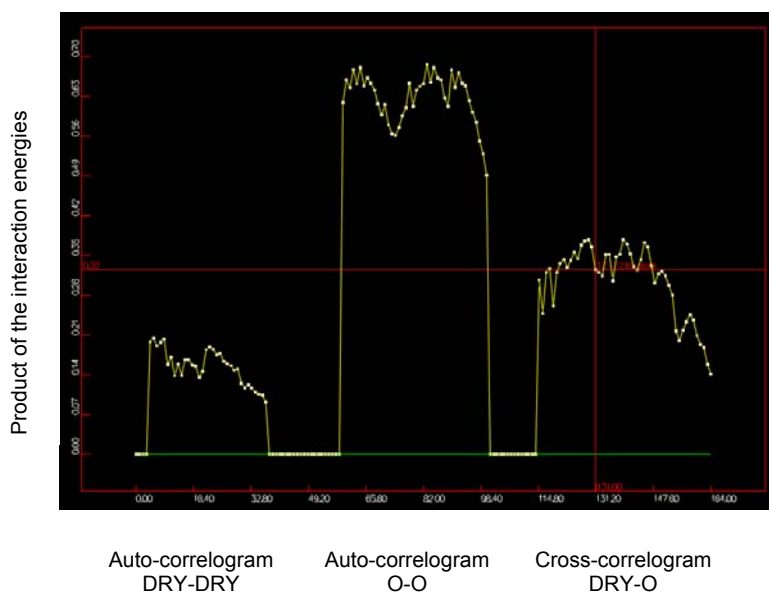


Figure 13. Correlograms obtained for BL (1) using probes DRY and O. From left to right auto-correlogram DRY-DRY, auto-correlogram O-O and cross-correlogram DRY-O are shown.

One of the already mentioned advantages that GRIND methodology offers respect to previous autocorrelation methodologies is that it allows an easy interpretation of the data obtained. The two coordinates whose interaction energy product is calculated are saved in the computer memory, allowing to know which pair of nodes has originated each energy value. This method is called *maximum auto- and cross-correlation 2* (MACC-2).⁹² As an example, with the cross-correlogram corresponding to probes DRY-O calculated for BL (**1**), the pair of nodes that has generated each descriptor can be represented. As shown in figure 14, on the left part there are the shorter distances and on the right the longer ones.

So, when GRIND descriptors have been calculated for a molecule, a profile of energies related with the distance is obtained, showing which distances separate the more important interaction zones in the molecule. The correlogram peaks correspond to the high energy products between two nodes. The shape of the peak also gives information about the group distribution. Functional groups producing intense interaction are represented on the correlograms by wide peaks. On the other hand, thin peaks tend to represent weak interactions.

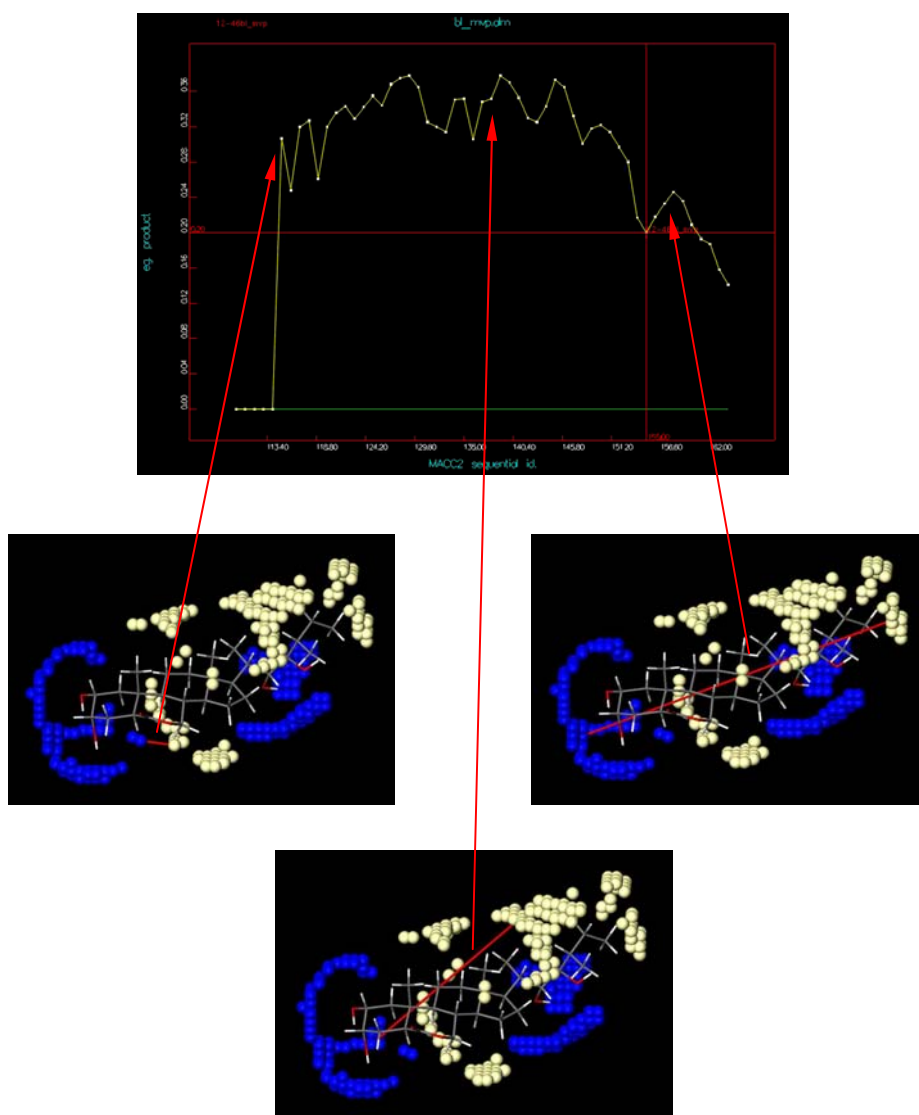
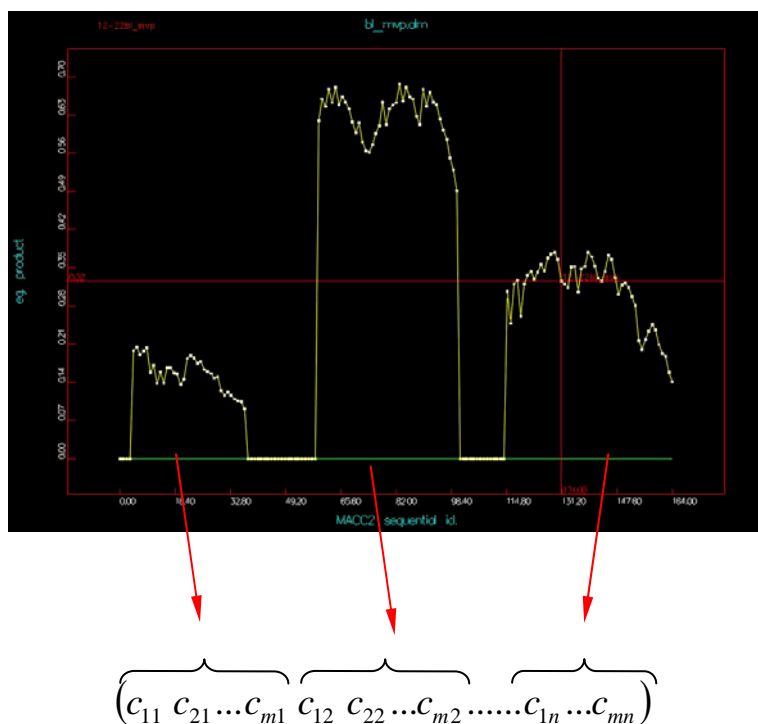


Figure 14. Distances corresponding to different points in the cross-correlogram DRY-O calculated for BL (**1**).

At a theoretical level, the set of correlograms obtained is expressed through a vector where energy values have been obtained as they appear on the correlogram (figure 15).



where n = total number of correlograms
 m = number of energy values in each correlogram.

Figure 15. Expression of correlograms as a vector

GRIND descriptors have been successfully used in different fields of drug discovery in the development of QSAR models,⁹³⁻⁹⁷ to highlight those pharmacophoric features needed for active molecules to elicit activity⁹⁸ and also to make predictions about drug metabolism.⁹⁹

1.3.3. SHOP descriptors

As described before, alignment-free descriptors offer a great advantage over those that need an alignment. However, GRIND descriptors do not take into account the absolute three-dimensional disposition of the molecule, as they are based on distances calculated between all the points in the MIF. This problem has partially been overcome with the recent development of SHOP methodology.

SHOP methodology uses alignment-free descriptors based on distances measured from reference points in the molecule, called anchor points, either to MIFs calculated around the compound with the GRID methodology, or to atomic positions. This method shows an analogy with GRIND descriptors, but in this case distances are calculated respect to defined points of interest in the molecule.

Anchor points can be defined in two ways:

- As the essential groups or substructures that are involved in the interaction with the receptor or with other molecules. As example, in some thrombin inhibitors, its interaction with the residue of aspartic acid Asp189 of the active centre S1 could be defined as the anchor point.
- As the group in a molecule that is involved in the synthesis of other compounds. As example, in the reactions of N-acylation for the peptide synthesis, the carboxylic acid of the residues can be defined as the anchor point.

In the SHOP methodology the molecules are described using three different kinds of descriptors: GRID-SHOP, SHAPE-SHOP and SHOP-Fingerprint. All these descriptors are based on the GRID methodology and the molecular geometry.^{79,100}

These three types of descriptors are described as follows:

1.-GRID-SHOP: These descriptors set are based on distances calculated between the anchor point/s of a molecule and the MIFs calculated around it.

In first place, MIFs are calculated for a molecule with GRID program with different selected probes. Then there is a filtering of the points of the MIFs to extract the most relevant regions that define the VRS. For each one of the remaining points, its distance from the anchor point/s defined in the molecule and its interaction energy with the molecule are considered. This information is codified in alignment-free descriptors as follows: For each different probe used to calculate the MIFs, diagrams energy/distance are performed, so that for each defined small range of distances, called bin, only the distance with the minimum energy value is considered.

As example, a GRID-SHOP diagram obtained with probe N1 is shown in figure 16

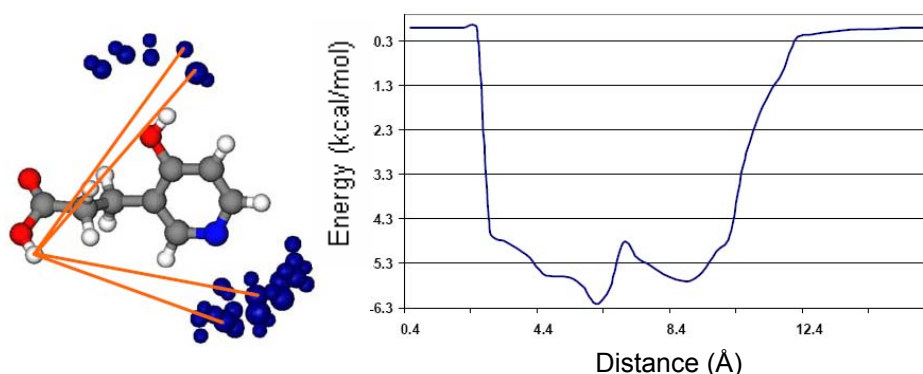


Figure 16. GRID-SHOP diagram obtained with probe N1.

2.-Shape-SHOP: This descriptor set describes the volume of the molecule with the MIF obtained with probe N1. Distances between the anchor point/s and the surface of the molecule defined with the MIF are calculated. The number of times that a distance appears for a different range of distances is codified.

As example, a Shape-SHOP diagram is shown in figure 17.

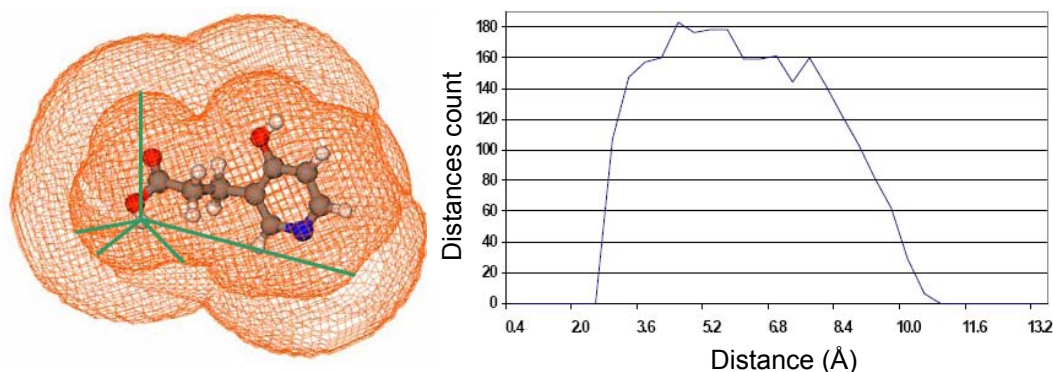


Figure 17. GRID-Shape diagram.

3.-Fingerprints-SHOP: The distances between the anchor point/s and the atomic positions of the molecule are calculated. These distances are divided into hydrophobic, hydrogen bond acceptor, hydrogen bond donor and formally positive and negative, according to the atom kind. The distances found can be stored as Gaussian function or on/off variable (binary-like). In figure is shown the SHOP-Fingerprint descriptor calculated, respect to hydrogen bond donors in the molecule, with a Gaussian-like shape. The values range from 0 to 1.

As example, a Fingerprints-SHOP diagram is shown in figure 18.

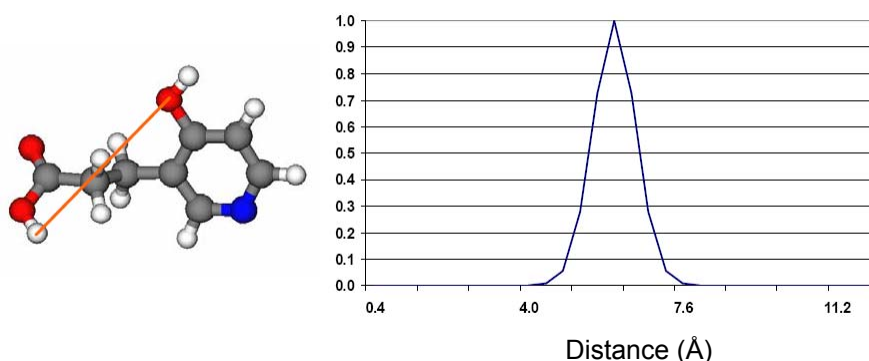


Figure 18. Fingerprints-SHOP diagram.

Although in this work will not be used, SHOP methodology can also be applied for molecules where several anchor points are defined in its structure. In this case, it is necessary to define a new descriptor called GEOM-SHOP. This descriptor set measure the distances and angles between the different anchor points.

Each one of these descriptors, GRID-SHOP, Shape-SHOP and Fingerprints-SHOP, has rendered a vector where numerical values have been stored in an ordered manner, according to the distance. Finally, these vectors are stored ordered one after the other, being the whole descriptor that SHOP has calculated for each molecule.

1.3.4. FLAP methodology

FLAP (Fingerprints for ligands and proteins) is a procedure that describes the pharmacophoric properties of ligands in terms of tetrahedrons defined either between atoms of the structure or between selected points of molecular interaction fields calculated with the program around the molecule with fixed probes.^{47,48} This lattice-independent description can be used for many drug-discovery related applications.¹⁰¹

In FLAP procedure, each molecule is described according to the whole possible tetrahedra (groups of four atoms) that can be selected on its structure. Each tetrahedron is codified into a bit-string of characters where the distance and spatial position of the four atoms is represented. The tetrahedrons are characterized considering the kind of atoms present in each vertex (for example, hydrophobic, hydrogen bonding acceptor or donor atoms), the spatial distribution of these 4 points, in terms of six distances between them, and the chirality of the tetrahedron in case of asymmetry.

In a ligand-based virtual screening performed with the FLAP procedure, the number of tetrahedron coincidences between a template and the different compounds of a database is used as the criterion to establish a candidate ranking. The bit-strings of the template and the compounds of the database are compared according to a set of features.

The following parameters can be configured for the calculation:

1. Distance tolerance: This parameter defines the tolerance between pair wise atoms (from template and dataset molecule) in Å.

During the calculation, a shape filtering can be performed. The shape of each database molecule is analyzed, so that it should not differ much from the one of the template. This shape consideration can be made with the following two parameters.

2. Unselectivity level: This feature allows a percentage of the atoms of the test molecule to lie out of the template molecular volume. The number is given as the double of this percentage of atoms divided per 100. A value of 0,4 would be so a 20% of the test molecule atoms that can lie out the template molecular volume.

3. Cavity expansion: The pseudo-cavity defined by the molecular template can be extended in an integer number of Å.

4. Minimum number of atoms on different regions: It is possible to define how many atoms must be placed inside spheres defined around the different regions fixed previously.

5. Region definition: In the different zones fixed previously in the template, the presence of a certain generic atom can be forced. In the table, this selection possibility is described as the region code (**Reg**), the radius of the sphere (**Rad**) and the minimal number of atoms desired to be there (**Min**). 1 or 2 different regions have been defined in each calculation (**A** and **B**, respectively). In each region a defined kind of generic atom feature is required: in "22R,23R" and "2 α ,3 α " regions, hydrogen bond donor or acceptor, in the "lipo" region, hydrophobic, and in the "carb" region, hydrogen bond acceptor.

6. GRID-probes fixation: In the regions previously defined, one, two or three atoms with assigned fixed probe/s, can be forced to be placed.

7. Atom properties association: With this configuration feature, the properties assigned to the atoms are defined. In the generic case, the atoms are defined into hydrophobic, donor or acceptors in terms of its atom type (**p=1**). In the specific case, a correspondence table, derived from a comparison of the GRID probes, is applied to assign each atom to a fixed probe. This table was primarily used as default (**p=def**), but later the F atoms existing in some compounds of the data set, according to information available,¹⁰² was assigned to O probe (**p=F**).

8. Number of rotatable bonds: This feature can be defined in relation to the conformer generation step.

9. Maximum number of conformers: The maximum number of conformers generated for each structure can be defined. A high number can make sure an extensive analysis of the conformational space of each structure but at the same time increases the calculation time. In case of rigid molecules, although the number of conformers required could be high, the method can provide a lower number of conformations.

1.3.4.1. New version of FLAP

A new version of FLAP, recently developed, uses points selected from MIFs calculated around the molecule as a reference to align the molecules. This procedure works as follows. A database is created to store, for each compound, the information related to the GRID Molecular Interaction Fields (MIFs) for the conformers generated on-the-fly. Then, among the compounds known as active, the method selects one (or even more, up to four) to use as reference template(s). This is done automatically by an optimisation routine: FLAP uses as input a series of active and inactive known compounds. Then a model is created to discriminate between both series of compounds. This model is then used to rank the compounds in the database. The enrichment curve of the active compounds is used to quantify the quality of the model. In case of good quality, the top ranked compounds (from the library) can be classified as possible hits and tested.

In the FLAP database the GRID Molecular Interaction Fields (MIF) have been stored for each conformation of each compound. They have been obtained (usually) with the probes DRY, O, N1 and H, so they refer both to the hydrophobic character of the molecule and to its hydrogen bonding character. The template is described with the same MIF as well.

When comparing to the template one molecule from the database, its conformations are all considered, one by one. Each conformation of the dataset compound could be oriented over the template in many different ways. The orientations are selected according to the quadruplets of pharmacophore points generated with the classic FLAP engine. The only difference here is that these pharmacophore points can be the molecular atoms or MIF points.

For each orientation of each conformation, a score is given: the conformer with the best overall score is the result of the comparison. The score is a measure of the overlapping of MIF of the two molecules or overlapping of the atomic positions.

1.4. Data processing

1.4.1. Similarity indexes

1.4.1.1. Carbó similarity index

On 1980 Carbó *et al.*¹⁰³ proposed a similarity index to compare the electronic densities of two overlapped molecules, and thus to establish a similarity criterion between them (equation 3).

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

where ρ_i = electronic density of molecule i
v = volume

Equation 3. Carbó similarity index.

The numerator is a measure of the overlapping between the electronic densities of two molecules (A and B) and the denominator is a normalization factor to assure that the similarity index value is included in the range from 0 to 1. The value of 1 corresponds to a maximum similarity between the compared molecules.

The proper expression of the Carbó index can be adapted to properties related with molecular fields or electrostatic potentials, which is the case used in this work. In this case the former equation is expressed as equation 4.

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

where N = Number of variables to compare.
 P_{ij} = Property of molecule j that is compared with data i (j = A or B).

Equation 4. Carbó similarity index applied to molecular fields or electrostatic potentials.

1.4.1.2. Hodgkin similarity index

Hodgkin *et al.*¹⁰⁴ proposed a similarity index based on that of Carbó. These authors concluded that the Carbó index for two different molecules, A and B, with the profile $\rho_{i,A} = n \cdot \rho_{i,B}$ rendered a value of 1. So, they noticed that the Carbó similarity index represents the similarity between the shape of the density distributions between two molecules, but not between its magnitude. So, a new index that would include these two parameters was purposed (equation 5).

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

where ρ_i = electronic density of molecule i ($i = A$ or B).

Equation 5. Hodgkin similarity index.

For properties related with molecular fields or electrostatic potentials, the Hodgkin similarity index is expressed as equation 6.

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

where N = Number of variables to compare

$P_{i,j}$ = Property of molecule j that is compared with data i ($j = A$ or B).

Equation 6. Hodgkin Similarity index applied to molecular fields or electrostatic potentials.

1.4.1.3. Tanimoto similarity index

If the molecules are described according to the presence or absence of features, i.e. the molecular descriptors are numerical strings which may contain several zeros, the Tanimoto coefficient,¹⁰⁵ defined as equation 7, may be useful.

$$T = \frac{c}{a + b + c}$$

where:

a = number of times a value is present in the descriptor of molecule 1 and not in molecule 2.

b = number of times a value is present in the descriptor of molecule 2 and not in molecule 1.

c = number of a times a value in the string is present in the descriptor in both molecules.

Equation 7. Tanimoto similarity index.

1.4.2. Multivariate analysis

1.4.2.1. Principal Component Analysis (PCA)

In QSAR studies the number of variables is usually much higher than the number of compounds. Principal Component Analysis (PCA) is a multivariate method that extracts the information present in a matrix of variables and simplifies it into a few new variables called principal components (PC).¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

The PCA method decomposes the matrix of variables (X) into the matrixes described in equation 8.

$$X = T \cdot P^T + E$$

where X = matrix of variables (m x n), where n = n° of compounds, m = n° of variables.
T = objects or scores matrix (n x p), where p = number of PCs
P^T = transposed projection or loadings matrix (m x p)
E = residual matrix (m x n)

Equation 8. Decomposition of the matrix of variables (X) by the PCA method.

The objects or scores matrix (T) describes every compound according to its projection in the PCs. The projection or loadings matrix (P) describes each PC according to the weight of each one of the original variables. The residual matrix (E) contains the information that the method has not been able to explain with the number of PCs used.

Each PC corresponds to the directions of maximum variance in the multivariate space. The PCA method represents multivariate table in a space of much less dimensions. The PCs are orthogonal and they are ordered so that the first one bears more information than the second one, and so on.

The results of the PCA can be plotted in the score and the loading plots.¹⁰⁸ The score plot represents the position of the molecules in the space of PCs, so that they could be grouped by clusters. On the other hand, the loading plot represents the original variables in the space of the PCs. The value of the projection of a variable shows its contribution on the PCs.

1.4.2.2. Partial Least Square (PLS)

The Partial Least Square (PLS) method is a multivariate analysis tool like the PCA, but in this case the matrix of variables is decomposed taking into consideration the activity values of the compounds, so that structural information is extracted from the matrix of variables maximizing at the same time its correlation with the activity, and minimizing the residual of the activity as well.^{106,108}

The result of a PLS is a series of new variables which are a linear combination of the original ones. These new variables, are called latent variables (LVs), explain both the internal structure of the data and the activity as well. The activity of a compound can be predicted with the projection of its corresponding variables in the space defined by the LV. In this sense, the PLS method is useful to generated QSAR models with a certain activity predictability of new compounds. The set of compounds used to make the model, called training set, must have homogenous known activities. To enhance the predictability of the model, compounds have to be selected with homogenously distributed activities all along the activity range.

Validation methods are used to measure the prediction ability of a model.¹⁰⁹ They give information about the optimum number of LVs for the model and about the predictability of the model. There are two kinds of validation methods: the cross-validation or the external ones.

The cross-validation methods perform an internal validation of the model. They use the compounds of the training set of the model, so that some of them are excluded, the

model is rebuilt with the left compounds and the activity of the excluded compounds is predicted with the new model.

There are different ways to select the compounds to build this reduced model, being the most usual the Leave One Out (LOO) and the random groups. In LOO the models are rebuilt taking away one compound of the training set every time and the process is repeated until this operation is made for all the compounds. In random groups, compounds are randomly assigned to different groups. The models are rebuilt taking one group out at a time and the process is repeated until all groups have been excluded once.

For each one of the dimensions of the model the experimental activity and the predicted one are compared according with the following parameters:

Standard Deviation of Prediction Errors (SDEP)¹¹⁰ (equation 9):

$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum (y_i^{calc} - y_i^{real})^2}{N}}$$

Equation 9. Definition of the SDEP parameter

Correlation Prediction Coefficient (Q²) (equation 10): Represents the proportion of the variance that the model is able to predict. As closer the value is to 1, the better is the prediction ability. Q² is the basic measure with which the QSAR models obtained with PLS are evaluated.

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (y_i^{calc} - y_i^{real})^2}{\sum (y_i^{calc} - y_i^{mean})^2}$$

Equation 10. Definition of Q² parameter

External validation methods are based on the prediction of the activity of a group of compounds which have not been used in the training set of the model to determine the predictive ability of the QSAR model.

1.5. Molecular alignment

The ability of a compound to interact with the corresponding binding site of a biological receptor is explained by the interaction pattern of this compound with its environment. In this sense, if two compounds would show a good alignment between certain functional groups, a same interaction profile with the receptor could be expected. In this work, molecular alignments have been performed to assess the similarity of molecules respect to a template with program MOE.¹¹¹

The flexible alignment procedure that MOE program performs is based on the generation of random conformers of a set of molecules, using force-field MMFF94, and the consequent overlap between them. The measure of a good similarity is mainly based on the overlap between aromatic and hydrophobic zones, hydrogen bonding acceptor and donors groups and the molecular shape. The overlap is quantified by a

function that considers a good overlap between these zones and also the internal energy of the conformers generated.

The alignment can be made fixing the conformation of the template on its active conformation (AC) and then finding, in an iterative way, the better alignment given by a molecule under study respect the former. In this work this method has been applied as a visual way to check the suitability of a candidate compound from a pharmacophoric point of view.

2. Application of computational methods to find new BR-like compounds

2.1. Introduction

Brassinosteroids (BRs) are potent plant growth promoters whose difficult obtaining procedures have been the main drawback for its general use in agriculture to enhance the quantity and quality of crops.^{1,3,112} As mentioned before, one of the main objectives of this work is to find new BR-like compounds with a more suitable structure, either from a synthetic or a commercial way, keeping those structural requirements needed for active BRs to elicit biological activity. In precedent works in our group,^{39,113} the application of GRID methodology to a set of BRs made possible to conclude that the four hydroxyl groups, the carbonyl and the hydrophobic end of the side chain of brassinolide (BL) (**1**), the most active BR, were very important for activity. Since then, these structural features have been taken into account in the design of new structures of BR-like compounds.^{49,50,102} Nevertheless, GRID methodology does not allow the performance of a systematic search of commercial compounds, since the alignment step between the template and the molecule under study is a slow and subjective step.

The recent development of new methodologies which use alignment-free descriptors based on Molecular Interaction Fields (MIFs) has encouraged us to perform a systematic search of new BR-like compounds over commercial compounds databases with the aim to find a new lead. The procedures that will be used in this work are GRIND⁴³, FLAP^{47,48} and SHOP.⁴⁵

To find new active structures, two different strategies are proposed. In first place, virtual screenings will be performed over commercial screening compound databases, using a QSAR model developed with GRIND descriptors (Part 2.2) and using as well FLAP methodology (Part 2.3). In this case, the candidate compounds obtained with both methods will be directly evaluated in the Rice Lamina Inclination Test (RLIT), a bioassay available in our group to measure the activity of compounds as plant growth promoters.^{37,38}

On the other hand, a scaffold hopping procedure will be performed with SHOP methodology to try to replace the steroidal skeleton of compounds **6** and **7** (Part 2.4). Since some synthetic steps are required to obtain possible active compounds, with the side chain **5** linked to the corresponding skeleton, the search will be focused on commercial building blocks databases. Once these compounds will be synthesized, they will be evaluated in the RLIT. Also, keeping this idea of finding an analogue to the skeletons of **6** and **7**, a virtual screening will be performed over a commercial compound database using a QSAR model using GRIND descriptors (part 2.5). In figure 19 a scheme of these strategies is shown.

It must be highlighted that, to perform a search to find new BR-like compounds with the methods described above, only pharmacophoric parameters will be considered. Obviously there are a lot of phenomena that define the biological activity of an active agrochemical compound: transport inside the plant, possible metabolic transformations, the rate of degradation, toxicity, to cite some of them. Nevertheless the information nowadays available about these phenomena for BRs is still limited. Keeping in mind this limitation, the whole discussion of results and conclusions will be leaded considering only pharmacophoric features of the new analogues that will be being proposed.

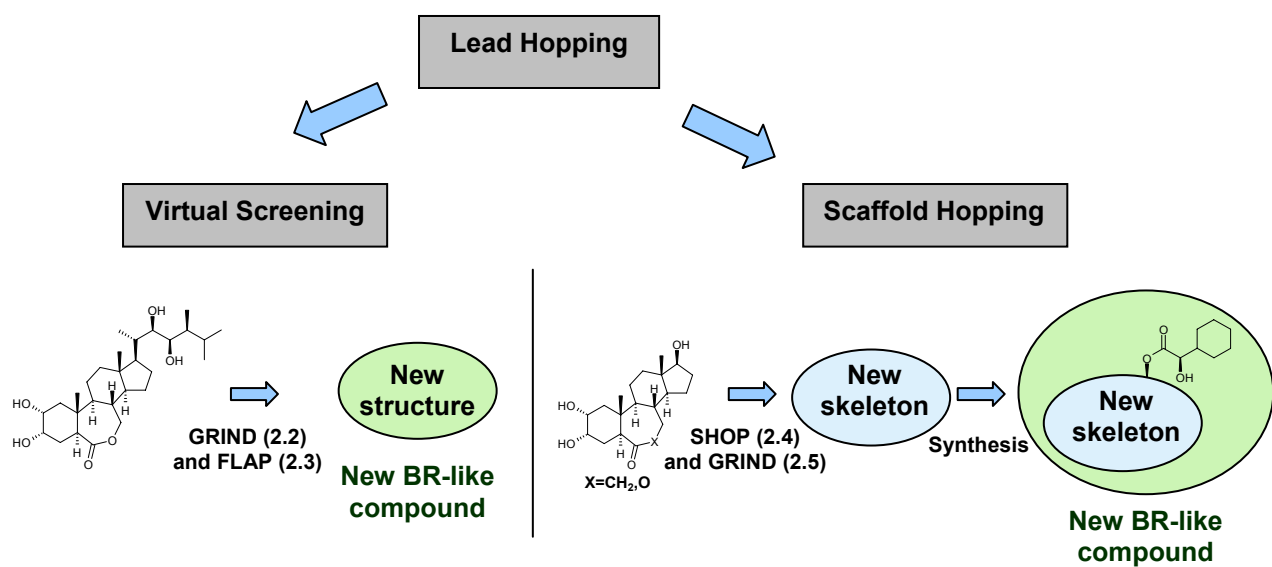


Figure 19. Scheme of the approaches used to find new BR analogues

2.2. 3D-QSAR model for brassinosteroids (BRs) using GRIND descriptors

A 3D-QSAR model is developed for BRs using GRID-Independent descriptors. This model will be further used to perform a virtual screening over a commercial set of compounds databases trying to find news hits with activity as plant growth promoter.

2.2.1. Data set

The data set that will be used in the performance of the QSAR model consists of 177 compounds, most of them synthesized in our group, whose biological activity with the RLIT has been evaluated in our group.^{38,102} This biological activity is given as the negative logarithm of the dose that produces an inclination of 45° of the rice lamina (see Annexe part). The compound with highest activity has been brassinolide (BL) (**1**), for which an activity value of 4.01 has been obtained. Compounds that have given an inclination angle minor than 45° at a dose of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}$ have been considered as inactive.

The 47 active compounds considered and their biological activity values are described in figure 20.

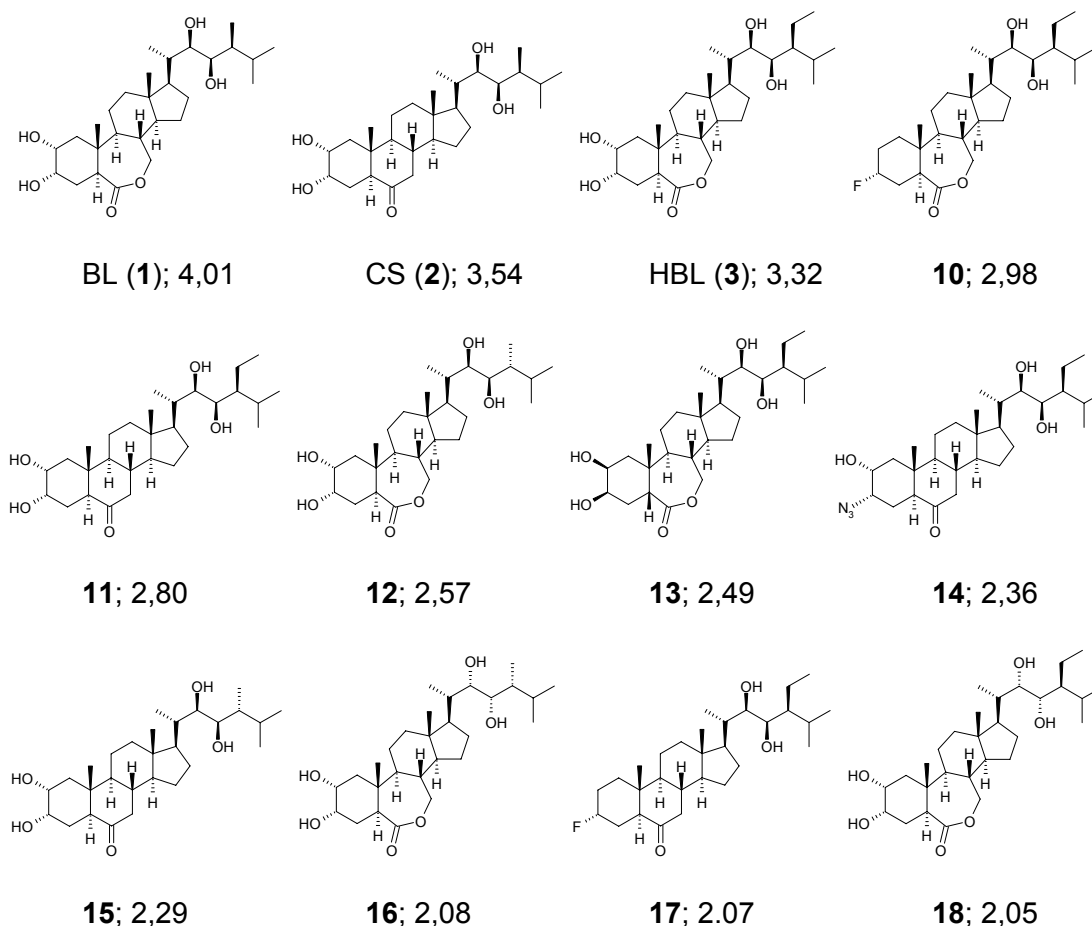


Figure 20. Active compounds used in the building and validation of the QSAR model.

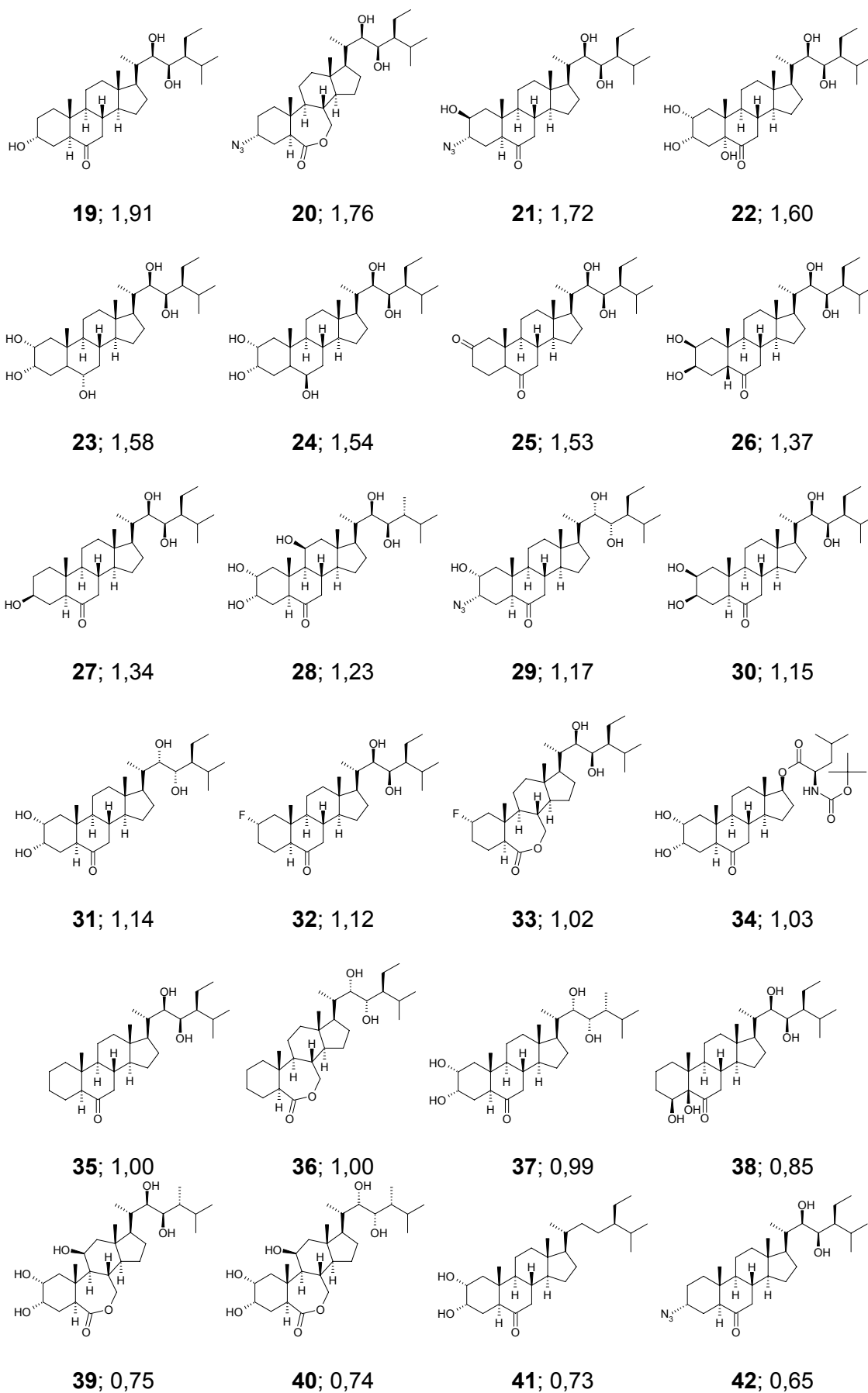


Figure 20. Active compounds used in the building and validation of the QSAR model.

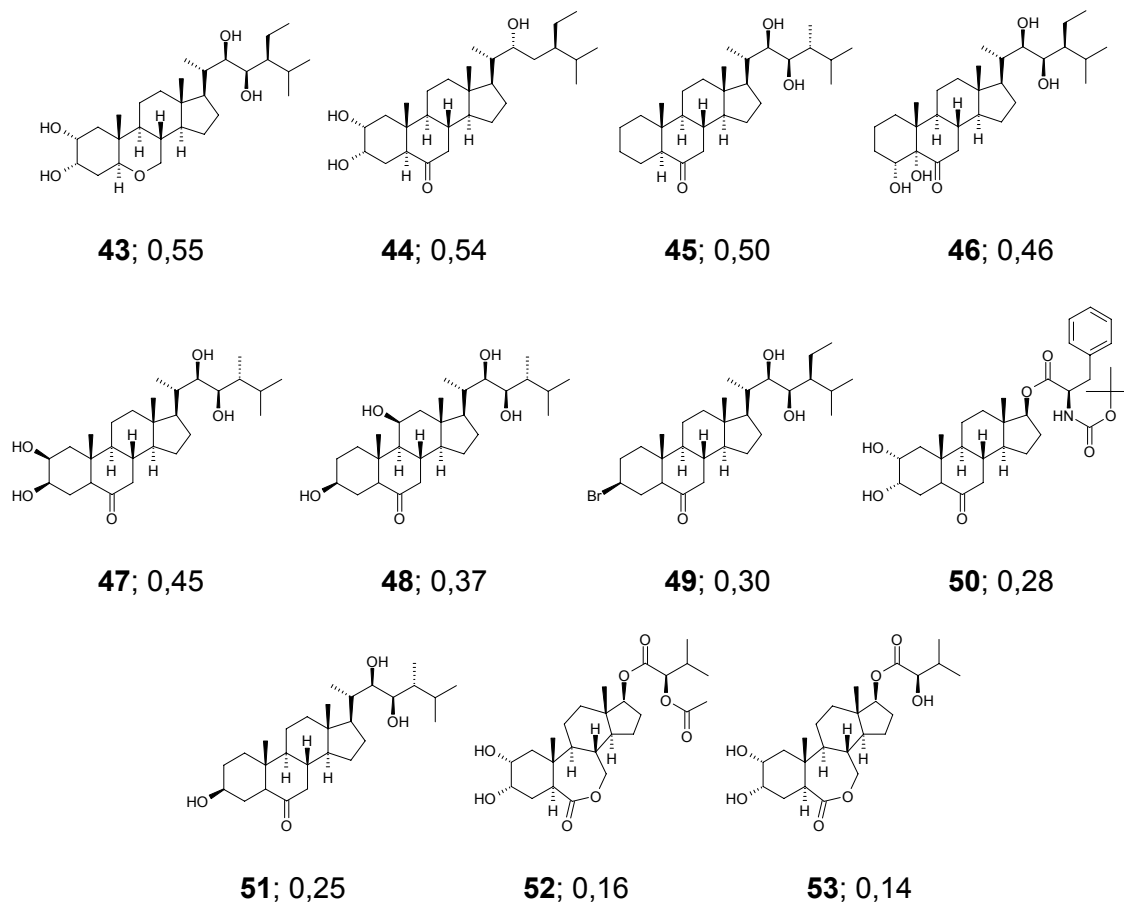


Figure 20. Active compounds used in the building and validation of the QSAR model.

Figure 21 shows the 130 inactive compounds used in the training set or in the test set of the QSAR model. Their activity value is 0.

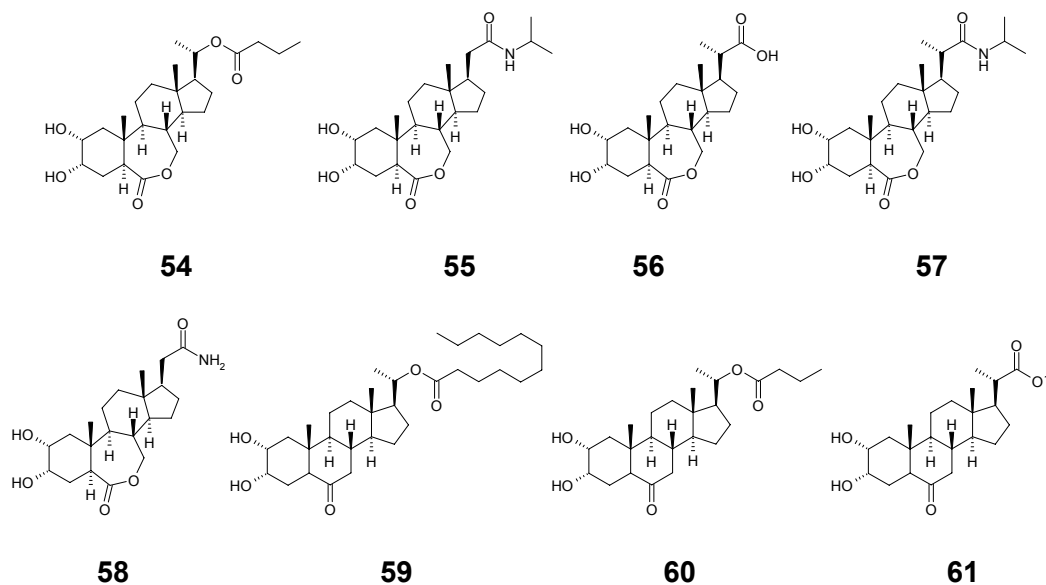


Figure 21. Inactive compounds used in the building and validation of the QSAR model

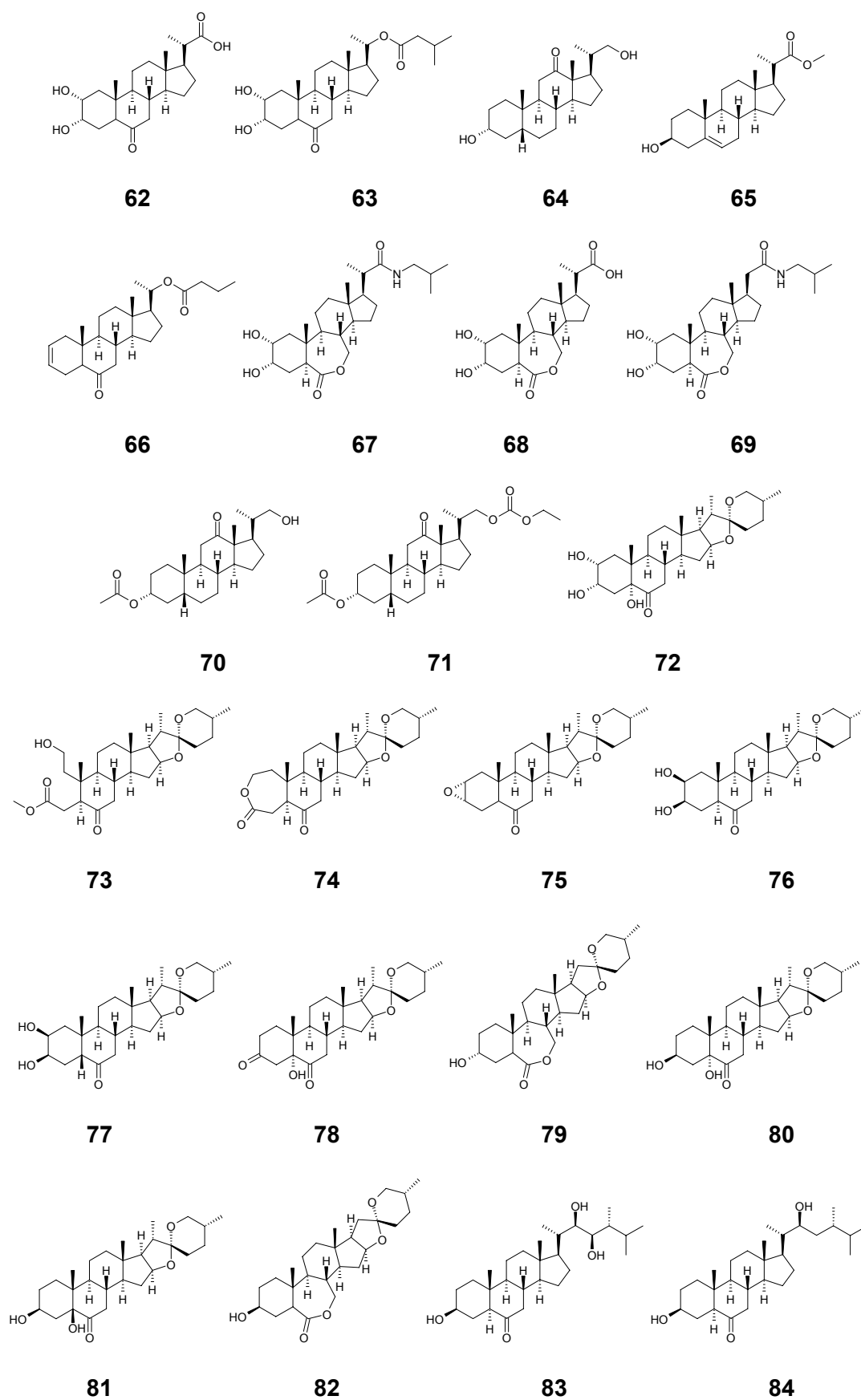


Figure 21. Inactive compounds used in the building and validation of the QSAR model.

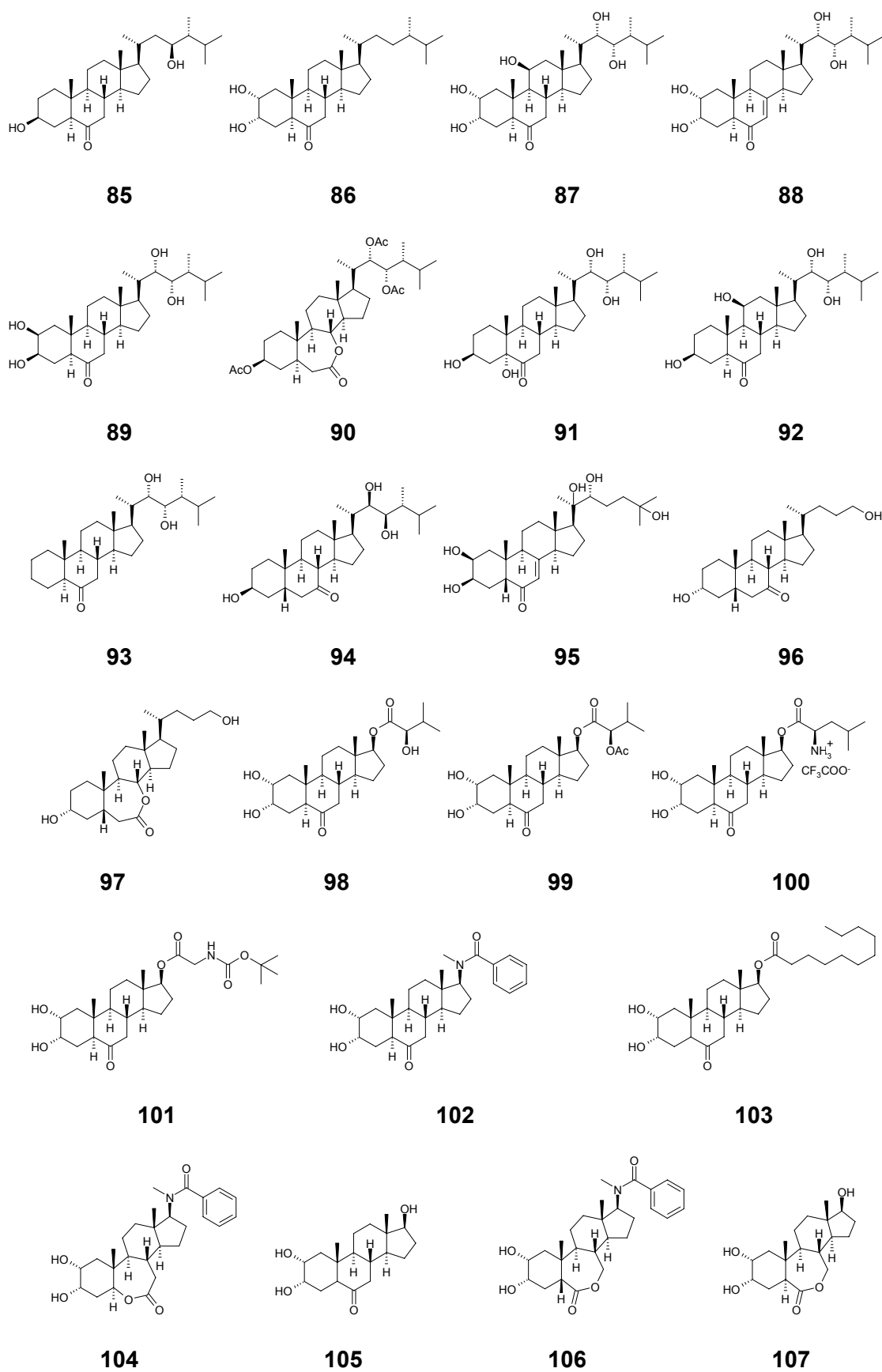


Figure 21. Inactive compounds used in the building and validation of the QSAR model.

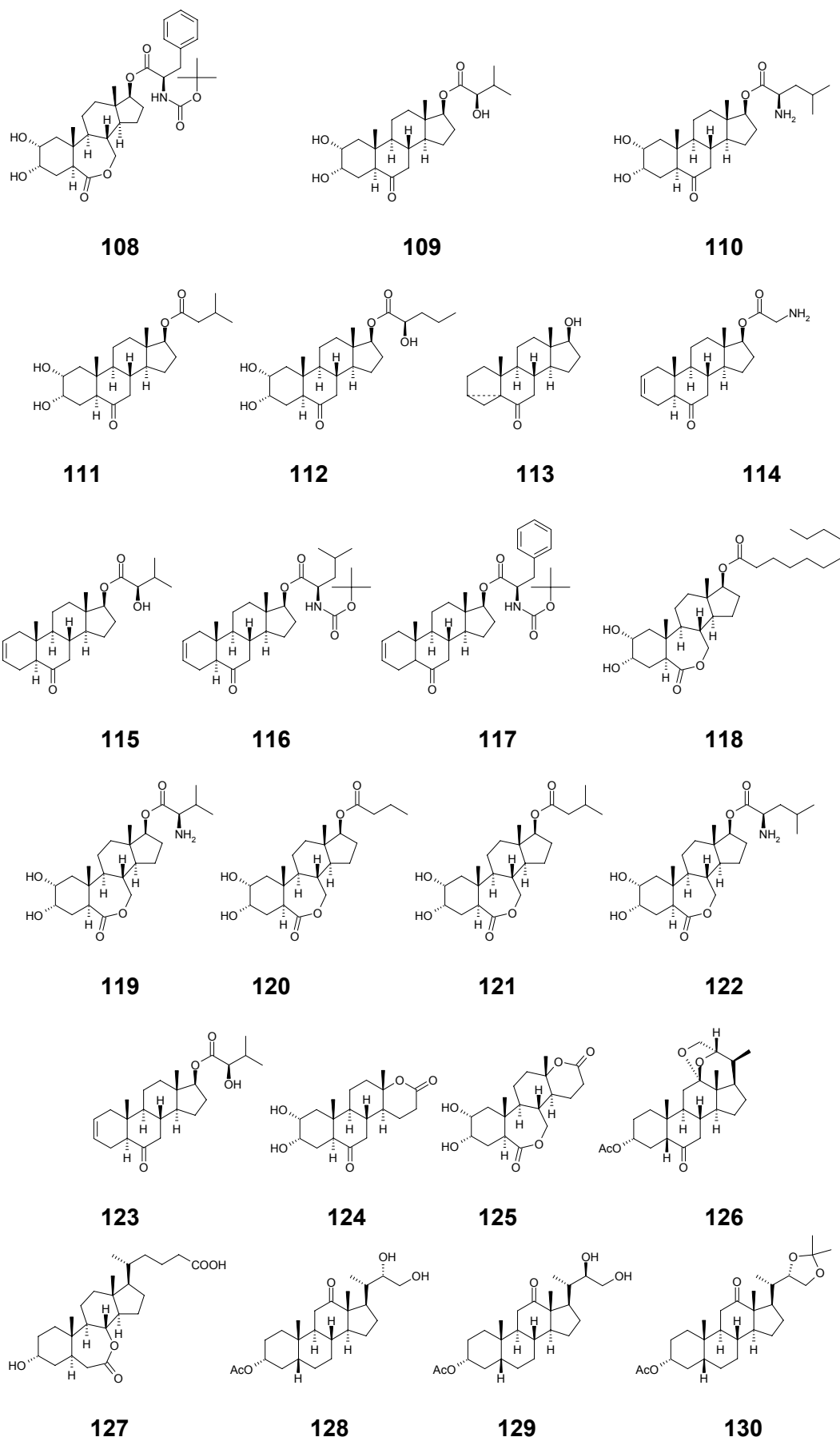


Figure 21. Inactive compounds used in the building and validation of the QSAR model.

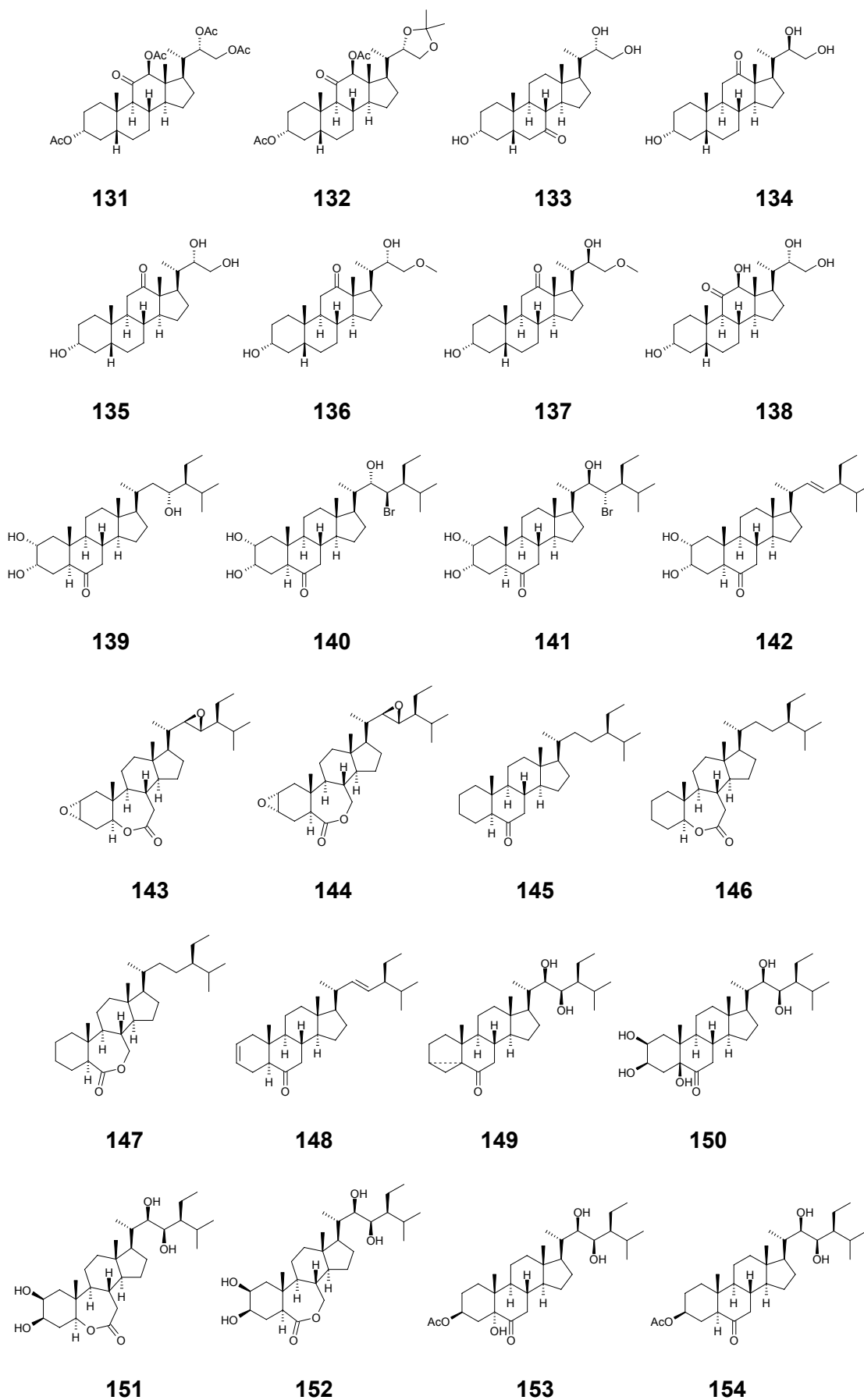


Figure 21. Inactive compounds used in the building and validation of the QSAR model.

