



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

**ESTUDIO TEÓRICO DE LAS INTERACCIONES DE
LOS BRASINOESTEROIDES CON EL MEDIO
BIOLÓGICO**

Memoria presentada por

Cercis Morera Boado

para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas,

dirigida por

Dr. Raúl Hermín González Jonte

Dra. Esther Alonso Becerra

MADRID, 2011

Raúl Hermín González-Jonte Cruz, Profesor Titular Interino del Departamento de Química Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid

y

Esther Alonso Becerra, Profesora Titular del Departamento de Química Física de la Universidad de La Habana.

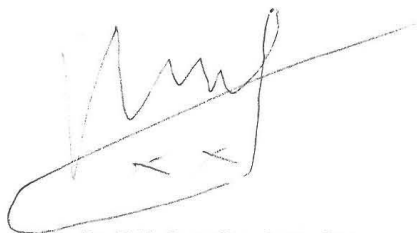
CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada:

"Estudio teórico de las interacciones de los Brasinoesteroides con el medio biológico"

presentada por **Cercis Morera Boado** para optar al título de Doctor en Ciencias, ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

En Madrid a 9 de junio de 2011



Fdo.: Dr. R.H. González-Jonte Cruz



Fdo.: Dra. E. Alonso Becerra

A la memoria de mi mamá Isabel de la Caridad Boado Sardiñas.
A mi papá y a mi hermano.

Agradecimientos

He pensado tanto en el momento de escribir y sobre todo de leer los agradecimientos, que no sé ni por donde empezar. Primero quiero agradecer al profesor Montero, por siempre poder contar con él, por enseñarme a ser independiente y por su confianza en mí. A Garci, por todo lo que he aprendido de él, por apoyarme siempre, por tu generosidad, y tú cariño. A Esthercita, por ser la impulsora de esta tesis, muchas gracias. Al Rauli, que le agradezco todo lo que ha hecho por mí.

Quiero agradecer a todas mis amigas, que sin ellas no soy nadie, pues de cada una he aprendido muchísimo, y soy muy feliz de tenerlas a mi lado, hablo de Susana, Tuti, Rachel, y Yoana. Gracias por soportarme en todas mis facetas, las quiero muchísimo. A mi hermanita Yahima Oliva, por siempre estar a mi lado. A la Niurkity por su apoyo incondicional. A la Betty por su sinceridad. Al profe Carlos Pérez por su amistad, que me honra muchísimo. A mi suegri linda, por tu comprensión y cariño.

A todos los profes de mi Dpto, Nieto, Núñez, Jacques, Pedrín, Peláez, la Helen, Maura, Norma, Dennys. A la Chavatiña y la Leslita, por apoyarme siempre. A mis niños del LQCT, Kikín, Kenny, Miguel, Marco, Carlos y el Joe, por aguantarme siempre y por los momentos de desesperación. A Yoanna, por su cariño. A Piti por sus majaderías. A todos los que están presentes y que de una forma u otra me han ayudado, a mis estudiantes más queridos: Jesús, muchas gracias. Además al departamento de Química Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, por recibirme y por el apoyo y cariño que siempre me han brindado, a Rafa, Paloma, al profe Jaime, Salama, Alfredo, Nacho, y Guillermo.

Por último quiero agradecer a las personas más importantes de mí vida, a quiénes va dedicada esta tesis, a mi mamita, porque imagino lo orgullosa que estarías de mí, si soy doctora hoy es por tí mami, siempre estás en mí corazón. A mi papito, que es mi ejemplo a seguir en todo, mi apoyo incondicional. A mi hermano lindo, porque te adoro, y quiero con toda mi alma, por confiar tanto en mí. A mis sobrinos preciosos, Romelito y Rachelita, por brindarme muchísima alegría todos los días. A Ady, por tus enseñanzas. Por último quiero agradecer al amor de mí vida, a mi Carly, quién ha estado a mi lado brindándome amor y cariño siempre, por tu paciencia, por ser mi soporte en los momentos más difíciles, por conocerme tanto y por todo el tiempo que hemos compartido juntos.

INDICE

| | Contenido | Pág. |
|--|--|------|
| Capítulo I <i>INTRODUCCIÓN</i> | | |
| 1.1. | Consideraciones generales | 3 |
| 1.2. | Objetivos | 5 |
| Capítulo II <i>MÉTODOS DE CÁLCULO PARA BRASINOESTEROIDES</i> | | |
| 2.1. | La química computacional: Métodos de Cálculo. | 11 |
| 2.1.2. | Métodos de <i>mecánica cuántica</i> | 12 |
| 2.1.2.1. | El método de Hartree-Fock | 12 |
| 2.1.3. | Error de Superposición de Bases (BSSE) | 14 |
| 2.1.4. | Correlación electrónica | 15 |
| 2.1.5. | Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) | 16 |
| 2.1.5.1. | Funcionales de correlación intercambio | 18 |
| 2.1.6. | Métodos semiempíricos | 21 |
| 2.1.7. | Superficie de energía potencial (SEP), optimización de geometrías y análisis conformacional. | 23 |
| 2.1.8. | Métodos para el estudio de los efectos del solvente | 25 |
| 2.1.9. | La aproximación de la Hipersuperficie de Múltiples Mínimos (MMH) | 25 |
| 2.2. | Análisis de la densidad electrónica | 29 |
| 2.2.1. | La teoría de Átomos en Moléculas | 29 |
| 2.2.1.1. | Clasificación de puentes de hidrógeno según la teoría de átomos en molécula | 31 |
| 2.3. | Relaciones cuantitativas estructura – actividad (QSAR) | 32 |
| 2.4. | Sistemas en estudio | 33 |

INDICE

| | | |
|----------|--|----|
| 2.4.1. | Brasinoesteroides naturales | 33 |
| 2.4.2. | Antecedentes en el estudio teórico de la estructura e interacciones de los brasinoesteroides | 39 |
| 2.4.2.1. | Estudios basados en métodos clásicos | 39 |
| 2.4.2.2. | Estudios basados en métodos mecano-cuánticos | 43 |
| 2.5. | Evidencias sobre las interacciones entre esteroides y proteínas | 44 |

Capítulo III **MODELOS ESTRUCTURALES DE BRASINOESTEROIDES**

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1. | Estudio de los brasinoesteroides aislados | 49 |
| 3.1.1. | Estudio conformacional de un modelo de la cadena lateral | 49 |
| 3.1.2. | Validación de métodos para la reproducción de geometrías de estos sistemas | 50 |
| 3.1.3. | Análisis AIM de las interacciones intramoleculares | 52 |
| 3.2. | Estudio de las interacciones de los brasinoesteroides con moléculas de interés biológico | 53 |
| 3.2.1. | Estudio conformacional de un modelo de la cadena lateral de la brasinólida formando complejos moleculares con moléculas pequeñas | 53 |
| 3.2.2. | Modelos de la interacción brasinoesteroides-agua | 54 |
| 3.2.3. | Modelos de la interacción brasinólida-aminoácidos | 54 |

Capítulo IV **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

| | | |
|--------|--|----|
| 4.1. | Estudio conformacional de un modelo de la cadena lateral | 59 |
| 4.1.1. | Influencia del sustituyente del C ₂₄ en el análisis conformacional | 70 |
| 4.2. | Validación de métodos para la reproducción de geometrías de estos sistemas | 71 |
| 4.3. | Análisis de las interacciones intramoleculares | 76 |
| 4.4. | Conclusiones parciales del estudio de brasinoesteroides aislados | 80 |
| 4.5. | Estudio de las interacciones de los brasinoesteroides | 81 |
| 4.5.1. | Estudio conformacional de un modelo de la cadena lateral de la brasinólida (BR _m) formando complejos moleculares con moléculas pequeñas. | 81 |

INDICE

| | | |
|----------|---|-----|
| 4.5.1.1. | Análisis AIM de las interacciones intra- e intermoleculares de los complejos BR _m -moléculas | 85 |
| 4.5.2. | Estudio de la solvatación de los brasinoesteroides | 93 |
| 4.5.2.1. | Interacción entre los brasinoesteroides y una molécula de H ₂ O, (BRS)-(H ₂ O) ₁ | 93 |
| 4.5.2.2. | Análisis energético de los complejos (BRS)-(H ₂ O) ₁ | 97 |
| 4.5.2.3. | Análisis de las geometrías de los complejos BRS-(H ₂ O) ₁ | 100 |
| 4.5.2.4. | Análisis termodinámico de los clusters BRS-(H ₂ O) _n con n=2 a 5 | 101 |
| 4.5.2.5. | Interacciones preferenciales de los clusters BRS-(H ₂ O) _n con n=2 a 5 | 104 |
| 4.5.3. | Estudio de la Interacción de la brasinólida con los aminoácidos naturales | 109 |
| 4.5.3.1. | Estudio de los complejos <i>brasinólida-aminoácidos</i> más estables | 119 |

Capítulo V CONCLUSIONES

Capítulo VI REFERENCIAS

ANEXOS

ANEXO 1 RESUMEN DE LAS TRES VARIANTES DE LA METODOLOGÍA MMH

ANEXO 2 ESTUDIO CONFORMACIONAL DE LOS RESTANTES MODELOS DE LA CADENA LATERAL.

ANEXO 3 PARÁMETROS GEOMÉTRICOS CALCULADOS Y EXPERIMENTALES PARA LA VALIDACIÓN DE LAS GEOMETRÍAS

ANEXO 4 GEOMETRÍAS DE CLUSTERS BRS-(H₂O)_n CON n=4 y 5

ANEXO 5 PUBLICACIONES

I. INTRODUCCIÓN

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Consideraciones generales.

Los brasinoesteroides (BRS) constituyen una de las hormonas más importantes del reino vegetal. A diferencia de las demás fitohormonas presentan estructura esteroideal y muestran elevada actividad biológica a muy bajas concentraciones, en el orden de 0.001 - 0.1 ppm, lo que es aproximadamente 100 veces inferior que la de otros reguladores del crecimiento vegetal¹. Estas fitohormonas han sido ampliamente usadas en la agricultura desde su descubrimiento, ya que la aplicación de pequeñas cantidades provoca una mejora considerable en el crecimiento y desarrollo de las plantas²⁻⁴. Estos reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel vital en los procesos de fotoregulación y control hormonal. Además aumentan la división celular, el contenido de clorofila, la inclinación de las hojas, la germinación de las semillas, la altura de la planta y el tamaño de las raíces^{5,6}. El efecto de los BRS en el crecimiento vegetal es particularmente fuerte en condiciones de crecimiento adversas (temperaturas extremas, escasez de nutrientes, salinidad y sequía), por lo que han sido denominados como las "hormonas del estrés"^{7,8}. Se ha comprobado que sin la presencia de estas fitohormonas las plantas serían diminutas e incapaces de reproducirse.

Uno de los campos de investigación más activos en estos sistemas es el desarrollo de estudios cuantitativos que relacionan su estructura con la actividad biológica (QSAR)⁹⁻¹⁸. Debido a las bajas concentraciones en que se encuentran estas especies en la naturaleza se encarece mucho su aislamiento por vía natural, siendo además la síntesis de los BRS naturales más activos, brasinólida (**BR**) y 24-epibrasinólida (**epiBR**), muy costosa. Es por esto que se han desarrollado muchos trabajos QSAR con vistas a la obtención de BRS y análogos de los mismos cuya relación actividad biológica-costeo sea más favorable. Sin embargo, aunque se conoce que determinadas funcionalidades en el anillo A y B, así como en la cadena lateral de estas hormonas contribuyen a aumentar la actividad biológica de las mismas, no existe actualmente una interconexión clara entre la estructura y las propiedades biológicas de los BRS¹⁹. Lo anterior se debe principalmente al poco conocimiento que se tiene de cómo ocurre la interacción de estas fitohormonas con el receptor en la planta. La receptora de estas especies es una proteína de membrana, la cual hasta el momento no se ha podido aislar y por lo tanto no se cuenta con su estructura de tres dimensiones (3D)²⁰⁻²³.

Se han desarrollado experimentos bioquímicos que han comprobado la interacción directa de la **BR** con el receptor biológico^{21,22,24-26}, pero estos estudios experimentales han aportado poca información acerca de cómo ocurre dicha interacción. Debido a la ausencia de datos experimentales resulta conveniente acudir al uso de los métodos de cálculo mecánico cuántico de la química computacio-

nal. Estos métodos constituyen una herramienta muy poderosa para describir mediante modelos confiables los fenómenos que ocurren a nivel atómico y molecular (nanoscópico). Aunque sus resultados normalmente complementan información obtenida experimentalmente, en muchos casos es posible predecir propiedades y fenómenos que no hayan sido estudiados experimentalmente. Las interacciones moleculares han sido un tema de gran interés para la química computacional, la cual puede ofrecer un entendimiento de la naturaleza compleja de las mismas en ocasiones donde la información experimental sea poca o inaccesible.

Las interacciones moleculares juegan un papel importante en la mayoría de los procesos biológicos relacionados con la vida²⁷. Cuando las energías de interacción están razonablemente por debajo de las energías requeridas para la formación del enlace covalente (150-400 kJ/mol) se está en presencia de interacciones débiles, las cuales juegan un papel crucial en la química supramolecular, en la estructura de las biomoléculas y en el reconocimiento molecular por sólo citar algunos ejemplos²⁸. Estas interacciones pueden ser intra- e intermoleculares, siendo ejemplo de las mismas las interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, las llamadas hidrofóbicas, de transferencia de carga, entre otras²⁸.

Las propiedades físicas, químicas, y biológicas de una molécula de relativa complejidad dependen en la mayoría de los casos de las conformaciones que éstas adoptan. Las interacciones intramoleculares son muy importantes para entender la estabilidad relativa de determinadas conformaciones con respecto a otras. El análisis conformacional constituye un procedimiento de la química computacional dedicado a la búsqueda de los conformeros preferenciales de una molécula determinada²⁹. Sin embargo, por razones de potencia computacional, a medida que se modelan estructuras más grandes y flexibles, como es el caso de los BRS, se hace más difícil la utilización de métodos que tengan en cuenta el efecto del intercambio electrónico, que solo se logra con los métodos mecánico-cuánticos. La gran mayoría de los estudios teóricos desarrollados en estas fitohormonas utilizan campos de fuerza de mecánica molecular para realizar estudios conformacionales de las cadenas laterales flexibles que estas presentan³⁰⁻³³, las que se espera puedan influir significativamente en la actividad biológica de los BRS³⁴. También se ha estudiado la formación de enlaces de hidrógeno mediante mecánica molecular para estudiar la interacción de los BRS con diferentes moléculas que simulan interacciones importantes en el medio biológico. La principal desventaja de estos métodos radica en la pobre descripción que los mismos realizan de los efectos cuánticos, evitando su utilización en el tratamiento de procesos que involucren cambios en la estructura electrónica, transferencias de carga y reacciones químicas³⁵.

Por algunas de las razones anteriores, el estudio de las propiedades electrónicas, conformaciones e interacciones moleculares de los BRS ha sido mucho menos tratado con métodos mecano-cuánticos. En el presente trabajo se realizan por primera vez, búsquedas conformacionales a través de la metodología de hipersuperficies de múltiples mínimos (MMH) desarrollada en nuestro laboratorio^{36,37}. Lo anterior nos permitirá conocer las conformaciones preferenciales de las cadenas laterales de estas fitohormonas mediante métodos mecano-cuánticos y además estudiar la influencia de las interacciones moleculares sobre estas conformaciones. La nueva modificación del MMH para el estudio conformacional mejora la exploración de la superficie de energía potencial tanto de las moléculas como de sus asociaciones moleculares, debido a que tiene en cuenta los grados de libertad internos de las mismas. El empleo de esta nueva herramienta nos permitió desarrollar una metodología que utiliza métodos mecano-cuánticos para tratar las interacciones moleculares de estas especies y explorar de forma aceptable la superficie de energía potencial de cualquier molécula de tamaño y complejidad similar a la de los BRS. En esta tesis, haciendo uso de la metodología MMH se estudian las conformaciones preferenciales de los BRS, sus propiedades electrónicas y sus interacciones moleculares con el fin de aportar información teórica, hasta ahora inexistente, que facilite la comprensión de cómo ocurre la interacción de estas fitohormonas con el receptor utilizando los recursos computacionales existentes.

1.2. Objetivos.

Por lo tanto, nuestro objeto de estudio está constituido por *los métodos de modelación de interacciones moleculares a nivel cuántico y sus técnicas para permitir la aplicación a la estructura de los brasinoesteroides naturales*. El problema científico que pretendemos resolver radica en *obtener modelos teórico-computacionales confiables para la estructura electrónica y las interacciones moleculares de los brasinoesteroides y que estén basados en los métodos mecano-cuánticos*. Este problema científico conlleva a la aplicación de los métodos de la química computacional basados en la mecánica cuántica como importante e inevitable vía para la profundización en el estudio de la estructura e interacciones de estos compuestos a nivel molecular si se desea tener en cuenta los fenómenos asociados al intercambio y las densidades electrónicas. Su gran utilidad radica fundamentalmente en que facilitan un acercamiento confiable a problemas para los cuales es muy difícil obtener información experimental.

La hipótesis que guía nuestra investigación es que *con la aplicación de las herramientas mecano-cuánticas de la química computacional es posible construir modelos teóricos capaces de describir la estructura electrónica en las conformaciones preferenciales de los brasinoesteroides y las interac-*

ciones de estas fitohormonas con moléculas representativas de interés en el medio biológico.

Nos proponemos como **objetivo general** de nuestro trabajo el *desarrollo de modelos teóricos para la comprensión de la estructura electrónica y las interacciones moleculares de los BRS*. Para dar respuesta a este objetivo general nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la flexibilidad conformacional de la cadena lateral de los BRS aplicando por vez primera la metodología MMH modificada para este propósito de tener en cuenta grados de libertad conformacionales de las moléculas.
2. Determinar los métodos teóricos más apropiados para describir y caracterizar la estructura electrónica de los BRS y sus interacciones intramoleculares.
3. Determinar las características y naturaleza de las interacciones de la cadena lateral de la brasinólida con diferentes grupos funcionales pertenecientes a moléculas de interés biológico a través de la metodología MMH.
4. Estudiar los diferentes patrones de interacción de los BRS con agua a través de la metodología MMH.
5. Modelar la interacción de la brasinólida con los aminoácidos proteinogénicos a través de la metodología MMH.

En nuestro trabajo se han abordado los diferentes objetivos planteados inicialmente con la metodología MMH y posteriormente se han realizado cálculos mecano-cuánticos más rigurosos a diferentes niveles de teoría teniendo siempre en cuenta la relación calidad-costos computacional para elegir los métodos y bases utilizados. Cada objetivo planteado demanda del uso de diferentes métodos de cálculo, los cuales se exponen a continuación:

- Se realizó un estudio conformacional utilizando una nueva variante de la metodología MMH a través de métodos cuánticos semiempíricos. También fueron realizados cálculos a nivel DFT como forma de validación y generalización de resultados. De esta forma se obtuvieron resultados similares a los reportados por otros autores que han desarrollado búsquedas conformacionales mediante dinámica molecular³².
- Para estudiar la flexibilidad conformacional y las interacciones moleculares de la cadena lateral de los BRS se utilizó un modelo estructural de la misma frente a distintas moléculas que simulan interacciones biológicas importantes. Así, se obtuvieron los complejos más estables y se caracterizaron las interacciones producidas en cada caso.
- Se realizó una validación de diversos métodos semiempíricos y funcionales de la densidad con diferentes bases para la correcta descripción de las estructuras electrónicas de estos

esteroides.

- Para los estudios de las interacciones BRS - H₂O y brasinólida - aminoácidos se utilizó la metodología MMH y posteriormente se realizaron cálculos a nivel DFT. En cada caso se obtuvieron las interacciones preferenciales con estas fitohormonas, y las magnitudes termodinámicas relacionadas con la solvatación y asociación de las mismas por los aminoácidos. Se propuso un orden de afinidad teórico de la brasinólida por los 20 aminoácidos proteínogénicos.

A nuestro parecer, y después de consultada ampliamente la literatura científica existente, la novedad científica de este trabajo está en:

- 1) La utilización por vez primera de una modificación de la metodología MMH para el estudio conformacional de sistemas de elevada flexibilidad, como es la cadena lateral de los BRS, y utilizando métodos mecano-cuánticos;
- 2) Disponer de modelos teóricos capaces de reflejar estructuras electrónicas confiables de los BRS;
- 3) Explicar la interacción de estas moléculas con el medio biológico en que se encuentran de una forma sencilla y confiable.

Nuestros resultados constituyen una base para el mejor entendimiento de la química de los BRS, brindando nuevas experiencias en el estudio de estas fitohormonas. Los resultados obtenidos en este trabajo han sido publicados en artículos que aparecieron en tres revistas internacionales prestigiosas y especializadas en este campo. También se han presentado en alrededor de 10 eventos científicos nacionales e internacionales.

II. MÉTODOS DE CÁLCULO PARA BRASINOESTEROIDES

CAPITULO II. MÉTODOS DE CÁLCULO PARA BRASINOESTEROIDES

2.1. La química computacional: métodos de cálculo.

El término química computacional se utiliza generalmente cuando un método matemático está lo suficientemente bien desarrollado que puede ser automatizado e implementado en la computadora para aplicaciones relacionadas con la química^{38,39}. La química computacional aplicada a la estructura y los procesos moleculares abarca un amplio rango de métodos matemáticos, los cuales pueden dividirse en dos grandes categorías:

- Los métodos de mecánica cuántica, los cuales se basan en la Ecuación de Schrödinger para describir los sistemas mediante un tratamiento directo de la estructura electrónica. Estos métodos se subdividen a su vez en varias clases: métodos semiempíricos y métodos *ab initio*, según el nivel de teoría y tipo de aproximación utilizadas. Existen además dentro de esta categoría los métodos que trabajan con los funcionales de la densidad electrónica, llamados DFT, los cuales calculan la energía y las propiedades del sistema a partir de la información contenida en la densidad de probabilidad electrónica molecular⁴⁰.
- Los métodos clásicos, los cuales ajustan ecuaciones de la física clásica a las interacciones atómico - moleculares, sin considerar explícitamente a los electrones y simulando su presencia con parámetros adecuadamente obtenidos a partir de cálculos cuánticos y datos experimentales (muy utilizados en las llamadas mecánica y dinámica molecular). Obviamente, estos no permiten interpretaciones ni generalizaciones físicas, pues solo tienden a imitar los resultados de los métodos cuánticos o de los experimentos en los que se basan mediante la utilización de funciones matemáticas sencillas²⁹.

A partir de la Ecuación de Schrödinger, y por tanto de los métodos que de ella se derivan, se realiza el cálculo de la superficie de energía potencial (SEP) de las moléculas, la cual está dada por una función multidimensional que expresa la energía de interacción entre átomos de una molécula en función de sus coordenadas.

El desarrollo de los métodos de la química computacional ha sido muy acelerado en los años finales del siglo pasado y en el presente. La selección de cual método utilizar en cada problema científico en concreto y cómo interpretar los resultados que se obtienen constituye un problema del sistema en particular³⁹. Los métodos de cálculo utilizados en el presente trabajo son los mecanocuánticos, por lo que expondremos un breve resumen de sus principales características.

2.1.2. Métodos de mecánica cuántica.

Los métodos químico-cuánticos permiten una descripción de la estructura molecular en términos de núcleos atómicos y distribución electrónica alrededor de ellos, y constituyen una de las herramientas más utilizadas en el estudio químico teórico de sistemas de interés químico-físico y biológico. En teoría, la mecánica cuántica puede predecir exactamente cualquier propiedad de un átomo individual o de una molécula. En la práctica, con las ecuaciones de la química cuántica sólo se han encontrado soluciones analíticas exactas para un sistema monoelectrónico³⁹.

El postulado fundamental de la mecánica cuántica establece que existe una función de onda (ψ) que contiene toda la información que es posible calcular o predecir acerca de un sistema cuántico en estudio. Sobre esta función actúan operadores o funciones apropiadas que arrojan valores de las propiedades observables del sistema que se calcula. Al operador que nos permite obtener la energía total del sistema se le denomina Hamiltoniano (\hat{H}). La ecuación de valores y funciones propias que describe los sistemas cuánticos no relativistas es la Ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (Ecuación 2.1). La mayoría de las aproximaciones en la química cuántica se basan en la solución aproximada de esta ecuación:

$$\hat{H}\Psi = E \Psi \quad (2.1)$$

donde ψ y E representan los conjuntos de funciones propias y valores propios, respectivamente, soluciones de esta ecuación. Estas funciones propias, conocidas como funciones de onda, son dependientes de las coordenadas espaciales de todas las partículas y de las componentes de espín y constituyen el problema básico a resolver en el estudio teórico de la estructura atómica o molecular de un sistema⁴¹.

2.1.2.1. Método de Hartree Fock.

La Ecuación (2.1) no se puede resolver de forma exacta para sistemas de más de un núcleo y un electrón, por lo que se necesita una serie de métodos aproximados de tipo variacional o perturbativo para resolverla. La aplicación del principio variacional es de gran utilidad y ocupa un lugar prominente en todas las aplicaciones químico-cuánticas como una forma de aproximarnos sistemáticamente a la función de onda del estado base Ψ_0 . Este plantea que el valor esperado de \hat{H} para una función de onda arbitraria bien comportada Ψ es mayor que el valor propio más bajo E_0 de \hat{H} correspondiente a la solución exacta de la ecuación⁴⁰. Es decir, esto indica que cualquier función normalizada y bien definida para un problema en específico, proporciona un valor esperado de la energía mayor o

igual que el valor exacto de la energía del estado fundamental. Se opera proponiendo una función de prueba aproximada para el estado objeto de estudio, la cual contiene parámetros variacionales que pueden ser empleados para conseguir el valor mínimo de la energía del sistema.

Además de la aproximación de Born y Openheimer (BO), la cual implica que el movimiento de los núcleos y los electrones pueden analizarse por separado, el método de Hartree-Fock (HF) incluye otra aproximación muy importante. Esta simplificación es conocida como aproximación orbital del modelo del electrón independiente, donde la función de onda multieletrónica se construye como una combinación de funciones de onda monoeléctricas que se conocen como orbitales atómicos (OAs) y son monocéntricas mientras que para moléculas se conocen como orbitales moleculares (OMs), y son multicéntricas. Según esta aproximación la función de onda electrónica se escoge como un simple determinante de Slater, donde las funciones monoeléctricas son los espín-orbitales $\chi_i(\vec{x}_i)$. Al tener en cuenta una función de onda monoeléctrica se está considerando la repulsión electrónica solamente como un efecto promedio y esta constituye la principal aproximación del método de HF.

El objetivo de este método es encontrar los espín-orbitales que minimizan la energía electrónica, manteniendo el constreñimiento de que los mismos permanezcan ortonormales. El mejor conjunto de espín-orbitales $\chi_i(\vec{x}_i)$ es el que corresponda al mínimo valor de energía electrónica y se obtiene resolviendo las ecuaciones de HF.

$$\hat{f}(x_1)\chi_K(x_1) = \varepsilon_K \chi_K(x_1) \quad (2.2)$$

donde $\hat{f}(x_1)$ es el operador hamiltoniano monoeléctrico de Fock y viene expresado por la Ecuación 2.3. Los valores propios ε_K representan las energías de los orbitales.

$$\hat{f}(x_1) = \hat{h}_K(x_1) + \sum_j [2\hat{J}_{kj}(x_1) - \hat{K}_{kj}(x_1)] \quad (2.3)$$

En la Ecuación 2.3, \hat{J} y \hat{K} representan los operadores de Coulomb y de intercambio, respectivamente, los cuales describen la interacción entre dos electrones⁴⁰. El operador de Coulomb \hat{J} es el potencial local experimentado por un electrón que se encuentra en el espín orbital χ en el punto r . El operador de intercambio \hat{K} no está definido en un punto del espacio, sino en términos de su efecto en el espín orbital.

La técnica utilizada para la solución de la Ecuación 2.2 es el procedimiento del campo autoconsistente o autoconcordado (SCF de sus siglas en inglés), ya que los orbitales se derivan de sus propios potenciales efectivos. De forma resumida, esta técnica comienza con un conjunto de orbitales de prueba, con las cuales deben ser resueltas las ecuaciones de *HF*. El conjunto de orbitales resultante es usado entonces en la nueva iteración hasta que los orbitales de entrada y de salida solo se diferencien en menos de un valor umbral de energía previamente definido y generalmente muy bajo. A su vez, las funciones moleculares monoeléctricas u OMs se resuelven usualmente mediante su expansión en términos de un conjunto de bases finito.

La base es el conjunto de funciones de onda utilizados para describir los OMs. Por razones computacionales, el conjunto de funciones de base no suele ser suficiente para una representación completa de las funciones de onda moleculares lo cual provoca que la selección de la base condicione la calidad de los resultados obtenidos. Debido a ello, esta elección constituye un paso importante ante cualquier modelación. La práctica ha impuesto que las bases usualmente sean descritas por funciones del tipo Gaussianas (GTOs, con una dependencia $(\exp(-\alpha r^2))$). Las del tipo Slater (STOs, con una dependencia $(\exp(-\alpha r))$) son solo escasamente usadas. Las funciones STOs reproducen más adecuadamente los orbitales atómicos, representando bien la densidad electrónica en el espacio, pero desde el punto de vista computacional son más difíciles de tratar.⁴²

2.1.3. Error de Superposición de bases (BSSE).

El hecho de usar funciones de base situadas en diferentes especies moleculares de un mismo sistema genera frecuentemente una superestabilización artificial como producto de la minimización variacional utilizada. Este problema se conoce como el “error de superposición de las bases” (BSSE) y puede arrojar resultados confusos e inexactos aún en cálculos rigurosos y costosos.

El procedimiento usado en nuestro trabajo, para el tratamiento de los complejos intermoleculares, es la llamada aproximación supermolecular⁴³, en la cual la energía de asociación de los complejos se calcula como la diferencia de energía entre el complejo intermolecular y las moléculas aisladas, según la siguiente ecuación:

$$\Delta E(AB) = E(AB) - E(A) - E(B) \quad (2.4)$$

para evitar o disminuir efectos indeseables del BSSE.

El procedimiento de CounterPoise (CP), desarrollado por *Boys y Bernardy*⁴⁴, es el método estándar usado en la literatura, para corregir el BSSE y en el que se basan muchos resultados de esta tesis. El procedimiento de CP consiste en calcular la energía de cada monómero en la geometría del complejo, empleando una base que incluye las funciones atómicas de ambas moléculas. Así, para calcular un monómero en particular, se emplean sus funciones de base y se sitúan además el conjunto de funciones de base correspondientes al otro monómero, pero sin incluir los núcleos del mismo. A estas últimas funciones se les llama orbitales fantasma.

Se ha demostrado que el BSSE afecta también la geometría de los complejos⁴⁵. Por esta razón, sobre todo si se estudian asociaciones muy débiles, es necesario optimizar las geometrías en la superficie de energía potencial libre de BSSE, ya que la optimización en una superficie de energía potencial no corregida podría conducir a geometrías totalmente erróneas. Para esto se requiere de la evaluación del BSSE en cada paso de la optimización, seguida del cálculo de los gradientes correspondientes. En los casos donde el BSSE no afecte tanto la geometría se puede corregir la superficie de energía potencial contaminada mediante un cálculo de energía.

2.1.4. Correlación electrónica.

La energía de correlación para ciertos estados con respecto a un hamiltoniano específico, es la diferencia entre sus valores exactos y valores obtenidos por un cálculo de Hartree-Fock para el estado considerado⁴⁶.

$$E_{Corr} = E_0 - E_{HF} \quad (2.5)$$

La correlación electrónica está relacionada en gran medida con la repulsión instantánea de los electrones, la cual se tiene en cuenta de forma promedio en la aproximación de HF. Como resultado, los electrones tienden a estar más cerca que en la realidad, lo cual conlleva a que E_{HF} sea siempre mayor que la energía exacta E_0 del sistema y por lo tanto la energía de correlación es siempre negativa. El valor relativo de la E_{Corr} puede llegar a ser alrededor del 1% de la energía total de los electrones del sistema, lo que aunque parezca pequeño, puede ser decisivo en ciertos procesos de interacciones moleculares y formaciones o rupturas de enlaces. Para recuperar esta correlación y disminuir el valor de la energía se recurre a tratamientos llamados “post-Hartree-Fock” (post-HF) ó métodos de correlación electrónica. Los diferentes métodos post-HF difieren en la forma en que se calculan los coeficientes de participación de los determinantes, estos métodos pueden ser: métodos per-

turbativos⁴⁷, o métodos variacionales³⁹. Una manera alternativa de tener en cuenta toda la energía electrónica, incluyendo la correlación, es empleando los métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT). Esta teoría implica usar la densidad electrónica como variable fundamental que proporciona toda la información para el cálculo de la energía, aunque las aplicaciones actuales siguen un procedimiento numérico muy parecido al de HF e incluyen estos efectos a través de “funcionales” específicos para cada tipo de interacción electrónica, incluida la correlación. A continuación analizaremos las bases fundamentales de las aplicaciones de DFT.

2.1.5. Teoría de los funcionales de la densidad (DFT).

El enfoque básico de la química cuántica utiliza la función de onda Ψ como la variable central. La razón es la teoría original establece que una vez que conocemos Ψ (o una buena aproximación a ella) se tiene acceso a toda la información que se puede calcular o estimar teóricamente acerca de un estado en particular de nuestro sistema. Un ejemplo típico de este enfoque es la aproximación de Hartree-Fock que se expuso anteriormente (Epígrafe 1.1.2.1). Existe, sin embargo, un grave problema; la función de onda multielectrónica exacta no puede ser obtenida debido a su naturaleza, además depende de $4N$ variables, tres espaciales y una de espín para cada uno de los electrones⁴⁸ lo que adiciona otra dificultad.

A diferencia de la Ψ , la densidad electrónica $\rho(r)$ es un observable y puede ser medida experimentalmente por difracción de rayos X (DRX). Además solamente depende de tres coordenadas, a diferencia de la Ψ . Se ha demostrado que la densidad electrónica ofrece todos los ingredientes necesarios para plantear el hamiltoniano del sistema en función de la misma y este es precisamente el basamento de la teoría de los funcionales de la densidad. Este método tiene la ventaja importante de que implícitamente incluye los efectos de correlación en los cálculos y que además consumen aproximadamente el mismo tiempo que los cálculos de HF, de los que ya hemos descrito que no incluyen correlación electrónica (Epígrafe 1.1.4).⁴⁹

El primer teorema de Hohenberg y Kohn (1964)⁵⁰ es el pilar sobre el cual la DFT ha sido construida. Este teorema establece que para sistemas con un estado fundamental no degenerado, la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental $\rho_0(\vec{r})$ determina al potencial externo $V_{ext}(r)$ y el número de electrones. Este teorema prueba que la $\rho_0(\vec{r})$ determina el hamiltoniano electrónico molecular, y de esta forma también la energía y otras propiedades, e indirectamente, la función de onda del estado fundamental.

La energía electrónica del estado fundamental E_0 es un “funcional” de la función $\rho_0(\vec{r})$, y se representa por: $E_0 = E_v[\rho_0]$ donde el subíndice v enfatiza la dependencia de E_0 del potencial externo $V_{ext}(r)$, que difiere para distintas moléculas.

El hamiltoniano electrónico puede ser planteado en función de la densidad electrónica como:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] \quad (2.6)$$

donde T es el término referido a la energía cinética de los electrones, E_{Ne} es la energía de atracción entre los núcleos y los electrones y E_{ee} es la energía de repulsión entre los electrones.

El segundo *teorema de Hohenberg y Kohn*⁵⁰, establece que la menor energía obtenible para un sistema, es la que corresponde con la densidad electrónica real de su estado base. Esto es equivalente al teorema variacional y ofrece una forma operativa de encontrar la densidad electrónica del estado base del sistema.⁴⁸

El éxito de los métodos DFT, se debe a la implementación del formalismo de Kohn y Sham. En el mismo se idea un método práctico para obtener ρ_0 y E_0 a partir de ρ_0 ⁵⁰. El mismo se basa en asumir que la energía cinética electrónica puede ser calculada empleando un conjunto de orbitales que proporcionen la densidad electrónica del sistema. El *Hamiltoniano* (\hat{H}_{KS}), viene entonces representado por la Ecuación 2.7:

$$\hat{H}_{KS} = \sum_{i=1}^N \left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + V_s(r_i) \right] \quad (2.7)$$

donde el primer término dentro de la sumatoria representa el operador de la energía cinética de los electrones y $V_s(r_i)$ es el potencial externo ejercido por los núcleos. El operador \hat{H}_{KS} describe un sistema de electrones independientes por definición y por lo tanto no contiene ningún término de interacción electrónica. La conexión de este sistema artificial y el real se establece al escoger el potencial efectivo $V_s(r_i)$ de forma tal que la densidad electrónica sea exactamente igual a la del estado base del sistema real. Así la Ecuación 2.6 puede ser desglosada como se muestra en la Ecuación 2.8:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{Ne}[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (2.8)$$

Donde $T_s[\rho]$ se podría calcular de manera exacta para el sistema de partículas no interactuantes, $J[\rho]$ es el potencial coulombico de interacción electrón-electrón, $E_{Ne}[\rho]$ es el término de interacción núcleo-electrón y por último, $E_{xc}[\rho]$ es el término de correlación e intercambio el cual es desconocido. Existen una serie de aproximaciones para el desarrollo de este último término y una vez establecida la más adecuada, se minimiza la energía, manteniendo el constreñimiento de que los orbitales de Kohn y Sham sean ortogonales. Así se obtiene un conjunto de ecuaciones equivalentes a las ecuaciones de HF, aunque con un significado diferente. En resumen podemos decir que en el término $E_{xc}[\rho]$ se incluye todo aquello que no se puede calcular exactamente. Uno de los campos más activos de la DFT es precisamente la búsqueda de expresiones para $E_{xc}[\rho]$ que proporcionen resultados aceptables.

2.1.5.1. Funcionales de correlación intercambio.

La energía de intercambio - correlación $E_{xc}[\rho]$ se divide generalmente en dos términos separados, la componente de intercambio E^x , y la componente de correlación E^c a pesar de que solo tiene sentido físico la combinación de ambas. El término E^x está asociado a las interacciones entre electrones de espines paralelos, mientras que el término E^c representa esencialmente la interacción de electrones de espín opuesto.

$$E^{xc}[\rho] = E^x[\rho] + E^c[\rho] \quad 2.9$$

Estos dos términos en los cuales se descompone $E_{xc}[\rho]$ también constituyen funcionales de la densidad electrónica y son conocidos como funcional de intercambio $E^x[\rho]$ y funcional de correlación $E^c[\rho]$. Estos funcionales pueden ser de dos tipos:

- locales o que dependen solamente de la densidad electrónica;
- de gradientes corregido o que dependen tanto de la densidad electrónica como del gradiente $\nabla\rho(\vec{r})$ ⁵¹.

Aproximación de la densidad local (LDA)

La LDA constituye la forma más simple de representar el funcional de correlación-intercambio. En esencia, este método asume implícitamente que $E_{xc}[\rho]$ en cualquier punto del espacio es solamente función de $\rho_0(\vec{r})$ y que está dada por la densidad electrónica de un gas uniforme de elec-

trones, o lo que es lo mismo, el sistema se encuentra en un medio en el que la densidad electrónica varía muy lentamente, de tal forma que la energía de intercambio y correlación puede ser calculada usando las ecuaciones derivadas de un gas de densidad electrónica uniforme. Este modelo está bastante alejado de la realidad tanto en átomos como en moléculas, que se caracterizan por densidades electrónicas que varían rápidamente. La versión de la LDA para sistemas de capa abierta es la llamada aproximación de espín de la densidad local, LSDA⁵².

Aproximación de gradiente generalizado (GGA)

A principios de los años 80 se dieron los primeros pasos para el desarrollo de otros funcionales. Los cambios consistieron en tener en cuenta no solamente la densidad electrónica $\rho(\vec{r})$ en un punto particular r , sino incluir además el gradiente de la misma $\nabla\rho(\vec{r})$. Esto último permitió tener en cuenta la no homogeneidad de la densidad electrónica. Esta aproximación considera un gas no uniforme de electrones para lo cual realiza un desarrollo en serie de Taylor de la densidad. Como ejemplo de funcionales GGA de intercambio más utilizados se encuentran: Becke 88(B)⁵³⁻⁵⁸ y Perdew-Wang (PW)⁵⁹.

El funcional de correlación más conocido es el LYP, derivado por Lee, Yang y Parr en 1988⁶⁰. Este funcional no se construyó basándose en LDA, sino teniendo en cuenta una ecuación muy exacta de la energía de correlación del átomo de helio, el mismo contiene un parámetro empírico.

En general estos funcionales GGA representan una mejora significativa comparada con los métodos locales (LDA; LSDA). Sin embargo, la precisión de estos métodos no es todavía suficiente para describir correctamente muchos aspectos químicos de las moléculas. Ejemplo de lo anterior lo constituyen las interacciones de van der Waals (vdW), donde estos fallan.

Funcionales Híbridos (H-GGA). El funcional B3LYP

Los funcionales híbridos (H-GGA) contienen la energía convencional de intercambio correlación de los métodos GGA con un porcentaje de intercambio de Hartree-Fock (exacto). Es decir estos funcionales incluyen una mezcla de la energía de intercambio de HF y DFT y la energía de correlación debida a DFT. De esta forma queda definido el término de intercambio-correlación como:

$$E_{\text{híbrido}}^{XC} = c_{HF} E_{HF}^X + c_{DFT} E_{DFT}^{XC} \quad 2.10$$

Donde los c son los parámetros empíricos introducidos por Becke en 1993 para determinar el peso de cada una de las componentes y de los funcionales mezclados. El B3⁶¹ es una combinación de

las componentes de interacción e intercambio de LSDA, de la componente de intercambio de HF, del funcional de correlación PW91 y del funcional de intercambio B, incluyendo tres parámetros empíricos de tal manera que se reprodujeran bien las energías de atomización e ionización, así como las afinidades protónicas incluidas en la base G2 (una combinación de bases y procedimientos estándar para el programa Gaussian).

Actualmente el funcional híbrido más popular es el B3LYP y fue propuesto por Stephens y colaboradores en 1994⁶². Aunque es muy similar al B3 de Becke, en el B3LYP el funcional de correlación PW91 es reemplazado por el funcional LYP. Los valores de los parámetros empíricos son los mismos obtenidos por Becke para el B3. Así la expresión del B3LYP viene dada por la Ecuación 2.11

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1-a)E_X^{LSDA} + aE_{XC}^{HF} + bE_X^{B88} + cE_C^{LYP} + (1-c)E_C^{LSDA} \quad 2.11$$

B3LYP ha tenido gran éxito debido al gran número de propiedades diferentes para las que da buenos resultados, incluyendo áreas tan complicadas como la química de los metales de transición. A pesar de los éxitos que ha tenido la utilización del funcional B3LYP es importante hacer notar que presenta dificultades y no es, de ninguna manera, un cálculo exacto. De los problemas conocidos, la que más nos interesa en nuestro caso es su dificultad, por demás esperable, para describir las interacciones tipo vdW o interacciones de medio rango (~2-5 Å). Esta incapacidad para describir interacciones donde las energías dispersivas juegan un rol determinante limita su aplicación para muchos sistemas biológicos⁶³. No obstante, este método obtiene muy buenos resultados en cuanto a la reproducción de geometrías y la energética de complejos donde la componente electrostática tiene mayor contribución. Esto lo podemos encontrar en enlaces de hidrógeno de mayor fortaleza ²⁷.

Funcionales híbridos de gradiente meta- generalizado (HM-GGA). M05-2X

Los métodos HM-GGA⁶³⁻⁶⁸ representan una nueva clase de funcionales de la densidad y la investigación de los mismos está en activo desarrollo. La diferencia principal es que estos parten de los métodos m-GGA en lugar de los GGAs. Dependiendo igualmente de la energía de intercambio según HF, pero incorporan la densidad electrónica de espín, el gradiente de la densidad $\nabla\rho(\vec{r})$ y la densidad de energía cinética. Esta última ha sido añadida de forma balanceada en los funcionales de correlación e intercambio. En los últimos 5 años se han desarrollado nuevos funcionales HM-GGA para el tratamiento de metales de transición, termoquímica, e interacciones no covalentes. Uno de los grupos que más han contribuido es el de el Prof. Truhlar, en la Universidad de Minnesota, donde los funcionales M05⁶⁹, y M05-2X⁷⁰ están siendo muy utilizados para resolver problemas de

metales de transición y de interacciones no covalentes respectivamente. Así la expresión del M05-2X viene dada por la Ecuación 2.12:

$$E_{XC}^{hyb} = E_X^{HF} + \left(1 - \frac{X}{100}\right)(E_X^{DFT} - E_X^{HF}) + E_C^{DFT} \quad 2.12$$

donde E_X^{HF} es la energía no local de intercambio de HF, X es el porcentaje de intercambio de HF en el funcional híbrido, E_X^{DFT} es la energía local de intercambio de DFT y E_C^{DFT} es la energía de correlación local de DFT. El buen desempeño de este funcional en el tratamiento de las interacciones dispersivas se debe a una mejora en el funcional de correlación del mismo, sobre todo en el rango de 2-5 Å. El funcional M05-2X se ha reconocido como uno de los mejores que se han desarrollado hasta el momento⁶⁹ en la descripción de las interacciones de tipo no covalente en sistemas biológicos, y especialmente las interacciones débiles y de enlaces de hidrógeno, interacciones π - π stacking y energías de interacción de nucleobases⁶⁵.

2.1.6. Métodos semiempíricos.

Estos métodos tienen como ventaja que pueden ser usados para obtener resultados cualitativos confiables para sistemas de gran tamaño. En los métodos semiempíricos se tienen en cuenta los efectos de correlación electrónica, que por definición no aparecen en el esquema *HF*, a través de la parametrización contra resultados experimentales que incluyen toda la energía del sistema. El BSSE no existe debido, probablemente, a la ortogonalidad de las bases virtuales usadas. La mayor limitación de estos métodos radica en el empleo de parametrizaciones “*a posteriori*”, lo que conlleva a que no exista un modo sistemático de mejorar los cálculos ya que no hay una progresión en los niveles de teoría.

Los métodos de cálculo semiempíricos implementan un conjunto de aproximaciones con el objetivo de disminuir el costo computacional y hacerlos más rápidos que los métodos *ab-initio*. Una de las aproximaciones más importantes de estos métodos es la consideración de la aproximación de superposición diferencial nula, **ZDO** de sus siglas en inglés, que establece que los espacios comunes de los orbitales atómicos de base correspondientes a átomos diferentes es tan pequeña que los valores de las integrales correspondientes tienen valores despreciables⁷¹ lo que reduce o anula valores derivados de integrales de repulsión.

Actualmente diferentes métodos semiempíricos son empleados en el estudio de problemas de interés químico, entre los cuales podemos citar:

- **MNDO** (Modified Neglect of Differential Overlap)⁷²: es un método basado en la aproximación NDDO⁷³, en el que las integrales son parametrizadas en términos de variables atómicas, que dependen solamente de la naturaleza del átomo considerado.
- **AM1** (Austin Model 1)⁷⁴: es una mejora del método MNDO. Se diferencia del anterior esencialmente en que la energía de repulsión entre las distribuciones de carga se modifican para optimizar las interacciones repulsivas. Además, los parámetros para cada elemento se optimizaron a partir de un conjunto de moléculas representativas de cada uno.
- **PM3** (Parameterized Model revisión 3)⁷⁵: En este caso se generaliza la aproximación AM1 y las parametrizaciones se realizaron a partir de una data experimental más amplia así como que todos los parámetros se optimizaron simultáneamente. Es decir, para cada átomo se optimizaron los parámetros a partir de un conjunto representativo de moléculas que contenía todos los elementos a parametrizar, permitiendo elaborar de una sola vez, un conjunto de parámetros más generalizables para cada átomo.

Una de las limitaciones más importantes de los métodos semiempíricos MNDO, AM1 y PM3 ha sido la frecuentemente incierta predicción de interacciones débiles como vdW o los enlaces de hidrógeno^{76,77}. El método MNDO no predice estos enlaces, mientras que PM3 tiende a acortarlos y a estabilizar interacciones H-H a cortas distancias^{49,77-79}. Se ha reportado que AM1 predice bastante bien los enlaces de hidrógeno, pero las geometrías fallan frecuentemente. Las barreras de rotación para enlaces que tienen carácter de doble enlace son significativamente muy bajas según estos métodos. Esto es especialmente un problema para la rotación alrededor del enlace C-N en amidas, aunque esto puede ser parcialmente corregido empleando la opción MMOK, que implica una corrección de mecánica molecular⁸⁰.

El objetivo del desarrollo de nuevos métodos semiempíricos radica en mejorar la calidad de las estimaciones de los parámetros que se desee manteniendo un costo computacional moderado. El grupo de Repasky y colaboradores⁸¹⁻⁸³ desarrolló en 2002 un esquema denominado “grupos y enlaces equivalentes”. Con esta aproximación lograron mejorar significativamente magnitudes como los calores de formación. La táctica que siguieron fue incluir este esquema en los formalismos semiempíricos sin afectar las energías electrónicas y esto lo hicieron modificando solamente la función de repulsión core-core. Introduciendo calores de formación experimentales e información sobre grupos funcionales en la función de repulsión core-core surgió la aproximación PDDG: “Pairwise-Distance-Directed-Gaussian Methods”, la cual utiliza como función la Ecuación 2.13.

$$PDDG(A, B) = \sum_A \sum_{B>A} \frac{1}{n_A + n_B} * \left[\sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 (n_A P_{Ai} + n_B P_{Bj}) \right] \exp \left(-10^{-2} (R_{AB} - D_{Ai} - D_{Bj})^2 \right)$$

2.13

Esta función se plantea para el átomo A y B, donde cada elemento requiere un total de cuatro parámetros optimizados para la función PDDG, dos factores preexponenciales, P_{A1} y P_{A2} y dos términos de distancias, D_{A1} y D_{A2} . Además se tienen en cuenta los electrones de valencia de ambos átomos A y B (n_A y n_B). De esta forma se construyen los hamiltonianos semiempíricos: PDDG/PM3 y PDDG/MNDO, donde esta función (Ecuación 2.13) es añadida a los términos de repulsión core-core de los métodos PM3 y MNDO respectivamente.

Los cálculos semiempíricos continúan apareciendo en un gran número de referencias bibliográficas, pues siempre habrá investigadores interesados en estudiar sistemas moleculares que excedan el tamaño accesible a los métodos *ab initio* y DFT; por lo que los niveles semiempíricos de la teoría de OM deben seguir desarrollándose y aplicándose.

En el año 1993⁸⁴ se evaluaron los métodos AM1 y PM3 en cuanto a las geometrías, para 344 distancias de enlace y 146 ángulos en moléculas orgánicas primarias, compuestas de H, C, N, O, F, Cl, Br y , siendo los errores promedios de 0.027 Å y 0.022 Å para las distancias de enlaces y de 2.3° y 2.8° para los ángulos. Stewart, uno de sus coautores, también llevo a cabo un análisis del comportamiento de los ángulos diedros, encontrando errores de 21.60°, 12.50° y 14.90° respectivamente, para los formalismos MNDO, AM1 y PM3⁸⁵. A pesar de las conocidas limitaciones del hamiltoniano semiempírico AM1, el mismo ha sido muy utilizado para reproducir tanto geometrías como otras propiedades de interés, por los bajos errores que muestra ⁸⁶⁻⁸⁸.

2.1.7. Superficie de energía potencial (SEP), optimización de geometrías y análisis conformational.

La SEP es la hipersuperficie definida por la energía electrónica sobre todas las posibles posiciones nucleares. La energía electrónica según la aproximación de BO es una función de 3N-6 dimensiones ó 3N-5 si la estructura es lineal, donde N es el número de átomos y cada punto de esta hipersuperficie corresponde a una estructura o disposición diferente de los núcleos atómicos. La SEP incluye el mínimo global y también se pueden encontrar mínimos locales y estados de transición⁴⁰. Sea para encontrar un mínimo o un estado de transición, el objetivo es determinar la ubicación del punto estacionario sobre la superficie de energía potencial, con gradiente igual a cero y el número correcto de valores propios negativos. Esto se logra optimizando la geometría molecular, es decir,

buscando la configuración de los núcleos que hace mínima la energía total del sistema poliatómico. Así, se calculan los gradientes de la energía electrónica total con respecto a las coordenadas nucleares, y en un proceso iterativo se propone cada vez una nueva configuración nuclear en la dirección en la que la energía total del sistema vaya disminuyendo, que es lo mismo que hacer tender la geometría a aquella donde el gradiente total resultante sea lo más cercano a cero posible. Desafortunadamente es muy difícil obtener la descripción de la SEP completa, y a medida que aumentan los grados de libertad del sistema es mucho más complicado²⁹.

El método que nos permite estudiar todas las posibles conformaciones de una molécula se denomina análisis conformacional. Las conformaciones de una molécula constituyen cada una de las estructuras de un mismo compuesto que se obtienen al realizar torsiones alrededor de enlaces simples. El objetivo del análisis conformacional es explorar todos los posibles conformeros que se puedan obtener de una molécula dada para calcular la energía molecular asociada con estas torsiones y así identificar las conformaciones preferenciales adoptadas por la misma⁴⁰. Estas conformaciones son usualmente los mínimos de la SEP, y es por esto que los métodos de minimización de energía son tan importantes para el análisis conformacional. A medida que el sistema en estudio es más grande, el número de mínimos aumenta y se hace impracticable obtenerlos todos de esta forma. Entonces lo que se hace es tratar de encontrar los mínimos accesibles del sistema haciendo uso de una distribución de Boltzmann para el cálculo de las poblaciones relativas de los conformeros de la molécula. Usualmente se asume que la conformación que ocurre naturalmente es el mínimo global²⁹, y aunque es el conformero que posee la menor energía, no necesariamente tiene que ser la conformación más poblada. Lo anteriormente dicho se debe a la contribución de los niveles de energía vibracional al peso estadístico de cada estructura. El mínimo global tampoco tiene que ser la estructura más activa pues en algunos casos se ha encontrado que la conformación más activa no corresponde a ningún mínimo de la SEP²⁹. Muchas veces la molécula no adopta una única conformación. Esto favorece mucho un aumento de la entropía conformacional y por lo tanto facilita su interacción con el receptor debido a que puede cambiar muy fácilmente a la o las conformaciones activas. El problema de los múltiples mínimos se conoce también como “explosión combinatoria”, ya que el número de mínimos crece exponencialmente con el número de variables y se han desarrollado varios métodos para la correcta realización del muestreo conformacional. Entre ellos se destacan: los métodos estocásticos y de Monte Carlo, métodos de dinámica molecular, “templado simulado” (*simulated annealing*), métodos de difusión y métodos de distancia geométrica⁴⁰. Por supuesto que el mejor método a utilizar depende del problema en cuestión. Estos métodos de mode-

lación molecular nos permiten hacer un rastreo exhaustivo de todo el potencial conformacional de una molécula de forma asequible, mientras que con técnicas experimentales como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), DRX y espectroscopía infrarroja (IR) obtenemos datos sobre unas pocas conformaciones de la molécula y podemos perder información valiosa²⁹.

2.1.8. Métodos para el estudio de los efectos del solvente.

El efecto de un solvente puede ser dividido en dos grandes partes: 1) solvatación específica o efectos de corto alcance, como por ejemplo los enlaces de hidrógeno u orientaciones específicas de las moléculas de solvente cerca de un ión y 2) macroscópicas o efectos de largo alcance, donde está involucrados el apantallamiento de cargas (polarización del solvente)⁸⁹. El efecto de solvatación específico está mayormente concentrado en la primera esfera de solvatación, pero la modelación de los efectos de largo alcance requieren de un gran número de moléculas de solvente³⁹. En esta tesis se estudia el primer efecto, el cual está mayormente concentrado en esa primera esfera de solvatación. Los métodos computacionales para evaluar este efecto tratan a las moléculas de solventes individuales o explícitamente. El siguiente epígrafe muestra las características de los procedimientos de Hipersuperficies de Múltiples Mínimos (MMH), que fueron los utilizados en el presente trabajo.

2.1.9. La aproximación de la Hipersuperficie de Múltiples Mínimos (MMH).

La principal diferencia entre los modelos que consideran explícitamente a las moléculas del solvente (contrariamente a los que solo tienen en cuenta el campo de su interacción) radica en la forma en que se realice el cálculo energético de los múltiples mínimos que aparecen al rodear a la molécula considerada como soluto.

La aproximación de las Hipersuperficies de Múltiples Mínimos (MMH)^{36,37} permite el estudio de los efectos colectivos del ambiente molecular mediante la combinación de los procedimientos mecánico-cuánticos, con vistas al cálculo de las energías de agregados moleculares, conjuntamente con la termodinámica estadística, para la determinación de las propiedades termodinámicas de asociación de sistemas poliatómicos³⁶. Se explora la superficie de energía potencial, con el objetivo de encontrar aquellos arreglos moleculares, que con sus geometrías y energías respectivas, pueden formar el grupo de los estados significativos más importantes para el cálculo de las propiedades termodinámicas del sistema completo.

Para llevar a cabo el procedimiento MMH se genera un conjunto de diferentes ordenamientos aleatorios del soluto con un número suficiente de moléculas del solvente (celdas) y se reordenan hasta llegar al valor mínimo de la energía interna. Estos mínimos pueden considerarse como un conjunto

canónico representativo del estado macroscópico (sistema cerrado con N,V,T constante), de acuerdo con una típica distribución de *Boltzmann*.

Hasta el año 2009 las diferentes celdas generadas según esta metodología se referían a las posiciones de las moléculas de solvente alrededor del soluto, pero ambas geometrías (soluto y solvente) permanecían rígidas durante la generación de las celdas y era la posterior optimización la que lograba las distintas configuraciones (véase *variante uno* del Anexo 1). Posteriormente se desarrolló una modificación a la misma⁹⁰, donde además de situar al solvente en distintas posiciones aleatoriamente alrededor del soluto, se exploran los grados de libertad internos tanto del soluto como del solvente, mejorando de esta forma la exploración de la SEP de los complejos de asociación formados entre ambas especies. El MMH realiza de esta forma una búsqueda conformacional aleatoria en la cual puede analizar las conformaciones más importantes del soluto así como las asociaciones que estabilizan los complejos con el solvente. La modificación de la metodología MMH se resume en las *variantes dos y tres* del Anexo 1. En esta tesis se utiliza por primera vez esta modificación para el estudio de la flexibilidad conformacional que presentan las cadenas laterales de los BRS. La optimización posterior de las celdas se realiza por métodos de cálculo mecánico-cuánticos, que en nuestro caso consisten en hamiltonianos semiempíricos (Epígrafe 1.1.6).

Las técnicas de la termodinámica estadística establece un vínculo entre el macro y el micromundo mediante la función de partición, la cual representa la suma estadística de los estados accesibles de un sistema. A partir de ella es posible calcular magnitudes termodinámicas macroscópicas tales como la energía interna, la entropía y la energía libre de Helmholtz (en el caso de conjuntos canónicos), entre otras.⁴¹

El estado de referencia se asume como un conjunto con el mismo número de moléculas no-interactuantes, lo cual implica el proceso de asociación isotérmico desde el punto de vista molecular. Es decir, todos los demás grados de libertad (traslacionales, rotacionales y vibracionales) se consideran idénticos en las moléculas individuales y en los agregados moleculares para cada celda y del mismo tipo al del agregado molecular creado, tal que la suma de sus energías totales se toma como valor de referencia en la escala de energías³⁷.

Consecuentemente, la energía de la celda con respecto a la nueva escala de referencia, $\Delta\epsilon_i$, es:

$$\Delta\epsilon_i = \epsilon_i - \epsilon^{\text{ref}} \quad 2.14$$

donde:

$$\mathcal{E}^{ref} = \mathcal{E}_{tot(solute)} + n\mathcal{E}_{tot(solvent)} \quad 2.15$$

En términos estadísticos y tomando como estado de referencia a las moléculas no asociadas.

$$\Delta E^{asoc} = E - E^{ref} = RT^2 \frac{\xi^*}{\xi} \quad 2.16$$

$$S^{asoc} = R \ln q^* + \frac{E^{asoc}}{T} \quad 2.17$$

$$A^{asoc} = -RT \ln q^* \quad 2.18$$

donde: E^{asoc} , S^{asoc} y A^{asoc} son la energía interna, la entropía y la energía libre de Helmholtz, T: temperatura en Kelvin, R: constante de los gases expresada en J/molK y ξ^* : función de partición molecular.

La suma de los pesos estadísticos (función de partición) de los estados correspondientes al conjunto dado, se expresa como una sumatoria que se extiende sobre los estados accesibles al sistema.

$$\xi^* = \sum_i e^{\frac{-\Delta E}{RT}} \quad 2.19$$

donde: ΔE : energía interna debida exclusivamente a la asociación molecular ³⁶.

Como se discute en las referencias del método, para comparar la entalpía y energía libre de Gibbs experimentalmente, definidas a presión constante, se deben añadir las correcciones del gas ideal teniendo en cuenta la cantidad de moles intercambiados en el proceso de asociación:

$$E^{asoc} = H^{asoc} + \Delta nRT. \quad 2.20$$

consecuentemente:

$$H^{asoc} = RT^2 (q^{*'} / q^*) - \Delta nRT \quad 2.21$$

$$G^{asoc} = -RT \ln q^* - \Delta nRT \quad 2.22$$

La búsqueda de las celdas representativas, se lleva a cabo como ya ha sido mencionado, por métodos cuánticos semiempíricos y optimizando un número significativo de celdas, que se han generado inicialmente de manera aleatoria.

Como resultado de la optimización, puede llegarse a estructuras de idéntica o parecida energía, expresándose la degeneración de dos maneras:

- Celdas con la misma energía y el mismo ordenamiento molecular, las cuales se pueden considerar iguales desde el punto de vista energético y geométrico. Este tipo de degeneración no aporta información a la función de partición y son eminentemente redundantes.

- Celdas con diferentes ordenamientos moleculares, pero energía muy similar. Esto sí representa una degeneración significativa, por lo que entonces deben ser consideradas en la función de partición⁹¹.

Debido a ello, el programa Q3 que realiza el procesamiento estadístico, contiene una subrutina de trabajo llamada Tanimoto^{92,93}, la cual analiza la semejanza entre los diferentes agregados moleculares para desechar las degeneraciones redundantes. Este procedimiento calcula la semejanza entre las estructuras par a par, mediante la comparación de todos los agregados, con una diferencia de energía menor de 0.001 eV con respecto a una anterior. Se convierten entonces las coordenadas de cada átomo de internas a cartesianas. De este modo, se construye la matriz con los módulos de las distancias entre cada par de átomos del sistema. Se fija un valor de límite de discriminación para considerar las celdas iguales o no desde el punto de vista geométrico. El índice de Tanimoto más probado es $T=0.85$ y de esta manera se tiene que:

- $T > 0.85$ se puede considerar que esos arreglos moleculares son equivalentes y estamos en presencia de agregados geoméricamente degenerados.
- $T < 0.85$ los agregados son diferentes y estamos en presencia de degeneración del segundo tipo, la cual sí contribuye a la función de partición.

Cuando el soluto y el solvente son muy diferentes en cuanto a tamaño, el índice de Tanimoto presenta dificultades para eliminar completamente la degeneración que no aporta a la función de partición, en estos casos fue utilizado el índice de Carbó (C_{AB})^{94,95} implementado en el programa TGSA, (Análisis de superposición topo-geométrico)⁹⁶. Este programa contiene un algoritmo que solo requiere los números atómicos y las coordenadas de las moléculas a superponer, considerándolas como cuerpos rígidos. El C_{AB} fue originalmente desarrollado para comparar moléculas de acuerdo con su densidad electrónica, y como se observa en la Ecuación 2.23 involucra las densidades electrónicas ρ_A y ρ_B donde A y B representan dos moléculas. Posteriormente se ha generalizado este índice para comparar cualquier propiedad estructural entre dos moléculas. El C_{AB} se encuentra entre 0 y 1, donde valores cercanos a 1 indican una mayor semejanza entre las geometrías comparadas. El caso singular de $C_{AB}=1$ significa que las moléculas son iguales.

$$C_{AB} = \frac{\langle \rho_A / \rho_B \rangle}{\| \rho_A \| \| \rho_B \|} \quad 2.23$$

El MMH ha sido usado con éxito en el estudio de interacción de aminoácidos con el NO⁹⁷, estudio de agregados moleculares de agua³⁷, estudio del efecto del solvente sobre estados excitados en moléculas orgánicas, drogas y flavonoides⁹⁸⁻¹⁰¹.

2.2 Análisis de la densidad electrónica.

2.2.1. La teoría de átomos en moléculas (AIM).

El método AIM^{102,103} obtiene toda la información a partir de la densidad electrónica $\rho(\vec{r})$, obtenida a partir del cuadrado de las funciones de onda, tal y como conocemos. La $\rho(\vec{r})$ es una función de las tres coordenadas espaciales y puede ser analizada en términos de su topología (máximos, mínimos, puntos de ensilladura). O sea, que un análisis basado en AIM comienza con la localización de los puntos críticos de la densidad electrónica ($\nabla\rho(\vec{r})=0$). Estos pueden clasificarse en dependencia del número de valores propios negativos del hessiano (o segunda derivada) λ_1 , λ_2 y λ_3 . Los puntos críticos estables corresponden a cuatro categorías que son máximos de la densidad electrónica en las tres direcciones, los que usualmente corresponden con los núcleos atómicos y tienen las tres curvaturas negativas λ_1 , λ_2 y $\lambda_3 < 0$. Existen otros puntos críticos que son máximos en dos direcciones y mínimos en la tercera dirección. Estos aparecen cuando hay una interacción ó un enlace entre un par átomos y se denominan *puntos críticos de enlace (bcp)*. Así, el camino de enlace se define como la línea de mayor densidad electrónica entre un par de átomos enlazados. Esta línea contiene al bcp, y la curvatura asociada a la dirección paralela al camino de enlace es positiva $\lambda_3 > 0$. Las curvaturas perpendiculares al camino de enlace son negativas, $\lambda_1, \lambda_2 < 0$. El valor máximo de la densidad electrónica en la superficie interatómica se alcanza en el *bcp*.

Los *puntos críticos de anillo*, que aparecen en el centro de los ciclos están caracterizados por ser mínimos en dos direcciones y máximos en una tercera llamándose puntos críticos de anillo (*rcp*). Por último también pueden encontrarse los *puntos críticos de caja* que se caracterizan por ser mínimos en las tres direcciones λ_1 , λ_2 y $\lambda_3 > 0$.

El análisis del laplaciano de la densidad electrónica $\nabla^2\rho(\vec{r})$ es muy útil ya que permite conocer donde la densidad electrónica se concentra ($\nabla^2\rho(\vec{r}) < 0$) y donde se reduce ($\nabla^2\rho(\vec{r}) > 0$). Un valor positivo del laplaciano corresponde a interacciones cuya naturaleza no implica una concentración muy elevada de la densidad electrónica en la zona internuclear, tal como es el caso de las interacciones iónicas, los enlaces de hidrógeno o las interacciones de vdW. Mientras que cuando es negativo indica una elevada densidad electrónica en la zona del enlace, lo cual significa que es un enlace covalente. De acuerdo con esta teoría las interacciones atómicas se clasifican en dos tipos, interacciones compartidas o covalentes e interacciones de capa-cerrada o no-covalentes.

Una forma de interpretar físicamente el signo del laplaciano es mediante el teorema del virial. El denominado *teorema del virial local* establece la siguiente relación:

$$\frac{h^2}{4m} \nabla^2 \rho(r) = 2G(r) + V(r) \quad 2.24$$

donde $G(r)$ y $V(r)$ representan las densidades de energía cinética y potencial respectivamente, siendo la primera mayor y la segunda menor que 0. Otra propiedad importante es la energía electrónica de la distribución de cargas, la cual viene dada por la siguiente ecuación¹⁰⁴:

$$H(r) = G(r) + V(r) \quad 2.25$$

Como se expresó anteriormente, el signo del laplaciano es el que nos dice si existe acumulación ($\nabla^2 \rho(r) < 0$), o disminución de carga ($\nabla^2 \rho(r) > 0$). De las Ecuaciones 2.24 y 2.25 se obtiene la siguiente relación:

$$G(r) = \frac{h^2}{4m} \nabla^2 \rho(r) - H(r) \quad 2.26$$

Como $G(r) > 0$ siempre, se debe cumplir la siguiente condición en todos los casos:

$$H(r) < \frac{h^2}{4m} \nabla^2 \rho(r) \quad 2.27$$

De la Ecuación 2.26 se derivan tres casos:

(1) $\frac{h^2}{4m} \nabla^2 \rho(r) > 0$ y que $H(r) > 0$, en este caso el término de energía cinética domina sobre el de potencial y corresponde a interacciones que no implican acumulación significativa de densidad electrónica en la zona internuclear. En esos casos se cumple también que $|V(bcp)|/G(bcp) < 1$ y puede tratarse de interacciones de vdW, enlaces de hidrógeno y/o enlaces iónicos.