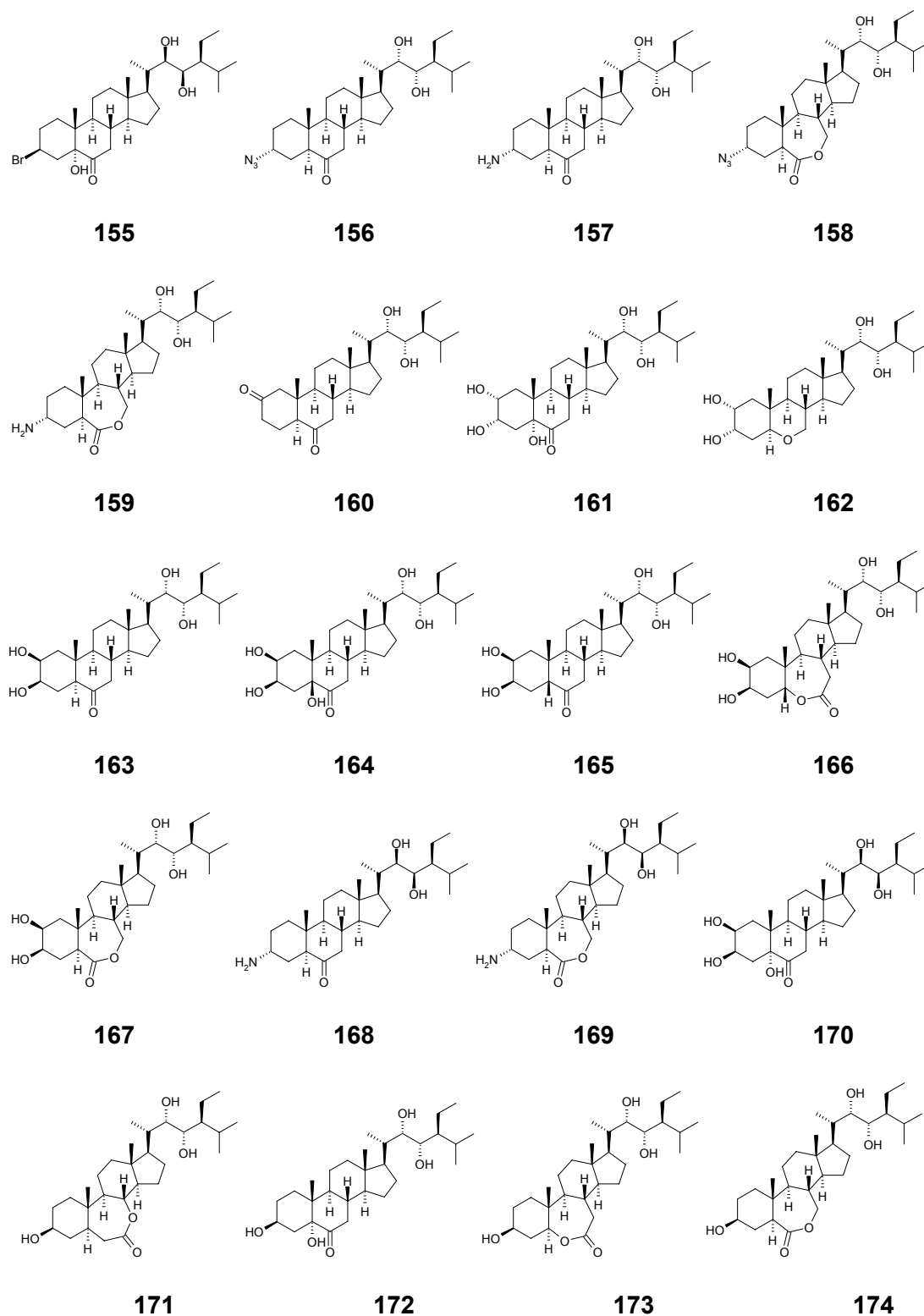


Figure 21. Inactive compounds used in the building and validation of the QSAR model.

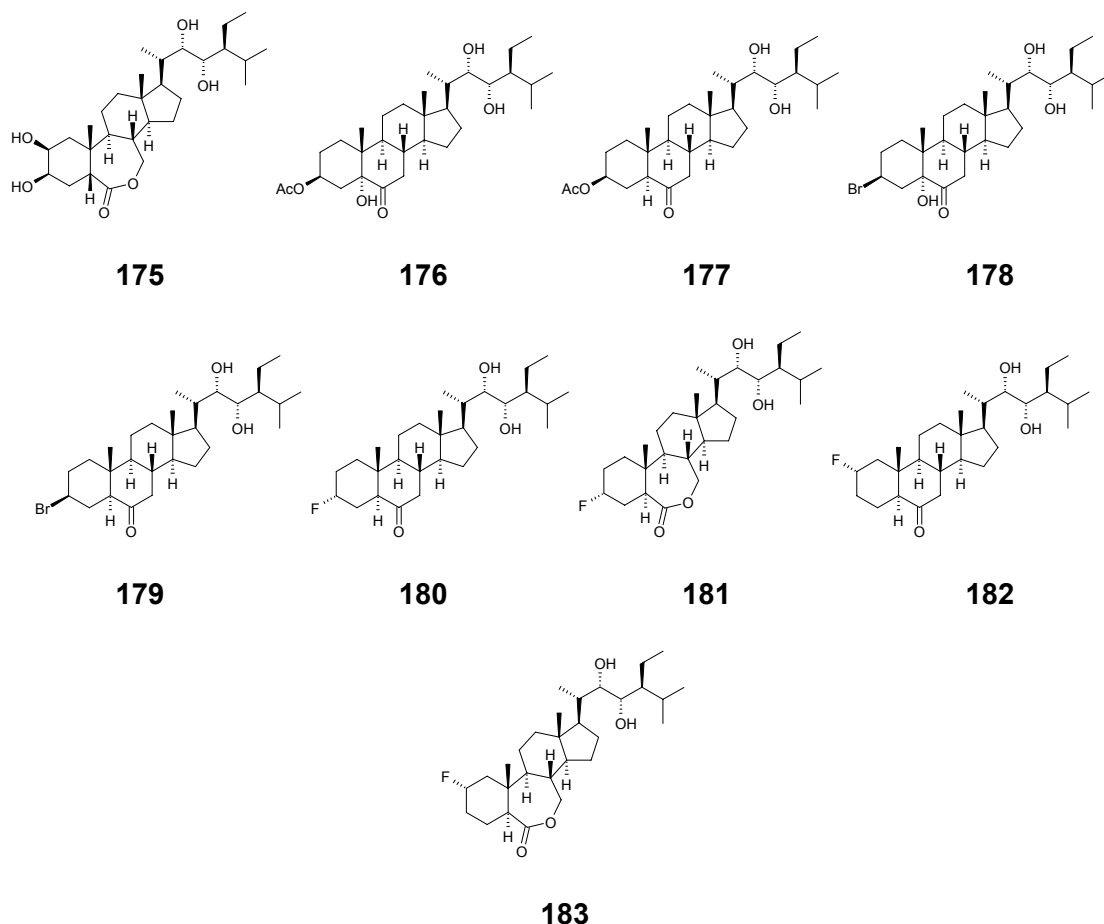


Figure 21. Inactive compounds used in the building and validation of the QSAR model.

2.2.2. Compound selection for the training set

2.2.2.1. Conformer generation

The minimum energy conformer and the most diverse conformers, considering a maximum of 20 conformers per compound, were generated for each structure with a rule-based method performed with the program CONCORD.¹¹⁴ The structures of the dataset were coded in SMILES format,¹¹⁵ as this is the input file format for this program.

2.2.2.2. Choice of the compounds for the training set

With the aim to develop a homogenous QSAR model, we decided to build the training set of the model with the same number of compounds in a considered activity range. Five activity groups were considered: inactive compounds, compounds with an activity higher than 0 and lower than 1, compounds with an activity higher than 1 and lower than 2, compounds with an activity higher than 2 and lower than 3, and compounds with an activity higher than 3. For each of the four first groups, 8 compounds are selected. For the last range only the 4 compounds available are considered: BL (1), CS (2), HBL (3) and 10. So, the training set of the model consists of 36 compounds.

In order to select the most diverse compounds, for each range the 8 compounds are chosen by the Most Descriptive Compounds (MDC) criterion in the five-dimensional

space defined by the PCA scores of the GRIND descriptors calculated on the minimum energy conformation for each compound. For each different compound, the GRIND descriptors for all its conformers were calculated using probes DRY, O, N1 and TIP. The grid space was set to 0.5 Å and the smoothing window to 0.8 grid units. The number of filtered points was set to 150, with a weighting between distance and energy of 50%. The rest of options were left by default. To ensure the chemical diversity of the chosen compounds, the same process of subset selection was repeated using VOLSURF descriptors, calculated with default options.¹¹⁶ Volsurf descriptors calculate MIF-based pharmacokinetic properties of compounds.^{117,118} In all cases, the same dispersion of the previously highlighted compounds was observed in the space of the PCA scores (data not shown).

The whole of the non-selected active compounds will integrate the test set of the model.

2.2.2.3. Conformer selection of the compounds of the training set

Once the compounds of the training set have been selected, the most suitable conformer for each structure is chosen. This choice is done in terms of similarity indexes to the different active conformations (ACs) of BL (**1**), calculated through GRIND descriptors. In first place, the GRIND descriptors with the same calculation configuration as done before for the data set of molecules were calculated for the 3 active conformations of **1**: BL_sqr, BL_pls and BL_mvp. Then similarity indexes of Carbó¹¹⁹ and Hodgkin¹²⁰ were calculated for each conformer of the selected compounds of the training set respect to each particular active conformation of **1**. The conformer with the highest similarity value in both indexes with a defined AC of BL was chosen to integrate the training set. So, three different sets of conformers, and so, three different QSAR models, can be derived depending on the AC of **1** taken as reference. Additionally, a fourth training set, which renders a fourth QSAR model, can be proposed considering the conformation for each compound that appears to be most often top ranked to any AC of BL (**1**). Some compounds can have different selected conformations. In this case, all the selected conformers were chosen and one of them was selected in a later step.

After this calculation, four different training sets have been proposed to perform the QSAR models: "PLS model" for BL_PLS AC of **1**, "SQR model" for BL_SQR AC of **1**, "MVP model" for the BL_mvp of **1** and the "global model" considering the three ACs of **1** together.

2.2.3. Quantitative models

In first place, GRIND descriptors are calculated for conformers of the compounds of the training set. The selected probes are DRY, O, N1 and TIP. The grid space was set to 0.5 Å and the smoothing window to 0.8 grid units. The number of filtered points was initially set to 150, with an initial weighting between distance and energy of 50%. The rest of options were left by default.

Once GRIND descriptors were calculated, a PLS calculation was performed, which rendered a preliminary QSAR-model. Here, the last step of the conformer selection step was performed. As detailed before, for some compounds of the training set several conformers had been chosen. In these cases, a single conformer was selected through the plot of predicted vs. experimental activity. The conformer that rendered the best prediction of the experimental activity of the compound was selected. It must be

remarked that this selection criterion could cause overfitting, that is, the prediction parameters of the model could be overestimated.

A PLS calculation was performed again and the prediction ability of the model was refined by a variable selection procedure, performed using a fractioned factorial design that worked with a maximum of two PCs and used the fold-over-design and keep-uncertain-variables options. However, the Q^2 values obtained for the internal prediction and the SDEP value for the external prediction for these models were not high (table 2).

In some 3D-QSAR models using GRIND descriptors developed before,¹²¹ it was pointed out that some information from the lipophylic parts of the compounds of the training set could not be sufficiently highlighted if a correct filtering of the points was not done. The authors improved the predictive quality of the models filtering 500 points with an energy-distance balance of 25%. In this work, this filtering configuration was applied. Unfortunately, the previous predictive results were not considerably improved. The results are summarized in table 2. The number of latent variables (LVs) at which the statistical parameters have been calculated are described too.

Filtered points	Balance% Energy - distance	Statistical parameters	AC of BL (1) taken as reference			
			PLS	SQR	MVP	Global
150	50	Q^2 (random groups)	0,23 3 LV	0,51 3 LV	0,42 2 LV	0,44 3 LV
150	50	SDEP (external prediction)	1,14 1 LV	1,37 3 LV	1,38 3 LV	1,38 3 LV
500	25	Q^2 (random groups)	0,40 3 LV	0,42 3 LV	0,37 3 LV	0,61 3 LV
500	25	SDEP (external prediction)	1,12 3 LV	1,14 3 LV	1,18 3 LV	1,06 3 LV

Table 2. Predictability of the first QSAR models obtained.

As seen, the change made in the weighting function has not yielded better prediction results, nor internal, nor external.

At this point, one interesting consideration could be done by checking if the four models obtained, using the 3 different defined ACs of BL (1), gave similar influence to the different variables. To perform this, the coefficients of the model obtained using 150 points and a energy-distance balance of 50% were plotted between the BL-PLS model and the three other models. The results are shown in figure 22.

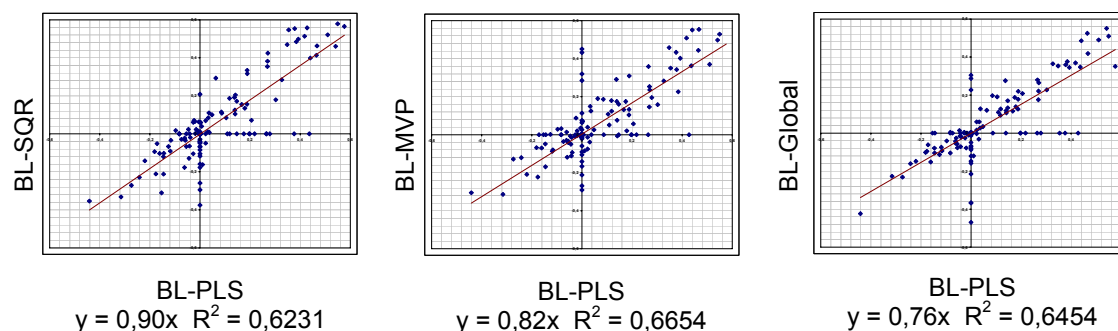


Figure 22. Plot of the coefficients of the “PLS model” with the coefficients of “SQR model”, “MVP model” and the “global model”. Regression plots and its correlation factor are shown.

As seen, the four models obtained with the three ACs of BL (1) seem to be equivalent, since the regression line obtained has yielded a slope close to 1. So, next studies to obtain a good model will be made considering arbitrarily as a reference the AC of 1 defined as PLS-BL.

Coming back to the models, a detailed revision of the MIFs computed to perform models shown in table 2 highlighted that the azido groups, present in some compounds, were not correctly modelled as expected. The probe N1 (donating hydrogen bond interactions) does not keep filtered nodes around the terminal nitrogen atom of this group. This behaviour is not what should be expected, since the terminal nitrogen atom of the azido group has always electron pairs available to potentially accept hydrogen bonds.¹²² Moreover, the probe TIP detects the high convex extreme of the azido group, defining distances that have a big weight on the model, since the training set has some very active compounds having azido groups (figure 20). In figure 23 the MIF obtained with N1 probe for compound **14**, showing the lacking of interaction energy on the terminal nitrogen atom, can be seen. On the contrary, this atom is recognized by Shape probe. This filtering pattern was observed both with the model obtained filtering 150 points with a distance-energy weight of 50% and with the model obtained filtering 500 points with a distance-energy weight of 25%.

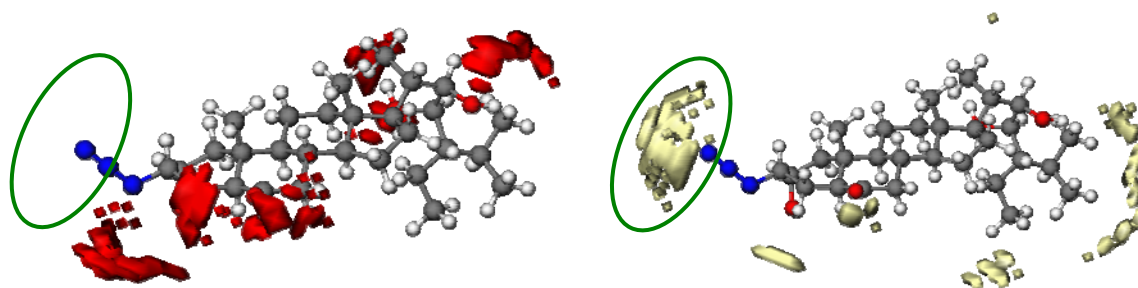


Figure 23. Contour of the filtered points from MIFs obtained for **14** with N1 probe, on the left, and with Shape probe, on the right. As shown, there are no points coming from N1 MIF around the terminal nitrogen atom of azido group (green circle). On the other hand, points coming from Shape MIF are left in this area.

Due to this drawback, the compounds having azido groups on their structure were excluded from both the training and the test set of the PLS model, being a limitation on the applicability of the model. Training set was built again, following the mentioned strategy, for the PLS model using the same criterion described in part 2.2.2.2.

Another problem that was observed in the calculation of the MIFs was that the fluorine atoms were not considered as hydrogen bond acceptors. The filtering process applied for the MIF obtained with the N1 probe did not left any point near this region. The problem to this behaviour is given by the fact that the activity of some compounds bearing fluorine atoms on its structure, for example **10**, can only be explained, in terms of MIFs, considering this atom as a potential hydrogen bond acceptor. The solution came with the calculation of MIFs with GRID program, setting of the DWAT option to 20. DWAT is an option of MIF calculation that takes account of the dielectric constant of the media where MIFs are calculated for a molecule. The default value for DWAT is 80, representing the behaviour of a compound in water media. The idea beyond this was that a decrease on the dielectric constant could cause that some points of the original MIF obtained with N1 probe could be left around the fluorine atom. Additionally N1 probe was substituted with N1+ probe. This idea succeeded, as figure 24 shows.

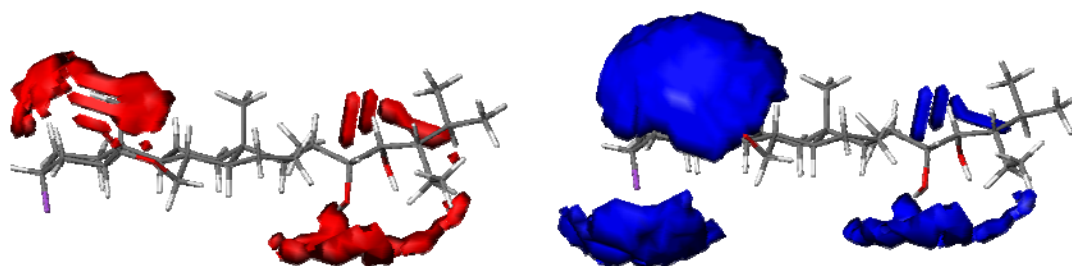


Figure 24. Contour of the filtered points from MIFs obtained for **10** with N1 probe and a DWAT value of 80, on the left, and filtered points from MIFs obtained for **10** with N1+ probe and a DWAT value of 20, on the right. As seen, only in the second case energy points are left around fluorine atom, shown in purple.

New models were built, leaving out compounds with an azido group on their structure, setting the DWAT value to 20 and using N1+ instead of N1 probe. Its prediction ability is shown in table 3.

Filtered points	Balance% energy - distance	Q ² (random groups)	SDEP (external prediction)
150	50	0,60 2 LV	1,28 2 LV
500	25	0,65 2 LV	1,45 2 LV

Table 3. Predictability of the QSAR models obtained using as AC of reference PLS-BL, leaving out compounds with an azido group, setting the DWAT option as 20 and using DRY, O, N1+ and Shape probes.

As seen, the internal prediction values exceeded those obtained in the conditions of table 2. Nevertheless, the external prediction value was still low. On the other hand, the calculation of the MIF with program GRID, setting the DWAT option to 20, were time consuming, since the whole MIF points of the calculation (kout file) had to be stored to import later to ALMOND program to calculate GRIND descriptors. This slowness of the calculation made impossible to apply these conditions to the calculation of descriptors for large collection of compounds to perform virtual screenings. So, we decided to take out the compounds with fluorine atoms on their structure to try to find models with good external prediction ability in terms of accuracy and timing. In this sense, the training set

had to be built again using again the criterion defined in part 2.2.2.2 and N1 probe was used again instead of N1+. It must be remarked that taking away compounds with fluorine and azido groups from the training set decreases the chemical diversity of the model.

Four models were obtained using different point filtering options. All of them used as AC of reference BL-PLS. Table 4 shows the obtained results.

Filtered points	Balance% energy - distance	Q ² (random groups)	SDEP (external prediction)
150	50	0.42 1 LV	0.97 1 LV
150	25	0.40 1 LV	1,01 1 LV
500	50	0.48 3 LV	0.54 3 LV
500	25	0.47 2 LV	0.68 2 LV

Table 4. Predictability of the QSAR models obtained using as AC of reference PLS-BL, leaving out compounds with either an azido group either fluorine atoms.

As seen, the model that has yielded the best prediction ability is the one obtained filtering 500 points with an energy-distance weight of 50%. Its external prediction value is considered good enough to use this model to perform the virtual screening. Moreover, the interpretation of the model has given information about the most important distances between points of the VRS to explain the activity of BRs. The coefficients with a highest weight are highlighted with red dots in figure 25.

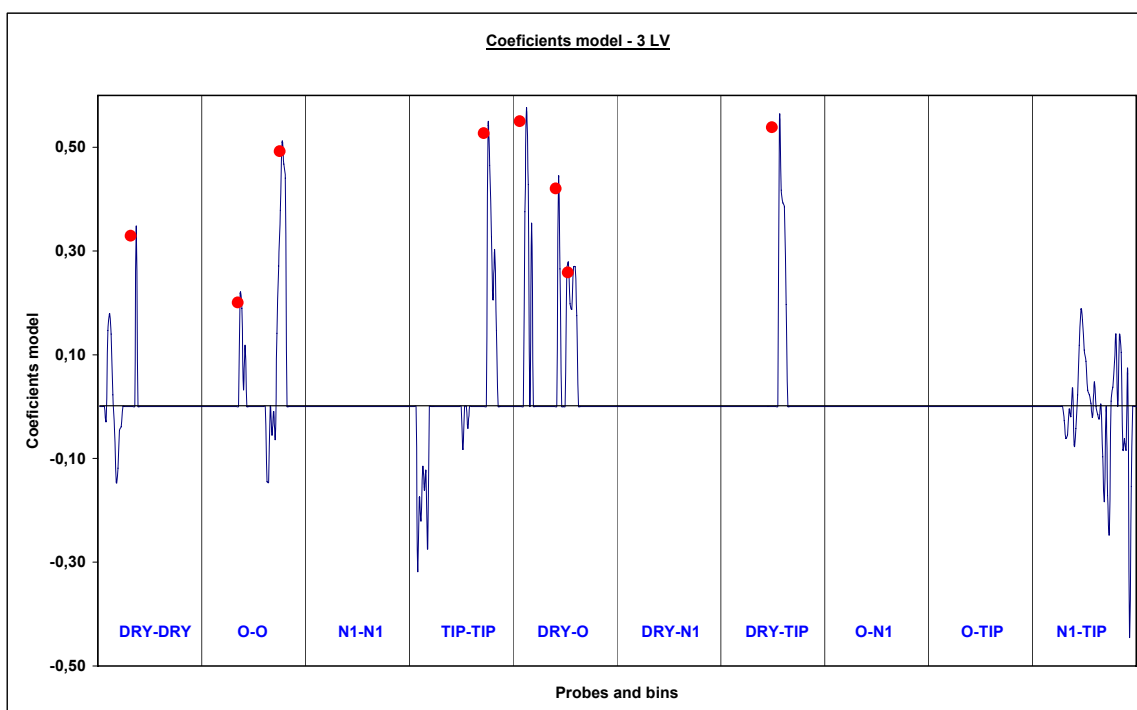


Figure 25. Highest weight coefficients in the QSAR model developed.

The distances corresponding to the highest coefficients, applied to BL (1), and its range values are shown in figure 26.

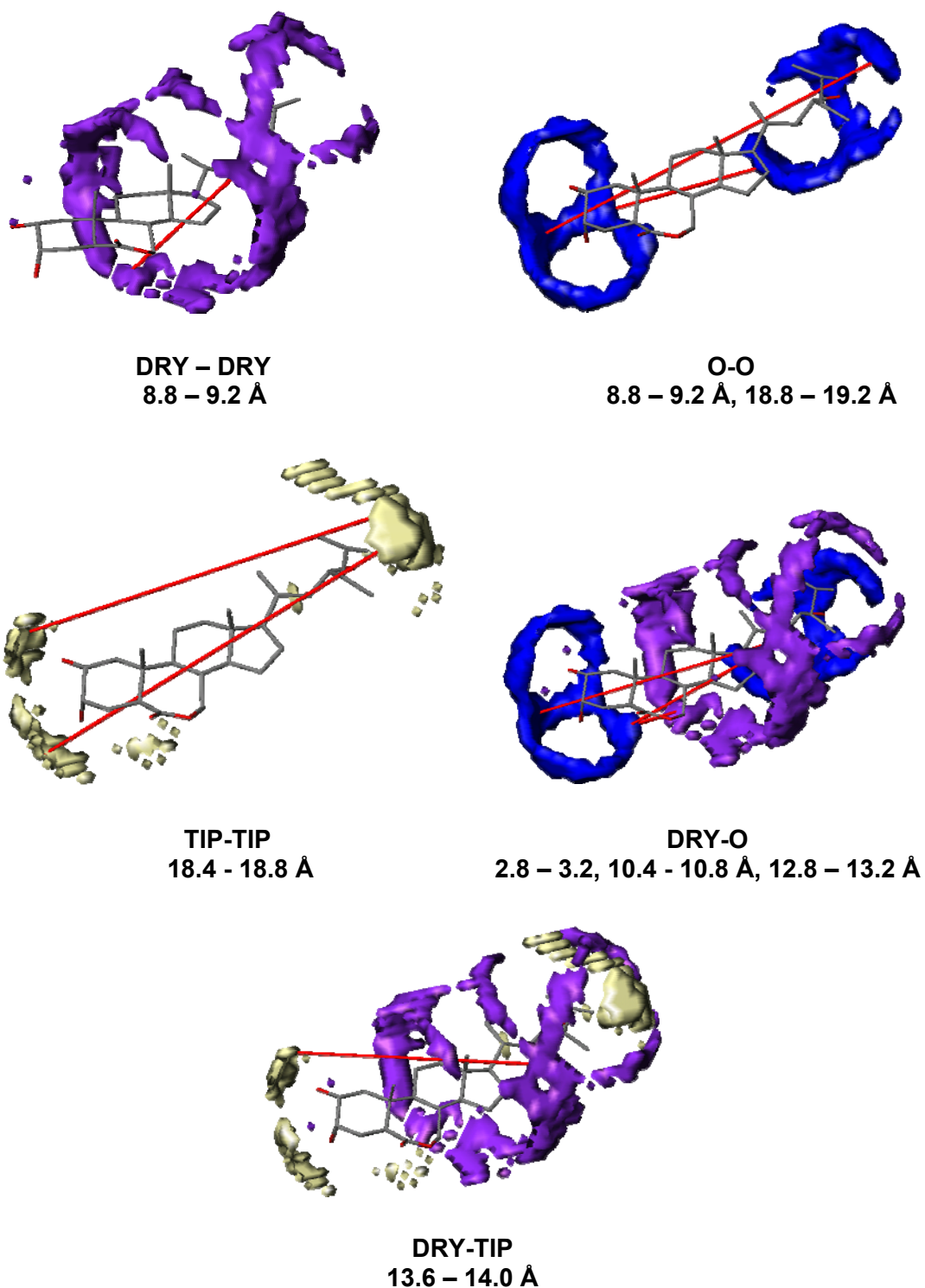


Figure 26. Distances corresponding to the coefficients with highest weight on the model. The distance range that they represent is shown.

The distances corresponding to highest coefficients highlight some structural requirements that had been described as important for activity in previous works in our group. The distances between the diol groups shown by distances between O probes define the presence of these groups as important, as had been stated for studies using GRID descriptors. Moreover, GRID descriptors add some information related with the geometry of the central hydrophobic part, as its optimum width, the distance it should have respect to the diols and the distance between the most convex extremes of the molecule. In addition, the TIP-TIP distances add information about the shape that the molecule should have. It must be remarked that the carbonyl and the hydrophobic extreme of the side chain have not possibly been considered in the highest weight coefficient because these functionalities are present in both active and inactive compounds and thus the model has not found these groups as discriminant for activity. To sum up, GRIND descriptors have reinforced and quantified the information described with previous studies and has added additional information.

2.2.4. Virtual Screening

The three steps described in figure 27 will be applied to perform the virtual screening over the molecular screening compound database.

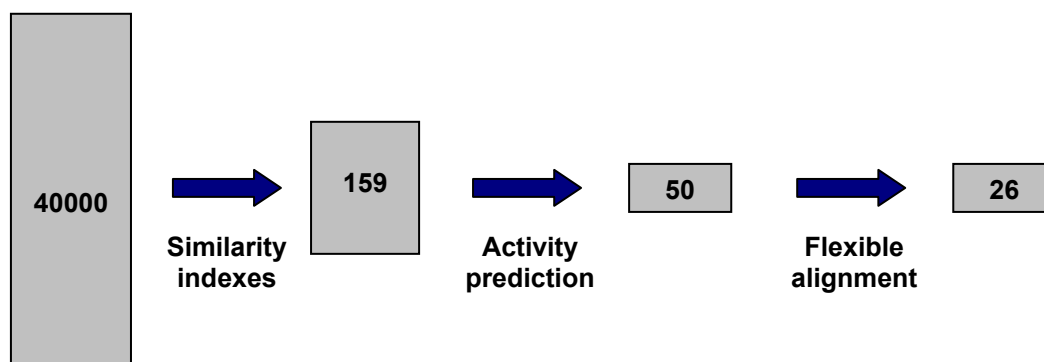


Figure 27. Steps used to perform the virtual screening. The number of candidate compounds present on each steps is shown inside grey squares.

2.2.4.1. Compound database pre-treatment

A virtual screening was performed in a compound database with the obtained models in order to find new hits. The database chosen was SPECS screening collection,¹²³ which consists of 40000 commercially available compounds.

The first step was the generation of the 10 most diverse conformers for each compound in the database with the program XCOMFORT. GRIND descriptors were computed for the list of 400000 conformers. The conditions of the computation were as follow: Probes used were DRY, O, N1 and TIP. 200 points were filtered from the computed MIFs. The weight between distance and energy in the filtration step was set to 50%. The correlogram size was fixed in 100 bins. ALMD directive was active. The rest of options were set as default.

2.2.4.2. First step: similarity index calculation

The next step was the computation of GRIND descriptors with the same configuration for 3 reference compounds. The chosen ones were BL (1), CS (2) and HBL (3). The Carbó¹¹⁹ and Tanimoto^{105,124} similarity indexes were calculated for all the conformers of the database respect to the three reference molecules. This provides 6 similarity index

values for each of the 400000 structures and thus 6 lists of ranked molecules. Only the 1000 molecules with the biggest similarity index value for each list were further considered. The sum of the positions of each one of the molecules in these filtered lists rendered a value that was used to elaborate a new list, so that the structure with the least value is the best one. The conformers that didn't appear in all the 6 lists were discarded. This operation rendered 713 conformers, corresponding to 159 compounds (figure 27).

The predictive quality of this methodology based on similarity indexes has to be checked. To do this, the set of the active BRs present in the test set and in the data set of the model will be used to perform an enrichment curve. Similarity indexes will be calculated for this set of compounds and will be included in the ranked files yet calculated. Nearly 400000 structures will be analyzed and ranked. A plot of the % of recuperation of the active BRs respect to their position in the total ranking of predicted activities is done. What we want to see is if this criterion is good enough to positively discriminate the active BRs set. Since 6 similarity index lists are obtained, 6 enrichment curves can be generated. In figure 28 the enrichment curves obtained applying a similarity index criterion using the Carbó and Tanimoto similarity indexes and BL (1), CS (2) and HBL (3) as template are shown. BRs with high activity are coloured in blue, BRs with medium activity in green and the less active in red.

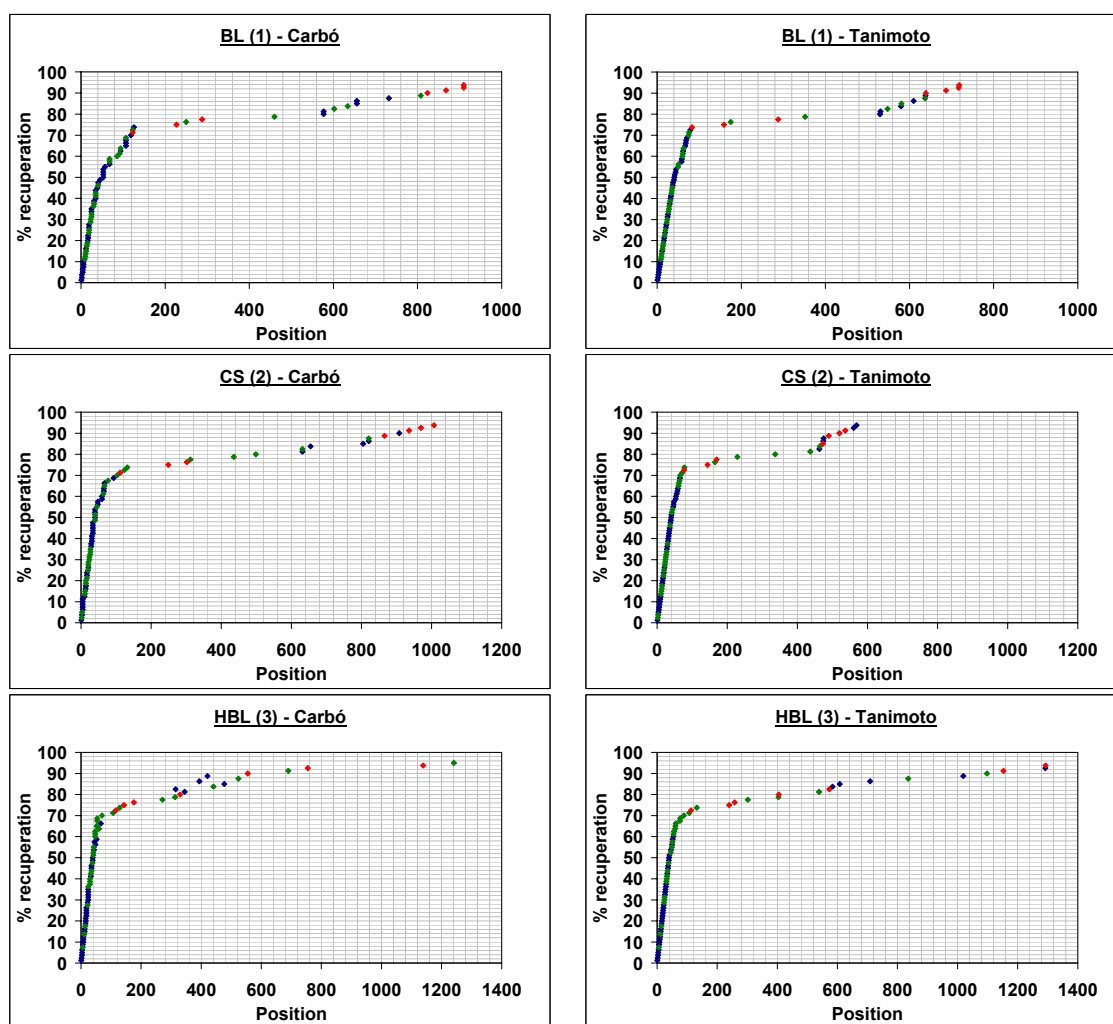


Figure 28. Enrichment curves obtained for active BRs respect to similarity indexes measured respect to BL (1), CS (2) and HBL (3) using both Tanimoto and Carbó similarity indexes.

As seen, the similarity index criterion is good enough to perform the ranking of the compounds according to its BR activity. So, the structures selected in the first step are established as possible candidates to elicit BR activity. However, due to limitations in the measure of the activity with RLIT, no more than 30 compounds can be selected. So, additional filtering steps are necessary to select this reduced number of candidates.

2.2.4.3. Second step: Activity prediction with a QSAR model

In the next step of the virtual screening process the QSAR model already developed using GRIND descriptors will be applied to predict the biological activity of the selected compounds in the last step of the virtual screening process. However, the configuration for the calculation of the descriptors has been different for the QSAR model than for the compounds of the commercial database that are being screened. A validation step is needed. The predicted activity for the 713 structures for both conditions is compared in a plot. The R^2 values for the straight line adjusted to the data of the plot considering a different number of LV are shown in table 5. The plot where the adjustment for the data obtained with the model considering 3 LV can be seen in figure 29.

Number of LV considered	R^2 value obtained
1	0,9861
2	0,9801
3	0,9780
4	0,9649
5	0,9291

Table 5. R^2 values obtained for the comparison of the predicted activities of the 713 candidate compounds with the two described conditions of the QSAR model respect to the number of LVs.

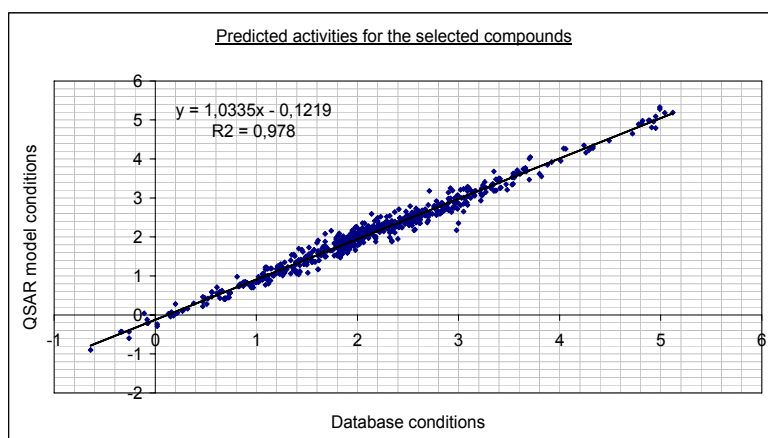


Figure 29. Plot of the predicted activities for the 713 candidate compounds with the two described conditions of the QSAR model using 3 LV.

This result shows that the QSAR model developed shows good predictive ability under the conditions of descriptor calculation for the compounds of the database.

The activity is predicted for the 713 structures using the QSAR model calculated in the first step with the former conditions. This enables to perform a new ranked list of

compounds, now with a different criterion. The relative position of each structure in both lists (similarity index and activity prediction) is summed, given a definitive ranking that considers both the predicted activity and the similarity index given respect to high-activity BRs. If a compound could have more than one conformer, the best ranked conformer was chosen.

2.2.4.4. Third step: Flexible alignment with BL (1)

A flexible alignment of the first 50 compounds was performed with the latest defined active conformation of BL (1), BL-mvp, with the program MOE in a process with 200 iterations. The alignment with a lowest S score value were examined in order to discard those compounds whose alignment with BL (1) was not considered acceptable in terms of overlapping and polar functions. With this last criterion molecules containing a polar moiety in the centre of the molecule, such as a sulphamides, were discarded because this was not compatible with the lipophylic core of the steroid skeleton of BL (1).

Following this procedure, 26 compounds were selected to evaluate its activity with the RLIT. As expected, their structures are very different from that of BRs. The structures and its alignment with the AC of BL (1) called BL-mvp are shown in figure 30.

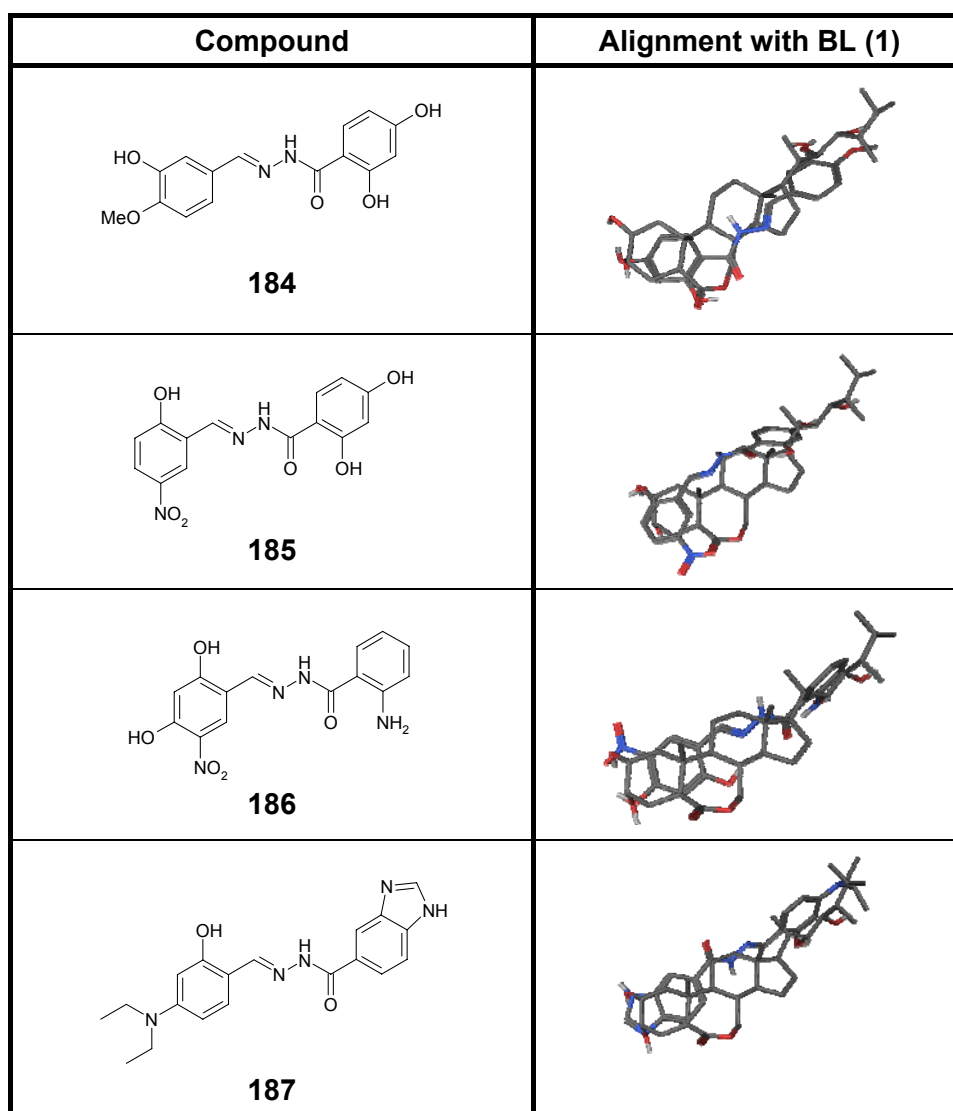


Figure 30. 26 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

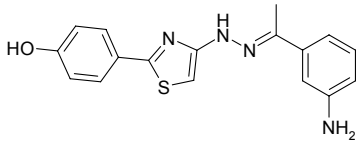
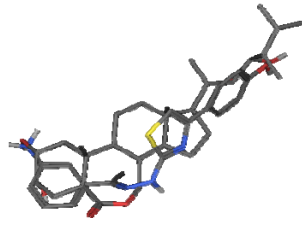
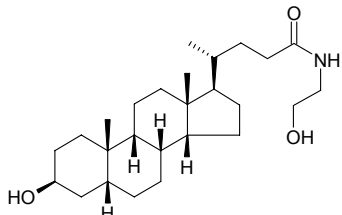
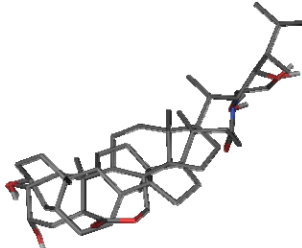
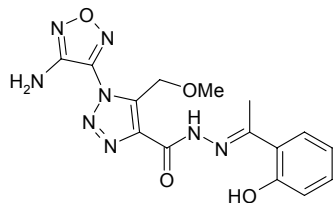
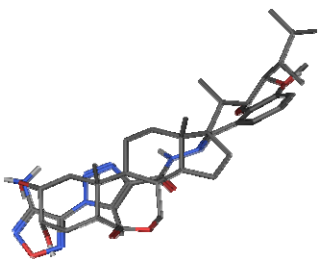
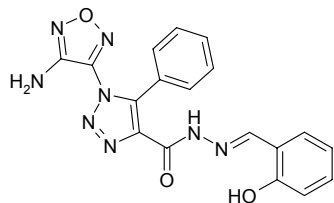
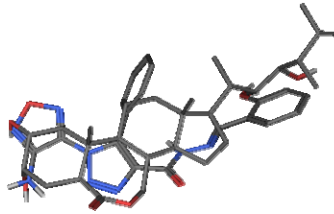
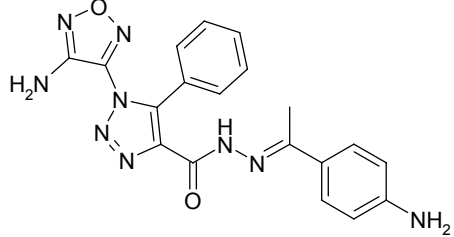
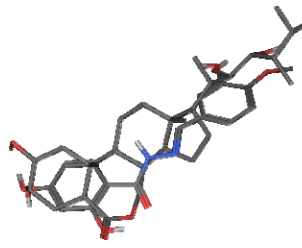
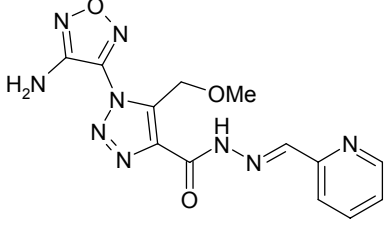
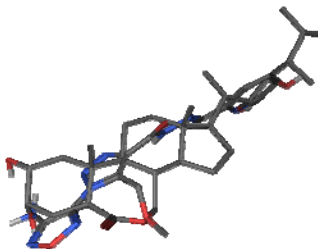
Compound	Alignment with BL (1)
 <p>188</p>	
 <p>189</p>	
 <p>190</p>	
 <p>191</p>	
 <p>192</p>	
 <p>193</p>	

Figure 30. 26 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

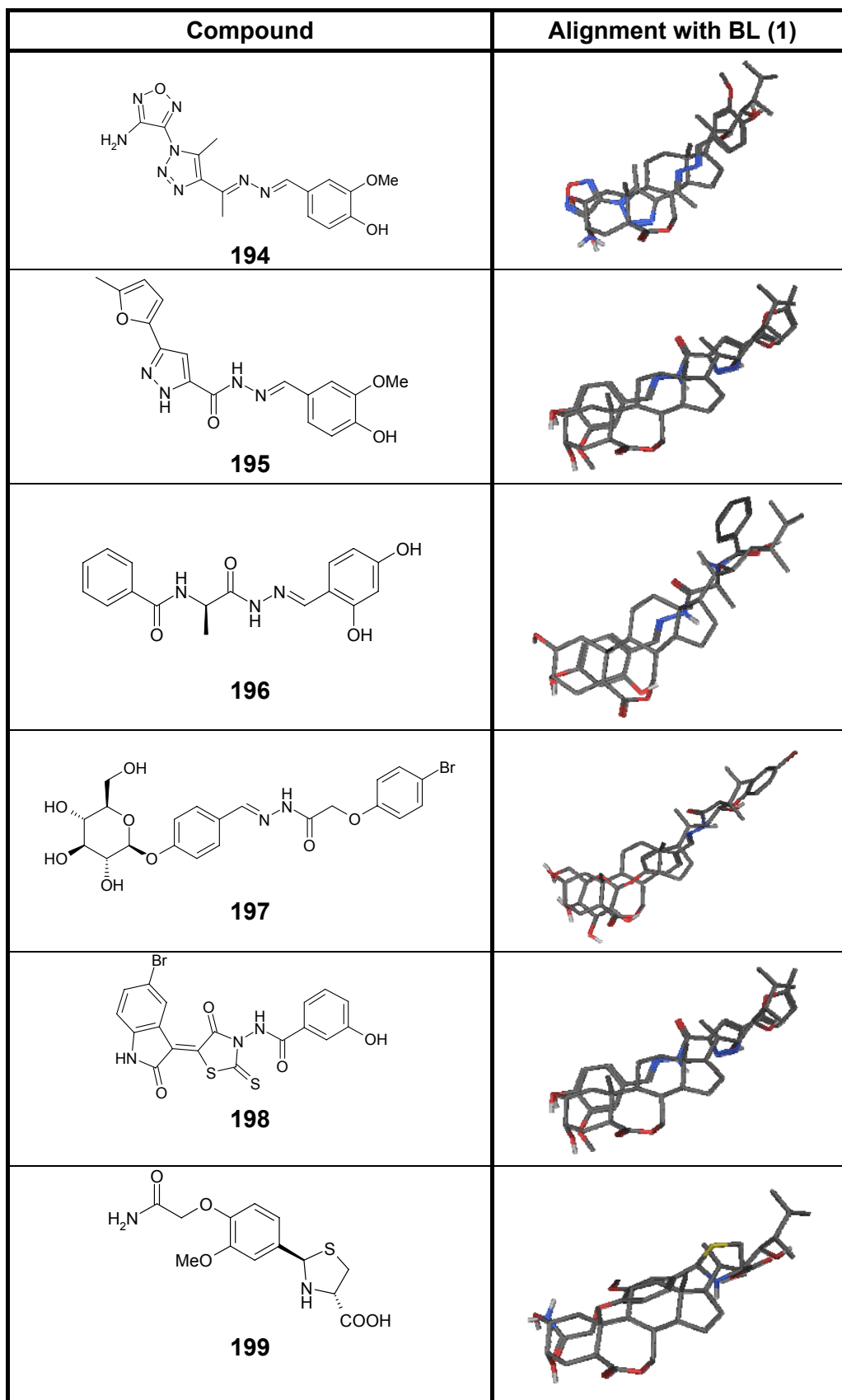


Figure 30. 26 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

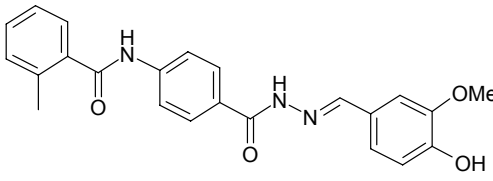
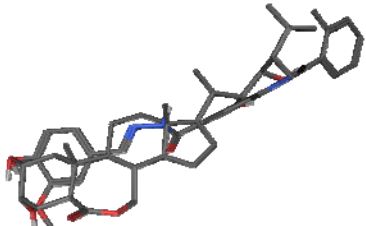
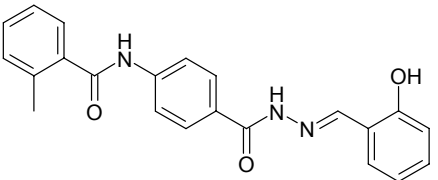
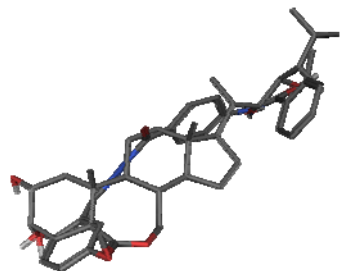
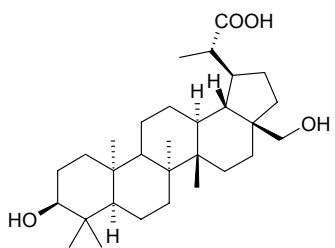
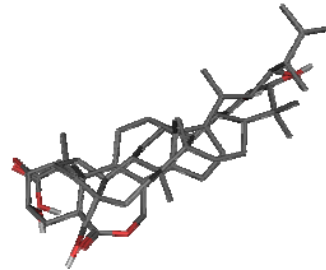
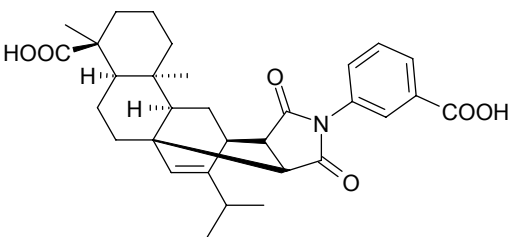
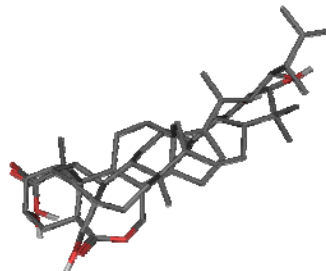
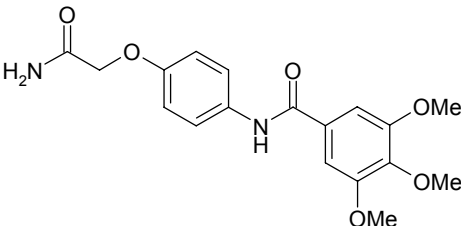
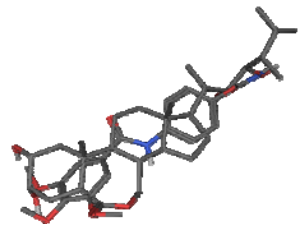
Compound	Alignment with BL (1)
 <p>200</p>	
 <p>201</p>	
 <p>202</p>	
 <p>203</p>	
 <p>204</p>	

Figure 30. 26 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

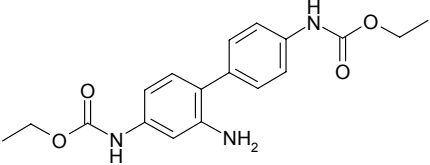
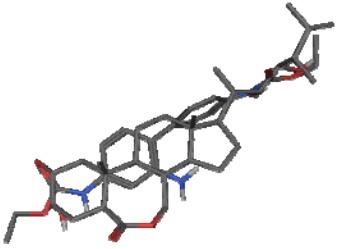
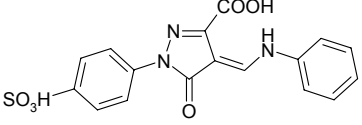
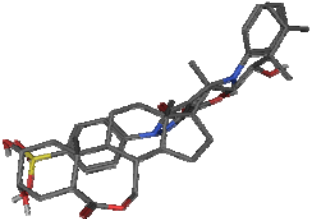
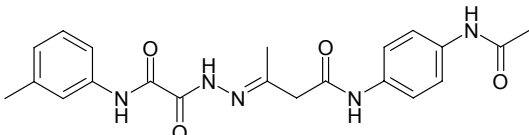
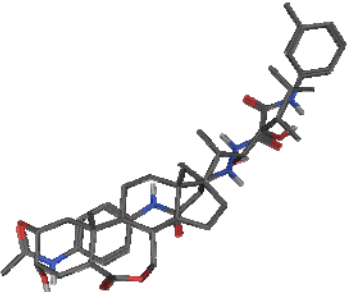
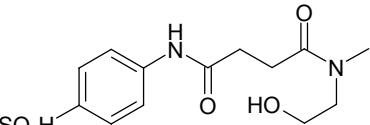
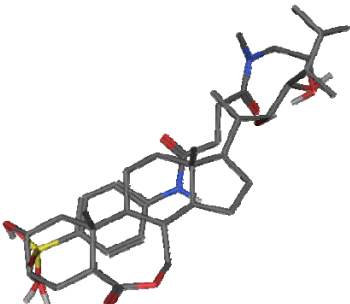
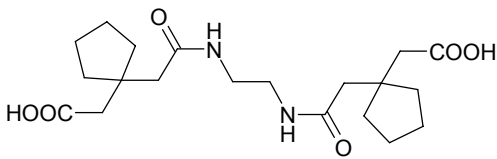
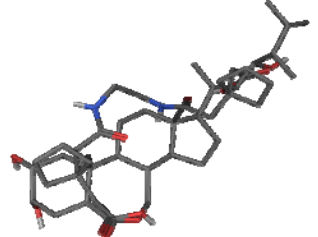
Compound	Alignment with BL (1)
 <p style="text-align: center;">205</p>	
 <p style="text-align: center;">206</p>	
 <p style="text-align: center;">207</p>	
 <p style="text-align: center;">208</p>	
 <p style="text-align: center;">209</p>	

Figure 30. 26 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

2.2.4.5. Activity evaluation

The biological activity as vegetal growth promoters of the 26 candidates was measured with the Rice Lamina Inclination Test (RLIT) (see Annexe part). In this bioassay, a solution of the compound is applied to rice plants. The activity of a compound is proportional to the bending angle shown by the rice lamina to the stem. To obtain preliminary data, each compound was applied to a dose of 1 $\mu\text{g}/\text{plant}$. Active BRs typically show an inclination angle higher than 70°. In table 6 the bending angle obtained for the 26 candidates at a dose of 1 $\mu\text{g}/\text{plant}$ is shown.

Compound	Solvent	Bending angle at a dose of 1 $\mu\text{g}/\text{plant}$
184	EtOH	0° \pm 2°
185	EtOH	19° \pm 2°
186	THF	17° \pm 3°
187	EtOH	10° \pm 3°
188	EtOH	4° \pm 2°
189	THF	4° \pm 3°
190	EtOH	-3° \pm 2°
191	DMSO*	-17° \pm 3°
192	EtOH	0° \pm 3°
193	EtOH	-2° \pm 3°
194	DMSO*	-39° \pm 2°
195	DMSO*	5° \pm 3°
196	EtOH	-3° \pm 1°
197	DMSO*	0° \pm 9°
198	EtOH	-4° \pm 1°
199	THF	0° \pm 7°
200	THF	3° \pm 4°
201	THF	-1 \pm 1°
202	DMSO*	-38° \pm 2°
203	EtOH	-5° \pm 0°
204	THF	1° \pm 3°
205	EtOH	6° \pm 6°
206	EtOH	1° \pm 2°
207	DMSO*	36° \pm 11°
208	EtOH	0° \pm 4°
209	DMSO*	42° \pm 10°

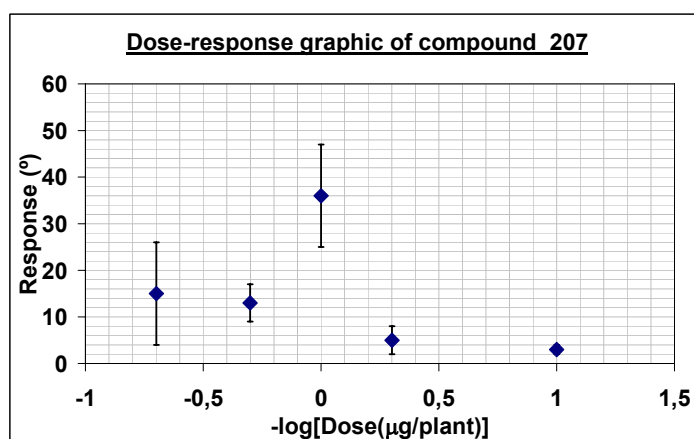
*See pag. 185

Table 6. Bending angle at a dose of 1 $\mu\text{g}/\text{plant}$ for the 26 candidates of the virtual screening made with the QSAR model obtained with GRIND descriptors.

As seen, any compound is not showing a bending angle like that of active BRs. Nevertheless, two compounds, **207** and **209**, have shown a bending angle, of 36° and 42° , respectively, higher than the others. Thought these angles are minor than the ones expected for active BRs, it is noteworthy that the rice plant has not remained unaffected and has shown a certain level of response. It is important to realize that the structures of compounds **207** and **209** are completely different to that of a steroid. In both cases, more response measures at different doses have been performed to evaluate the activity profile of these compounds.

The response obtained for compounds **207** and **209** at the new doses is shown in figure 31.

Compound 207 (DMSO)	
Dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Response
5	$15^\circ \pm 11^\circ$
2	$13^\circ \pm 4^\circ$
1	$36^\circ \pm 11^\circ$
0.5	$5^\circ \pm 2^\circ$
0.1	$3^\circ \pm 1^\circ$



Compound 209 (DMSO)	
Dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Response
5	$33^\circ \pm 11^\circ$
2	$22^\circ \pm 6^\circ$
1	$42^\circ \pm 10^\circ$
0.5	$14^\circ \pm 16^\circ$
0.1	$2^\circ \pm 1^\circ$

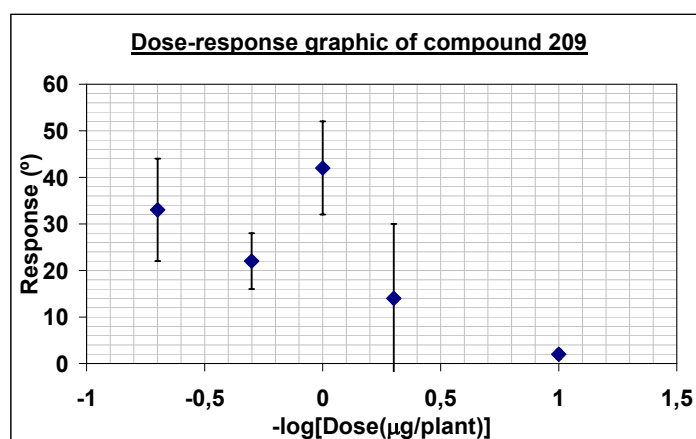


Figure 31. Responses of compounds **207** and **209** at the new doses evaluated.

At lower doses, of 0.5 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{plant}$, the behaviour of both compounds is slightly different. While compound **207** is inactive at both doses, compound **209** still keeps some activity at 0.5 $\mu\text{g}/\text{plant}$, and thus is more potent than **207**.

At higher doses, of 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{plant}$, both compounds show a lower response than the one shown at 1 $\mu\text{g}/\text{plant}$, being again the response of compound **209** higher than the one of compound **207**. This descent in activity can be explained by the incapability of the rice plant to effectively absorb doses higher than 1 $\mu\text{g}/\text{plant}$.³⁸ In these cases there is the possibility that the compounds become toxic to the plant. Indeed, a dark spot is observed in the rice stem after the injection. Anyway, at these doses both compounds still exhibit some activity, highlighting their non-inactive behaviour.

Moreover, as shown in the annexe part (for example pag. 210), some individual responses of rice plant have achieved bending angles higher than 70° , and so are equivalent to those of active BRs. This result, reinforced with the level of activity shown at doses of 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{plant}$, strongly suggests that compounds **207** and **209** should be considered as weak-active candidates useful to the future design of non-steroidal analogues of BRs. Moreover, compounds **207** and **209** elicit BR activity on their own, without needing any co-applied plant growth regulator, as happened in some cases reported before.⁵⁴ So, these compounds, although weakly active, can be considered new hits. Therefore one of the main objectives of this project has been achieved: to obtain new compounds eliciting BR activity with a structure totally different to that of active BRs. Further research must be done in order to obtain analogues related with their structure to improve their response profile.

2.3. Use of FLAP methodology to find new BR analogues

As described before, FLAP methodology was used to perform a virtual screening over a database of commercial compounds to find candidates to elicit BR activity.

The FLAP procedure (Fingerprints for Ligands And Proteins) describes the pharmacophoric properties of ligands in terms of tetrahedrons defined either between atoms of the structure or between selected points of Molecular Interaction Fields calculated with the program GRID around the molecule with fixed probes.^{47,48}

The application of this lattice-independent methodology in the ligand-based virtual screening has required four steps (figure 32).

1) The atoms of the template that will take part in the generation of the tetrahedrons are selected and characterized. Two atomic characterizations are possible: the generic one defines the atoms according to its hydrophobic, hydrogen bond donor and hydrogen bond acceptor behaviour; the specific one relates each atom with the most similar atom type from the GRID force field. Moreover, some regions of interest have been defined to aid the further calculations.

2) The configuration of the calculation of the virtual screening is established for both criteria through enrichment curves using a set of molecules whose biological activity is known. As mentioned before, the number of tetrahedron coincidences between a template and the different compounds of a database is used to establish the ranking of candidates used in both this step and the next one as well.

3) The virtual screening is performed for both conditions over a commercial screening compounds database, using the calculation configuration found in previous step. Two list of candidates are obtained and combined.

4) A refining of the candidates obtained in the previous step is performed through molecular alignments with the template using a more advanced version of FLAP (figure 32).

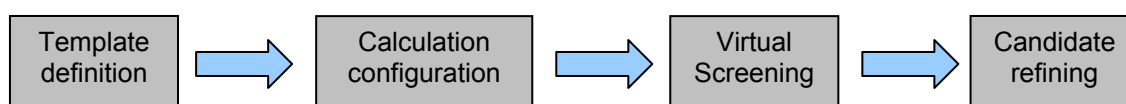


Figure 32. Application of the FLAP methodology applied in this work

2.3.1. Definition of the template BL (1)

The template used to perform the virtual screening was BL (1), on its active conformation (BL_mvp).

The atoms that form the tetrahedrons are defined with two criteria, the so-called generic and specific.

In the generic criterion, atoms are classified into hydrogen bond acceptors, hydrogen bond donors and hydrophobics. With the generic criterion the atoms of the template BL (1) are defined as follows: all the C atoms are considered as *DRY*, the 4 hydroxyl

groups are considered as *DONOR* and all the 6 oxygen atoms of the molecule as *ACCEPTOR*.

In the specific criterion, atoms are classified according to GRID force field atom types (DRY, O, O1, OES,...). With this criterion the atoms of the template are defined as follows: all the C atoms are considered as *DRY*, the oxygen atoms of the 4 hydroxyl groups are considered as *O1*, the carbonyl oxygen is considered as *O* and the 6-oxa oxygen as *OES*.

Moreover, some atoms of the template that may provide redundant information can be removed in order to obtain a faster calculation. Keeping this idea in mind, the following C atoms of the template were removed: 6, 9, 10, 13, 17, 22 and 25. They are showed in red dots in figure 33.

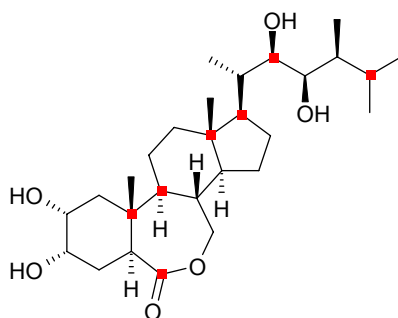


Figure 33. Atoms that have been omitted in the template BL (1)

With FLAP it is possible to encode the knowledge concerning structural features important for the biological activity: four regions generally considered decisive for the biological activity of BL (1) are defined as spheres. These 4 zones, shown in figure 34, are: **1**.the C2-C3 diol ($2\alpha,3\alpha$), **2**.the carbonyl of the B ring (Carb), **3**.the C22-C23 diol ($22R,23R$) and **4**.the lipophylic extreme of the side chain (lipo). For the first and the third zones, the centre of the spheres is set as the middle of the straight line that joins both oxygen atoms on each glycol. The carbonyl oxygen atom is defined as the centre of the sphere of the second region and the middle of the bond between C24 and C25 is defined as the centre of the last defined region. The use of these regions force the method to produce the fingerprint related to the molecular template only with tetrahedrons in which at least one atom lie in each of such spheres. One can simultaneously obtain a more focused molecular description and speed up the calculations.

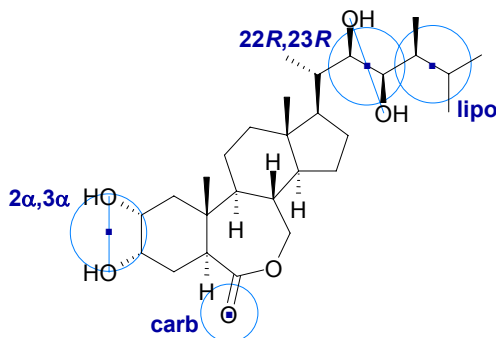


Figure 34. Regions that have been defined in the template BL (1).

2.3.2. Setting of the calculation configuration for the virtual screening

The next step consists on finding the best calculation configuration to perform the virtual screening. This is done with a set of BRs whose biological activity is known. The suitability of a calculation configuration was analyzed through enrichment curves, in which is reported the positions of the 12 most active BRs, respect to the whole 160, in the ranked list obtained at the end of the calculation.

The dataset of molecules that was used consists on 160 structures (figure 14) whose activity in the RLIT (see annexe) has been evaluated in the Steroids Laboratory of IQS, so that 113 are inactive, 35 have an activity minor than 2 and 12 have an activity equal or major than 2. The whole 160 compounds have the minimum energy conformation, given by the Concord methodology.^{64,114} The active conformation (AC) of BL (1), BL-mvp, is included in the last group too.

2.3.2.1. Generic criterion calculation

The calculations performed using the generic criterion to characterize the atoms are summarized in table 7. The different configuration parameters have been described in part 1.3.4. No automatic method was used to optimize the search conditions. The calculation was started from a default configuration which was changed according to the results that were being obtained in the enrichment curves. This procedure is useful to obtain good results but does not ensure to obtain the optimal global conditions for the computation.

The results are analyzed considering, for each compound of the database, only the conformer with most coincidences respect to the template BL (1). In figure 35 the enrichment curves obtained for the calculations made under the generic criterion are shown. The red line shows the ideal curve, the green line the curve obtained in the calculation, for the 12 most active BRs, respect to the whole 160, and the blue line a random distribution of the compounds. The configuration of the run number 10 is chosen for further use because has rendered the best enrichment curve. The slope at the beginning of the curve is close to the ideal one and the whole of the active compounds are included in the top 20% of the compounds. It must be remarked that obtaining this good curve for BRs with pharmacophore-based descriptors is noteworthy, since the relative positions of the parts of the molecules does not differ much from active BRs to others, since they are structurally similar.

As may be seen, the default configuration for **b**, **c** and **d** options has been valid. Also, fixing the number of conformers generated for each structure to 100 has rendered a good balance between accuracy and calculation speed. The best result has been obtained fixing the four regions defined in the template and forcing additionally the presence of 2 hydrogen bond donors/acceptors in an sphere of 3 Å around the "22R,23R" region and 1 hydrogen bond acceptor atom in an sphere of 1 Å set around the "carb" region. In addition, fixing the four regions has not only let to a more accurate, but also a much faster calculation.

In the enrichment curves shown, both x and y axes report % of compounds, x for the entire dataset and y for the set of known active compounds, found during the screening process; the ideal and random curves are reported for comparison. A ripid curve means the method is able to enrich the first section of the dataset with active compounds; therefore, picking some among the top-ranked compounds, one should have a higher probability to find new active compounds.

In runs number 11 and 12 the calculation made has not been able to find any coincidences between compounds and the template because the calculation configuration were too strict because the tolerance value was lowered.

Run	b	c	d	m	Reg A	Rad A	Min A	Reg B	Rad B	Min B	p	r	s
1	1	0,2	1	4	2 α ,3 α	2	2				1	7	250
2	1	0,2	1	4	2 α ,3 α	2	2				1	7	100
3	1	0,2	1	3	2 α ,3 α	2	1				1	7	100
4	1	0,2	1	4	2 α ,3 α	2	1				1	7	100
5	1	0,2	1	4	carb	2	1				1	7	100
6	1	0,2	1	4	2 α ,3 α	2	1	carb	2	1	1	7	100
7	1	0,2	1	4	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	2	1	carb	2	1	1	7	100
8	1	0,2	1	4	lipo	2	1	carb	2	1	1	7	100
9	1	0,2	1		22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	3	2	carb	1	1	1	7	20
10	1	0,2	1	4	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	3	2	carb	1	1	1	7	100
11	0,5	0,1	1	4	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	3	2	carb	1	1	1	7	100
12	0,5	0,2	1	4	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	3	2	carb	1	1	1	7	100
13	1	0,1	1	4	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	3	2	carb	1	1	1	7	100
14	1	0,1	1	4	22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>	3	2	carb	2	1	1	7	100

Table 7. Configuration of the calculations performed using the generic criterion where **b**=distance tolerance, **c**=unselectivity level, **d**=cavity expansion, **Reg i**=Spherical region of radius **Rad i**, where **min i** atoms must be present, **p**=atom properties association, **r**=number of rotatable bonds and **s**=maximum number of conformers.

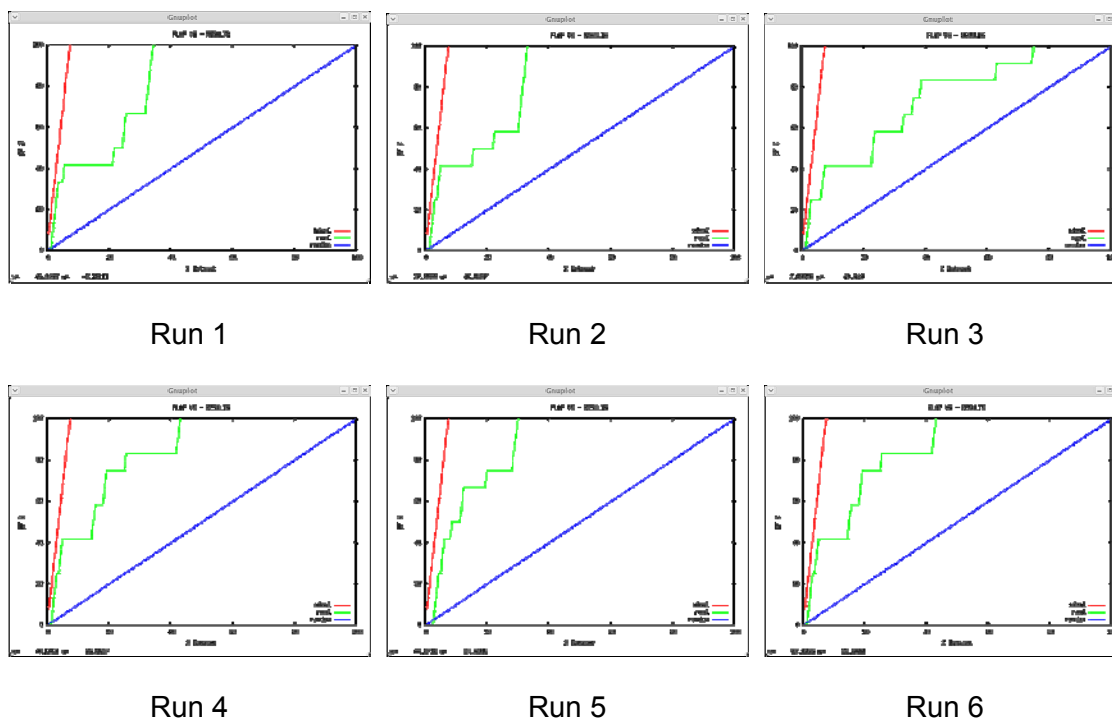


Figure 35. Enrichment curves obtained for the generic criterion calculations.

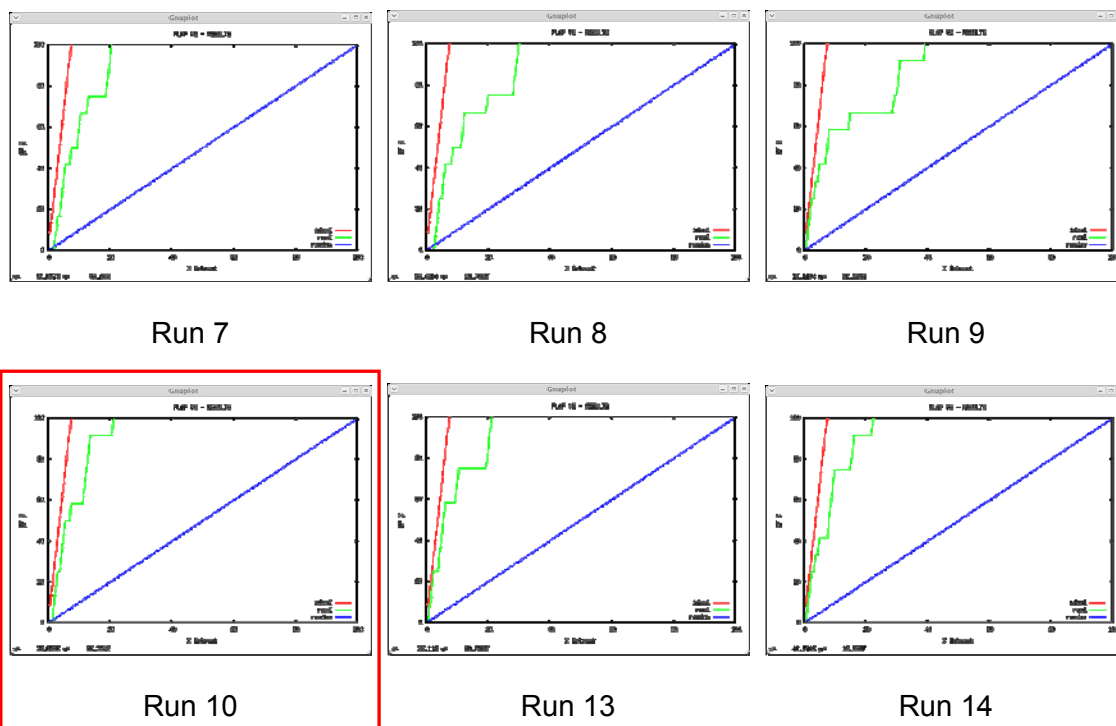


Figure 35. Enrichment curves obtained for the generic criterion calculations.

2.3.2.2. Specific criterion calculation

The calculations performed using the specific criteria to characterize the atoms are summarized in table 8. As done before in the generic criterion calculations, the calculation was started from a default configuration which was changed according to the results that were being obtained in the enrichment curve.

Similar to the generic criteria calculations, only the conformer with best results for each compound is considered. In figure 36 the enrichment curves obtained for the calculations made under the generic criterion are shown. The red line shows the ideal curve, the green line the curve obtained in the calculation and the blue line a random distribution of the compounds. The conditions of the run number 22 are chosen for further use due to its enrichment curve. The slope at the beginning of the curve is close to the ideal one and the whole of the active compounds are included in the top 20% of the compounds.

As may be seen, the default configuration for **b**, **c** and **d** options has been valid. In addition, like in the former case, fixing the number of conformers generated for each structure to 100 has rendered a good balance between accuracy and calculation speed. The best result, run number 22, has been obtained fixing the four regions defined in the template and forcing additionally the presence of 1 atom associated to O1 probe in one of them and 1 hydrogen bond donors in a sphere of 2 Å around the “22R,23R” region. A great improvement in both speed calculation and calculation accuracy has also been observed by fixing four regions.

Run	b	c	d	g1	g2	g3	m	Reg A	Rad A	Min A	p	r	s
15	1	0,2	1				4				def	7	250
16	1	0,2	1				4				F	7	100
17	1	0,2	1	DRY			4				F	7	100
18	1	0,2	1	O1			4				F	7	100
19	1	0,2	1	O			4				F	7	100
20	1	0,2	1	O::			4				F	7	100
21	1	0,2	1	DRY	O1		4				F	7	100
22	1	0,2	1	O1			4	22R,23R	2	1	F	7	100
23	1	0,2	1	O1			4	lipo	2	1	F	7	20
24	1	0,2	1	DRY			4	carb	2	1	F	7	100
25	1	0,2	1	DRY	O1		4	carb	2	1	F	7	100
26	1	0,2	1	O1	O1		4	carb	2	1	F		
27	1	0,2	1	DRY			4	22R,23R	2	1	F		
28	1	0,2	1	O1	O1		4	22R,23R	2	1	F		
29	1	0,2	1	O1	O		4				F		
30	1	0,2	1	O1	O		4	22R,23R	2	1	F	7	100
31	1	0,2	1	O1	O1	O	4				F	7	100
32	1	0,1	1	O1			4	22R,23R	2	1	F	7	100

Table 8. Configuration of the calculations performed under the specific criterion, where **b**=distance tolerance, **c**=unselectivity level, **d**=cavity expansion, **gi**=GRID fixation probes, **m**=minimum number of atoms on different regions, **Reg A**=Spherical region of radius **Rad A**, where **min A** atoms must be present, **p**=atom properties association, **r**=number of rotatable bonds and **s**=maximum number of conformers.

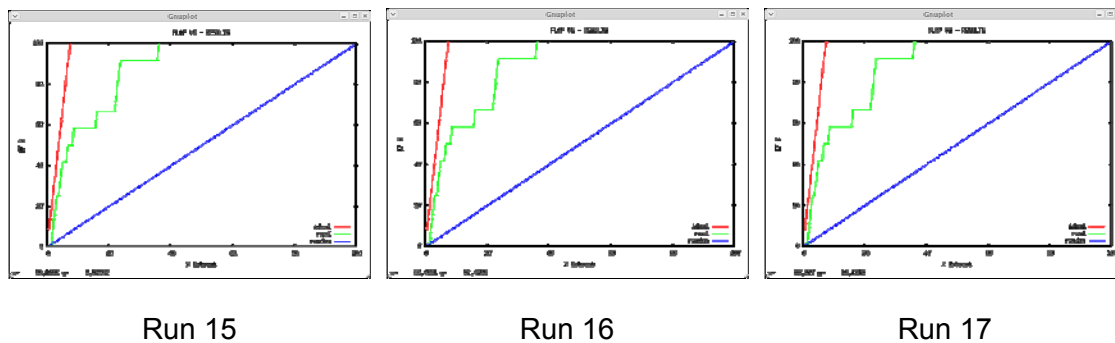


Figure 36. Enrichment curves obtained for the specific criterion calculations

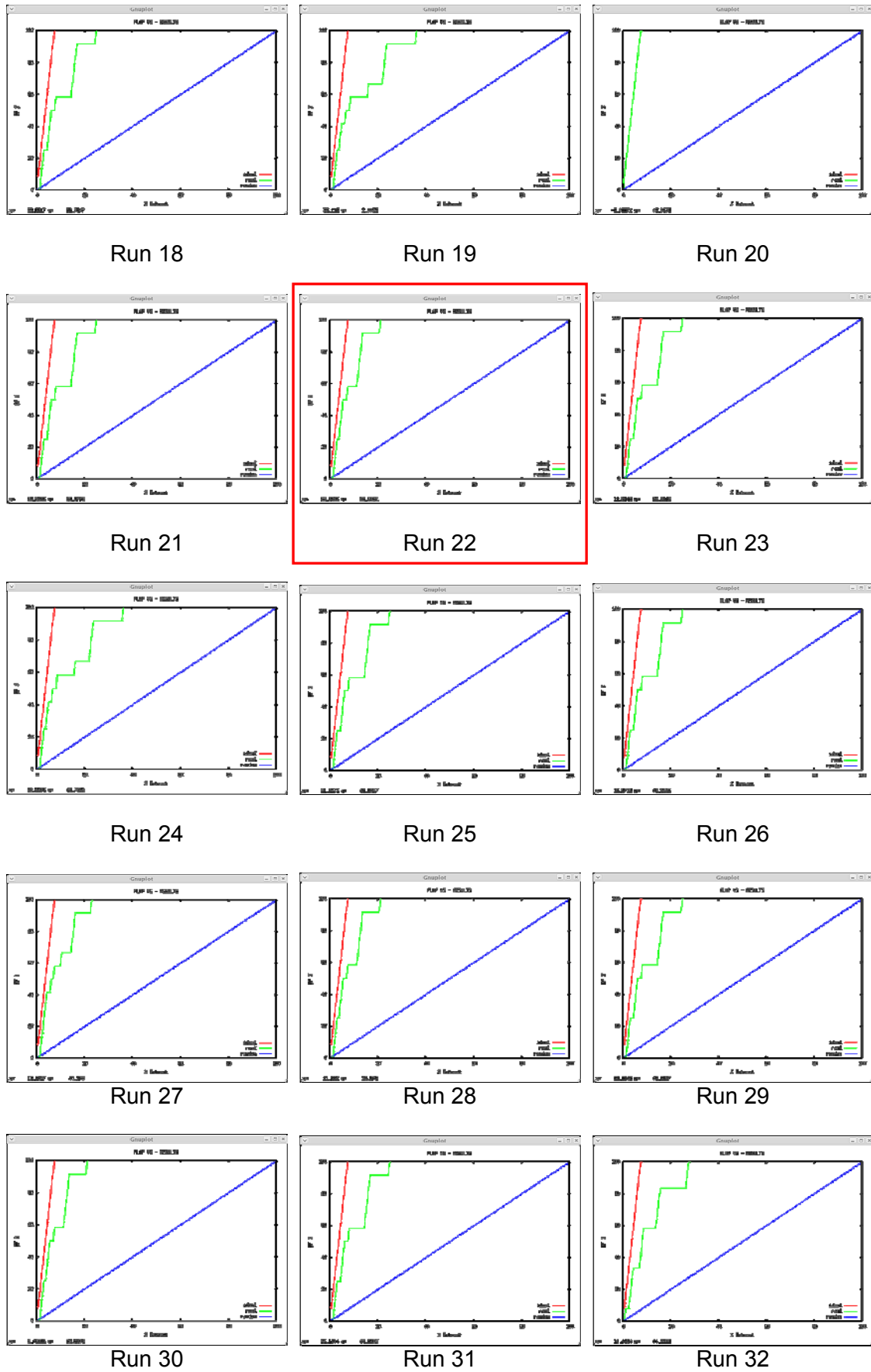


Figure 36. Enrichment curves obtained for the specific criterion calculations

2.3.3. Comparison of the two methods

Next, the number of tetrahedron coincidences for the database compounds for both conditions, generic and specific. In order to discriminate between active and inactive compounds, we compared the number of tetrahedron coincidences obtained with the two runs. Figure 37 shows this comparison.

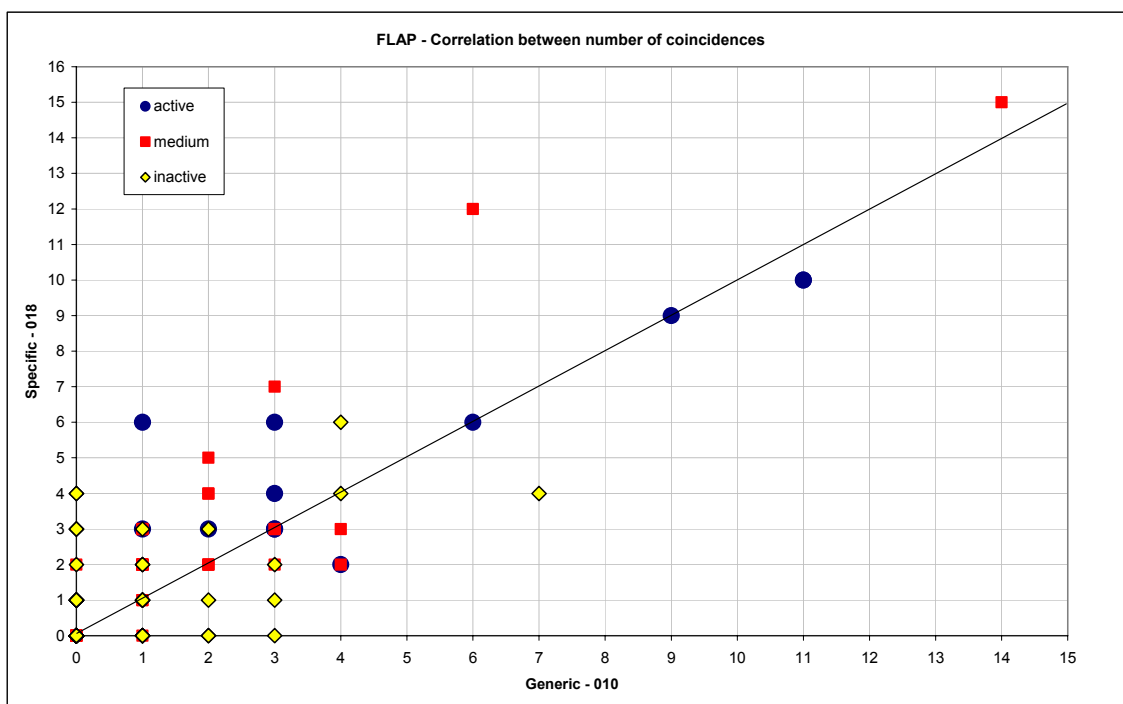


Figure 37. Comparison of the number of coincidences obtained for the compounds of the BRs database for the specific and the generic criterion.

As it may be seen, for both criteria there is not a number of coincidences than cleanly separates active than inactive compounds. Anyway, it can be seen how the whole active compounds, for both the generic and the specific criteria, have shown at least one tetrahedron coincidence with the template. This result suggests that discarding those compounds with no coincidence in the virtual screening would be an effective filter to exclude most of the inactive compounds from the database.

2.3.4. Ligand-based virtual screening using 1st generation FLAP

Once the configuration of the calculation with the generic and the specific criteria have been selected, a ligand-based virtual screening procedure is performed over the SPECS compounds of ZINC database (about 400000 compounds) with the previously chosen AC of BL (**1**), BL-mvp, taken as a template. Two calculations are made, one with the run 10 calculation configuration for the generic criterion, and other with the calculation configuration of run 22, for the specific one. ZINC database consists on a compendium of commercial database compounds taken in their whole possible different ionization states and, if undefined, enantiomers or diastereoisomers.¹²⁵

When the calculation is complete, two lists are generated, one for the generic criterion and other for the specific one. From each list only those compounds for which at least one coincidence with the template BL (**1**) has been found are selected. So, for the

generic criterion, 234 compounds have been selected and 167 for the specific one. Overall, 385 different structures are included, 16 compounds found in both lists.

These 385 structures can be ranked according to the number of coincidences in both lists. This criterion could be good enough to select the best candidates and test their biological activity in the RLIT. Anyway, it is possible to make alignments between these candidates and the template, BL (1), with the new version of FLAP described in part 1.3.4. This was used to refine the candidate compounds obtained.

2.3.5. Refining of the candidates using a more recent FLAP procedure

As described in point 1.3.4 two criteria can be used to align the compounds: the atomic positions that define the quadruplets or the MIF points calculated around the molecule. Both conditions are used with a database that includes the 385 structures selected in the previous step and the 160 BRs yet used. The active conformation of BL (1) (bl_mvp) is used as the template. The calculation of scores is performed to rank the compounds. The comparison of the scores of the compounds obtained with the two conditions, the atom-based and the MIF-based, can be seen in figure 37.

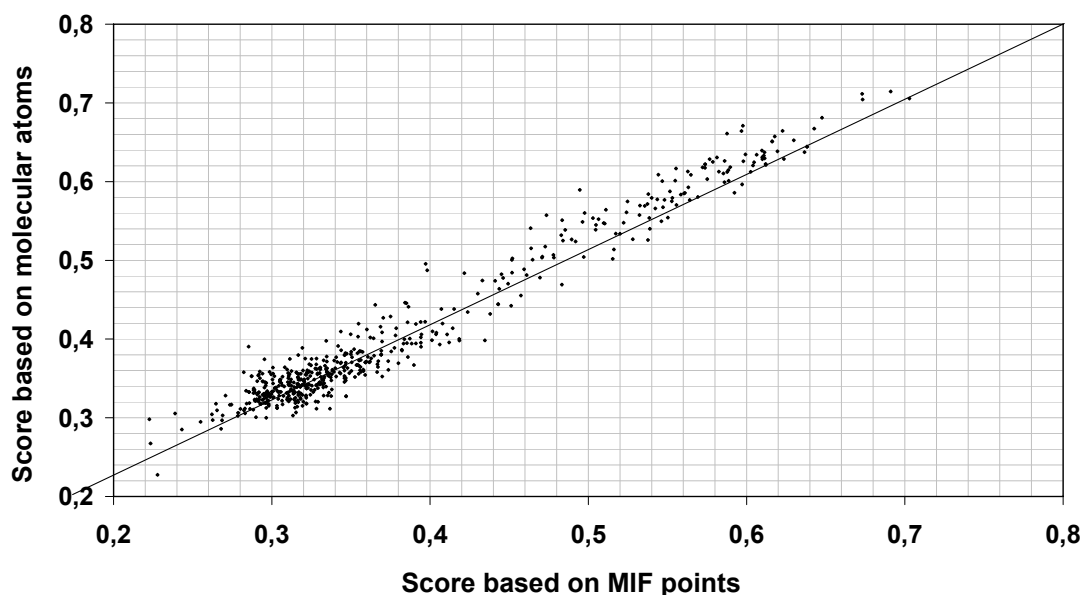


Figure 37. Influence of taking MIF points or molecular atoms as a reference to generate the pharmacophore of the compounds

The scores obtained for the two calculation can be considered almost equivalent for compounds with scores lower than 0.4, whereas for compounds more similar to the reference (score >0.4) the values obtained combining molecular atoms are higher than the corresponding scores obtained with MIF points.

So, the conditions chosen to perform the virtual screening will be using the score based on molecular atoms. The calculation was performed again but the best overlapping for each structure was saved to allow a visual inspection of the result. The molecules which have given the best alignments with BL-mvp are chosen. 23 candidates, shown in figure 38 together with their overlapping, are selected to evaluate their biological activity with the RLIT (see annexe).

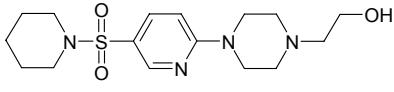
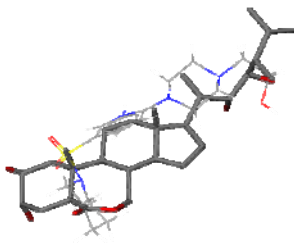
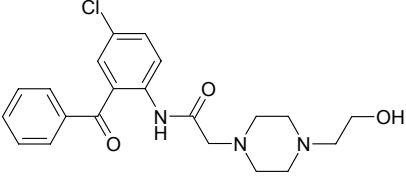
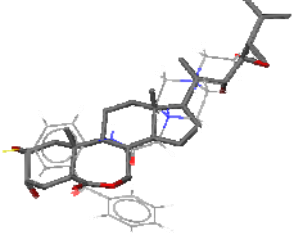
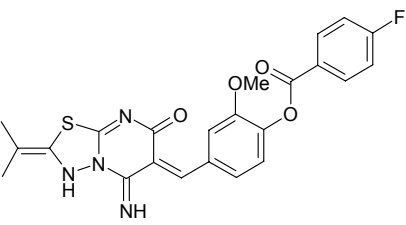
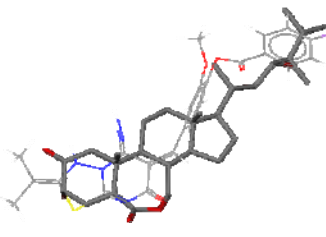
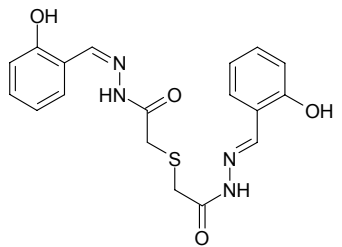
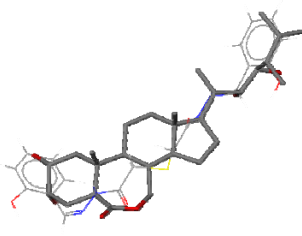
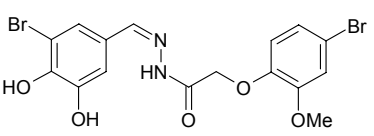
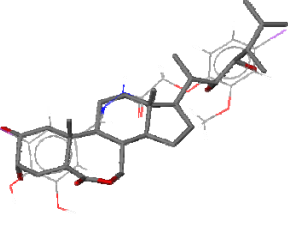
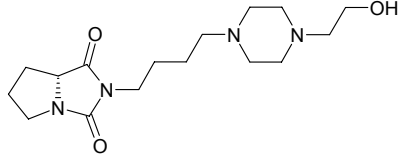
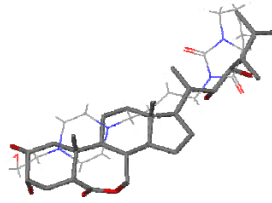
Compound	Alignment with BL (1)
 <p style="text-align: center;">210</p>	
 <p style="text-align: center;">211</p>	
 <p style="text-align: center;">212</p>	
 <p style="text-align: center;">213</p>	
 <p style="text-align: center;">214</p>	
 <p style="text-align: center;">215</p>	

Figure 38. 23 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

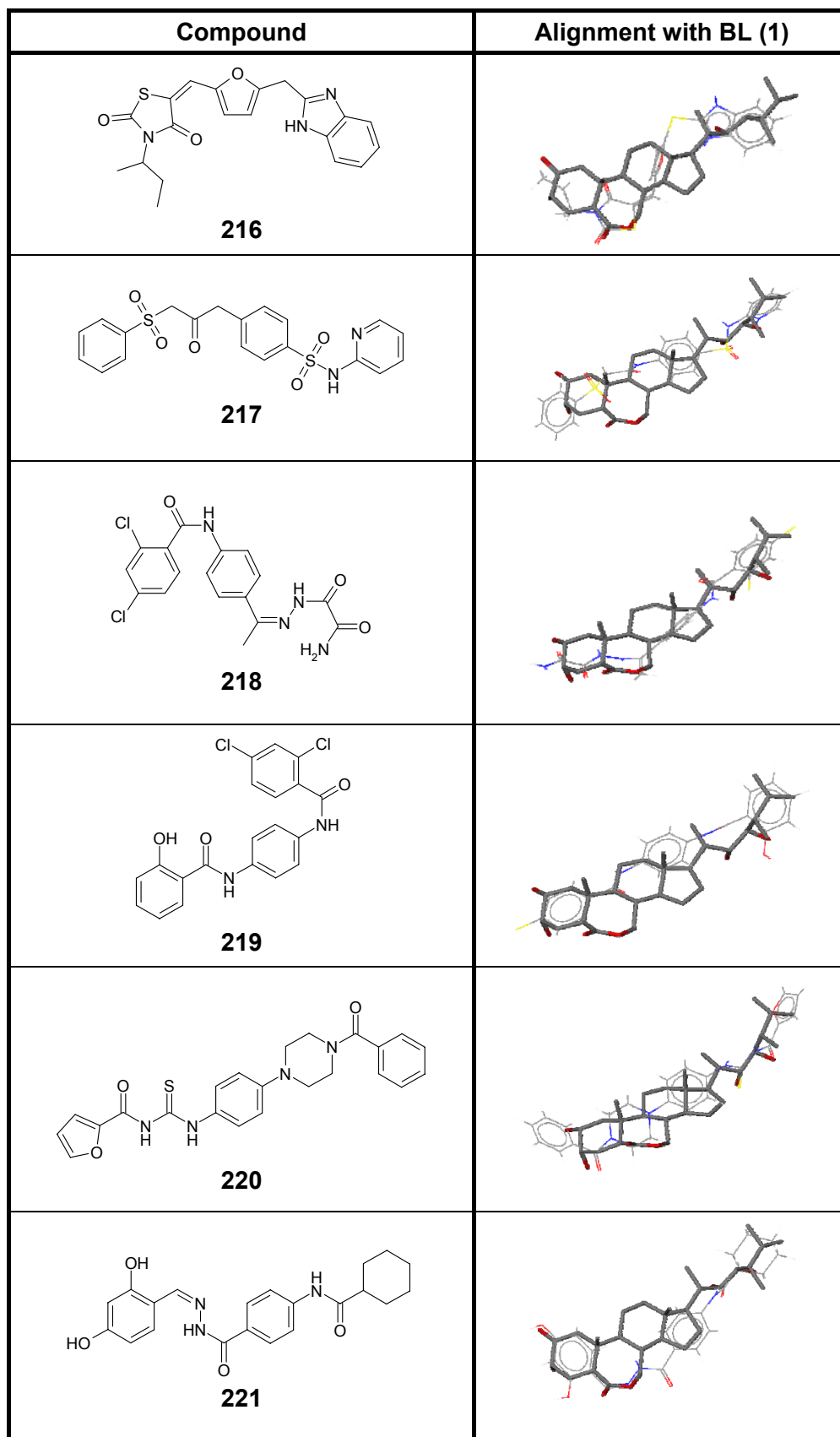


Figure 38. 23 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

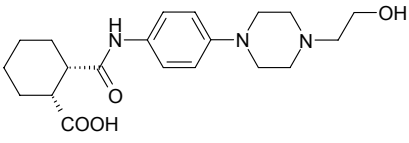
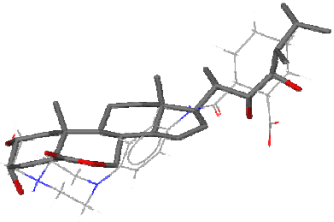
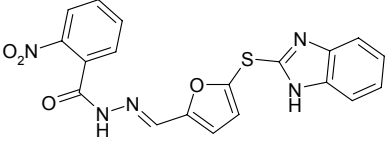
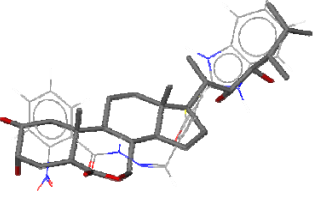
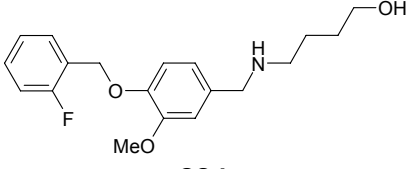
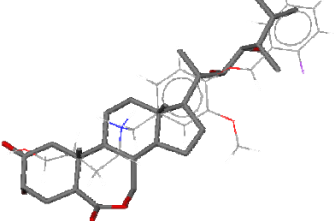
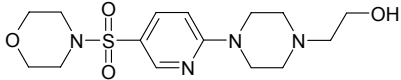
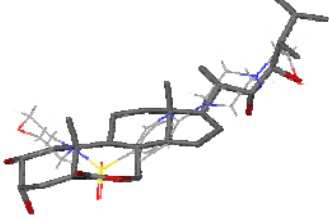
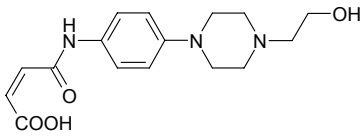
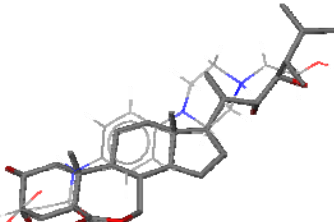
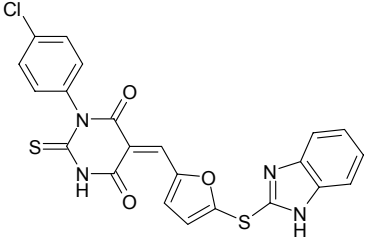
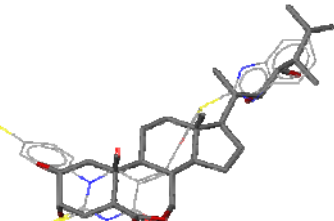
Compound	Alignment with BL (1)
 <p style="text-align: center;">222</p>	
 <p style="text-align: center;">223</p>	
 <p style="text-align: center;">224</p>	
 <p style="text-align: center;">225</p>	
 <p style="text-align: center;">226</p>	
 <p style="text-align: center;">227</p>	

Figure 38. 23 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

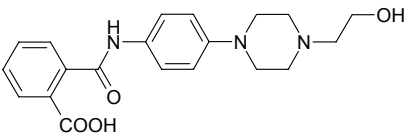
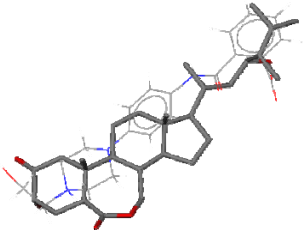
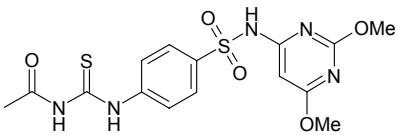
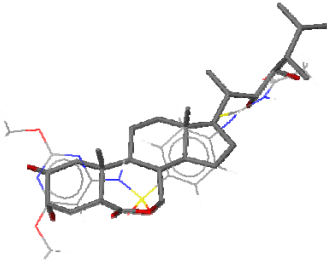
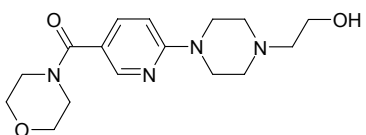
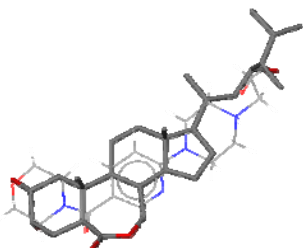
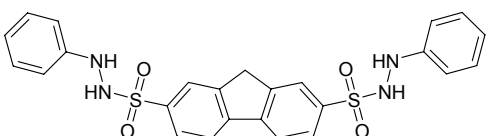
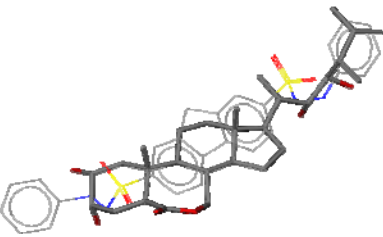
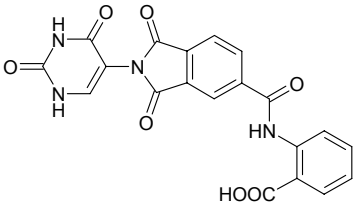
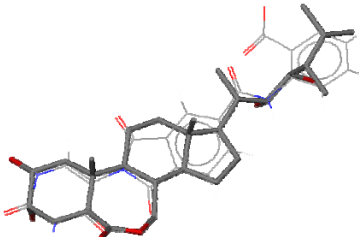
Compound	Alignment with BL (1)
 <p style="text-align: center;">228</p>	
 <p style="text-align: center;">229</p>	
 <p style="text-align: center;">230</p>	
 <p style="text-align: center;">231</p>	
 <p style="text-align: center;">232</p>	

Figure 38. 23 candidates and their alignment with the AC BL-mvp.

2.3.6. Activity evaluation with the Rice Lamina Inclination Test (RLIT)

The biological activity of the 23 candidates as plant growth promoters is measured with the Rice Lamina Inclination Test (RLIT). In this bioassay, the activity of a compound is proportional to the bending angle shown by the rice lamina to the stem, so that active BRs typically show an inclination angle higher than 70° at a dose of 1 µg/plant. To obtain preliminary data, each compound has been applied to this dose. In table 9 the bending angle obtained for the 23 candidates at a dose of 1 µg/plant is shown.

Compound	Solvent	Bending angle at a dose of 1 µg/pl
210	EtOH	47° ± 7°
211	EtOH	43° ± 13°
212	EtOH	14° ± 3°
213	THF	10° ± 3°
214	EtOH	8° ± 2°
215	EtOH	41° ± 16°
216	EtOH	16° ± 4°
217	THF	11° ± 4°
218	THF	4° ± 2°
219	THF	4° ± 1°
220	THF	8° ± 2°
221	EtOH	8° ± 1°
222	DMSO*	3° ± 2°
223	THF	3° ± 1°
224	EtOH	30° ± 2°
225	EtOH	14° ± 13°
226	THF	7° ± 2°
227	THF	5° ± 1°
228	DMSO*	3° ± 2°
229	EtOH	5° ± 1°
230	EtOH	5° ± 2°
231	DMSO*	2° ± 2°
232	DMSO*	3° ± 2°

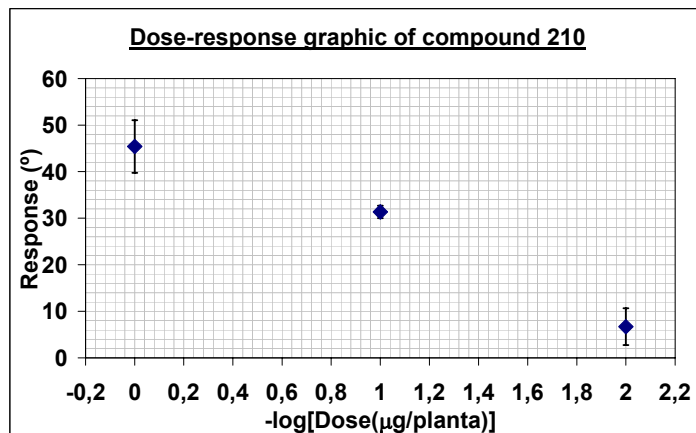
*See pag. 185

Table 9. Bending angle at a dose of 1 µg/plant for the 23 candidates of the virtual screening made with FLAP methodology.

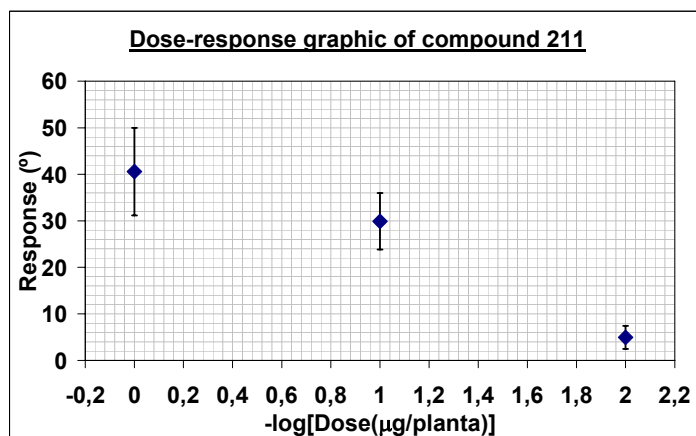
As seen, compounds **210**, **211**, **215**, **224** and **225** have shown a bending angle higher than the others. Thought these angles are minor than the ones obtained for active BRs, it is noteworthy that the plant has not remained unaffected and has given a certain level of activity. This case is equivalent to that got in part 2.2.4 with compounds **207** and **209**. Likewise, more response measurements at lower doses have been made to

obtain the activity profile for these five compounds. The obtained results are shown in figure 39.

Compound 210 (EtOH)	
Dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Response
1	$47^\circ \pm 7^\circ$
0.1	$31^\circ \pm 1^\circ$
0.01	$7^\circ \pm 4^\circ$



Compound 211 (EtOH)	
Dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Response
1	$43^\circ \pm 13^\circ$
0.1	$30^\circ \pm 6^\circ$
0.01	$5^\circ \pm 2^\circ$



Compound 215 (EtOH)	
Dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Response
1	$41^\circ \pm 16^\circ$
0.1	$17^\circ \pm 2^\circ$
0.01	$19^\circ \pm 4^\circ$

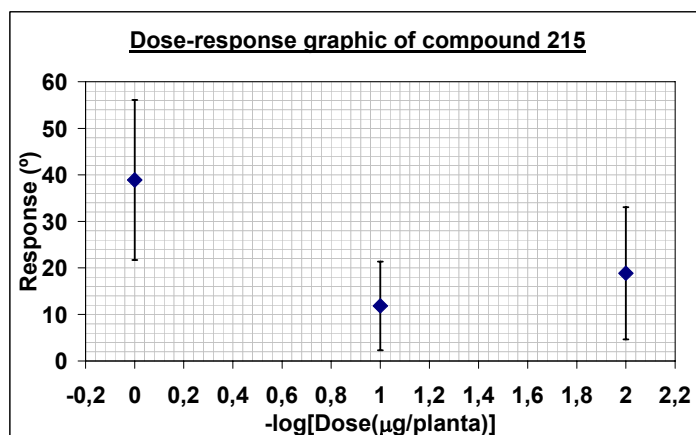
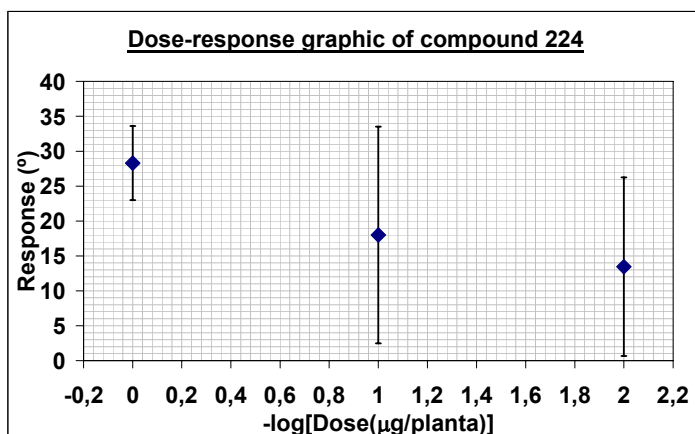


Figure 39. Responses of compounds 209, 210, 211, 215 and 224 at the new doses evaluated.

Compound 224 (EtOH)	
Dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Response
1	$30^\circ \pm 2^\circ$
0.1	$26^\circ \pm 10^\circ$
0.01	$13^\circ \pm 13^\circ$



Compound 225 (EtOH)	
Dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Response
1	$14^\circ \pm 13^\circ$
0.1	$36^\circ \pm 17^\circ$
0.01	$4^\circ \pm 2^\circ$

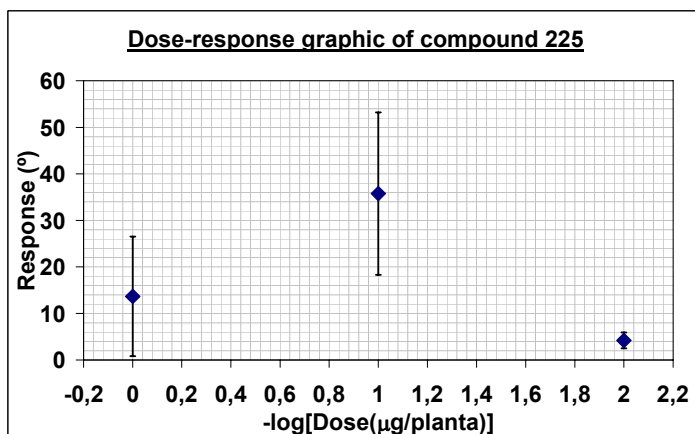


Figure 39. Responses of compounds **209**, **210**, **211**, **215** and **224** at the new doses evaluated.

As seen, compounds **210**, **211**, **215** and **224** show a certain level of response at a dose of $0.1 \mu\text{g}/\text{plant}$, though lower than the one obtained at $1 \mu\text{g}/\text{plant}$. This level of activity is kept by compounds **215** and **224** at a dose of $0.01 \mu\text{g}/\text{plant}$, while is extinguished in compounds **210** and **211**. Compound **225** shows a different profile, since the response at $0.1 \mu\text{g}/\text{plant}$ is higher than the one shown at $1 \mu\text{g}/\text{plant}$. This result can be explained by the toxicity of the compound at the later dose.

Moreover, as detailed in the annex part, individual results of compounds **210**, **211**, **215** and **224** at $1 \mu\text{g}/\text{plant}$ and of compound **225** at $0.1 \mu\text{g}/\text{plant}$ are higher than 70° and thus equivalent to that of active BR. This reinforces their non-active compounds consideration. In addition, these compounds represent a chemical series, sharing a *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine substructure.

This five compounds, together with compounds **207** and **209**, are considered very interesting results because, although they do not show the response of an active BR, they show a level of activity which makes them promising structures to be considered in the future design of non-steroidal compound with BR activity.

2.4. Application of the SHOP methodology to find new BR-like compounds

2.4.1. Aim

One of the highest achievements in the design of new active structures as plant growth promoters was the synthesis of the androstane BRs **6** and **7**, that rendered an activity similar to those of medium activity BRs.^{50,51} An androstane BR comprises an steroid skeleton, properly functionalised, with an hydroxyl group in 17 β position, where an acyl group, that is intended to mimic the side chain of **1** and **2**, is linked. The carbonyl of the acyl side chain and the α -carbon polar functionality seeks to mimic the 22*R*-OH and the 23*R*-OH of **1** and **2**, respectively, and the hydrophobic part, the extreme of the side chains of **1** and **2**. The commercial side chain of **6** and **7** was purposed by the application of the SHOP methodology to a commercial carboxylic acid compounds database.^{46,49}

The good result given by the application of SHOP methodology to replace the side chain of **1** by a commercial structure in an androstanic BR, encouraged us to try the same methodology to replace **233** and **234** (figure 39), the steroidal skeletons of **6** and **7**, by a commercial or easily available structure with a hydroxyl group in its structure to link the side chain to. It must be pointed of that **234** and **233** require of 8 and 9 synthetic steps, respectively, prior to proceed to its condensation with the corresponding side chain. So, obtaining a new structure, different to the steroidal pattern, that would render an active BR-like compound, would be very important to increase the availability of compounds with a BR activity to its future use in agriculture applications.

SHOP methodology needs a template structure with one or some atoms of reference, called anchor points, to perform the search procedure. In our case, the structures that will be used as reference are **233** and **234**, the steroid skeletons of BL (**1**) and CS (**2**), with a 17 β -OH replacing the side chain. The O atom of 17 β -OH group will be chosen as reference or anchor point (A) in both structures. So, the search will be focused on finding mimetics of structures **235** and **236** (figure 39) with a hydroxyl group on its structure equivalent to that of 17 β parameterized as anchor point.

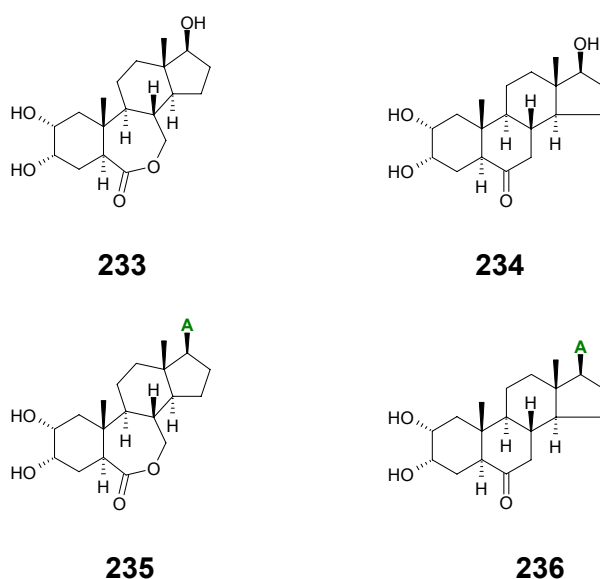


Figure 40. Compounds **233**, **234**, **235** and **236**.

In the literature, non-steroidal structures that have shown an activity similar to that of steroidal ones have been reported. One of the most representative examples is diethylstilbestrol (DES) (**237**), compound that possess an activity analogue as that of the oestrogen 17 β -estradiol (E₂) (**238**), a natural feminine sexual hormone. The activity shown by **237** can be explained looking at its overlapping with **238** (figure 41). Those pharmacophoric patterns needed to elicit estrogenic activity are shared by both compounds: two hydroxyl groups separated by a defined distance with a hydrophobic skeleton.

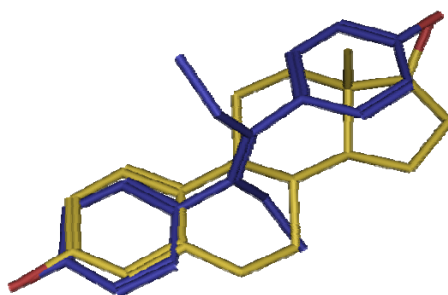
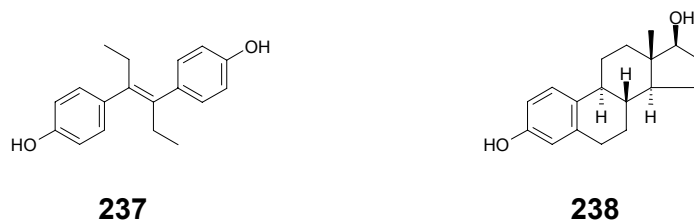


Figure 41. Overlap of DES (**237**), in yellow, with E₂ (**238**), in blue.

What makes **237** very interesting is that it can be easily synthesized and is even more active than **238**.¹²⁶ This is exactly the aim in the replacement of skeletons **233** and **234** by more available active structures.

Other compounds different than **237** with estrogenic activity have been found. They are included in the family of endocrine-disruptor chemicals (EDCs). This class of compounds shows a lot of families of structures that, with a proper functionalization, could be estrogenic. This means that they possess a pharmacophoric profile similar to that of **238**. So, this could be a source of information about non-steroidal structures able to mimic a steroidal one.

The search process with SHOP methodology will be applied systematically to a commercial alcohols database. Additionally, taking advantage of the knowledge about the structures of EDCs, a database of alcohols will be designed *ad hoc*, that is, designed for the particular aim of this project, keeping in mind ideas taken from the EDCs structures.

2.4.2. Database generation

As described, two databases will be used in the screening process made with SHOP methodology. The first will include compounds derived from the backbones of structures of endocrine disruptors-chemicals and the second will be formed by commercial building blocks.

2.4.2.1. *Ad hoc* designed database

As highlighted before, the group of endocrine disruptor-chemicals (EDC) include non-steroidal structure able to possess the same activity as the estrogenic hormone 17β -estradiol (**238**). So, they are able to mimic the activity given by a steroid compound. One of the best known examples is the one given by diethylstilbestrol (DES) (**237**). As remarked before, the good overlapping of the two hydroxyl groups and the correspondence between the two hydrophobic skeletons (figure 41) has been purposed as the basis to explain the activity of **237**.¹²⁷ In this sense, one can realize that the good overlapping is given by the similarity of the backbone of **237** to the steroid backbone of **238** and the availability to place the hydroxyl groups on the same regions.

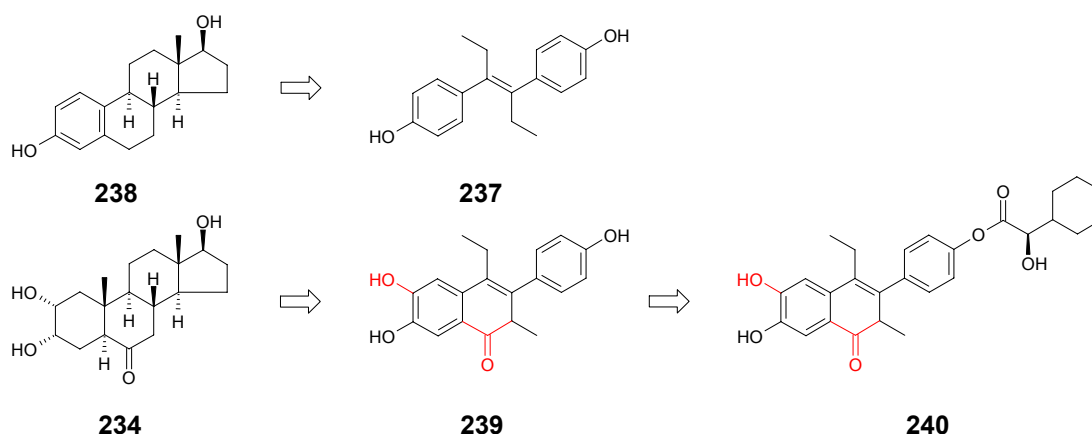


Figure 42. Scheme of the idea that leads the design of **240**-like compounds.

Taking this idea in mind, it seems interesting to pursue the same concept, to properly functionalize the **237** skeleton in order to resemble those functionalities present in **233** and **234**, trying to get structures like **239**. Then, the side chain **5** will be anchored to the new proposed skeleton by synthetic means, to reach a non-steroid structure **240**, with a potential ability to elicit BR activity. So, DES-like compounds will be modified in order to try to reach the pharmacophoric profile defined by **233** and **234**. The scheme of this idea is shown in figure 42.

This approach offers the advantage that the structures proposed are susceptible to present better alignments with the templates **233** and **234** than the ones obtained from the commercial compound database, since the former are based on a pre-existing idea. On the contrary, they may need some synthetic steps to be obtained; so, the information that they could yield is expected to have a higher scientific value than commercial.

Moreover, other compounds of the EDC family with different structures have shown a high estrogenic activity.¹²⁷ Two examples of them are 3,4,6'-trihydroxyflavone (**241**) and bisphenol B (**242**) (figure 43). So, their backbones will be used to extend the database, together with other groups of compounds.

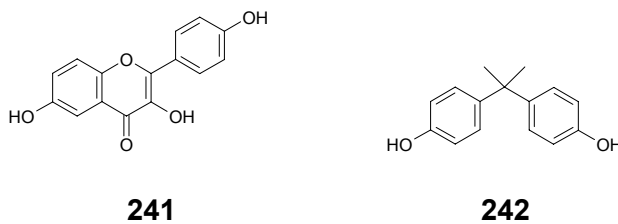


Figure 43. Compounds **241** and **242**.

The chosen backbones to be in the database will be systematically functionalized in order to study the most convenient functionalization for each one. This result will give an idea of the convenience to use some backbones respect to others. According to this idea, 20 families of compounds have been designed. There have been 3 series of systematic substitution patterns (group I, group II and group III), yielding a total of 720 compounds.

For each structure an atom will be defined as anchor point to allow the performance of SHOP methodology. The anchor point will be assigned to the O atom of the hydroxyl group that seeks to mimic the 17 β -OH of **233** and **234**.

The compounds chosen to integrate the *ad hoc* designed database are described in figures 44-46. In each one of the three groups, each family has been functionalized according to all the options of the substitution pattern shown. The name **family n** refers to the substitution pattern n applied to the backbone structure **family**. DU refers to dummy atoms.

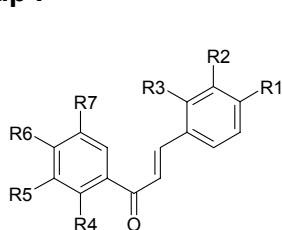
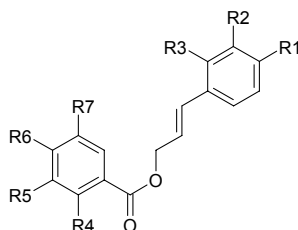
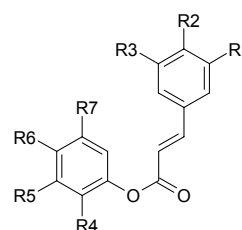
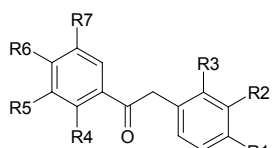
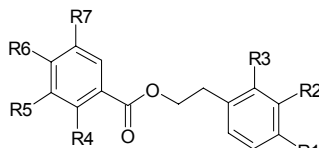
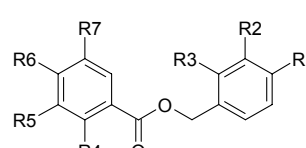
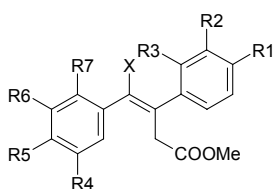
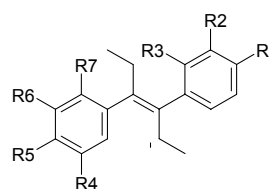
2.4.2.2. Commercial building blocks database

This database was formed by commercial building blocks extracted from different chemical suppliers: Aldrich,¹²⁸ Maybridge,¹²⁹ Specs,¹³⁰ Keyorganics¹³¹ and Combiblocks.¹³² The search is focused on building blocks because these structures will have to be linked to the side chain (*R*)-hexahydromandelic acid (**5**) through some synthetic steps. So, a building blocks amount, higher than the used for bioassay trials, is needed.