(2) $\frac{h^2}{4m} \nabla^2 \rho(r) < 0$ entonces $H(r) < 0$ para que se cumpla la condición 2.26. Además como $H(r) < 0$ significa que el término de energía potencial $V(r)$ domina con respecto al término de energía cinética $G(r)$ (Ecuación 2.25), y por tanto se produce una acumulación local de densidad

electrónica. Esta densidad será mayor que la que encontramos como promedio en el átomo como un todo y $|V(bcp)|/G(bcp) > 2$. Este caso corresponde a enlaces covalentes.

(3) $\frac{h^2}{4m} \nabla^2 \rho(r) > 0$ y $H(r) < 0$, en este caso $2G(r) > V(r)$. Es raro para enlaces covalentes. Se ha definido como *enlaces de hidrógeno intermedios*. La naturaleza de estos enlaces es parcialmente electrostática y parcialmente covalente y $1 < |V(bcp)|/G(bcp) < 2$ ¹⁰⁵.

2.2.1.1. Clasificación de enlaces de hidrógeno según la teoría de átomos en moléculas.

El enlace de hidrógeno es una de las interacciones no covalentes de mayor importancia biológica²⁷. Los complejos que presentan enlaces de hidrógeno están estabilizados por términos electrostáticos, de inducción y de dispersión. Al término electrostático contribuyen las interacciones dipolo-dipolo e ion-dipolo, las cuales le dan a este tipo de interacción un importante carácter direccional. Según la definición de Desiraju y Steiner¹⁰⁶ se forma un enlace de hidrógeno $D-H...A$ cuando el átomo de hidrógeno está unido a un átomo electronegativo donador (D) y a un vecino electroceptor (A). Esta definición ha sido extendida a enlaces de hidrógeno más débiles, del tipo $C-H...O$ ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Estos autores clasificaron los enlaces de hidrógeno $D-H...A$ en dependencia de la naturaleza de los átomos D y A , las distancias entre el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor ($d_{H...A}$), y el ángulo θ definido por $D-H...A$. Los enlaces de hidrógeno moderados del tipo $-OH...O$ y $-NH...O$ son cortos y esencialmente lineales ($d_{H...A} = 1.5-2.2$ Å, y $\theta = 130^\circ-180^\circ$), mientras que para los enlaces de hidrógeno débiles del tipo $-CH...O$ y $-CH...N$ muestran $d_{H...A} = 2.2 - 3.2$ Å y $\theta = 90^\circ - 150^\circ$.¹¹⁰

Koch y Popelier^{111,112} desarrollaron una lista de ocho criterios importantes para la detección de enlaces de hidrógeno basados en la metodología de AIM. Estos criterios nos permitirán conocer si los átomos involucrados están enlazados o no. La presencia de un enlace de hidrógeno $D-H...A$ debe cumplir con las siguientes condiciones:

- 1) La presencia de un bcp entre $H...A$ que pruebe que los átomos están en contacto.
- 2) La densidad electrónica en el bcp debe estar en el rango de 0.002-0.040 au.
- 3) El laplaciano de la densidad electrónica en el bcp $\nabla^2 \rho(bcp)$ debe estar en el rango 0.024-0.139 au.
- 4) Debe detectarse pérdida de densidad electrónica en el átomo de hidrógeno con respecto al caso no enlazado.

- 5) Debe notarse estabilización energética del átomo de hidrógeno.
- 6) Debe disminuir el volumen del átomo de hidrógeno.
- 7) Debe observarse un decrecimiento de la polarización dipolar del hidrógeno.
- 8) Debe haber penetración mutua de los átomos del donador y del aceptor.

Los criterios 1, 2, 3 y 8 se basan en la topología de la densidad electrónica, mientras que el resto se basa en las propiedades integradas del átomo de hidrógeno. En esta tesis se han utilizado seis de los ocho criterios planteados. Estos nos permitirán discernir entre enlaces de hidrógeno débiles e interacciones de vdW, no siendo aplicables a enlaces de hidrógeno más fuertes que tengan una componente covalente importante y donde las densidades electrónicas en los *bcp* sean mayores que los límites establecidos por estos criterios. También, además de caracterizar enlaces de hidrógeno intermoleculares mediante esta metodología podremos clasificar enlaces de hidrógeno intramoleculares, los que son muy importantes ya que dan explicación a muchas estructuras preferenciales que están estabilizadas por este tipo de interacción.

2.3 Relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR).

La correlación cuantitativa entre la actividad biológica y la estructura (QSAR de siglas en inglés) se atribuye a Hansch y colaboradores a finales de los años 60¹¹³. Hoy en día, con el avance de las ciencias y sus procedimientos, el conocimiento de la estructura 3D del receptor es muy útil ya que se dispone de información para poder predecir la fortaleza de la interacción ligando-receptor ¹¹⁴. Como la actividad biológica depende directamente de la afinidad del ligando por el receptor, los estudios 3D-QSAR ofrecen siempre una alternativa viable en los casos en que se cuenta con la estructura 3D del receptor^{114,115}. Los modelos QSAR se basan en la utilización de descriptores moleculares, que no son más que variables que nos permiten predecir mediante correlaciones estadísticas el resultado de un experimento o propiedad medible, existiendo descriptores topológicos, químicos, y descriptores químico físicos. El descriptor molecular GRID desarrollado por Goodford¹¹⁶ en el año 1985 introdujo el concepto de campo de interacción molecular, implicando por primera vez la estructura tridimensional en la obtención de descriptores moleculares. Este descriptor GRID está basado en un campo de fuerza de mecánica molecular, el cual calcula una energía de interacción constituida por factores estéricos, electrostáticos y posible formación de enlaces de hidrógeno entre una molécula de prueba y el compuesto en estudio.

Existe un programa denominado GRID, basado en este campo de fuerzas, el cual consiste en situar la molécula de estudio, optimizada previamente, en el interior de una malla tridimensional y calcular la energía de interacción entre la molécula prueba y el compuesto de estudio por cada uno de los puntos de la malla, recorriendo así el espacio tridimensional y aportando descriptores que reflejan la formación de enlaces de hidrógeno con las moléculas de prueba específicas.

2.4 Sistemas de estudio.

2.4.1. Brasinoesteroides naturales.

Las hormonas vegetales son compuestos naturales de las plantas con la capacidad de influir en los procesos fisiológicos a concentraciones por debajo de las que los nutrientes o las vitaminas influirían en estos. Es un hecho reconocido que el crecimiento, la reproducción y la senescencia de las plantas están regulados por fitohormonas^{117,118}. A diferencia de las hormonas animales, la biosíntesis de las hormonas vegetales no está relacionada directamente con una glándula, sino que ocurre en todas las células¹¹⁹. Una única hormona puede regular una gran diversidad de procesos, mientras que al mismo tiempo múltiples hormonas a menudo influyen un único proceso¹²⁰. Su capacidad reguladora, y el hecho de que los niveles hormonales o sus respuestas puedan manipularse para mejorar determinadas características de las plantas ha captado la atención de los científicos¹²¹.

Existen diferencias significativas en cuanto a la producción, transporte y reconocimiento de las hormonas animales y vegetales. Las hormonas animales se transportan a través del sistema circulatorio, afectando de esta forma a células que se encuentran alejadas de las glándulas especializadas donde son producidas. Sin embargo, las hormonas vegetales afectan células y tejidos locales, además de ser transportadas a través del sistema vascular. Las fitohormonas son moléculas orgánicas pequeñas, mientras que las hormonas animales pueden ser moléculas pequeñas pero también péptidos ó proteínas¹²². A nivel microscópico las fitohormonas promueven la síntesis de proteínas, facilitan el transporte de productos fotosintéticos, regulan el nivel de agua en la planta, la síntesis de proteínas y azúcares y además las protegen contra el estrés ambiental. A nivel macroscópico regulan el crecimiento y la floración, aceleran o retrasan la maduración de los frutos, entre otras. Por todas estas propiedades las fitohormonas son ampliamente utilizadas en la agricultura como reguladores del crecimiento y la reproducción vegetal ^{123,124}.

En 1941, Mitchell y Whitehead¹²⁵, publicaron un artículo afirmando que el polen del maíz contenía compuestos promotores del crecimiento vegetal. Sin embargo, no fue hasta el año 1970 cuando el

interés de Mitchell en este campo lo lleva a publicar en la revista Nature: "Brasinos- A new family of plant hormones from rape pollen"¹²⁶. En un primer momento, se pensó que estos promotores correspondían a una mezcla de ácidos grasos esterificados con galactosa. La evidencia que aportaron estos investigadores fue bastante criticada, ya que se consideró prematura para extraer conclusiones. Finalmente, en 1978, Grove y colaboradores lograron aislar 4 mg a partir de unos 40 kg del polen de la *Brassica Napus* (nabo) de un compuesto de estructura esteroidal con una fuerte actividad estimuladora de la división y el crecimiento celular. A este compuesto se le denominó Brasinólida (**BR**) y no fue hasta el siguiente año¹²⁷ que se caracterizó totalmente su estructura como (22R, 23R)-2 α , 3 α , 22,23-tetrahidroxi-6, 7seco-5 α -campestan-6,7-lactona por medio de datos espectroscópicos y rayos X (RX) (Figura 2.1).

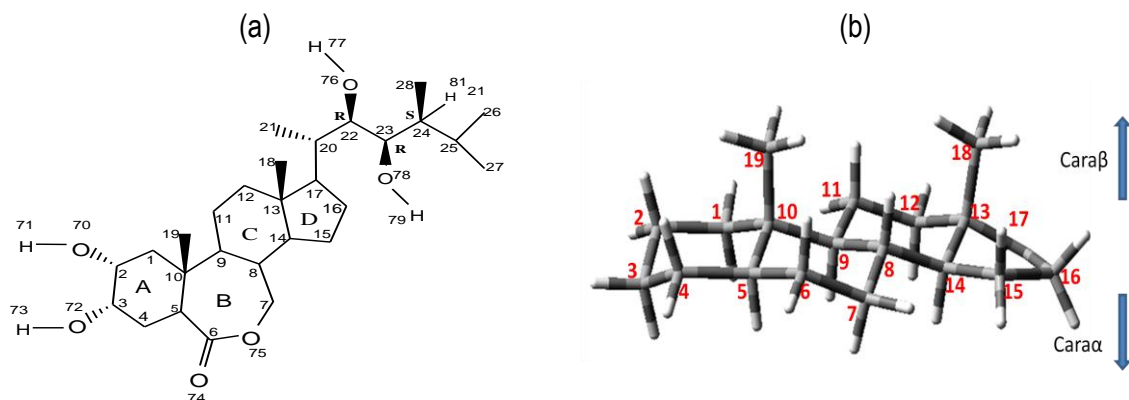


Figura 2.1 - (a)- Estructura de la brasinólida (**BR**) y (b) Representación espacial del núcleo base de los BRS.

Una vez identificada la estructura de este compuesto, Figura 2.1, se intensificó la búsqueda de otros compuestos con estructura y actividad biológica semejantes y a esta nueva familia de reguladores del crecimiento vegetal se le denominó brasinoesteroides (BRS)^{126,127}. Sin embargo no es hasta 1997 en que se clasifican como la sexta clase de fitohormonas, después de que la proteína involucrada en su reconocimiento fue descubierta²⁵. Hasta el presente han sido aislados de las plantas 70 BRS naturales⁷. También se han centrado esfuerzos en el terreno de la actividad fitofisiológica, modo de acción, metodologías de síntesis química, relaciones estructura actividad, microanálisis, distribución en el reino vegetal, interrelación con otras fitohormonas, biosíntesis, metabolismo y aplicaciones a nivel de campo¹²⁸. Los BRS son las únicas fitohormonas conocidas que presentan una estructura esteroidal. Son esenciales para el crecimiento, reproducción y desarrollo normal del reino vegetal^{2,129,130}. Estas hormonas desencadenan respuestas únicas en las plantas, regulan el crecimiento y la división celular, influyen en la síntesis de clorofila y juegan un papel vital en los procesos de fotorregulación y control hormonal.

Además regulan la germinación de las semillas, la altura de la planta, el grueso del tallo y la inclinación de las hojas^{3,6,131}. Previenen la caída prematura de las hojas, y les confieren a la planta resistencia, no solamente a los pesticidas y herbicidas artificiales, sino a factores medioambientales adversos, como la salinidad, temperaturas extremas, escasez de nutrientes y sequía. También se ha demostrado que los BRS protegen a las plantas de infecciones virales y fúngicas¹³²⁻¹³⁴.

Estas fitohormonas se encuentran presentes en todo tipo de plantas (gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas), incluso en algas y cianobacterias. El margen de concentraciones en el que se pueden encontrar en las plantas va desde 10^{-1} nmol hasta 10^{-7} nmol por gramo, dependiendo no sólo de la especie y del período de desarrollo, sino también de la parte de la planta. Las mayores concentraciones se encuentran en las partes con mayor actividad reproductora (polen, semillas, flores), y en los tejidos con fuerte crecimiento tales como los pequeños brotes^{5,135,136}. Desde su descubrimiento, han sido considerados buenos candidatos para ser empleados en la agricultura ya que pequeñas cantidades de ellos (entre 5 y 100 mg de BRS por hectárea) provocan una mejora considerable en el desarrollo de las plantas e incrementan el rendimiento y la calidad de los cultivos¹³⁷.

Su efecto regulador se pone de manifiesto a concentraciones cien veces inferiores a la de las restantes fitohormonas y ha sido ampliamente demostrada la fuerte interacción que existe con varias de ellas, como por ejemplo las auxinas^{138 139-141} y giberelinas¹⁴². El brasinoesteroide más activo es la **BR**, pero debido a lo complejo y costoso que resulta su obtención por vía natural o sintética¹⁴³, la homobrasinólida (**homBR**), la 24-epibrasinólida (**epiBR**) y la castasterona (**CS**) han sido más utilizadas en los estudios in vitro e in vivo¹⁴⁴⁻¹⁴⁵.

Los BRS naturales tienen en común un esqueleto 5α -colestano (Figura 2.2). Las variaciones estructurales se relacionan con las funciones presentes en tres zonas bien diferenciadas de estos esteroi- des: el anillo A, el anillo B y la cadena lateral⁵.

En el anillo A la diversidad estructural es bastante grande, identificándose 10 tipos de modificaciones estructurales según las funciones oxigenadas presentes, su posición y su orientación espacial.

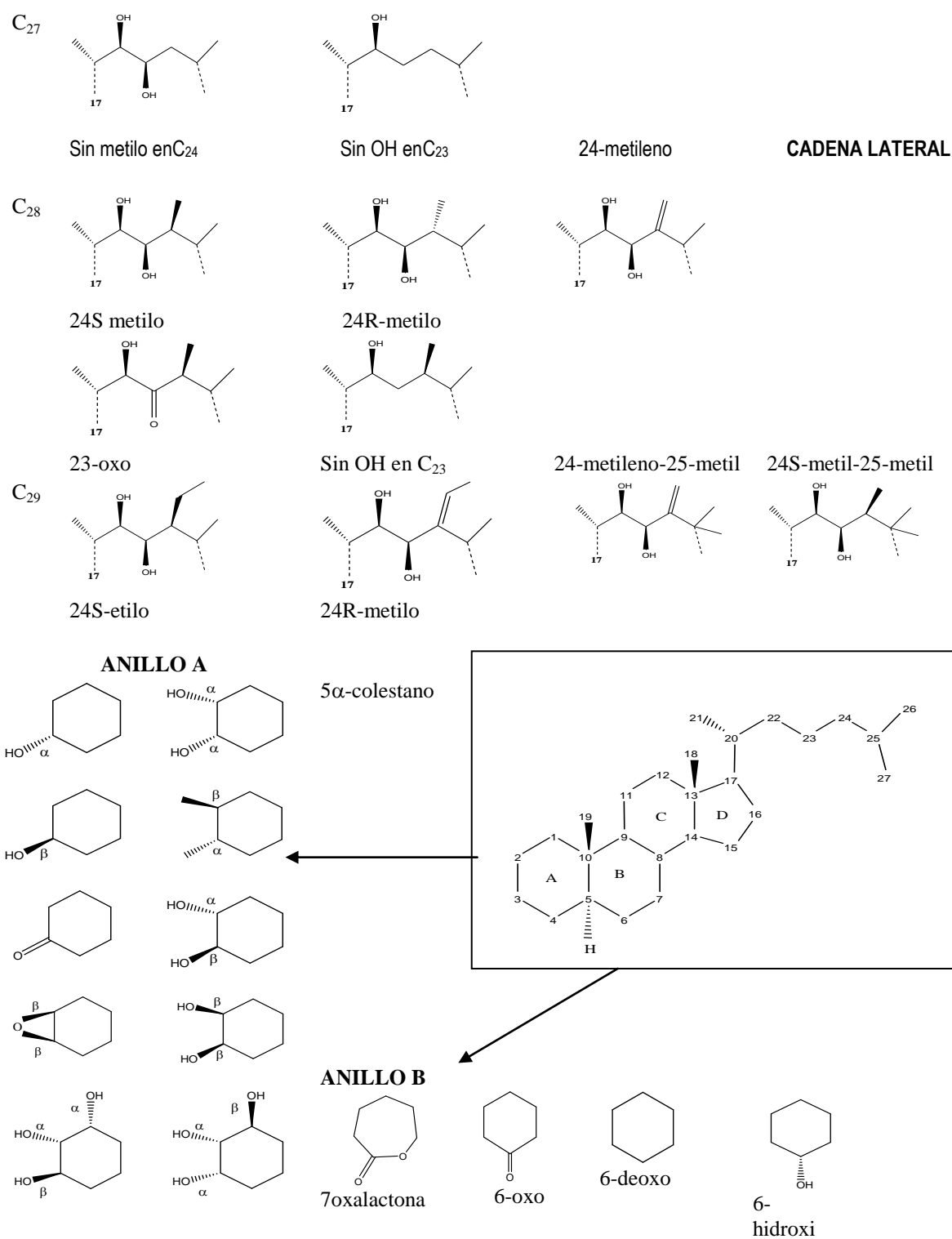


Figura 2.2 - Diferentes sustituyentes en el anillo A, anillo B y cadena lateral de BRS naturales.

La mayoría de los BRS naturales poseen un grupo diol $2\alpha, 3\alpha$, que le confiere una elevada actividad biológica a estos esteroides. Los BRS naturales que solo poseen una función oxigenada en el C_3 se consideran precursores en la biosíntesis de los $2\alpha, 3\alpha$, mientras que las configuraciones $2\beta, 3\alpha$ y $2\beta, 3\beta$ probablemente son producidas en la degradación metabólica de los $2\alpha, 3\alpha$. La actividad biológica decrece en el siguiente orden: $2\alpha, 3\alpha > 2\alpha, 3\beta > 2\beta, 3\alpha > 2\beta, 3\beta$, sugiriendo que la orientación 2α del grupo hidroxilo es necesaria para mostrar una elevada actividad⁵.

En el anillo B la diversidad estructural es más reducida. Los BRS más activos presentan un anillo B de siete miembros con una función 7-oxalactona. Los BRS naturales que presentan un anillo B de seis miembros sin funciones oxigenadas o con una función 6-ceto o 6-hidroxo se consideran precursores biosintéticos de la 7-oxalactona. Aunque los BRS naturales con una función cetona en el C_6 son considerados precursores de las 7-oxalactonas, ellos por si mismo poseen un 50% de la actividad biológica de las mismas y constituyen la mayoría de los BRS aislados hasta el momento. Los 6-deoxo BRS son prácticamente inactivos^{130,134}.

El Tifasterol (**TF**) y la Castasterona (**CS**) poseen una función 6-ceto y presentan la misma cadena lateral que la **BR** (Figura 2.2). El **TF** además carece de $-OH$ en el C_2 , mientras que la **CS** presenta la misma funcionalidad en el anillo A que la **BR**. Estos cambios en cuanto a estructura de anillo A y B hacen que el orden de bioactividades (actividad biológica relativa) sea de **BR**(100%), **CS**(20%) y **TF**(2%)¹⁴⁶.

La cadena lateral se clasifica inicialmente en tres grupos según el número de átomos de carbonos presentes: C_{27} -BRS, C_{28} -BRS y C_{29} -BRS. Todos los BRS naturales presentan un diol 22R, 23R. Las diferencias fundamentales en la cadena lateral vienen dadas por los sustituyentes en el C_{24} . Este centro es muy importante en la actividad biológica de los BRS, ya que la mayoría de los BRS naturales solamente se diferencian en el sustituyente y la estereoquímica de este carbono. Así, la **BR** presenta un grupo metilo en el C_{24} con estereoquímica S, la **epiBR** posee el grupo metilo en configuración R, la **homBR** presenta un grupo etilo 24S, la dolicólida (**DL**) posee un grupo metileno en el C_{24} , mientras que la norbrasinólida (**norBR**) no presenta ningún sustituyente en esa posición de la cadena lateral. La mayoría de los BRS naturales poseen un grupo isopropilo en el C_{25} , pero también existen algunos con un grupo ter-butilo como la 25-metildolicosterona¹⁴⁷ (Figura 2.2).

La planta más utilizada para el estudio de la fisiología y genética vegetal, incluyendo, como es lógico, todos los estudios relacionados con la biosíntesis y mecanismo de acción de los BRS constituye la *arabidopsis thaliana*. La *arabidopsis thaliana* es una planta pequeña y muy prolífica de la familia

de las mostazas y se considera “el ratón del reino vegetal” por su utilidad como medio para pruebas *in vivo*. Esta planta posee muchas ventajas, como son su rápido crecimiento (ciclo de vida de seis a ocho semanas) y pequeño tamaño. Su genoma es el más sencillo de las plantas que florecen, lo cual posibilitó la completa secuenciación del mismo a mediados del año 2000^{148,149}. El conocimiento del genoma de esta planta permitió que se dilucidara la biosíntesis de la **BR**, la cual ocurre a partir del campesterol por dos vías diferentes conocidas como la ruta de la oxidación temprana y la ruta de la oxidación tardía. Se ha comprobado experimentalmente que ambas rutas coexisten en la *arabidopsis thaliana*, dependiendo de las condiciones ambientales¹⁵⁰. La observación sugiere que la ruta de la oxidación temprana del anillo B opera predominantemente en condiciones de oscuridad, mientras que la ruta de la oxidación tardía tiene lugar predominantemente en condiciones de iluminación⁴.

En estudios realizados por Chory y colaboradores²⁵ fue identificada la proteína BRI1, “*brassinosteroid receptor insensitive 1*,” como receptor de los BRS en la *arabidopsis thaliana*. BRI1 es una proteína de membrana de 1196 aminoácidos (aa) que en su región extracelular contiene 24 motivos enriquecidos en leucina (LRR de sus siglas en inglés, “Leucine rich repeated”) e interrumpidos por una isla de 70 aa entre los motivos LRR21 y LRR22. Cada LRR constituye una proteína receptora del tipo kinasa que interactúa fundamentalmente con otras proteínas. Estos autores demostraron mediante complejos y costosos experimentos que el sitio de unión de los BRS con esta proteína receptora se encuentra en la región limitada a la isla de aa y el motivo LRR22^{21,22}. Estos resultados mostraron que la BRI1 es la primera proteína del tipo kinasa enriquecida en leucina que es capaz de interactuar directamente con compuestos orgánicos como los BRS, lo cual constituye un nuevo paradigma de las respuestas hormonales en las plantas.

Actualmente existen muchas incógnitas en la transducción de señales y mecanismos de acción de los BRS, razón por la cual estas fitohormonas son objeto de análisis en muchos laboratorios. Una de las causas por la cual se conoce muy poco acerca de la interacción BRS-receptor es la ausencia de la estructura 3D de la proteína receptora BRI1. El aislamiento de esta proteína de membrana, tanto unida al brasinoesteroide como sin él, es muy difícil dada su cercanía a la membrana celular y la baja estabilidad de este complejo¹⁵¹. Además, el hecho de que esta proteína sea atípica hace que su homología con otras proteínas pertenecientes a su misma familia sea muy baja y por lo tanto, la simulación *in silico* de la interacción brasinoesteroide-BRI1 puede ser muy poco confiable^{119,128}. A pesar de esto, cada vez son mayores los esfuerzos que se realizan en el aislamiento de esta proteína y del complejo brasinoesteroide-receptor. Una de las formas de lograr un acercamiento a la natura-

leza de esta interacción es mediante la utilización de métodos de cálculos teóricos para la obtención de modelos de las posibles interacciones del ligando con el medio biológico, centrándose en el esteroide y no en el receptor. En el próximo epígrafe se detallan las modelaciones teóricas-computacionales realizadas en estas moléculas.

2.4.2. Antecedentes en el estudio teórico de la estructura e interacciones de los BRS.

Los métodos teóricos empleados en el análisis de la estructura de los BRS se han basado en su gran mayoría en métodos clásicos, como la dinámica y mecánica molecular. En este epígrafe se resumen inicialmente las investigaciones más importantes realizadas con estos métodos y después se tratan las aplicaciones de los métodos mecano-cuánticos de la química computacional en estos sistemas.

2.4.2.1. Estudios basados en métodos clásicos.

Desde el descubrimiento de estas hormonas vegetales en 1979, uno de los campos que más ha llamado la atención es el desarrollo de modelos QSAR, tanto de BRS, como de análogos de los mismos que presenten diferencias en el anillo A, B y cadena lateral principalmente. Estos han tenido como objetivo la búsqueda de nuevos BRS con una adecuada relación actividad biológica-coste que contribuyan al mejoramiento de la agricultura.

Los primeros estudios QSAR fueron realizados por Thompson y Takatsuto^{18,152-154} en 1983 y 1984, donde se obtuvieron los principales requerimientos estructurales para la obtención de una elevada actividad biológica. Estos son:

- Anillo A: Presencia de sistema diol con configuración 2α , 3α .
- Anillo B: Presencia de 7-oxalactona en lugar de 6-cetona.
- Unión trans de anillo A y B.
- Cadena lateral: Presencia de diol en cis, con configuración 22R, 23R.
- Sustitución del C₂₄ con un grupo metilo o etilo.

Ultimamente ha tenido lugar un auge de las investigaciones QSAR de análogos de BRS que presenten diferencias, sobre todo en la cadena lateral, la cual se cree desempeña un rol importante en la interacción con el receptor^{13,14,155,156}.

Un grupo de investigadores del Instituto Químico de Sarriá dirigido por Carme Brosa ha dedicado gran parte de su investigación a estudios QSAR en BRS^{9,23,31}. Estos autores plantearon que los requerimientos encontrados anteriormente no podían ser considerados de forma independiente. Se

propuso que lo que realmente importa es la disposición tridimensional de la molécula, y no la valoración de las funcionalidades por separado. Para validar dicha hipótesis decidieron sintetizar cinco análogos que no cumplieran los requerimientos de Thompson y Takatsuto descritos anteriormente y que sin embargo mostraban actividad biológica. Mediante esta investigación fue demostrada la importancia de la disposición tridimensional en la actividad biológica de estas fitohormonas y además el hecho importante de que hasta el momento no existe una relación confiable entre la estructura y la actividad biológica de los BRS¹⁹.

Los estudios QSAR de Brosa se han basado en la aproximación del análogo activo, la cual considera que todos los BRS se unen a un único receptor en los mismos puntos. Dicha unión se produce cuando el brasinoesteroide se encuentra en una conformación preferente, a la cual denominó “conformación activa”. En dicha conformación los átomos implicados directamente en la unión deben tener la misma distribución espacial en todas las conformaciones activas. Como la **BR** es el brasinoesteroide natural más importante se asume que la conformación activa es la que presenta una distribución espacial óptima para unirse al receptor³⁰. Se ha buscado con dinámica molecular la conformación activa mediante un análisis conformacional para la **BR** y una serie de análogos de BRS. En este análisis los ángulos muestreados fueron C₁₃-C₁₇-C₂₀-C₂₂, C₁₇-C₂₀-C₂₂-C₂₃, C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄, C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅ y C₂₃-C₂₄-C₂₅-H₂₅. Teniendo en cuenta la conformación más activa se ha estudiado también el potencial electrostático, el cual se construye a partir de las cargas atómicas y brinda información acerca de la reactividad molecular. Se superpuso a los potenciales electrostáticos de las demás moléculas con la de la “conformación activa” y mediante índices de semejanza analizaron las que deberían ser más activas a medida que este índice fuera mayor. También se ha utilizado la metodología GRID¹¹⁶, para analizar la formación de posibles enlaces de hidrógeno entre la conformación activa y la proteína receptora, la cual fue representada por moléculas de prueba como el H₂O y el NH₃, debido a las capacidades donadoras y aceptoras de hidrógenos que poseen estas moléculas. Las zonas más propensas a formar enlaces de hidrógenos en la conformación activa fueron superpuestas con respecto a las zonas encontradas para los demás BRS. Como resultado se encontró una buena correlación entre la actividad biológica de los BRS y la facilidad de formar enlaces de hidrógeno. Lo anterior sugiere que este es uno de los posibles tipos de interacción existentes entre los BRS y el receptor.

Otro grupo de investigadores se ha dedicado a buscar una relación entre la actividad biológica y las conformaciones preferenciales que adoptan las cadenas laterales flexibles de estas fitohormonas.

Andrea Porzel y colaboradores han utilizado las técnicas de RMN para obtener las conformaciones preferentes de las cadenas laterales de los BRS en solución^{32,157,158}. Este grupo ha utilizado la RMN 1D y 2D para determinar tales estructuras preferenciales y compararlas con las estructuras cristalinas obtenidas por DRX (*estructura de RX*). Este análisis ha mostrado una semejanza muy elevada entre las estructuras cristalinas y en solución. En un estudio realizado por este grupo mediante dinámica molecular con el método templado simulado se demostró que los BRS de menor actividad biológica adoptaban conformaciones de la cadena lateral más extendidas, mientras que las más activas preferían inclinaciones hacia la cara β del esteroide (Figura 2.1b). Estos autores obtuvieron 1500 conformaciones y formaron familias de confórmeros en función de los valores mostrados por los ángulos diedros: $H_{17}-C_{17}-C_{20}-C_{22}$, $C_{17}-C_{20}-C_{22}-C_{23}$, $C_{20}-C_{22}-C_{23}-C_{24}$, $C_{22}-C_{23}-C_{24}-C_{25}$ y $C_{23}-C_{24}-C_{25}-H_{25}$. Para la **BR** obtuvieron tres familias (1SF1, 1SF2 y 1SF3) representativas del 77 % de toda la población de confórmeros y con una inclinación moderada hacia la cara β del esteroide. La diferencia energética entre la conformación de mayor y menor estabilidad está por debajo de 4.2 kJ/mol, indicando la elevada flexibilidad conformacional que presentan estas cadenas laterales. Además, encontraron que las conformaciones más favorecidas energéticamente obtenidas por las simulaciones de dinámica molecular son muy similares a las estructuras de RX y de RMN en solución. Con este estudio demostraron que la actividad biológica de los BRS puede estar relacionada con la orientación de la cadena lateral³².

Recientemente Khripach y colaboradores³⁴ realizaron un estudio experimental que les permitió obtener las conformaciones preferenciales de estigmastanos de cadena lateral similar a los BRS naturales (22R, 23R-diol) y sintéticos (22S, 23S-diol) utilizando las técnicas de DRX y de RMN 1D y 2D. En este estudio y de forma similar al desarrollado por Porzel y colaboradores se obtuvo que las conformaciones en solución de las cadenas laterales típicas de los BRS naturales y sintéticos son muy parecidas a las estructuras de los sólidos cristalinos (RX). Los BRS naturales poseen una cadena lateral ligeramente inclinada hacia la cara β , con los grupos $-OH$ apuntando hacia la cara α del esteroide, mientras que los BRS sintéticos poseen la cadena lateral orientada hacia la cara α del esteroide con los grupos $-OH$ ubicados hacia la cara β e impedidos estéricamente por el grupo metilo en el C_{20} . Se demostró que en ambos casos la cadena lateral está estabilizada por enlaces de hidrógeno intramoleculares formados entre el $-OH$ del C_{23} y el $-OH$ del C_{22} , $-O_{78}H_{79} \dots O_{76}H_{77}$ (Figura 2.1a).

En 2006 Shuji Yamamoto y colaboradores³³ analizaron la relación entre la actividad biológica de análogos de BRS con diferentes cadenas laterales y el área espacial ocupada por el C₂₅ de estos análogos como una medida de la flexibilidad conformacional de las cadenas laterales. Los análogos de BRS difieren en cuanto a la estereoquímica y el sustituyente del C₂₀. Los autores realizaron una búsqueda conformacional sistemática mediante mecánica molecular donde rotaron el ángulo C₁₃-C₁₇-C₂₀-C₂₂ 360° cada 10° y los ángulos C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄, C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅, C₂₃-C₂₄-C₂₅-C₂₆ cada 30°, y compararon las áreas ocupadas por el C₂₅ de los conformeros más estables obtenidos de estos análogos con respecto a la ocupada en el caso de la **BR**. Se obtuvo que en las conformaciones preferenciales de los análogos de menor actividad biológica (sin metilo en el C₂₀), el C₂₅ ocupa un mayor volumen respecto a la **BR**, indicando la mayor flexibilidad conformacional de estos análogos. De este análisis concluyeron que mientras menor es la flexibilidad conformacional de la cadena lateral mayor es la actividad biológica de la misma.

Otros estudios realizados recientemente por Andrianov y colaboradores^{159,160} se basan en la obtención e interpretación de espectros IR mediante cálculos teóricos con el objetivo de poder establecer correlaciones entre las propiedades biológicas y las características de dichos espectros. Este grupo obtiene los espectros IR experimentalmente y los compara con espectros teóricos. Los espectros teóricos son obtenidos mediante mecánica molecular adaptando un campo de fuerzas para el cálculo de las frecuencias y las distribuciones de energía potencial de los modos normales de vibración de estos sistemas. Estos trabajos poseen mucha utilidad pues tratan de mejorar campos de fuerza existentes para la correcta reproducción de los espectros IR experimentales de estas fitohormonas.