As described before, the desired molecular structures must have one hydroxyl group, needed for the further esterification with **5**. Moreover, the O of this group will be considered as anchor point to perform the calculations with SHOP. So, a filtering of the building blocks of the database has been done to select those compounds with at least one hydroxyl group on its structure. Moreover, we need to define the O of these hydroxyl groups as a dummy atom (anchor point). This operation is made with Virtual Reactions program, which allows the selection of the compounds of a database with a reaction pattern.¹³³

After this selection step, a database of 1996 different alcohols, with the O atom of the hydroxyl group selected as anchor point, has been made. In the case of structures having more than one hydroxyl group, as many structures as hydroxyl groups have been selected.

Group I

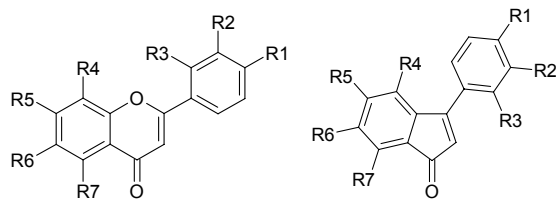

Chalcones

Cinnamyl benzoates

Phenyl cinnamates

Benzylphenylketones

Phenethyl benzoates

Benzyl benzoates

Stilbenes (X = H, Me, Et)

DES-like stilbenes

Substitution pattern	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
1	DU	-	-	OH	-	-	-
2	DU	-	-	-	OH	-	-
3	DU	-	-	-	-	OH	-
4	DU	-	-	OH	OH	-	-
5	DU	-	-	-	OH	OH	-
6	DU	-	-	-	OH	-	OH
7	DU	-	-	OH	-	OH	-
8	-	DU	-	OH	-	-	-
9	-	DU	-	-	OH	-	-
10	-	DU	-	-	-	OH	-
11	-	DU	-	OH	OH	-	-
12	-	DU	-	-	OH	OH	-
13	-	DU	-	-	OH	-	OH
14	-	DU	-	OH	-	OH	-
15	-	-	DU	OH	-	-	-
16	-	-	DU	-	OH	-	-
17	-	-	DU	-	-	OH	-
18	-	-	DU	OH	OH	-	-
19	-	-	DU	-	OH	OH	-
20	-	-	DU	-	OH	-	OH
21	-	-	DU	OH	-	OH	-

Family	Code
Chalcones	Calconan
Cinnamyl benzoates	Benzcinn
Phenyl cinnamates	Cinnfenn
Benzylphenylketones	Benzfencetn
Phenethyl benzoates	Benzetfenn
Benzyl benzoates	Benzbenzn
Stilbenes	X= Me EstilbMen
	X= Et EstilbEtn
	X= H EstilbHn
DES-like stilbenes	EstilbDES _n

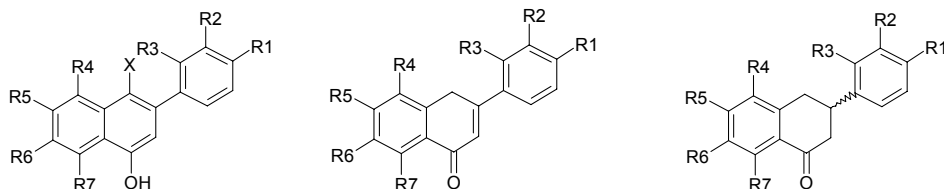
Figure 44. Families and substitution pattern of the group I proposed compounds.

Group II



Flavonoids

3-Phenylindanones



Phenylnapthalenes (X = H, Me, Et)

Phenyltetralones

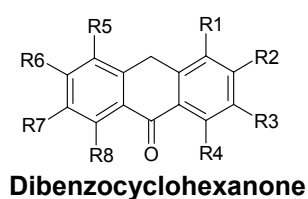
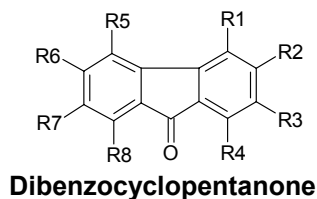
Phenylidihydrotetralones (S o R)

Substitution pattern	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
1	DU	-	-	OH	-	-	-
2	DU	-	-	-	OH	-	-
3	DU	-	-	-	-	OH	-
4	DU	-	-	-	-	-	OH
5	DU	-	-	OH	OH	-	-
6	DU	-	-	-	OH	OH	-
7	DU	-	-	-	-	OH	OH
8	DU	-	-	OH	-	-	OH
9	DU	-	-	-	OH	-	OH
10	DU	-	-	OH	-	OH	-
11	-	DU	-	OH	-	-	-
12	-	DU	-	-	OH	-	-
13	-	DU	-	-	-	OH	-
14	-	DU	-	-	-	-	OH
15	-	DU	-	OH	OH	-	-
16	-	DU	-	-	OH	OH	-
17	-	DU	-	-	-	OH	OH
18	-	DU	-	OH	-	-	OH
19	-	DU	-	-	OH	-	OH
20	-	DU	-	OH	-	OH	-
21	-	-	DU	OH	-	-	-
22	-	-	DU	-	OH	-	-
23	-	-	DU	-	-	OH	-
24	-	-	DU	-	-	-	OH
25	-	-	DU	OH	OH	-	-
26	-	-	DU	-	OH	OH	-
27	-	-	DU	-	-	OH	OH
28	-	-	DU	OH	-	-	OH
29	-	-	DU	-	OH	-	OH
30	-	-	DU	OH	-	OH	-

Family	Code
Flavonoids	Flavonn
3-Phenylindanones	Phenylindann
Phenylnapthalenes	X= Me NaftMen
	X= Et NaftEtn
	X= H NaftHn
Phenyltetralones	Phenyltetran
Phenylidihydrotetralones (S o R)	S aphenylditetran
	R bphenylditetran

Figure 45. Families and substitution pattern of the group II proposed compounds

Group III



Substitution pattern	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
1	DU	-	-	-	OH	-	-	-
2	DU	-	-	-	-	OH	-	-
3	DU	-	-	-	-	-	OH	-
4	DU	-	-	-	-	-	-	OH
5	DU	-	-	-	OH	OH	-	-
6	DU	-	-	-	-	OH	OH	-
7	DU	-	-	-	-	-	OH	OH
8	DU	-	-	-	OH	-	-	OH
9	DU	-	-	-	-	OH	-	OH
10	DU	-	-	-	OH	-	OH	-
11	-	DU	-	-	OH	-	-	-
12	-	DU	-	-	-	OH	-	-
13	-	DU	-	-	-	-	OH	-
14	-	DU	-	-	-	-	-	OH
15	-	DU	-	-	OH	OH	-	-
16	-	DU	-	-	-	OH	OH	-
17	-	DU	-	-	-	-	OH	OH
18	-	DU	-	-	OH	-	-	OH
19	-	DU	-	-	-	OH	-	OH
20	-	DU	-	-	OH	-	OH	-
21	-	-	DU	-	OH	-	-	-
22	-	-	DU	-	-	OH	-	-
23	-	-	DU	-	-	-	OH	-
24	-	-	DU	-	-	-	-	OH
25	-	-	DU	-	OH	OH	-	-
26	-	-	DU	-	-	OH	OH	-
27	-	-	DU	-	-	-	OH	OH
28	-	-	DU	-	OH	-	-	OH
29	-	-	DU	-	-	OH	-	OH
30	-	-	DU	-	OH	-	OH	-
31	-	-	-	DU	OH	-	-	-
32	-	-	-	DU	-	OH	-	-
33	-	-	-	DU	-	-	OH	-
34	-	-	-	DU	-	-	-	OH
35	-	-	-	DU	OH	OH	-	-
36	-	-	-	DU	-	OH	OH	-
37	-	-	-	DU	-	-	OH	OH
38	-	-	-	DU	OH	-	-	OH
39	-	-	-	DU	-	OH	-	OH
40	-	-	-	DU	OH	-	OH	-

Family	Code
Dibenzocyclopentanone	dibenzpentn
Dibenzocyclohexanone	dibenzhexn

Figure 46. Families and substitution pattern of the group III proposed compounds.

2.4.3. Methodology

2.4.3.1. Database generation

The first step in the SHOP methodology is the creation of the databases that will be used to perform the screening procedures taking a template, in this case **233** and **234**, as a reference.

The database creation requires of two steps: the conformer generation and the descriptor calculation.

a) The conformer generation process is done by a rule-based method, compiled with program SHOP, selecting the 10 most diverse conformers for each compound, so that the energy of each new conformer does not exceed in 10 kcal/mol the energy of the minimum energy conformer generated.

b) Next step consists of the calculation of SHOP descriptors for each one of the new conformers obtained for each compound of the database. As described, three kinds of descriptors will be obtained: SHOP-GRID, SHOP-Shape and SHOP-Fingerprints. For the first type, the following probes are selected to perform the calculation:

- DRY probe, which mimics the hydrophobic interactions.
- N1 probe, which mimics hydrogen bond donor interactions.
- O probe, which mimics hydrogen bond acceptor interactions.

In the study the descriptors related with the geometry of the anchor points would not be considered, since only one anchor point is considered on each molecule.

2.4.3.2. Search procedure

Once the two databases have been generated, the search procedure is ready to be applied. In first place, SHOP descriptors, with the same configuration used for the databases descriptors calculation, are calculated for the two templates that will be used, **233** and **234**.

Then, similarity indexes are computed, according to the SHOP descriptors calculated, between each one of the two templates and the whole compounds of the two databases, the commercial compounds one and the *ad hoc* designed one. Similarity indexes of Carbó¹¹⁹ and Hogdkin¹²⁰ are used to perform the comparison. Also, two criteria of similarity index calculation are chosen, considering the sum and the product of the different descriptors calculated. In the similarity index calculation, the values calculated for each probe have been given the same weight in the calculation.

So, the compounds of the two databases have been ranked according to 3 factors (template –**233** and **234**–, similarity index-Carbó and Hogdkin– and calculation-like – sum and product) with two levels each one, thus rendering 8 lists for each database.

2.4.3.3. Analysis of the results and refining

The results of the scaffold hopping process given by the commercial compounds database and the *ad hoc* designed database are summarized as follows. In both cases the results obtained using **233** as templates are shown in first place and after the results using **234** as template. For each of the four cases, four lists have been

generated due to the use of two similarity indexes, Carbó and Hodgkin, and two ways to calculate the index, sum or product (tables 9-12). The 30 best results for each condition are considered.

Those structures present in various lists with high similarity index values are selected. The next step has consists of a flexible alignment between the selected candidates and **233** or **234**, depending on the case. The best overlaps given for each structure are shown above in figures 48-52. All the chosen overlaps show good superposition between the 17 β -OH group of **233** or **234** and the corresponding hydroxyl group of the molecule under study, since this is the anchor point, where the side chain **5** will be linked. The convenience of using each structure for the future synthesis of a BR-like compound is discussed. The analysis will be focused on evaluating the overlap between the polar functionalities between each molecule and between the hydrophobic part of **233** or **234**. In all the overlap figures shown, **233** or **234** appear in yellow and the molecule under study in grey.

2.4.3.3.1. Analysis of the results given by the *ad hoc* designed database

2.4.3.3.1.1. 233 as template

Table 10 summarizes the results obtained for the *ad hoc* designed database using **233** as template. The chosen structures are shown in figure 47.

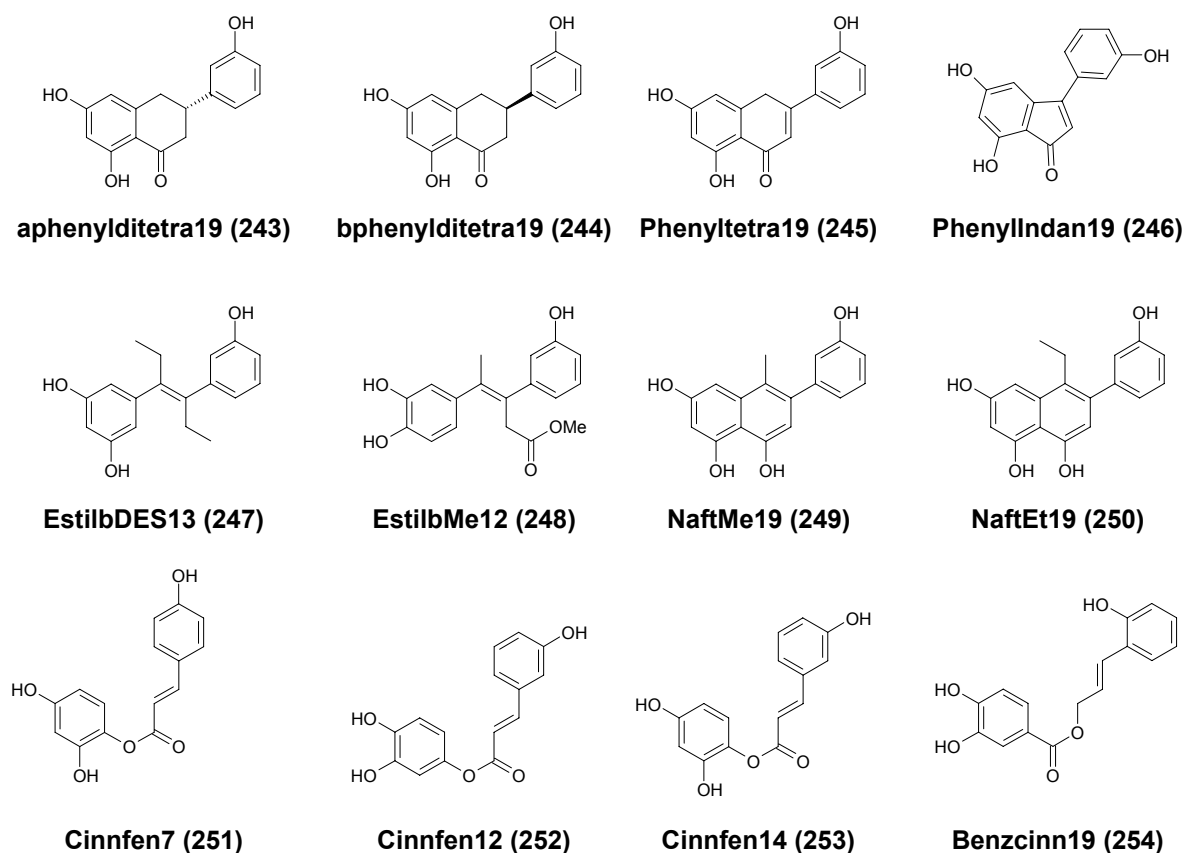


Figure 47. Compounds selected in the *ad hoc* designed database using **233** as template.

Sum Carbó		Sum Hogdkin		Product Carbó		Product Hogdkin	
Compound	SI	Compound	SI	Compound	SI	Compound	SI
estilbDES13_12	0,971	estilbMe12_16	0,952	estilbDES13_12	0,922	estilbDES13_12	0,866
estilbMe12_15	0,970	estilbMe12_15	0,952	estilbDES13_2	0,917	Cinnbenz7_1	0,866
estilbDES13_11	0,969	Cinnbenz7_1	0,949	naftEt19_1	0,913	Cinnbenz14_6	0,866
estilbMe12_16	0,968	estilbDES13_12	0,947	estilbDES9_3	0,912	naftEt19_1	0,865
ditetra19_4	0,967	ditetra19_4	0,947	estilbDES13_11	0,908	Cinnbenz12_13	0,865
estilbDES9_3	0,965	Cinnbenz4_1	0,947	ditetra19_4	0,907	naftMe19_3	0,862
btetra19_3	0,965	btetra19_3	0,947	naftMe19_2	0,906	naftMe19_2	0,861
estilbDES13_2	0,964	atetra19_4	0,947	Cinnbenz14_6	0,906	Cinnbenz7_2	0,857
atetra19_4	0,964	ditetra19_2	0,946	estilbDES13_4	0,904	btetra19_3	0,854
naftEt19_1	0,963	Cinnbenz14_6	0,946	Cinnbenz12_13	0,903	ditetra19_4	0,853
ditetra19_2	0,963	Cinnbenz5_1	0,944	naftMe19_3	0,902	naftEt19_6	0,852
Cinnbenz14_6	0,963	naftMe19_3	0,943	naftEt19_6	0,901	Benzfen6_12	0,851
naftMe19_2	0,962	phenylindan19_min	0,943	benzcinn19_13	0,901	naftEt19_3	0,850
estilbDES9_8	0,962	phenylindan19_1	0,943	naftEt19_3	0,899	estilbDES13_2	0,848
Cinnbenz7_1	0,962	estilbDES13_11	0,943	estilbDES9_8	0,897	Benzfen14_14	0,847
Cinnbenz2_8	0,962	naftMe19_2	0,942	Cinnbenz7_1	0,896	benzcinn19_13	0,847
naftMe19_3	0,961	Cinnbenz12_13	0,942	atetra14_2	0,896	Cinnbenz4_1	0,845
phenylindan19_min	0,961	naftEt19_1	0,941	naftEt12_1	0,893	benzcinn19_1	0,844
phenylindan19_1	0,961	Cinnbenz7_2	0,940	estilbMe12_15	0,892	benzbenz20_13	0,844
estilbDES13_4	0,961	Cinnbenz19_9	0,939	naftMe12_2	0,891	atetra19_4	0,843
naftEt19_6	0,960	Benzfen6_12	0,939	naftEt12_6	0,891	estilbDES13_11	0,841
naftEt19_3	0,960	Benzfen14_14	0,939	btetra14_2	0,891	Cinnbenz19_1	0,841
estilbDES12_8	0,960	naftEt19_6	0,938	estilbDES12_8	0,890	Cinnbenz19_2	0,840
Cinnbenz12_13	0,959	naftEt19_3	0,938	benzcinn19_1	0,890	estilbMe12_15	0,839
benzcinn19_13	0,959	Cinnbenz4_2	0,936	btetra19_3	0,889	estilbMe13_4	0,837
Cinnbenz5_1	0,958	estilbMe13_4	0,935	Cinnbenz7_2	0,888	Cinnbenz5_1	0,835
Cinnbenz4_1	0,958	Cinnbenz6_1	0,935	naftMe12_3	0,887	dibenzpent26_min	0,834
Cinnbenz2_6	0,958	Cinnbenz19_2	0,935	Benzfen6_12	0,886	dibenzpent26_1	0,834
Benzfen14_14	0,956	benzcinn19_13	0,935	naftEt12_3	0,885	Cinnbenz7_8	0,834
benzcinn19_1	0,956	estilbMe12_3	0,934	benzbenz20_13	0,885	estilbDES13_4	0,832

Table 10. Results obtained for the *ad hoc* designed database using **233** as template. The nomenclature shown for each structure is FamilySubstitutionPattern_conformer.

Table 11 shows and describes the overlaps obtained for the 12 candidate molecules and the template **233**.

Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
243 Alignment1		Yes	No	Yes	Yes
243 Alignment2		Yes	No	Yes	Yes
244 Alignment1		Yes	No	Yes	Yes
244 Alignment2		Yes	No	Yes	Yes
245 Alignment1		Yes	Yes	Yes	Yes
245 Alignment2		Yes	No	Yes	Yes
246		Yes	No	Yes (7-oxa)	Yes

Table 11. Alignments of the candidate compounds of the search made for the *ad hoc* designed database, in grey, using **233**, in yellow, as template.

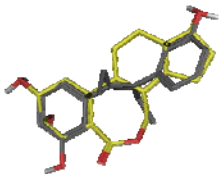
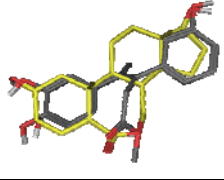
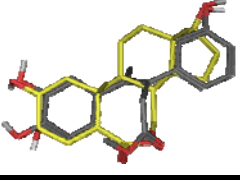
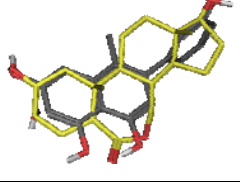
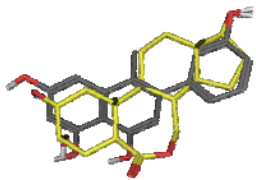
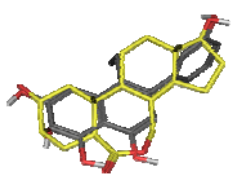
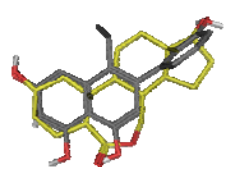
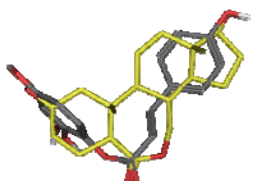
Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
247		Yes	No	No	Yes
248 Alignment1		Yes	Yes	Yes	Yes
248 Alignment2		Yes	Yes	Yes	Yes
249 Alignment1		Yes	No	Yes	Yes
249 Alignment2		Yes	No	Yes	Yes
250 Alignment1		Yes	No	Yes	Yes
250 Alignment2		Yes	No	Yes	Yes
251		Yes	Yes	Yes	Yes

Table 11. Alignments of the candidate compounds of the search made for the *ad hoc* designed database, in grey, using **233**, in yellow, as template.

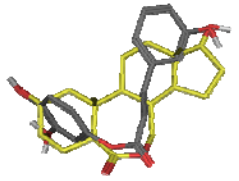
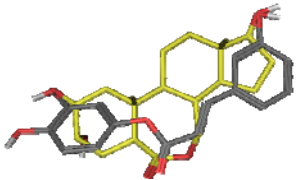
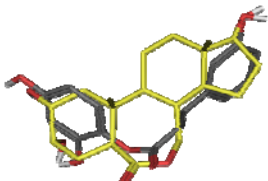
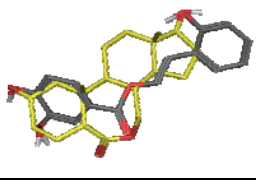
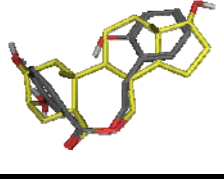
Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
252 Alignment1		Yes	Yes	Yes	No
252 Alignment2		Yes	No	Yes	No
253		Yes	Yes	Yes	Yes
254 Alignment1		Yes	Yes	Yes (7-oxa)	No
254 Alignment2		Yes	Yes	Yes	Yes

Table 11. Alignments of the candidate compounds of the search made for the *ad hoc* designed database, in grey, using **233**, in yellow, as template.

In the last alignment given by compound **254** all the moieties are well overlapped except the 17 β -OH of **233** and the hydroxyl group of the aromatic ring of the cinnamyl part of the molecule. This last alignment seems to show that if this ring would be *para*-substituted, as Benzcinn5 (**255**) is, the quality of the overlap would increase. Although this molecule has not given a good ranking in the screening made with SHOP, its alignment with **233** is tried. The result is shown in figure 48. As seen, all the polar moieties overlap well, though a good overlapping with the skeleton has not been achieved.

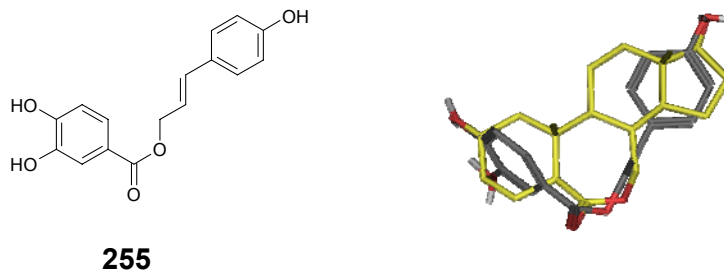


Figure 48. Alignment of Benzcinn5 (**255**), in grey, with **233**, in yellow.

Selection of the candidates

Once the 12 compounds have been analyzed, the most promising candidates must be selected in order to proceed with the synthesis of the corresponding BR-like compound, with the side chain **5** anchored to the hydroxyl group that mimics the 17 β -OH of **233**. The choice of the candidates is made according to good overlap features. As shown, in general the molecules have not given a good superposition between the central hydrophobic parts. So, the selection is focused on the overlap of the polar moieties keeping in mind that a certain overlap must be given in the central part of the molecule. On the other hand, synthetic feasibility, in case the compounds are not commercial, must be considered too.

Taking this last idea in mind, non-commercially available compounds **243** and **244**, although the good overlap with **233** shown, are not prioritized due to the chiral centre present on its structure. In this sense, compound **245**, as representative of compounds bearing the 19 substitution pattern, seems to be a better candidate. However, as noticed once the calculations had been done, compound **245** presents, as does the whole "phenyltetra" family of compounds, the 1,5-prototropy shown in figure 49, that makes this family be equivalent to that of so-called "phenylnaftalenes".

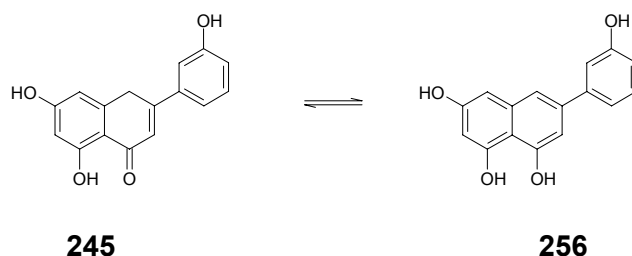


Figure 49. 1,5-prototropy shown between **245** and NaftH19 (**256**). This behaviour can be extended to the compounds of phenyltetra and phenylnaftalenes families, respectively.

It must be remarked that phenylnaftalenes have not given bad result in the SHOP screening procedure. Additionally, this 1,5-prototropy in the phenyltetra family could be avoided by the introduction of two functionalities, as two fluorine groups or two methyl groups in the methylene position. However, this could introduce some difficulties in the synthesis of that compound.

Finally, the selected candidates are **245**, **248**, **253** and **255**. Although this last compound has not given a good result in the SHOP procedure, its good overlapping with **233** makes it a good candidate.

2.4.3.3.1.2. 234 as template

Table 12 summarizes the results obtained for the *ad hoc* designed database using **234** as template. The chosen structures are shown in figure 50.

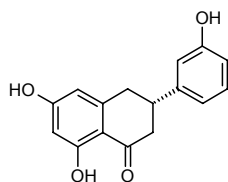
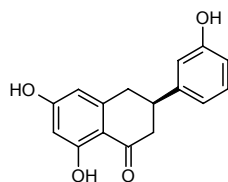
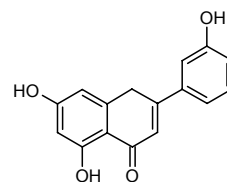
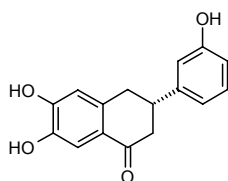
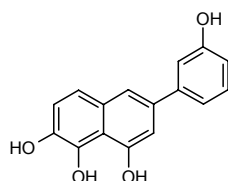
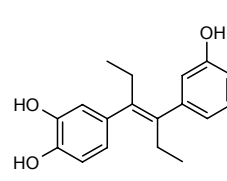
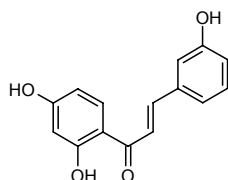
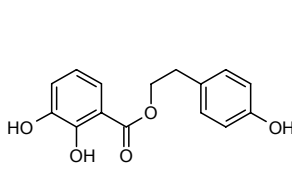
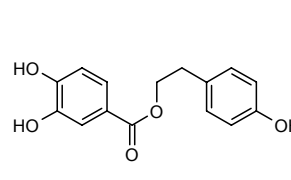
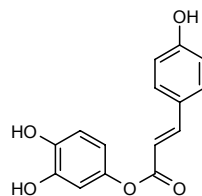
**aphenylditetra19 (243)****bphenylditetra19 (244)****Phenyltetra19 (245)****aphenylditetra16 (257)****NaftH17 (258)****EstilbDES12 (259)****chalcone 14 (260)****Benzetfen4 (261)****Benzetfen5 (262)****Cinnfen5 (263)**

Figure 50. Compounds selected in the *ad hoc* designed database using **234** as template.

Suma Carbó		Suma Hogdkin		Producte Carbó		Producte Hogdkin	
Compound	SI	Compound	SI	Compound	SI	Compound	SI
chalcone14_5	0,980	chalcone14_5	0,965	atetra19_2	0,942	atetra19_2	0,907
chalcone14_4	0,979	chalcone14_4	0,964	chalcone14_4	0,935	chalcone14_5	0,901
atetra19_2	0,975	Atetra19_2	0,959	chalcone14_5	0,932	chalcone14_4	0,901
Cinnbenz5_1	0,965	Cinnbenz5_1	0,956	Cinnbenz5_1	0,916	Cinnbenz5_1	0,889
benzbenz1_3	0,965	benzbenz5_1	0,952	ditetra19_2	0,913	ditetra19_2	0,887
ditetra14_2	0,963	chalcone14_1	0,950	Cinnbenz3_1	0,910	atetra19_4	0,882
Cinnbenz3_1	0,963	ditetra19_2	0,949	benzbenz1_3	0,910	btetra19_3	0,877
estilbDES12_5	0,962	benzbenz4_7	0,948	atetra19_4	0,909	atetra16_4	0,870
ditetra19_2	0,962	Atetra19_4	0,948	Cinnbenz3_8	0,908	naftH17_2	0,869
Cinnbenz3_8	0,962	Btetra19_3	0,947	Cinnbenz2_1	0,904	btetra19_2	0,866
chalcone14_1	0,962	naftMe19_3	0,946	btetra19_3	0,904	benzbenz5_1	0,864
btetra19_2	0,962	naftH17_2	0,946	btetra19_2	0,903	benzbenz4_7	0,860
benzbenz5_1	0,962	atetra19_min	0,946	atetra16_4	0,901	chalcone14_1	0,859
benzbenz4_7	0,961	Atetra19_1	0,946	naftH17_2	0,900	atetra16_2	0,853
naftMe19_3	0,960	btetra19_min	0,945	estilbDES12_5	0,899	benzbenz4_13	0,851
naftH17_2	0,960	Btetra19_2	0,945	atetra17_2	0,892	benzbenz4_8	0,850
estilbDES9_9	0,960	Btetra19_1	0,945	chalcone14_1	0,891	atetra17_2	0,850
estilbDES12_3	0,960	Atetra16_4	0,942	atetra16_2	0,891	naftH19_2	0,848
Cinnbenz2_1	0,960	naftMe19_2	0,941	benzbenz5_1	0,886	estilbDES12_5	0,848
btetra19_3	0,960	estilbDES12_5	0,941	benzbenz4_7	0,886	benzbenz5_17	0,848
benzbenz3_5	0,960	Cinnbenz11_2	0,941	btetra17_2	0,884	Cinnbenz11_2	0,844
atetra19_min	0,960	Cinnbenz13_2	0,940	ditetra14_2	0,883	naftH16_2	0,843
atetra19_4	0,960	benzbenz4_8	0,940	benzbenz3_5	0,881	Cinnbenz4_1	0,843
atetra19_1	0,960	ditetra19_4	0,939	benzbenz5_17	0,880	btetra17_2	0,840
btetra19_min	0,959	benzbenz4_12	0,939	benzbenz4_13	0,879	ditetra17_2	0,835
btetra19_1	0,959	estilbDES12_3	0,938	naftH19_2	0,876	benzbenz4_12	0,835
naftMe19_2	0,958	Benzfen12_2	0,938	benzbenz4_8	0,873	benzbenz11_16	0,834
estilbDES2_7	0,958	Benzfen6_11	0,936	benzfenet13_1	0,871	atetra19_min	0,833
atetra16_4	0,957	benzbenz5_17	0,936	benzbenz1_2	0,871	atetra19_1	0,833
atetra14_3	0,957	benzbenz4_13	0,936	chalcone10_1	0,869	Cinnbenz13_2	0,831

Table 12. Results obtained for the *ad hoc* designed database using **234** as template. The nomenclature shown for each structure is FamilySubstitutionPattern_conformer.

Table 13 shows the overlaps obtained for the 12 candidate molecules and the template **234**.

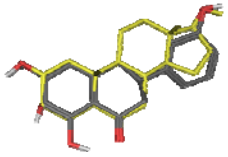
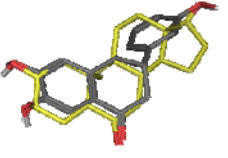
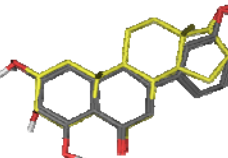
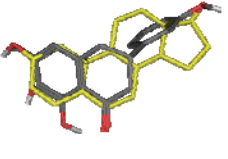
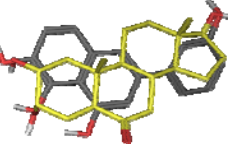
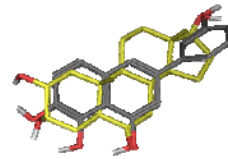
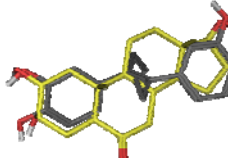
Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
243		Yes	No	Yes	No
244		Yes	Yes	Yes	Yes
245		Yes	No	Yes	Yes
257		Yes	No	Yes	No
258 Alignment 1		Yes	Yes	No	Yes
258 Alignment 2		No	Yes	Yes	Yes
259		Yes	Yes	No	Yes

Table 13. Alignments of the candidate compounds of the search made for the *ad hoc* designed database, in grey, using **234**, in yellow, as template.

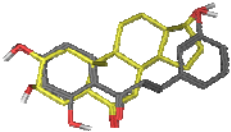
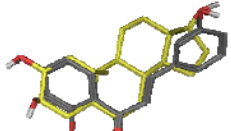
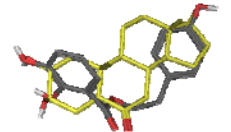
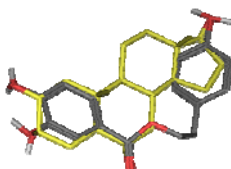
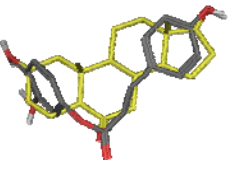
Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
260 Alignment1 Transoid		Yes	No	Yes	No
260 Alignment2 Cisoid		Yes	No	Yes	Yes
261		Yes	Yes	Yes	No
262		Yes	Yes	Yes	No
263		Yes	Yes	Yes	Yes

Table 13. Alignments of the candidate compounds of the search made for the *ad hoc* designed database, in grey, using **234**, in yellow, as template.

Selection of the candidates

Once the 10 compounds have been analyzed, the most promising candidates must be selected, in order to proceed with the synthesis of the corresponding BR-like compound, with the same criteria considered before.

The selected compounds are **245**, selected before, **260** and **263**.

2.4.3.3.2. Analysis of the results given by the commercial compounds database

2.4.3.3.2.1. 233 as template

Table 14 summarizes the results obtained for the commercial compound database using **233** as template. The structures shown, which have given the highest similarity indexes, have been selected. As seen, the similarity indexes obtained are lower to that obtained with the *ad hoc* database.

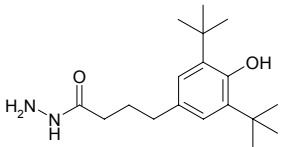
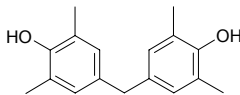
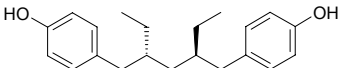
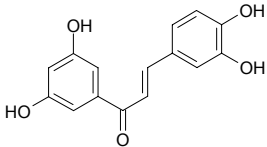
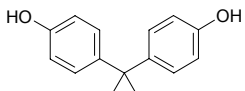
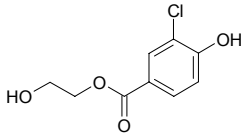
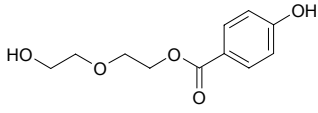
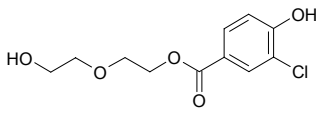
Compound	SI Carbó Sum	SI Hogdkin Sum	SI Carbó Product	SI Hogdkin Product
 264	< 0.934	0.898	< 0.842	0.729
 265	0.945	< 0.898	0.856	< 0.729
 266	0.943	< 0.898	0.868	0.730
 267	< 0.934	0.908	< 0.842	0.788
 268	0.939	< 0.898	0.862	< 0.729
 269	< 0.934	< 0.898	0.843	0.730
 270	0.950	0.913	0.886	0.805
 271	0.947	0.912	0.875	0.804

Table 14. The 13 candidates obtained from the commercial database using **233** as template.

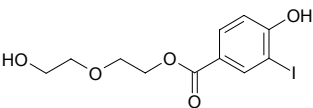
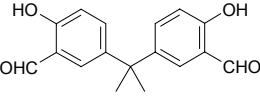
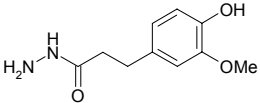
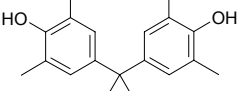
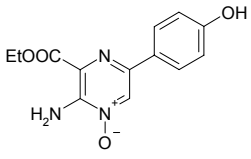
Compound	SI Carbó Sum	SI Hogdkin Sum	SI Carbó Product	SI Hogdkin Product
 272	0.964	0.931	0.897	0.828
 273	< 0.934	0.898	< 0.842	0.763
 274	0.942	0.903	0.861	0.764
 275	0.934	< 0.898	0.843	< 0.729
 276	0.942	0.983	0.861	0.763

Table 14. The 13 candidates obtained from the commercial database using **233** as template.

Table 15 shows the overlaps obtained for the 12 candidate molecules and the template **233**. As they offer alternative plausible alignments, compounds **270**, **271** and **272** show two representative alignments and compound **276** shows three as well.

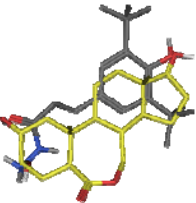
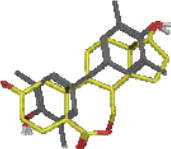
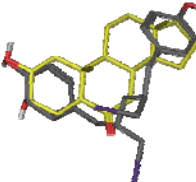
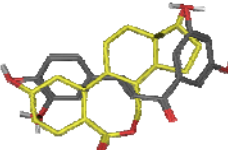
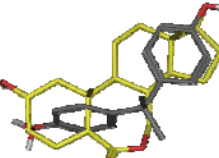
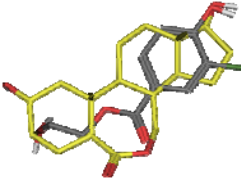
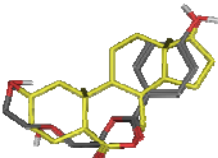
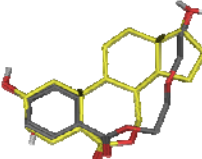
Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
264		Yes	Yes	No	No
265		No	Yes	No	Yes
266		Yes	No	No	No
267		Yes	Yes	No
268		No	Yes	No	Yes
269		No	Yes
270 Alignment 1		Yes	Yes	Yes	No
270 Alignment 2		Yes	No	Yes	No

Table 15. Alignments of the candidate compounds of the search made for the commercial compound database, in grey, using **233**, in yellow, as template.

Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
271 Alignment 1		Yes	Yes	Yes
271 Alignment 2		Yes	No	Yes	No
272 Alignment 1		Yes	Yes	Yes (7-oxa)	No
272 Alignment 2		Yes	No	Yes	No
273		Yes	Yes	No	Yes
274		Yes	Yes	No	No
275		Yes	No	No	Yes
276 Alignment 1		Yes	Yes	No	Yes

Table 15. Alignments of the candidate compounds of the search made for the commercial compound database, in grey, using **233**, in yellow, as template.

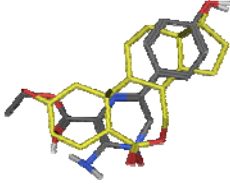
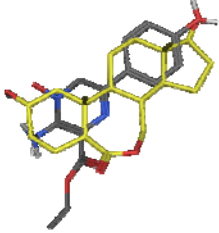
Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
276 Alignment 2		Yes	Yes	Yes	Yes
276 Alignment 3		No	Yes	Yes	Yes

Table 15. Alignments of the candidate compounds of the search made for the commercial compound database, in grey, using **233**, in yellow, as template.

Selection of the candidates

A particular overlap behaviour is shown by compounds **265**, **266**, **268**, **273** and **275**. Four of them are diphenylmethanes. These compounds show a good overlapping between either 2 α -OH or 3 α -OH (or both hydroxyl groups in the case of compound **273**), 17 β -OH and the central hydrophobic part.

Compounds **270**, **271** and **272**, with similar structures, give equivalent alignments with **233**. Each one of these compounds has two hydroxyls, one aromatic and other one aliphatic. So, they can overlap in two main ways with **233**, depending on the hydroxyl that is overlapped with 17 β -OH. If the aromatic hydroxyl overlaps with 17 β -OH of **233**, there is a good overlap with the 2 α -OH, the 3 α -OH and the carbonyl of **233**, though the overlap of the hydrophobic core is not good. On the other hand, if the aliphatic hydroxyl is aligned with 17 β -OH, there is a very good alignment of the lactone of **233** and the 2 α -OH also overlaps well. The 2 α -OH and the hydrophobic skeleton of **233** are not overlapped in this case.

Finally, compound **276** shows several overlaps where its various functionalities overlap in different ways with 2 α -OH, 3 α -OH and the carbonyl of **233**, keeping always a good overlap with 17 β -OH and a quite well overlap with the central hydrophobic skeleton.

Some candidates are proposed to proceed to the synthesis of the corresponding BR-like compound. The best found structure is thought to be **276** and so this is considered the priority one. Also, **265** and **270**, in a second priority level, are arbitrarily proposed since they represent two groups of compounds that have given various candidates in the screening.

2.4.3.3.2.2. 234 as template

Table 16 summarizes the results obtained for the commercial designed database using **234** as template. The structures shown, which have given the highest similarity indexes, have been selected. Some of them have been selected in part 2.4.3.3.2.1 too.

As seen again, the similarity indexes obtained are lower to that obtained with the *ad hoc* database.

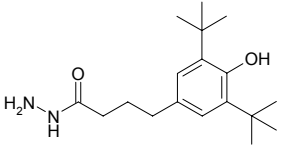
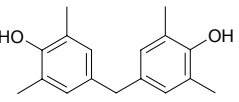
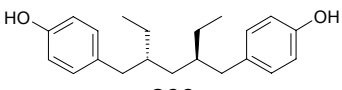
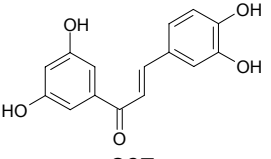
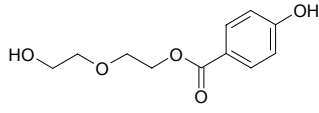
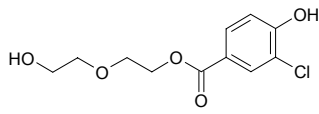
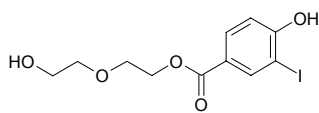
Compound	SI Carbó Sum	SI Hogdkin Sum	SI Carbó Product	SI Hogdkin Product
 264	0,922	0,896	< 0,765	< 0,690
 265	0,923	< 0,881	0,815	< 0,690
 266	0,952	0,896	0,826	0,729
 267	< 0,922	0,882	0,694	< 0,690
 270	0,949	0,916	0,839	0,767
 271	0,946	0,918	0,826	0,767
 272	0,932	0,903	< 0,765	0,691

Table 16. The 14 candidates obtained from the commercial database using **234** as template.

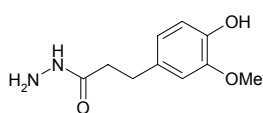
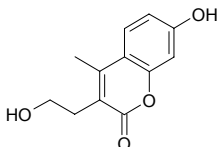
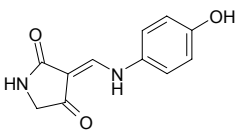
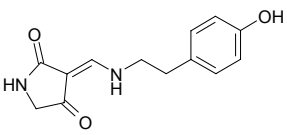
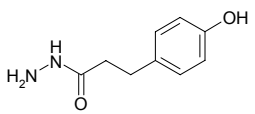
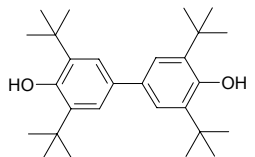
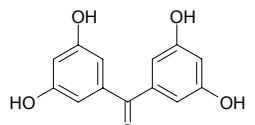
Compound	SI Carbó Sum	SI Hogdkin Sum	SI Carbó Product	SI Hogdkin Product
 274	0,940	0,905	0,780	0,697
 277	0,922	0,833	0,775	0,702
 278	< 0,922	< 0,881	0,782	0,716
 279	< 0,922	< 0,881	0,768	0,713
 280	0,935	0,908	0,851	0,794
 281	0,929	< 0,881	0,784	< 0,690
 282	< 0,922	< 0,881	0,771	0,725

Table 16. The 14 candidates obtained from the commercial database using **234** as template.

The next step would consist of the performance of a flexible alignment procedure between **234** and compounds **277**, **278**, **279**, **280**, **281** and **282**, since the rest have been analyzed in the previous analysis. Table 17 shows the overlaps obtained for the 6 new candidate molecules and the template **234**. For compound **278** two representative alignments are shown.

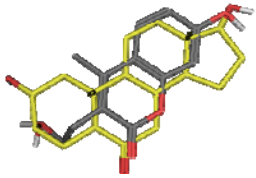
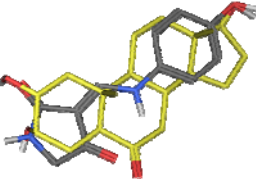
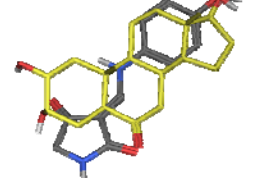
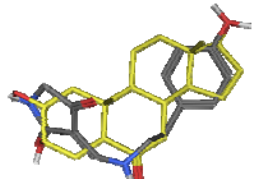
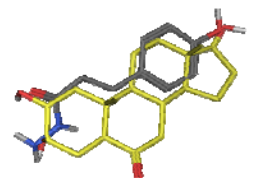
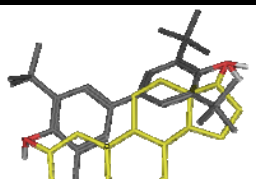
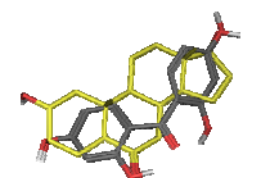
Compound	Alignment	2 α -OH	3 α -OH	Carbonyl	Hydrophobic part
277		No	Yes	Yes	Yes
278 Alignment 1		Yes	Yes	Yes	Yes
278 Alignment 2		Yes	Yes	Yes	Yes
279		Yes	Yes	Yes	Yes
280		Yes	Yes	No	...
281		Yes	No	No	No
282		No	Yes	Yes	Yes

Table 17. Alignments of the candidate compounds of the search made for the commercial compound database, in grey, using **234**, in yellow, as template.

Compounds **278** and **279** show a profile similar to that of **276**, since these compounds possess various functionalities that overlap well with the moieties present in the rings A and B of **234**. Also, the central part of the molecules overlaps well between them.

Compound **281**, a biphenyl, shows a profile similar to that of compounds **265**, **266**, **267**, **273** and **275**. Anyway, in this case, the hydrophobic central part of **281** is larger than that of **234**.

The compounds that seem to be the best candidates are compounds **270**, selected before, **277** and **278**. Chalcone **267** is discarded due to its inappropriate functionalization pattern, since it contains two hydroxyl groups in the aromatic ring where chain **5** would be linked, thus making more difficult its synthesis.

2.4.3.4. List of candidates

Considering the results from the fragment (scaffold) substitution in the *ad hoc* designed and commercial compound databases with SHOP methodology using both templates **233** and **234**, the candidates proposed to be used in the synthesis of the corresponding BR-like compounds, that is, to which the side chain **5** will be linked, are shown in figure 51.

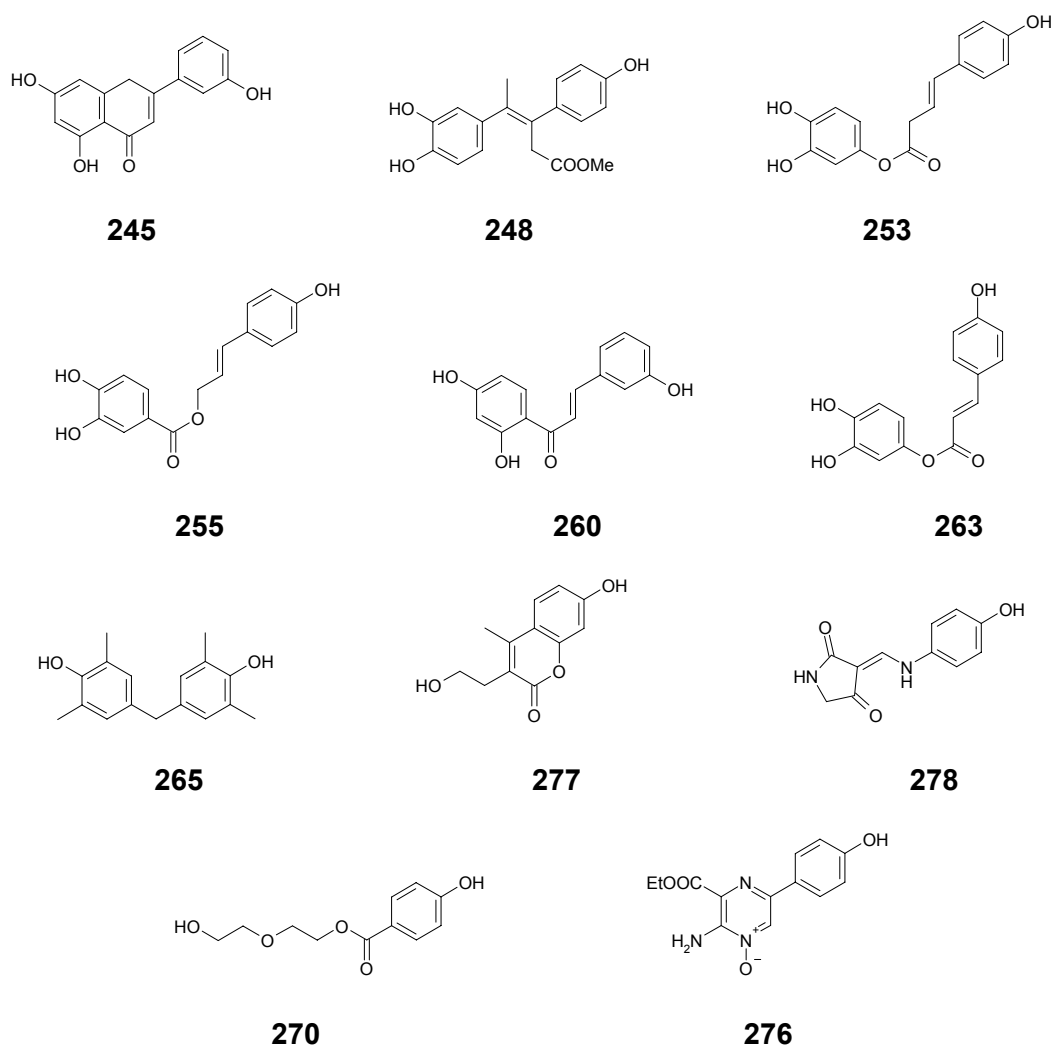


Figure 51. List of the eleven selected compounds in the scaffold hopping search.

Two comments have to be made. In first place, a chalcone, compound **267**, has been found in the commercial compound database, as happened before in the scaffold hopping made with the *ad hoc* designed database, where chalcone **260** was found. Although **267** has been ruled out due to synthetic reasons, this result shows that the methodology is consistent and gives convergent results. Another point in this aspect is that diphenylmethanes have been found in the screening made over the commercial compound database. Some EDCs, compounds that can mimic the activity given by the steroid E₂ (**238**), have a diphenylmethane backbone, as it has been previously indicated. So, the fact that some diphenylmethanes have been found shows that SHOP methodology is consistent.

The synthesis of the corresponding analogues, with the side chain **5** linked to the new skeletons in the hydroxyl group defined previously as anchor point, depends on their structures. So, those compounds with more than one hydroxyl group would require the protection of the rest of the hydroxyl groups. In this sense, compound **265**, with a symmetrical structure, and compounds **276** and **278**, a single hydroxyl group, does not require of a protection step. Moreover, compounds **245**, **248**, **253**, **255**, **260** and **263**, from the *ad hoc* designed database are not commercial and need to be synthesized.

Some preliminary analogues have been tried to synthesize (part 1 chapter 2). Anyway, since this synthetic work was made in parallel to the computational work described, the synthesis of analogues using the ten candidates is not made in this work.

2.4.4. Study of the groups of the *ad hoc* database

Complementarily to the scaffold hopping search performed, it appears interesting to look into which families of compounds of the *ad hoc* designed database have given in general best results than the others. This could give an idea of which kind of compounds are susceptible to mimic better the structures **233** and **234**.

The procedure that will be applied is described as follows. For each one of the 20 families of compounds proposed in the *ad hoc* designed database, the mean and the standard deviation for the compounds of a single family are calculated for the similarity indexes calculated with the Carbó index and the criterion of the sum, considering the two templates: **233** and **234**.

In first place, the calculation is done with the first 500 candidates for both lists. Table 18 shows the results obtained. Figure 52 shows the graphical representation of this data.

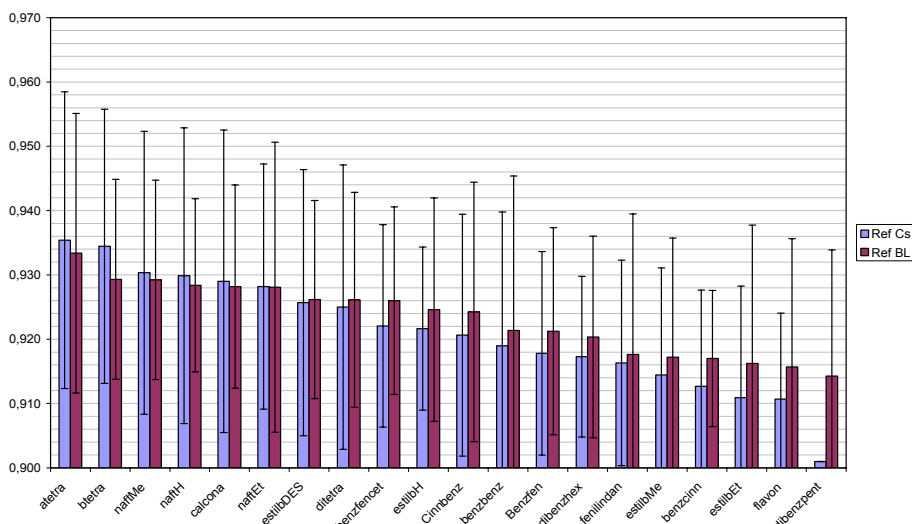


Figure 52. Graphical representation of the results of table 17.

Family	Mean	SD	Ranking 233	Family	Mean	SD	Ranking 234
ditetra	0,933	0,022	1	atetra	0,935	0,023	1
Cinnbenz	0,929	0,016	2	btetra	0,934	0,021	2
atetra	0,929	0,015	3	naftMe	0,930	0,022	3
btetra	0,928	0,013	4	naftH	0,930	0,023	4
naftMe	0,928	0,016	5	calcona	0,929	0,024	5
estilbDES	0,928	0,023	6	naftEt	0,928	0,019	6
naftEt	0,926	0,015	7	estilbDES	0,926	0,021	7
calcona	0,926	0,017	8	ditetra	0,925	0,022	8
dibenzhex	0,926	0,015	9	benzfencet	0,922	0,016	9
benzfencet	0,925	0,017	10	estilbH	0,922	0,013	10
phenylindan	0,924	0,020	11	Cinnbenz	0,921	0,019	11
benzcinn	0,921	0,024	12	benzbenz	0,919	0,021	12
benzbenz	0,921	0,016	13	Benzfen	0,918	0,016	13
estilbMe	0,920	0,016	14	dibenzhex	0,917	0,012	14
Benzfen	0,918	0,022	15	phenylindan	0,916	0,016	15
flavon	0,917	0,019	16	estilbMe	0,914	0,017	16
naftH	0,917	0,011	17	benzcinn	0,913	0,015	17
dibenzpent	0,916	0,021	18	estilbEt	0,911	0,017	18
estilbH	0,916	0,020	19	flavon	0,911	0,013	19
estilbEt	0,914	0,020	20	dibenzpent	0,901	0,000	20

 Table 18. Mean and SD (standard deviation) of the similarity indexes obtained for the whole compounds of a family of the *ad hoc* designed database for templates 233 and 234.

As seen, the high dispersion of the data does not allow a good comparison between the families. This means that, as expected, the convenience of each family of compound is intimately linked to the substitution pattern. Trying to get results with less dispersion, the calculation is intended to be done using one the 100 best compounds in

the ranking respect to template. **234** is arbitrarily chosen. To make sure that the compound number 100 on the list, btetra16_1, with a SI of Carbó of 0.940, is good enough, it is overlapped with **234**. Since the overlapping is good, compounds with a similarity index higher than 0.940 are selected to perform this analysis. Means and standard deviations (SD) are calculated again. In the first 100 ranked compounds, only 17 families are present. Table 19 and figure 53 show the results of this calculation.

Ranking	Family	Mean	SD
1	calcona	0,960	0,016
2	Cinnbenz	0,956	0,008
3	ditetra	0,955	0,010
4	benzbenz	0,953	0,007
5	atetra	0,953	0,010
6	estilbEt	0,953	0,002
7	estilbDES	0,952	0,007
8	btetra	0,952	0,008
9	naftMe	0,950	0,007
10	naftH	0,949	0,008
11	naftEt	0,948	0,006
12	Benzfen	0,945	0,003
13	estilbH	0,945	0,004
14	estilbMe	0,944	0,001
15	benzfencet	0,943	0,003
16	benzcinn	0,943	-
17	dibenzhex	0,941	-

Table 19. Mean and SD (standard deviation) of the similarity indexes obtained for the 100 best ranked compounds of the *ad hoc* designed database for templates **234**.

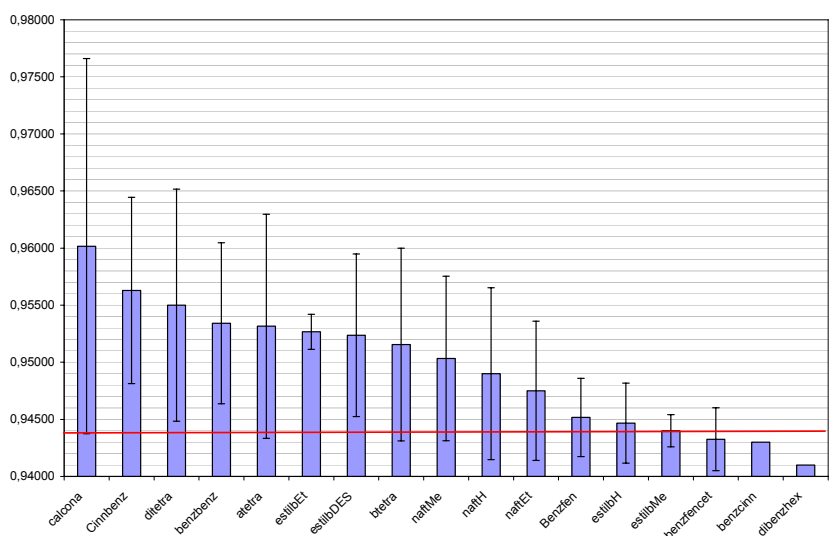


Figure 53. Graphical representation of the results of table 18.

The graphic shows again that the high dispersion of the data does not allow performing a clear ranking of the different families. So, this reinforces the already mentioned idea cited before that there is a close relationship between the hydrocarbon backbone and the substitution pattern for the compounds in the database in order to exhibit a good mimic with **234**. It seems licit to extend this conclusion to the **233** list.

Finally, in order to establish a priority shown for some skeletons respect to the others independently from the substitution pattern, the compound from each family with the highest similarity index is selected on each list obtained with Carbó index calculated with the sum criterion. Table 20 shows the results.

It can be clearly seen that the ranking of the families differs according to the compound taken as reference. In general, the families with good results in common with both structures are atetra, btetra, ditetra, estilbDES and Cinnbenz. These results are more similar to that obtained in the screening process. So, the results of this study complement the results obtained in the screening process but do not offer any additional information.

Ranking	234 list		233 list	
	Family	SI	Family	SI
1	calcona14	0,979	estilbDES13	0,971
2	atetra19	0,975	estilbMe12	0,970
3	benzbenz1	0,965	ditetra19	0,967
4	Cinnbenz5	0,965	btetra19	0,965
5	ditetra14	0,963	atetra19	0,964
6	btetra19	0,962	Cinnbenz14	0,963
7	estilbDES12	0,962	naftEt19	0,963
8	naftH17	0,960	naftMe19	0,962
9	naftMe19	0,960	phenylindan19	0,961
10	estilbEt2	0,954	benzcinn19	0,959
11	naftEt19	0,954	Benzfen14	0,956
12	Benzfen6	0,949	dibenzpent26	0,954
13	estilbH9	0,948	benzfencet13	0,953
14	benzfencet13	0,946	naftH19	0,952
15	estilbMe10	0,945	benzbenz20	0,950
17	dibenzhex26	0,941	calcona20	0,948
18	flavon17	0,939	dibenzhex16	0,943
19	phenylindan16	0,937	estilbH13	0,941
20	dibenzpent26	0,901	flavon19	0,935

Table 20. Compounds from each family of the *ad hoc* designed database with the highest similarity index respect to templates **233** and **234**.