El grupo de Borisevich y colaboradores^{19,161} se ha dedicado a la obtención de espectros IR de BRS y ha resaltado la importancia que tiene la cadena lateral sobre la actividad biológica de los mismos. Estos autores han sido los primeros en obtener y analizar los espectros IR de BRS con el objetivo de demostrar la presencia de enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares de estas especies. Estos autores realizaron espectros tanto en fase sólida (KBr) como en solución (CHCl₃). En fase sólida demostraron la existencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos -OH vecinos en el anillo A y en la cadena lateral, e intermoleculares solamente entre el grupo carbonilo del anillo B y el sistema diol de la cadena lateral. En solución se demostró la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares formados entre los grupos diol del anillo A y la cadena lateral solamente y además, se especuló sobre la mayor flexibilidad de la cadena lateral que presentan los BRS de estereoquímica 22S, y 23S, los cuales, como se dijo anteriormente, son sintéticos, no naturales.

A manera de resumen es importante resaltar que la mayoría de los estudios realizados con métodos clásicos como mecánica y dinámica molecular exploran la libertad conformacional de la cadena lateral de estas fitohormonas mediante estudios conformacionales, tratando de relacionarla con la actividad biológica. Sin embargo, el efecto que realizan las interacciones moleculares sobre las conformaciones preferenciales de estas cadenas ha sido mucho menos tratado por estos métodos, ni suele ser objeto de atención por las dificultades que implica su tratamiento, a pesar de que puede ser determinante en un análisis de esta índole. Es esta una de las principales motivaciones del presente trabajo.

2.4.2.2. Estudios basados en métodos mecano-cuánticos.

En la actualidad existen muy pocos trabajos que utilizan los métodos mecano-cuánticos de la química computacional para resolver problemas relacionados con la estructura electrónica de los BRS. Estos métodos han sido utilizados para obtener descriptores mecano-cuánticos para el desarrollo de modelos QSAR¹⁶². Como ejemplo de estos descriptores se encuentran la energía electrónica, las cargas atómicas, la electronegatividad, las energías de los orbitales frontera, HOMO (de sus siglas en inglés “highest occupied molecular orbital”) y LUMO (“lowest unoccupied molecular orbital”), entre otros. Estos estudios también se han realizado a análogos de los BRS y a esteroides animales¹⁶³. Entre los métodos mecano-cuánticos más empleados en su obtención se encuentran diferentes hamiltonianos semiempíricos y funcionales de la densidad¹⁶⁴.

También se han reportado diversos estudios que utilizan los métodos mecánico-cuánticos para el análisis de mecanismos de reacción, sobre todo en análogos de los BRS, como las sapogeninas¹⁶⁵ y esteroides animales¹⁶⁶.

Es evidente que existe un esfuerzo en la comunidad científica por incrementar el conocimiento existente sobre la relaciones estructura-actividad biológica y la interacción de estas hormonas con el receptor. Como no está determinada aún la estructura 3D de la proteína BRI1 todo trabajo que modele y aporte información teórica sobre cómo ocurre dicha interacción es muy útil. Como se ha visto, la mayoría de los estudios teóricos se ha dedicado a la utilización de métodos clásicos como la mecánica y la dinámica molecular para el estudio de la elevada flexibilidad conformacional de estas fitohormonas. Sin embargo, ni la flexibilidad conformacional, ni las interacciones moleculares han sido estudiadas utilizando métodos mecano-cuánticos. Tampoco se conoce el efecto que pueden realizar las interacciones moleculares sobre las conformaciones preferenciales de estos sistemas. Este trabajo, además de realizar los primeros cálculos con basamento mecánico-cuántico de la estructura molecular de las conformaciones preferenciales e interacciones moleculares de estas fitohormonas,

contribuye al desarrollo de nuevas metodologías para el estudio de variabilidades estructurales internas de las moléculas, las que inevitablemente forman parte de su “espacio químico” en el momento de reaccionar o asociarse. Tales nuevos procedimientos pueden ser aplicados a diversos sistemas de elevada flexibilidad conformacional como los BRS.

2.5 Evidencias sobre las interacciones entre esteroides y proteínas.

Debido a que hasta el momento no han sido encontrados en la Base de Datos de Proteínas (PDB por sus siglas en inglés, Protein Data Bank) sitios activos que involucren a los BRS, mostramos en este epígrafe complejos formados entre diversos esteroides animales y proteínas presentes en la naturaleza. Recientemente se han obtenido por cristalografía y DRX las estructuras de los complejos formados entre diversos receptores de andrógeno y esteroides animales similares en estructura a los BRS. Se reportan los complejos con número de identificación: 1A28, 1E3G, 1SQN y 3D90 formados entre el receptor de la progesterona humana enlazado a los esteroides progesterona¹⁶⁷, metribolona¹⁶⁸, noretindrona¹⁶⁹, y levonorgestrel¹⁷⁰ respectivamente. La interacción de estos esteroides con el sitio activo de la proteína ocurre entre el grupo C=O en el C_3 del anillo A con la cadena lateral del aa básico Arg. Además, en el caso de la progesterona, levonorgestrel y noretindrona este grupo también interactúa con la cadena lateral de la Gln. La metribolona posee dos grupos hidroxilos en C_3 y C_{17} , los cuales interactúan a distancias menores de 2.5 Å con las cadenas laterales polares de la Arg y Thr respectivamente.

Recientemente fue aislada la estructura 3D del receptor de los ecdiesteroides acoplados a la 20-hidroxiecdisona^{171,172}. Los ecdiesteroides constituyen un grupo de hormonas animales relacionadas con la metamorfosis y cambio de la piel de los insectos y crustáceos. Este grupo representa las hormonas animales que mayor semejanza estructural muestran con los BRS, basándose mayoritariamente su estructura en un esqueleto 5β -colestano, a diferencia de los BRS (Figura 2.1b). En la Figura 2.3 se muestra la estructura de la 20-hidroxiecdisona. Dada la elevada semejanza estructural que presentan ambos grupos de hormonas se han realizado múltiples estudios que plantean el posible reconocimiento de los BRS por el receptor de los ecdiesteroides¹⁷³. Estos estudios han demostrado que los BRS pueden actuar como inhibidores de los ecdiesteroides, mostrando gran afinidad por el receptor de estas hormonas animales. El número de identificación en el PDB del complejo formado entre el receptor de los ecdiesteroides y la 20-hidroxiecdisona es el 2R40. En el sitio activo de esta proteína se encontraron los aa Glu, Arg, Ala, Thr, Tyr y Asn. Las interacciones más importantes se presentaron entre el grupo diol $2\beta,3\beta$ del anillo A de esta hormona con las cadenas latera-

les cargadas de los aa Glu y Arg. Además, el -C=O del anillo B interactuó con los grupos peptídicos de la cadena principal de la ALA y los grupos -OH en los C_{14} , C_{20} y C_{22} mostraron interacciones con los aa Thr, Tyr y Asn respectivamente.

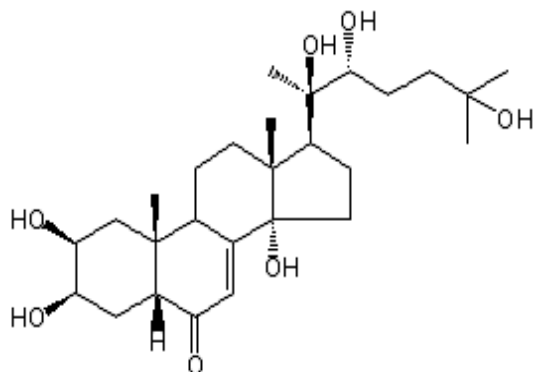


Figura 2.3 – Estructura del ecdiesteroides 20-hidroxiectidisona.

III. MODELOS ESTRUCTURALES DE BRASINOESTEROIDES

CAPITULO III. MODELOS ESTRUCTURALES DE BRASINOESTEROIDES

Se trabajó con un conjunto de siete BRS naturales y uno sintético de actividad biológica conocida. Estos son: brasinólida (**BR**), 24-epibrasinólida (**epiBR**), 28-homobrasinólida (**homBR**), norbrasinólida (**norBR**), dolicolida (**DL**), 22, 23-diepi-28-homobrasinólida (**diepiBR**), castasterona (**CS**) y tifasterol (**TF**) (Figura 3.1). Los cálculos fueron realizados teniendo en cuenta dos grupos de estructuras. El primer grupo (Grupo I) está formado por **BR**, **epiBR**, **homBR**, **norBR** y **DL** (Figura 3.1 a-e), las cuales corresponden a BRS naturales que se diferencian solamente en el sustituyente del C₂₄ en la cadena lateral, manteniendo igual la estructura del anillo A y B. El segundo grupo (Grupo II) está integrado por **BR**, **CS** y **TF**, los cuales poseen igual cadena lateral, pero se diferencian en cuanto a las estructuras del anillo A y B (Figura 3.1 a,h,i). El brasinoesteroide sintético 22,23-diepi-28-homobrasinólida (**diepiBR**) fue solamente utilizado en la validación de métodos (Figura 3.1 g).

Todos los cálculos realizados a nivel semiempírico fueron desarrollados con el programa MOPAC v 6j¹⁷⁴ utilizando el procedimiento de optimización de la geometría denominado *eigenvector following* (EF). Además se refinó por un factor de 100 el criterio para terminar todas las optimizaciones, electrónicas y geométricas; obteniéndose resultados de esta forma más precisos. El criterio de convergencia de gradientes utilizado en los cálculos fue de 0.01 kcal/mol Å y en los epígrafes posteriores se señalarán, si procediera, las palabras claves necesarias a cada caso en particular. Las optimizaciones desarrolladas a nivel DFT fueron realizadas con el programa Gaussian 03¹⁷⁵. De manera general, las interfaces gráficas utilizadas que ayudaron a la visualización de las estructuras fueron Accelrys Developer Studio Visualizer 1.5¹⁷⁶, GaussView 3.0¹⁷⁷ e Hyperchem¹⁷⁸.

3.1. Estudio de los brasinoesteroides aislados.

3.1.1. Estudio conformacional de un modelo de la cadena lateral.

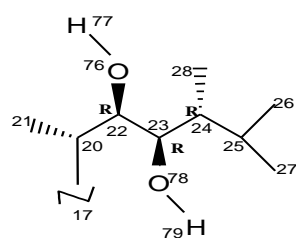
Los BRS poseen una cadena lateral muy flexible, y el primer paso en la modelación de los mismos fue realizar un análisis conformacional para obtener las conformaciones preferenciales. Para realizar un análisis más detallado de la cadena lateral se construyó un modelo de la misma (Figura 3.1 f) y se empleó la metodología MMH (Epígrafe 1.1.9) en su nueva variante, empleando el programa GRANADAROT⁹⁰. En esta variante del MMH se tienen en cuenta por primera vez los grados de libertad internos de las moléculas. Esta variante se nombró *variante dos* y se explica detalladamente en el Anexo 1. Inicialmente y con el objetivo de comprobar la correcta generación aleatoria de configuraciones espaciales por este programa se obtuvieron 3000 conformaciones para cada ángulo diedro (indicados en la Figura 3.1 f): C₁₃-C₁₇-C₂₀-C₂₂, C₁₇-C₂₀-C₂₂-C₂₃, C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄, C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅

y C₂₃-C₂₄-C₂₅-H₂₅ del Grupo I (Figura 3.1 a-e). Posteriormente fueron generadas 1000 conformaciones para cada ángulo. El modelo se define con la letra subíndice *m* para diferenciarla de las moléculas correspondientes. De esta forma obtuvimos los modelos: BR_m, epiBR_m, homoBR_m, DL_m y norBR_m.

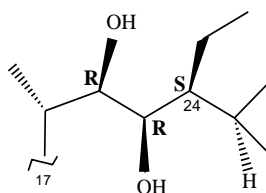
Las estructuras de partida fueron las geometrías de los sólidos cristalinos obtenidas por DRX³² (*estructura de RX*) para la **BR** y la **epiBR**. Para los casos de la homoBR_m, norBR_m y DL_m fueron construidas a partir de las estructuras de RX anteriores y optimizadas a nivel M05-2X/6-31++G(d,p). Estas 1000 estructuras de cada modelo fueron posteriormente optimizadas por el método AM1. Se utilizó el programa Q3 para el tratamiento estadístico. En este caso se toman las energías de referencia, en unidades de eV, como las de la optimización AM1 de las estructuras de partida. La energía de convergencia fue 10⁻³ eV y el coeficiente de Tanimoto, T=0.85. Luego de realizados los tratamientos matemáticos de termodinámica estadística según las ecuaciones descritas anteriormente, se seleccionaron las celdas en un rango de 0-20.9 kJ/mol con respecto a la geometría de mínimo encontrada por AM1 para cada uno de los modelos. A este conjunto de celdas se les realizó cálculos de energía por los métodos: B3LYP/6-31G//AM1 y M05-2X/6-31G//AM1. Luego se reoptimizaron las estructuras que quedaron por debajo de 16.7 kJ/mol según los cálculos de energía puntuales utilizando los dos funcionales anteriormente mencionados. En el *Anexo 1* se presenta un resumen de este procedimiento.

3.1.2. Validación de métodos para la reproducción de geometrías de estos sistemas.

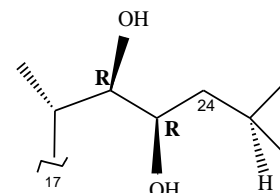
Es muy importante utilizar los métodos adecuados para describir correctamente la estructura electrónica e interacciones moleculares. Desafortunadamente, mientras más preciso es el hamiltoniano que utilicemos más difícil se hace poder trabajar con sistemas grandes debido al costo computacional que esto genera. El siguiente paso fue probar diferentes hamiltonianos semiempíricos y funcionales de la densidad para trazarnos una metodología a seguir durante el desarrollo de esta tesis. Se optimizaron las estructuras de RX³² de partida de tres BRS: **BR**, **epiBR** y **diepiBR** (Figura 3.1 a,b,g) utilizando cinco hamiltonianos semiempíricos de orbitales moleculares en la teoría del campo autoconsistente, específicamente AM1⁷⁴, PM3⁷⁵, MNDO⁷², PDDG/PM3 y PDDG/MNDO⁸¹⁻⁸³.



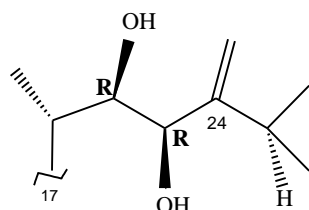
(b) 24-epibrasinólida (**epiBR**)



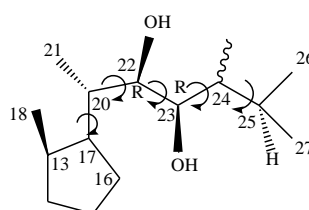
(c) Homobrasinólida (**homBR**)



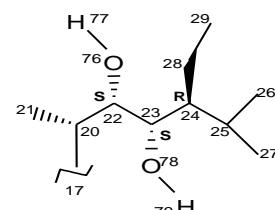
(d) Norbrasinólida (**norBR**)



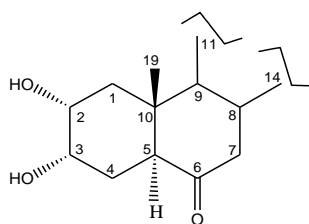
(e) Dolicolida (**DL**)



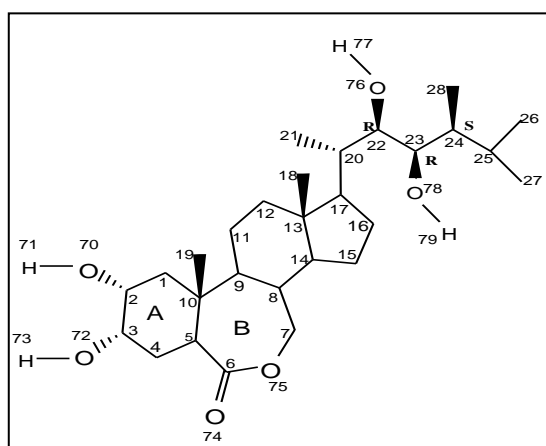
(f) Modelo de cadena lateral



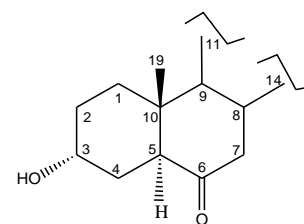
(g) 22,23-diepi-28
homobrasinólida
(**diepiBR**)



(h) Castasterona (**CS**)



a) **Brasinólida (BR)**



(i) Tifasterol (**TF**)

Figura 3.1 - (a) Estructura de la brasinólida (**BR**). Grupo I – brasinoesteroides (BRS) que difieren de estructura (a) solamente en cuanto al sustituyente en el C₂₄: (b) **epiBR**, (c) **homBR**, (d) **norBR**, (e) **DL**. Grupo II – BRS que difieren de estructura (a) solamente en sustituyentes de anillo A y B: (h) **CS**, (i) **TF**. (f) Modelo de la cadena lateral escogido para el análisis conformacional. (g)-**diepiBR**: brasinoesteroide sintético utilizado solamente en estudio aislado. Numeración detallada para los BRS : (a),(b),(g) debido a que son utilizados para la validación de métodos.

Además se utilizaron los funcionales de la densidad B3LYP y M05-2X, el primero con las bases 6-31G y 6-31G(d,p) y el segundo con las bases 6-31G y 6-31++G(d,p). Para realizar la validación con estos métodos, semiempíricos y DFT, se utilizó el estadígrafo de desviación media (MD, de sus siglas en inglés), el cual nos permite calcular las diferencias entre las coordenadas internas estimadas por cada método en particular y los valores experimentales según la Ecuación 2.27. En esta ecuación, cuando x_i representa las distancias de enlace se obtiene la MD correspondiente a esta coordenada interna en Å. De la misma forma cuando x_i representa los ángulos de valencia (°) ó los ángulos diedros (°) se obtienen las MD correspondientes a las coordenadas referentes a los ángulos.

$$MD = \frac{\sum_{i=1}^N |x_i - x_{\text{exp}}|}{N} \quad 2.27$$

Para el cálculo de la media cuadrática (RMSD, de sus siglas en inglés) utilizamos la herramienta del paquete de programa Hyperchem 7.0¹⁷⁹. En este procedimiento se superponen las moléculas que se están comparando y de forma iterativa se calcula el RMSD (Ecuación 2.28) para cada superposición hasta que el mismo sea mínimo. En esta ecuación el parámetro D_i se refiere a las distancias entre las coordenadas de cada par de átomos superpuestos¹⁸⁰. En este caso se superpusieron las geometrías optimizadas por cada método (semiempírico y DFT) con las correspondientes estructuras de RX. Los valores de RMSD nos dan una idea de la semejanza estructural y dependen esencialmente del tamaño molecular de las estructuras que se comparen. Muchos autores las han considerado como aceptables sobre todo en comparaciones estructurales de proteínas cuyos valores de RMSD se encuentren por debajo de 2 Å.^{181,182}

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (D_i)^2}{N}} \quad 2.28$$

3.1.3. Análisis AIM de las interacciones intramoleculares.

Con el objetivo de hacer un análisis de la topología de la densidad electrónica en estos sistemas (BR, **epiBR**, **diepiBR**) se utilizó la teoría de átomos en moléculas (AIM). Dicho análisis fue realizado a nivel B3LYP/6-31G(d,p), y las densidades electrónicas resultantes fueron analizadas empleando el paquete de programas AIM2000¹⁸³.

3.2. Estudio de las interacciones de los BRS con moléculas de interés biológico.

Se realizó primeramente un estudio de las interacciones del modelo de la cadena lateral de la **BR** (Figura 3.1 f), BR_m , con diferentes moléculas que simulan grupos funcionales importantes en el medio biológico y teniendo en cuenta además las diferentes conformaciones de la misma; luego se realizó un estudio de las interacciones de estas fitohormonas con H_2O . Por último se realizó un estudio de la interacción de la **BR** con los 20 aa proteinogénicos. En todos los casos fue utilizada la metodología MMH descrita en el *Anexo 1*, en su *primera y tercera variante*.

Para el cálculo de las energías de interacción en los diferentes complejos que se analizarán en los epígrafes siguientes se utilizó la aproximación supermolecular según:

$$\Delta E(BRS - molécula) = E(BRS - molécula) - E(BRS) - E(molécula) + CP \quad 2.29$$

donde $\Delta E_{BRS-molécula}$ es la diferencia de energía entre el complejo y las especies por separado junto con la corrección del BSSE calculada por el procedimiento de Conterpoise de Boys y Bernardi, CP^{44} en los casos en los que se haya utilizado.

3.2.1. Estudio conformacional de un modelo de la cadena lateral de la brasinólida formando complejos moleculares con moléculas pequeñas.

Con el objetivo de analizar las características y naturaleza de las interacciones de la cadena lateral de los BRS con diferentes grupos funcionales presentes en moléculas de interés biológico, se realizó un estudio conformacional utilizando el modelo de la cadena lateral de la brasinólida (BR_m) (Figura 3.1 f) con las siguientes moléculas pequeñas: H_2O , NH_4^+ , $HCONH_2$, H_2S , C_6H_6 , C_6H_5OH , CH_3COO^- y C_8H_6NH , las cuales simulan grupos funcionales presentes en el medio biológico y particularmente entre los residuos de los aa. Los grupos funcionales $-OH$ presentes en la cadena lateral de los aa polares no cargados como la Ser y Thr fueron simuladas con H_2O como único modelo viable en estas condiciones. Los enlaces peptídicos de la cadena principal de los aa y los grupos amida de la cadena lateral de Gln y Asn fueron modelados con formamida ($HCONH_2$). El grupo funcional $-SH$ de la cadena lateral de la Cys fue modelado con H_2S . Se utilizaron las moléculas benceno (C_6H_6), indol (C_8H_6NH) y fenol (C_6H_5OH) para simular las interacciones con las cadenas laterales de los aa: Phe, Trp y Tyr respectivamente. Para la modelación de las interacciones con los grupos $-COO^-$ del Asp y el Glu se utilizó el grupo acetato CH_3COO^- y por último la interacción con el grupo amino terminal de la cadena lateral de la Lys fue modelada con el catión amonio NH_4^+ .

Se generaron 1000 celdas mediante la metodología MMH rotando los ángulos diedros $C_{13}-C_{17}-C_{20}-C_{22}$, $C_{17}-C_{20}-C_{22}-C_{23}$, $C_{20}-C_{22}-C_{23}-C_{24}$, $C_{22}-C_{23}-C_{24}-C_{25}$ y $C_{23}-C_{24}-C_{25}-H_{25}$ del modelo BR_m y además se añadieron aleatoriamente cada una de las moléculas anteriormente mencionadas alrededor

del soluto (BR_m) como explica la *variante tres* desarrollada en el *Anexo 1*. Luego de optimizarlas al nivel AM1 se seleccionaron las celdas en un rango de 0-20.9 kJ/mol con respecto al mínimo AM1. Con este conjunto de celdas se realizaron cálculos de energía por el método M05-2X/6-31++G(d,p)//AM1. Debido al mayor nivel de cálculo empleado en este caso para describir correctamente las interacciones, fueron reoptimizadas solamente las conformaciones de mínima energía y se comprobó que fueran mínimos mediante cálculos de frecuencia. El error de superposición de bases (BSSE) fue corregido para las energías de interacción obtenidas. Se utilizó la teoría de átomos en moléculas (AIM) mediante el programa AIM2000¹⁸³ para caracterizar la naturaleza de las interacciones.

3.2.2. Modelos de la interacción brasinoesteroides-agua.

Para el estudio de la interacción BRS-H₂O se generaron 100 celdas de cada uno de los BRS del Grupo II (brasinólida (**BR**), castasterona (**CS**) y tifasterol (**TF**), Figura 3.1 a,h,i) rodeados por n moléculas de H₂O, con n=1-5 según la metodología MMH en su *variante uno*, *Anexo 1*. Se tomó de partida la estructura de RX³² en el caso de la **BR** y se contruyeron las demás (**CS** y **TF**) a partir de esta. Se optimizaron las 100 celdas generadas en cada caso mediante el hamiltoniano semiempírico AM1 y se aplicó el programa Q3 para obtener las configuraciones más importantes. Luego solamente en el caso de n=1, (BR-(H₂O)₁, CS-(H₂O)₁ y TF-(H₂O)₁), se aplicó el programa TGSA para eliminar información redundante no tenida en cuenta por el índice de Tanimoto. Los mínimos locales obtenidos después del análisis TGSA fueron reoptimizados a nivel B3LYP/6-31G y se corrigió el BSSE en las geometrías y en las energías al mismo nivel de teoría. Primero se realizó la corrección de la energía mediante una evaluación del BSSE de los complejos en la superficie de energía potencial no corregida y posteriormente fue corregida la energía en cada paso de la optimización, obteniéndose así la superficie de energía potencial más correcta al nivel de la base y funcional B3LYP/6-31G. Finalmente se hizo una evaluación de la energía de los complejos BRS-(H₂O)₁ corregidos por CP con los métodos B3LYP/6-31+G(d)//B3LYP/6-31G y B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G.

3.2.3. Modelos de la interacción brasinólida-aminoácidos.

Para el estudio de las interacciones brasinoesteroides (BRS)-aa se utilizó nuevamente la metodología MMH en su *variante uno*, *Anexo 1*, generándose en este caso 50 celdas de la **BR** rodeada de cada uno de los 20 aa. Para este estudio los aa se clasificaron en cinco grupos de acuerdo a la polaridad de la cadena lateral en: alifáticos no polares (Gly, Ala, Ile, Leu, Val, Pro), aromáticos (Phe, Trp, Tyr), con átomos de S (Cys, Met), polares no cargados (Ser, Asn, Thr, Gln) y polares cargados (Glu, Asp, Arg, Lys, His). Para modelar los aa se utilizó un modelo bloqueado de los mismos que se

muestra en la Figura 2.2. Como se puede observar el enlace peptídico fue simulado con metilamina (-NHCH₃) y grupos acetilos (-COCH₃). Se eliminó cualquier interacción que ocurra por los metilos de los extremos. Se optimizaron las 50 celdas y se añadió la palabra clave MMOK para la correcta optimización AM1 con mecánica molecular de los enlaces peptídicos presentes en los aa⁸⁰. Este comando activa un campo de fuerzas construido específicamente para reproducir la geometría planar del enlace peptídico y la barrera energética de isomerización del mismo. Se añadieron las palabras claves CHARGE=+1 ó CHARGE=-1 para modelar correctamente la carga de los aa básicos y ácidos respectivamente a pH fisiológico.

Se realizó un estudio más exhaustivo de los complejos BR-aa más estables obtenidos según la metodología MMH-AM1. En estos casos se generaron 100 celdas adicionales para explorar mejor sus posibles interacciones y se añadieron a este análisis las 50 celdas obtenidas inicialmente. Los complejos de mayor población resultantes de este análisis se reoptimizaron al nivel B3LYP/6-31G y se comprobó que fueran mínimos a través de cálculos de frecuencia. Se realizó además un cálculo de energía al nivel B3LYP/6-311+G(d)//B3LYP/6-31G. Debido al conocimiento que se tiene respecto a la pobre descripción de las interacciones dispersivas que realizan los métodos AM1 y B3LYP^{63,77}, en este caso recurrimos nuevamente a la utilización del funcional M05-2X, mediante un cálculo de energía al nivel M05-2X/6-311+G(d)//B3LYP/6-31G, para validar el comportamiento de AM1 y B3LYP en la descripción de estos complejos. En estos cálculos se obtuvieron parámetros termodinámicos referentes a la asociación de la **BR** por los aa con los cuales se mostró la mayor interacción a 298.15 K, teniendo en cuenta las correcciones térmicas a la energía interna (TCE, de sus siglas en inglés) y a la energía libre de Gibbs (TCG, de sus siglas en inglés) para el cálculo de las mismas a esta temperatura. Para este cálculo se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\Delta E^{298K}(BR - aa) = (E(BR - aa) + TCE) - (E(BR) + TCE) - ((E(aa) + TCE)) \quad 2.30$$

$$\Delta G^{298K}(BR - aa) = (E(BR - aa) + TCG) - (E(BR) + TCG) - ((E(aa) + TCG)) \quad 2.31$$

La nomenclatura utilizada para identificar estos complejos es $BR(u;v)-aa(x;y)$, donde u y v representan las regiones de la **BR** que interactúan con las regiones x , y de un aa en particular. Por ejemplo $BR(1)-GLU(1)$ identifica el complejo donde la región 1 de la **BR** (sistema diol anillo A) interactúa con la región 1 del GLU (cadena lateral). Estas regiones pueden ser observadas en la Figura 3.2. Cuando se especifica un grupo funcional determinado es porque la interacción ocurre específicamente en ese sitio. En el complejo $BR(1)OH_2-GLU1$, la interacción ocurre entre el hidroxilo presente en el C_2 del anillo A de la **BR** y la cadena lateral del GLU.

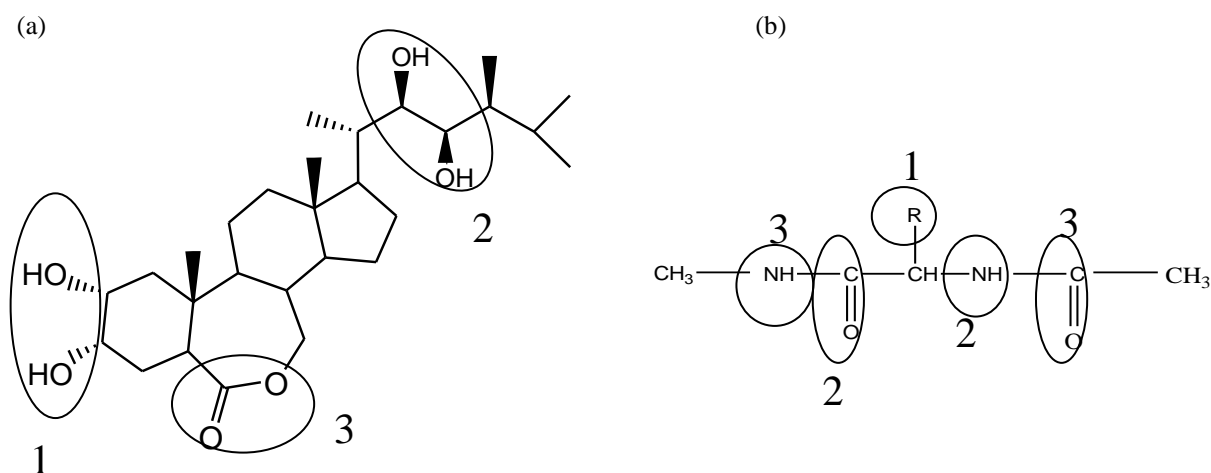


Figura 3.2 - a)-Estructura de la brasinólida (**BR**) y b) Modelo de aminoácido (aa) bloqueado. Los círculos indican las zonas de interacción específica en ambos casos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos mediante la aplicación de los métodos de la química computacional al estudio de la estructura electrónica e interacciones moleculares de los BRS. Se han dividido los resultados en dos epígrafes, el primero referido al estudio de los BRS aislados, su estructura y propiedades electrónicas, y el segundo al estudio de sus interacciones moleculares.

Estudio de BRS aislados.

4.1. Estudio conformacional de un modelo de la cadena lateral.

Como resultado de la revisión bibliográfica resulta evidente que la cadena lateral de los BRS juega un rol muy importante en la actividad biológica de los mismos^{13,14,34}. Por esto el primer paso fue realizar un análisis conformacional de los BRS naturales con diferentes sustituyentes en el C₂₄ para poder analizar cuales conformaciones son las más estables. Posteriormente se analizará si cambian las conformaciones preferenciales al interactuar con moléculas de interés que simulan sus interacciones con el ambiente molecular. Para este análisis se procedió como se describe en el *Capítulo III, Epígrafe 3.1.1*.

Como se vio anteriormente dada la existencia de campos de fuerza que reproducen adecuadamente las diferentes conformaciones de estos sistemas, todos los estudios conformacionales previos realizados a la cadena lateral han utilizado solo la dinámica molecular basada en potenciales clásicos^{10,30-33,157}. En este trabajo la metodología MMH es utilizada por vez primera para realizar análisis conformacionales, con la característica de que se utiliza métodos mecano-cuánticos para este fin, los cuales hasta el momento no habían sido probados para estudiar el paisaje energético completo de estos sistemas incluyendo la flexibilidad conformacional de las cadenas laterales de los BRS. Esta modelación realizada a través de la metodología MMH nos permitirá mejorar la exploración de la hipersuperficie de múltiples mínimos que se puede realizar, y además estudiar el efecto que tienen las interacciones moleculares sobre las conformaciones preferenciales teniendo en cuenta los desplazamientos de densidades electrónicas, que constituyen un efecto esencialmente cuántico.

El primer paso realizado fue comprobar la generación aleatoria realizada por el programa GRANADAROT⁹⁰. En la Figura 4.1 se muestran los histogramas de frecuencia absoluta de los cinco diedros rotados sólo en el caso del modelo de la cadena lateral de la brasinólida (BR_m). Estos histogramas son el resultado de la generación aleatoria de 3000 diedros por cada ángulo rotado. Como se puede observar se han generado aleatoriamente ángulos en casi todo el espacio de 0-360°. Las únicas zonas no exploradas corresponden a ángulos que dan lugar a geometrías donde se acercan

los átomos a distancias por debajo de los radios de vdW permitidos y estas geometrías son descartadas automáticamente, porque significarían interpenetraciones de estos cuerpos. Así, el ángulo $C_{13}-C_{17}-C_{20}-C_{22}$ no puede tomar valores entre 220° y 230° debido a que los metilos en las posiciones C_{13} y C_{20} se acercan mucho. Sin embargo, los demás ángulos rotados: $C_{17}-C_{20}-C_{22}-C_{23}$, $C_{20}-C_{22}-C_{23}-C_{24}$, $C_{22}-C_{23}-C_{24}-C_{25}$ y $C_{23}-C_{24}-C_{25}-H_{25}$ no presentan este tipo de problemas estéricos. Un estadígrafo que nos permite evaluar la flexibilidad conformacional de estos diedros es el coeficiente de variación, o variabilidad C_v , expresado en %. Este estadígrafo se calcula como $C_v = (S/\bar{X}) * 100$, o sea es el cociente entre la desviación estándar S y la media \bar{X} de cada distribución numérica y constituye una medida de variación relativa. Lo podemos ver encabezando cada histograma de la Figura 4.1. En términos estadísticos un aumento de este valor significa que la heterogeneidad de la distribución de valores se incrementa. De los C_v reportados en la Figura 4.1 podemos ver que la variabilidad se incrementa a medida que nos alejamos del anillo ciclopentano. El diedro $C_{13}-C_{17}-C_{20}-C_{22}$ es el que muestra menor valor de C_v pues involucra el sistema rígido, el cual impide determinadas rotaciones como se vio anteriormente; mientras que el ángulo $C_{23}-C_{24}-C_{25}-H_{25}$ muestra el mayor C_v indicando una mayor flexibilidad conformacional al final de la cadena lateral.

Una vez probado el buen desempeño del programa GRANADAROT⁹⁰ para la generación aleatoria se realizó una optimización con el hamiltoniano semiempírico AM1 de las 1000 celdas generadas. El método AM1 nos permite realizar una exploración inicial del espacio conformacional. Este hamiltoniano ha sido ampliamente utilizado con diversos fines en sistemas diferentes (Epígrafe 1.1.6). Una vez realizada la misma se tomaron como muestra las geometrías que estaban a 20.9 kJ/mol del mínimo AM1 (35 estructuras, Figura 4.2), y se realizaron cálculos de energía a estas estructuras según B3LYP y M05-2X con la base 6-31G. Luego se reoptimizaron a los mismos niveles de teoría las celdas por debajo de 16.7 kJ/mol según los cálculos de energía anteriores, quedándonos con 16 geometrías finales.

En la Figura 4.2a se puede observar la superposición de las 35 estructuras, donde se muestra claramente la flexibilidad conformacional que presenta la cadena lateral.

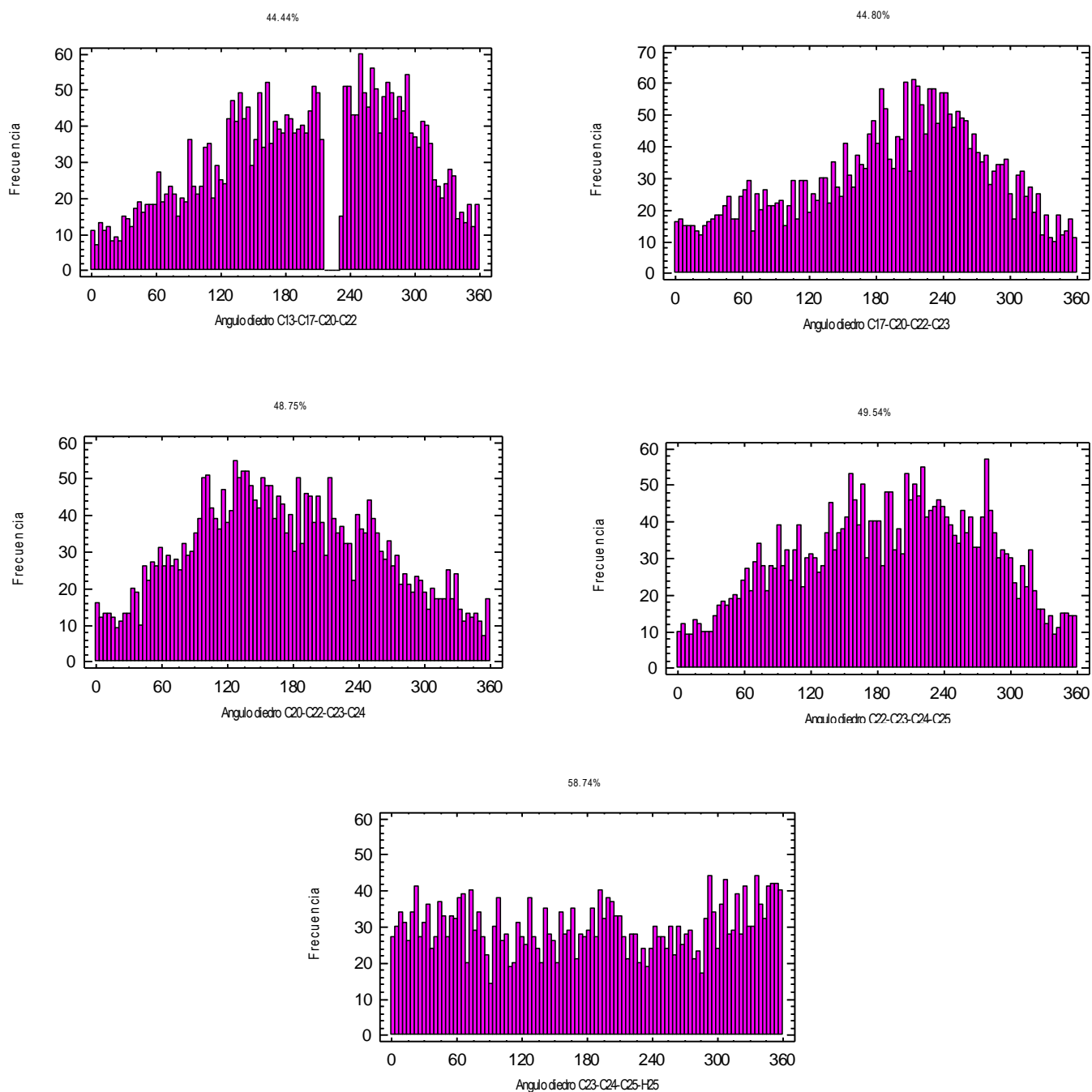


Figura 4.1 - Histogramas de frecuencia absoluta de los ángulos diedros rotados C₁₃-C₁₇-C₂₀-C₂₂, C₁₇-C₂₀-C₂₂-C₂₃, C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄, C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅ y C₂₃-C₂₄-C₂₅-H₂₅. Coeficiente de variación C_v, expresado en %.

La Figura 4.2b,c muestra la superposición de las geometrías AM1 que resultaron más y menos estables según los cálculos de energía realizados con B3LYP y M05-2X, con las geometrías de partida

o de RX. En esta figura se incorporó el índice de Carbó (C_{AB}) para medir la semejanza de estas cadenas con la geometría de partida.

Como se puede observar las celdas de mayor estabilidad, Figura 4.2 b, poseen C_{AB} mayores de 0.99, indicando una alta semejanza con respecto a la estructura de RX (verde). Sin embargo, la estabilidad de estos modelos disminuye cuando la cadena lateral está muy inclinada hacia la cara β (definida por el metilo en C_{13} , Figura 2.2 b) o hacia la cara α del esteroide y este comportamiento lo podemos observar en la Figura 4.2 c.

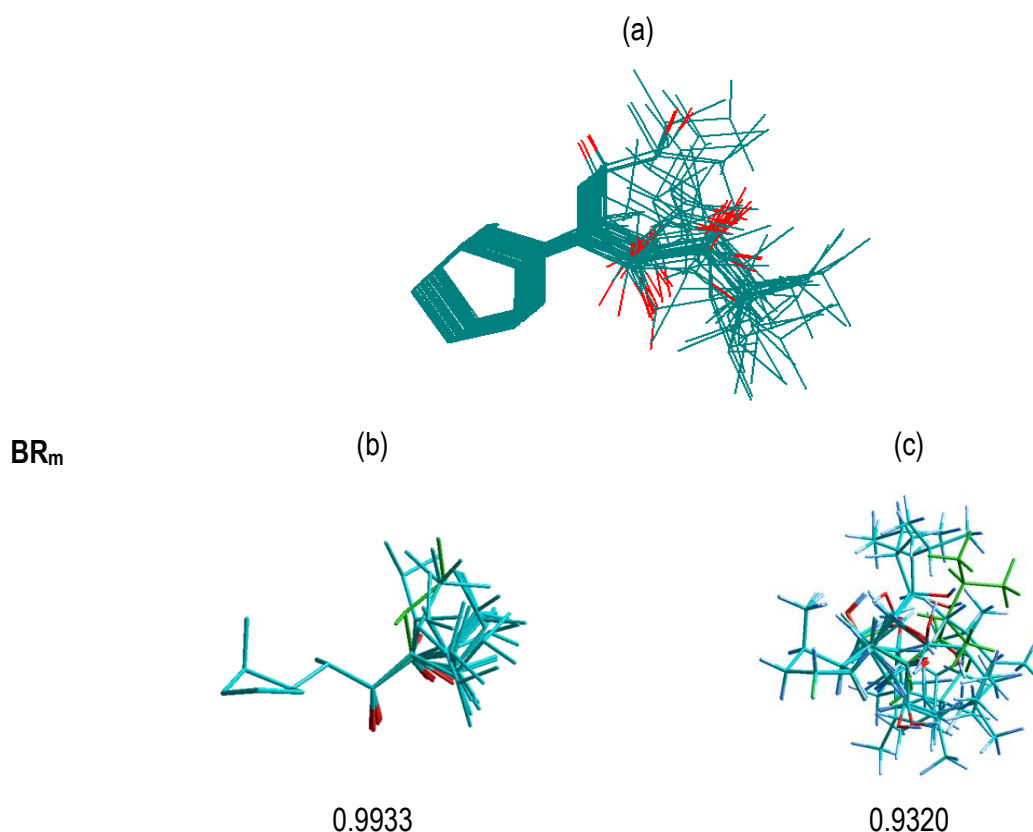


Figura 4.2 - (a) Superposición de 35 estructuras AM1. (b) Superposición de estructura de RX con geometrías < 16.7 kJ/mol y (c) Superposición de estructura de RX con geometrías > 16.7 kJ/mol. C_{AB} -promedio del índice de Carbó.

En este caso se observa como disminuye el valor de C_{AB} , reflejando mayores diferencias entre los conformeros menos estables y la geometría de RX (verde).

Los resultados que se muestran en la Tabla 4.1 corresponden a las energías relativas y poblaciones respecto a los mínimos correspondientes a cada método (AM1, B3LYP/6-31G y M05-2X/6-31G) de las 16 geometrías. Como se puede observar el hamiltoniano semiempírico AM1 no concuerda con B3LYP y M05-2X en cuanto a las conformaciones de mínimo. Las conformaciones de mínimo en-

contradas por B3LYP y M05-2X (**BR_m 21 y BR_m 26**) se encuentran a más de 19 kJ/mol del mínimo encontrado según AM1. Las pequeñas diferencias de energía calculadas para las conformaciones evidencian la elevada flexibilidad conformacional del sistema. Las barreras energéticas entre las diferentes conformaciones deben ser relativamente bajas, permitiendo que varias conformaciones tengan una elevada población. Las diferencias de energía encontradas por el método AM1 están en el orden del error del mismo⁴⁹. Aunque el hamiltoniano semiempírico AM1 no reflejó estabilidades relativas de los cónformeros parecidas a las de los métodos DFT, es importante resaltar que a través de la exploración realizada con MMH utilizando este hamiltoniano fue posible encontrar una geometría bastante cercana a la obtenida por DRX. Como se conoce la estructura obtenida por DRX muestra a las moléculas sujetas a un empaquetamiento cristalino y aunque nuestra modelación fue realizada al vacío, el método AM1 permitió acertar en alguna medida.

Los dos funcionales DFT muestran tendencias similares en cuanto a las estabilidades de los cónformeros, siendo muy pequeñas las diferencias de energía entre los mismos. Las diferencias en geometrías entre las conformaciones B3LYP y M05-2X para cada cónformero son muy pequeñas. La Tabla 4.2 muestra los ángulos diedros de las 16 conformaciones resultantes de la optimización M05-2X/6-31G. En la Figura 4.3 se presentan las 16 geometrías optimizadas a nivel M05-2X/6-31G y la geometría del sólido cristalino (RX).

La posición del grupo diol en el C₂₂ y C₂₃ depende del ángulo diedro C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄, y por esta razón se dividieron las conformaciones en dos familias, permitiendo para este ángulo valores en un rango de 30° en cada una de ellas. De esta forma, para la familia número uno, denotada como F1, el ángulo C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄ se encuentra en el rango de 50° - 80° y para la familia número dos: F2, el mismo toma valores en el intervalo de 140° a 170°.

En la Figura 4.4 se muestran las superposiciones de las conformaciones optimizadas por DFT de la F1 y la F2 con la estructura de RX. La F1 fue la que mayor superposición mostró con la estructura de RX, como lo reflejan los valores de C_{AB}. Estas cadenas laterales muestran una ligera inclinación hacia la cara β del esteroide. La F2 muestra la cadena lateral más extendida, es decir con una menor inclinación hacia la cara β de la molécula. La estabilización de ambas familias de cónformeros podría deberse a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos -OH del C₂₂ y C₂₃.

La diferencia de energía entre los cónformeros pertenecientes a la F1: BR_m 42 y BR_m 26 según M05-2X, es de alrededor de 12.5 kJ/mol, observándose la mayor diferencia en el valor que toma el diedro C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅. El cónformero BR_m 42 muestra una inclinación mucho más marcada hacia la

cara β del esteroide. Lo anterior nos dice que no sólo es importante el diedro que define la posición del sistema diol, sino que los demás también ejercen un efecto importante en la estabilidad de estas cadenas laterales.

Tabla 4.1: Energía relativa (kJ/mol) a la conformación del mínimo y población de Boltzman de cada confórmero a nivel AM1, B3LYP/6-31G y M05/6-31G (en negrita mínimo encontrado por cada método).

| Conformación | Energía Relativa (AM1) | AM1 Población (%) | Energía Relativa (B3LYP) | B3LYP/6-31G Población (%) | Energía Relativa (M05-2X) | M05-2X/6-31G Población (%) |
|---------------------|------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| BR _m 8 | 0.0 | 34.3 | 4.7 | 3.8 | 9.3 | 1.5 |
| BR _m 95 | 0.5 | 28.6 | 3.1 | 7.2 | 5.8 | 5.8 |
| BR _m 88 | 2.2 | 14.0 | 2.6 | 8.8 | 8.9 | 1.6 |
| BR _m 12 | 2.9 | 10.3 | 4.6 | 3.9 | 8.7 | 1.8 |
| BR _m 59 | 5.5 | 5.4 | 8.4 | 0.9 | 10.0 | 1.1 |
| BR _m 111 | 11.9 | 0.3 | 4.7 | 3.3 | 9.3 | 1.5 |
| BR _m 64 | 17.5 | 0.03 | 6.4 | 1.8 | 12.6 | 0.4 |
| BR _m 6 | 18.0 | 0.02 | 7.8 | 1.1 | 9.1 | 1.6 |
| BR _m 7 | 19.3 | 0.02 | 3.4 | 6.3 | 8.3 | 2.1 |
| BR _m 13 | 19.6 | 0.01 | 2.2 | 10.2 | 9.0 | 1.6 |
| BR _m 26 | 20.0 | 0.01 | 0.4 | 21.4 | 3.1 | 17.5 |
| BR _m 21 | 20.2 | 0.01 | 0.0 | 24.9 | 0.0 | 60.2 |
| BR _m 14 | 20.5 | 0.0 | 9.5 | 0.5 | 11.6 | 0.6 |
| BR _m 116 | 20.8 | 0.0 | 5.2 | 3.0 | 10.1 | 1.0 |
| BR _m 42 | 20.9 | 0.0 | 12.9 | 0.1 | 15.5 | 0.1 |
| BR _m 87 | 20.9 | 0.0 | 5.4 | 2.8 | 9.0 | 1.6 |

El diedro C₁₃-C₁₇-C₂₀-C₂₂ involucra el anillo ciclopentano y esto adiciona una restricción a la rotación libre alrededor del enlace C₁₇-C₂₀, es por esto que siempre toma valores cercanos a 180° (Tabla 4.2). El ángulo diedro C₁₇-C₂₀-C₂₂-C₂₃ también debe tomar valores cercanos a 180° en las conformaciones más estables. Lo anterior está mostrado por la baja estabilidad de conformaciones como

la BR_m 14 y BR_m 6 (Tabla 4.2), cuyas cadenas laterales presentan una gran inclinación hacia la cara α , Figura 4.3.

Tabla 4.2- Angulos diedros de las geometrías obtenidas a nivel M05-2X/6-31G. Poblaciones relativas (entre paréntesis) de las conformaciones más estables del modelo de la cadena lateral de la brasinólida, (BR_m) a nivel B3LYP/6-31G y M05-2X/6-31G.

| Confórmero | C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ | C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ | C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -H ₂₅ |
|--------------------------|--|--|--|--|--|
| F1 | B3LYP- (46.4 %) | | M05-2X- (77.9 %) | | |
| BR _m 21 | 175.1 | -179.9 | 59.9 | 176.8 | -76.3 |
| BR _m 26 | 174.9 | 176.9 | 59.0 | -174.4 | 36.7 |
| BR _m 42 | 176.5 | -172.2 | 64.9 | -96.3 | 39.9 |
| F2 | B3LYP- (53.6 %) | | M05-2X- (22.1 %) | | |
| BR _m 95 | 177.6 | -177.1 | 147.4 | -179.8 | -72.9 |
| BR _m 7 | 176.2 | -178.4 | 147.1 | -173.1 | 37.6 |
| BR _m 12 | 177.3 | -177.8 | 146.8 | -162.2 | -172.9 |
| BR _m 88 | 177.4 | -177.2 | 147.6 | -157.7 | 60.6 |
| BR _m 87 | 176.1 | -178.2 | 148.4 | -176.9 | 165.4 |
| BR _m 111 | 176.2 | 179.9 | 153.4 | -79.2 | 38.3 |
| BR _m 8 | 174.2 | 179.0 | 153.3 | -77.3 | 38.6 |
| BR _m 59 | 177.5 | -176.9 | 145.8 | 52.6 | -52.0 |
| BR _m 116 | 176.9 | 178.2 | 148.4 | -170.9 | 35.3 |
| BR _m 64 | 175.9 | -176.7 | 153.7 | -73.7 | 39.8 |
| BR _m 13 | 176.1 | -178.1 | 148.4 | -176.9 | 165.4 |
| BR _m 14 | -175.7 | 53.9 | 146.5 | -172.4 | 166.8 |
| BR _m 6 | -175.7 | 53.9 | 146.4 | 55.0 | -74.8 |
| BR-RX^a | 176.0 | -172.1 | 48.1 | -179.8 | -61.1 |

^aBR-RX- Angulos diedros de la estructura de RX de la brasinólida.

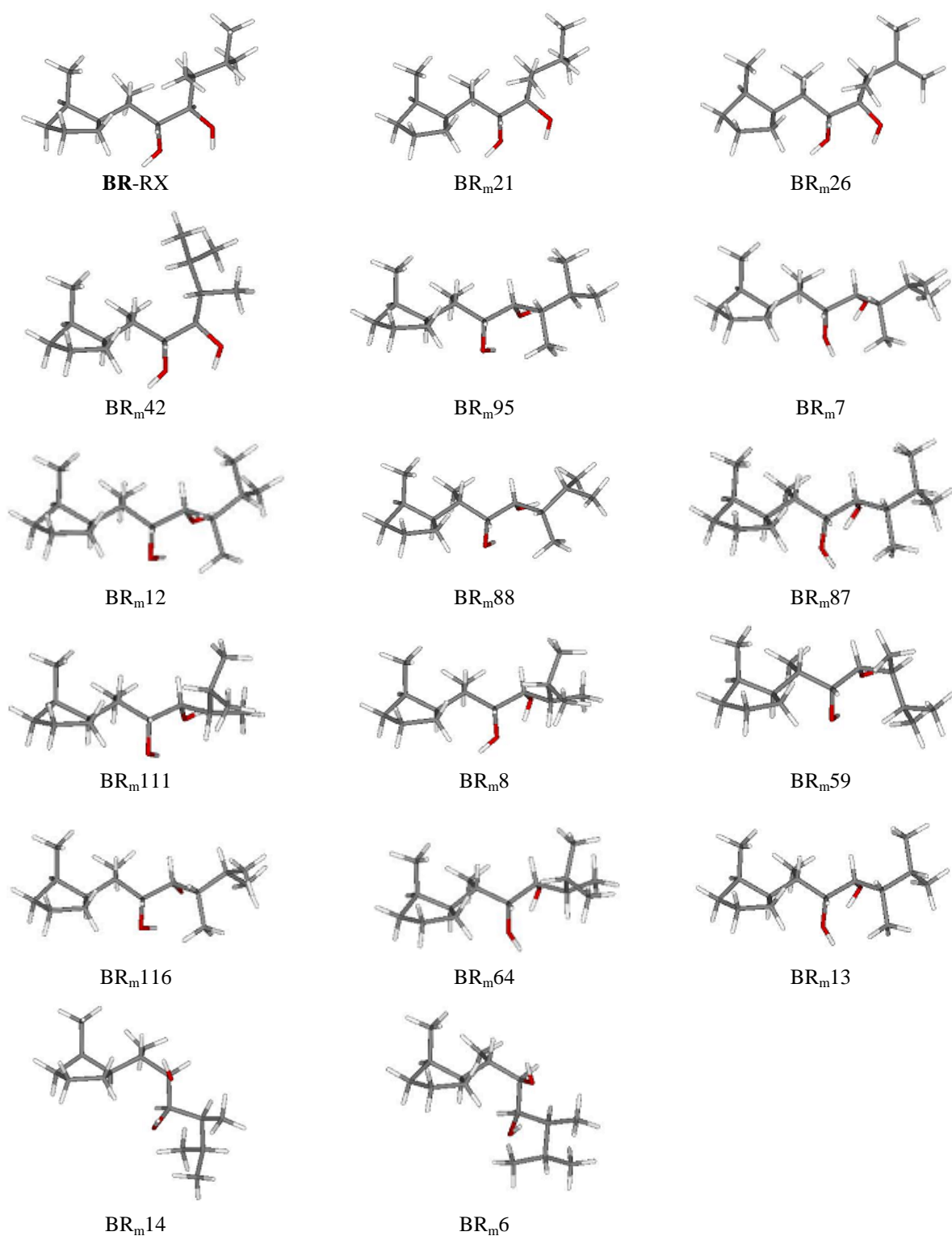


Figura 4.3 - Estructura cristalina de RX (**BR-RX**) y 16 conformeros optimizados a nivel M05-2X/6-31G.

Los diedros C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅ y C₂₃-C₂₄-C₂₅-H₂₅ toman diferentes valores para las conformaciones más estables, indicando un incremento de la flexibilidad a medida que nos alejamos del anillo ciclo-

pentano. La F1 es la más importante en el caso del funcional M05-2X, aportando en un 77.9 % a la función de partición total, mientras que para B3LYP están ligeramente más favorecidas las configuraciones de la cadena lateral más extendidas.

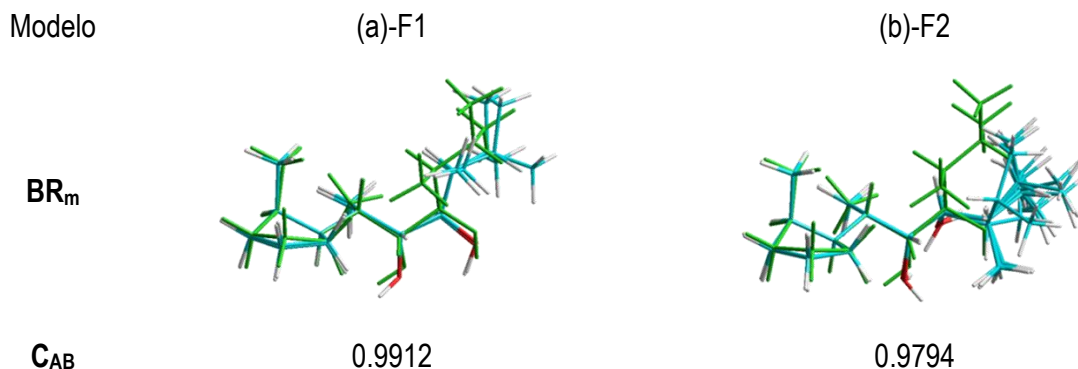


Figura 4.4 - Superposición de conformaciones de mínima energía a nivel M05-2X/6-31G de : (a) Confórmeros pertenecientes a la F1 y (b) Confórmeros pertenecientes a la F2. En color verde se representa la geometría de RX.

Es importante resaltar que para el funcional M05-2X, la familia que más aporta a la función de partición, F1, no es la que contiene el mayor número de conformaciones, a diferencia de B3LYP. A pesar de ello, las geometrías son muy parecidas, y ambos funcionales pueden ser usados para describir las conformaciones preferenciales de la cadena lateral.

En la Tabla 4.3 se muestran los ángulos diedros de las 16 geometrías optimizadas por el método AM1. Las mayores diferencias en geometrías con respecto a las optimizadas por DFT se obtienen para los ángulos diedros C₁₇-C₂₀-C₂₂-C₂₃ y C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄. En algunos casos el diedro C₁₇-C₂₀-C₂₂-C₂₃ adopta valores cercanos a -150°. Con la optimización a nivel DFT estos valores se acercan a 180°, como se observó anteriormente (Tabla 4.2). El diedro C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄, que involucra al sistema diol, exhibe en casi todos los casos una diferencia de 15° a 30° con respecto a los optimizados a nivel DFT. Lo anterior hace que la F2 amplíe su rango en estos casos, tomando valores entre 115° y 165°. Las geometrías AM1 de los confórmeros BR_m 7, BR_m 87, BR_m 64 y BR_m 42 casi no variaron después de la optimización a nivel DFT. Como habíamos visto anteriormente el método AM1 da una preferencia a las cadenas laterales más extendidas, mientras que la F1 muestra muy bajas poblaciones, a diferencia de los funcionales B3LYP y M05-2X.

Tabla 4.3- Angulos diedros y poblaciones relativas de las conformaciones más estables del modelo de la cadena lateral de la brasinólida, BR_m según MMH-AM1.

| BR _m | C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ | C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ | C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -H ₂₅ |
|--------------------------|--|--|--|--|--|
| F1 | (0.02%) | | | | |
| BR _m 21 | 178.9 | -153.5 | 79.0 | -152.8 | -43.5 |
| BR _m 26 | 178.7 | -153.9 | 78.4 | -152.4 | 42.9 |
| BR _m 42 | 178.7 | -158.2 | 64.4 | -107.3 | 38.2 |
| F2 | (93.0%) | | | | |
| BR _m 95 | 179.2 | -169.1 | 129.9 | -168.3 | -45.9 |
| BR _m 7 | 179.6 | -167.3 | 144.7 | -169.1 | 35.5 |
| BR _m 12 | 179.5 | -168.8 | 127.4 | -162.2 | -166.2 |
| BR _m 88 | 179.4 | -168.3 | 124.5 | -159.9 | 44.3 |
| BR _m 87 | 179.8 | -166.8 | 147.4 | -152.6 | -167.9 |
| BR _m 111 | 179.6 | -163.8 | 149.7 | -77.9 | 36.9 |
| BR _m 8 | 179.4 | -167.5 | 123.8 | -70.4 | 38.6 |
| BR _m 59 | 179.6 | -165.1 | 115.3 | 43.9 | -75.0 |
| BR _m 116 | 179.4 | -142.2 | 164.0 | -156.2 | 40.6 |
| BR _m 64 | 179.4 | -164.1 | 154.1 | -79.1 | 38.4 |
| BR _m 13 | 179.6 | -167.4 | 124.9 | -160.7 | -165.8 |
| BR _m 14 | -177.3 | 55.3 | 148.5 | -157.5 | -165.9 |
| BR _m 6 | -177.6 | 54.9 | 146.1 | -165.4 | -43.8 |
| BR-RX^a | 176.0 | -172.1 | 48.1 | -179.8 | -61.1 |

^aBR-RX-Angulos diedros de la cadena lateral de la estructura de RX de la brasinólida.

Debe observarse que el estudio conformacional presentado, tal y como se ha descrito, utiliza un modelo de la cadena lateral pero no constituye una estructura completa del brasinoesteroide. Lo anteriormente dicho puede influir en las pequeñas diferencias de energía obtenidas para los 16 cónformeros según los cálculos realizados a nivel DFT (Tabla 4.1). Para saber si nuestro modelo estaba dando buenos resultados desde el punto de vista energético se escogieron las conformaciones más estables del modelo BR_m dada por los métodos DFT, BR_m 21 y BR_m 26, y se construyó a partir de ellos la estructura de la **BR**. A las conformaciones **BR**21 y **BR**26 se les realizó un cálculo de energía puntual a nivel M05-2X/6-31++G(d,p) y se obtuvo una diferencia de energía de 12.6 kJ/mol,

siendo la más estable la conformación **BR**21 construida a partir del modelo BR_m 21. El confórmero BR_m 21 también resultó ser el más estable según el modelo utilizado, lo cual valida el modelo pequeño con la cadena lateral para reproducir diferencias energéticas entre las conformaciones de los BRS.

Nuestros resultados también muestran una gran similitud con la dinámica molecular desarrollada al va-cío por Droshin y colaboradores³² y cuyos resultados fueron resumidos en el Epígrafe 1.4.2.1. El estudio realizado por estos autores fue mediante el templado simulado de varios BRS. En el caso de la **BR** fueron encontradas tres familias de compuestos muy parecidas a la estructura obtenida por DRX. Estas familias mostraron la cadena lateral orientada hacia la cara β del esteroide, y una contribución de un 77% a la función de partición total del sistema. La diferencia energética entre la familia más y menos estable fue de 3.3 kJ/mol, demostrando la existencia de una hipersuperficie cuasi-plana donde no existe un mínimo global significativo³².

En el estudio conformacional desarrollado por primera vez con nuestra metodología, el confórmero BR_m 21 perteneciente a la F1 es muy similar a la tercera familia (1SF3) mostrada por estos autores, obteniéndose un RMSD de 0.06 Å al superponer nuestro confórmero con el reportado. Además, nuestra conformación BR_m 21 presentó un RMSD de 0.24 Å al superponerla con la estructura de RX. El segundo confórmero en estabilidad, BR_m 26, es también muy similar a los compuestos que integran la segunda familia (1SF2) reportada por estos autores, mostrando un RMSD de 0.07 Å respecto a la misma y un RMSD de 1.10 Å respecto a la estructura de RX. A diferencia de ellos, encontramos un grupo de confórmeros pertenecientes a la F2 de cadena lateral más extendida y con contribuciones significativas a la función de partición del sistema. En nuestro caso los tres confórmeros de mayor estabilidad obtenidos a nivel M05-2X/6-31G: BR_m 21 (F1), BR_m 26 (F1) y BR_m 95 (F2), mostraron una contribución a la función de partición total del sistema mayor del 80 %, con una diferencia energética de 5.8 kJ/mol. Esta pequeña diferencia de energía nos vuelve a indicar lo plana que resulta la hipersuperficie de energía potencial de estos sistemas, lo cual se debe a la elevada flexibilidad conformacional de estas cadenas, y a la existencia de múltiples mínimos locales muy cercanos en energía. A manera de resumen podemos decir que la nueva variante de la metodología MMH desarrollada en nuestro laboratorio para el estudio conformacional y aplicada por vez primera en esta tesis nos permitió obtener una superficie de energía potencial muy similar a la reportada por los estudios de dinámica molecular en cuanto a las geometrías y a las características energéticas de la misma. Lo anterior nos permite validar la metodología MMH para la realización de búsquedas

conformacionales en sistemas de elevada entropía conformacional como las cadenas laterales de estas fitohormonas basados en métodos mecano-cuánticos.

4.1.1. Influencia del sustituyente del C₂₄ en el análisis conformacional.

En este epígrafe se analizan los estudios conformacionales realizados a los demás modelos de cadenas laterales de los BRS naturales pertenecientes al Grupo I (Figura 3.1 a-e), cuya única diferencia con respecto al modelo BR_m se encuentra en el sustituyente del C₂₄ y en la estereoquímica del mismo. Los resultados obtenidos son muy similares al caso del modelo BR_m y se presentan en el *Anexo 2*. De las Tablas A2.1-A2.5 se puede observar que las conformaciones más estables en todos estos modelos: epiBR_m, norBR_m, DL_m y homoBR_m son muy similares a la estructura de RX (sólo en el caso de la epiBR_m), ó a las de partida (DL_m, norBR_m y homBR_m) obtenidas a un mayor nivel de cálculo. Como en el caso de la BR_m y a excepción de la epiBR_m, los confórmeros más estables de cada uno de estos modelos tienen la cadena lateral inclinada hacia la cara β del esteroide, y los menos estables poseen una inclinación muy marcada hacia la cara β o la α . Como se observa en las Tablas A2.2-A2.5 y en las Figuras A2.1-A2.4 del *Anexo 2* los confórmeros que presentan las cadenas laterales muy inclinadas hacia alguna de las dos caras de la molécula, (epiBR_m 141, norBR_m 8, norBR_m 93 y norBR_m 103), muestran los ángulos diedros C₁₃-C₁₇-C₂₀-C₂₂ y C₁₇-C₂₀-C₂₂-C₂₃ con valores muy diferentes de 180°.

Las conformaciones más estables de la epiBR_m prefieren una cadena lateral más extendida, mostrando la familia F2 (diedro C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄ entre 140°-170°) una mayor población mediante el cálculo con los dos funcionales utilizados. El confórmero más estable, epiBR_m115 pertenece a la F2, la cual presenta una población de 70.8% según la optimización M05-2X/6-31G. La F1 contribuye en un 29.2% a la función de partición total del sistema.

En los demás modelos, norBR_m, DL_m, y homoBR_m, la F1 es la más estable. También es de resaltar que en el caso de la norBR_m aparecen confórmeros de baja estabilidad donde el ángulo C₁₇-C₂₀-C₂₁-C₂₂ adopta aproximadamente valores de 50° en lugar de 180°. El ángulo C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅ casi siempre adopta valores cercanos a 180° debido a que en este caso no existe sustituyente en el C₂₄, a diferencia de los demás modelos donde el mismo aparece en algunos casos. Para la homoBR_m después de realizados los cálculos de energía, sólo quedaron dos estructuras con energía menor de 16.7 kJ/mol, las cuales al ser optimizadas a nivel M05-2X/6-31G convergieron a geometrías muy similares y pertenecientes a la F1.