CAPÍTOL 2

SÍNTESI

En aquesta part del present treball es planteja sintetitzar nous compostos amb potencial activitat com a promotors del creixement vegetal, prenent com a referència les estratègies i la informació proporcionada en els estudis computacionals descrits en el capítol 1. Tal com s'ha comentat anteriorment, la idea de rerefons sempre és trobar nous compostos amb unes estructures que, sent més assequibles, tan des d'un punt de vista econòmic com sintètic, que les dels BRs derivats de la BL (**1**) i de la CS (**2**), incorporin els requeriments estructurals que a l'Equip s'ha postulat que són necessaris perquè els nous compostos siguin actius. Aquests requeriments, de forma general, es basen en que els noves estructures tinguin funcionalitats o subestructures que puguin mimetitzar els 4 hidroxils, el carbonil i l'extrem hidrofòbic de la cadena lateral de **1** i **2**, els BRs més actius.

Amb aquesta idea de base, a l'Equip s'han plantejat diverses estratègies per obtenir nous anàlegs.^{49,50,102} En aquest projecte, a nivell de síntesi, s'ha treballat en una línia de recerca, seguint el plantejament descrit a l'apartat 2.4 del capítol 1, per abordar l'obtenció de compostos que substitueixin l'esquelet esteroïdal dels compostos **6** i **7** per noves estructures.

Per l'altra banda, en l'àmbit d'acció de futurs treballs, es proposa la síntesi de derivats dels compostos **207**, **209**, **210**, **211**, **215**, **224** i **225**, estructures que ha rendit els valor d'activitat més alts en el RLIT de les proposades com a candidates en els *virtual screenings* realitzats amb un model QSAR elaborat amb descriptors GRIND (apartat 2.2 del capítol 1) i amb la metodologia FLAP (apartat 2.3 del capítol 1). Els derivats d'aquests compostos permetran aprofundir en el coneixement dels requisits biofòrics que expliquen la seva activitat biològica, permetent així el disseny racional de nous anàlegs

1. Substitució de l'esquelet esteroïdal dels compostos 6 i 7

Tal i com s'ha comentat a la Introducció d'aquest treball, una de les fites més importants en la línia de recerca de BRs androstànics establerta a la Secció d'Esteroides del IQS va ser el disseny⁴⁹ i obtenció⁵⁰ del compostos **6** i **7**, que van presentar una considerable activitat de 1.70 i de 1.06 respectivament, en el RLIT.

Aquest compost pertany a la família dels anomenats BRs androstànics, és a dir, compostos que presenten un esquelet androstànic, pertinentment funcionalitzat, amb un hidroxil en la posició 17 β on hi ha unit per esterificació una grup acil, que pretén mimetitzar la cadena lateral de la BL (**1**) i de la CS (**2**). La cadena de **6** i **7** comprèn aquelles requeriments estructurals que s'havien postulat com a necessaris per obtenir brassinoesteroides androstànics actius: una funcionalitat polar en la posició α del carbonil i un extrem hidrofòbic.⁵²

Allò que fa especialment interessant els composts **6** i **7** és que la seva cadena lateral, l'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (**5**), és comercialment assequible. Va ser trobada a través de la metodologia SHOP,⁴⁶ aplicada sobre bases de dades d'àcids carboxílics comercials.⁴⁹ Donat el seu alt valor d'activitat biològica, i que la cadena lateral és assequible comercialment, es decideix prendre **6** i **7** com a compost de referència dins de la família dels anàlegs androstànics pel disseny de futurs anàlegs. En aquest sentit, en aquesta tesi es planteja, prenent com a referència l'estructura **6** i **7**, trobar un compost comercialment assequible que pugui mimetitzar l'esquelet androstànic de **6** i **7** i obtenir així un compost actiu, de la mateixa manera com s'ha fet amb a cadena lateral de **1** i de **2**. L'elecció de la nova estructura es pretén fer mitjançant la metodologia SHOP sobre dues bases de dades creades amb dos criteris diferents: un

de sistemàtic emprant bases de dades d'alcohols comercials i un de racional "inspirat" en anàlegs no esteroïdals de l'estradiol (E_2) (**238**).

Mentre l'estudi computacional s'estava duent a terme, amb la mateixa idea es va decidir, a nivell preliminar plantejar la síntesi d'estructures que incorporessin esquelets que poguessin mimetitzar els esquelet esteroïdals de **6** i **7**. Aquestes estructures es van plantejar buscant, amb el criteri de la família de disruptors endocrins en ment, estructures que fossin assequibles sintèticament o comercialment, i que oferissin bons requeriments estructurals perquè fossin susceptibles de poder ser actives. Aquestes estructures, tot i que no han donat els millors resultats quan la metodologia SHOP va ser aplicada, ofereixen alineaments acceptables amb la BL (**1**). Els tres compostos plantejats (**283**, **284** i **285**) i el seu solapament amb **1** es mostren a la figura 54.

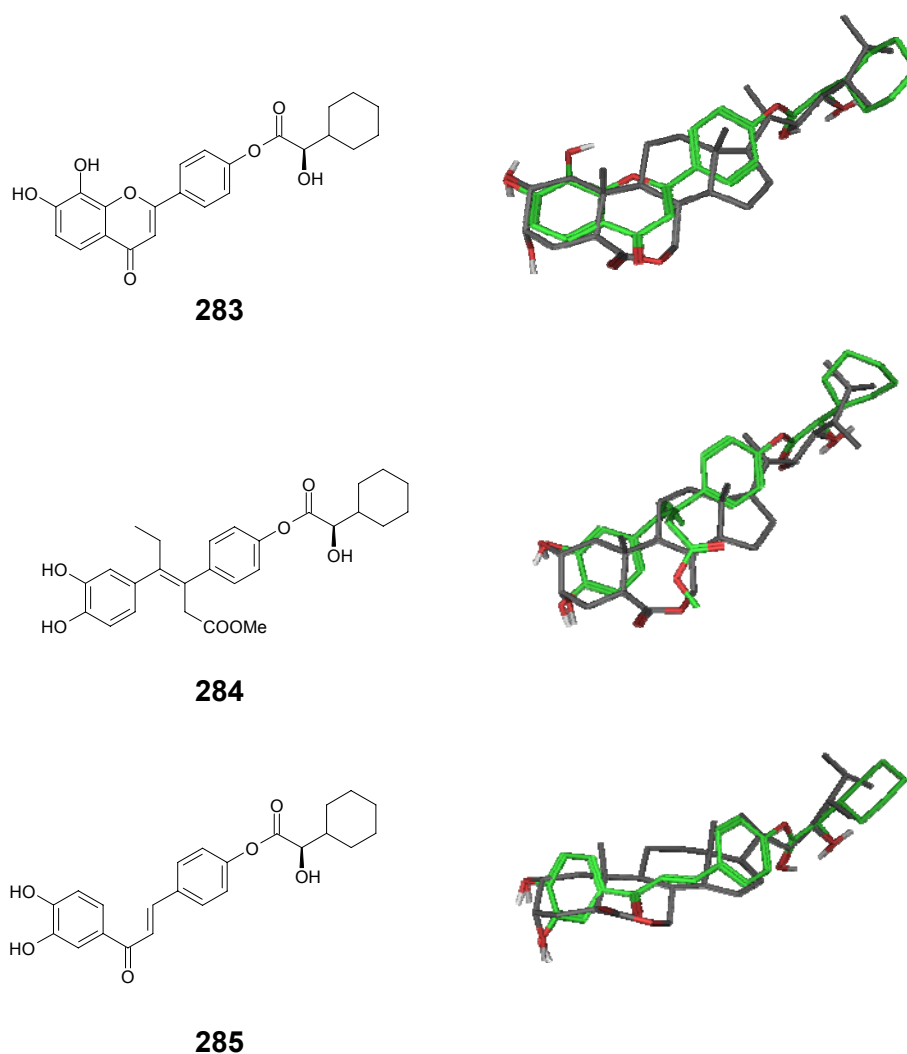


Figura 54. Alineaments de **283**, **284** i **285**, en verd, amb la BL (**1**), en gris

La síntesi preliminar d'aquestes estructures ha permès fer-les servir com a banc de proves per trobar condicions de reacció i grups protectors addients per a ser emprats de forma sistemàtica en la síntesi futura d'altres anàlegs del mateix tipus. En aquest sentit cal remarcar que les síntesis han estat dutes a terme de forma paral·lela i que, per això, no es dona una continuïtat entre elles.

2. Intent de síntesi del compost 283

L'estructura flavonoïdea **286** va ser escollida com a la més adient després de fer una cerca sobre una base de dades de flavones comercials (figura 55). En aquest sentit, seguint la idea citada anteriorment, es pretén que els hidroxils en les posicions C7 i C8 de **283** mimetitzin els de C2 i C3 de la BL (**1**), el carbonil en C4 de **283**, el carbonil en C6 de **1** i l'hidroxil en C4' de **283**, l'hidroxil en 23R de **1**.

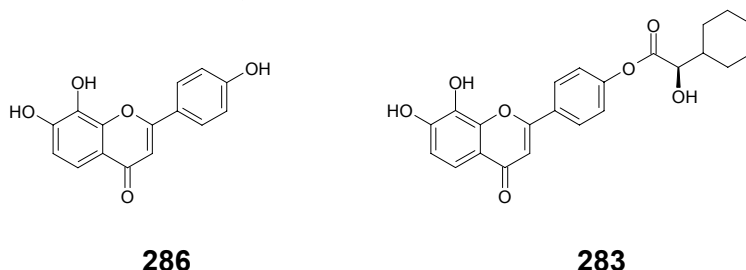


Figura 55. Compostos **283** i **286**.

L'estratègia sintètica del compost **283** es basa en protegir els hidroxils C7 i C8 de **286** i l'hidroxil de **5**, unir per esterificació les dues unitats estructurals i desprotegir els hidroxils. Es creu convenient, a priori, escollir grups protectors per tots els hidroxils de tal manera que es desprotegeixin sota les mateixes condicions en una sola etapa. Un des grups que es creu més addient són els grup benzil, per l'hidroxil de la cadena, i l'acetal difenilmetilènic, pels hidroxils en 7 i 8 de l'esquelet de flavona. Ambdós grups es desprotegeixen en condicions d'hidrogenòlisi ($H_2/Pd(C)$). Aquestes condicions es creu que són suaus i selectives per deixar inalterada la resta de la molècula. A la literatura hi ha descrit el seu ús en compostos que integren l'esquelet de flavona en la seva estructura,^{134,135} així com funcionalitats del tipus α -hidroxiester arílic.¹³⁶

L'estratègia sintètica global que es proposa es mostra a la figura 56.

2.1. Protecció de la cadena lateral

Es vol protegir l'hidroxil de l'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (**5**) com a èter benzílic deixant l'àcid carboxílic inalterat per procedir a la posterior esterificació amb l'esquelet flavonoide.

2.1.1. Intent de protecció selectiva de l'hidroxil de **5**

Normalment, els procediments de protecció de l'hidroxil de α -hidroxiàcids impliquen la protecció prèvia de l'àcid carboxílic i la posterior desprotecció. Per tant, les metodiques que suposen una protecció directa de l'hidroxil sense haver de protegir l'àcid prèviament són d'especial interès, doncs suposen l'estalvi de dos passos de síntesi (figura 57).

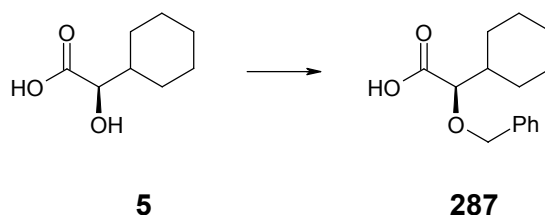


Figura 57. Síntesi de **287** a partir de **5** amb un sol pas de síntesi.

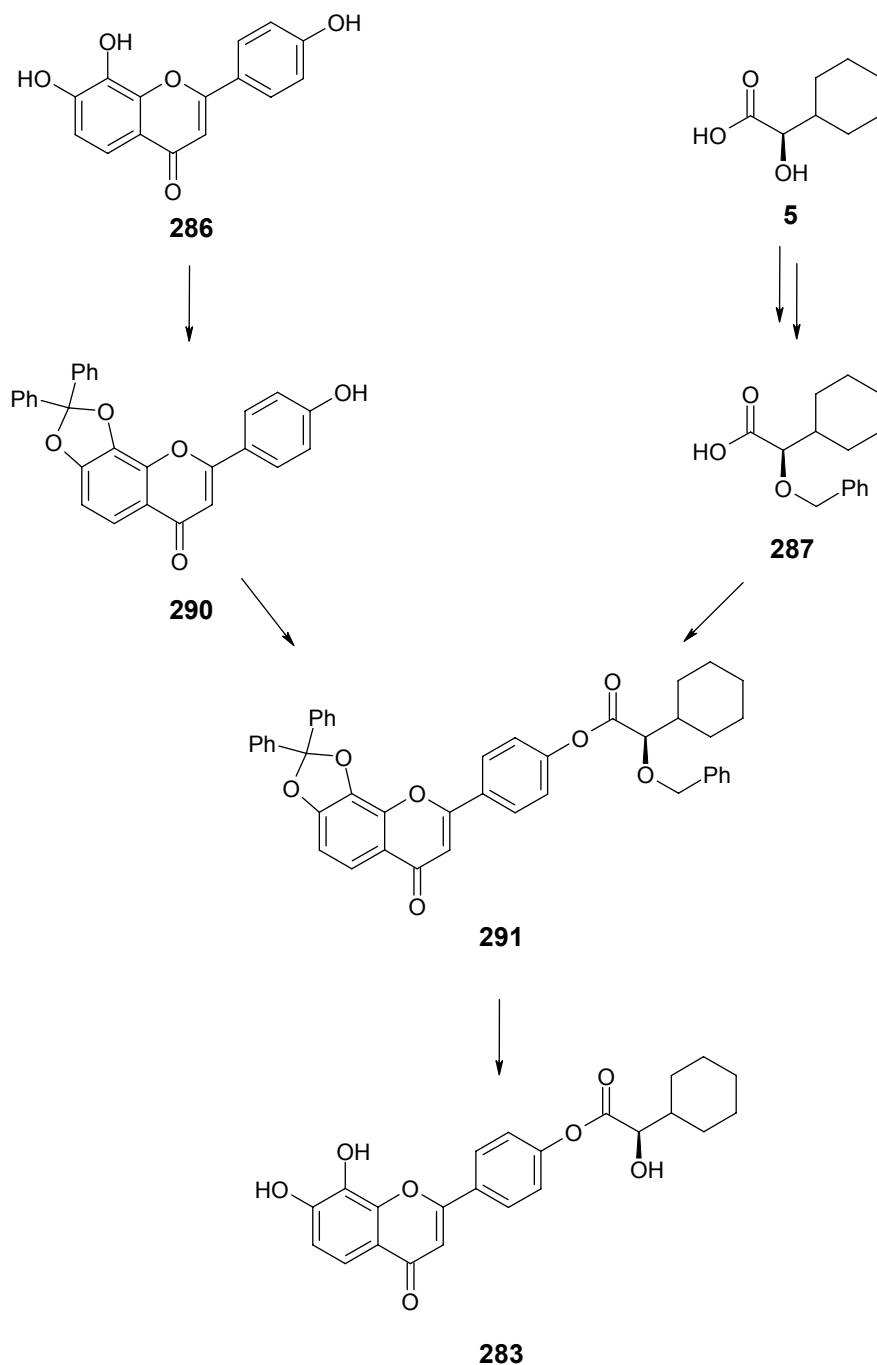


Figura 56. Estratègia sintètica plantejada per obtenir **283**.

Hon *et al.*¹³⁷ descriuen la protecció selectiva de l'hidroxil d'un α -hidroxiàcid com a èter benzílic mitjançant el mètode de Williamson, tractant el compost d'interès amb bromur de benzil i hidrur sòdic en THF. Aquest procediment s'aplica a **5**, però no s'obté el producte desitjat **287**.

Així, cal buscar altres mètodes per benzilar l'hidroxil de **5**. Anteriorment en l'Equip, els 2,2,2-tricloroacetimidats d'aril van ser emprats amb èxit en la protecció d'hidroxis com a èters arílics.⁴⁹ Aquest procediment requereix de la protecció prèvia de l'àcid carboxílic de **5**. Per tant, es decideix procedir a la benzilació de l'hidroxil de **5** amb la prèvia protecció de l'àcid carboxílic com a ester metílic (figura 58).

2.1.2. Síntesi d'àcid (*R*)-2-benziloxi-2-ciclohexilacètic (**287**)

La síntesi de (*R*)-hexahidromandelat de metil (**288**) es duu a terme amb el procediment descrit per Dubost *et al.*,¹³⁸ segons el qual **5** es tracta amb clorur de tionil en medi MeOH. S'obté **288** amb un rendiment del 89%. L'obtenció de **289** s'aconsegueix seguint el procediment descrit per Dubost *et al.*¹³⁸ en el qual **288** es tracta amb 2,2,2-tricloroacetimidat de benzil i àcid trifluorometansulfònic en medi DCM/hexà. S'obté **289** amb un rendiment del 91%. La desprotecció de l'àcid de **289** es duu a terme amb hidròxid de potassi en medi EtOH/aigua, seguint el procediment descrit per Kato *et al.*¹³⁹ S'obté **287** amb un rendiment del 91% (figura 58).

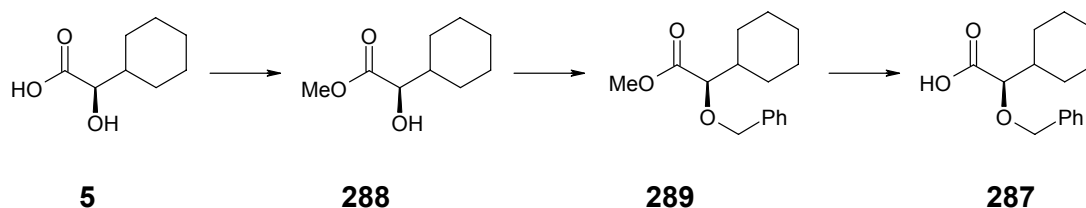


Figura 58. Síntesi de **287** a partir de **5** amb tres pas de síntesi emprant **288** i **289** com a intermedis sintètics.

2.2. Protecció de l'esquelet

Per protegir **286**, i obtenir així **290** (figura 59), es segueix el procediment descrit per Bengtsson *et al.*,¹⁴⁰ segons el qual el compost amb dos hidroxils aromàtics en *orto* es tracta amb α,α' -diclorodifenilmetà sense dissolvent a 170 °C durant 15 min sota atmosfera inerta. Aquest procediment ha estat aplicat en la protecció d'hidroxils en *orto* de flavones.^{141,142}

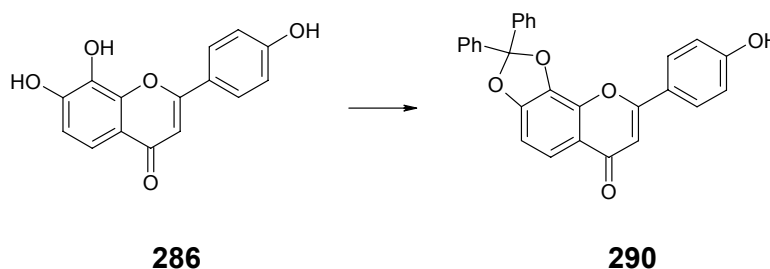


Figura 59. Síntesi de **290** a partir de **286**.

Aplicant aquest procediment sobre **286** s'obté, després de 10 min, **290** amb un rendiment del 93%. En el procés de purificació, cal realitzar un rentat amb acetona del sòlid format per separar correctament **286** de **290**.

2.3. Síntesi del compost 291

Es procedeix a l'esterificació entre el compost **290** i **287** per obtenir l'ester **291** (figura 60).

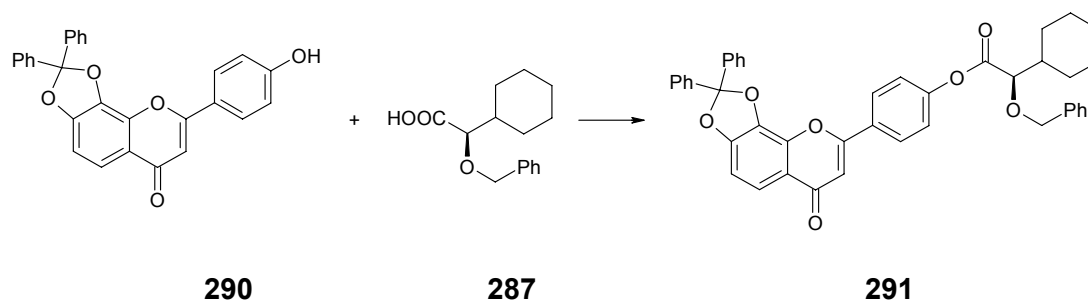


Figura 60. Síntesi de **291** a partir de **287** i de **290**.

2.3.1. Intent de síntesi del compost **291** pel mètode de Yamaguchi

Un dels mètodes d'esterificació que més bons resultats ha donat en l'Equip és el mètode de Yamaguchi,^{49,122,143} tot i que no ha estat emprat en la síntesi d'ester arílics. Aquest mètode consta de dos passos. En el primer, té lloc la formació d'un anhídrid mixt entre l'àcid d'interès i clorur de 2,4,6-triclorobenzoil amb TEA en THF. En el segon pas, l'anhídrid mixt format es tracta amb l'alcohol d'interès en presència de DMAP com a catalitzador de transferència de grups acil,¹⁴⁴ en toluè o DCM. Els rendiments obtinguts han variat segons els substrats emprats, però generalment han estat de l'ordre del 50-60 %.^{49,50}

No tots els mètodes de síntesi disponibles permeten obtenir esters arílics. Així, en primer lloc, per comprovar l'adequació del mètode de Yamaguchi en la síntesi de **291**, es va assajar aquesta metodologia en la síntesi de propionat de fenil. Es va obtenir el producte d'interès amb un rendiment del 60%, fet que indica que aquest mètode és apte per a la síntesi de compostos amb aquest tipus de funcionalitats.

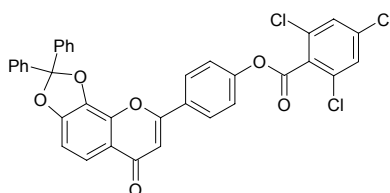
Ara bé, l'aplicació del mètode de Yamaguchi en la síntesi de **291** es veu restringida pel fet que **290** és insoluble en els dissolvents en els quals s'ha descrit¹⁴³ que és més idoni efectuar el segon pas de la reacció: toluè, 1,4-dioxà, py i DCM. Tampoc és soluble en CHCl_3 , AcOEt, ACN, aigua i acetona. Ara bé, **291** és soluble en THF a una concentració de 10 mg/ml.

Tot i així, la reacció s'assaja emprant toluè en el segon pas. Després del procés de purificació, s'obté una mescla on s'identifica **291**, amb un rendiment aproximat del 10%, barrejat amb un altre compost no identificat, del qual no ha estat possible separar.

Cal recordar que un dels objectius en la síntesi de **283** era trobar condicions de reacció per fer aplicable aquesta via sintètica a altres futurs anàlegs. Per tant, cal trobar condicions de reacció que permetin obtenir l'ester d'interès amb rendiments acceptables.

En un nou intent, s'empra piridina en el segon pas de la reacció. En aquest dissolvent **290** és insoluble, però és un dels dissolvents més idonis per aplicar el mètode de Yamaguchi. Es forma un cru complex en el qual sembla que s'identifica una petita quantitat del producte d'interès. Ara bé, aquest tampoc no es pot arribar a purificar.

Tot i que no és el dissolvent adequat, s'assaja l'ús de THF en el segon pas de síntesi. El cru de reacció és més net que en el cas anterior. Ara bé, majoritàriament es detecta el compost **292** (figura 61) i no es detecta el producte d'interès en el cru que es forma.

Figura 61. Compost **292**

Donats els resultats negatius obtinguts en assajar el procediment de Yamaguchi en la síntesi de **291**, es decideix assajar nous mètodes d'esterificació que puguin ser efectuats pertinentment en THF.

2.3.2. Intent de síntesi del compost **291** pel mètode de Steglich

El mètode d'esterificació de Steglich¹⁴⁵ (DCC/DMAP) es basa en l'activació de l'àcid carboxílic amb N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) formant una O-acilurea. Tot seguit, el grup acil de l'àcid carboxílic és captat per la N,N'-4-dimetilaminopiridina (DMAP), afavorint l'atac de l'alcohol. Si l'atac de la DMAP no es dona amb rapidesa, degut a possibles impediments estèrics, o no té lloc a temperatures inferiors a 5 °C, entre d'altres causes, l'intermedi O-acilurea evoluciona a N-acilurea, compost que no rendeix l'ester d'interès. Per tant, és important que la formació de N-acilurees no s'indueixi, buscant condicions de reacció adequades (figura 62).

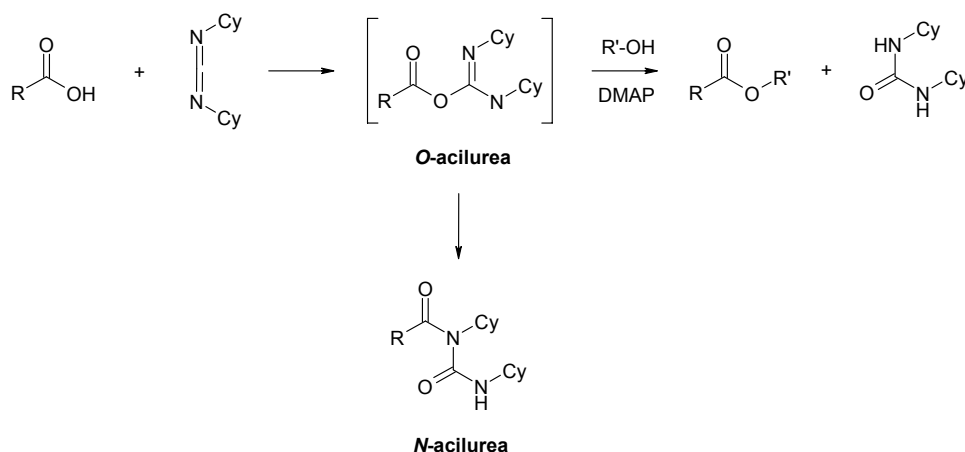


Figura 62. Mecanisme de la reacció d'esterificació de Steglich

Tot i que anteriorment en l'Equip havia donat problemes de baixos rendiments deguts a la formació de subproductes,¹⁴⁶ la possibilitat de realitzar aquesta reacció en THF en la síntesi d'esters arílics fa interessant assajar-la.¹⁴⁷

En primer lloc, i tal com es va fer en el mètode de Yamaguchi, es decideix assajar aquesta reacció en la síntesi de propionat de fenil per comprovar si aquesta reacció és adequada en la síntesi d'esters arílics. Aquest s'obté amb un rendiment del 53%, fet que indica que aquest mètode és també vàlid per a la síntesi d'aquest tipus de compostos.

En una primera prova, **290** i **287** es dissolen en THF i es tracten amb DCC i DMAP a t.a.. Durant la reacció es van addicionant quantitats sobreestoequiomètriques de DCC, fins a un total de 3.5 eq, per intentar afavorir l'avenç de la reacció. Malauradament, es

forma un cru complex amb nombrosos subproductes on no es detecta el producte d'interès.

Es decideix repetir aquesta reacció en les mateixes condicions amb la mateixa estequiometria amb la que es va dur a terme la síntesi de propionat de fenil amb el mètode de Steglich, és a dir, DCC:DMAP (1:0.4). Es torna a formar un cru complex en el que no es detecta el producte d'interès.

Es creu que una de les causes d'aquests resultats pot ser l'evolució de les O-acilurees, que es formen com a intermedi de reacció, a N-acilurees, compostos que no evolucionen cap a l'ester d'interès. Una de les causes que poden motivar aquesta transposició és la temperatura. Així, es decideix repetir la reacció a 0 °C amb l'esteiquimètria del segon assaig.

Es repeteix la reacció afegint lentament el DCC sobre una dissolució de **290**, **287** i DMAP, refredada a 0 °C. Després de 7 dies de reacció, s'obté un cru complex on no es detecta el producte d'interès.

Així, finalment es desestima el mètode de Steglich per a procedir a la síntesi de **291**.

2.3.3. Intent de síntesi del compost **291** amb 1,1'-carbonildiimidazole (CDI)

El CDI és un agent activador d'àcids carboxílics emprat tant en la síntesi d'esters¹⁴⁸ com en la d'amides.¹⁴⁹ El mecanisme de reacció es basa en la formació d'una imidazolidina entre l'àcid carboxílic d'interès i el CDI, activant així el grup acil per a un posterior alcoholisi o aminòlisi (figura 63). En el cas de la síntesi d'esters, la segona etapa requereix calor per a que tingui lloc.¹⁵⁰

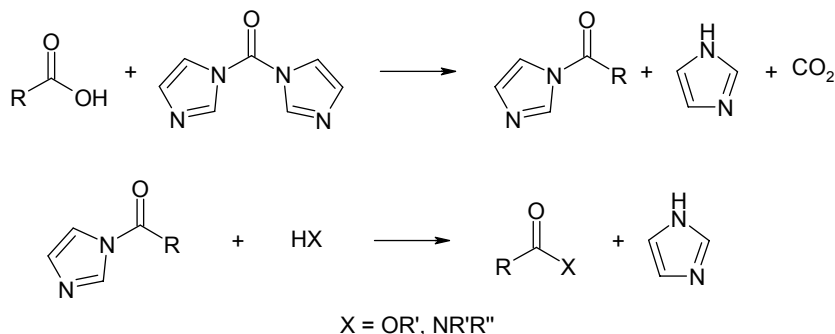


Figura 63. Mecanisme de la reacció d'esterificació emprant CDI

Achatz *et al.*¹⁵¹ descriuen l'esterificació directa d'un α -hidroxiàcid amb fenol fent servir 1,1'-carbonildiimidazole (CDI) (figura 64).

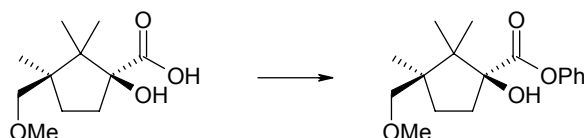


Figura 64. Reacció d'esterificació directa amb CDI descrita per Achatz *et al.*

Prèviament a l'intent de síntesi de **291**, es decideix assajar la reacció de **5** amb fenol per rendir (**293**) (figura 65) amb les condicions emprades per Achatz *et al.*¹⁵¹ Així, **5** es tracten amb CDI en THF a t.a. durant 17 h, i, a continuació, s'afegeix fenol al sistema,

que s'escalfa a reflux durant 5 dies. Ara bé, no s'observa evolució dels reactius de partida. La reacció es repeteix, realitzant la primer etapa de la reacció escalfant a reflux, però, de nou, no s'observa evolució dels reactius de partida. Així, es descarta l'aplicació del mètode d'esterificació amb CDI.

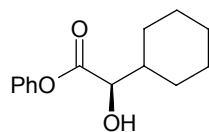


Figura 65. Compost **293**.

2.3.4. Esterificació via clorur d'acil

La reacció entre clorurs d'acil i hidroxils és un dels millors mètodes per la síntesi d'esters. Ara bé, aquesta reacció es troba restringida per l'obtenció del clorur d'acil de l'àcid que es vulgui esterificar. Després d'una intensa recerca bibliogràfica, es va trobar un mètode que permetia obtenir clorurs d'acil en condicions suaus, emprant diclorur d'oxalil i DMF en DCM.¹⁵² Posteriorment, el clorur d'acil i l'alcohol es tracten amb TEA en THF a t.a..

Aquest mètode va ser aplicat en la síntesi de **291** a partir de **290** i de **287**, rendint satisfactòriament el producte desitjat. Es va observar que l'addició d'una quantitat catalítica de DMAP en el segon pas de la reacció n'augmentava el rendiment, fins a un 57%. Addicionalment, el cru de reacció era més net que en els assajos realitzats amb el mètode de Yamaguchi i amb DCC/DMAP.

Aquest resultat mostra que aquest mètode d'esterificació sembla adient per a futures síntesis de compostos anàlegs a **283**.

2.4. Intent de síntesi del compost 283

En aquest pas es vol desprotegir els hidroxils en 7 i 8 de l'esquelet flavonoide i l'hidroxil de la cadena lateral de **291** per rendir **283** (figura 66).

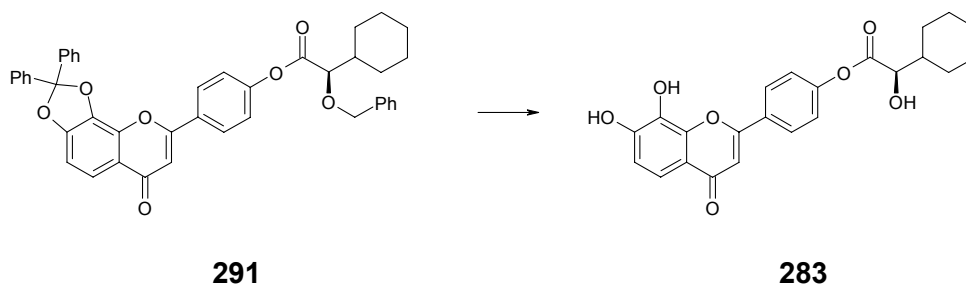


Figura 66. Reacció d'obtenció de **283** a partir de la hidrogenòlisi de **291**

Tal com s'ha comentat anteriorment, els grups protectors de **291** es poden desprotegir en condicions d'hidrogenòlisi, en les quals el compost d'interès es tracta amb H₂ i pal·ladi suportat sobre carbó actiu (Pd/C) al 10%.^{153,154}

En primer lloc, com a prova, es realitza la desprotecció per hidrogenòlisi de **290**, amb Pd/C 10% i amb una pressió de H₂ de 1 atm en THF, rendint **286** amb el 90% (figura 67).

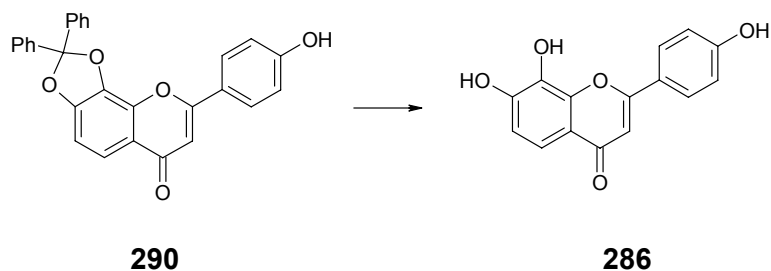


Figura 67. Reacció d'obtenció de **286** a partir de la hidrogenòlisi de **290**

Per tant, aquest mètode sembla adient per procedir a la síntesi **283**. Pel que fa a la funcionalitat que no s'ha considerat en la prova realitzada, la cadena lateral amb l'hidroxil protegit com a èter benzílic, cal esmentar que hi ha una referència bibliogràfica en la qual es descriu la síntesi de lactat de fenil a partir de la hidrogenòlisi del compost amb l'hidroxil protegit com a èter benzílic amb una pressió d'hidrogen de 2.8 atm sobre Pd/C,¹³⁶ fet pel qual es considera que les condicions d'hidrogenòlisi aplicades sobre **290** seran en principi vàlides per desprotegir totalment **291**.

Així, s'intenta desprotegir per hidrogenòlisi **291** per obtenir **283** amb una pressió de 1 atm. En una primera prova, fins a les 4h de reacció no s'observa l'aparició de productes. La reacció es deixa evolucionar fins a 19 h, quan la conversió del reactiu ha estat total. Ara bé, en aquest cas, s'obté un cru complex en el que no s'observa producte d'interès i en el que la conversió ha estat total. Es decideix realitzar una segona prova, en la qual el producte es deixa evolucionar menys temps, intentant controlar que no hi hagi una gran aparició de subproductes, encara que es detecti producte de partida en el cru. Sota aquest criteri, la reacció s'atura a les 8 h. Per CCF, es detecten els mateixos subproductes que en la primera prova, però amb una quantitat menor relativa al producte de partida. En el cru tampoc es detecta producte d'interès.

Essent la desprotecció per hidrogenòlisi l'únic mètode que està descrit bibliogràficament per desprotegir de forma suau, sense haver de recórrer a un medi aquós àcid, les funcionalitats protegides de **291**, i havent fallat aquesta, es decideix descartar l'ús dels grups protectors èter benzílic i acetal difenilmetilènic en la síntesi de futurs anàlegs. Per altra banda, la síntesi del compost **283** es considera interessant donat que el seu esquelet de flavona és comercial i que presenta característiques farmacofòriques que semblen adequades perquè aquest compost pugui desenvolupar activitat com a promotor del creixement vegetal. Tal com s'ha comentat, en aquest treball es va estar assajant la síntesi de varies estructures a la vegada, fet pel qual, de moment no es segueix amb la síntesi de **283**. Així, es deixa per futurs treball l'assaig d'altres grups protectors per assolir la síntesi d'aquest compost.

3. Intent de síntesi del compost 284

Una de les estructures que presenten interès per obtenir nous compostos amb activitat brassinoesteroides amb un esquelet no esteroidal és el compost **284** (figura 68). Tal com s'ha descrit a l'apartat 2.3 del capítol 1, la proposta de síntesi d'aquest compost es basa en l'aproximació de substituir l'esquelet esteroidal dels compostos **6** i **7** per una estructura més assequible sintèticament i que pugui complir els requisits farmacofòrics propis de **233** i **234**.

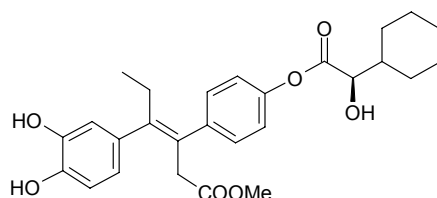


Figura 68. Compost **284**.

Com tots els anàlegs que es dissenyen sota aquesta aproximació, la síntesi del compost **284** es realitza per esterificació de la cadena **5** amb l'esquelet estilbènic **294**, amb els hidroxils pertinents dels dos compostos protegits adequadament. L'estratègia sintètica general, sense considerar les etapes de protecció i desprotecció dels hidroxils pertinents, es mostra a la figura 69.

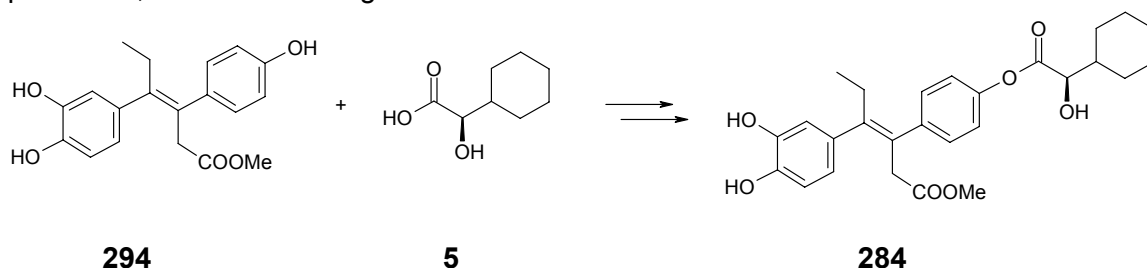


Figura 69. Estratègia sintètica general proposada per obtenir el compost **284**.

El compost **294** no és disponible comercialment. La seva síntesi es planteja a través de la formació del doble enllaç central per l'acoblament de dues estructures carboníliques mitjançant la reacció de McMurry.¹⁵⁵ En la literatura es descriu com aquest mètode va ser emprat en la síntesi del compost estilbènic **295** a partir dels sintons **296** i **297** (figura 70).¹²⁶

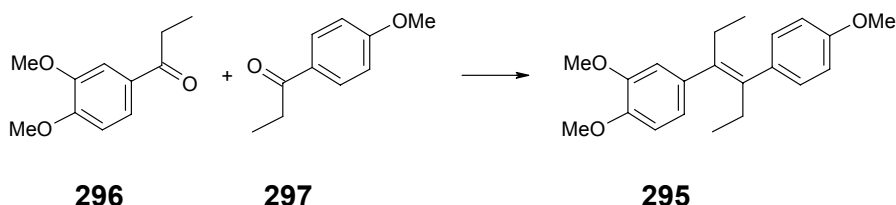


Figura 70. Síntesi del compost **295** a través de l'acoblament de McMurry de les estructures **296** i **297**.

Així, per analogia amb la reacció anterior, es proposa l'estratègia sintètica mostrada a la figura 71 per obtenir el compost **294** a partir de l'acoblament mixte de les estructures **298** i **299**.

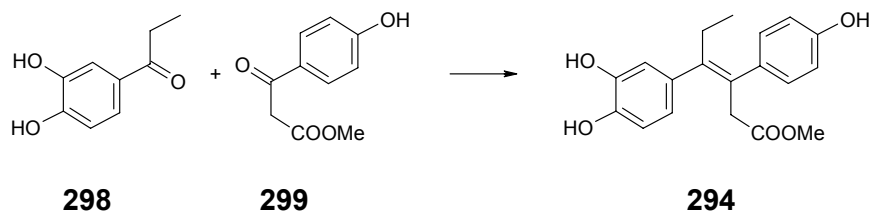


Figura 71. Proposta de síntesi del compost **294** a través de l'acoblament de McMurry de les estructures **298** i **299**.

La reacció de McMurry fa servir reactius de Ti de baixa valència, obtinguts a partir de la reducció de TiCl_3 o de TiCl_4 amb Zn, Mg, el parell Zn/Cu, K, Li o H_4LiAl .¹⁵⁵ De tots ells, la combinació $\text{TiCl}_3/\text{Zn-Cu}$ és la més reactiva, la més reproducible i la més emprada.¹⁵⁵ El mecanisme que es proposa es detalla a la figura 72.¹⁵⁵

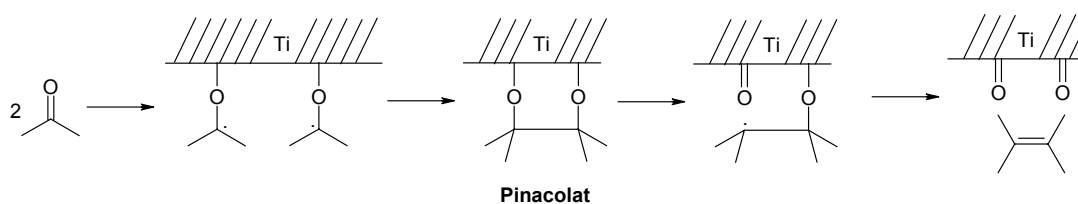


Figura 72. Mecanisme de la reacció de McMurry

En primer lloc, es dona la dimerització reductiva dels reactius carbonílics inicials formant un pinacolat. Tot seguit, té lloc la desoxigenació d'aquest intermediari rendint l'alquè corresponent.

La reacció de McMurry és compatible amb la presència d'alcohols,¹⁵⁵ fet a tenir en compte en la síntesi de **294** a partir de **298** i de **299**. Així mateix, s'ha descrit l'aplicació de la reacció de McMurry en l'acoblament de cetones o aldehids en compostos on hi ha present un ester,¹⁵⁶ cosa que en principi la fa compatible per assolir la síntesi de **294**. Per altra banda, també hi ha descrites aplicacions de la reacció de McMurry en casos en els quals el carbonil d'esters dona acoblaments amb cetones rendint èters enòlics.¹⁵⁷ Ara bé, no hi ha descrites aplicacions d'aquesta reacció en les que s'emprin β -cetoesters, com és el cas de **299**, per a realitzar acoblaments a través del carbonil cetònic. Per tant, cal assajar en primer lloc si la reacció de McMurry té aplicabilitat en aquest cas. Així, es planteja la síntesi del compost **300** a partir de l'acoblament mixt de McMurry entre el compost **301** i el compost **302** (figura 73) Tal com s'observa, s'han omès els hidroxils dels compostos **298** i **299** per simplificar aquest estudi.

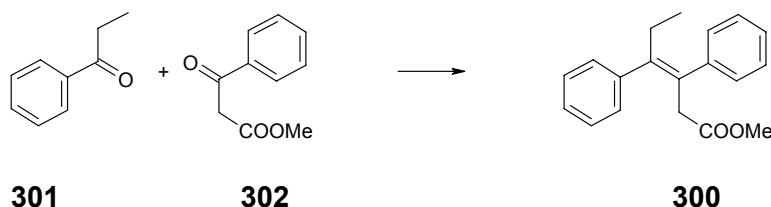


Figura 73. Proposta de síntesi del compost **300** a través de l'acoblament de McMurry de les estructures **301** i **302**.

3.1. Síntesi de benzoïlacetat de metil (302)

El benzoïlacetat de metil (**302**) no és comercialment assequible però si que ho és el benzoïlacetat d'etil (**303**). Es decideix obtenir **302** a través de la transesterificació de **303** amb MeOH (figura 74).

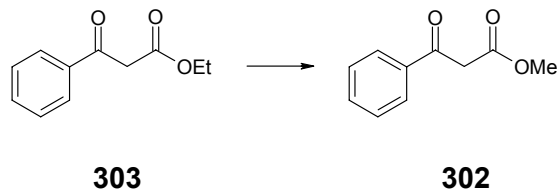


Figura 74. Proposta de síntesi del compost **302** a través de la transesterificació de **303**.

Seguint el procediment descrit per Rappoport *et al.*,¹⁵⁸ **303** es tracta amb MeOH en presència d'àcid sulfúric en quantitat catalítica a reflux durant 20 h. S'obté una mescla en la qual es detecta **302** barrejat amb un altre compost, que, a través de dades espectroscòpiques obtingudes, es creu compatible amb acetofenona. La mescla obtinguda es purifica per destil·lació a pressió reduïda. S'obté **302** amb un rendiment del 58%.

Pel compost **302**, a partir de l'anàlisi de l'espectre de ¹H-RMN realitzat, es detecta la presència de tautomeria ceto-enòlica entre la forma cetònica **302a** i la forma enòlica **302b** (figura 75). La proporció entre **302a** i **302b** en CDCl₃ és de 4:1.

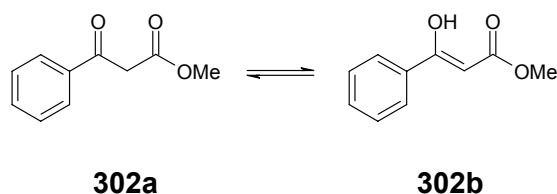


Figura 75. Tautomeria ceto-enòlica del compost **302**.

3.2. Intent de síntesi del compost 300

Es procedeix a la síntesi del compost **300** a través de l'acoblament carbonílic dels compostos **301** i **302** mitjançant la reacció de McMurry (figura 73).

En un primer moment, es segueix el procediment descrit per Castedo *et al.*¹⁵⁶, segons el qual els compostos carbonílics que es volen acoblar es tracten a reflux durant 20 h amb una solució on prèviament s'ha tractat TiCl₃ amb el parell Zn/Cu durant 3 h a reflux. Aquests autors preparen el parell Zn/Cu segons el procediment descrit per McMurry *et al.*¹⁵⁹ A més, realitzen la desactivació, o *quenching*, del pinacolat format en el medi de reacció afegint-hi gel de sílice. L'aplicació d'aquest procediment a la síntesi de **300** rendeix un cru de reacció en el que no s'observa evolució dels productes de partida.

Donat que s'observa que l'aplicació de la reacció de McMurry per la síntesi de **300** no és trivial, per verificar si la reproductibilitat de la reacció és correcta es decideix, abans de res, assajar la síntesi del compost **304** a partir de l'homoacoblament de **301** (figura 76).

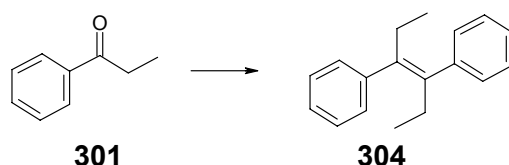


Figura 76. Proposta de síntesi del compost **304** a través de l'homoacoblament de McMurry de l'estructura **301**.

Per altra banda, una de les causes que es creu que han motivat el resultat de la prova anterior és que el parell Zn/Cu no estigués ben format. Es decideix aplicar el procediment de preparació del parell Zn/Cu descrit per Vogel *et al.*,¹⁶⁰ segons el qual aquest es forma *in situ* en el medi de reacció a partir de CuCl i de Zn activat. Així mateix, es fa servir l'estequiometria descrita per Vogel *et al.*,¹⁶⁰ de TiCl₃/Zn/CuCl/**301** de 20:40:4:1. Tot i que aquests autors descriuen l'ús de TiCl₄, en aquesta experiència s'empra TiCl₃, seguint les condicions de reacció descrites per Castedo *et al.*¹⁵⁶ En el cru de reacció tampoc es va observar el producte d'interès.

Un dels punts on es creu que es podria incidir perquè la reacció tingués lloc és l'etapa de desactivació, o *quenching*, del cru de reacció. Així, el procediment anterior es repeteix emprant una dissolució aquosa de K₂CO₃ 10% per realitzar la desactivació del cru de reacció després d'haver deixat evolucionar el sistema a reflux durant 20 h. Novament, en el cru de reacció no s'observa que els reactius hagin evolucionat.

Ja que cap dels mètodes anteriors ha funcionat emprant TiCl₃, es decideix assajar la reacció emprant TiCl₄. Es segueix el procediment descrit per Leimner *et al.*¹⁶¹ segons el qual el compost de Ti de baixa valència es forma mesclant TiCl₄, Zn i py a 0 °C, posteriorment s'addiciona el compost carbonílic a aquesta mescla i, a continuació, el sistema s'escalfa a reflux durant 20 h. La mescla de reacció es desactiva amb una dissolució aquosa de Na₂CO₃ 10%. Tot i que, de nou, no s'observa el producte d'interès, s'observa una evolució dels reactius de partida, fet que motiva incidir en els assajos emprant TiCl₄.

Es decideixen aplicar les condicions de reacció descrites per Vogel *et al.*,¹⁶⁰ segons les quals el compost de titani de baixa valència es prepara pel tractament de TiCl₄ amb Zn i CuCl a reflux durant 3 h. La mescla formada es tracta amb el compost carbonílic durant 20 h a reflux. La mescla de reacció es desactiva amb una dissolució aquosa de K₂CO₃ 10%. Després d'un pas de purificació per cromatografia, s'obté el producte d'interès **304** amb un rendiment del 58%.

Tot seguit, un cop reproduïda la reacció de McMurry a l'equip per l'acoblament simètric de dues cetones, es procedeix a la síntesi del compost **300**. Així, les condicions anteriors s'apliquen per l'acoblament asimètric de **301** i de **302**. El cru de reacció es purifica per cromatografia, i només es detecta majoritàriament **304**, fet que indica que l'acoblament mixt no s'ha donat. Aquest fet implica que l'acoblament d'una cetona es troba més afavorit que el d'un β-cetoester. Això podria indicar que les condicions de reacció trobades no serien aplicables per l'ús de β-cetoesters en l'acoblament de McMurry. Per verificar aquesta afirmació es decideix assajar la síntesi de **305** a partir de **302**.

3.3. Intent de síntesi del compost 305

Es planteja obtenir el compost **305** a través de l'homoacoblament de **302** per la reacció de McMurry (figura 77).

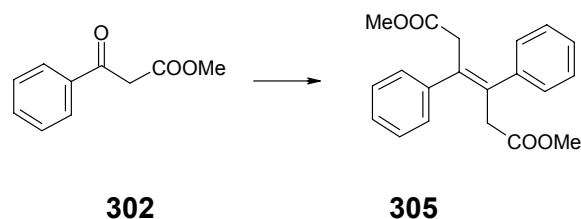


Figura 77. Proposta de síntesi del compost **305** a través de l'homoacoblament de McMurry de l'estructura **302**.

S'apliquen les condicions de reacció trobades en el pas anterior.¹⁶⁰ Malauradament, no s'observa evolució del producte de partida. Així, es creu que els compostos amb un β -cetoester no són aplicables en les condicions de reacció trobades anteriorment, en les que si es donava l'homoacoblament de McMurry de **301** per rendir **304**. Es creu que una de les causes d'aquest resultat negatiu pot ser el menor caràcter de carbonil que presenta la cetona de **302**, degut a l'existència de la tautomeria ceto-enòlica mostrada a la figura 75.

Per tant, a partir dels resultats obtinguts es decideix desestimar la síntesi d'estructures del tipus **294**, amb un esquelet estilbènic funcionalitzat amb un ester, a través de l'acoblament de McMurry del carbonil cetònic de β -cetoesters, degut a les dificultats sintètiques trobades. Es deixa per futurs treballs l'assaig d'altres vies sintètiques que puguin rendir estructures d'aquest tipus.

4. Intent de síntesi del compost 285

Seguint amb l'estratègia de trobar estructures anàlogues a **233** i **234**, esquelet del compostos **6** i **7**, i obtenir així noves estructures potencialment actives com a promotores del creixement vegetal, es proposa la síntesi del compost **285** (figura 78), que contempla una estructura de calcona per substituir l'esquelet esteroide de **6** i **7**.

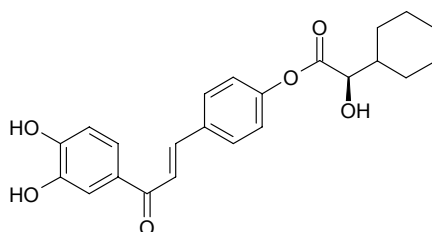


Figura 78. Compost **285**

Anàlogament a com s'ha proposat anteriorment, la síntesi de **285** es planteja a través de l'esterificació de **306** amb **5**, amb els pertinents hidroxils protegits. A la figura 79 es mostra aquesta estratègia, ometent les corresponents etapes de protecció i desprotecció.

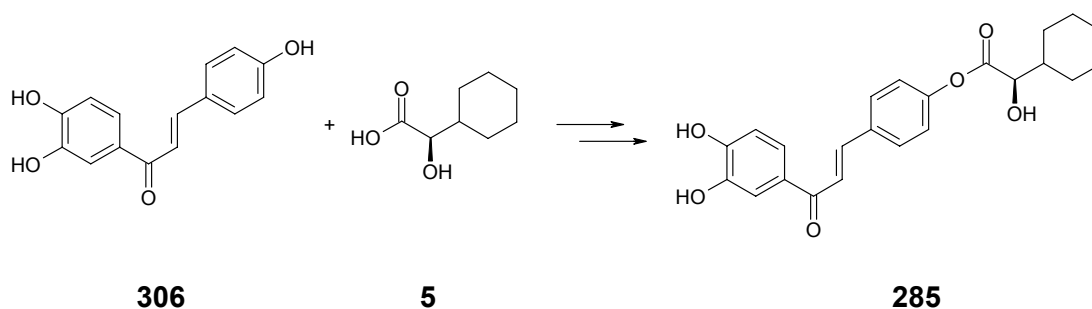


Figura 79. Estratègia proposada per la síntesi del compost **285**.

A l'hora de considerar un mètode de protecció pels dos hidroxils catecòlics de **306** i per l'hidroxil de **5** es tenen diverses opcions, d'entre les quals es descarta l'ús de l'èter benzílic i de l'acetal difenilmetilènic com a grups protectors, donat que no han donat bons resultats en aquest treball (veure apartat 1.1 del capítol 2). En aquest cas, es decideix assajar l'ús de l'èter metílic com a grup protector, tant per l'hidroxil de la cadena lateral com pels dos hidroxils de l'esquelet de calcona que es volen protegir. Aquest grup no és fàcil de desprotegir però es creu d'aplicació molt àmplia, donat que el grup metoxil és present en molts sintons comercials interessants en el lloc on es desitjaria un hidroxil. Així, els sintons per formar l'esquelet de **285** es podrien comprar ja protegits, fet que comportaria l'estalvi de l'etapa de protecció. Per altra banda, s'ha de tenir en compte que el grup protector escollit ha de ser desprotegit amb condicions de reacció molt suaus, amb el propòsit de no hidrolitzar l'ester arílic intern present a **285**. En aquest sentit, s'ha trobat en la literatura que la desprotecció d'hidroxils protegits com a metoxils es pot realitzar sense emprar hidròlisi àcida o bàsica.

4.1. Síntesi de l'àcid (*R*)-2-ciclohexil-2-metoxiacètic (**307**)

La protecció de l'hidroxil de **5** com a èter metílic requereix d'unes condicions en les quals l'àcid carboxílic es converteix a l'èster metílic **308**. Així, es fa necessària una etapa posterior d'hidròlisi de **308** per rendir finalment **307** (figura 80).

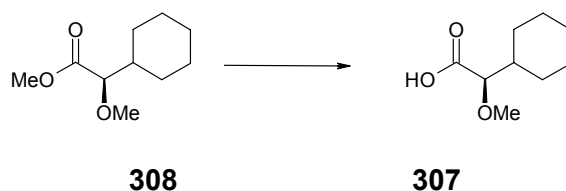


Figura 82. Síntesi de **307** per hidròlisi de **308**.

Així, **308** es tracta amb KOH/EtOH durant 24 h a t.a.. S'obté **307** amb un rendiment del 92 %.

4.2. Síntesi del compost **309**

Una de les vies més utilitzades per sintetitzar calcones és la condensació aldòlica entre una acetofenona i un benzaldehyd pertinentment derivatitzats.¹⁶³ Així, es planteja la síntesi de **309** partint de la 3,4-dimetoxiacetofenona (**310**) i del *p*-hidroxibenzaldehyd (**311**) (figura 83).

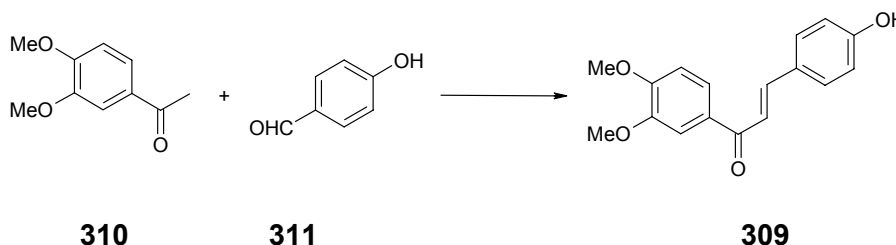


Figura 83. Síntesi de **309** per condensació aldòlica de **310** i de **311**.

La condensació aldòlica de **310** amb **311** es pot realitzar tant en medi bàsic com en medi àcid.¹⁶⁴ En primer lloc, s'assaja la reacció en medi bàsic, seguint el procediment descrit per Koteswara Rao *et al.*¹⁶⁵ Així, **310** i **311** es tracten amb KOH en medi MeOH/H₂O durant 72 h a t.a. En el cru de reacció es detecten nombrosos subproductes. Després d'un procés de purificació per cromatografia de columna s'obté **309** impurificada amb un rendiment del 20%. Es creu que una de les causes que poden haver motivat aquest resultat és la desprotonació de **311** en el medi bàsic de la reacció, rendint el corresponent fenòxid que pot haver interferit en la reacció aldòlica. Per aquest motiu, es decideix intentar la síntesi de **309**, a partir de **310** i de **311**, en medi àcid. Es segueixen les condicions descrites per Seo *et al.*,¹⁶⁶ en les que l'acetofenona i el benzaldehyd d'interès es tracten en MeOH amb àcid sulfúric en quantitats catalítiques a reflux durant 24 h. El cru de reacció és més net que en el cas anterior. Després d'un pas de purificació per cromatografia de columna, s'obté **309** amb un rendiment del 52%.

4.3. Síntesi del compost **312**

Es procedeix a l'esterificació de **309** amb **307** per rendir **312** (figura 84).

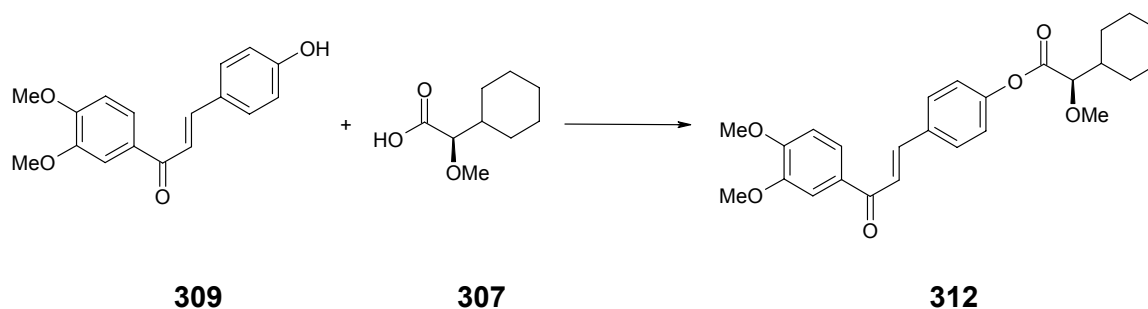


Figura 84. Síntesi de **312** per esterificació de **306** i de **307**.

Tal com s'ha comentat anteriorment, el mètode d'esterificació que ha rendit resultats més bons en l'Equip és el mètode de Yamaguchi,¹⁴³ que permet realitzar esterificacions en condicions suaus i amb rendiments acceptables.^{49,50} Així, **309** es tracta amb clorur de 2,4,6-triclorobenzoïl i TEA en THF a t.a. durant 30 min. Tot seguit, el cru format en aquest pas, es tracta amb **307** i DMAP en 1,4-dioxà a t.a. durant 16 h. Després d'un pas de purificació per cromatografia de columna, s'obté **312** impurificat. Es sotmet a un procés de purificació per digestió en fred en Et₂O i s'obté pur amb un rendiment global del 50 %.

Aquest compost no presenta els requeriments estructurals que semblen idonis per desenvolupar activitat brassinoesteroide, donat que presenta protegits com a metoxils els hidroxils que s'esperarien perquè pogués ser actiu. Tot i això, serà avaluat en el RLIT per obtenir informació addicional sobre l'activitat biològica d'aquest tipus d'estructures.

4.4. Intent de síntesi del compost **285**

En aquest pas es vol desprotegir els hidroxils de **312** per rendir el compost desitjat **285** (figura 85).