La preferencia por la F2 en el caso de la epiBR_m con respecto a los demás modelos puede deberse a la estereoquímica diferente del C₂₄ (Figura 3.1 b). La BR_m, homBR_m y DL_m poseen el C₂₄ con configuración S, mientras que la epiBR_m tiene configuración R y en la norBR_m este centro no es quiral. Las mayores diferencias en las geometrías AM1 con respecto a las optimizaciones realizadas por DFT se obtienen para los ángulos diedros C₂₀-C₂₂-C₂₃-C₂₄ y C₂₂-C₂₃-C₂₄-C₂₅, los cuales exhiben en casi todos los casos una diferencia de 15° a 30° con respecto a los optimizados a nivel DFT.

A manera de resumen podemos plantear que las cadenas laterales de estos sistemas poseen una elevada libertad conformacional, con diferencias energéticas entre los conformeros muy pequeñas. Esto podría favorecer la interacción entre el brasinoesteroide y un posible receptor, debido al bajo costo energético requerido para pasar de cualquier conformación a la conformación activa del brasinoesteroide. Esta característica podría ser evaluada en términos del favorecimiento de las interacciones a partir de una entropía conformacional importante del ligando activo libre. Por ello representa un reto para futuros trabajos donde se explore esta característica tan escasamente considerada en la literatura.

4.2. Validación de métodos para la reproducción de geometrías de estos sistemas

En el Epígrafe 3.1 se realizó un estudio conformacional de la cadena lateral utilizando el hamiltoniano semiempírico AM1 y los funcionales B3LYP y M05-2X con la base 6-31G. El método AM1 fue escogido inicialmente debido a su amplio uso en la literatura, siendo validado el mismo en diversas aplicaciones de la química computacional y teórica^{77,78}. Con este hamiltoniano fueron optimizadas las conformaciones de partida generadas por la metodología MMH. Posteriormente nos basamos en criterios energéticos mediante el uso de diferentes funcionales de la densidad para obtener el conjunto de conformaciones más estables, dentro de las cuales encontramos conformaciones muy similares a las obtenidas por DRX. Es importante resaltar que la eficiencia y rapidez de la metodología desarrollada en el análisis conformacional de estas moléculas depende de la buena calidad de las geometrías de partida obtenidas a nivel semiempírico. Por esta razón, en este epígrafe se realiza una validación de métodos (semiempíricos y DFT), para reproducir las geometrías experimentales obtenidas por DRX de tres BRS según se explicó anteriormente en el *Epígrafe 2.1.2*. Los BRS son moléculas de más de 80 átomos y la utilización de métodos más precisos encarece en términos de costo computacional la modelación teórica de los mismos. Este análisis nos servirá para validar el uso de diferentes métodos semiempíricos, incluyendo el utilizado durante el estudio conformacional.

También obtendremos la combinación funcional/base óptima para la modelación de estas estructuras.

En el *Anexo 3* se presentan las Tablas A3.1-A3.9 con todas las distancias de enlace, los ángulos de valencia y los ángulos diedros para los tres compuestos. También se muestra la desviación media, MD, de cada método con respecto a la data experimental de RX. La MD se calculó de dos formas diferentes. Primero teniendo en cuenta sólo los parámetros más importantes (MD^a) y segundo, teniéndolos en cuenta a todos (MD^b). A partir de las Tablas A3.1, A3.4 y A3.7 se encontraron ciertas regularidades. El método semiempírico que mejor reproduce las distancias O-H, y C=O es el PDDG/PM3; AM1 reproduce mejor las distancias C-O presentes en la cadena lateral y en el anillo A. También fue encontrado que todos los métodos semiempíricos subestiman las distancias C-O, estando las desviaciones en el rango de 0–0.04 Å por debajo de los valores experimentales.

Los funcionales B3LYP y M05-2X sobrestiman las distancias C-O en un rango de 0 a 0.03 Å con la base 6-31G, mientras que con las bases 6-31G (d,p) y 6-31++G(d,p) las subestiman. Ambos funcionales sobrestiman las distancias –OH en un rango de 0 a 0.05 Å. En general B3LYP y M05-2X reproducen muy bien las distancias de enlace de estos sistemas, dando mejores resultados los funcionales/bases B3LYP/6-31G (d,p) y M05-2X/6-31++G(d,p).

Las Tablas A3.2, A3.5 y A3.8 muestran que los ángulos de valencia de las estructuras cristalinas fueron mejor reproducidos por los métodos AM1 y MNDO, mientras que los funcionales B3LYP y M05-2X dan buenos resultados en cualquiera de sus variantes. De las Tablas A3.3, A3.6 y A3.9 concluimos que los hamiltonianos semiempíricos PDDG/PM3 y AM1 reproducen muy bien los ángulos diedros de las estructuras de RX, dando valores de MD^b menores o iguales a los de B3LYP y M05-2X.

En la Tabla 4.4 se muestran los RMSD resultantes de la superposición de los tres BRS calculados con los diferentes métodos teóricos y las geometrías correspondientes obtenidas por DRX. En todos los casos se obtuvieron valores menores de 1.2 Å, lo cual evidencia una excelente correspondencia entre las estructuras teóricas y las experimentales. La Figura 4.5 muestra la superposición de la estructura de RX de la **BR** (BR-RX) con las obtenidas por los métodos de menor RMSD, PDDG/PM3, AM1, B3LYP/6-31G(d,p) y M05-2X/6-31++G(d,p). Aunque la superposición del sistema rígido (anillos A,B,C,D) obtenida por el método AM1 no fue tan buena como en los otros casos, se observa que la cadena lateral fue muy bien reproducida por este método.

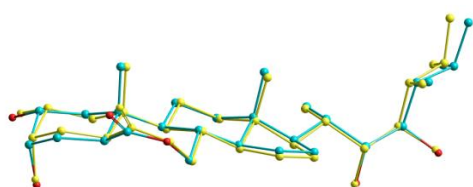
En la Tabla 4.5 se resumen las desviaciones medias absolutas donde se incluyeron todos los valores de las coordenadas internas de las tres moléculas (**BR**, **epiBR** y **diepiBR**). Se puede observar

una buena correspondencia entre los parámetros geométricos calculados con respecto a los parámetros experimentales como lo reflejan los valores de MD.

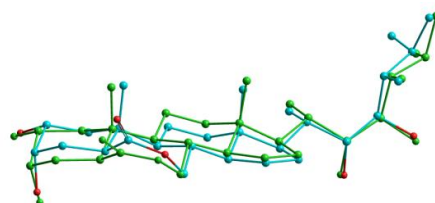
Tabla 4.4- Valores de RMSD obtenidos al comparar los diferentes métodos con la estructura de RX de la **BR**, **epiBR** y **diepiBR**.

| RX – Métodos | Media cuadrática (RMSD) ^a | | |
|------------------------|--------------------------------------|-------|---------|
| | BR | epiBR | diepiBR |
| RX - PM3 | 0.683 | 1.170 | 0.756 |
| RX - AM1 | 0.503 | 0.423 | 0.713 |
| RX - MNDO | 1.142 | 0.306 | 0.784 |
| RX - PDDG/MNDO | 0.973 | 0.360 | 0.689 |
| RX - PDDG/PM3 | 0.307 | 0.837 | 0.815 |
| RX-B3LYP/6-31G | 0.246 | 0.901 | 0.549 |
| RX-B3LYP/6-31G(d,p) | 0.238 | 0.921 | 0.417 |
| RX-M05-2X/6-31G | 0.218 | 0.983 | 1.161 |
| RX-M05-2X/6-31++G(d,p) | 0.212 | 1.007 | 0.366 |

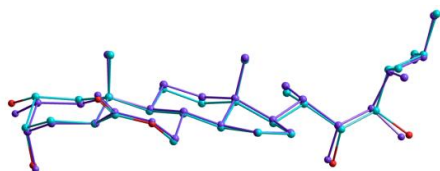
^a todos los valores de RMSD están en Å.



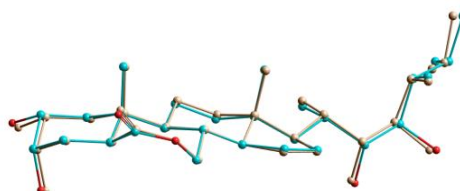
PDDG/PM3(amarilla), RMSD=0.307



AM1 (verde), RMSD=0.503



B3LYP/6-31G(d,p)(violeta), RMSD=0.238



M05-2X/6-31++G(d,p)(Carmelita), RMSD=0.212

Figura 4.5 - Estructura de la **BR** superpuesta con la estructura obtenida por DRX (color Azul)

En particular, los hamiltonianos PDDG/PM3 y AM1 muestran los mejores resultados y las mayores coincidencias con las estructuras obtenidas por DRX. Esto se debe particularmente a que los ángulos diedros son muy bien reproducidos. Esta propiedad es particularmente sensible a las asociaciones moleculares debido a que muestra el máximo de grados de libertad cuando las barreras energéticas de torsión de estos enlaces son bajas. Los funcionales B3LYP y M05-2X dan también resultados muy buenos, sobre todo en distancias de enlace y ángulos de valencia.

En general, los métodos semiempíricos reproducen adecuadamente los valores de los parámetros geo-métricos desde el punto de vista cualitativo, estando las diferencias dentro del error de cada método⁴⁹.

Las estructuras obtenidas por DRX y RMN de la **BR**, **epiBR**, y **diepiBR** exhiben enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos dioles de la cadena lateral y el anillo A^{19,34}. El método semiempírico MNDO no predice estos enlaces de hidrógeno, lo cual como se conoce, constituye una de las principales limitaciones de este hamiltoniano⁴⁹. Sin embargo, los métodos semiempíricos PM3, AM1, PDDG/PM3, y los funcionales B3LYP y M05-2X reproducen muy bien los mismos. Es bien conocido que el método PM3 contiene el artefacto numérico de estabilizar interacciones H-H a distancias cortas, menores de 1.80 Å⁷⁹, que no tienen significado físico alguno. El hamiltoniano semiempírico AM1 sin embargo, no presenta ese comportamiento.

Podemos concluir de este análisis que los hamiltonianos semiempíricos PDDG/PM3 y AM1 en nuestro caso representan una alternativa viable para realizar cálculos teóricos de la estructura molecular de los BRS y proveen una herramienta muy útil para obtener modelos moleculares que describan adecuadamente el enlace teniendo en cuenta el intercambio electrónico. Lo anterior está basado en el hecho de que las principales distancias de enlaces, ángulos de valencia y diedros fueron muy bien reproducidos por los mismos.

Es importante resaltar que aunque el método AM1 no obtuvo estabilidades relativas de los conformeros similares a los cálculos DFT, constituye uno de los hamiltonianos semiempíricos que mejor reprodujo las geometrías experimentales, validando de esta forma su uso en el estudio conformacional realizado anteriormente. Aunque el método PDDG/PM3 mostró ser una buena opción para la reproducción de estas geometrías, es un método relativamente nuevo, y no existen muchas referencias que muestren su desempeño. Como era de esperar, los funcionales B3LYP y M05-2X reproducen adecuadamente estas geometrías. De este análisis resultó conveniente trabajar con el hamiltoniano semiempírico AM1 para obtener muchas de las geometrías de esta tesis.

Tabla 4.5 Desviación media absoluta (MD) para la predicción de las diferentes coordenadas internas incluyendo todos los valores de las mismas.

| | BRS | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | B3LYP/ /6-31G | B3LYP/ 6-31G(d,p) | M05-2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) |
|---------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-----------|----------|------------------|----------------------|------------------|-------------------------|
| Distancias de enlace (Å) | BR | 0.021 | 0.026 | 0.017 | 0.020 | 0.020 | 0.017 | 0.015 | 0.021 | 0.020 |
| | epiBR | 0.012 | 0.013 | 0.027 | 0.027 | 0.013 | 0.019 | 0.012 | 0.012 | 0.009 |
| | diepiBR | 0.021 | 0.028 | 0.017 | 0.020 | 0.022 | 0.016 | 0.014 | 0.002 | 0.009 |
| Angulos de valencia (grados) | BR | 2.3 | 1.7 | 1.9 | 2.6 | 2.2 | 1.2 | 1.3 | 1.3 | 1.2 |
| | epiBR | 2.1 | 1.7 | 1.8 | 2.0 | 2.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.2 |
| | diepiBR | 2.6 | 2.4 | 1.9 | 2.3 | 2.6 | 1.6 | 1.5 | 0.9 | 0.9 |
| Angulos diedros (grados) | BR | 5.9 | 6.1 | 23.0 | 10.3 | 4.4 | 5.7 | 6.7 | 6.5 | 5.0 |
| | epiBR | 11.7 | 7.0 | 12.3 | 7.9 | 10.9 | 12.2 | 13.0 | 12.6 | 11.4 |
| | diepiBR | 14.4 | 10.9 | 14.9 | 12.0 | 10.8 | 11.1 | 8.9 | 11.4 | 4.6 |

4.3. Análisis de las interacciones intramoleculares.

En el estudio conformacional desarrollado en el Epígrafe 3.1 se planteó que la estabilización de los conformeros pertenecientes a las familias F1 y F2 se debía a la posible formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en el sistema diol de la cadena lateral. Como se expuso anteriormente en el Epígrafe 1.4.2.1, la existencia de estos enlaces intramoleculares ha sido comprobada mediante estudios IR^{19,34,160} desarrollados en fase sólida (KBr) y en solución (CHCl₃). Los espectros IR fueron realizados a BRS con estereoquímica 2 α ,3 α en el anillo A, y 22R, 23R en la cadena lateral. En las regiones de elevada frecuencia de estos espectros (3700-3100 cm⁻¹) no se encontraron bandas de absorción características de los grupos –OH libres, lo que es un indicio de que tanto en fase sólida como en solución estos grupos están involucrados en interacciones por puente de hidrógeno. Además, estos autores obtuvieron bandas anchas a menores frecuencias, típicas de interacciones intra- e intermoleculares del tipo OH...OH. En este epígrafe analizaremos la posible formación de enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares basándonos en criterios geométricos y topológicos. Estos últimos se tuvieron en cuenta a través de un análisis de la topología de la densidad electrónica utilizando el método AIM a nivel B3LYP/6-31G(d,p).

En la Figura 4.6 se muestran los mapas de la topología de la densidad electrónica del anillo A y la cadena lateral de la **BR**, **epiBR** y **diepiBR**.

El primer criterio de Koch y Popelier para la detección de enlaces por puente de hidrógeno requiere la presencia de un punto crítico de enlace (*bcp*) entre el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor (Epígrafe 1.2.1.1). Como se observa en la Figura 4.6b,d fueron encontrados dos puntos críticos con las topologías (3,-1) y (3,+1) correspondientes a un punto crítico de enlace (*bcp*) y a un punto crítico de anillo (*rcp*) respectivamente. El *bcp* se encontró entre el átomo de hidrógeno y el de oxígeno referente a la interacción intramolecular –O₇₈H₇₉...O₇₆- presente en el sistema diol de la cadena lateral de la **BR** y **epiBR**. El *rcp* se encuentra en estos casos debido a la formación de un anillo de cinco miembros integrado por los átomos: C₂₂, C₂₃, -O₇₈H₇₉ del C₂₃ y el oxígeno unido al C₂₂.

Como se puede observar de la Figura 4.6a,c,e no fueron encontrados los *bcp* para los posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares –O₇₂H₇₃...O₇₀- del anillo A de la **BR**, **epiBR** y **diepiBR**. El sistema diol de la cadena lateral de la **diepiBR** (Figura 4.6 f) tampoco mostró el *bcp* esperado entre el átomo de hidrógeno y el de oxígeno correspondiente.

Las topologías de las interacciones obtenidas por AIM se resumen en la Tabla 4.6. La $\rho(bcp)$ y el $\nabla^2\rho(bcp)$ corresponden a los enlaces intramoleculares del sistema diol de la cadena lateral de la **BR** y la **epiBR**.

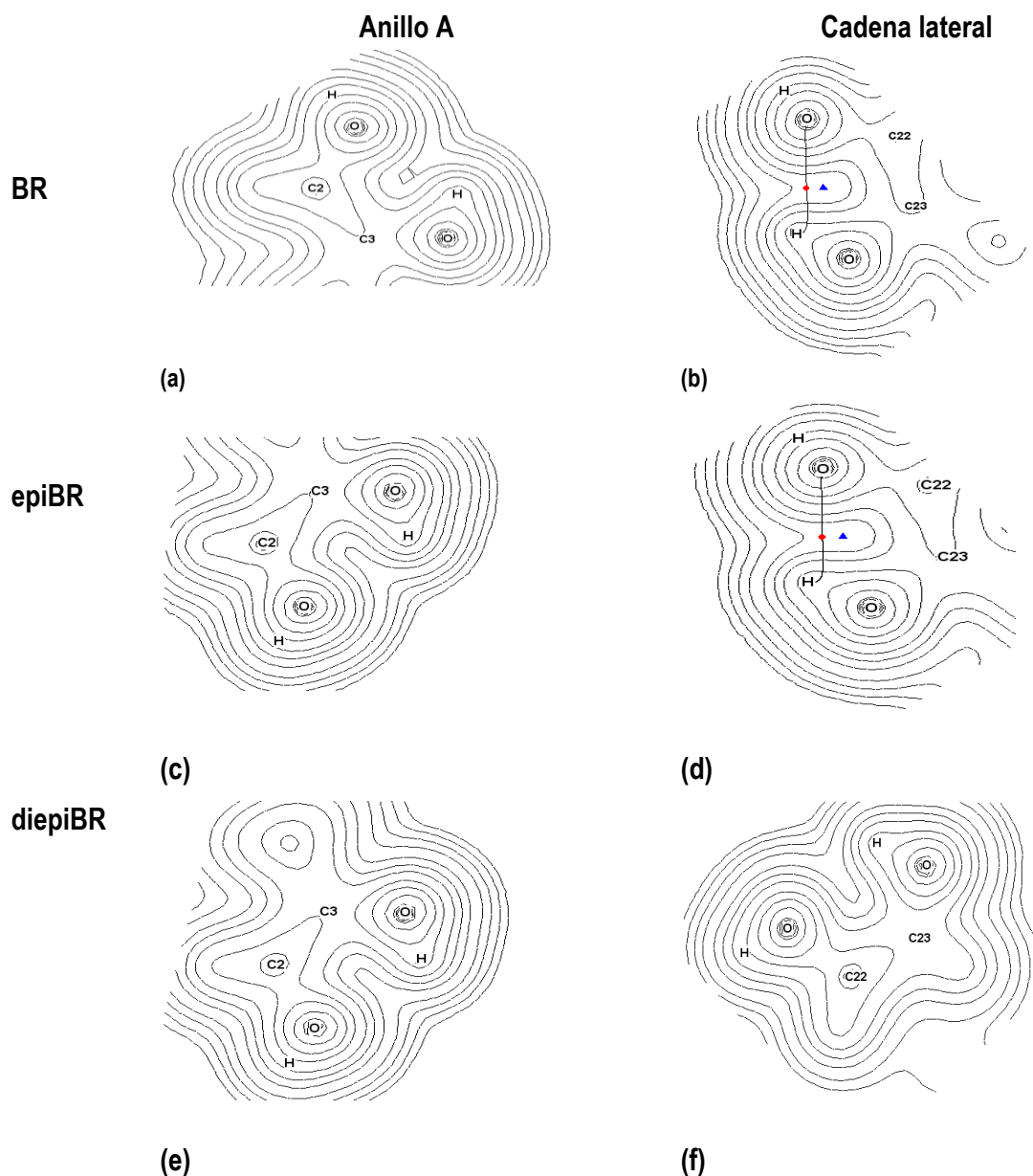


Figura 4.6 - Mapa de contorno de la densidad electrónica de **BR**, **epiBR** y **diepiBR** calculados al nivel B3LYP/6-31G(d,p): a,c,e) Diol de Anillo A en el plano formado por el grupo -OH del C₃ y el átomo de oxígeno del grupo -OH en el C₂. b,d,f) Diol de cadena lateral en el plano formado por el grupo -OH del C₂₃ y el átomo de oxígeno del grupo -OH en el C₂₂. Los *bcp* están marcados con un círculo rojo, los *rcp* con un triángulo azul. La línea es el camino de enlace que une el hidrógeno con el átomo aceptor.

Además se muestran los parámetros geométricos siguientes: $d_{O...H}$ en (Å), que representa la distancia entre el átomo donador y el átomo aceptor, el ángulo θ definido por O-H...O (°) y la distancia

entre el *bcp* y el *rcp* ($d_{bcp-rcp}$ (Å)) para todas las posibles interacciones intramoleculares de **BR**, **epiBR** y **diepiBR**. El parámetro $d_{bcp-rcp}$ nos indica la cercanía a la que se encuentran los dos puntos críticos.

Tabla 4.6- Parámetros geométricos: distancia $d_{O...H}$ (Å); ángulo θ , $O-H...O$ (°); $d_{rcp-bcp}$ (Å) y análisis topológico de los puntos críticos de enlace (*bcp*) de topología (3, - 1) para los enlaces de hidrógeno intramoleculares de **BR**, **epiBR** y **diepiBR**.

| BRS | diol | Interacción | $d_{O...H}$ | θ | $\rho(bcp)$ | $\nabla^2\rho(bcp)$ | $d_{rcp-bcp}$ |
|----------------|----------------|---|-------------|----------|-------------|---------------------|---------------|
| BR | Anillo A | -O ₇₂ H ₇₃ ...O ₇₀ | 2.228 | 111.6 | - | - | - |
| | Cadena lateral | - O ₇₈ H ₇₉ ...O ₇₆ | 2.123 | 114.8 | 0.0216 | 0.0808 | 0.49 |
| epiBR | Anillo A | -O ₇₂ H ₇₃ ...O ₇₀ | 2.235 | 111.4 | - | - | - |
| | Cadena lateral | - O ₇₈ H ₇₉ ...O ₇₆ | 2.113 | 114.9 | 0.0219 | 0.0819 | 0.52 |
| diepiBR | AnilloA | -O ₇₂ H ₇₃ ...O ₇₀ | 2.227 | 111.6 | - | - | - |
| | Cadena lateral | - O ₇₈ H ₇₉ ...O ₇₆ | 2.238 | 109.9 | - | - | - |

Como se observa las densidades electrónicas son pequeñas y el laplaciano $\nabla^2\rho(bcp)$ es positivo, estando ambos en el rango dado anteriormente por Koch y Popelier para interacciones débiles que en este caso son enlaces por puente de hidrógeno (Epígrafe 1.2.1.1).

Según los criterios geométricos dados por Desiraju y Steiner¹⁰⁶ (Epígrafe 1.2.1.1) y analizando la Tabla 4.6 tanto las $d_{O...H}$ como los ángulos θ de todas estas interacciones son típicas de enlaces por puente de hidrógeno. Sin embargo, según el método AIM no se encontraron los *bcp* específicos para las interacciones intramoleculares del anillo A de la **BR**, **epiBR** y **diepiBR**, ni de la cadena lateral de la **diepiBR**. La falta de los caminos de enlace esperados entre los átomos de hidrógeno y oxígeno de los sistemas dioles en anillo A y cadena lateral no necesariamente indica la ausencia de estas interacciones intramoleculares. En estos casos puede ocurrir que el sistema se encuentre en una geometría particular, para la cual el *bcp* está tan cercano del *rcp* que se produce una auto-aniquilación de ambos. Esta auto-aniquilación trae como consecuencia la desaparición del camino de enlace que une los átomos involucrados en la interacción molecular. Este fenómeno ha sido explicado anteriormente en la literatura^{111,112,184} al utilizar la teoría AIM para analizar la presencia de interacciones moleculares. En nuestro caso para analizar el comportamiento de la densidad electrónica y ver la evolución de los puntos críticos se fueron variando las distancias $d_{O...H}$ (Å) del sistema

diol intramolecular del anillo A de la **BR**. En la Tabla 4.7 se muestran las variaciones en las $d_{O...H}$ (Å), el valor del ángulo θ (°), y la distancias entre el bcp y el rcp ($d_{bcp-rcp}$ (Å)) referentes al análisis anterior.

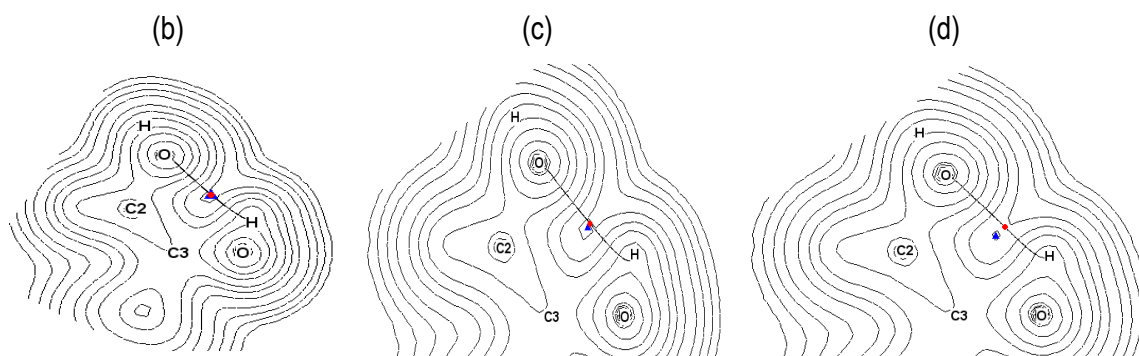
En la Figura 4.7b se observa claramente la cercanía entre los puntos críticos bcp y rcp , los cuales se encuentran a una distancia de 0.04 Å. Este comportamiento anterior se obtuvo para una variación de 0.04 Å en las distancias de enlace $d_{O...H}$ y de 4.5° para el ángulo θ con respecto a la geometría de partida (Figura 4.6 a)..

Tabla 4.7-Distancia entre el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor ($d_{O...H}$ (Å), ángulo θ , O-H...O (°) y $d_{rcp-bcp}$ (Å) del sistema diol del anillo A la **BR**.

| | $d_{O...H}$ | θ | $d_{rcp-bcp}$ |
|------------------------|-------------|----------|---------------|
| Fig.3.6 ^a | 2.228 | 111.6 | - |
| | 2.200 | 114.8 | - |
| | 2.190 | 116.1 | - |
| Fig. 3.7b ^b | 2.187 | 116.1 | 0.04 |
| | 2.185 | 116.3 | 0.08 |
| Fig. 3.7c ^b | 2.180 | 116.6 | 0.14 |
| | 2.160 | 117.1 | 0.26 |
| | 2.140 | 118.2 | 0.34 |
| Fig. 3.7d ^b | 2.120 | 119.2 | 0.40 |

^aparámetros correspondientes a la Figura 4.6 a.

^bparámetros correspondientes a las Figuras 4.7 b,c,d.



Diol del Anillo A de la **BR**

Figura 4.7 - Mapa de contorno de la densidad electrónica del sistema diol del anillo A de la **BR** correspondientes a las variantes b,c,d de la Tabla 4.7. Plano formado por el grupo -OH del C₃ y el átomo de oxígeno del grupo -OH en el C₂. Los bcp están marcados con un círculo rojo, los rcp con

un triángulo azul. La línea es el camino de enlace que une el hidrógeno con el átomo aceptor. Esto demuestra cómo pequeñas variaciones de la distancia producen una separación de los puntos críticos de anillo y de enlace, apareciendo de esta forma el camino de enlace que prueba la existencia de estas interacciones intramoleculares

El mismo comportamiento fue obtenido en los demás casos, lo cual demuestra cómo con pequeñas variaciones de la geometría producto de vibraciones moleculares se puede producir la separación de los puntos críticos bcp y rcp, tal como se observó en la Tabla 4.7.

A manera de resumen podemos decir que se comprobó la existencia de enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares entre los sistemas dioles del anillo A y la cadena lateral de estas fitohormonas mediante el uso de criterios geométricos y topológicos.

4.4. Conclusiones parciales del estudio de los BRS aislados.

En este trabajo hemos empleado por primera vez la metodología MMH para estudiar la variabilidad conformacional que presentan las cadenas laterales de los BRS. El uso de métodos mecano-cuánticos para el estudio de las conformaciones preferenciales constituye uno de los aportes más importantes en la modelación teórica de estos sistemas aislados. Además, se desarrolla una metodología de trabajo que vincula métodos semiempíricos con funcionales de la densidad para el estudio de estas moléculas y caracterización de sus interacciones moleculares nunca antes realizada.

Las diferencias energéticas encontradas mediante el estudio conformacional son muy pequeñas, lo que es una indicación de la elevada flexibilidad conformacional que presentan estas cadenas laterales. Aún así, se observó un aumento de la estabilidad a medida que las mismas se orientan ligeramente hacia la cara β del esteroide.

Se obtuvieron resultados comparables con las dinámicas moleculares realizadas en los mismos sistemas³², lo cual permite validar el estudio conformacional realizado a través de la metodología MMH. Aunque el hamiltoniano semiempírico AM1 no da buenos resultados en cuanto al orden de estabilidad de los confórmeros, reproduce muy bien las geometrías y puede ser utilizado en combinación con otros métodos, B3LYP y M05-2X, para mejorar sus limitaciones. Se validó el modelo de cadena lateral utilizado para el estudio conformacional desde el punto de vista energético. Se comprobó, además, la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en los sistemas dioles del anillo A y la cadena lateral de estos esteroides a través de criterios geométricos y topológicos.

4.5. Estudio de las interacciones de los brasinoesteroides

En este epígrafe se describen modelos teóricos que consideramos bastante confiables de la interacción de los BRS con diferentes moléculas presentes en el medio biológico con el objetivo de brindar mayor información desde el punto de vista teórico acerca de cómo puede ocurrir la interacción de estas fitohormonas con el receptor en la planta. Primero se estudiarán las interacciones del modelo de la cadena lateral de la brasinólida, BR_m , con diferentes grupos funcionales presentes en moléculas de interés biológico. Posteriormente se realizará una modelación de la solvatación de los BRS del Grupo II (Figura 3.1 a,h,i), y por último un estudio de las interacciones de la **BR** con los 20 aa proteinogénicos.

4.5.1. Estudio conformacional del modelo de la cadena lateral de la brasinólida formando complejos moleculares con moléculas pequeñas.

Este estudio fue realizado empleando la *variante dos* de la metodología MMH para la búsqueda conformacional ya descrita anteriormente. En la Tabla 4.8 se muestran los ángulos diedros de los complejos de mínima energía, BR_m -moléculas, y en la Figura 4.8 se observan sus geometrías. Los complejos más estables formados entre la BR_m y las moléculas utilizadas pertenecen a la F1, que había sido definida en el caso del estudio conformacional de las moléculas aisladas para el ángulo diedro: $C_{20}-C_{22}-C_{23}-C_{24}$ en el rango de $50^\circ - 80^\circ$. Es importante destacar que de todas las conformaciones analizadas, los complejos se estabilizan siempre que la cadena lateral se encuentre en una conformación similar a la de la estructura cristalina en estado sólido (RX). Los ángulos $C_{22}-C_{23}-C_{24}-C_{25}$ y $C_{23}-C_{24}-C_{25}-H_{25}$ pueden adoptar diferentes conformaciones, aumentando los grados de libertad a medida que nos alejamos del sistema rígido (un anillo como el del ciclopentano).

El ángulo diedro $C_{20}-C_{22}-C_{23}-C_{24}$ puede cambiar hasta 25° respecto al modelo más estable aislado (BR_m aislado). Como se observa de la Tabla 4.8 las interacciones con H_2O , C_6H_5OH , C_8H_6NH y $HCONH_2$ son las que más afectan la geometría de la BR_m aislada. Las interacciones con C_6H_6 y H_2S prácticamente no perturban la geometría original de la BR_m . La interacción con las moléculas cargadas, NH_4^+ y CH_3COO^- hace que el ángulo $C_{20}-C_{22}-C_{23}-C_{24}$ se aproxime mucho más al valor que tiene en la estructura de RX, adoptando las menores desviaciones con respecto al mismo (1.07° y 5.18° respectivamente).

Tabla 4.8- Angulos diedros de las configuraciones de mínima energía de **BR_m**-moléculas según M05-2X/6-31++G(d,p)

| Complejo | C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ | C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ | C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -H ₂₅ |
|---|--|--|--|--|--|
| BR-RX^a | 176.0 | -172.1 | 48.1 | -179.8 | -61.1 |
| BR_m^b | 175.2 | -178.8 | 56.3 | -175.9 | 33.8 |
| F1 | | | | | |
| BR _m -H ₂ O | 178.6 | -162.5 | 81.3 | -153.6 | -45.9 |
| BR _m -NH ₄ ⁺ | 175.0 | -179.3 | 49.2 | -160.8 | 60.3 |
| BR _m -HCONH ₂ | 177.9 | -178.6 | 69.1 | -154.5 | -172.9 |
| BR _m -H ₂ S | 175.2 | 178.9 | 57.3 | 178.7 | -78.1 |
| BR _m -CH ₃ COO ⁻ | 177.3 | -178.4 | 53.3 | 177.7 | -76.6 |
| BR _m -C ₆ H ₅ OH | 178.7 | -163.1 | 80.2 | -154.8 | 171.4 |
| BR _m -C ₈ H ₆ NH | -174.2 | -153.3 | 80.1 | -148.2 | 58.1 |
| BR _m -C ₆ H ₆ | 175.8 | 178.7 | 57.5 | -172.6 | 36.4 |

^arepresenta la geometría cristalina en estado sólido (RX)

^brepresenta la geometría más estable optimizada a nivel M05-2X/6-31++G(d,p).

En la Tabla 4.9 se muestran tres valores de energía. Las dos primeras se refieren a la energía de interacción (ΔE) y la energía de interacción corregida del BSSE (ΔE_{BSSE}) de los diferentes complejos BR_m-moléculas. Posteriormente se construyó la estructura de la **BR** a partir de los complejos de mínima energía encontrados para cada tipo de interacción. Se calculó nuevamente la ΔE para comprobar la validez del modelo en el estudio de las interacciones moleculares y la existencia de diferencias en cuanto a las estabilidades de los distintos complejos. Este constituye el tercer valor de energía presentado en la Tabla 4.9 y se denominó ΔE_{BR}

Como podía esperarse, los complejos más estables son aquellos formados entre la BR_m y las moléculas cargadas, NH₄⁺ y CH₃COO⁻. El orden decreciente de estabilidades obtenida según los valores de ΔE fue: **BR_m-NH₄⁺**, **BR_m-CH₃COO⁻**, **BR_m-HCONH₂**, **BR_m-C₆H₅OH**, **BR_m-H₂O**, **BR_m-C₈H₆NH**, **BR_m-H₂S** y **BR_m-C₆H₆**. En la Figura 4.8 se observa que los complejos más estables formados con NH₄⁺, CH₃COO⁻, HCONH₂, H₂O y C₆H₅OH involucran interacciones a distancias menores de 2.0 Å, lo cual explica la elevada estabilización de estos complejos respecto a los formados con C₈H₆NH, C₆H₆ y H₂S. Para estos últimos complejos las distancias intermoleculares se encuentran en el rango de 2.1-3.0 Å.