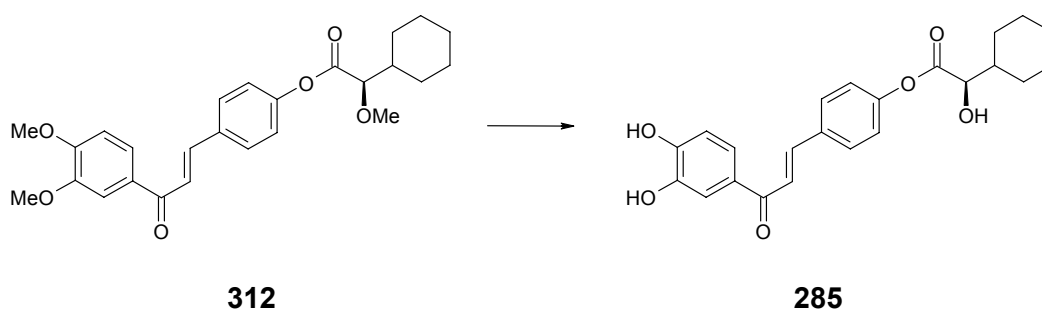


Figura 85. Síntesi de **285** per desprotecció dels hidroxils de **312**

Hi ha diversos procediments descrits per desprotegir hidroxils protegits com a èter metílic. De tots ells, cal evitar aquells mètodes que suposin l'ús de nucleòfils en medi àcid o l'ús de medis aquosos bàsics, ja que aquestes condicions podrien suposar el trencament de l'ester arílic del compost. Així, es decideix prioritzar l'ús de mètodes de desprotecció sota aquest criteri. A més a més, cal tenir present que seria adient emprar un únic procediment de desprotecció que servís tant pels dos hidroxils fenòlics com per l'hidroxil alifàtic de **312**.

Un dels mètodes que es creu més adequat és el que empra iodur de trimetilsilil (Me₃Sil).¹⁶⁷ El procediment general es mostra a la figura 86.¹⁶⁷ Aquest es basa en

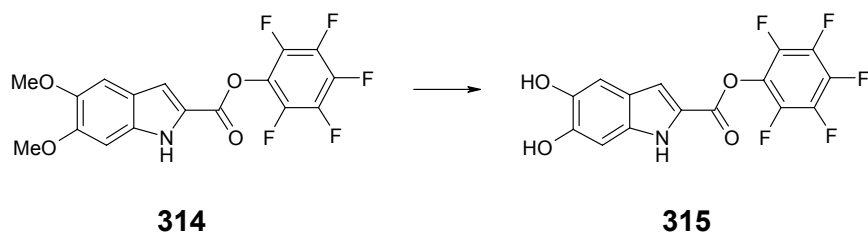


Figura 88. Síntesi de **315** a partir de **314** emprant BBr_3 en DCM.

El mètode descrit per Saito *et al.*¹⁷⁰ s'aplica a **310** per obtenir **313**. **310** es tracta amb BBr_3 a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durant 4 h, però no s'observa evolució del producte de partida. El seguiment es fa per CCF aplicant els extractes amb DCM d'una una mostra de 200 μl del cru de reacció hidrolitzada amb unes gotes d'aigua gelada. Així, es decideix augmentar la temperatura de reacció fins a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ per observar algun canvi. Per CCF es detecta l'aprició de productes en el cru de reacció. Després de 4h, el sistema s'escalfa gradualment fins a t.a. i es deixa evolucionar a aquesta temperatura durant 16 h. Per CCF s'observa una conversió total del producte de partida. Després del procés de purificació, s'obté **313** amb un rendiment del 14%. Aquest fet indica que s'ha pogut reproduir la reacció de desprotecció de catecols protegits com a 1,2-dimetoxibenzens. Així, aquest mètode es passa a aplicar en la desprotecció dels hidroxils de **312**.

En una primer experiència, **312** es tracta amb 6 eq. de BBr_3 a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durant 2 h, i posteriorment, a t.a. durant 18 h. La desactivació (*quenching*) del cru de reacció es realitza amb aigua gelada. S'obté un cru complex.

Es creu que a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, **312** no reacciona i que a t.a. descomposa. Així, la reacció es decideix mantenir un temps a una temperatura intermèdia de $-40\text{ }^\circ\text{C}$. Les condicions de la reacció anterior es reproduïxen mantenint el cru a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durant 5 h, a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ durant 3 h, i 17 h a t.a.. Em aquest cas, la desactivació es realitza amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO_3 . De nou, s'obté un cru complex.

En una nova experiència, es decideix tractar **312** amb 4.5 eq de BBr_3 , disminuint-ne la quantitat respecte els casos anteriors, i realitzant l'addició de BBr_3 en el sistema a $-40\text{ }^\circ\text{C}$, deixant-lo evolucionar a aquesta temperatura durant 5 h i realitzant la desactivació amb aigua gelada també a $-40\text{ }^\circ\text{C}$. Després d'una etapa de separació per cromatografia flaix, s'obté el compost **316** amb un rendiment del 26% (figura 89).

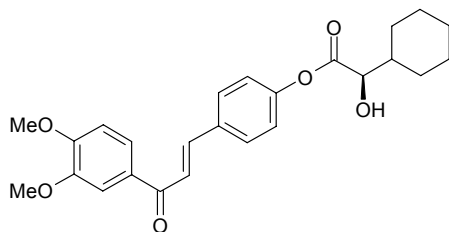


Figura 89. Compost **316**.

Donat el resultat anterior, es decideix reproduir la metòdica mantenint el cru de reacció a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ durant 9 h. En aquest cas, s'obté **316** amb un rendiment del 20% i, tot i que es realitzen varies purificacions per cromatografia de columna, no s'arriba a identificar el producte d'interès **285**.

Les condicions de l'experiència anterior es repeteixen augmentant de nou el nombre d'equivalents de BBr_3 fins a 6 eq. S'obté un cru complex.

Donats els mals resultats obtinguts en la desprotecció dels hidroxils de **312**, es decideix deixar de provar BBr_3 com a mètode de desprotecció. Resta així per a futurs treballs, trobar unes condicions adequades per realitzar aquesta desprotecció o bé per assajar l'ús d'altres grups protectors d'hidroxils que permetin assolir la síntesi de **285**.

5. Mesura de l'activitat biològica de 291, 312 i de 316 amb el RLIT

Els productes **291**, **312** i **316** no presenten els requeriments estructurals esperats perquè puguin desencadenar activitat com a promotors del creixement vegetal en el RLIT, ja que tenen protegits hidroxils que haurien de mimetitzar el paper decisiu que desencadenen els hidroxils 2α , 3α i $23R$ en activitat de BRs. Tot i això, aquests tres compostos s'avaluen en el RLIT per obtenir informació que pugui ser d'utilitat.

Els angles d'inclinació mostrats en el RLIT per **291**, **312** i **316** a una dosi de 1 $\mu\text{g/planta}$ es mostren a la taula 22.

Compost	Angle a una dosi de 1 $\mu\text{g/planta}$
291	$11^\circ \pm 2^\circ$
312	$25^\circ \pm 5^\circ$
316	$5^\circ \pm 1^\circ$

Taula 22. Activitat biològica de **291**, **312** i de **316** en el RLIT.

Aquests resultats, tot i que no són com els que presenten els BRs actius, mostren que aquests compostos han donat un cert nivell d'activitat. Aquest fet és destacable, donat que, tal com s'ha comentat, no posseeixen els requeriments estructurals necessaris per oferir a priori una activitat elevada. Així, sembla plausible plantejar que l'aplicació dels compostos **283** i **285**, un cop aquests s'hagin pogut sintetitzar, podria oferir valors d'angle més elevats, donat que aquests incorporarien les peculiaritats necessàries que es creuen necessàries perquè un compost pugui oferir una alta activitat.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

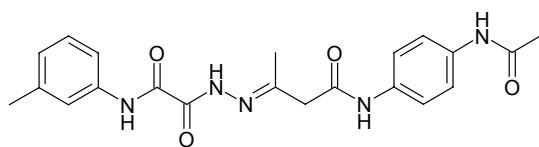
CONCLUSIONS

1. S'han dissenyat nous compostos amb potencial activitat brassinoesteroide desde dos enfocaments: per una banda, s'han buscat estructures completament noves i, per l'altra, s'han buscat estructures per substituir el fragment esteroïdal dels compostos **6** i **7**. Amb aquest objectiu s'han aplicat mètodes computacionals, emprant descriptors independents de l'alineament basats en camps d'interacció molecular, per la cerca de nous compostos amb activitat brassinoesteroide amb estructures més assequibles, tant sintètica com econòmicament, respecte als compostos ja coneguts.

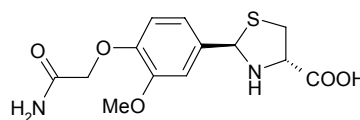
*1. New compounds with potential brassinosteroid activity have been designed using two approaches: looking for totally new structures and looking for structures to mimic the steroidal part of compounds **6** and **7**. Keeping this aim in mind, computational methods have been applied, using alignment-free descriptors based on molecular interaction fields, to find new compounds with brassinosteroid activity with more available structures, either synthetically or commercially, respect to known compounds.*

2. En el cas de l'aproximació de buscar estructures íntegrament noves, a partir de la realització de *virtual screenings* sobre bases de dades de compostos comercials s'han trobat els compostos **207** i **209** amb un model QSAR, desenvolupat amb descriptors GRIND, i el compost **224** i la serie **210**, **211**, **215** i **225**, que comparteix l'estructura de *N*-(2-hidroxiethyl)piperazina, amb la metodologia FLAP. Aquests 7 *hits*, tots ells amb estructures molt diferents als brassinoesteroides, es plantegen com a estructures que estableixen una nova referència pel disseny de nous anàlegs no esteroïdals de brassinoesteroides.

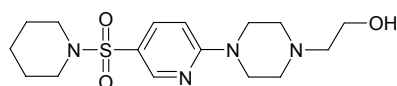
*2. In the case of the approach to find totally new structures, using a virtual screening procedure over commercial compounds databases, compounds **207** and **209** have been found, with a QSAR model developed with GRIND descriptors, and compound **224** and the series **210**, **211**, **215** and **225**, sharing a *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine substructure, have been found using FLAP methodology. These 7 hits, with structures different from brassinosteroid ones, are proposed as a new reference in the design of new non-steroidal analogues of brassinosteroids.*



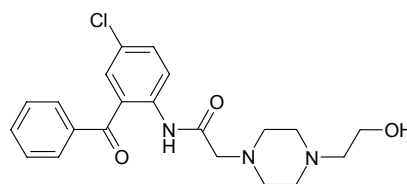
207



209

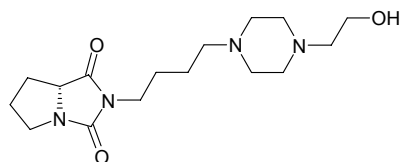


210

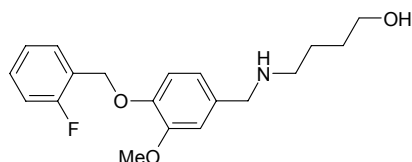


211

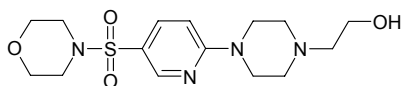
CONCLUSIONS



215



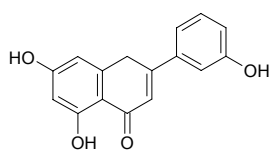
224



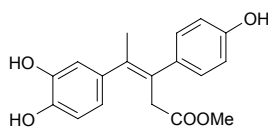
225

3. Emprant la metodologia de *scaffold hopping* (SHOP) s'han proposat 11 compostos (**245**, **248**, **253**, **255**, **260**, **263**, **265**, **277**, **278**, **270** i **276**), tots ells amb estructures molt diverses i diferents dels esquelets de brassinoesteroides naturals, com a bioisòsters de **233** i de **234** per a ser usats en futures síntesis d'anàlegs a **6** i **7**.

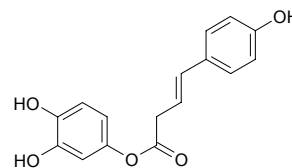
3. Using a *scaffold hopping* (SHOP) methodology 11 compounds (**245**, **248**, **253**, **255**, **260**, **263**, **265**, **277**, **278**, **270** i **276**), with structures very different from those of natural brassinosteroids, have been proposed as bioisosters of structures **233** and **234** to be used in future synthesis of compounds analogous to compounds **6** and **7**.



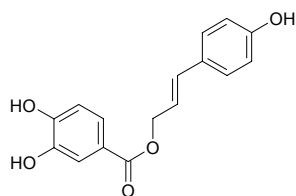
245



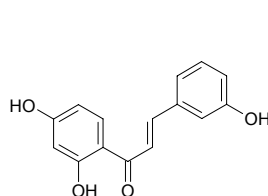
248



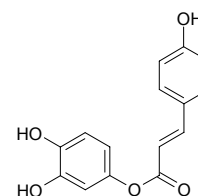
253



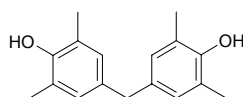
255



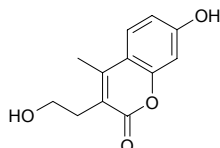
260



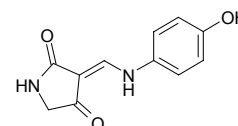
263



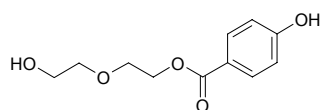
265



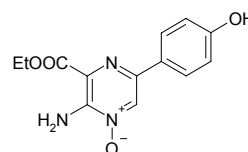
277



278



270



276

CONCLUSIONS

4. Els intents de síntesi dels compostos **307**, **308** i **309** han permés obtenir informació preliminar sobre les condicions experimentals i els grups protectors a emprar en la síntesi d'anàlegs a **6** i **7**.

*4. Attempts to synthesize compounds **307**, **308** and **309** have given preliminar information about the experimental conditions and the protecting groups that should be used in the synthesis of analogues to compounds **6** and **7**.*

CONCLUSIONS

PART EXPERIMENTAL

Agraïments

Abans de res, vull expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que han contribuït a la realització de la part experimental d'aquest projecte.

A l'Eduard Ventura, per la qualitat del treball que has realitzat al laboratori.

A l'Anna Esteve, en Jaume Bosch i en Xavier Cirera, per la vostra col·laboració en la realització del bioassaig amb les plantes d'arròs.

Al Dr. Xavier Batllori, per la realització dels espectres de ressonància magnètica nuclear i la seva disponibilitat i valuosa ajuda en la seva interpretació.

A la Sra. M^a Carmen Meca per la realització d'espectres d'infraroig.

A la Sra. Núria Ruiz per les seves minucioses pesades i per la realització d'espectres d'infraroig.

Al Prof. Esteban Guitián Fernández, de la Universitat de Santiago de Compostela, per la realització dels espectres de masses d'alta resolució.

OBSERVACIONS GENERALS**1. Abreviatures**

Ac ₂ O	Anhídrid acètic
ACN	Acetonitril
AcOEt	Acetat d'etil
c.c.	Cru complex
CDI	<i>N,N</i> -carbonildiimidazole
CCF	Cromatografia de capa fina
Cy	Ciclohexà
DCC	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometà
DMAP	<i>N,N</i> -4-dimetilaminopiridina
DME	1,2-dimetoxietà
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
Et ₂ O	Èter dietílic
EtOH	Etanol
FE	Fase estacionària
Imp.	Impureses
MeOH	Metanol
py	Piridina
Rdt.	Rendiment
R _f	Factor de retenció
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambient
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofuran
TsOH	Àcid <i>p</i> -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 K₂CO₃ anhidre i es destil·la.

Acetona: S'asseca sobre K₂CO₃ anhidre i es destil·la.

Ciclohexà (Cy): S'asseca sobre CaCl₂ anhidre i es destil·la.

Cloroform (CHCl₃): S'asseca sobre CaCl₂ anhidre i es destil·la.

Diclorometà (DCM): S'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i es destil·la sobre P₂O₅.

Èter dietílic (Et₂O): S'elueix per una columna d'alúmina i es destil·la sobre sodi.

Tetrahidrofuran (THF): S'elueix per una columna d'alúmina, s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es destil·la sobre LiAlH₄.

Toluè: S'asseca sobre P₂O₅ i es destil·la.

Trietilamina (TEA): S'asseca sobre CaH₂ i es destil·la.

3. Control de reacció

La cromatografia de capa fina (CCF) ha estat el mètode emprat per a observar l'evolució i resultat de les diferents reaccions, així com la puresa de les diferents fraccions eluïdes en les columnes cromatogràfiques per a la seva posterior recombinació.

La CCF es realitza amb plaques de plàstic Macherey-Nagel (MN) Silicagel Polygram UV₂₅₄ 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 H₂SO₄ al 50% seguit de calefacció a 120 °C durant 5 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 H₂O/MeOH (1:4) i l'addició de 8 gotes de NaOH al 30% fins observar-ne un canvi de coloració (els àcids carboxílics presenten una coloració groguenca que difereix del color blau verdós de tota la capa fina).

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 el present treball s'empren les tècniques cromatogràfiques que es descriuen a continuació. La fase mòbil o l'eluent emprat es detalla en cada cas concret.

5.1. Cromatografia convencional

Columna recta emprant sílice SDS de mida de partícula compresa entre 70 i 200 µm. 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.

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.

5.2. Cromatografia flash

Columna recta emprant sílice SDS de mida de partícula compresa entre 35 i 70 µm 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 ml·min⁻¹. En cas que no s'indiqui el contrari, la relació cru:adsorbent emprada és de 1:50 en pes.

5.3. Cromatografia líquida de baixa pressió

S'han emprat les columnes preparades de fase normal Merck Lobar Lichroprep Si 60 (40-63 μm) 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 μm) 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.

5.4. Cromatografia preparativa

Plaques de sílice Macherey-Nagel (MN) SIL G-25 UV₂₅₄ amb indicador fluorescent UV₂₅₄ de 0.25 mm de gruix. La mida de les plaques és de 20 x 20 cm.

6. Dades espectroscòpiques

6.1. Espectres d'infraroig (IR)

Es registren en un espectrofotòmetre Nicolet Magna IR 560. Les mostres s'han registrat en un film evaporat de cloroform. Es fa constar la posició de les bandes d'absorció més significatives de cada espectre en cm^{-1} .

6.2. Espectres de ressonància magnètica nuclear de protó (¹H-RMN)

Es registren amb un instrument Varian Gemini-300 (300 MHz). La mostra es dissol en el corresponent dissolvent deuterat: deuterocloroform (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 (δ) 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 (singulet), 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 (¹³C-RMN)

Es registren amb un instrument Varian Gemini-300 (75.5 Hz). La mostra es dissol en deuterocloroform (CDCl_3). Els espectres es registren en condicions de desacoblament de protó de banda ampla (WALTZ-16) i la multiplicitat dels senyals es determina mitjançant l'ús de la seqüència DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*). La posició dels senyals es dona en valor de desplaçaments químics (δ) en ppm, prenent com a referència interna la senyal dels protons de tetrametilsilà (TMS) ($\delta = 0$). A continuació es descriu la multiplicitat del senyal caracteritzat com s (singulet), d (doblet), t (triplet) o q (quadruplet) i, finalment, l'assignació del senyal.

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. Dades físiques

7.1. Rotació òptica

Es registren en un polarímetre Perkin Elmer 241. S'empra radiació de λ 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 $^{\circ}$.

7.2. 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.

1. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 283

1.1. Intent de síntesi d'àcid (*R*)-benziloxiciclohexilacètic (287)

Es dissolen 200 mg (1.3 mmol) d'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (**5**) en 4.3 ml de THF. S'hi addicionen 96 mg (4 mmol) de NaH 95% i 230 µl (330 mg, 1.9 mmol) de bromur de benzil. La mescla s'agita a 0 °C durant 5 h. A continuació s'hi afegeixen 10 ml d'una dissolució aquosa saturada de clorur amònic. La mescla s'acidula amb HBr 45%. Es realitzen extraccions amb AcOEt (3x10 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. S'obtenen 432 mg d'un cru que es purifica per cromatografia flash (Cy:AcOEt (1:1 v/v)). Les fraccions obtingudes es descriuen a la taula 26.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	268	Bromur de benzil
F2	92	5
F3	44	5 + imp.

Taula 26. Cromatografia flash del cru obtingut en la síntesi de l'àcid (*R*)-benziloxiciclohexilacètic (**287**)

No s'obté el producte d'interès.

1.2. Síntesi de (*R*)-hexahidromandelat de metil (288)

Es dissolen 304 mg d'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (**5**) (1.9 mmol) en 40 ml de MeOH. A aquesta dissolució s'afegeixen 1.4 ml de clorur de tionil (19 mmol) gota a gota a t.a.. La mescla s'agita a t.a. durant 40 min. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. L'oli obtingut es dissol en 20 ml de DCM. Es realitzen rentats amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml). La fase aquosa s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 294 mg de (*R*)-hexahidromandelat de metil (**288**) (1.7 mmol) (Rdt.: 89%).

IR (Film): 3484, 2928, 2854, 1736, 1450, 1261, 1220, 1175, 1145, 1118 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 4.03 (1H, dd, J=3.5, 6.5 Hz, H₂), 3.79 (3H, s, OCH₃), 2.63 (1H, d, J=6.5 Hz, OH), 1.8-1.1 (11H, m, H_{Cy}).

1.3. Síntesi de (*R*)-2-benziloxi-2-ciclohexilacetat de metil (289)

Es dissolen 260 mg (1.5 mmol) de (*R*)-hexahidromandelat de metil (**288**) en 750 µl de DCM. A t.a. s'hi afegeix una dissolució de 560 µl (758 mg, 3 mmol) de 2,2,2-tricloroacetimidat de benzil en 4.5 ml d'hexà i a continuació s'hi addicionen 10 µl (11 mg, 75 µmol) d'àcid triflic. La suspensió blanca que es forma es deixa en agitació a t.a. en la foscor durant 17 h. El sòlid blanc es filtra i es renta amb hexà. El filtrat es renta amb 20 ml d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃. La fase aquosa resultant s'extreu amb hexà (3 x 20 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. La mescla obtinguda es purifica per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (15:1 v/v). Les fraccions obtingudes es descriuen a la taula 27.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	52	Imp.
F2	364	289
F3	40	289 + imp.
F4	457	Imp.
F5	348	<i>N</i> -benziltricloroacetamida

Taula 27. Cromatografia flash del cru obtingut en la síntesi de **289**.

Després de la separació cromatogràfica duta a terme s'obtenen 364 mg (1.4 mmol) d'un oli incolor que correspon a (*R*)-2-benziloxi-2-ciclohexilacetat de metil (**289**) (Rdt.: 91%).

IR (Film): 3029, 2927, 2854, 1952, 1873, 1807, 1749, 1735, 1451, 1199, 1121, 735, 698 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.35-7.31 (5H, m, H_{ar}), 4.68 (d, J=11 Hz, OCH_aPh), 4.36 (d, J=11 Hz, OCH_bPh), 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.72 (1H, d, J=6.5 Hz, H₂), 1.8-1.1 (11H, m, H_{Cy}).

***N*-benziltricloroacetamida**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.41-7.31 (5H, m, H_{ar}), 4.56 (d, J=11 Hz, CH₂).

1.4. Síntesi de l'àcid (*R*)-2-benziloxi-2-ciclohexilacètic (287**)**

Es dissolen 344 mg de (*R*)-2-benziloxi-2-ciclohexilacetat de metil (**289**) (1.3 mmol) en 4 ml de MeOH. A 0 °C s'hi afegeix 4 ml d'una dissolució de 830 mg de KOH en aigua. La dissolució s'agita durant 4 h i 30 min. A continuació, s'acidula amb una dissolució de HCl 2 M. Es realitzen extraccions amb AcOEt (4 x 30 ml). Les fases orgàniques s'ajunten, es renten amb 50 ml de salmorra i s'assequen sobre MgSO₄ anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 307 mg (1.2 mmol) d'un oli incolor que correspon a àcid (*R*)-2-benziloxi-2-ciclohexilacètic (**287**) (Rdt.: 90%).

IR (Film): 3088, 3063, 3030, 2928, 2854, 1949, 1872, 1803, 1740, 1715, 1452, 1121, 735, 698 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.35 (5H, m, H_{ar}), 4.69 (d, J=11.5 Hz, OCH_aPh), 4.49 (d, J=11.5 Hz, OCH_bPh), 3.81 (1H, d, J=5 Hz, H₂), 1.8-1.1 (11H, m, H_{Cy}).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 176.2/s COOH, 136.9/s C_{ar}, [128.3/d, 128.0/d, CH_{ar}] 82.5/d C₂, 73.1/t OCH₂, 41.1/d CH_{Cy}, [29.2/t, 27.8/t, 26.1/t, 26.1/t, 26.0/t, CH_{2,Cy}]

EM-IQ: 249 ([M+H]⁺, 4), 203 (6), 181 (15), 180 (6), 179 (4), 142 (13), 123 (5), 107 (8), 95 (5), 92 (9), 91 (100).

EM-AR: trobat 249.1482 [M+H]⁺ (calc. 249.1491, C₁₅H₂₁O₃)

1.5. Síntesi del compost 290

Es mesclen 399 mg (1.5 mmol) de 4',7,8-trihidroxi flavona (**286**) amb 280 μl (339 mg, 1.5 mmol) de α,α -diclorodifenilmetà 97%. La mescla s'escalfa durant 10 min a 170 °C sota atmosfera inerta. El sòlid taronja format es renta amb cloroform, amb acetona i s'asseca a pressió reduïda. S'obtenen 597 mg (1.4 mmol) de **290** (Rdt.: 93%).

IR (Pastilla KBr): 3407, 3082, 3064, 1602, 1564, 1530, 1465, 1448, 1246, 1173 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): 7.97 (2H, m, H2',H6'), 7.72 (1H, d, J=8.5 Hz, H5), 7.71-7.68 (4H, m, H_{fenil,o}), 7.53-7.46 (6H, m, H_{fenil,m,p}), 7.16 (1H, d, J=8.5 Hz, H6), 7.06 (2H, m, H3',H5'), 6.66 (1H, s, H3).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 175.5/s C4, 162.1/s C2, 160.9/s C4', 150.6/s C7, 140.1/s C8, 138.5/s C_{Ph,ipso}, 133.4/s C9, 129.7/d C_{Ph,para}, 128.6/d C_{Ph,orto}, 128.1/d C2',C6', 125.9/d C_{Ph,meta}, 121.1/q C1', 119.5/q C_{sp3}, 119.3/d C5, 119.2/q C10, 115.9/d C3',C5', 107.2/d C6, 104.3/d C3.

EM-ESI-TOF: 565 (1113), 537 (2196), 457 (1860), 447 (1415), 436 (11162), 435 (34110), 325 (1389), 308 (2639), 307 (17452), 291 (1932), 281 (1237), 272 (3619), 271 (19784), 246 (2240), 245 (15324), 233 (1778).

EM-AR: trobat 435.1227 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 435.44, C₂₈H₁₉O₅)

1.6. Síntesi del compost 291

1.6.1. Síntesi de propionat de fenil

Es dissolen 400 μl d'àcid propiònic 99% (5.3 mmol) en 25 ml de THF. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 750 μl de TEA (5.3 mmol) i 880 μl de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil 97% (5.3 mmol). El sistema es deixa en agitació a t.a durant 5 h. El sòlid blanc precipitat es separa per filtració i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda. L'oli resultant es dissol en 12 ml de toluè sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 275 mg (2.2 mmol) de DMAP i 500 mg (5.3 mmol) de fenol. La mescla s'agita a t.a. durant 46 h. Tot seguit, s'hi afegeixen 15 ml de AcOEt. Es realitzen rentats amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃ (3 x 30 ml), 30 ml d'aigua i 50 ml de salmorra. La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 2.07 g d'una mescla que es purifica per cromatografia flash (Cy:AcOEt (50:1 v/v)). Les fraccions obtingudes es descriuen a la taula 28.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	433	Anhídrid 2,4,6-triclorobenzoic
F2	484	Propionat de fenil

Taula 28. Cromatografia flash del cru obtingut en la síntesi de propionat de fenil.

S'obtenen 484 mg (3.2 mmol) de propionat de fenil (Rdt.:60%).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 7.41-7.06 (5H, m, Ar), 2.60 (2H, q, J=7.5 Hz, H2), 1.27 (3H, t, J=7.5 Hz, H3).

Anhídrid 2,4,6-triclorobenzoic

IR (film evap. CHCl_3): 3085, 1828, 1815, 1758, 1577, 1549, 1371, 1524, 1210, 1188, 1081, 1005, 991, 859, 823 cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.39 (s, H3,H3',H5,H5').

1.6.2. Intent de síntesi del compost 291 pel mètode de Yamaguchi en toluè

Es dissolen 289 mg (1.1 mmol) de **287** en 6 ml de THF. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 180 μl (1.1 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoïl i 170 μl de TEA. El sistema es deixa en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 135 min. El sòlid blanc format es separa per filtració i es renta amb THF. El dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. El residu format es dissol en 3 ml de toluè. Sobre aquesta dissolució s'hi addiciona una suspensió de 508 mg de **290** (1.1 mmol) i 63 mg de DMAP en 4.5 ml de toluè. El sistema es deixa en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 4 dies. A continuació, es deixa evolucionar a 80 °C durant 17 h. El sòlid present en el cru de reacció es filtra i s'identifica com una mescla de flavonoides que no corresponen al producte d'interès. El dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 811 mg d'un oli que es purifica per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:DCM (1:5 v/v) (taula 29).

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	293	Imp.
F2	74	291 (83%) + Imp. (17%)
F3	336	Imp.

Taula 29. Cromatografia flash del cru obtingut en la síntesi de **291**.

S'obtenen 74 mg d'una fracció on s'observa el producte d'interès **291** impurificat amb una altra estructura flavonoïdea en una relació 5:1. La quantitat de **291** en aquesta fracció seria de 60 mg (0.1 mmol) (Rdt = 10%).

1.6.3. Intent de síntesi del compost 291 pel mètode de Yamaguchi en piridina

Es dissolen 57 mg (230 μmol) de **287** en 1 ml de THF. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 40 μl (240 μmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoïl i 35 μl de TEA. El sistema es deixa en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 1 h. El sòlid blanc format es separa per filtració i es renta amb THF. El dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. El residu format es dissol en 1 ml de py. Sobre aquesta dissolució s'hi addiciona una suspensió de 100 mg de **290** (220 μmol) i 15 mg de DMAP en 1 ml de py. El sistema es deixa en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 3 dies. A continuació, es deixa evolucionar a 40 °C durant 24 h. El cru de reacció s'elueix directament per un llit de 30 g de SiO_2 i fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (4:1). El dissolvent de la dissolució obtinguda s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 150 mg d'un oli que es purifica per cromatografia flash emprant com a eluent una mescla Cy:DCM (1:5 v/v). Les fraccions obtingudes es detallen a la taula 29.

Fracció	Massa/mg	Productes
F1	5	Imp.
F2	60	291 + 290 + Imp.
F3	20	287
F4	25	Imp.

Taula 30. Cromatografia flash del cru obtingut en l'intent de síntesi de **291** pel mètode de Yamaguchi en Py.

S'obtenen 60 mg d'una mescla complexa, en la que s'identifica el producte d'interès, que no s'investiga posteriorment.

1.6.4. Intent de síntesi del compost **291** pel mètode de Yamaguchi en THF

Es dissolen 50 mg (0.2 mmol) de **287** en 5 ml de THF. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 30 μ l (0.2 mmol) de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil i 30 μ l de TEA. El sistema es deixa en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 90 min. El sòlid blanc format es separa per filtració i es renta amb 5 ml de THF. Sobre el filtrat s'hi afegeix una dissolució de 130 mg de **290** (0.3 mmol) i 40 mg de DMAP en 5 ml de THF. El sistema es deixa en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 15 h. El sòlid format es separa per filtració. El filtrat es dilueix amb THF fins a 30 ml, es renta amb una dissolució aquosa saturada de NH_4Cl (2x30 ml), i s'asseca sobre MgSO_4 anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 70 mg d'un residu que es tracta amb Cy. El sòlid blanc precipitat es separa per filtració i s'asseca a pressió reduïda. S'obtenen 47 mg d'un sòlid que s'identifica com a **292**. El dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda i s'asseca a pressió reduïda. S'obté un cru complex que no s'investiga posteriorment.

Compost **292**

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 8.24 (2H, m, H2',H6'), 7.99 (2H, s, $\text{CH}_{\text{Triclorobenzoil}}$), 7.68 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.65-7.62 (4H, m, $\text{H}_{\text{fenil,o}}$), 7.55 (2H, m, H3',H5'), 7.51-7.49 (6H, m, $\text{H}_{\text{fenil,m,p}}$), 7.30 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.03 (1H, s, H3).

1.6.5. Intent de síntesi del compost **291** amb el mètode de Steglich

Propionat de fenil

Es dissolen 500 mg (5.3 mmol) de fenol, 345 μ l d'àcid propiònic 99% (6,5 mmol), 1.86 g de DCC 99% (8,1 mmol) i 82 mg de DMAP 98% (0,7 mmol) en 50 ml de AcOEt. La mescla s'agita a t.a. durant 32 h. S'hi afegeixen 152 mg de DMAP. La mescla s'agita a t.a. durant 88 h més. S'hi afegeixen 50 ml de AcOEt. La fase orgànica resultant es renta amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO_3 (3 x 50 ml) i amb 50 ml de salmorra i s'asseca amb MgSO_4 anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 1.82 g d'una mescla que es purifica per cromatografia flash (Cy:AcOEt, (20:1 v/v)). S'obtenen 395 mg (2.6 mmol) de propionat de fenil (Rdt.:53%).

Intent de síntesi de 291

Experiència 1

Es dissolen 47 mg (0.1 mmol) de **290** i 28 mg (0.1 mmol) de **287** en 4 ml de THF. S'hi afegeixen 20 mg (0.1 mmol) de DCC i 5 mg (0.04 mmol) de DMAP sobre el sistema en agitació sota atmosfera inerta a t.a.. El sistema es deixa en agitació a t.a. durant 5 dies. S'hi afegeixen 10 mg de DMAP i 40 mg de DCC. El sistema es deixa en agitació a t.a. durant 2 dies més. El sòlid groguenc precipitat es separa per filtració i el dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 71 mg d'un c.c. que no s'investiga posteriorment.

Experiència 2

Es dissolen 59 mg (0.1 mmol) de **290** i 41 mg (0.1 mmol) de **287** en 4 ml de THF. S'hi afegeixen 46 mg (0.1 mmol) de DCC i 8 mg (0.04 mmol) de DMAP sobre el sistema en agitació sota atmosfera inerta a t.a.. El sistema es deixa en agitació a t.a. durant 7 dies. El sòlid groguenc precipitat es separa per filtració i el dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 71 mg d'un sòlid que es purifica per cromatografia flash emprant com a eluent una mescla Cy:AcOEt (10:1 v/v). En cap de les fraccions recollides es detecta el producte d'interès.

Experiència 3

Es dissolen 25 mg (0.1 mmol) de **290** i 44 mg (0.1 mmol) de **287** en 5 ml de THF. S'hi afegeixen 5 mg (0.04 mmol) de DMAP. El sistema es refreda a 0 °C. S'hi afegeixen 25 mg (0.05 mmol) de DCC en porcions en 5 mg. El sistema es deixa evolucionar fins a t.a. amb agitació sota atmosfera inerta durant 5 hores. S'hi afegeixen 10 mg de DMAP i 27 mg de DCC i es deixa evolucionar el sistema en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 7 dies. El sòlid format es separa per filtració i el dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 123 mg d'un c.c. que no s'investiga posteriorment.

1.6.6. Intent de síntesi del compost 291 amb 1,1'-carbonildiimidazole (CDI)

Es dissolen 86 mg (0.5 mmol) de **5** i 104 mg (0.6 mmol) de CDI en 15 ml de THF. El sistema es deixa evolucionar en agitació a t.a. (taula 30) durant 17 h en condicions anhidres sota atmosfera inerta. S'hi afegeix una dissolució de 20 mg (0.2 mmol) de fenol en 2 ml de THF i el sistema s'escalfa a reflux durant 17 h. A continuació, s'hi afegeix una dissolució de 40 mg (0.4 mmol) de fenol en 2 ml de THF i el sistema s'escalfa a reflux durant 4 dies. No s'observa evolució dels reactius.

Es repeteixen les mateixes condicions deixant evolucionar el sistema escalfant a reflux. De nou, no s'observa evolució dels reactius.

1.6.7. Síntesi del compost 291 amb diclorur d'oxalil i DMF

Es dissolen 26 mg (0.1 mmol) de **287** en 1.5 ml de DCM. A 0 °C sota atmosfera inerta s'hi afegeixen 20 µl (25 mg, 0.2 mmol) de diclorur d'oxalil i 10 µl de DMF. El sistema es deixa evolucionar en agitació durant 30 min a 0 °C sota atmosfera inerta. A continuació, el dissolvent s'elimina a pressió reduïda i el residu que es forma s'asseca a pressió reduïda. Tot seguit, l'oli obtingut es dissol en 2 ml de THF i s'afegeix a una dissolució de 43 mg (0.1 mmol) de **290** i de 20 µl (0.2 mmol) de TEA en 7 ml de THF. A continuació, s'hi afegeixen 10 mg de DMAP. El sistema es deixa evolucionar en agitació a t.a. sota atmosfera inerta durant 5 h. El sòlid format es separa per filtració i

el dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 60 mg d'un sòlid que es separa per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (3:1 v/v). S'obtenen 38 mg (57 μmol) d'un sòlid blanc que correspon a **291** (Rdt.=57%).

IR (film evap. CHCl_3): 3036, 3032, 2928, 2854, 1769, 1655, 1631, 1600, 1498, 1451, 1417, 1387, 1341, 1301, 1273, 1210, 1183, 1169, 1115, 1090, 1018, 699 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 7.98 (2H, m, H_{2'},H_{6'}), 7.81 (1H, d, J=8.5 Hz, H₆), 7.66-7.63 (4H, m, H_{fenil,o}), 7.44-7.33 (12H, m, H_{fenil,m,p}, H_{benzil cadena}), 7.26 (2H, m, H_{3'},H_{5'}), 7.03 (1 H, d, J=8.5 Hz, H₅), 6.70 (1H, s, H₃), 4.80 (1H, d, J=11.5 Hz, OCH_aPh), 4.54 (1H, d, J=11.5 Hz, OCH_bPh), 3.97 (1H, d, J=5.5 Hz, C_{2''}), 1.93-1.26 (11H, m, H_{Cy}).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 176.4/s C₄, 170.8/s C_{1''}, 162.1/s C₂, 153.9/s C₇, 152.2/s C_{4'}, 140.2/s C₇, 140.0/s C₈, 138.8/s C_{Ph,ipso}, 130.4/d C_{2'},C_{6'}, 130.1/s C₉, 129.2/d C_{Ph,meta}, 129.0 C_{Ph',meta}, 128.8/s C_{Ph',ipso}, 128.7/d C_{Ph',orto}, 128.5/d C_{Ph,para}, 128.4/d C_{Ph',para}, 128.3/d C_{1'}, 126.9/d C_{Ph,orto}, 123.3/d C_{3'},C_{5'}, 120.8/s C₁₀, 120.4/d C₅, 107.9/d C₆, 107.5/d C₃, 83.4/d C_{2''}, 73.2/t OCH₂, 42.1/d CH_{Cy}, [29.9/t, 28.9/t, 26.9/t, 26.8/t, 26.7/t, CH_{2,Cy}].

EM-IQ: 666 ([M+H]⁺, 9), 436 (18), 272 (8), 184 (36), 182 (9), 169 (11), 168 (14), 167 (14), 135 (8), 121 (10), 120 (10), 113 (9), 111 (9), 108 (9), 107 (100), 106 (9), 105 (30), 97 (10), 95 (64), 93 (31), 92 (19), 91 (86), 83 (14), 81 (10), 79 (53).

EM-AR: trobat 665.2545 [M+H]⁺, (calc. 655.2539, C₄₃H₃₇O₇).

1.6.8. Intent de síntesi del compost 283

1.6.8.1. Desprotecció del compost 290

Es dissolen 30 mg (70 μmol) de **290** en 5 ml de THF. S'hi afegixen 70 mg de Pd/C 10%. El sistema es deixa evolucionar sota agitació vigorosa a t.a. sota atmosfera de H₂ amb una pressió de 1 atm durant 24 h. El cru de reacció es posa sota atmosfera d'Ar i el sòlid present en el cru de reacció es filtra sobre un llit de celite i es renta amb THF. El dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda. Se'n fa una digestió en fred amb una mescla Cy:AcOEt (2:1 v/v). El sòlid residual es separa per filtració i es renta amb Cy. Es fa una digestió del sòlid amb acetona i el sòlid romanent es separa per filtració. El dissolvent del filtrat s'elimina a pressió reduïda i el residu es purifica per cromatografia preparativa. S'obtenen 17 mg (63 μmol) de **286** (Rdt.=90%).

1.6.8.2. Intent de desprotecció completa del compost 291

Es dissolen **A** mg (**B** μmol) de **291** en 5 ml de THF. S'hi afegixen **C** mg de Pd/C 10%. El sistema es deixa evolucionar sota agitació vigorosa a t.a. sota atmosfera de H₂ amb una pressió de 1 atm durant **D** h. El cru de reacció es posa sota atmosfera d'Ar i el sòlid present en el cru de reacció es filtra sobre un llit de celite i es renta amb THF. S'obtenen 6 mg d'un cru que es purifica per cromatografia preparativa fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (1:2 v/v). Cap de les fraccions obtingudes conté el producte d'interès.

Exp.	A (mg 315)	B (μmol 315)	C (mg de Pd/C 10%)	D (temps)
1	11	11	10	19
2	15	23	32	8

2. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 284

2.1. Síntesi de benzoïlacetat de metil (302)

Es dissolen 5.01 g (26 mmol) de benzoïlacetat d'etil (**303**) i 200 ml de $\text{H}_2\text{SO}_{4(c)}$ en 60 ml de MeOH. El sistema s'escalfa a reflux durant 20 h. A continuació, el cru de reacció es dilueix amb 50 ml d'aigua. Es realitzen extraccions amb CHCl_3 (3x20 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i s'assequen sobre MgSO_4 anhidre. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obtenen 4.23 g d'un cru que es purifica per destil·lació a pressió reduïda. S'obtenen 2.63 g (15 mmol) de benzoïlacetat de metil (**302**) (Rdt.=58%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.97-7.94 (2H, m, $\text{CH}_{m,\text{forma cetònica}}$), 7.80-7.77 (2H, m, $\text{CH}_{m,\text{forma enòlica}}$), 7.64-7.58 (3H, m, $\text{CH}_{o,p,\text{forma enòlica}}$), 7.52-7.42 (3H, m, $\text{CH}_{o,p,\text{forma cetònica}}$), 5.68 (1H, s, $\text{COCH}_{\text{forma enòlica}}$), 4.02 (2H, s, $\text{CH}_{2,\text{forma cetònica}}$), 3.81 (3H, s, OCH_3 , forma enòlica), 3.76 (3H, s, OCH_3 , forma cetònica).

La relació entre la forma cetònica i la forma enòlica és de 4:1.

2.2. Intent de síntesi del compost 300

2.2.1. Preparació del parell Zn/Cu

S'addicionen 4.90 g (75 mmol) de Zn sobre 20 ml d'aigua desoxigenada. Tot seguit, s'hi afegeixen 374 mg (2.4 mmol) de sulfat de coure (II) CuSO_4 . La mescla es deixa evolucionar sota agitació sota una corrent de N_2 durant 10 min. A continuació, el sòlid es separa per filtració sota una atmosfera de N_2 . El sòlid es renta amb aigua desoxigenada, acetona i èter de petroli. S'obtenen 4.71 g del parell Zn/Cu, que es conserven sota atmosfera inerta.

2.2.2. Intent de síntesi del compost 300

Es pesen 20 mg (0.13 mmol) de TiCl_3 i 30 mg del parell Zn/Cu sota atmosfera inerta. S'hi afegeixen 2 ml de DME. El sistema s'escalfa a reflux durant 1 h sota atmosfera inerta. A continuació, s'hi afegeix una dissolució de 1 g de **301** i 1.34 g de **302** en 5 ml de DME. El sistema s'escalfa a reflux durant 20 h sota atmosfera inerta. A continuació, s'afegeixen 110 mg de gel de sílice i el sistema s'agita durant 15 min. El sòlid es separa per filtració i el dissolvent del filtrat es destil·la a pressió reduïda. En el residu obtingut no s'observa evolució dels reactius de partida.

2.2.3. Síntesi del compost 304

El Zn s'activa prèviament tractant-lo amb àcid clorhídric concentrat, separant-lo per filtració i rentant-lo amb aigua i acetona.

Experiència 1

Es pesen 500 mg (3 mmol) de TiCl_3 , 393 mg (6 mmol) de Zn activat, 60 mg (0.6 mmol) de CuCl sota atmosfera inerta. S'hi afegeixen 5 ml de DME. El sistema s'escalfa a reflux durant 1 h sota atmosfera inerta. A continuació, s'hi afegeix una dissolució de 20 mg (0.15 mmol) de **301** en 20 ml de DME. El sistema s'escalfa a reflux durant 20 h sota atmosfera inerta. El sòlid es separa per filtració i el dissolvent del filtrat es destil·la a pressió reduïda. En el residu obtingut no s'observa evolució dels reactius de partida.

Experiència 2

Es reproduïx la metòdica anterior addicionant 10 ml d'una dissolució aquosa de K_2CO_3 10% després d'haver deixat evolucionar el sistema escalfant a reflux durant 48 h. De nou, en el cru complex obtingut no es detecta el producte d'interès.

Experiència 3

S'addicionen gota a gota 1.93 g (8 mmol) de $TiCl_4$ sobre 30 ml de THF en agitació a 0 °C sota atmosfera inerta. S'hi afegeixen 970 mg (15 mmol) de Zn activat en porcions i a continuació 1 ml de py. Tot seguit, s'hi afegeix 1 g (7.5 mmol) de **301** dissolt en 5 ml de THF. El sistema s'escalfa a reflux durant 20 h sota atmosfera inerta. A continuació, el sistema es deixa refredar fins a t.a.. S'hi afegeixen 50 ml d'una dissolució aquosa de Na_2CO_3 10% en porcions. El sòlid format es separa per filtració i el sòlid filtrat es renta amb Et_2O . La fase aquosa del filtrat es s'extreu amb 25 ml de Et_2O . Les fases orgàniques s'ajunten i es renten amb àcid clorhídric 0.1 N (2x30 ml) i amb aigua (2x30 ml). La fase orgànica s'asseca sobre $MgSO_4$ anhidre i el dissolvent es destil·la a pressió reduïda. En el cru obtingut no es detecta el producte d'interès.

Experiència 4

Es pesen 13.1 g de Zn activat (0.2 mol) i 2.0 g de $CuCl$ (20 mmol) i es mesclen amb 250 ml de THF. Sota atmosfera inerta s'hi afegeixen, gota a gota, 11 ml de $TiCl_4$. El sistema s'escalfa a reflux durant 3 h sota atmosfera inerta. Tot seguit, s'hi afegeix, gota a gota durant 10 min, una dissolució de 670 mg (5 mmol) de **301** dissolt en 5 ml de THF. El sistema s'escalfa a reflux durant 20 h sota atmosfera inerta. A continuació, s'hi afegeixen 50 ml d'una dissolució aquosa de K_2CO_3 10%. El sòlid negre-blavós format es separa per filtració. El filtrat s'asseca sobre $MgSO_4$ anhidre i el dissolvent es destil·la a pressió reduïda. El cru obtingut es purifica per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (20:1). S'aïllen 389 mg (3 mmol) de **304** (Rdt.=58%).

IR (film $CHCl_3$): 3078, 3057, 3025, 2964, 2931, 2872, 1943, 1872, 1802, 1744, 1667, 1599, 1575, 1491, 1452, 1442, 1374, 1315, 1280, 1067, 1029, 762, 699 cm^{-1} .

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 7.08-6.92 (10 H, m, H_{ar}), 2.56 (4H, q, $J=7.0$ Hz, CH_2), 0.97 (6H, t, $J=7.0$ Hz, CH_3).

2.2.4. Intent de síntesi del compost 300

Es pesen 13.1 g de Zn activat (0.2 mol) i 2.0 g de $CuCl$ (20 mmol) i es mesclen amb 250 ml de THF. Sota atmosfera inerta s'hi afegeixen, gota a gota, 11 ml de $TiCl_4$. El sistema s'escalfa a reflux durant 3 h sota atmosfera inerta. Tot seguit, s'hi afegeix, gota a gota durant 10 min, una dissolució de 537 mg (4 mmol) de **301** i 237 mg de **302** (1.3 mmol) dissolt en 5 ml de THF. El sistema s'escalfa a reflux durant 20 h sota atmosfera inerta. A continuació, s'hi afegeixen 50 ml d'una dissolució aquosa de K_2CO_3 10%. El sòlid negre-blavós format es separa per filtració. El filtrat s'asseca sobre $MgSO_4$ anhidre i el dissolvent es destil·la a pressió reduïda. El cru obtingut es purifica per cromatografia flash fent servir com a eluent una mescla Cy:AcOEt (20:1). S'aïllen 413 mg (3 mmol) de **318** impurificats i a més no es detecta el producte d'interès.

2.2.5. Intent de síntesi del compost 305

Es pesen 13.1 g de Zn activat (0.2 mol) i 2.0 g de CuCl (20 mmol) i es mesclen amb 250 ml de THF. Sota atmosfera inerta s'hi afegeixen, gota a gota, 11 ml de TiCl₄. El sistema s'escalfa a reflux durant 3 h sota atmosfera inerta. Tot seguit, s'hi afegeix, gota a gota durant 10 min, una dissolució de 890 mg (5 mmol) de **302** dissolt en 5 ml de THF. El sistema s'escalfa a reflux durant 20 h sota atmosfera inerta. A continuació, s'hi afegeixen 50 ml d'una dissolució aquosa de K₂CO₃ 10%. El sòlid format es separa per filtració. El filtrat s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i el dissolvent es destil·la a pressió reduïda. En el cru obtingut no es detecta evolució dels reactius.

3. INTENT DE SÍNTESI DEL COMPOST 285

3.1. Síntesi del compost 308

Experiència 1

Es dissolen 200 mg (1.3 mmol) d'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (**5**) en 5 ml de DMSO anhidre. S'afegeixen 2 equivalents de NaH 60% (102 mg), suspesos en 1 ml de DMSO anhidre, i es deixa agitant durant 10 min a t.a. sota atmosfera inerta. Tot seguit, s'addicionen lentament 4 equivalents de iodur de metil (710 mg) i el sistema es deixa evolucionar amb agitació durant 20 min. A continuació, la mescla de reacció s'extreu amb Cy (3x25 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i la fase orgànica resultant s'asseca sobre MgSO₄ anhidre. El dissolvent es destil·la a pressió reduïda. S'obtenen 173 mg d'una mescla 1:1 dels compostos **288** i **308** (identificada per ¹H-RMN).

Experiència 2

Es dissolen 200 mg (1.3 mmol) d'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (**5**) en 5 ml de THF sec. S'afegeixen 2 equivalents de NaH 60% (102 mg), suspesos en 1 ml de THF sec i es deixa agitant durant 1 h a t.a. i sota atmosfera inerta. Tot seguit, s'addicionen lentament 5 equivalents de iodur de metil (897 mg) i el sistema es deixa evolucionar amb agitació durant 2 dies. A continuació, el sòlid format es separa per filtració i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 194 mg d'un c.c..

Experiència 3

Es dissolen 200 mg (1.3 mmol) d'àcid (*R*)-hexahidromandèlic (**5**) en 5 ml de DMSO anhidre. S'afegeixen 2.5 equivalents de NaH 60% (127 mg), suspesos en 1 ml de DMSO anhidre, i es deixa agitant durant 30 min a t.a. sota atmosfera inerta. Tot seguit, s'addicionen lentament 5 equivalents de iodur de metil (897 mg) i el sistema es deixa evolucionar amb agitació durant 3 h. A continuació, la mescla de reacció s'extreu amb Cy (3x25 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i la fase orgànica resultant es renta amb aigua (2x25ml) i amb salmorra (2x25 ml) i s'asseca sobre MgSO₄ anhidre. El dissolvent es destil·la a pressió reduïda. S'obtenen 212 mg d'una mescla 1:2 dels compostos **288** i **308** (identificada per ¹H-RMN).

Experiència 4

La reacció anterior es reproduïx afegint 3 equivalents de NaH 60% (153 mg). De nou, s'obtenen 221 mg d'una mescla 1:4 dels compostos **288** i **308** (identificada per ¹H-RMN).

Experiència 5

La reacció anterior es reproduïx, elevant la proporció de NaH 60% afegit fins 3.5 eq (179 mg) respecte la quantitat afegida de **5**. S'obtenen 600 mg d'un oli groguenc que correspon a **308** amb un rendiment quantitatiu.

IR (film CHCl₃): 2987, 2928, 2854, 2829, 1752, 1737, 1450, 1265, 1196, 1179, 1130, 1117, 1006 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.80 (3H, s, COOCH₃), 3.53 (1H, d, J=5.0 Hz, H-C2), 3.36 (1H, s, C2-OCH₃), 1.74-1.11 (11H, m, Cy).

3.2. Síntesi del compost 307

Es dissolen 544 mg (2.9 mmol) de **308** en 10 ml d'una dissolució 1 M de KOH/EtOH. El sistema es manté en agitació a t.a. durant 24 hores. La mescla de reacció es neutralitza amb una dissolució de HCl al 10% fins a pH = 3 – 4. Tot seguit, s'afegeixen 10 ml d'aigua desionitzada i s'elimina el EtOH a pressió reduïda. El residu obtingut es tracta amb 20 ml d'aigua i es realitzen extraccions amb AcOEt (4x30 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i la fase orgànica resultant es renta amb 50 ml de salmorra i s'asseca sobre MgSO₄ anhidre. El dissolvent es destil·la a pressió reduïda. S'obtenen 461 mg (2.7 mmol) d'un oli corresponent a **307** (Rdt.:92 %).

IR (film CHCl₃): 3420-2560 (ample), 2987, 2929, 2855, 1719, 1451, 1196, 1179, 1118 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.59 (1H, d, J=5.0 Hz, H-C2), 3.44 (1H, s, OCH₃), 1.77-1.20 (11H, m, Cy).

3.3. Síntesi del compost 309

Experiència 1

Es dissolen 1.801 g (0.01 mol) de 3,4–dimetoxiacetofenona (**310**) i 1.221 g (0.01 mol) de *p*-hidroxibenzaldehyd (**311**) en 200 ml d'etanol. A continuació s'afegeixen amb agitació 200 ml d'una dissolució aquosa de KOH al 50%. La mescla de reacció es deixa evolucionar en agitació durant 72 h. Posteriorment, s'afegeixen 50 ml d'aigua a 0 °C i s'ajusta el pH a 3-4 mitjançant una dissolució aquosa de HCl 2 M. A continuació es destil·la el EtOH a pressió reduïda i es fan extraccions amb AcOEt (3x50 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i la fase orgànica resultant es renta amb salmorra (3 x 20 ml), s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i finalment se'n destil·la el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 3.50 g d'un cru de color vermellós que es purifica mitjançant cromatografia flash (SiO₂, Cy/AcOEt (7:3)). Les fraccions obtingudes es descriuen a la taula 31.

Fraccions	Quantitat (g)	Assignació
F1	0.19	310 + imp.
F2	0.26	311
F3	1.09	Imp.
F4	0.56	309 + imp.

Taula 31. Cromatografia flash del cru obtingut en la síntesi de **309**.

S'obtenen 560 mg de **309** impurificat amb un rendiment aproximat del 20%.

Experiència 2

Es dissolen 1.801 g (0.01 mol) de 3,4–dimetoxiacetofenona (**310**) i 1.221 g (0.01 mol) de *p*-hidroxibenzaldehyd (**311**) en 50 ml de MeOH. Seguidament, s'afegeixen 3 g de H₂SO₄ concentrat i el sistema es deixa en agitació a reflux durant 24 h. A continuació s'addiciona una dissolució de NaOH al 15 % fins a un pH de 3-4. El dissolvent es destil·la a pressió reduïda. A continuació, es realitzen extraccions amb AcOEt (3x40 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i la fase orgànica resultant es renta amb salmorra, s'asseca sobre MgSO₄ anhidre. El dissolvent es destil·la a pressió reduïda.

S'obtenen 3.53 g d'un cru de color groguenc que es purifica mitjançant cromatografia flash (SiO₂, Cy:AcOEt (3:1)). S'obtenen 1.49 g (5.2 mmol) de **309** (Rdt.: 52%).

IR (film CHCl₃): 3213, 3084, 3020, 2962, 2937, 2839, 1644, 1596, 1583, 1562, 1512, 1463, 1448, 1419, 1334, 1262, 1246, 1201, 1166, 1148, 1023 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.79 (2H, d, J=15.5 Hz, -CH=CH-C(=O)-), 7.69 (1H, J=2.0,8.5 Hz, H-C6'), 7.62 (1H, d, J=2.0 Hz, H-C2'), 7.56 (2H, m, H-C2, H-C6), 7.44 (1H, d, J=15.5 Hz, -CH=CH-C(=O)-), 6.94 (2H, d, J=8.5 Hz, H-C5'), 6.91 (2H, m, H-C3, H-C5), [3.97 (3H, s), 3.96 (3H, s), Ar-OCH₃].

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 189.3/s -C(=O)-CH=CH-, 158.5/s C4, 153.1/s C4', 149.0/s C3', 144.5/d C(=O)-CH=C_H, 131.2/s C1', 130.4/d C2,C6, 127.3/s C1, 123.0/d C6', 118.9/d -CH=C_H-C(=O)-, 116.0/d C3,C5, 110.8/d C5', 109.9/d C2', [56.1/q, 56.0/q, OCH₃].

EM-IQ: 325 (24), 315 (12), 314 (28), 313 (81), 299 (16), 287 (60), 286 (78), 285 (100), 284 (67), 283 (12), 271 (18), 269 (12), 193 (12), 191 (41), 181 (27), 167 (23), 166 (19), 165 (97), 149 (18), 147 (58), 139 (32), 137 (18), 135 (15), 123 (15), 121 (47), 107 (30), 95 (17).

EM-AR: trobat 285.1126 [M+H]⁺, (calc. 285.1127, C₁₇H₁₇O₄).

3.4. Síntesi del compost 312

Es dissolen 2.74 g (16 mmol) de **307** en 93 ml de THF sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 2.2 ml de TEA (16 mmol) i a continuació 2.6 ml de clorur de 2,4,6-triclorobenzoil (16 mmol). El sistema es manté en agitació a t.a. durant 30 min. El sòlid blanc precipitat es separa per filtració. El dissolvent del filtrat es destil·la a pressió reduïda. L'oli obtingut es dissol sota atmosfera inerta en 46 ml de dioxà sec. Sota atmosfera inerta s'hi addicionen 70 ml d'una dissolució de 3.72 g (13 mmol) de **309** i 3.35 g (27 mmol) de DMAP en dioxà. El sistema es manté en agitació a t.a. durant 16 hores. Tot seguit, el cru de reacció es dilueix amb 200 ml d'AcOEt. La fase orgànica resultant es renta amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃ (3x200 ml), es renta amb 200 ml de salmorra i s'asseca amb MgSO₄ anhidre. El dissolvent es destil·la a pressió reduïda. S'obtenen 5.69 g d'un cru que es purifica mitjançant cromatografia flash (SiO₂, Cy:AcOEt (2:1)). S'obtenen 3.458 g (7.9 mmol) d'un oli groguenc corresponent a **312** impurificat. Es dilueix l'ester impurificat en la mínima quantitat de Et₂O calent i el sistema es deixa refredar fins a t.a.. El sòlid blanquinós precipitat es separa per filtració. El dissolvent del filtrat es destil·la a pressió reduïda, rendint 2.85 g (6.5 mmol) d'un sòlid groc pàl·lid corresponent a **312** (Rdt.: 50%).

IR (film CHCl₃): 3078, 3001, 2930, 2853, 1766, 1658, 1598, 1580, 1513, 1506, 1464, 1451, 1420, 1261, 1209, 1165, 1115, 1025 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.80 (2H, d, J=15.6 Hz, -CH=CH-C(=O)-), 7.69 (1H, J=2.0,8.5 Hz, H-C6'), 7.68 (2H, m, H-C2, H-C6), 7.63 (1H, d, J=2.0 Hz, H-C3'), 7.52 (1H, d, J=16 Hz, -CH=CH-C(=O)-), 7.19 (2H, m, H-C3, H-C5), 6.94 (2H, d, J=8.5 Hz, H-C5'), [3.98 (3H, s), 3.98 (3H, s), Ar-OCH₃], 3.78 (1H, d, J=5.5 Hz, H-C2''), 3.50 (1H, s, C2''-OCH₃), 1.96-1.10 (11H, m, Cy).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 188.2/s C(=O)-CH=CH-, 170.5/s C1'', 153.2/s C4, 151.7/s C4', 149.1/s C3', 142.6/d C(=O)-CH=C_H-, 132.9/s C1, 131.1/s C1', 129.4/d C2,C6, 122.9/d C6', 121.9/d C3,C5, 121.8/d C(=O)-CH=CH-, 110.7/d C5', 109.9/d C2', 85.4/d

C2'', 58.8/q C2''-OCH₃, [56.1/q, 56.1/q, C_{ar}-OCH₃], 41.3/d CH_{Cy}, [29.1/t, 28.1/t, 26.2/t, 26.1/t, 26.0/t, CH_{2,Cy}].

EM-IQ: 604 (12), 480 (15), 470 (14), 469 (30), 468 (85), 454 (11), 443 (13), 442 (64), 441 (100), 440 ([M+H]⁺, 100), 439 ([M]⁺, 22), 438 (26), 408 ([M-31]⁺, 14), 406 ([M-33]⁺, 12), 358 ([M-81]⁺, 37), 331 (31), 330 (85), 329 ([M-90]⁺, 70), 326 (13), 315 (19), 314 (77), 312 (11), 302 (17), 300 (16), 288 (30), 287 (89), 286 (92), 285 (62), 284 (26), 270 (11), 258 (13), 257 (12), 166 (15), 165 (82), 147 (48), 139 (14), 128 (22), 127 (69), 126 (39), 125 (44), 121 (12), 95 (63).

EM-AR: trobat 439.2119 [M+H]⁺, (calc. 439.2120, C₂₆H₃₁O₆).

3.5. Desprotecció de metoxils del compost 312

3.5.1. Síntesi de 3,4-dihidroxiacetofenona (313)

Experiència 1 - Me₃Sil

Es dissolen 500 mg (2.7 mmol) de 3,4-dimetoxiacetofenona (**310**) en 3 ml de CHCl₃. Sota atmosfera inerta s'addicionen 1.44 g (1 ml) (7.0 mmol) de Me₃Sil. El sistema es deixa evolucionar en agitació, en la foscor a 50 °C durant 48 hores. A continuació, s'addicionen 600 µl de MeOH i el sistema es deixa en agitació a 50 °C durant 4 hores. Tot seguit, s'elimina el dissolvent per destil·lació a pressió reduïda. El residu resultant es dissol en 30 ml de AcOEt. La dissolució resultant es renta amb 30 ml d'una dissolució aquosa saturada de NaHSO₃, amb 30 ml d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃ i amb 30 ml de salmorra. La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obté un cru complex.

Experiència 2 - Me₃Sil

Es dissolen 500 mg (2.7 mmol) de 3,4-dimetoxiacetofenona (**310**) en 3 ml de CHCl₃. Sota atmosfera inerta a 0 °C s'addicionen gota a gota 1.44 g (1 ml) (7.0 mmol) de Me₃Sil. El sistema es deixa evolucionar en agitació fins a t.a. en la foscor a 50 °C durant 48 hores. A continuació, s'addicionen 600 µl de MeOH i el sistema es deixa en agitació a 50 °C durant 4 hores. Tot seguit, s'elimina el dissolvent per destil·lació a pressió reduïda. El residu resultant es dissol en 30 ml de AcOEt. La dissolució resultant es renta amb 30 ml d'una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃. La dissolució aquosa resultant s'extreu amb AcOEt (3x30 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i es renten amb 30 ml de salmorra. La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i el dissolvent s'elimina a pressió reduïda. S'obté un c.c..

Experiència 1 - BBr₃

Es dissolen 305 mg (1.7 mmol) de 3,4-dimetoxiacetofenona (**310**) en 5 ml de DCM. Sota atmosfera inerta a -78 °C, s'addicionen gota a gota 6.7 ml (6.7 mmol) d'una dissolució de tribromur de bor (BBr₃) 1M. El sistema es manté en agitació a -78 °C durant 4 hores. Posteriorment es puja gradualment la temperatura fins a -40 °C i el sistema es deixa en agitació a aquesta temperatura durant 4 hores més. Un cop transcorregut aquest temps, es deixa evolucionar el sistema fins a t.a. i es deixa en agitació durant 16 h. Tot seguit, s'addicionen 25 ml d'aigua a 0 °C sobre el medi de reacció i seguidament es realitzen extraccions amb CHCl₃ (3 x 30 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i es renten amb 30 ml de salmorra. La fase orgànica s'asseca

sobre MgSO₄ anhidre i el dissolvent es destil·la a pressió reduïda. S'obtenen 41 mg (0.23 mmol) d'un oli blanquinós corresponent al 3,4-dihidroxiacetofenona (**313**) (Rdt.: 14 %).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.66 (1H, d, J=2.0 Hz, H-C2), 7.50 (1H, J=2.0,8.5 Hz, H-C6), 6.63 (1H, d, J=8.5 Hz, H-C5), 2.57 (1H, s, CH₃).

3.5.2. Intent de síntesi del compost 285

Metodologia general

Es dissolen 100 mg (0.23 mmol) de la calcona **312** en 20 ml de DCM. Sota atmosfera inerta s'addicionen gota a gota **A** equivalents (**B** ml; **B** mmol) d'una dissolució 1M de BBr₃ en CH₂Cl₂ a una temperatura de **C**. El sistema es manté en agitació durant **D** h (taula 32). Posteriorment, s'addicionen 25 ml d'aigua a 0 °C sobre el medi de reacció i seguidament es realitzen extraccions amb DCM (3 x 30 ml). Les fases orgàniques s'ajunten i la fase orgànica resultant es renta amb 30 ml de salmorra, s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i se'n destil·la el dissolvent a pressió reduïda.

Exp.	A Eq BBr ₃	B mmol BBr ₃	C T addició /°C	D Temps reacció / h	Resultat
1	6	1.36	-78	-78 °C → 2 t.a → 18	c.c.
2*	6	1.36	-78	-78 °C → 5 -42 °C → 3 t.a → 17	c.c.
3	4.5	1.03	-40	5	316
4	4.5	1.03	-40	9	316
5	10	2.26	-40	9	c.c.

*L'experiència 2 ha estat la única en la que s'ha utilitzat una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃ per fer el *quenching*.

Taula 32. Taula resum d'experiències per l'obtenció de 309

Després de realitzar l'experiència 3, s'obtenen 116 mg d'un cru que es purifica mitjançant cromatografia de columna flash (SiO₂, Cy:AcOEt (3:1)). S'obtenen 26 mg de calcona **316** pura amb un rendiment del 27 %. Les fraccions obtingudes es descriuen a la taula 33.

Fracció	Quantitat	Composició
1	33	imp.
2	11	316 + imp.
3	26	316
4	35	316 + imp.

Taula 33. Cromatografia flash del cru obtingut en l'experiència 3.

Després de realitzar l'experiència 4, s'obtenen 94 mg d'un cru que es purifica mitjançant cromatografia de columna flash (SiO₂, Cy:AcOEt (7:2)). Les fraccions obtingudes es descriuen a la taula 34.

Fracció	Quantitat	Composició
1	29	c.c.
2	21	316
3	32	316 + imp.

Taula 34. Cromatografia flash del cru obtingut en l'experiència 4.

S'obtenen 21 mg de **316** (Rdt.=20%). Sobre la fracció 3 es fan successives purificacions mitjançant cromatografia Lobar, preparativa i recristal·lització sense poden arribar a concloure que en les impureses presents a dita fracció es troba el producte d'interès **285**.

Compost 316

IR (film evap. CHCl₃): 3451, 2929, 2853, 1759, 1656, 1598, 1579, 1506, 1463, 1450, 1420, 1321, 1262, 1209, 1165, 1111, 1023 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.80 (2H, d, J=15.5 Hz, -CH=CH-C(=O)-), 7.69 (1H, J=2.0,8.5 Hz, H-C6'), 7.69 (2H, m, H-C2, H-C6), 7.63 (1H, d, J=2.0 Hz, H-C3'), 7.53 (1H, d, J=15.5 Hz, -CH=CH-C(=O)-), 7.18 (2H, m, H-C3, H-C5), 6.94 (2H, d, J=8.5 Hz, H-C5'), [3.98 (3H, s), 4.30 (1H, d, J=5.5 Hz, H-C2''), 3.98 (3H, s), Ar-OCH₃], 1.90-1.10 (11H, m, Cy).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 188.1/s C(=O)-CH=CH-, 173.1/s C1'', 153.2/s C4, 151.5/s C4', 149.2/s C3', 142.4/d C(=O)-CH=CH-, 133.2/s C1, 131.1/s C1', 129.5/d C2,C6, 123.0/d C6', 122.1/d C(=O)-CH=CH-, 121.8/d C2,C6, 110.7/d C5', 109.9/d C2', 75.0/d C2'', [56.1/q, 56.1/q, OCH₃], 42.2/d CH_{1,Cy}, [29.2/t, 27.0/t, 26.6/t, 26.3/t, 26.1/t, CH_{2,Cy}].

EM-IQ: 428 (11), 427 (20), 426 ([M+H]⁺, 58), 313 (23), 287 (39), 286 (100), 285 (37), 165 (23), 147 (17), 95 (36).

EM-AR: trobat 425.1968 [M+H]⁺, (calc. 425.1964, C₂₅H₂₉O₆).

ANNEX: BIOASSAJOS

1. INTRODUCCIÓ

L'avaluació de l'activitat biològica de brassinoesteroides (BRs) va ser duta a terme a través de bioassajos que inicialment havien estat desenvolupats per mesurar l'activitat d'altres fitohormones, com auxines, gibberel·lines o citoquinines, i que posteriorment van ser adaptats per a ser emprats en BRs. En aquests bioassajos es mesura un efecte macroscòpic en una espècie del regne vegetal causat per una acció a nivell molecular del compost aplicat.

Els bioassajos més emprats fins al moment per avaluar l'activitat biològica de BRs són els que es mostren a la taula 36.¹⁷²

Test	Límit de detecció (M)
Tomàquet ¹⁷³	$4 \cdot 10^{-9}$
Rave ¹⁷³	$8 \cdot 10^{-9}$
Mongeta (1 ^{er} entrenús) ¹⁷⁴	$3 \cdot 10^{-10}$
Mongeta (2 ^{on} entrenús) ¹⁷⁵	$2 \cdot 10^{-11}$
Inclinació làmina d'arròs (planta tallada) ²⁶	$1 \cdot 10^{-13}$
Inclinació làmina d'arròs (planta sencera) ²⁷	$1 \cdot 10^{-13}$
Mongeta (2 ^{on} entrenús sensibilitzat) ¹⁷⁶	$1 \cdot 10^{-14}$
Inhibició del pèsol ¹⁷⁷	$1 \cdot 10^{-14}$

Taula 36. Bioassaigs més emprats per avaluar l'activitat de BRs.

Els bioassajos del tomàquet i del rave van ser molt utilitzats en un principi per avaluar l'activitat biològica de BRs, però es van anar abandonant en aparèixer altres tests més sensibles. En aquest sentit, un dels bioassajos més sensibles i més emprats avui en dia per determinar l'activitat biològica de BRs és el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT, *Rice Lamina Inclination Test*), desenvolupat per Maeda¹⁷⁸ l'any 1965 per avaluar l'activitat biològica d'auxines.

1.1. Variants del test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT)

En el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT), l'avaluació de l'activitat es realitza mesurant l'angle d'inclinació que hi ha entre la segona làmina i la tija de la planta, essent aquesta mesura proporcional a l'activitat biològica del compost aplicat. La correspondència que hi ha entre l'angle d'inclinació de la làmina i l'activitat del BR és deguda a la propietat que presenten els BRs actius de provocar l'elongació i/o la divisió cel·lular, que provocarà una inclinació de la fulla que es desenvolupa en el punt d'aplicació. Així, una major inclinació implica una major activitat de l'anàleg.

A la literatura hi ha descrites dues variants del RLIT: la de plana tallada²⁶ i la de planta sencera.²⁷

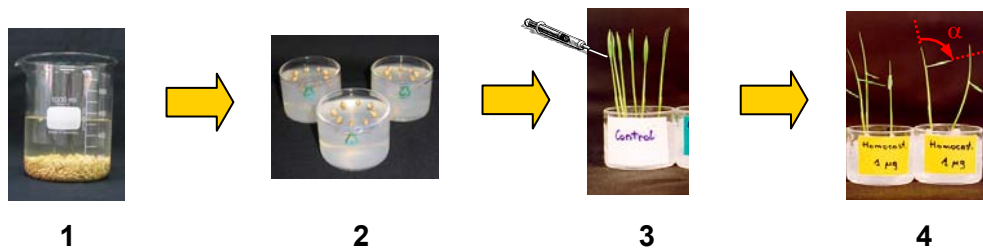
Planta tallada.²⁶ consisteix en deixar germinar les llavors en aigua, sembrar-les i, després d'uns dies, tallar la tija en segments d'igual longitud que la segona làmina i mantenir-les submergides 1 dia en aigua. A continuació, s'escullen aquelles plantes que presentin una inclinació concreta i es deixen en remull amb una concentració determinada del BR que es vulgui avaluar durant 2 dies, després dels quals es

procedeix a la mesura. La mesura de l'activitat s'aconsegueix en 12-13 dies. Aquest test es va realitzar anteriorment a l'equip,³⁸ però es va descartar degut a la baixa reproductibilitat que presentava.

Planta sencera:²⁷ consisteix, a diferència del cas anterior, en injectar el BR que es vulgui avaluar a una dosi determinada a l'entrenús de la planta sencera. Aquesta variant del RLIT va ser desenvolupada inicialment amb la varietat japonesa d'arròs Tan-Ginbozu.²⁷ A l'equip es va posar a punt aquest bioassaig adaptant-lo a varietats autòctones del delta de l'Ebre a fi de tenir un conjunt de dades homogènies per tal de poder realitzar un primer estudi de correlació estructura-activitat.³⁷ De totes les varietats assajades, la Bahia és la que va donar millors resultats. Posteriorment, modificant el fotoperíode d'una de les etapes, es va aconseguir millorar la sensibilitat del test.³⁸ No obstant, aquesta variant del RLIT no permet l'aplicació de compostos a concentracions superiors a 1 µg/planta, degut a la falta d'assimilació del BR per part de la planta. En aquests casos, s'observa una taca blanca en el punt d'injecció.

1.2. Protocol

El protocol per mesurar l'activitat d'un BR comprèn les etapes que es descriuen a continuació:



1. Germinació: les llavors d'arròs es submergeixen en aigua desionitzada i es situen en una cambra de cultiu durant 2 dies a 30 °C amb un fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor.
2. Sembra: primer de tot es prepara el medi de cultiu, que és un gel d'agar-agar al 0.5% en aigua. Les llavors germinades es sembren en aquest suport amb la radícula cap amunt i en contacte amb la superfície. S'introdueixen en un recipient on la humitat relativa es manté aproximadament al 90%, i es col·loquen en la cambra de cultiu amb les mateixes condicions que l'etapa anterior durant 4 dies.
3. Aplicació: abans del tractament, es realitza una selecció rigorosa de les plantes que han de ser injectades, eliminant totes aquelles en les que no s'observa el segon entrenús i les que ja tenen la segona làmina desenvolupada. A continuació, s'injecten 0.5 µl de la dissolució del BR en etanol al 95% en el segon nus de desenvolupament de la segona làmina i es col·loquen en la cambra de cultiu a 30 °C durant 2 dies a la foscor. Cada compost que es vulgui avaluar s'ha d'aplicar en un mínim de 10-15 plantes.
4. Mesura: es tallen les plantes 2 cm per sota de l'entrenús i es mesura l'angle d'inclinació entre l'anvers de la segona làmina i la tija de la planta (figura 110).

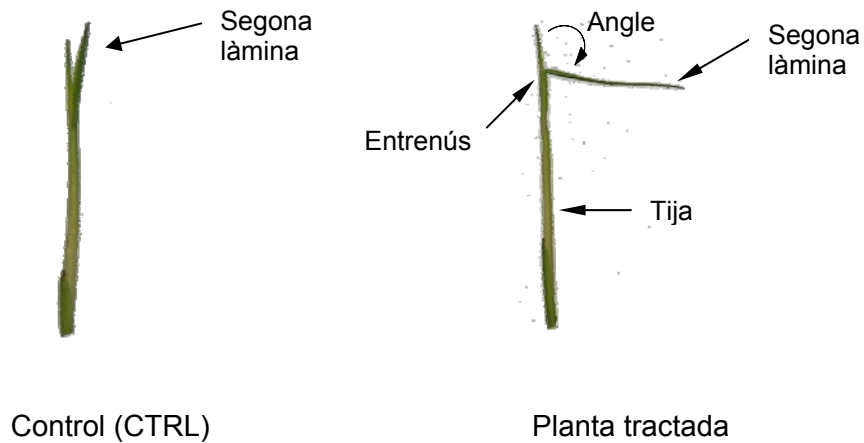


Figura 110: Mesura de l'angle d'inclinació de la làmina d'arròs

5. Tractament estadístic: es realitza el tractament estadístic de les dades, amb el qual es calcula la repetibilitat i la reproductibilitat, així com la corba dosi-resposta dels compostos que han resultat ser actius.

2. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES

2.1. Per a cada experiment (BA ##)

Primer de tot cal definir tot el tractament estadístic que s'ha realitzat sobre les dades obtingudes experimentalment. Els angles obtinguts en cada experiment es mostren en una taula, com la taula 37, on es col·loquen per columnes els compostos assajats a una dosi determinada i, per files, s'introdueixen les dades dels angles obtinguts experimentalment. A la part inferior de la taula, i per cada compost i dosi, es troben els paràmetres estadístics.

BA ##	CTRL	HCS	Compost X
dosi (µg/planta)	0	1	1
	0	111	90
	0	111	92
	0	112	104
	0	113	106
	0	114	110
	4	115	112
	5	115	114
	5	117	114
	11	118	116
Mitjana	4	116	109
M-Mc:	-	112	105
DesvSt:	5	3	8
nº Plantes	9	9	9
REPET	2	2	3

Taula 37. Exemple de taula per presentar els resultats obtinguts en el RLIT. Els paràmetres es descriuen a continuació:

BA ##	Nom que identifica un experiment concret.
M	Mitjana aritmètica dels angles per a cada compost a una dosi determinada (\bar{x}_i).
Mc	Mitjana aritmètica dels angles del control (CTRL) (\bar{x}_c).
M-Mc	Diferència entre la mitjana d'un compost-dosi i la del control (\bar{x}_{ic}).
DesvSt	Desviació estàndard associada a M (σ_i) o a Mc (σ_c). És la mesura de la dispersió dels valors respecte la mitjana.
Nº plantes	Nombre de plantes que intervenen en el càlcul estadístic.
REPET	desviació estàndard associada a M-Mc ($\sigma_{\bar{x}_{ic}}$).

• **Mitjana (M) i desviació estàndard (DesvSt) :**

Per treballar amb dades normalitzades, a la mitjana M obtinguda se li ha de restar la mitjana del control (Mc) corresponent al mateix experiment (BA ##). La normalització de les dades es fa per poder relacionar els diferents experiments en que s'assaja el mateix compost a una concentració determinada, ja que entre una experiència i una altra poden haver petites variacions. Les equacions corresponents a la mitjana aritmètica (\bar{x}_i) i a la desviació estàndard (σ_i) es representen a continuació:

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{n=1}^{N_i} x_n}{N_i}$$

Equació 11

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_i} (x_n - \bar{x}_i)^2}{N_i - 1}}$$

Equació 12

On x_n és l'angle d'inclinació de les plantes tractades amb el compost "i" a una concentració determinada i N_i és el nº de plantes tractades amb el compost "i" a una concentració determinada.

• **Repetibilitat (REPET):**

La desviació estàndard associada a M-Mc ($\sigma_{\bar{x}_{ic}}$) es calcula segons la propietat de la varianza que es defineix a continuació. Si x i y són variables aleatòries independents, aleshores:

$$\sigma_{ax-by}^2 = a^2 \cdot \sigma_x^2 + b^2 \cdot \sigma_y^2$$

Equació 13

On x correspondria a la mitjana del compost (\bar{x}_i) i y correspondria a la mitjana del control (\bar{x}_c).

Sabent que les desviacions estàndard d'aquestes variables s'obtenen mitjançant les equacions 14 i 15,

$$\sigma_x = \sigma_{\bar{x}_i} = \frac{\sigma_i}{\sqrt{N_i}}$$

Equació 14

$$\sigma_y = \sigma_{\bar{x}_c} = \frac{\sigma_c}{\sqrt{N_c}}$$

Equació 15

aleshores la variança pren la forma:

$$\sigma_{x_{ic}}^2 = \sigma_{(\bar{x}_i - \bar{x}_c)}^2 = \sigma_{\bar{x}_i}^2 + \sigma_{\bar{x}_c}^2 = \frac{\sigma_i^2}{N_i} + \frac{\sigma_c^2}{N_c}$$

Equació 16

$$\sigma_{x_{ic}} = \sqrt{\frac{\sigma_i^2}{N_i} + \frac{\sigma_c^2}{N_c}}$$

Equació 17

Aquesta desviació estàndard normalitzada ($\sigma_{x_{ic}}$) rep el nom de repetibilitat (REPET) i dóna una idea de la variabilitat de la mitjana dels angles obtinguts per a un compost a una dosi determinada, dins d'un experiment donat (BA ##).

2.2. Per a cada compost a una dosi determinada

Els diferents experiments realitzats on s'ha aplicat el mateix compost es troben agrupats en un nou tipus de taula. En ella s'indica el compost assajat a les diferents concentracions aplicades i els següents paràmetres estadístics: mitjana (MI), repetibilitat mitjana (REPET M) i reproducibilitat (REPRO). A la taula 38 es mostra un exemple d'aquest tipus de taula i es defineixen els paràmetres utilitzats:

Compost avaluat						
Dosi ($\mu\text{g/planta}$)	1		0.1		0.01	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
	75	9	53	8	40	8
	84	7	34	6	25	6
	93	6	10	5	6	3
MI/REPET M	84	8	31	7	23	6
REPRO	13		29.9		24	

Taula 38. Exemple de taula emprada per presentar els resultats d'un compost.

Mitjana (MI): És la mitjana dels valors de M-Mc obtinguts per a una dosi determinada de compost realitzada en diversos experiments. La mitjana global pren la següent forma:

$$\bar{x}_{ik} = \frac{\sum_{j=1}^{L_i} x_{ic}}{L_i}$$

Equació 18

On L_i és el nº d'experiments on ha estat aplicat el compost "i" a una dosi determinada.

Aquesta mitjana global té associada dues desviacions estàndard: la que fa referència al concepte de reproductibilitat i la que fa referència al de repetibilitat.

Reproductibilitat (REPRO): És la desviació estàndard associada al càlcul de la mitjana (MI) i s'obté de promitjar les diferents mitjanes normalitzades (M-Mc) que provenen dels diferents experiments on s'ha aplicat el compost a la concentració determinada. Es defineix com a REPRO i pren la forma següent:

$$\text{REPROD} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{L_i} (\bar{x}_{ic} - \bar{x}_{ik})^2}{L_i - 1}}$$

Equació 19

Aquest paràmetre dóna una idea de com varia la resposta d'un compost a una concentració determinada en els diferents experiments.

Repetibilitat mitjana (REPET MI): Es defineix com la mitjana de les desviacions estàndard de cada experiment (REPET) i indica la dispersió dels angles obtinguts a la mateixa dosi aplicada en els diferents experiments. Pren la següent forma:

$$\text{REPET MITJ} = \frac{\sum_{n=1}^{L_i} \text{REPET}}{L_i}$$

Equació 20

La reproductibilitat i la repetibilitat seran millors quan menors siguin els valors corresponents. En el càlcul d'aquests tres paràmetres també es desestimen aquells experiments en els que els resultats surten de la tendència general. Aquests valors es mostren en vermell en les taules que es presenten a la part experimental.

2.3. Factors que poden introduir un error en els resultats

Existeixen una sèrie de factors a considerar a l'hora de realitzar el bioassaig que poden influir en la dispersió dels resultats. Uns són els factors extrínsecs, que són inherents a la pròpia metodologia del test i que es poden minimitzar tenint cura d'una sèrie de precaucions, i els altres són els factors intrínsecs, que depenen de la planta durant el seu desenvolupament i no poden controlar-se.

- **Factors extrínsecs**

Aquests factors depenen de la metodologia del test i es poden minimitzar seguint una sèrie de precaucions:

-La influència de la llum:¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Donades les característiques de la cambra de cultiu, la llum no és totalment homogènia en el seu interior i això fa que en les zones on la llum és més intensa s'afavoreixi el creixement de les plantes. Per evitar aquest factor, les plantes s'han de distribuir aleatòriament al interior de la cambra. Pel què fa a l'etapa d'aplicació, la llum també s'ha de tenir en compte. Un BR pot variar la seva resposta en funció del fotoperíode d'aquesta etapa. En el protocol inicial del bioassaig desenvolupat en l'equip (*RLIT I*),³⁸ es va descriure realitzar l'aplicació del BR amb un fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor. Posteriorment es va observar que la sensibilitat dels BRs aplicats en aquesta etapa del bioassaig augmentava si el bioassaig es realitzava amb un fotoperíode de 24 h de foscor.

-Etapa d'aplicació del BRs: És un dels altres factors a tenir en compte. Aquesta etapa sol ser llarga (unes 2 h) i, durant aquest període, la segona làmina de les plantes es comença a obrir. Per tant, es modifica l'ordre d'aplicació dels BRs en els diferents bioassajos per evitar que un mateix compost sigui sempre aplicat sobre les plantes més desenvolupades.

-Etapa d'aplicació del BRs amb la xeringa: Durant aquesta aplicació cal evitar que la dissolució resti molta estona oberta ja que pot ser que aquesta es concentri lleugerament per evaporació del dissolvent, modificant lleugerament la dosi injectada. Cal esmentar però, que en estudis anteriors en l'equip,³⁷ es va observar que petites modificacions en la dosi no afectaven al resultat i que cal que es produeixi una variació d'un ordre de magnitud en la dosi perquè s'observi un canvi significatiu en la resposta.

-Injecció: S'ha d'assegurar la injecció total de la mostra en la planta, descartant totes aquelles plantes en les que la dissolució de BR regalimi per la tija.

-Etapa de mesura de l'angle: En l'etapa de mesura de l'angle, s'ha de dibuixar l'angle immediatament després de tallar la tija de la planta, ja que estudis anteriors realitzats en l'equip,^{37,38} demostren que la fulla es va plegant al llarg del temps, fent disminuir l'angle.

-Factors externs: Existeix una dispersió deguda a factors externs. Per detectar aquesta dispersió, s'injecta en cada bioassaig la 28-homocastasterona (HCS) (**11**), un compost actiu a una dosi de 1 µg/planta. Es reserven en cada bioassaig unes 10-15 plantes per aquest tractament i es sotmeten al mateix protocol. Qualsevol variació en la resposta de la HCS (**11**) permet detectar un factor extern en la realització del test com pot ser: mal funcionament del fotoperíode, llavors envellides, baixa humitat en la cambra de cultiu, variacions de temperatura, etc. És d'esperar que si afecta al BR de referència, també afecti a la resta de productes aplicats, invalidant tot el bioassaig. A la figura 111 es mostra la tendència general de la HCS (**11**) a 1 µg/planta i la seva dispersió.

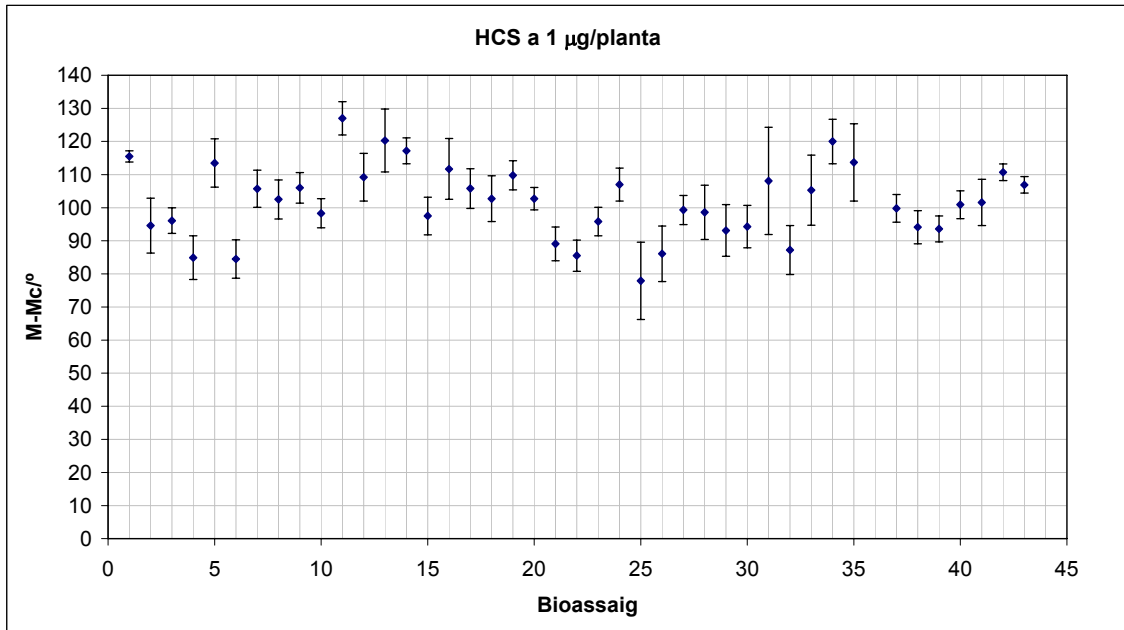


Figura 111. Resultats del valor de la mitjana normalitzada (M-Mc) corresponent al BR de referència (HCS) (11) de tots els bioassaig realitzats.

- **Factors intrínsecs**

Aquests factors depenen de la planta durant el seu desenvolupament. Per avaluar-los es reserven en cada experiment unes 10-15 plantes sense tractar, anomenades control (CTRL), que seran sotmeses al mateix protocol. Això permet conèixer quina és la dispersió natural en el valor de l'angle mesurat causat per la pròpia planta en l'etapa de creixement. A la figura 112 es mostra el valor Mc i permet veure la dispersió d'aquest al llarg dels diferents bioassaig:

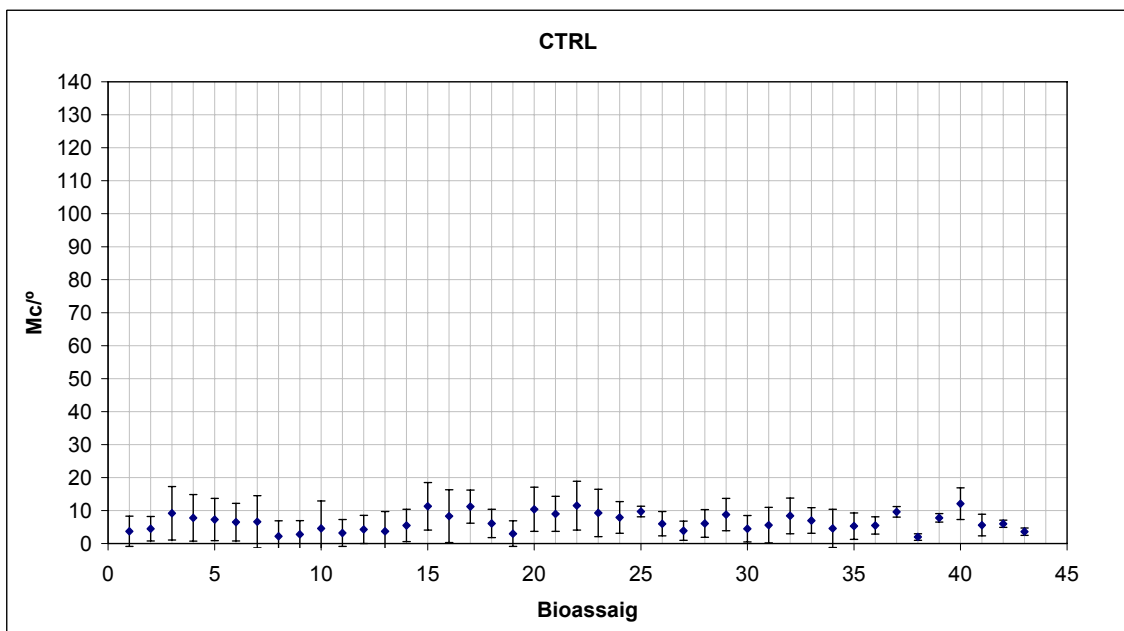
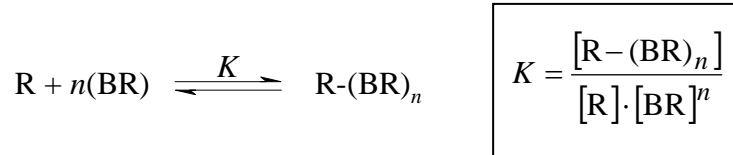


Figura 112. Resultats de Mc de tots els bioassaig realitzats.

3. REPRESENTACIÓ DE LA CORBA DOSI - RESPOSTA

Com a dada d'activitat s'utilitza el valor del logaritme de la dosi a la qual el valor d'activitat correspon al 50% de l'activitat màxima. L'ús d'aquest valor està recomanat en les relacions estructura – activitat,¹⁸² degut a que el valor de la dosi efectiva al 50% és proporcional a la constant d'equilibri del procés d'interacció entre substrat i receptor biològic.

Suposant el cas d'interacció d'un receptor R amb n molècules d'un BR determinat, on $R-(BR)_n$ és el complex receptor-brassinosteroid:



Equació 21

Quan hi ha el 50% de l'activitat màxima, el nombre de receptors lliures i ocupats és el mateix:

$$K_{50\%} = \frac{[R-(BR)_n]_{50\%}}{[R]_{50\%} \cdot [BR]_{50\%}^n} = \frac{1}{[BR]_{50\%}^n}$$

Equació 22

Per tant, el logaritme de K resulta proporcional al logaritme de la concentració de BR en què s'observa el 50% de l'activitat màxima. Simplificant les equacions:

$$\log K_{50\%} = n \log \frac{1}{[BR]_{50\%}} = -n \log [BR]_{50\%}$$

Equació 23

A la figura 113 es representa la corba d'activitat de la BL (1) com a exemple de corba d'activitat. Generalment, els compostos es distribueixen de tal manera que els valors resposta cobreixin un marge de fins a 4 unitats de logaritme (de 0 a -4), estant aquest paràmetre dins dels valors recomanats.¹⁸²

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, el valor d'activitat adequat per comparar l'activitat dels diferents BRs és $\log(\text{dosi}_{50\%})$. No obstant, degut a les limitacions pràctiques del bioassaig, hi ha BRs que a les dosis màximes estudiades no arriben al nivell màxim de la corba. S'ha de tenir en compte que la resposta màxima trobada en l'equip per a tot el conjunt de BRs actius compren un marge de 80-110°, per tant es considera el promig de 90°. Això fa que el 50% de la resposta màxima correspongui al valor d'angle de 45°, fent que el valor d'activitat utilitzat en l'equip sigui $-\log(\text{dosi}_{45^\circ})$.

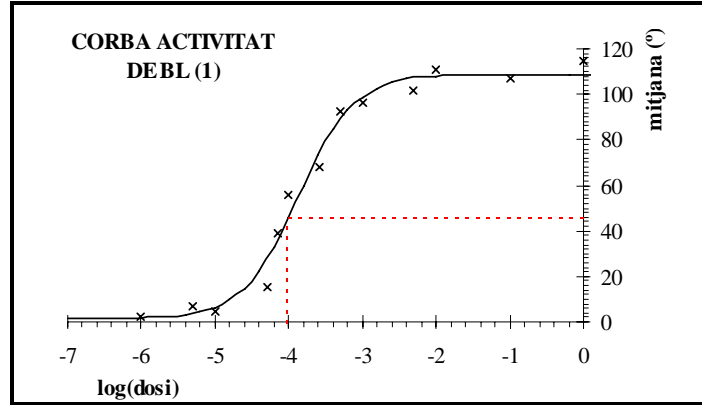


Figura 113. Corbes dosi-resposta de la BL (1)

Un cop es tenen els paràmetres que defineixen la corba, aquesta s'ajusta mitjançant el programa Fig.P.¹⁸³ Per fer-ho, es construeix una taula amb les dades corresponents a $\log(\text{dosi})$ vs MITJANA (°) i s'ajusta una funció del tipus "logistic sigmoid (classic logistic function; log dose vs effect)". La funció pren la següent forma:

$$f(x) = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + e^{-K(X - X_{50})}}$$

Equació 24

On *Min* és el valor mínim que presenta la corba, *Max* és el valor màxim que presenta la corba, *K* el factor relacionat amb el pendent de la corba i X_{50} l'abscissa corresponent al 50% de l'ordenada màxima de cada corba .

El programa realitza varies iteracions fins que arriba a la convergència i dona els valors dels paràmetres que defineixen aquesta funció (*Min*, *Max*, *K* i X_{50}). Finalment, es representa la corba i s'inclou el valor numèric de $-\log(\text{dosi})$ al interpolar a 45°.

4. PRESENTACIÓ DELS RESULTATS

Els resultats es poden dividir en dos grups:

1. Compostos no actius: Compostos que no donen activitat a 1µg/planta. Per tant, no es realitzen mesures de resposta a altres dosis.
2. Compostos actius: Compostos que a 1µg/planta i a concentracions inferiors donen activitat. Per aquests compostos es realitzen mesures de resposta a vàries concentracions per determinar-ne el perfil d'activitat. En una taula es mostra el compost assajat a les diferents concentracions aplicades i els paràmetres mitjana (MI), reproduïbilitat (REPRO) i repetibilitat mitjana (REPET M). Les dades que es troben en vermell indiquen que són punts erronis i, per tant, no es tenen en compte en el tractament estadístic realitzat.

En el present treball s'ha avaluat l'activitat de compostos proposats a través de vàries línies de recerca:

- Compostos proposats pels processos de *virtual screening* sobre bases de dades de compostos comercials descrits anteriorment en aquest treball (veure apartats 2.2 i 2.3 del capítol 1).
- Compostos sintetitzats basats en substituir l'esquelet de **6** i **7** per una estructura no esteroïdea (veure l'apartat 1 del capítol 2).
- Anàlegs sintetitzats a l'Acadèmia de Ciències de la República Txeca al laboratori del Prof. Ladislav Kohout.¹⁸⁴
- Compostos procedents de varis projectes desenvolupats a la Secció d'Esteroides de l'IQS: Anàlegs brassinoesteroides androstànics^{51,185} i transformació del KM-01 en agonista BR.¹⁸⁶

De tots ells, només es presenten els resultats corresponents als dos primers punts, ja que són els que es troben relacionats amb la part de discussió de resultats exposada en aquest treball. Els resultats corresponents a la resta de línies de recerca es troben exposats en comunicacions personals realitzades en el marc de l'Equip.^{51,185}

4.1. Anàlegs proposats per mètodes de *Virtual Screening*

4.1.1. Anàlegs proposats pel model QSAR desenvolupat amb descriptors GRIND

A la figura 114 es descriuen les dades obtingudes en el RLIT pels 26 compostos proposats com a candidats pel mètode de *virtual screening* descrit a l'apartat 2.2 del capítol 1. D'entre tots ells, només s'han realitzat més determinacions d'activitat, a concentracions diferents, dels compostos **207** i **209**, que són els que han mostrat un angle d'inclinació més elevat a 1 µg/planta.

Alguns compostos han presentat problemes de solubilitat amb etanol 95%, el dissolvent que es fa servir per defecte per preparar les dissolucions que s'injecten. En aquests casos, els compostos s'han intentat dissoldre amb THF. Si tampoc han estat solubles en aquest darrer dissolvent, s'han avaluat en dissolució amb DMSO. Ara bé, en aquest darrer dissolvent les mesures de l'angle presenten una gran desviació

estàndard, de l'ordre de 40°. Això fa que la mitjana del control pugui arribar a assolir valors de 40°, cosa que fa que l'angle d'inclinació normalitzat pugui prendre valors de -40°.

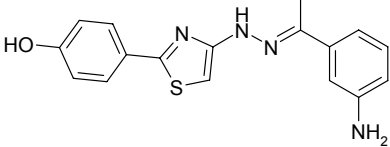
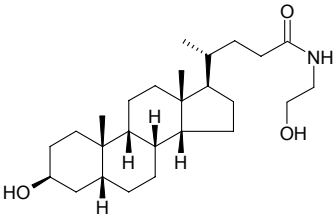
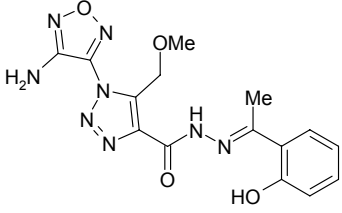
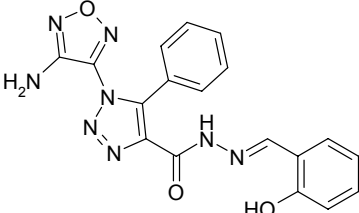
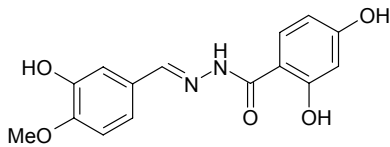
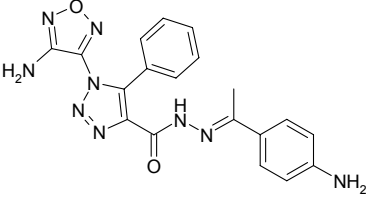
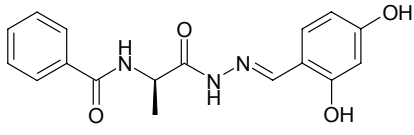
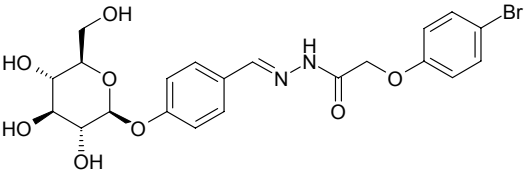
Compost	Compost
 <p>184 0° ± 2° (EtOH) BA-J-M-17, BA-J-M-18</p>	 <p>185 19° ± 2° (EtOH) BA-J-M-12, BA-A-E-15</p>
 <p>186 17° ± 3° (THF) BA-A-E-22</p>	 <p>187 10° ± 3° (EtOH) BA-J-M-16</p>
 <p>188 4° ± 2° (EtOH) BA-J-M-15</p>	 <p>189 4° ± 3° (THF) BA-A-E-22</p>
 <p>190 -3° ± 2° (EtOH) BA-J-M-19</p>	 <p>191 -17° ± 3° (DMSO) BA-A-E-24</p>

Figura 114. Dades d'activitat pels 26 candidats proposats.

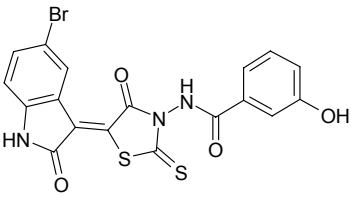
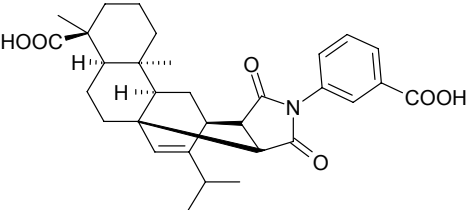
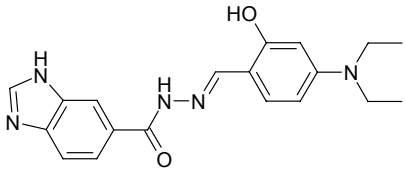
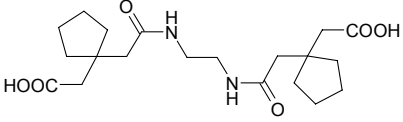
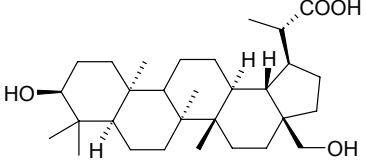
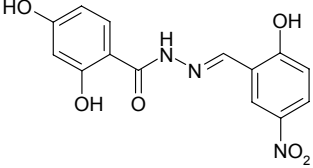
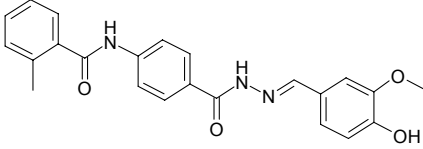
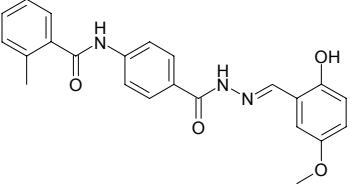
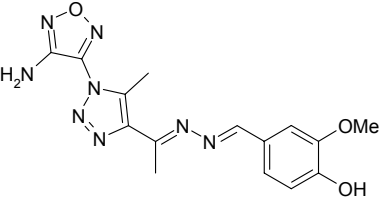
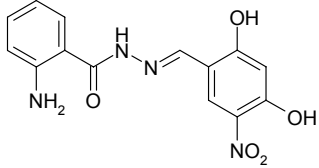
Compost	Compost
 <p style="text-align: center;">192 $0^\circ \pm 3^\circ$ (EtOH) BA-A-E-06, BA-A-E-10</p>	 <p style="text-align: center;">193 $-2^\circ \pm 3^\circ$ (EtOH) BA-A-E-09</p>
 <p style="text-align: center;">194 $-39^\circ \pm 2^\circ$ (DMSO) BA-A-E-24</p>	 <p style="text-align: center;">195 $5^\circ \pm 3^\circ$ (DMSO) BA-A-E-18</p>
 <p style="text-align: center;">196 $-3^\circ \pm 1^\circ$ (EtOH) BA-A-E-09</p>	 <p style="text-align: center;">197 $0^\circ \pm 9^\circ$ (DMSO) BA-A-E-26</p>
 <p style="text-align: center;">198 $-4^\circ \pm 1^\circ$ (EtOH) BA-A-E-09</p>	 <p style="text-align: center;">199 $0^\circ \pm 7^\circ$ (THF) BA-A-E-06b</p>
 <p style="text-align: center;">200 $3^\circ \pm 4^\circ$ (THF) BA-A-E-06b, BA-A-E-14</p>	 <p style="text-align: center;">201 $-1 \pm 1^\circ$ (THF) BA-A-E-06, BA-A-E-08</p>

Figura 114. Dades d'activitat pels 26 candidats proposats.

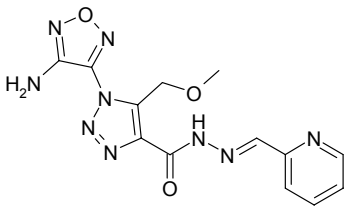
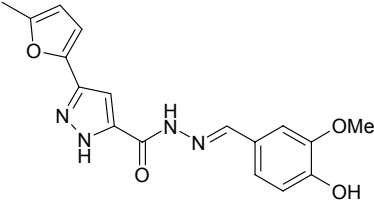
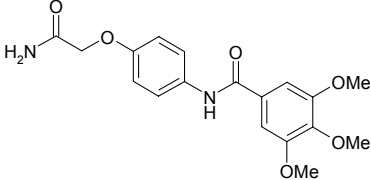
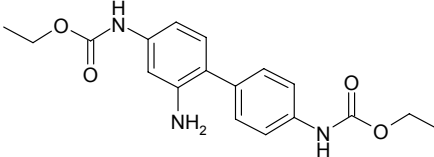
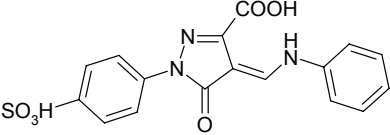
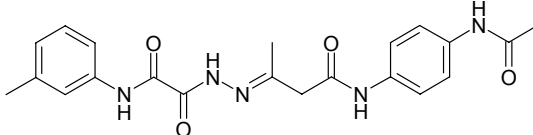
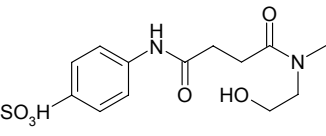
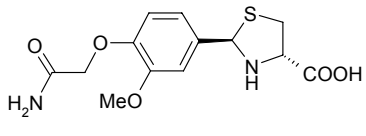
Compost	Compost
 <p>202 -38° ± 2° (DMSO) BA-A-E-26</p>	 <p>203 -5° ± 0° (EtOH) BA-A-E-09</p>
 <p>204 1 ± 3° (THF) BA-A-E-08</p>	 <p>205 6° ± 6° (EtOH) BA-X-24, BA-X-26</p>
 <p>206 1° ± 2° (EtOH) BA-A-E-06</p>	 <p>207 36° ± 11° (DMSO) BA-A-E-07, BA-X-24, BA-X-26, BA-X-29, BA-X-30</p>
 <p>208 0° ± 4° (EtOH) BA-A-E-09</p>	 <p>209 42° ± 10° (DMSO) BA-A-E-07, BA-X-24, BA-X-26, BA-X-29, BA-X-30</p>

Figura 114. Dades d'activitat pels 26 candidats proposats.

Els compostos **207** i **209** han mostrat un valor d'angle d'incinació a 1 µg/planta més alts que la resta de compostos. Tot i que el valor que han rendit no és tan alt com els dels BRs actius, el fet que hagin donat un nivell d'activitat net fa interessant realitzar determinacions d'activitat a més dosis. A la taula 41 es mostren les dades obtingudes a cada una de les dosis i a la figura 115 la corba dosi-resposta obtinguda pel compost **207**. A la taula 42 i a la figura 116 es mostren aquests resultats pel compost **209**.

Dosi (µg/planta)	207 (DMSO)									
	5		2		1		0,5		0,1	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
BA-X-30	15	11								
BA-X-30			13	4						
BA-A-E-07					36	11				
BA-X-24							3	1		
BA-X-26							7	2		
BA-X-29									3	1
MITJ/REPET MITJ	15	11	13	4	36	11	5	2	3	1
REPROD	-		-		-		3		-	

Taula 41. Dades d'activitat obtingudes pel compost 207.

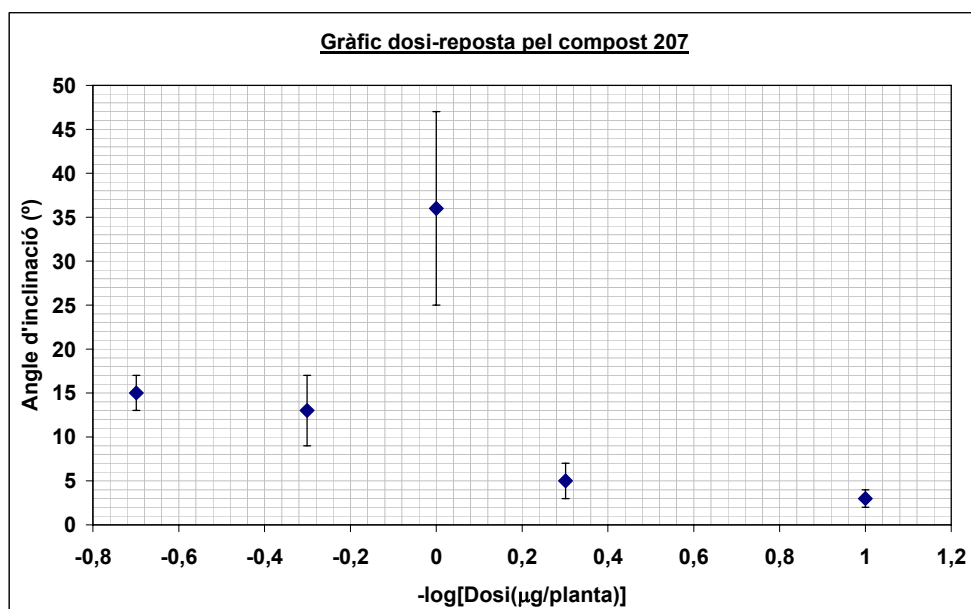
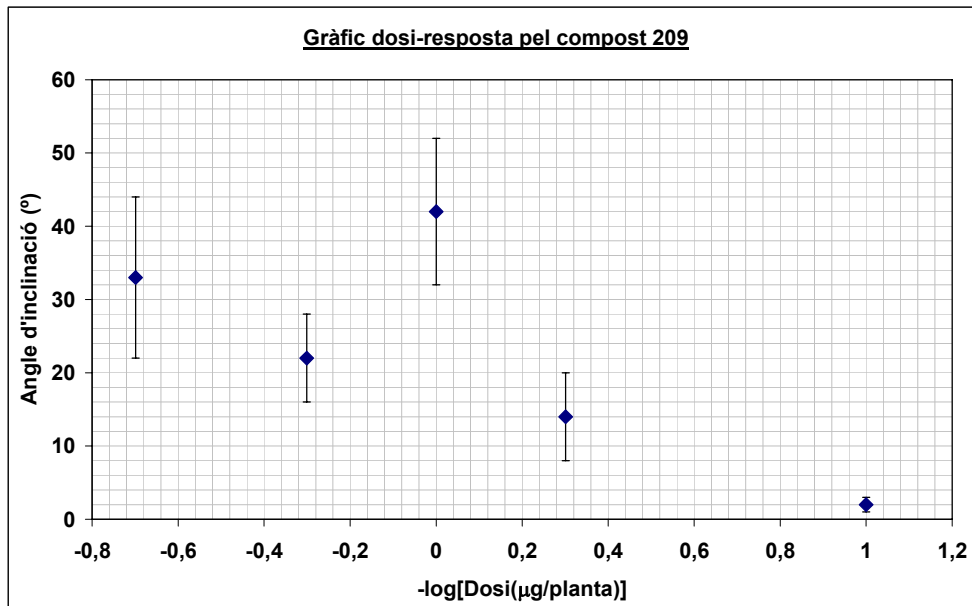


Figura 115. Gràfic dosi-resposta obtinguda pel compost 207.

Dosi (µg/planta)	209 (DMSO)									
	5		2		1		0,5		0,1	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
BA-X-30	33	11								
BA-X-30			22	6						
BA-A-E-07					42	10				
BA-X-24							3	1		
BA-X-26							25	10		
BA-X-29									2	1
MITJ/REPET MITJ	33	11	22	6	42	10	14	6	2	1
REPROD	-		-		-		16		-	

Taula 42. Dades d'activitat obtingudes pel compost 209.**Figura 115.** Corba dosi-resposta obtinguda pel compost 209.

4.1.2. Anàlegs proposats per la metodologia FLAP

A la figura 116 es descriuen les dades obtingudes en el RLIT pels 23 compostos proposats com a candidats pel mètode FLAP descrit a l'apartat 2.3 del capítol 1. De tots ells, s'ha obtingut com a resultat preliminar un únic assaig realitzat a 1 µg/planta. Cap compost ha mostrat un angle d'inclinació com el de BRs actius. Tot i això, cal acabar de determinar correctament el perfil d'activitat d'alguns compostos que han donat un cert nivell de resposta.

A nivell de solubilitat dels compostos, s'ha aplicat el mateix criteri que el descrit en el subapartat anterior.

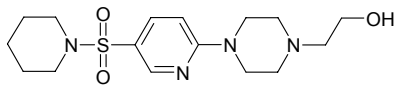
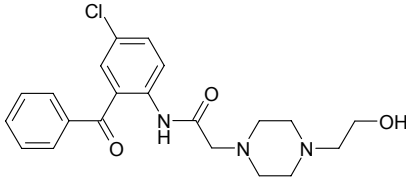
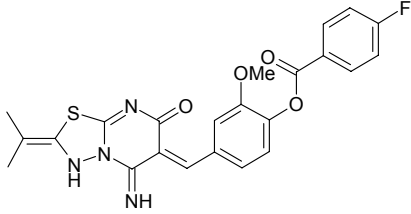
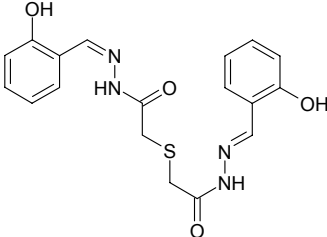
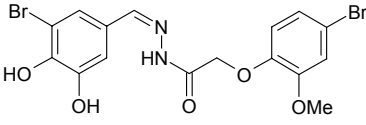
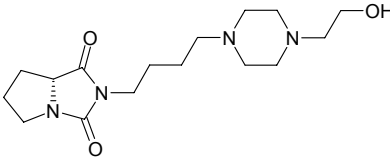
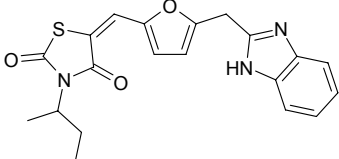
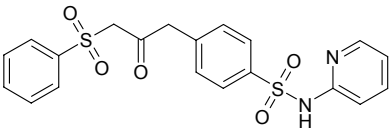
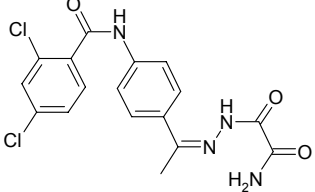
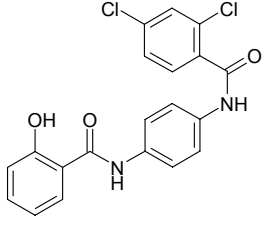
Compost	Compost
 <p>210 $47^\circ \pm 7^\circ$ (EtOH) BA-X-E-08, BA-X-10, BA-X-11, BA-X-13, BA-X-14, BA-X-15, BA-X-16</p>	 <p>211 $43^\circ \pm 13^\circ$ (EtOH) BA-X-E-08, BA-X-10, BA-X-11, BA-X-13, BA-X-14, BA-X-15, BA-X-16</p>
 <p>212 $14^\circ \pm 3^\circ$ (EtOH) BA-X-E-08</p>	 <p>213 $10^\circ \pm 3^\circ$ (THF) BA-X-E-09</p>
 <p>214 $8^\circ \pm 2^\circ$ (EtOH) BA-X-E-08</p>	 <p>215 $41^\circ \pm 16^\circ$ (EtOH) BA-X-E-08, BA-X-10, BA-X-11, BA-X-13, BA-X-14, BA-X-15, BA-X-16</p>
 <p>216 $16^\circ \pm 4^\circ$ (EtOH) BA-X-E-08</p>	 <p>217 $11^\circ \pm 4^\circ$ (THF) BA-X-E-09</p>
 <p>218 $4^\circ \pm 2^\circ$ (THF) BA-X-E-08</p>	 <p>219 $4^\circ \pm 1^\circ$ (THF) BA-X-E-08</p>

Figura 116. Dades d'activitat pels 23 candidats proposats.

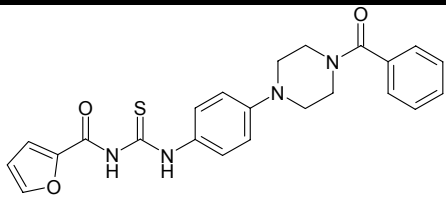
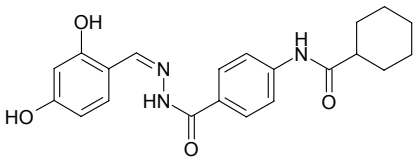
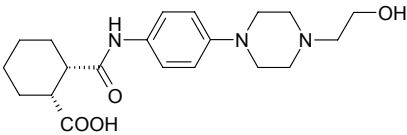
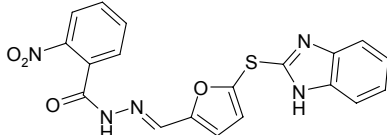
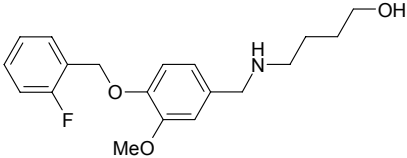
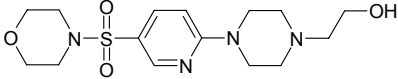
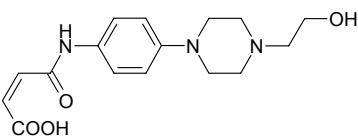
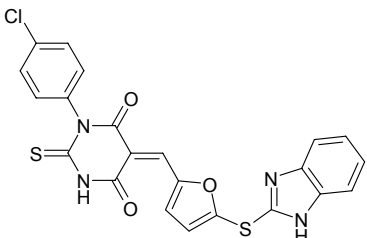
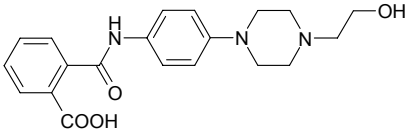
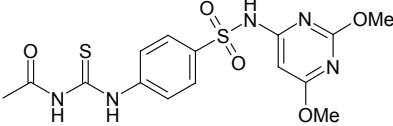
Compost	Compost
 <p>220 8° ± 2° (THF) BA-X-E-09</p>	 <p>221 8° ± 1° (EtOH) BA-X-E-08</p>
 <p>222 3° ± 2° (DMSO) BA-X-E-09</p>	 <p>223 3° ± 1° (THF) BA-X-E-08</p>
 <p>224 28° ± 5° (EtOH) BA-X-E-08, BA-X-10, BA-X-11, BA-X-13, BA-X-14, BA-X-15, BA-X-16</p>	 <p>225 14° ± 13° (EtOH) BA-X-E-08</p>
 <p>226 7° ± 2° (THF) BA-X-E-09</p>	 <p>227 5° ± 1° (THF) BA-X-E-08</p>
 <p>228 3° ± 2° (DMSO) BA-X-E-09</p>	 <p>229 5° ± 1° (EtOH) BA-X-E-08</p>

Figura 116. Dades d'activitat pels 23 candidats proposats.

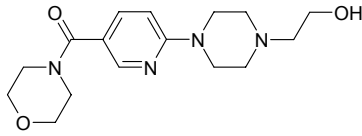
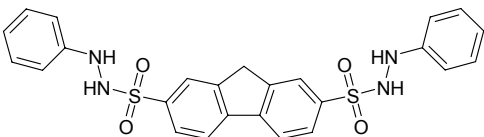
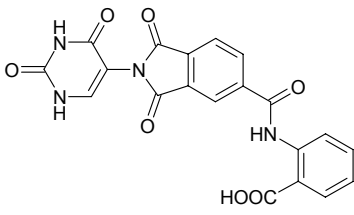
Compost	Compost
 <p>230 $5^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (EtOH) BA-X-E-08</p>	 <p>231 $7^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (DMSO) BA-X-E-09</p>
 <p>232 $4^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (DMSO) BA-X-E-09</p>	

Figura 116. Dades d'activitat pels 23 candidats proposats.

Els compostos **210**, **211**, **215**, **224** i **225** han mostrat un valor d'angle d'incinació a 1 µg/planta més alts que la resta de compostos. Tot i que el valor que han rendit no és tan alt com els dels BRs actius, el fet que hagin donat un nivell d'activitat net fa interessant realitzar determinacions d'activitat a més dosis. A les taules 45-49 es mostren les dades obtingudes a cada una de les dosis dels compostos **210**, **211**, **215**, **224** i **225** i a les figures 117-121 les corba dosi-resposta obtingudes

Dosi ($\mu\text{g/planta}$)	210 (EtOH)					
	1		0,1		0,01	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
BA-X-E-08	39	7				
BA-X-10	51	12				
BA-X-11	52	15				
BA-X-12			6	2		
BA-X-13			30	14		
BA-X-14			32	11		
BA-X-15					10	3
BA-X-16					4	2
MITJ/REPET MITJ	47	11	31	13	7	2
REPROD	7		1		4	

Taula 45. Dades d'activitat obtingudes pel compost 210.