Se observa como la componente electrostática estabiliza en estos casos los complejos cargados, siendo responsable de las significativas energías de interacción de los mismos. Las interacciones polares son las más importantes. Sin embargo, también se estabilizan los complejos con moléculas aromáticas como C₈H₆NH y C₆H₆.

Tabla 4.9-Energías de interacción (ΔE^a , kJ/mol) y corregida del BSSE (ΔE_{BSSE}^b , kJ/mol) de los complejos BR_m-moléculas. Energía de interacción (ΔE_{BR}^c , kJ/mol) de los complejos brasinólida (BR)-moléculas.

| BR _m ⁻ moléculas | BR _m ⁻ H ₂ O | BR _m ⁻ NH ₄ ⁺ | BR _m ⁻ HCONH ₂ | BR _m ⁻ H ₂ S | BR _m ⁻ CH ₃ COO ⁻ | BR _m ⁻ C ₆ H ₅ OH | BR _m ⁻ C ₈ H ₆ NH | BR _m ⁻ C ₆ H ₆ |
|---|--|--|--|--|--|--|--|---|
| ΔE | -43.4 | -149.7 | -54.9 | -23.9 | -142.6 | -44.3 | -39.6 | -16.2 |
| ΔE_{BSSE} | -37.7 | -146.4 | -50.7 | -20.5 | -137.8 | -38.9 | -33.4 | -13.5 |
| BR- moléculas | BR- H ₂ O | BR- NH ₄ ⁺ | BR- HCONH ₂ | BR- H ₂ S | BR- CH ₃ COO ⁻ | BR- C ₆ H ₅ OH | BR- C ₈ H ₆ NH | BR- C ₆ H ₆ |
| ΔE_{BR} | -55.2 | -154.6 | -66.7 | -35.1 | -172.0 | -58.9 | -54.8 | -26.9 |

^a ΔE - Energía de estabilización calculada según : $\Delta E = E_{(BR_m-molécula)} - E_{(BR_m)} - E_{(molécula)}$

^b ΔE_{BSSE} - Energía de estabilización corregida del BSSE con la geometría no corregida calculada según:

$$\Delta E_{BSSE} = \Delta E + BSSE$$

^c ΔE_{BR} -Energía de estabilización sin corregir el BSSE calculada según:

$$\Delta E_{BR} = E_{(BR-molécula)} - E_{(BR)} - E_{(molécula)}$$

^{a,b,c} - Calculadas a nivel de teoría : M05-2X/6-31++G(d,p).

El orden de estabildades dado por ΔE_{BR} es muy similar al obtenido con los modelos, siendo los complejos cargados los más favorecidos, y los de menor estabilidad: **BR**-C₈H₆NH, **BR**-H₂S y **BR**-C₆H₆. Este orden de asociación difiere solamente de ΔE en las estabildades relativas de los complejos formados con las moléculas cargadas. Según el orden de estabildades dado por ΔE , los complejos BR_m-NH₄⁺ y BR_m-CH₃COO⁻ poseen estabildades similares, siendo el primero alrededor de 7.1 kJ/mol más estable que el segundo. Esta diferencia de estabildades está en el orden del error del método, M05-2X/6-31++G(d,p), que es aproximadamente 8.4 kJ/mol⁴⁸. A diferencia del caso anterior, cuando se tiene en cuenta la molécula entera, el complejo formado con CH₃COO⁻ es 17.4 kJ/mol más estable que el complejo **BR**-NH₄⁺.

Como se puede observar en la Tabla 4.9 las energías ΔE_{BR} son siempre mayores en valor absoluto que las ΔE de los complejos BR_m-moléculas, esto se debe a que en el caso en el que se extiende el

modelo a la molécula **BR** se están teniendo en cuenta más átomos, y por lo tanto aumentan las fuerzas dispersivas, brindándole una mayor estabilización al sistema con respecto a los complejos donde interactúa solamente la cadena lateral con las diferentes moléculas. Las fuerzas dispersivas siempre están presentes y su efecto estabilizador en nuestro caso, al menos, aumenta a medida que el tamaño del sistema sea mayor.

Al corregir el BSSE, que se refleja en ΔE_{BSSE} , se obtiene la misma tendencia que la obtenida según los valores de ΔE . Como es esperado los complejos se hacen menos estables al ser corregido el ΔE del BSSE, debido a que este error, producido por la diferencia entre las bases utilizadas para describir el complejo y el monómero brinda una estabilización ficticia a los complejos (Epígrafe 1.1.3).

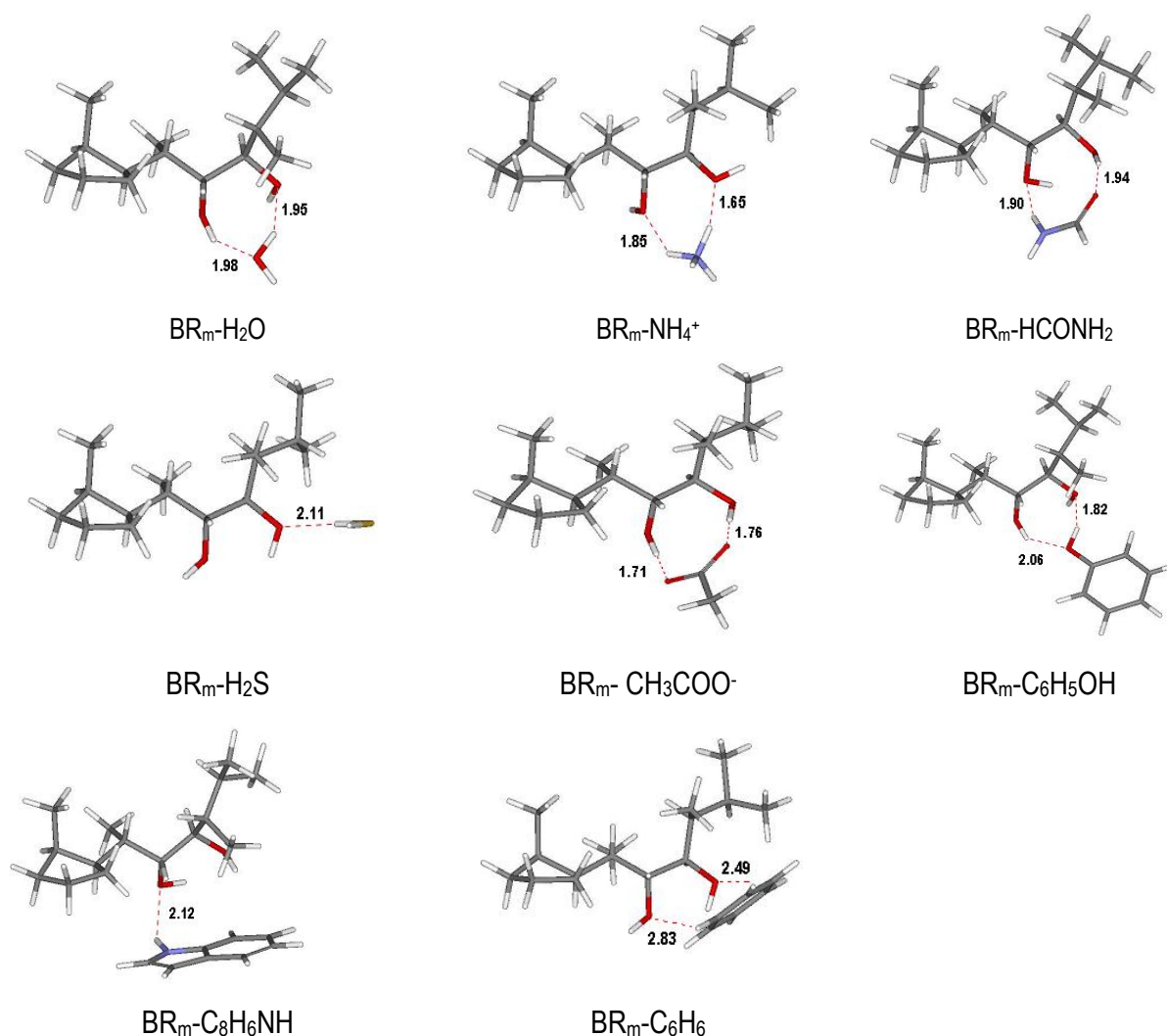


Figura 4.8 – Complejos más estables: BR_m-H₂O, BR_m-NH₄⁺, BR_m-HCONH₂, BR_m-H₂S, BR_m-CH₃COO⁻, BR_m-C₆H₅OH, BR_m-C₈H₆NH y BR_m-C₆H₆ obtenidos a nivel M05-2X/6-31++G(d,p).

4.5.1.1. Análisis AIM de las interacciones intra- e intermoleculares de los complejos BR_m-moléculas.

Con el objetivo de analizar la naturaleza de las interacciones moleculares que aparecen en los sistemas BR_m-moléculas hicimos un análisis AIM utilizando los primeros seis criterios expuestos en el Epígrafe 1.2.1.1. En la Figura 4.8 se observa que todas las interacciones se encuentran en el rango de 1.6 - 3.0 Å, indicando la posible estabilización de estos complejos por interacciones de puente de hidrógeno o de vdW. La Figura 4.9 a-h muestra los mapas de contorno de la densidad electrónica de todos los complejos BR_m-moléculas.

La primera condición se cumple para los ocho complejos, ya que se encuentra siempre un punto crítico de enlace (*bcp*) en el camino de enlace que une al hidrógeno y al átomo aceptor (Figura 4.9 a-h). Las segunda y tercera condiciones se refieren a la densidad electrónica $\rho(bcp)$ y al laplaciano $\nabla^2 \rho(bcp)$ en el *bcp*. La Tabla 4.10 muestra las distancias entre el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor $d_{H...A}$ (Å), los ángulos θ (°) definidos según: -OH...O-, -NH...O-, -SH...O-, -CH...N-, -CH...OC-, -CH...OH para las interacciones intra- e intermoleculares y las características topológicas fundamentales de la densidad electrónica en los puntos críticos de enlace para los complejos BR_m-moléculas. El enlace intramolecular observado en el sistema diol de la cadena lateral de la **BR** se ha denotado con la palabra *intra*, tanto para el sistema aislado como para los complejos donde se mantiene el mismo (BR_m-HCONH₂, BR_m-H₂S, BR_m-C₈H₆NH y BR_m-C₆H₆), Figura 4.9 c,d,g,h.

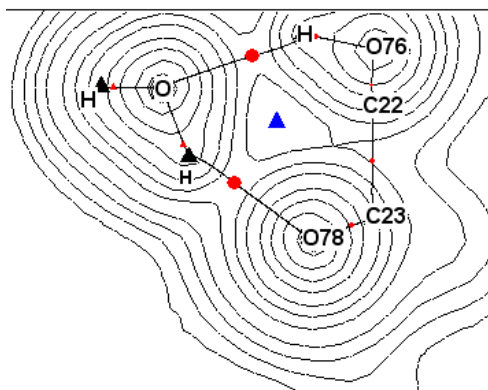
Excepto en el caso de H₃NH...O₇₈H (BR_m-NH₄⁺) y -O₇₆H...OCO (BR_m-CH₃COO⁻) todas las demás interacciones muestran la $\rho(bcp)$ entre 0.002 y 0.04 a.u, siendo típicas de interacciones débiles¹¹². También se puede observar que el $\nabla^2 \rho(bcp)$ es positivo en todos los casos y con la excepción de la interacción H₃NH... O₇₈H (BR_m-NH₄⁺) esta magnitud se encuentra siempre en el rango de 0.024 - 0.139 a.u. Es bien conocido que la $\rho(bcp)$ en los complejos de vdW se encuentra en el orden de 0.004 - 0.009 a.u, mientras que en el caso de los complejos estabilizados por puentes de hidrógeno esta es un orden mayor, o sea 10⁻² a.u¹⁰⁴. Los menores valores de $\rho(bcp)$ fueron encontrados en nuestro caso para las interacciones -CH...A (donde A =N, O y C) en los complejos BR_m-HCONH₂, BR_m-CH₃COO⁻, BR_m-C₈H₆NH y BR_m-C₆H₆ (Figura 4.9 c,e,g,h). La interacción -O₇₈H...C también mostró una baja $\rho(bcp)$ en el complejo BR_m-C₈H₆NH. Según lo planteado por Desiraju y Steiner¹¹⁰, las interacciones del tipo -CH...A, definidas anteriormente, se pueden considerar como débiles, de-

bido a que los valores de $d_{H...A}$ y θ , se encuentran en el rango planteado para interacciones de tipo vdW, Tabla 4.10 y Epígrafe 2.2.1.1.

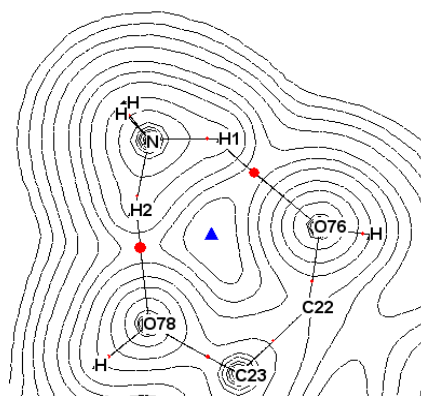
Tabla 4.10-Parámetros geométricos: distancia $d_{H...A}$ (Å) y ángulo θ (°) correspondiente a la interacción $D-H...A$. Análisis topológico de los puntos críticos de enlace (bcp) de topología (3, - 1) para los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares de los complejos BR_m-moléculas a nivel M05-2X/6-31++G(d,p).

| Complejos | Interacción | $D_{H...A}(\text{Å})$ | θ (°) | $\rho(\text{bcp})$ | $\nabla^2\rho(\text{bcp})$ | $ \lambda_1 /\lambda_3$ | $G(\text{bcp})$ | $-V(\text{bcp})$ | $\left[\frac{ V(\text{bcp}) }{G(\text{bcp})}\right]$ |
|---|--|-----------------------|--------------|--------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|--|
| BR _m -H ₂ O | -O ₇₆ H ₇₇ ...OH ₂ | 1.98 | 144.79 | 0.0227 | 0.0742 | 0.2143 | 0.0188 | 0.0190 | 1.0106 |
| | HOH ₍₁₎ ... O ₇₈ H | 1.95 | 145.45 | 0.0266 | 0.0788 | 0.2359 | 0.0207 | 0.0217 | 1.0483 |
| BR _m -NH ₄ ⁺ | H ₃ NH ₍₁₎ ... O ₇₆ H | 1.85 | 135.39 | 0.0319 | 0.1058 | 0.2352 | 0.0263 | 0.0262 | 0.9962 |
| | H ₃ NH ₍₂₎ ... O ₇₈ H | 1.65 | 162.38 | 0.0502 | 0.1471 | 0.2790 | 0.0387 | 0.0407 | 1.0517 |
| BR _m -H ₂ S | HS... O ₇₈ H | 2.11 | 172.96 | 0.0186 | 0.0509 | 0.2301 | 0.0142 | 0.0141 | 0.9929 |
| | -intraO ₇₈ H ₇₉ ...O ₇₆ H | 2.15 | 112.39 | 0.0200 | 0.0874 | 0.181 | 0.0202 | 0.0185 | 0.916 |
| BR _m -HCONH ₂ | -NH ₍₁₎ ...O ₇₆ H | 1.90 | 164.84 | 0.0288 | 0.0848 | 0.2399 | 0.0218 | 0.0223 | 1.0229 |
| | -O ₇₈ H ₇₉ ...O=C | 1.94 | 163.83 | 0.0241 | 0.0768 | 0.2211 | 0.0191 | 0.0189 | 0.9895 |
| | -C ₁₆ H ₁₆ ...N- | 2.87 | 155.64 | 0.0054 | 0.0164 | 0.1773 | 0.0035 | 0.0029 | 0.8286 |
| | -C ₂₂ H ₂₂ ...O=C | 2.76 | 118.92 | 0.0070 | 0.0237 | 0.1580 | 0.0051 | 0.0043 | 0.8431 |
| | -intraO ₇₆ H ₇₇ ...O ₇₈ H | 1.99 | 120.29 | 0.0273 | 0.0979 | 0.2097 | 0.0247 | 0.0249 | 1.0081 |
| BR _m -CH ₃ COO ⁻ | -O ₇₈ H ₇₉ ...OCO | 1.75 | 174.50 | 0.0378 | 0.1177 | 0.2456 | 0.0290 | 0.0286 | 0.9862 |
| | -O ₇₆ H ₇₇ ...OCO | 1.71 | 165.35 | 0.0434 | 0.1287 | 0.2623 | 0.0330 | 0.0338 | 1.0242 |
| | -C ₂₂ H ₂₂ ...OCO | 2.55 | 124.55 | 0.0104 | 0.0339 | 0.1730 | 0.0078 | 0.0071 | 0.9103 |
| | -C ₁₆ H ₁₆ ... OCO | 2.62 | 154.75 | 0.0073 | 0.0247 | 0.1771 | 0.0054 | 0.0047 | 0.8704 |
| BR _m -C ₆ H ₅ OH | -OH _{fenol} ...O ₇₈ H | 1.82 | 154.96 | 0.0343 | 0.1047 | 0.2430 | 0.0266 | 0.0269 | 1.015 |
| | -O ₇₆ H ₇₇ ... OH _{fenol} | 2.08 | 139.29 | 0.0176 | 0.0621 | 0.1924 | 0.0152 | 0.0149 | 0.9803 |
| BR _m -C ₆ H ₆ | -CH _{orto} ...O ₇₆ H | 2.83 | 152.43 | 0.0044 | 0.0174 | 0.1449 | 0.0035 | 0.0026 | 0.7429 |
| | -CH _{para} ...O ₇₈ H | 2.49 | 137.47 | 0.0102 | 0.0325 | 0.1909 | 0.0077 | 0.0072 | 0.9351 |
| | -intraO ₇₈ H ₇₉ ...O ₇₆ H | 2.14 | 113.66 | 0.0205 | 0.0865 | 0.1844 | 0.0203 | 0.0189 | 0.9310 |
| BR _m -C ₈ H ₆ NH | -NH... O ₇₆ H | 2.12 | 132.57 | 0.0198 | 0.0607 | 0.2231 | 0.0156 | 0.0161 | 1.0321 |
| | -O ₇₈ H ₇₉ ...CH | 2.46 | 136.59 | 0.0106 | 0.0338 | 0.1839 | 0.0073 | 0.0062 | 0.8493 |
| | -C ₂₂ H ₂₂ ...NH | 2.65 | 116.58 | 0.0089 | 0.0300 | 0.1469 | 0.0066 | 0.0057 | 0.8636 |
| | -C ₁₆ H ₁₆ ...CH | 2.70 | 144.23 | 0.0076 | 0.0227 | 0.1776 | 0.0047 | 0.0037 | 0.7872 |
| | -intraO ₇₆ H ₇₇ ...O ₇₈ H | 1.98 | 121.81 | 0.0277 | 0.0968 | 0.2153 | 0.0247 | 0.0251 | 1.0162 |
| BR _m | -intraO ₇₈ H ₇₉ ...O ₇₆ H | 2.14 | 112.93 | 0.0206 | 0.0872 | 0.1843 | 0.0204 | 0.0189 | 0.9265 |

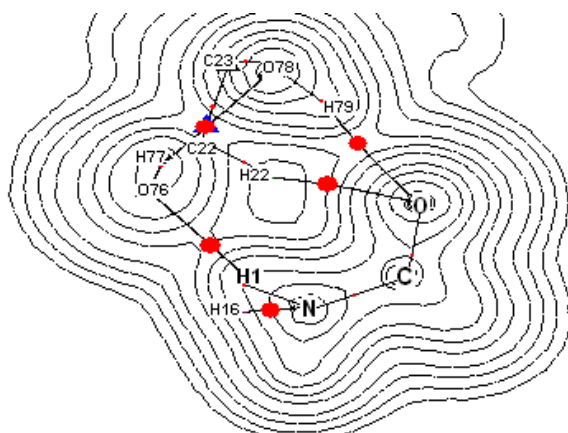
(a) BR_m-H_2O



(b) $BR_m-NH_4^+$



(c) $BR_m-HCONH_2$



(d) BR_m-H_2S

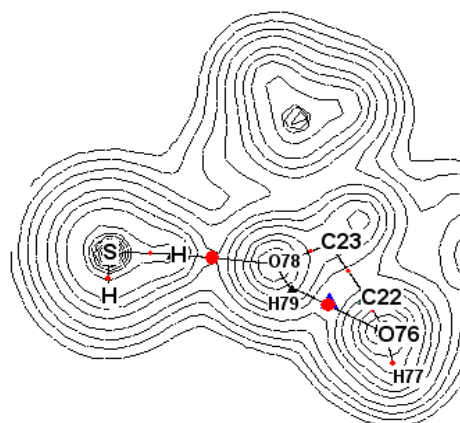


Figura 4.9(a)-(d).-Mapas de contorno de la densidad electrónica de los complejos (a) BR_m-H_2O en el plano formado por átomos de oxígeno O76, O78 y O_{agua}, (b) $BR_m-NH_4^+$ en el plano formado por O76, O78 y N (c) $BR_m-HCONH_2$ en el plano formado por O76, O78 y O_{formamida} (d) BR_m-H_2S en el plano formado por O76, O78 y S. Las esferas rojas representan los puntos críticos de enlace (*bcp*) intra- e intermoleculares más importantes. Los puntos críticos de anillo (*rcp*) se han denotado con un triángulo azul.

De la Figura 4.9 c,d,g,h se muestra que el enlace de hidrógeno intramolecular se mantuvo para los complejos $BR_m-HCONH_2$, BR_m-H_2S , $BR_m-C_8H_6NH$ y $BR_m-C_6H_6$. En la Tabla 4.10 se puede observar que las características topológicas de la interacción intramolecular $-^{intra}O_{78}H_{79}...O_{76}H$ de los complejos BR_m-H_2S y $BR_m-C_6H_6$ no se modifican con respecto al sistema aislado (BR_m). Lo anterior indica que la interacción con estas dos moléculas, H_2S y C_6H_6 , no afectó prácticamente la geometría del sistema aislado (BR_m), lo cual está de acuerdo con los valores de los ángulos diedros expuestos en la Tabla 4.8 y es una evidencia de las bajas energías de interacción (ΔE y ΔE_{BR}) de estos complejos (Tabla 4.9). Por otro lado, la interacción con $HCONH_2$ y C_8H_6NH (Figura 4.9 c,g) hace que la geometría de este enlace intramolecular cambie, y se produzca en estos casos: $-^{intra}O_{76}H_{77}...O_{78}H$ en lugar de $-^{intra}O_{78}H_{79}...O_{76}H$, esta última existente también en el caso de la molécula aislada. La interacción con estas moléculas incrementa la fortaleza del enlace intramolecular, lo cual se evidencia en el decremento de la distancia $d_{O...H}$, y en el aumento de $\rho(bcp)$ y de $\nabla^2\rho(bcp)$. La magnitud $|V(bcp)|/G(bcp)$ indica el carácter covalente de un enlace en la teoría AIM. En este caso se observa como la interacción con las moléculas $HCONH_2$ y C_8H_6NH aumentan el carácter covalente del enlace intramolecular, ya que la relación anterior toma valores mayores que 1 en los bcp intramoleculares $-^{intra}O_{76}H_{77}...O_{78}H$.

La interacción con H_2O , NH_4^+ , CH_3COO^- y C_6H_5OH modificó la geometría de los $-OH$ pertenecientes al sistema diol de tal forma que no se mantuvo el enlace de hidrógeno intramolecular (Figura 4.9 a,b,e,f). Como se observó anteriormente (Tabla 4.9) estos complejos poseen una elevada estabilidad. En estos casos se puede observar como existe un rcp en el anillo formado entre los $-OH$ pertenecientes al sistema diol y las moléculas H_2O , NH_4^+ , CH_3COO^- y C_6H_5OH . Estos rcp se encuentran alejados de los bcp correspondientes a los enlaces intermoleculares, lo cual le brinda estabilidad al anillo formado en cada caso.

La proporción $|\lambda_1|/\lambda_3$ es mayor que la unidad para interacciones covalentes, y menor que la unidad para no-covalentes. Como se puede observar en la Tabla 4.10 todas las interacciones tienen esta relación menor que 1, o sea en estos casos λ_3 siempre es mayor que $|\lambda_1|$, lo cual constituye una característica importante de las interacciones no-covalentes y significa que existe una disminución marcada de la densidad electrónica en la región internuclear.

Todas las interacciones intermoleculares presentes en el complejo BR_m-H_2O presentan cierto carácter covalente pues muestran la relación $|V(bcp)|/G(bcp)$ mayor que 1, mientras que el complejo $BR_m-C_6H_6$ está estabilizado por interacciones no-covalentes. En los demás complejos coexisten in-

teracciones con carácter covalente y no covalente. Muestra de lo primero son las interacciones: $\text{H}_3\text{NH}_{(2)}\dots\text{O}_{78}\text{H}$ ($\text{BR}_m\text{-NH}_4^+$), $\text{-NH}_{(1)}\dots\text{O}_{76}\text{H}$ ($\text{BR}_m\text{-HCONH}_2$ y $\text{BR}_m\text{-C}_8\text{H}_6\text{NH}$), $\text{-O}_{76}\text{H}_{77}\dots\text{OCO}$ ($\text{BR}_m\text{-CH}_3\text{COO}^-$) y $\text{-OH}_{\text{fenol}}\dots\text{O}_{78}\text{H}$ ($\text{BR}_m\text{-C}_6\text{H}_5\text{OH}$). El resto de las interacciones intermoleculares presentan carácter no covalente.

Como se mostró anteriormente la interacción $\text{H}_3\text{NH}\dots\text{O}_{78}\text{H}$ del complejo $\text{BR}_m\text{-NH}_4^+$ no cumple con los dos primeros criterios establecidos por Koch y Popelier. Además, el cociente entre las densidades de energía potencial y cinética se encuentra en el rango: $1 < |V(bcp)|/G(bcp) < 2$. Esta interacción la podemos catalogar como un enlace por puente de hidrógeno intermedio con fuerte carácter covalente, mostrando una naturaleza parcialmente electrostática y parcialmente covalente. La misma pertenece al caso *tres* ya descrito anteriormente en el Epígrafe 1.2.1.

Es importante resaltar que la caracterización de estas interacciones mediante el método de AIM nos permitió encontrar diferencias marcadas en cuanto a la topología, $\rho(bcp)$ y $\nabla^2\rho(bcp)$, de los puntos críticos de enlace de los complejos formados con NH_4^+ y CH_3COO^- respecto al resto. Lo anterior nos permitió caracterizar estas interacciones como de puentes de hidrógeno con un fuerte carácter covalente, y además entender la causa por la cual la energía de interacción de estos complejos es en valor absoluto superior al resto.

El cumplimiento de los tres criterios restantes (Criterios 4-6 Epígrafe 1.2.1.1) lo podemos analizar partiendo de las propiedades atómicas integradas mostradas en la Tabla 4.11. Estas son: la carga (q), la energía (E_H) y el volumen (v) del átomo de hidrógeno involucrado en el enlace $D\text{-H}\dots A$. En esta tabla se muestran los valores de Δq , ΔE_H y Δv , los cuales representan la diferencia de la propiedad entre el átomo de hidrógeno en el complejo (q_{comp} , $E_{H\text{comp}}$ y v_{comp}) y el átomo de hidrógeno en el monómero libre o no enlazado (q_{mon} , $E_{H\text{mon}}$ y v_{mon}), según $\Delta q = q_{\text{complejo}} - q_{\text{monómero}}$. En todos los casos se consideró el monómero como la molécula que aporta el átomo de hidrógeno en el enlace. La carga del átomo de hidrógeno en el complejo es más positiva que en el monómero libre, lo cual significa que la densidad electrónica del átomo de hidrógeno en el complejo ha disminuido y por lo tanto en la mayoría de los casos Δq adopta valores positivos. Lo anterior se cumple para la mayoría de las interacciones, cumpliendo las mismas con el cuarto criterio establecido. Las excepciones son las interacciones $\text{-C}_{22}\text{H}_{22}\dots\text{O}=\text{C}$ ($\text{BR}_m\text{-HCONH}_2$), $\text{-C}_{22}\text{H}_{22}\dots\text{NH}$ y $\text{-O}_{78}\text{H}_{79}\dots\text{C}$ ($\text{BR}_m\text{-C}_8\text{H}_6\text{NH}$) donde esta magnitud es negativa. En las interacciones $\text{-C}_{22}\text{H}_{22}\dots\text{O}=\text{C}$ y $\text{-C}_{22}\text{H}_{22}\dots\text{NH}$ el átomo de hidrógeno en el complejo posee un exceso muy pequeño de carga negativa (0.002e y 0.003e). En la interacción $\text{-O}_{78}\text{H}_{79}\dots\text{C}$, el átomo de hidrógeno tiene una menor densidad de carga en el monómero

que en el complejo, evidenciándose una interacción muy débil donde la diferencia de electronegatividades entre los átomos de C y de O hacen que el átomo de hidrógeno en el monómero posea menor densidad de carga que en el complejo. Los átomos de hidrógeno involucrados en las interacciones más fuertes pierden entre 0.04-0.1e.

El quinto criterio establece que el átomo de hidrógeno se encuentre desestabilizado en el complejo. Este efecto es medido por la magnitud ΔE_H , la cual es positiva excepto para los casos $-C_{22}H_{22}...O=C$ ($BR_m-HCONH_2$) y $-C_{22}H_{22}...NH$ ($BR_m-C_8H_6NH$). En las excepciones anteriores, el átomo de hidrógeno muestra una estabilización despreciable ($\Delta E_H < -0.002$ au) en el complejo con respecto al monómero. El valor del ΔE_H nos puede dar una medida de la fortaleza de la interacción, ya que al ser este valor más positivo indica que el átomo de hidrógeno tiene menor estabilidad en el complejo debido a la interacción fuerte con un átomo electroceptor. Los átomos de hidrógeno más desestabilizados, con valores más positivos de ΔE_H , fueron encontrados para las interacciones de los complejos más estables: $BR_m-NH_4^+$, $BR_m-CH_3COO^-$, $BR_m-HCONH_2$, BR_m-H_2O y $BR_m-C_6H_5OH$.

El sexto criterio plantea que debe disminuir el volumen del átomo de hidrógeno en el complejo. Este criterio se comprueba mediante la magnitud Δv . Este valor en nuestro caso es siempre negativo, lo cual prueba el criterio e indica que el volumen del átomo de hidrógeno es menor en el complejo que en el monómero. En general los volúmenes de los átomos de hidrógeno enlazados a C ($-CH...A$) no disminuyen mucho al compararlo con los monómeros. Este es el caso de $-CH_{orto}...O_{76}H$ ($BR_m-C_6H_6$), $-C_{22}H_{22}...O=C$, $-C_{16}H_{16}...N$ ($BR_m-HCONH_2$) y $-C_{16}H_{16}...C$ ($BR_m-C_8H_6NH$), los cuales representan interacciones muy débiles.

En este epígrafe hemos obtenido a través del método AIM información valiosa acerca de la naturaleza y fortaleza de las interacciones más importantes establecidas entre la cadena lateral y moléculas que simulan grupos funcionales presentes en el medio biológico. Con este análisis fue posible encontrar diferencias marcadas en las características topológicas encontradas para las interacciones más fuertes respecto a las demás. En este caso los complejos más estables ($BR_m-NH_4^+$ y $BR_m-CH_3COO^-$) están estabilizados por enlaces por puentes de hidrógeno que presentan un fuerte carácter covalente, mientras que los complejos de menor energía están formados por interacciones más débiles del tipo de vdW.

Tabla 4.11- Propiedades atómicas integradas: densidades de carga del monómero (q_{mon}) y del complejo (q_{comp}), energía de estabilización E_H y volumen (v) del átomo de hidrógeno en los enlaces intermoleculares $DH...A$, donde A=O, N, C a nivel M05-2X/6-31++G(d,p).

| Complejos | Interacción | ^a monómero | átomo | q_{mon} | q_{comp} | Δq^b | ΔE_H^b | Δv^b |
|---|---|----------------------------------|--------------------|-----------|------------|--------------|----------------|--------------|
| BR _m -H ₂ O | -O ₇₆ H ₇₇ ...OH ₂ | BR _m | H ₇₇ | 0.596 | 0.638 | 0.042 | 0.024 | -6.72 |
| | HOH ₍₁₎ ... O ₇₈ H | H ₂ O | H ₁ | 0.599 | 0.647 | 0.048 | 0.035 | -6.98 |
| BR _m -NH ₄ ⁺ | H ₃ NH ₍₁₎ ... O ₇₆ H | NH ₄ ⁺ | H ₁ | 0.538 | 0.566 | 0.027 | 0.018 | -5.71 |
| | H ₃ NH ₍₂₎ ... O ₇₈ H | NH ₄ ⁺ | H ₂ | 0.538 | 0.595 | 0.057 | 0.039 | -9.54 |
| BR _m -H ₂ S | HS ₁ ... O ₇₈ H | H ₂ S | H | -0.045 | 0.025 | 0.070 | 0.034 | -8.29 |
| BR _m - HCONH ₂ | -NH ₍₁₎ ...O ₇₆ H | HCONH ₂ | H ₁ | 0.465 | 0.537 | 0.072 | 0.040 | -10.13 |
| | -O ₇₈ H ₇₉ ...O=C | BR _m | H ₇₉ | 0.615 | 0.642 | 0.027 | 0.019 | -5.36 |
| | -C ₁₆ H ₁₆ ...N | BR _m | H ₁₆ | -0.041 | -0.027 | 0.014 | 0.003 | -1.95 |
| | -C ₂₂ H ₂₂ ...O=C | BR _m | H ₂₂ | -0.009 | -0.013 | -0.003 | -0.002 | -2.57 |
| BR _m - CH ₃ COO ⁻ | -O ₇₈ H ₇₉ ...OCO | BR _m | H ₇₉ | 0.615 | 0.662 | 0.047 | 0.036 | -7.66 |
| | -O ₇₆ H ₇₇ ...OCO | BR _m | H ₇₇ | 0.596 | 0.664 | 0.068 | 0.048 | -10.45 |
| | -C ₂₂ H ₂₂ ...OCO | BR _m | H ₂₂ | -0.009 | 0.007 | 0.016 | 0.004 | -7.86 |
| | -C ₁₆ H ₁₆ ...OCO | BR _m | H ₁₆ | -0.041 | 0.032 | 0.073 | 0.027 | -6.79 |
| BR _m -C ₆ H ₅ OH | -OH _{fenol} ...O ₇₈ H | C ₆ H ₅ OH | H _{fenol} | 0.606 | 0.655 | 0.049 | 0.036 | -9.21 |
| | -O ₇₆ H ₇₇ ...OH _{fenol} | BR _m | H ₇₇ | 0.596 | 0.629 | 0.033 | 0.019 | -5.34 |
| BR _m -C ₆ H ₆ | -CH _{orto} ...O ₇₆ H | C ₆ H ₆ | H _{orto} | 0.009 | 0.026 | 0.017 | 0.007 | -1.37 |
| | -CH _{para} ...O ₇₈ H | C ₆ H ₆ | H _{para} | 0.012 | 0.045 | 0.033 | 0.012 | -5.94 |
| BR _m -C ₈ H ₆ NH | -NH... O ₇₆ H | C ₈ H ₆ NH | H | 0.454 | 0.508 | 0.054 | 0.032 | -5.93 |
| | -O ₇₈ H ₇₉ ...CH | BR _m | H ₇₉ | 0.614 | 0.603 | -0.011 | 0.0007 | -1.09 |
| | -C ₂₂ H ₂₂ ...NH | BR _m | H ₂₂ | -0.010 | -0.013 | -0.003 | -0.003 | -5.11 |
| | -C ₁₆ H ₁₆ ...CH | BR _m | H ₁₆ | -0.041 | -0.014 | 0.027 | 0.009 | -4.72 |

^aEl monómero se define como la molécula que cede el átomo de hidrógeno.