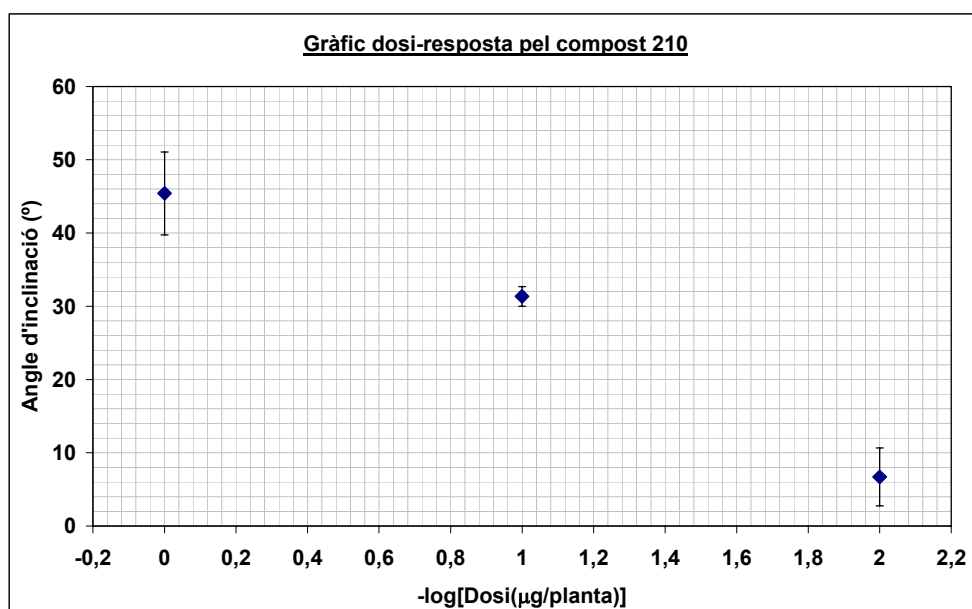


Figura 117. Corba dosi-resposta obtinguda pel compost 210.

Dosi ($\mu\text{g/planta}$)	211 (EtOH)					
	1		0,1		0,01	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
BA-X-E-08	41	12				
BA-X-10	31	9				
BA-X-11	50	11				
BA-X-13			34	12		
BA-X-14			26	9		
BA-X-15					7	2
BA-X-16					3	1
MITJ/REPET MITJ	43	11	30	11	5	2
REPROD	13		6		2	

Taula 46. Dades d'activitat obtingudes pel compost 211.

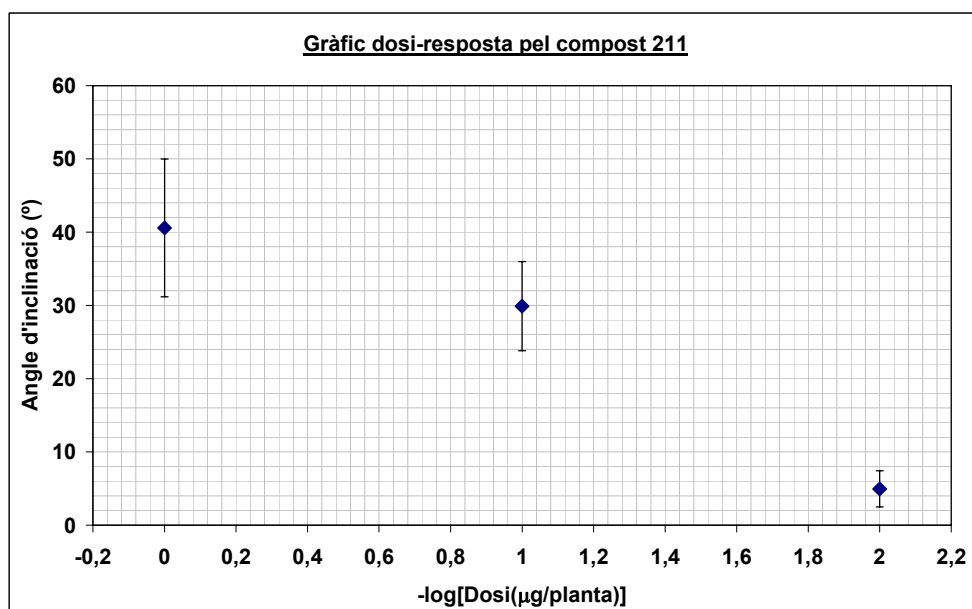


Figura 118. Corba dosi-resposta obtinguda pel compost 211.

Dosi (µg/planta)	215 (EtOH)					
	1		0,1		0,01	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
BA-X-E-08	30	11				
BA-X-10	59	12				
BA-X-11	33	10				
BA-X-12			1	1		
BA-X-13			19	13		
BA-X-14			16	5		
BA-X-15					29	11
BA-X-16					9	2
MITJ/REPET MITJ	41	11	17	9	19	7
REPROD	16		2		14	

Taula 47. Dades d'activitat obtingudes pel compost 215.

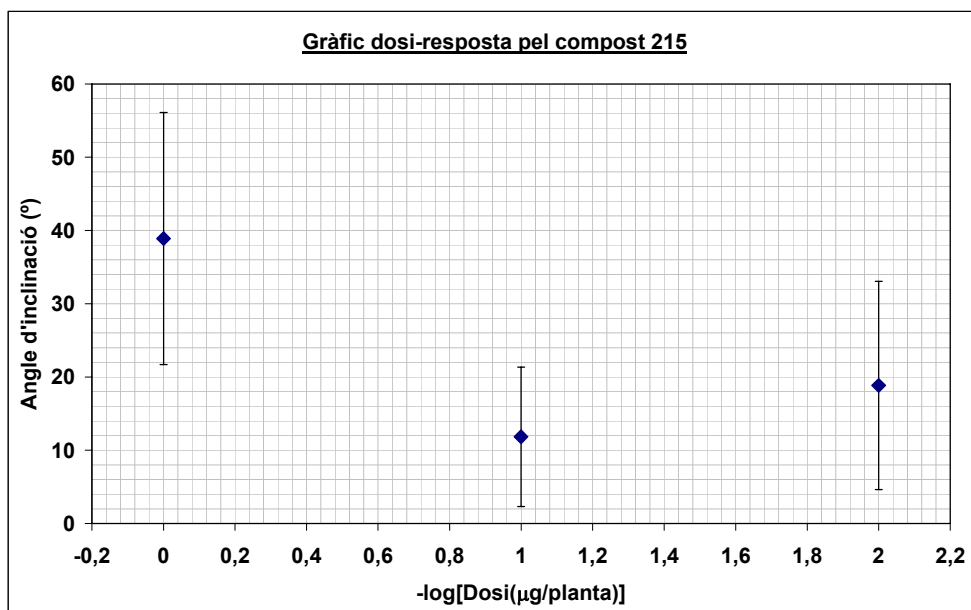


Figura 119. Corba dosi-resposta obtinguda pel compost 215.

Dosi (µg/planta)	224 (EtOH)					
	1		0,1		0,01	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
BA-X-E-08	33	6				
BA-X-10	30	11				
BA-X-11	28	9				
BA-X-12			2	1		
BA-X-13			33	14		
BA-X-14			19	7		
BA-X-12					23	9
BA-X-13					4	2
MITJ/REPET MITJ	30	9	26	7	13	6
REPROD	2		10		13	

Taula 45. Dades d'activitat obtingudes pel compost 224.

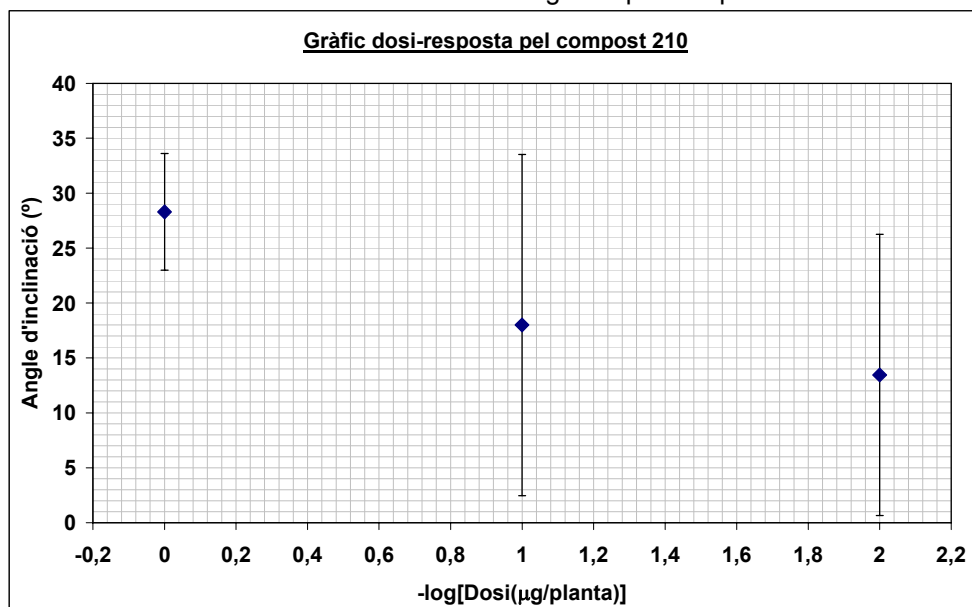


Figura 120. Corba dosi-resposta obtinguda pel compost 224.

Dosi (µg/planta)	225 (EtOH)					
	1		0,1		0,01	
	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET	M-Mc	REPET
BA-X-E-08	28	10				
BA-X-10	11	5				
BA-X-11	3	7				
BA-X-12			48	14		
BA-X-13			23	6		
BA-X-12					3	1
BA-X-13					5	2
MITJ/REPET MITJ	14	8	36	10	4	1
REPROD	13		17		2	

Taula 49. Dades d'activitat obtingudes pel compost 225.

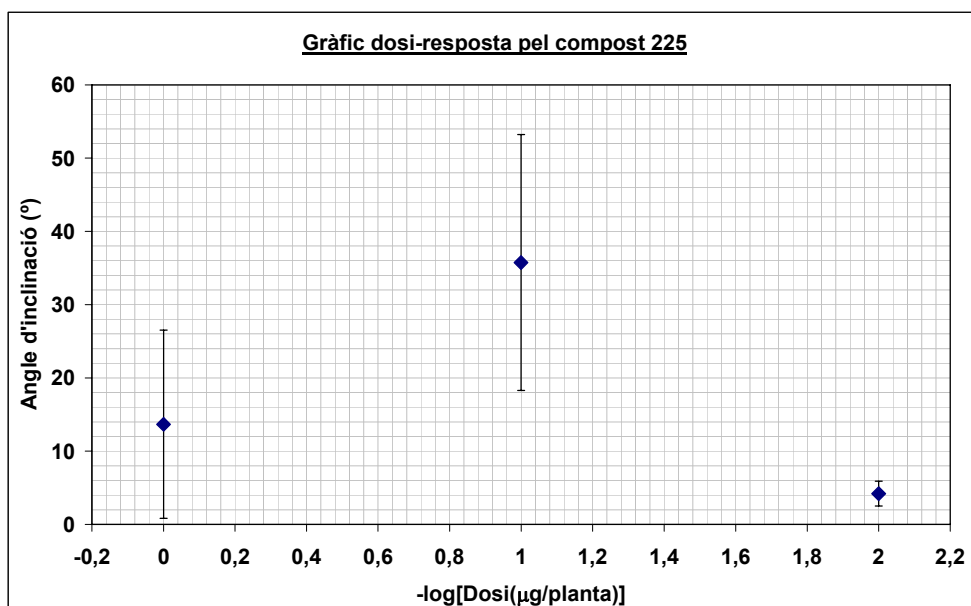


Figura 121. Corba dosi-resposta obtinguda pel compost 225.

4.2. Anàlegs derivats de 6 i 7: compostos 291, 312 i 316

A la figura 118 es descriuen les dades obtingudes en el RLIT pels 3 compostos sintetitzats basats en l'estructura dels compostos 6 i 7 (apartat 1 del capítol 2).

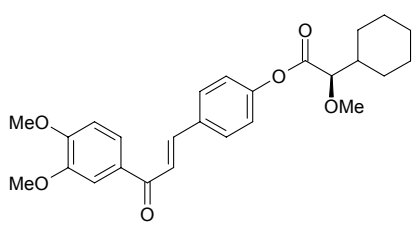
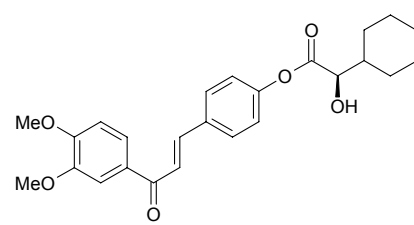
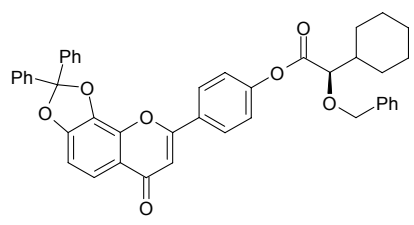
Compost	Compost
 <p>312 $25^\circ \pm 5^\circ$ (EtOH)</p>	 <p>316 $5^\circ \pm 1^\circ$ (EtOH)</p>
 <p>291 $11^\circ \pm 2^\circ$ (EtOH)</p>	

Figura 118. Dades d'activitat obtingudes pels compostos 291, 312 i 316.

4.3. Dades dels bioassajos realitzats

BA-A-E-06	CTRL ETOH	HCS	192	192	201 -THF	206	206
dosi (µg/planta)	0	1	1	1	1	1	1
	[0]	[67]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]
	0	71	0	0	0	0	3
	2	72	11	0	0	0	5
	4	82	31	0	3	0	5
	5	98	31	0	4	0	6
	7	107	45	0	5	10	6
	8	108	75	10	5	12	9
	[10]	109	82	11	6	[15]	10
		112	85	21	[12]		[13]
		133	[93]	22			
		[155]		[31]			
Mitjana	4	99	45	7	3	4	6
M-Mc:	-	95	41	3	-1	-1	2
DesvSt:	3	21	33	9	2	6	2
n° Plantes	6	9	8	9	7	6	7
REPET	2	7	12	3	2	3	2

BA-A-E-06b	CTRL THF	HCS	199 - THF	199 - THF	200 - THF
dosi (µg/planta)	0	1	1	1	1
	[0]	[67]	[0]	[0]	[0]
	0	71	0	0	3
	3	72	0	0	4
	4	82	6	0	5
	4	98	10	0	7
	4	107	11	0	8
	10	108	12	12	10
	11	109	14	[15]	11
	13	112	19		[11]
	14	133	19		
	[75]	[155]	24		
			[95]		
Mitjana	7	99	12	2	7
M-Mc:	-	92	5	-5	0
DesvSt:	5	21	8	5	3
n° Plantes	9	9	10	6	7
REPET	2	7	3	3	2

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-A-E-07	CTRL DMSO	HCS	207 - DMSO	209 - DMSO
dosi (µg/planta)	0	1	1	1
	[0]	[92]	[0]	[0]
	0	94	0	0
	0	96	9	33
	0	102	13	40
	10	103	24	42
	11	104	64	50
	11	105	67	53
	14	106	70	70
	14	112	73	84
	18	120	79	86
	[23]	[124]	[92]	[100]
Mitjana	9	105	44	51
M-Mc:	-	96	36	42
DesvSt:	7	8	32	27
n° Plantes	9	9	9	9
REPET	3	3	11	9

BA-A-E-08	CTRL THF	HOMO	201 - THF	204 - THF
dosi (µg/planta)	0	1	1	1
	[0]	[64]	[0]	[0]
	0	69	0	0
	0	85	0	5
	0	88	0	5
	10	93	8	8
	11	94	9	9
	11	110	10	16
	14	113	10	18
	14	[118]	13	[26]
	[18]		19	
			[25]	
Mitjana	8	93	8	9
M-Mc:	-	86	0	1
DesvSt:	6	15	7	6
n° Plantes	10	9	11	9
REPET	3	5	3	3

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-A-E-09	CTRL	HCS	193	193	196	196	198	198	203	203	208	208
dosi (µg/planta)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	[0]	[90]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]
	0	93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	6	112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
	9	117	10	0	5	4	0	0	0	0	4	12
	11	127	12	11	5	4	0	6	0	0	5	12
	11	[153]	12	12	7	7	11	7	0	5	5	13
	12		13	[23]	9	15	12	[9]	9	10	9	13
	13		15		[15]	18	15		10	[12]	11	13
	[18]		[22]			[23]	[15]		[12]		[14]	[27]
Mitjana	7	111	7	3	3	5	4	2	2	2	4	9
M-Mc:	-	-	0	-4	-4	-2	-3	-5	-5	-5	-3	2
DesvSt:	6	11	7	6	4	7	6	3	4	4	4	5
n° Plantes	9	8	9	7	8	9	9	7	9	8	9	9
REPET	3	4	3	3	2	3	3	2	2	2	2	3

BA-A-E-10	CTRL	HCS	192
dosi (µg/planta)	0	1	1
	[0]	[59]	[0]
	0	77	0
	0	78	0
	0	84	0
	6	86	5
	7	89	6
	10	90	8
	10	92	8
	12	110	9
	13	111	[10]
	[14]	[125]	
Mitjana	6	91	5
M-Mc:	-	84	-2
DesvSt:	5	12	4
n° Plantes	9	9	8
Repet_i	2	4	2

BA-A-E-14	THF	HCS	200 -THF
dosi (µg/planta)	0	1	1
	[0]	[89]	[0]
	0	92	3
	6	95	6
	7	105	8
	7	107	18
	10	110	19
	25	111	30
	[41]	[114]	31
			[35]
Mitjana	9	103	16
M-Mc:	0	101	7
DesvSt:	8	8	11
n° Plantes	6	6	7
Repet_i	4	4	5

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-A-E-15	CTRL	HCS	185
dosi (µg/planta)	0	1	1
	[0]	[23]	[0]
	0	24	0
	0	111	4
	1	115	7
	2	120	7
	2	133	12
	4	134	13
	10	[150]	16
	[10]		19
			20
			22
			22
			24
			71
			88
			[100]
Mitjana	3	106	23
M-Mc:	-	103	21
DesvSt:	3	41	25
n° Plantes	7	6	14

BA-A-E-18	CTRL DMSO	HCS	195 (DMSO)
dosi (µg/planta)	0	1	1
	[0]	[115]	[0]
	0	115	0
	0	117	0
	0	123	0
	0	130	0
	0	[136]	9
	0		11
	0		14
	0		15
	10		[20]
	[12]		
Mitjana	1	121	6
M-Mc:	-	97	5
DesvSt:	3	7	7
n° Plantes	9	4	8
REPET	7	8	3

BA-A-E-22	CTRL-THF	HCS	186 -THF	189 -THF
dosi (µg/planta)	0	1	1	1
	[0]	[80]	[0]	[0]
	0	82	13	0
	2	106	19	0
	3	112	22	9
	8	113	24	10
	9	117	25	10
	9	129	29	11
	10	[131]	29	22
	10		[40]	23
	[10]			[25]
Mitjana	6	110	23	11
M-Mc:	-	103	17	4
DesvSt:	4	16	6	9
n° Plantes	8	6	7	8
Repet i	2	7	3	3

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-A-E-24	CTRL DMSO	HCS	191	194
dosi (µg/planta)	0	1	1	1
	[9]	[102]	[10]	[0]
	20	107	15	12
	31	108	17	12
	37	109	19	12
	45	112	22	15
	60	112	24	15
	[64]	118	25	15
		120	30	20
		[130]	[72]	22
				[23]
Mitjana	39	112	22	15
M-Mc:	-16	102	-17	-39
DesvSt:	15	5	5	4
n° Plantes	5	7	7	8
Repet_i	7	3	3	2

BA-A-E-26	CTRL DMSO	HCS	202 - DMSO	197 - DMSO
dosi (µg/planta)	0	1	1	1
	[21]	[70]	[5]	[20]
	22	84	7	20
	23	89	7	29
	28	95	9	29
	30	98	10	40
	39	102	12	52
	62	105	[30]	69
	81	106		85
	87	109		[91]
	[97]	[112]		
Mitjana	47	99	9	46
M-Mc:	35	87	-38	0
DesvSt:	26	9	2	24
n° Plantes	8	8	5	7
Repet_i	10	4	2	9

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-J-M-12	CTRL	HCS	185
dosi ($\mu\text{g/planta}$)	0	1	1
	[0]	[102]	[0]
	0	111	0
	0	112	7
	0	115	14
	0	115	15
	0	123	21
	6	124	31
	8	130	38
	8	132	48
	12	141	[103]
	[14]	[147]	
Mitjana	4	123	22
M-Mc:	-	119	18
DesvSt:	5	10	16
n° Plantes	9	9	8
REPET	2	4	6

BA-J-M-15	CONTROL	HOMO	188
dosi ($\mu\text{g/planta}$)	0	1	1
	[0]	[72]	[0]
	0	84	0
	0	104	0
	0	114	6
	0	114	8
	0	116	9
	4	125	10
	7	127	11
	7	128	13
	8	[137]	[41]
	[12]		
Mitjana	3	114	7
M-Mc:	-	111	4
DesvSt:	4	15	5
n° Plantes	9	8	8
REPET	2	5	2

BA-J-M-16	CONTROL	HOMO	187
dosi ($\mu\text{g/planta}$)	0	1	1
	[0]	[90]	[0]
	0	100	0
	0	106	6
	0	106	14
	0	106	14
	0	107	15
	5	110	15
	7	112	16
	10	115	23
	10	117	23
	[13]	[120]	[59]
Mitjana	4	109	14
M-Mc:	-	105	10
DesvSt:	4	5	7
n° Plantes	9	9	9
REPET	2	2	3

BA-J-M-17	CONTROL	HOMO	184
dosi ($\mu\text{g/planta}$)	0	1	1
	[0]	[10]	[0]
	0	85	0
	0	94	0
	0	100	4
	4	104	8
	5	113	8
	7	124	9
	8	126	10
	9	134	10
	10	137	11
	10	[157]	11
	10		[15]
	[13]		
Mitjana	6	113	7
M-Mc:	-	107	1
DesvSt:	4	18	4
n° Plantes	11	9	10
REPET	2	6	2

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-J-M-18	CONTROL	HOMO	184
dosi (µg/planta)	0	1	1
	[0]	[43]	[0]
	0	91	0
	0	96	0
	0	103	0
	0	104	0
	0	105	0
	3	108	0
	7	111	5
	10	111	6
	12	112	7
	[13]	115	8
		[123]	[9]
Mitjana	4	106	3
M-Mc:	-	102	-1
DesvSt:	5	8	3
nº Plantes	9	10	10
REPET	2	3	2

BA-J-M-19	CONTROL	HOMO	190
dosi (µg/planta)	0	1	0
	[0]	[75]	[0]
	0	80	0
	0	109	0
	0	111	0
	3	116	0
	5	125	0
	6	127	0
	7	153	0
	9	155	7
	9	156	[11]
	[13]	[158]	
Mitjana	4	126	1
M-Mc:	-	121	-3
DesvSt:	4	25	2
nº Plantes	9	9	8
REPET	2	9	2

BA-X-24	CTRL	HCS	205	207 - DMSO	209 - DMSO
dosi (µg/planta)	0	1	1	0.5	0.5
	[0]	[76]	[0]	[3]	[3]
	2	82	3	3	3
	2	83	3	4	5
	2	85	3	4	5
	3	92	4	5	5
	3	97	5	6	5
	5	99	5	7	5
	5	99	8	8	8
	[7]	105	[8]	9	15
		[108]		[9]	[18]
Mitjana	3	93	4	6	6
M-Mc:	-	90	1	3	3
DesvSt:	1	9	2	2	4
nº Plantes	7	8	7	8	8
Repet_i	1	3	1	1	1

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-X-26	CTRL DMSO	HCS	205	205	209 - DMSO	207 - DMSO
dosi (µg/planta)	0	1	1	1	0,5	0,5
	[0]	[93]	[9]	[4]	[4]	[0]
	0	112	11	7	7	5
	0	115	13	8	11	9
	2	119	26	8	20	10
	4	122	35	9	49	15
	4	128	84	9	57	17
	7	128	98	9	[70]	[71]
	7	[130]	[111]	15		
	8			20		
	[14]			42		
				[102]		
Mitjana	4	121	45	14	29	11
M-Mc:	-	117	41	10	25	7
DesvSt:	3	7	37	11	23	5
n° Plantes	8	6	6	9	5	5
Repet_i	2	3	15	4	10	2

BA-X-29	CTRL DMSO	HCS	209 - DMSO	207 - DMSO
dosi (µg/planta)	0	1	0,1	0,1
	[0]	[99]	[2]	[2]
	0	100	3	4
	1	116	4	4
	3	117	4	5
	5	[122]	5	7
	6		8	7
	6		9	8
	[7]		[11]	9
				[10]
Mitjana	4	111	6	6
M-Mc:	-	108	2	3
DesvSt:	3	10	2	2
n° Plantes	6	3	6	7
Repet_i	1	6	1	1

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-X-30	CTRL DMSO	HCS	207 - DMSO	209 - DMSO	207 - DMSO	209 - DMSO
dosi (µg/planta)	0	1	2	2	5	5
	[0]	[95]	[0]	[3]	[5]	[6]
	0	99	7	9	5	7
	3	102	8	13	8	9
	4	102	9	16	9	17
	5	[115]	10	22	9	41
	6		19	36	10	42
	6		23	44	11	76
	7		29	47	86	76
	8		41	[77]	[109]	[85]
	[8]		[57]			
Mitjana	5	101	18	27	20	38
M-Mc:	-	96	13	22	15	33
DesvSt:	3	2	12	15	29	29
nº Plantes	8	3	8	7	7	7
Repet i	1	1	4	6	11	11

BA-X-10	CTRL	HCS	210	211	215	224	225
dosi (µg/planta)	0	1	1	1	1	1	1
	[0]	[82]	[9]	[7]	[12]	[6]	[6]
	6	113	11	12	12	8	6
	7	119	14	16	62	9	7
	7	119	64	18	74	21	11
	8	120	74	40	82	22	13
	10	121	80	62	85	25	16
	10	136	84	64	88	52	16
	10	[146]	86	66	[98]	81	32
	10		[89]	[88]		88	51
	[13]					[93]	[84]
Mitjana	9	121	59	40	67	38	19
M-Mc:	-	113	51	31	59	30	11
DesvSt:	2	8	33	24	29	32	15
nº Plantes	8	6	7	7	6	8	8
	1	3	12	9	12	11	5

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-X-11	CTRL	HCS	210	211	215	224	225
dosi (µg/planta)	0	1	1	1	1	1	1
	[8]	[100]	[9]	[8]	[8]	[11]	[7]
	9	111	9	15	8	12	10
	9	116	28	56	9	20	10
	12	119	81	71	18	22	10
	12	[124]	83	76	28	25	14
	13		87	81	44	29	24
	13		93	84	57	62	35
	[85]		[95]	87	75	69	36
				[93]	81	77	[57]
					83	[79]	
					[96]		
Mitjana	11	115	64	67	45	40	20
M-Mc:	-	104	52	56	33	28	9
DesvSt:	2	4	36	25	31	25	12
n° Plantes	7	3	6	7	9	8	7
Repet_i	1	2	15	10	10	9	5

BA-X-12	CTRL	HCS	210	215	224
dosi (µg/planta)	0	1	0.1	0.1	0.1
	[0]	[88]	[5]	[4]	[0]
	3	96	7	4	4
	5	99	8	4	5
	5	[100]	8	5	6
	5		11	6	7
	5		15	6	8
	5		15	6	8
	6		[18]	10	8
	[10]			[10]	9
					[17]
Mitjana	5	98	11	6	7
M-Mc:	-	93	6	1	2
DesvSt:	1	2	4	2	2
n° Plantes	7	2	6	7	8
REPET	0	2	2	1	1

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-X-13	CTRL	HCS	210	211	215	224	225
dosi (µg/planta)	0	1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	[0]	[78]	[7]	[3]	[0]	[4]	[4]
	0	94	8	5	3	6	8
	0	95	11	7	4	7	10
	2	104	13	7	5	9	12
	3	108	51	12	7	16	27
	3	[119]	81	19	26	41	76
	4		[94]	25	83	73	81
	5			76	[97]	96	90
	[5]			84		[109]	100
				95			[107]
				[104]			
Mitjana	2	100	33	37	21	35	51
M-Mc:	-	98	30	34	19	33	48
DesvSt:	2	7	32	37	31	36	40
n° Plantes	7	4	5	9	6	7	8
Repet_i	1	3	14	12	13	14	14

BA-X-14	CTRL	HCS	210	211	215	224	225
dosi (µg/planta)	0	1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	[4]	[85]	[7]	[7]	[8]	[0]	[10]
	4	97	8	7	9	8	13
	4	105	11	7	10	12	20
	5	116	28	15	10	12	20
	5	118	29	19	11	14	22
	6	[121]	32	22	15	16	30
	7		38	26	24	16	50
	8		55	37	24	31	51
	9		105	62	33	39	[71]
	[9]		[114]	89	58	77	
				[96]	[68]	[107]	
Mitjana	6	109	38	32	22	25	29
M-Mc:	-	103	32	26	16	19	23
DesvSt:	2	10	31	27	16	22	15
n° Plantes	8	4	8	9	9	9	7
Repet_i	1	5	11	9	5	7	6

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-X-15	CTRL	HCS	210	211	215	224	225
dosi (µg/planta)	0	1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	[0]	[76]	[6]	[5]	[5]	[7]	[5]
	0	91	8	6	9	7	6
	0	95	8	6	11	8	6
	0	99	10	7	12	9	6
	5	103	12	8	14	9	6
	5	106	12	9	19	13	7
	7	107	14	10	34	37	9
	7	108	17	12	79	59	9
	7	118	29	16	87	72	9
	7	[126]	[69]	24	[96]	[86]	[64]
	[8]			[64]			
Mitjana	4	103	14	11	33	27	7
M-Mc:	-	99	10	7	29	23	3
DesvSt:	3	8	7	6	32	26	1
n° Plantes	9	8	8	9	8	8	8
Repet_i	2	3	3	2	11	9	1

BA-X-16	CTRL	HCS	210	211	215	224	225
dosi (µg/planta)	0	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	[0]	[88]	[0]	[4]	[7]	[0]	[5]
	0	90	2	5	7	0	6
	4	91	5	6	7	5	6
	5	92	7	6	9	6	8
	5	92	7	7	10	6	8
	5	95	8	8	13	10	9
	6	101	13	8	14	12	10
	6	107	16	9	18	14	16
	[18]	[110]	[25]	9	18	18	16
				11	23	[26]	[20]
				[14]	[71]		
Mitjana	4	95	8	8	13	9	10
M-Mc:	-	91	4	3	9	4	5
DesvSt:	2	6	5	2	6	6	4
n° Plantes	7	7	7	9	9	8	8
Repet_i	1	3	2	1	2	2	2

ANNEX: BIOASSAJOS

BA-X-E-08	CTRL	HCS	210	211	212	214	215	216	218	219	221	223	224	225	227	229	230
dosi (µg/planta)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	[0]	[10]	[17]	[8]	[8]	[8]	[0]	[10]	[5]	[4]	[9]	[5]	[9]	[17]	[0]	[8]	[0]
	3	110	18	11	9	8	5	12	5	8	12	5	17	18	10	8	7
	3	110	29	16	18	9	11	12	8	9	12	7	26	20	10	10	9
	5	114	39	18	18	11	13	14	8	9	13	8	32	22	10	10	12
	5	114	43	32	18	12	20	14	10	9	13	8	36	26	10	12	14
	6	121	58	34	18	16	31	17	11	10	14	9	41	35	11	13	15
	7	123	65	79	20	19	52	19	15	12	14	10	52	82	12	14	[25]
	7	125	65	87	22	21	72	27	15	14	15	10	67	[89]	13	[28]	
	8	[125]	[95]	95	40	[25]	87	32	[24]	[18]	16	11	[82]		[20]		
	10			[99]	[62]		[92]	48			19	14					
	[12]							[64]			[20]	[51]					
Mitjana	6	117	45	47	20	14	36	22	10	10	14	9	39	34	11	11	11
M-Mc:	-	111	39	41	14	8	30	16	4	4	8	3	33	28	5	5	5
DesvSt:	2	6	18	35	9	5	31	12	4	2	2	3	17	24	1	2	3
nº Plantes	9	7	7	8	8	7	8	9	7	7	9	9	7	6	7	6	5
Repet _i	1	2	7	12	3	2	11	4	2	1	1	1	6	10	1	1	2

BA-X-E-09	CTRL THF	CTRL DMSO	HCS	213 - THF	217 - THF	226 - THF	220 - THF	222 (DMSO)	228 (DMSO)	231 (DMSO)	232 (DMSO)
dosi (µg/planta)	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1
	[0]	[4]	[89]	[0]	[0]	[4]	[0]	[0]	[4]	[0]	[3]
	0	5	99	0	4	5	0	0	5	0	4
	0	5	110	9	7	8	11	8	8	7	5
	3	7	112	11	7	8	12	8	8	8	6
	3	8	113	12	7	10	12	11	10	9	8
	4	9	114	16	20	11	13	11	11	10	10
	4	[9]	115	17	27	14	14	11	14	10	15
	6		[127]	27	29	16	19	12	16	11	21
	6			[29]	[69]	24	[25]	14	24	14	[29]
	6					24		15	24	[26]	
	[6]					[25]		[15]	[25]		
Mitjana	4	7	111	13	14	13	12	10	13	9	10
M-Mc:	-	3	107	10	11	10	8	3	7	2	3
DesvSt:	2	2	6	8	11	7	6	4	7	4	6
nº Plantes	9	8	6	7	7	9	7	11	9	8	10
Repet _i	1	1	3	3	4	2	2	2	2	2	2

BIBLIOGRAFIA

1. Cutler, H.G., Yokota, T., Gunter, A., Ed.; *Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications*. ACS Symposium Series 474, Washington DC. **1991**.
2. Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., De Groot, A.E., Ed.; *Brassinosteroids: A new class of plant hormones*. Academic Press, EUA. **1999**.
3. Sakurai, A., Yokota, T., Clouse, S.D., Ed.; *Brassinosteroids. Steroidal plant hormones*. Springer, Tokyo. **1999**.
4. Johri, M.M., Mitra, D., Action of plant hormones. *Current Science* **2001**, *80*, 199-205.
5. Gray, W.M., Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology* **2004**, *2*, 1270-1273.
6. Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K., Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, *7*, 847-859.
7. Pharis, R.P., King, R.W., Gibberellins and Reproductive Development in Seed Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1985**, *36*, 517-568.
8. Sakakibara, H., Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **2006**, *57*, 431-449.
9. Wang, K.L.C., Li, H., Ecker, J.R., Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **2002**, *14*, S131-S151.
10. Marion-Poll, A., Leung, J., Abscisic acid synthesis, metabolism and signal transduction. *Annual Plant Reviews* **2006**, *24*, 1-35.
11. Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M., and Thorpe, T.A., Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant* **1996**, *32*, 272-289.
12. Takematsu, T., Takeuchi, Y., Effects of brassinosteroids on growth and yields of crops. *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences* **1989**, *65*, 149-152.
13. Brosa, C., Biological effects of brassinosteroids, en *Biochemistry and Function of Sterols*, Parish, E.J., Nes, W.D., eds., CRC Press, USA, **1997**, *15*, 201-220.
14. Kulaeva, O.N., Burkhanova, E.A., Fedina, A.B., Khokhlova, V.A., Bokebayeva, G.A., Vorbrodt, H.M., Adam G., Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions, en *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, ACS Symposium Series 474, Adam, G., Culter, H.G., Yokota, T., eds., American Chemical Society, Washington, D. C., **1991**, *12*.
15. Singh, J., Nakamura, S., Yasuo, O., Effect of epi-brassinolide on gram (*Cicer arietinum*) plants grown under water stress in juvenile stage. *Indian Journal of Agricultural Sciences* **1993**, *63*, 395-397.
16. Katsumi, M., Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth, en *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, ACS Symposium Series 474, Adam, G., Culter, H.G., Yokota, T., eds., American Chemical Society, Washington, D. C., **1991**, *21*.
17. He, R.-Y., Wang, G., Wang, X., Effect of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings, en *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, ACS Symposium Series 474, Adam, G., Culter, H.G., Yokota, T., eds., American Chemical Society, Washington, D. C., **1991**, *19*.
18. Takematsu, T., Takeuchi, Y., Effects of brassinosteroids on growth and yields of crops. *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences* **1989**, *65*, 149-152.
19. Mandava, N.B., Brassinosteroids: U.S. Department of Agriculture contributions and environmental protection agency registration requirements, en *Brassinosteroids. Chemistry, bioactivity & applications*, Cutler, H.G., Yokota, T.,

- Günter, A., eds., ACS Symposium Series 474, Washington DC, **1991**, 26, 320-332.
20. 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.
 21. Yokota, T., Arima, M., Takahashi, N., Castasterone, a new phytosterol with plant hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23, 1275-1278.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Takatsuto, S., Yazawa, N., Ikekawa, N., Takematsu, T., Takeuchi, Y., Koguchi, M., Structure-activity relationship of brassinosteroids. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2437-2441.
 25. 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.
 26. Wada, K., Marumo, S., Abe, H., Morishita, T., Nakamura, K., Uchiyama, M., Mori, K., A rice lamina inclination test - a microquantitative bioassay for brassinosteroids. *Agricultural and Biological Chemistry* **1984**, 48, 719-726.
 27. 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.
 28. Kohout, L., Strnad, M., Kaminek, M., Types of brassinosteroids and their bioassays, en *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, ACS Symposium Series 474, Adam, G., Culter, H.G., Yokota, T., eds., American Chemical Society, Washington, D. C., **1991**, 6.
 29. Yokota, T., Mori, K., Molecular Structure and Biological Activity of Brassinolide and Related Brassinosteroids, en *Molecular Structure and Biological Activity of Sterols*, Bohl, M., Buax, W.L., eds., CRC Press, Boca Raton, **1992**, 4.
 30. Kohout, L., Velgova, H., Strnad, M., Kaminek, M., Steroids. Part CCCXXVIII. Brassinosteroids with androstane and pregnane skeleton. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1987**, 52, 476-486.
 31. Kohout, L., Strnad, M., Steroids. Part CCCXXXIX. Brassinolide analogs without a side chain. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1989**, 54, 1019-1027.
 32. Kohout, L., Strnad, M., Brassinosteroids with ester function with five carbon atoms at the 20 position. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1992**, 57, 1731-1738.
 33. Kohout, L., Kasal, A., Strnad, M., On steroids. CCCLXXIII. Pregnane-type brassinosteroids with a four-carbon ester functionality in position 20. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1996**, 61, 930-940.
 34. Brosa, C., Structure-Activity Relationship, en *Brassinosteroids: steroidal plant hormones.*, Sakurai, A., Yokota, T., Clouse, S.D., eds., Springer-Verlag, Tokyo, **1999**, 9, 191-222.
 35. Brosa, C., Nusimovich, S., Peracaula, R., Synthesis of new brassinosteroids with potential activity as antiecdysteroids. *Steroids* **1994**, 59, 463-467.
 36. Brosa, C., Capdevila, J.M., Zamora, I., Brassinosteroids: a new way to define the structural requirements. *Tetrahedron* **1996**, 52, 2435-2448.
 37. Soca, L. Tesi doctoral, **1988**, IQS CETS, Barcelona.

38. Terricabras, E. Tesi doctoral, **1999**, IQS CETS, Barcelona.
39. Zamora, I. Tesi doctoral, **1998**, IQS CETS, Barcelona.
40. 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* **2005**, *433*, 167-171.
41. Vilaplana, M. Tesi doctoral, **2008**, IQS CETS, Barcelona.
42. Cruciani, G., Ed.; *Molecular Interaction Fields*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim. **2006**.
43. 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.
44. Pastor, M., Alignment-independent Descriptors from Molecular Interaction Fields, en *Molecular Interaction Fields*, Cruciani, G., eds., Wiley-VCH, Winheim, **2007**, *6*, 117-144.
45. Ahlstrom, M.M., Ridderstrom, 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.
46. Bergmann, R., Linusson, A., Zamora, I., SHOP: Scaffold HOPping by GRID-based similarity searches. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 2708-2717.
47. Perruccio, F., Mason, J.S., Sciabola, S., Baroni, M., FLAP: 4-Point Pharmacophore Fingerprints from GRID, en *Molecular Interaction Fields*, Cruciani, G., eds., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**, *4*, 83-102.
48. Baroni, M., Cruciani, G., Sciabola, S., Perruccio, F., Mason, J.S., A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): theory and application. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 279-294.
49. Jové, I. Tesi doctoral, **2006**, IQS CETS, Barcelona.
50. Molist, M. Tesi doctoral, **2007**, IQS CETS, Barcelona.
51. Esteve, A.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2008**.
52. 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.
53. Kohout, L. Method of preparing 2α , 3α -dihydroxy- 17β -(2-methyl-butyryloxy)-7-oxa-B-homo- 5α -androstan-6-one. CZ 1992-3505[CZ 279479]. 1995.
54. 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.
55. Leach, A.R., Ed.; *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Prentice Hall, Harlow. **2000**.
56. Cramer, C.J., Ed.; *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. John Wiley & sons Ltd., Chichester. **2002**.
57. Schweizer, W.B., Conformational analysis, en *Structure correlation*, Bürgi, H.B., Dunitz, J.D., eds., VCH, Weinheim, **1994**, 369.
58. White, D.N.J., Kitson, D.H., Computational Conformational-Analysis of Cyclohexaglycyl. *Journal of Molecular Graphics* **1986**, *4*, 112-116.
59. Lipton, M., Still, W.C., The Multiple Minimum Problem in Molecular Modeling - Tree Searching Internal Coordinate Conformational Space. *Journal of Computational Chemistry* **1988**, *9*, 343-355.
60. 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.

61. Leach, A.R., A Survey of Methods for Searching the Conformational Space of Small and Medium-Sized Molecules, en *Reviews of Computational Chemistry II*, Lipkowitz, K.B., Boyd, D.B., eds., VCH Publishers Inc., New York, **1991**, 42.
62. 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.
63. Sun, Y.X., Kollman, P.A., Conformational Sampling and Ensemble Generation by Molecular-Dynamics Simulations - 18-Crown-6 As A Test Case. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 33-40.
64. Rusinko, A., III, Sheridan, R.P., Nilakantan, R., Haraki, K.S., Bauman, N., and Venkataraghavan, R., Using CONCORD to construct a large database of three-dimensional coordinates from connection tables. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1989**, *29*, 251-255.
65. Hendrickson, M.A., Nicklaus, M.C., Milne, G.W.A., and Zaharevitz, D., CONCORD and CAMBRIDGE: comparison of computer generated chemical structures with x-ray crystallographic data. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1993**, *33*, 155-163.
66. Hansch, C., Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research* **1969**, *2*, 232-239.
67. Kubinyi, H., Kehrhan, O.H., Quantitative structure-activity relationships. 1. The modified Free-Wilson approach. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 578-586.
68. FREE, S.M., Jr., WILSON, J.W., A mathematical contribution to structure-activity studies. *J. Med. Chem.* **1964**, *19*, 395-399.
69. Klein, D.J., Mihalic, Z., Plavsic, D., and Trinajstic, N., Molecular topological index: a relation with the Wiener index. *J.Chem.Inf.Comput.Sci.* **1992**, *32*, 304-305.
70. Hansen, P.J. and Jurs, P.C., Chemical applications of graph theory. Part I. Fundamentals and topological indices. *J.Chem.Educ.* **1988**, *65*, 574-580.
71. Mihalic, Z. and Trinajstic, N., A graph-theoretical approach to structure-property relationships. *J.Chem.Educ.* **1992**, *69*, 701-712.
72. Dykstra, C.E., Augspurger, J.D., Kirtman, B., and Malik, D.J., Properties of molecules by direct calculation. *Rev.Comput.Chem.* **1990**, 83-118.
73. Amat, L., Carbo-Dorca, R., and Ponec, R., Molecular quantum similarity measures as an alternative to log P values in QSAR studies. *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19*, 1575-1583.
74. Dai, J., Jin, L., Yao, S., and Wang, L., Prediction of partition coefficient and toxicity for benzaldehyde compounds by their capacity factors and various molecular descriptors. *Chemosphere* **2001**, *42*, 899-907.
75. Verloop, A. and Tipker, J., A comparative study of new steric parameters in drug design. *Pharmacochem.Libr.* **1977**, *2*, 63-81.
76. Broto, P., Moreau, G., and Vanduycke, C., Molecular structures: perception, autocorrelation descriptor and SAR studies. Perception of molecules: topological structure and 3-dimensional structure. *Eur.J.Med.Chem.-Chim.Ther.* **1984**, *19*, 61-65.
77. Lien, E.J., Guo, Z.R., Li, R.L., and Su, C.T., Use of dipole moment as a parameter in drug-receptor interaction and quantitative structure-activity relationship studies. *J Pharm Sci* **1982**, *71*, 641-655.
78. Karelson, M., Lobanov, V.S., and Katritzky, A.R., Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies. *Chem.Rev.(Washington, D.C.)* **1996**, *96*, 1027-1043.
79. Goodford, P.J., A Computational-Procedure for Determining Energetically Favorable Binding-Sites on Biologically Important Macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, *28*, 849-857.

80. 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.
81. Molecular Discovery Ltd. GRID v.17. 1999.
82. Broto, P., Moreau, G., Vandycke, C., Molecular structures: perception, autocorrelation descriptor and SAR studies. Autocorrelation descriptor. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1984**, *19*, 66-70.
83. Wagener, M., Sadowski, J., Gasteiger, J., Autocorrelation of Molecular Surface Properties for Modeling Corticosteroid Binding Globulin and Cytosolic Ah Receptor Activity by Neural Networks. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 7769-7775.
84. Anzali, S., Barnickel, G., Krug, M., Sadowski, J., Wagener, M., Gasteiger, J., Polanski, J., The comparison of geometric and electronic properties of molecular surfaces by neural networks: application to the analysis of corticosteroid-binding globulin activity of steroids. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1996**, *10*, 521-534.
85. Clementi, S., Cruciani, G., Riganelli, D., Valigi, R., Constantino, G., Baroni, M., Autocorrelation as a tool for a congruent description of molecules in 3D-QSAR studies. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1993**, *3*, 5-8.
86. 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.
87. Pastor, M., Alignment-independent Descriptors from Molecular Interaction Fields, en *Molecular Interaction Fields*, Cruciani, G., eds., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**, *6*, 117-144.
88. Multivariate Infometric Analysis, S. r. l. ALMOND v.2.0. 2000.
89. Goodford, P.J., A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, *28*, 849-857.
90. Fontaine, F., Pastor, M., Sanz, F., Incorporating Molecular Shape into the Alignment-free GRid-INdependent Descriptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 2805-2815.
91. Fedorov, V.V., Ed.; *Theory of Optimal Experiments*. Academic Press: New York. **1972**.
92. Clementi, M., Clementi, S., Clementi, S., Cruciani, G., Pastor, M., Chemometric Detection of Binding Sites of 7TM Receptors, en *Molecular Modelling and Prediction of Bioreactivity*, Gundertofte, K., Jorgensen, F.S., eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2000**, 207.
93. Afzelius, L., Masimirembwa, C.M., Karlen, A., Andersson, T.B., Zamora, I., Discriminant and quantitative PLS analysis of competitive CYP2C9 inhibitors versus non-inhibitors using alignment independent GRIND descriptors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2002**, *16*, 443-458.
94. Cratteri, P., Romanelli, M.N., Cruciani, G., Bonaccini, C., Melani, F., GRIND-derived pharmacophore model for a series of α -tropanyl derivative ligands of the sigma-2 receptor. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2004**, *18*, 361-374.
95. Benedetti, P., Mannhold, R., Cruciani, G., Ottaviani, G., GRIND/ALMOND investigations on CysLT1 receptor antagonists of the quinoliny(bridged)aryl type. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 3607-3617.
96. Afzelius, L., Zamora, I., Masimirembwa, C.M., Karlen, A., Andersson, T.B., Mecucci, S., Baroni, M., Cruciani, G., Conformer- and Alignment-Independent Model for Predicting Structurally Diverse Competitive CYP2C9 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 907-914.

97. Lapinsh, M., Prusis, P., Mutule, I., Mutulis, F., Wikberg, J.E.S., QSAR and Proteo-chemometric Analysis of the Interaction of a Series of Organic Compounds with Melanocortin Receptor Subtypes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2572-2579.
98. Cruciani, G., Benedetti, P., Caltabiano, G., Condorelli, D.F., Fortuna, C.G., Musumarra, G., Structure-based rationalization of antitumor drugs mechanism of action by a MIF approach. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *39*, 281-289.
99. Zamora, I., Afzelius, L., Cruciani, G., Predicting Drug Metabolism: A Site of Metabolism Prediction Tool Applied to the Cytochrome P450 2C9. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2313-2324.
100. 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.
101. Carosati, E., Cruciani, G., Chiarini, A., Budriesi, R., Ioan, P., Spisani, R., Spinelli, D., Cosimelli, B., Fusi, F., Frosini, M., Matucci, R., Gasparrini, F., Ciogli, A., Stephens, P.J., Devlin, F.J., Calcium channel antagonists discovered by a multidisciplinary approach. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5206-5216.
102. Amorós, M. Tesi doctoral, **2005**, IQS CETS, Barcelona.
103. 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.
104. 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.
105. Tanimoto, T.T., *IBM Internal Report*, **1957**.
106. Geladi, P. and Kowalski, B.R., Partial least-squares regression: a tutorial. *Anal.Chim.Acta* **1986**, *185*, 1-17.
107. Cocchi, M. and Johansson, E., Amino acids characterization by GRID and multivariate data analysis. *Quant.Struct.-Act.Relat.* **1993**, *12*, 1-8.
108. Baroni, M., Costantino, G., Cruciani, G., Riganelli, D., Valigi, R., Clementi, S., Generating optimal linear PLS estimations (GOLPE): an advanced chemometric tool for handling 3D-QSAR problems. *Quant. Struct. -Act. Relat.* **1993**, *12*, 9-20.
109. Wold, S., Validation of QSARs. *Quant. Struct. -Act. Relat.* **1991**, *10*, 191-193.
110. Cruciani, G., Baroni, M., Clementi, S., Costantino, G., Riganelli, D., Skagerberg, B., Predictive Ability of Regression Models. Part I: Standard Deviation of Prediction Errors (SDEP). *Journal of Chemometrics* **1992**, *6*, 335-346.
111. Molecular Operating Environment (MOE). 2002. Chemical Computing Group.
112. Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., De Groot, A.E., Ed.; *Brassinosteroids: A new class of plant hormones*. Academic Press, EUA. **1998**.
113. Brosa, C., Biological effects of brassinosteroids. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1999**, *34*, 339-358.
114. www.tripos.com . 2005.
115. 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.
116. VOLSURF 4.1.4. 2000. Multivariate Infometric Analysis Srl.
117. Cruciani, G., Crivori, P., Carrupt, P.-A., Testa, B., Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the Volsurf approach. *Journal of Molecular Structure (Teochem)* **2000**, 17-30.
118. Cruciani, G., Pastor, M., Guba, W., Volsurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, *11 Supl. 2*, S29-S39.

119. 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.
120. 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.
121. Afzelius, L., Masimirembwa, C.M., Karlen, A., Andersson, T.B., Zamora, I., Discriminant and quantitative PLS analysis of competitive CYP2C9 inhibitors versus non-inhibitors using alignment independent GRIND descriptors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2002**, *16*, 443-458.
122. Brosa, C., Amoros, M., Molist, M., Hernandez, X., New brassinosteroid analogs having nitrogenated functionalities at C3 to provide more information about the brassinosteroid-receptor interaction. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8529-8534.
123. SPECS. www.specs.net . 2007.
124. Willett, P., Chemical similarity searching. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 983-996.
125. Irwin, J.J., Shoichet, B.K., ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177-182.
126. Jan, S.T., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L., Large-scale synthesis of the catechol metabolites of diethylstilbestrol and hexestrol. *Chemical Research in Toxicology* **1998**, *11*, 408-411.
127. Fang, H., Tong, W., Shi, L.M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B.S., Xie, Q., Dial, S.L., Moland, C.L., Sheehan, D.M., Structure-Activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 280-294.
128. www.sigmaaldrich.com . 2006.
129. www.maybridge.com . 2006.
130. www.specs.net . 2006.
131. www.keyorganics.ltd.uk . 2006.
132. www.combi-blocks.com . 2006.
133. Lead Molecular Design S.L., Sant Cugat del Vallès, Spain. www.leadmolecular.com . 2008.
134. Bouktaib, M., Lebrun, S., Atmani, A., Rolando, C., Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10001-10009.
135. Chen, Z., Hu, Y., Wu, H., Jiang, H., Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3949-3952.
136. Denny, G.H., Jr., Zambito, A.J., Babson, R.D., Phenyl ester of lactic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* **1968**, *11*, 403-
137. Hon, Y.S., Chang, R.C., Chau, T.Y., The studies of metal ion catalyzed carbon-hydrogen insertion of α -alkoxy- α' -diazoketones derived from mandelic and lactic acids. *Heterocycles* **1990**, *31*, 1745-1750.
138. Dubost, C., Leroy, B., Marko, I.E., Tinant, B., Declercq, J.P., Bryans, J., Stereoselective synthesis of functionalized triol units by SnCl₄ promoted allylation of α -benzyloxyaldehydes: crucial role of the stoichiometry of the Lewis acid. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7693-7704.
139. Kato, D., Mitsuda, S., Ohta, H., Microbial Deracemization of α -Substituted Carboxylic Acids: Substrate Specificity and Mechanistic Investigation. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 7234-7242.
140. Bengtsson, S., Hoegberg, T., Secondary β -aminobenzamide and heteroatom directed lithiation in the synthesis of 5,6-dimethoxyanthranilamides and related compounds. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 4549-4553.

141. Jurd, L., Selective alkylation of polyphenols. I. Use of diphenylmethylene as a protective grouping for o-dihydroxy flavones. *Journal of Organic Chemistry* **1962**, *27*, 872-875.
142. Lee, Y., Yeo, H., Liu, S.H., Jiang, Z., Savizky, R.M., Austin, D.J., Cheng, Y.c., Increased Anti-P-glycoprotein Activity of Baicalein by Alkylation on the A Ring. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 5555-5566.
143. 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.
144. Höfle, G., Steglich, W., Vorbrüggen, H., 4-dialkylaminoyridines as highly active acylation catalysts. *Angewandte Chemie, International Edition* **1978**, *17*, 569-583.
145. Neises, B., Steglich, W., Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angewandte Chemie, International Edition* **1978**, *17*, 522-524.
146. Tobella, L.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2002**.
147. Lesac, A., Narancic, S., Sepelj, M., Bruce, D.W., Sunjic, V., Synthesis of novel chiral dopants based on optically active *p*-substituted mandelic acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2731-2737.
148. Morton, R.C., Mangroo, D., Gerber, G.E., A novel method of complete activation by carbonyldiimidazole: application to ester synthesis. *Canadian Journal of Chemistry* **1988**, *66*, 1701-1705.
149. Paul, R., Anderson, G.W., N,N'-carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*, 4596-4600.
150. Brooks, D.W., Lu, L.D.L., Masamune, S., C-Acylation under Virtually Neutral Conditions. *Angewandte Chemie, International Edition* **1978**, *18*, 72-74.
151. Achatz, O., Grandl, A., Wanner, K.T., Asymmetric Synthesis Employing a Chiral 5-Methoxy-1,4-oxazin-2-one Derivative: Preparation of Enantiomerically Pure -Quaternary -Amino Acids. *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, 1967-1978.
152. Jiang, X., Garcia-Fortanet, J., De Brabander, J.K., Synthesis and complete stereochemical assignment of psymberin/irciniastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11254-11255.
153. Heathcock, C.H., Ratcliffe, R., Stereoselective total synthesis of the guaiazulenic sesquiterpenoids a-bulnesene and bulnesol. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 1746-1757.
154. Haslam, E., Haworth, R.D., Mills, S.D., Rogers, H.J., Armitage, R., Searle, T., Gallotannins. II. Some esters and depsides of gallic acid. *Journal of the Chemical Society, Abstracts* **1961**, 1836-1842.
155. McMurry, J.E., Carbonyl-Coupling Reactions Using Low-Valent Titanium. *Chemical Reviews* **1989**, *89*, 1513-1524.
156. Castedo, L., Saá, J.M., Suau, R., Tojo, G., Selective reductive carbonyl couplings with titanium. *Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 4292-4294.
157. McMurry, J.E., Miller, D.D., Titanium-Induced Cyclization of Keto Esters - A New Method of Cycloalkanone Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 1660-1661.
158. Rappoport, Z., Gazit, A., Nucleophilic attacks on carbon-carbon double bonds. 33. Approaching the retention region from the stereoconvergence region in nucleophilic substitution of (E)- and (Z)-methyl *p*-substituted α -formyl- and α -(tert-butoxycarbonyl)- β -halocinnamates. *Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 4112-4131.
159. McMurry, J.E., Fleming, M.P., Kees, K.L., Krepski, L.R., Titanium-Induced Reductive Coupling of Carbonyls to Olefins. *Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 3255-3266.
160. Vogel, E., Koch, P., Hou, X.L., Lex, J., Lausmann, M., Kisters, M., Aukauloo, M.A., Richard, P., and Guillard, R., New porphycene ligands: octaethyl- and

- etioporphycene (OEPc and EtioPc): four and five-fold coordinated zinc complexes from OEPc. *Angewandte Chemie, International Edition* **1993**, 32, 1600-1604.
161. Leimner, J., Weyerstahl, P., Stereochemie und Nebenprodukte der reduktiven Kupplung von Alkylarylketonen zu 1,2-Dialkyl-1,2-diarylethylenen. *Chemische Berichte-Recueil* **1982**, 115, 3697-3705.
162. Carballeira, N.M., Emiliano, A., Hernandez-Alonso, N., and Gonzalez, F.A., Facile Total Synthesis and Antimicrobial Activity of the Marine Fatty Acids (Z)-2-Methoxy-5-hexadecenoic Acid and (Z)-2-Methoxy-6-hexadecenoic Acid. *J.Nat.Prod.* **1998**, 61, 1543-1546.
163. Smith, M.B. and March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th Edition **2000**, 1824-
164. Smith, M.B. and March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th Edition **2000**, 1824-
165. Rao, Y.K., Rao, C.V., Kishore, P.H., and Gunasekar, D., Total Synthesis of Heliannone A and (R,S)-Heliannone B, Two Bioactive Flavonoids from *Helianthus annuus* Cultivars. *J.Nat.Prod.* **2001**, 64, 368-369.
166. Seo, W.D., Kim, J.H., Kang, J.E., Ryu, H.W., Curtis-Long, M.J., Lee, H.S., Yang, M.S., and Park, K.H., Sulfonamide chalcone as a new class of alpha -glucosidase inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2005**, 15, 5514-5516.
167. Jung, M.E., Lyster, M.A., Quantitative dealkylation of alkyl ethers via treatment with trimethylsilyl iodide. A new method for ether hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 42, 3761-3764.
168. Jung, M.E., Lyster, M.A., Quantitative Dealkylation of Alkyl Esters Via Treatment with Trimethylsilyl Iodide - New Method for Ester Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99, 968-969.
169. Greene, T.W., Wuts, P.G.M., Ed.; *Protective Groups in Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, Inc., USA. **1999**.
170. Saito, S., Kawabata, J., Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents. *Tetrahedron* **2005**, 61, 8101-8108.
171. Sechi, M., Angotzi, G., Dallochio, R., Dessi, A., Carta, F., Sannia, L., Mariani, A., Fiori, S., Sanchez, T., Movsessian, L., Plasencia, C., Neamati, N., Design and synthesis of novel dihydroxyindole-2-carboxylic acids as HIV-1 integrase inhibitors. *Antivir. Chem. Chemother.* **2004**, 15, 67-81.
172. Kohout, L., Strnad, M., Kaminek, M., Types of brassinosteroids and their bioassays, en *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity & Applications*, ACS Symposium Series 474, Cutler, H.G., Yokota, T., Adam, G., eds., American Chemical Society, Washington, **1991**, 6, 56-73.
173. Takatsuto, S., Yazawa, N., Ikekawa, N., Takematsu, T., Takeuchi, Y., Koguchi, M., Structure-activity relationship of brassinosteroids. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2437-2441.
174. Meudt, W.J., Bennett, H.W., Rapid bioassay for auxin. *Physiologia Plantarum* **1978**, 44, 422-428.
175. 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.
176. 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.
177. Thompson, M.J., Mandava, N.B., Meudt, W.J., Lusby, W.R., Spaulding, D.W., Synthesis and biological activity of brassinolide and its 22 β ,23 β -isomer: novel plant growth-promoting steroids. *Steroids* **1981**, 38, 567-580.
178. Maeda, E., Rate of lamina inclination in excised rice leaves. *Physiologia Plantarum* **1965**, 18, 813-827.

179. Arteca, R.N., Bachman, J.M., Light Inhibition of Brassinosteroid-Induced Ethylene Production. *Journal of Plant Physiology* **1987**, *129*, 13-18.
 180. Krizek, D.T., Worley, J.F., The Influence of Spectral Quality on the Internodal Response of Intact Bean-Plants to Brassins. *Physiologia Plantarum* **1981**, *51*, 259-264.
 181. Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., Chory, J., A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science* **1996**, *272*, 398-401.
 182. Kubinyi, H., Biological data. The activity of group contributions., en Mannhold, R., Krogsgaard-Larsen, P., Timmerman, H., eds., VCH publishers, New York, **1993**.
 183. Fig.P 2.2a. 1994.
 184. Hnilickova, J., Sisa, M., Capdevila, E., Esteve, A., Brosa, C., Kohout, L., Synthesis of androstane brassinosteroid analogues with ester group in position 17 β designed by molecular modeling techniques. Poster presentation, 15th European Symposium on Organic Chemistry, 8-13th July, 2000, Dublin.
 185. Bosch, J.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2009**.
 186. Vidal, M.; Brosa, C., *Comunicació personal*, **2009**.
-