^b $\Delta q = q_{comp} - q_{mon}$; $\Delta E = E_{comp} - E_{mon}$; $\Delta v = v_{comp} - v_{mon}$, todas se expresan en a.u.

4.5.2. Estudio de la solvatación de los brasinoesteroides.

La actividad biológica que presentan los BRS puede estar relacionada con la facilidad de formación de enlaces de hidrógeno en los sitios de unión al receptor. Con el objetivo de obtener información teórica acerca de la formación de estos enlaces, se modeló la interacción de estas fitohormonas con H_2O , obteniendo además magnitudes termodinámicas importantes relacionadas con el proceso de solvatación de estas especies. En este epígrafe se describen primeramente los modelos de interacción de los BRS del Grupo II (Figura 3.1 a,h,i) con una molécula de H_2O ($BRS-(H_2O)_1$) y posteriormente se analizarán determinadas magnitudes termodinámicas referentes a la asociación con varias moléculas de este solvente. Este análisis se realizó mediante la metodología MMH en su *variante uno* como se describió ya anteriormente (Epígrafe 2.2.2 y Anexo 1).

3.5.2.1. Interacción entre los brasinoesteroides y una molécula de H_2O , $(BRS)-(H_2O)_1$.

Una de las ventajas brindadas por la metodología de MMH es que nos permite, a través de la exploración de la SEP, seleccionar las configuraciones de mayor estabilidad y obtener las interacciones preferenciales entre las moléculas de soluto y solvente. Un problema que se ha presentado en el mismo es la discriminación de información redundante a través del índice de Tanimoto. Este índice falla en determinadas ocasiones, sobre todo cuando no se utilizan las nuevas variantes del MMH para realizar búsquedas conformacionales. También se ha observado que cuando las moléculas de soluto y solvente son muy diferentes en cuanto a tamaño, como en este caso, el índice de Tanimoto no discrimina muy bien la información redundante. En la asociación de los BRS con H_2O desarrollada en este epígrafe, se trata a las moléculas de soluto y solvente como rígidas (*variante uno* del MMH), lo cual aumenta la probabilidad de encontrarnos con geometrías iguales que no son discriminadas por este índice. Lo anterior es la razón por la cual utilizamos de forma adicional el algoritmo TGSA, para la discriminación de geometrías iguales. Se tomaron los complejos que mayores contribuciones aportaron a la función de partición (50% de la población total) según la metodología MMH-AM1 y se superpusieron evaluando los índices de Carbó (C_{AB}) en cada caso. En la Tabla 4.12 se presentan las poblaciones relativas, energías de cada complejo e índices de semejanza de Carbó después de realizada la superposición con el programa TGSA. En la Figura 4.10 se muestra la superposición de los complejos obtenidos en el caso de la interacción $BR-(H_2O)_1$.

Como se observa en la Tabla 4.12 los índices C_{AB} son muy cercanos a 1 en todos los casos. Lo anterior ocurre porque la única diferencia entre dos complejos dados, para cada uno de los casos, es la posición del H_2O . Los solutos se superponen casi completamente debido a que la superposición de los cuatro anillos del brasinoesteroide es casi completa, elevando el índice de semejanza.

Tabla 4.12 –Poblaciones relativas (n/N, %), energías relativas (e_i , kJ/mol) e índices de Carbó (C_{AB}) de los complejos de mínimo encontrados según MMH-AM1.

| BRS | ^a Complejo | n/N % | e_i | C_{AB} |
|-------------------|-----------------------|-------|-------|---|
| brasinólida (BR) | BR1 | 14 | -32.2 | $C_{BR1-BR2}=0.9973$, $C_{BR1-BR2_a}=0.9973$ $C_{BR1-BR4}=0.9988$ |
| | BRr2 | 14 | -32.1 | $C_{BR2-BR2_a}=1$, $C_{BR2-BR4}=0.9979$ |
| | BRr2 _a | 12 | -31.8 | $C_{BR2_a-BR4}=0.9979$ |
| | BR3 | 6 | -30.3 | |
| castasterona (CS) | CS1 | 21 | -33.8 | $C_{CS1-CS1_a}=0.9997$; $C_{CS1-CS1_b}=0.9997$; $C_{CS1-CS2}=0.9971$ |
| | CS1 _a | 13 | -32.6 | $C_{CS1_a-CS1_b}=1$; $C_{CS1_a-CS2}=0.9979$ |
| | CS1 _b | 11 | -32.2 | $C_{CS1_b-CS2}=0.9979$ |
| | CS2 | 9 | -31.8 | |
| | CS3 | 0.5 | -24.7 | |
| tifasterol (TF) | TF1 | 32 | -27.7 | $C_{TF1-TF2}=0.9980$ |
| | TF2 | 20 | -26.5 | |
| | TF3 | 3 | -21.2 | |

^aComplejo- Nomenclatura de los complejos en dependencia de la zona de interacción del brasinoesteroide (1,2,3). Figura 3.2a

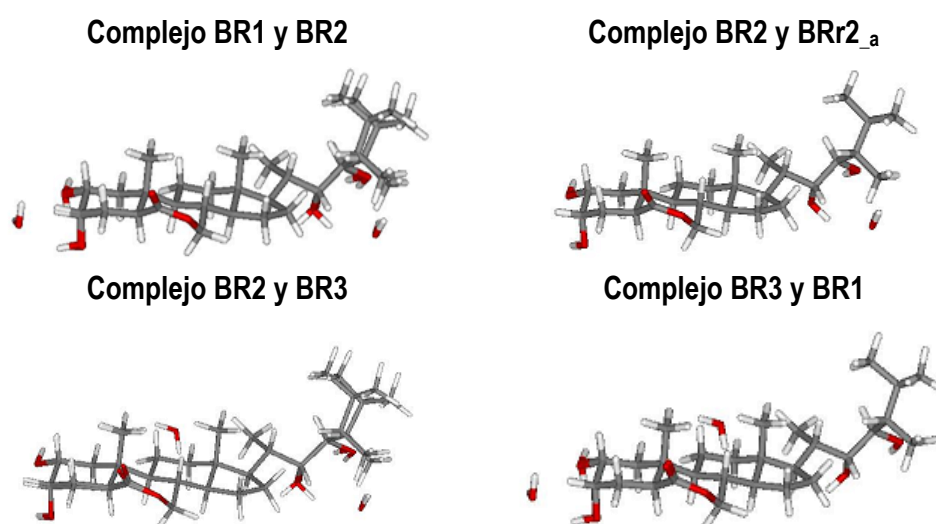


Figura 4.10 - Superposición mediante TGSA de los complejos de mínima energía obtenidos por MMH-AM1 para el caso BR-(H₂O)₁.

Para poder utilizar el índice C_{AB} en la diferenciación de este tipo de estructuras se impuso un umbral del mismo. Este valor fue obtenido empíricamente a través de la superposición de geometrías cada vez más similares, llegando a un valor límite de 0.9990. Si el índice C_{AB} para un par de estructuras superpuestas se encuentra por encima o por debajo de este valor, los dos complejos se consideran como iguales ó diferentes respectivamente.

En el caso de los complejos de **BR** con una molécula de H_2O , se encontraron cuatro complejos que contribuyen en su conjunto en un 46 % a la población sistema (Tabla 4.12). La nomenclatura utilizada para diferenciar los complejos se basa en las diferentes zonas del brasinoesteroide que interactúan con la molécula de H_2O . Se nombró la *zona 1* como el grupo diol del anillo A, *zona 2* al diol de la cadena lateral, y *zona 3* el anillo B, Figura 3.2 a. El complejo BR2_a fue eliminado debido a que el $C_{BR2-BR2_a}$ es 1 y además posee menor estabilidad que BR2. Aunque el complejo BR3 posee la menor estabilidad de las cuatro configuraciones no podemos eliminarlo porque muestra una zona diferente de interacción, que es la oxalactona del anillo B.

Para la **CS** con $n=1$ se encontraron cuatro configuraciones que mostraron energías similares, las cuales representan el 54 % de toda la población. En este caso se eliminaron los complejos CS1_a y CS1_b, debido a que CS1 es el complejo de menor energía encontrado para la interacción CS- $(H_2O)_1$ y los índices de Carbó de los pares: $C_{CS1-CS1_a}$, $C_{CS1-CS1_b}$ y $C_{CS1_a-CS1_b}$ mostraron valores por encima de 0.9990. De las 100 celdas generadas por el procedimiento MMH sólo una, que representa el 0.5 % de toda la población, mostró a la molécula de H_2O interactuando con el grupo carbonilo del anillo B. Por ello agregamos esta celda al análisis, nombrándola CS3.

TF mostró dos configuraciones (TF1 y TF2) con una población total del 52 % y con un índice de carbó de 0.9980. En este caso solo dos configuraciones mostraron a la molécula de H_2O interactuando con el grupo carbonilo y con una pequeña contribución (aproximadamente del 3 %). De estas estructuras se escogió la de menor energía y se le nombró TF3.

En la Figura 4.11 se muestran los nueve complejos obtenidos como resultado de la aplicación del MMH-AM1 junto con el procedimiento TGSA al estudio de la interacción de **BR**, **CS** y **TF** con una molécula de H_2O . La semejanza por degeneración fue completamente eliminada de los resultados. En las estructuras BR1 y CS1, la asociación del agua ocurre con el grupo diol del anillo A. Como se puede observar en la Figura 4.11a, para el complejo BR1, el -OH en el C_2 se reorienta favoreciendo la interacción del hidrógeno del mismo con el oxígeno del H_2O a una distancia de 2.39 Å. La interacción descrita anteriormente se especifica como: -OH... OH₂ y no se encuentra en el caso del complejo CS1 (Figura 4.11 d). La interacción más común del -OH en el C_2 producida en estos casos es

del tipo HO...H₂O. Esta interacción se observa en ambas estructuras y representa la interacción del oxígeno del grupo hidroxilo con los dos átomos de hidrógeno de la molécula de H₂O.

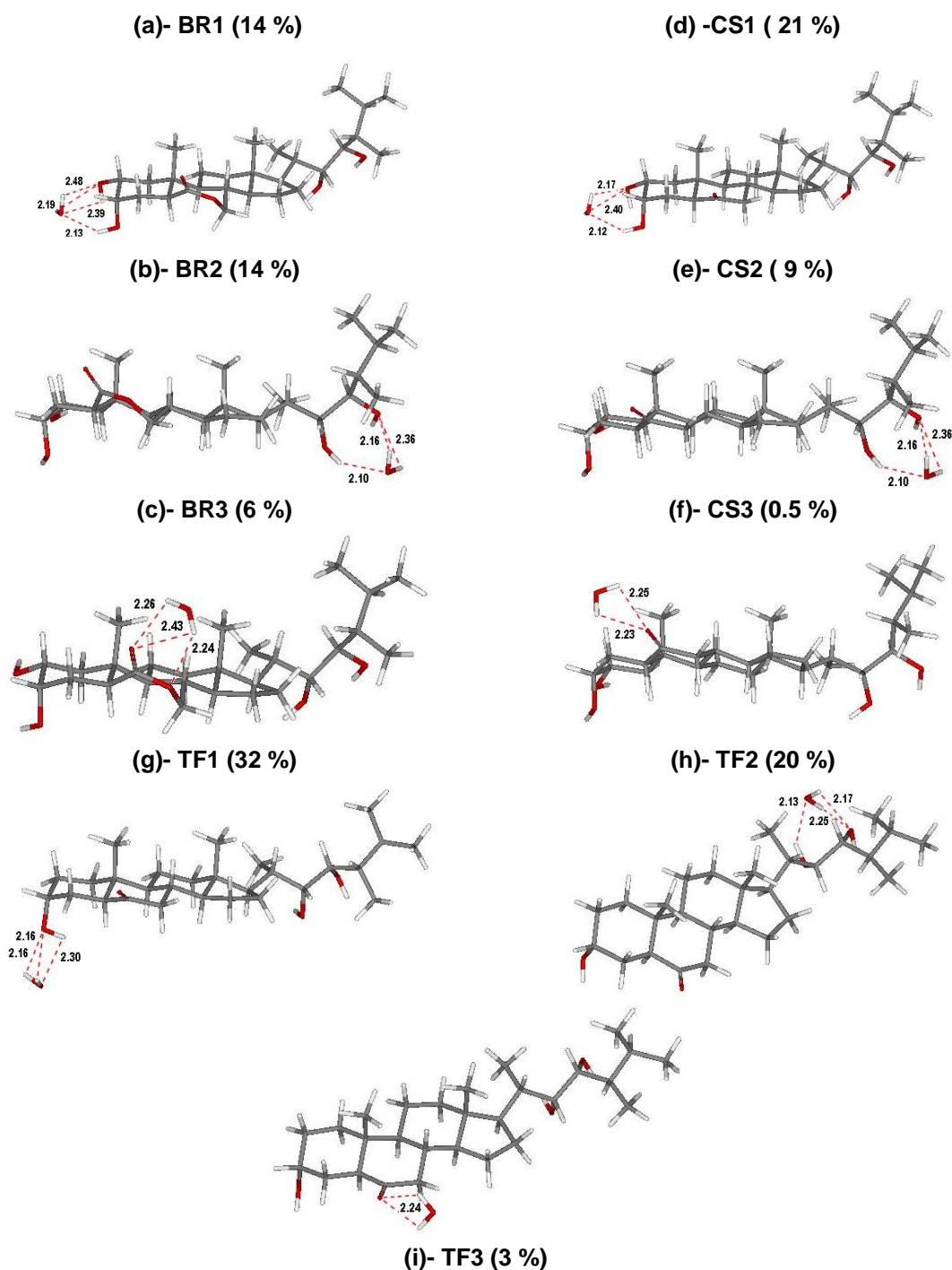


Figura 4.11 - Complejos más estables: (a)-BR1, (b)-BR2, (c)-BR3, (d)-CS1,(e)-CS2, (g)-TF1 ,(h)-TF2 y menos estables (f)-CS3 e (i)-TF3) obtenidos al aplicar la metodología MMH-AM1 a **BR**, **CS** y **TF**. Las poblaciones relativas se muestran entre paréntesis.

La interacción del grupo -OH en el C₃ de estos dos complejos es siempre del tipo -OH...OH₂. El caso de TF1 (Figura. 4.11 g) es diferente. Este brasinoesteroide no posee -OH en el C₂, lo cual hace que su actividad biológica se reduzca al compararla con la de **BR** y la de **CS**¹⁴⁶ (Epígrafe 1.4.1). En este caso el complejo TF1 se estabiliza no solo por la interacción -OH...OH₂, presente en las estructuras BR1 y CS1, sino también por la interacción HO...H₂O. En el Epígrafe 3.3 anterior comprobamos, mediante criterios geométricos, la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular en el anillo A de la **BR**. En este caso la diferente orientación del -OH en el C₃ de la estructura TF1 respecto a **BR** y **CS** puede deberse a la falta del -OH en el C₂, lo cual imposibilita la formación del enlace de hidrógeno intramolecular y por lo tanto el -OH en el C₃ puede rotar libremente y adoptar otras conformaciones.

Cuando la asociación se produce con el grupo diol de la cadena lateral (complejos BR2, CS2 y TF2), el -OH del C₂₂ experimenta siempre una interacción del tipo -OH...OH₂, y el -OH en el C₂₃ del tipo HO...H₂O.

BR3, CS3 y TF3 poseen la molécula de H₂O interactuando con los grupos polares del anillo B. En el complejo BR3 participa la oxalactona completa en la interacción con el H₂O (Figura 4.11 c), mientras que para los complejos CS3 y TF3 se produce la interacción de ambos hidrógenos del H₂O con el C=O, (-C=O...H₂O) (Figuras 4.11 f, i).

A manera de resumen en este epígrafe podemos expresar que se obtuvieron los complejos más significativos de interacción de tres BRS con una molécula de H₂O a través de la metodología MMH y utilizando el hamiltoniano semiempírico AM1. Esta metodología nos permitió explorar todos los sitios hidrofílicos de estas moléculas. En el epígrafe siguiente podremos analizar la energética de los complejos BRS-(H₂O)₁, y conocer si existen diferencias en la estabilidad de los complejos formados con una molécula de H₂O.

4.5.2.2. Análisis energético de los complejos BRS-(H₂O)₁.

Las nueve geometrías obtenidas por el hamiltoniano AM1 fueron posteriormente optimizadas utilizando B3LYP/6-31G. Las energías de estabilización obtenidas fueron corregidas al mismo nivel utilizando el procedimiento de CP⁴⁴ según se explicó anteriormente aunque se suele considerar que los cálculos DFT estarían mucho menos afectados por el BSSE que otros métodos que incluyen la correlación electrónica^{48,185}.

Los cálculos de las energías de interacción se presentan en la Tabla 4.13 a-g. Se conoce que el BSSE tiene efectos dignos de ser tenidos en cuenta sobre las distancias intermoleculares, fundamentalmente cuando se trata de complejos débiles^{186,187}. En nuestro caso la magnitud del BSSE,

calculada según $(-BSSE/\Delta E)*100$ (Tabla 4.13 c) para cada uno de los mínimos está en el rango de 25-42% de la energía de interacción total no corregida (ΔE). Obsérvese que en otros casos se ha reportado magnitudes del BSSE mayores del 50 % en complejos débiles mientras que para interacciones más fuertes este valor decrece. Un ejemplo de esto lo constituye el dímero de H₂O con un 25 % a nivel similar de B3LYP/6-31++G(d,p)¹⁸⁵. Con estos cálculos tenemos una idea de cómo se manifiesta el BSSE en este entorno y con estos métodos, lo que contribuye a esclarecer el alcance de las conclusiones a las que se puede llegar de esta forma y en los casos en los que esta corrección sea imposible debido al alto costo y la complejidad del sistema. Se observa además que los complejos más afectados por este error (mayor magnitud), son los de menor estabilidad, BR3, CS3 y TF1. El complejo TF1 es el menos estable de los complejos TF-H₂O teniendo en cuenta los cálculos realizados a mayor nivel (ΔE_3^{CP} y ΔE_4^{CP}). El incremento esperado en las distancias H...A al corregir el BSSE está en el rango de 0.01-0.07 Å, indicando que las geometrías no-correctas son aceptables hasta este nivel. Como se espera los complejos presentan una mayor estabilización al corregir el BSSE en cada paso de la optimización (SEP corregida del BSSE, ΔE_2^{CP}), que cuando se corrige el mismo mediante un cálculo de energía realizado a la SEP no corregida (ΔE_1^{CP}). En este caso, las diferencias observadas entre ΔE_1^{CP} y ΔE_2^{CP} son menores de 3 kJ/mol, lo cual se produce cuando las SEP no-correctas y correctas son muy planas en las cercanías del mínimo. Este comportamiento ha sido ampliamente estudiado en la literatura.^{185,188}

En la Figura 4.12 del siguiente Epígrafe (Epígrafe 3.5.2.3) se presentan las geometrías de los complejos corregidos del BSSE mediante la optimización B3LYP/6-31G. De los valores de ΔE , ΔE_1^{CP} y ΔE_2^{CP} se puede observar que los complejos donde la interacción se produce con los sistemas dióles del anillo A y cadena lateral (BR1, BR2, CS1, CS2, TF1 y TF2) poseen mayor estabilidad con respecto a cuando la interacción ocurre con el anillo B (BR3, CS3 y TF3). Es importante resaltar que las diferencias de energía de asociación son muy pequeñas, haciéndose menores a medida que aumentamos la calidad de la base utilizada (ΔE_3^{CP} y ΔE_4^{CP}). Lo anterior indica que todos los complejos representan poblaciones importantes, lo cual implica que todos deben ser tenidos en cuenta al analizar la solvatación de otros BRS.

Como se expresó anteriormente, debido al tamaño de los sistemas se hace muy costoso en términos de tiempo realizar la corrección de la SEP con las bases requeridas, que son las que tienen en cuenta no solo polarización sino funciones difusas para describir correctamente los enlaces de hidrógeno. Adicionalmente, fue realizada una optimización del complejo BR3 a nivel B3LYP/6-

31+G(d) y la geometría no cambió con respecto a la optimizada con el mismo funcional y base 6-31G. Por esto fueron realizados los cálculos de energía con las bases 6-31+G(d) y 6-311++G(d,p), reportando los valores de ΔE_3^{CP} y ΔE_4^{CP} respectivamente. A diferencia de los complejos TF-(H₂O)₁, en el caso de BR-(H₂O)₁ y CS-(H₂O)₁, las ΔE_3^{CP} y ΔE_4^{CP} siguen la misma tendencia que ΔE , ΔE_1^{CP} y ΔE_2^{CP} . Para las asociaciones entre **TF** y H₂O, el complejo TF3 (Figura 4.12 i), posee mayor estabilidad que el complejo TF1 (Figura 4.12 g). Lo anterior se debe a que la ausencia del sistema diol en el anillo A disminuye ligeramente la estabilidad del complejo TF1. De manera general se encuentra que la interacción del H₂O con los dos sistemas dioles (anillo A y cadena lateral) está ligeramente más favorecida que con el sistema oxalactona o grupo carbonilo del anillo B.

Tabla 4.13-Cálculos B3LYP y energías de interacción (kJ/mol) en la superficie de energía potencial no corregida por CP y corregida por CP con las bases 6-31G, 6-31+G(d) y 6-311++G(d,p).

| BRS | Complejo | ΔE^a | BSSE ^b | BSSE (%) | $^d\Delta E_1^{CP}$ | $^e\Delta E_2^{CP}$ | $^f\Delta E_3^{CP}$ | $^g\Delta E_4^{CP}$ |
|----------------------------|----------|--------------|-------------------|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| brasinólida (BR) | BR1 | -69.7 | 19.7 | 28.2 | -49.9 | -51.5 | -33.0 | -30.4 |
| | BR2 | -67.6 | 23.6 | 34.9 | -44.0 | -45.8 | -34.0 | -29.7 |
| | BR3 | -46.4 | 19.3 | 41.6 | -27.1 | -29.9 | -26.5 | -24.1 |
| castasterona (CS) | CS2 | -67.2 | 23.5 | 35.0 | -43.7 | -45.4 | -33.89 | -29.6 |
| | CS1 | -64.1 | 20.9 | 32.6 | -43.2 | -44.3 | -33.4 | -29.2 |
| | CS3 | -45.6 | 17.1 | 37.6 | -27.9 | -30.6 | -28.2 | -26.5 |
| tifasterol (TF) | TF2 | -64.6 | 21.2 | 32.8 | -43.4 | -44.2 | -29.9 | -25.0 |
| | TF1 | -50.9 | 20.2 | 39.8 | -30.7 | -33.2 | -22.8 | -21.4 |
| | TF3 | -44.1 | 15.2 | 34.4 | -28.7 | -31.6 | -24.8 | -23.3 |

^aEnergía de estabilización $\Delta E = E_{(BRS-H_2O)} - E_{(BRS)} - E_{(H_2O)}$ a nivel B3LYP/6-31G contaminada por BSSE.

^bBSSE es la energía total originada debido al error de superposición de base de la geometría no-corregida utilizando la base B3LYP/6-31G.

^cBSSE Magnitud del error BSSE calculado según $(-BSSE/\Delta E)*100$.

^d ΔE_1^{CP} es la energía de interacción corregida mediante CP con la geometría no-corregida a nivel B3LYP/6-31G.

^e ΔE_2^{CP} es la energía de interacción corregida con el método CP cuando el BSSE es tenido en cuenta durante la optimización a nivel B3LYP/6-31G.

^f ΔE_3^{CP} es la energía de interacción corregida con el método CP al nivel B3LYP/6-31+G(d)// B3LYP/6-31G.

^g ΔE_4^{CP} es la energía de interacción corregida con el método CP al nivel B3LYP/6-311++G(d,p)// B3LYP/6-31G.

4.5.2.3. Análisis de las geometrías.

En este epígrafe se muestran los cambios principales en las geometrías de los complejos corregidos de BSSE a nivel B3LYP/6-31G (Figura 4.12 a-i) con respecto a las geometrías obtenidas mediante MMH-AM1 (Figura 4.11 a-i).

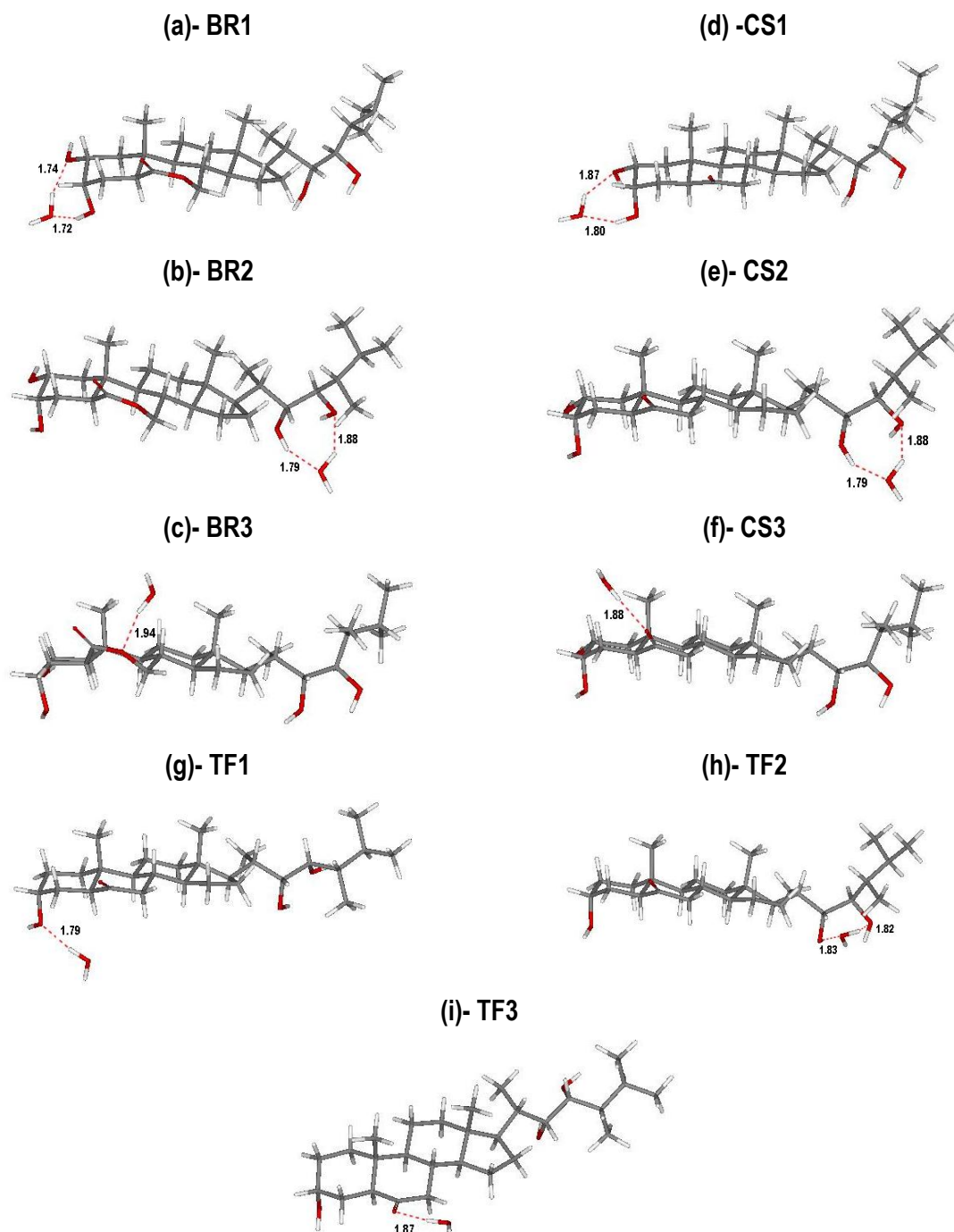


Figura 4.12 - Geometrías corregidas de BSSE de los complejos: (a)-BR1, (b)-BR2, (c)-BR3, (d)-CS1, (e)-CS2, (f)-CS3, (g)-TF1, (h)-TF2, (i)-TF3) a nivel B3LYP/6-31G.

Como es esperable en todos los casos, la molécula de agua está más cerca de los sitios polares, mostrando distancias por debajo de 2 Å. La coordinación de los dos hidrógenos de la molécula de H₂O al oxígeno de los grupos hidroxilo (HO...H₂O) de los tres BRS, Figura 4.11, cambió en todos los casos por una interacción del tipo HO...HOH. En esta interacción, Figura 4.12, la molécula de H₂O sólo interactúa con el oxígeno hidroxílico por uno de sus átomos de hidrógeno. Esto hace que la misma presente una disposición más lineal con respecto a los –OH.

En el caso del complejo BR3 la molécula de agua no interactúa con el grupo oxalactona completo (Figura 4.11 c), sino con el oxígeno cercano al grupo carbonilo, C=O...HOH (Figura 4.12 c).

Para los complejos CS3 y TF3, el H₂O adopta una estructura más lineal respecto al carbonilo, eliminando la coordinación de los dos hidrógenos del H₂O (Figura 4.11 f,i) por la interacción –C=O...HOH en los dos casos (Figura 4.12 f, i).

Es importante resaltar cómo la interacción del H₂O con el sistema diol en la cadena lateral del complejo BR2 es muy similar al obtenido en el Epígrafe 3.5.1, donde fue realizado el estudio conformational con la metodología MMH a un modelo de la cadena lateral de la brasinólida (BR_m-H₂O), Figura 4.8

4.5.2.4 .Análisis termodinámico de los clusters BRS-(H₂O)_n con n=2 a 5.

En este epígrafe se realiza un análisis de las magnitudes termodinámicas obtenidas mediante la metodología MMH. Estas magnitudes son: la energía de asociación (E^{asoc}), la energía libre de asociación de Helmholtz (A^{asoc}) y las entropías de asociación (S^{asoc}) referentes a la adición de una hasta cinco moléculas de H₂O a estos BRS.

Para obtener una representación completa de los efectos del solvente sobre el soluto podrían ser necesarias muchas moléculas de H₂O. Como nuestro propósito es tener en cuenta los efectos principales del ambiente molecular en las propiedades físico-químicas del soluto se estudiaron los efectos de una capa de hasta cinco moléculas de H₂O, la cual debe representar las principales perturbaciones de estas propiedades con respecto a la de la molécula **BR** aislada. También ocurre que el aumento de moléculas de agua más allá de este número comienza a favorecer asociaciones moleculares H₂O – H₂O que no son significativas a estos estudios³⁷. Los datos termodinámicos referentes a la asociación BR-(H₂O)_n, con n=1 a 5 se presentan en la Tabla 4.14. En la Figura 4.13 se muestra como varían las magnitudes termodinámicas (E^{asoc} , A^{asoc} , S^{asoc}) con la cantidad de moléculas de solvente.

Las magnitudes termodinámicas de los tres tipos de clusters moleculares son muy similares. Los valores de E^{asoc} y A^{asoc} son siempre negativos, lo cual indica que la asociación de estos BRS por H₂O

está favorecida desde el punto de vista termodinámico. Es importante tener en cuenta que estas magnitudes han sido calculadas a nivel AM1, y el análisis que desarrollaremos a partir de estos valores será esencialmente cualitativo aunque la cancelación de errores sistemáticos es esperable en este tipo de estimaciones donde intervienen tanto productos como reactivos de las reacciones de hidratación. En general, se observa una diferencia en las tendencias que siguen los valores de E^{asoc} , A^{asoc} y S^{asoc} de los solutos **BR** y **CS** con respecto al **TF**. En la Figura 4.13 b se puede distinguir mejor la diferencia en cuanto a la A^{asoc} de estos tres BRS. El hecho de que el comportamiento termodinámico de la **BR** y la **CS** sea tan similar podría indicar que el grupo oxalactona es menos importante en la asociación de estas moléculas con H₂O, ya que la única característica estructural que las distingue es la estructura del anillo B (Figura 3.1 a, i).

Tabla 4.14- Energía de asociación (E^{asoc} , kJ/mol), energía libre de Helmholtz (A^{asoc} , kJ/mol) y entropía de asociación (S^{asoc} , $J/Kmol$) por molécula de H₂O según MMH-AM1 de los BRS del Grupo II.

| No Moléculas H ₂ O | brasinólida (BR) | | | castasterona (CS) | | | tifasterol (TF) | | |
|----------------------------------|------------------|------------|------|-------------------|------------|------|-----------------|------------|------|
| | E^{asoc} | A^{asoc} | S | E^{asoc} | A^{asoc} | S | E^{asoc} | A^{asoc} | S |
| 1 | -29.8 | -37.1 | 24.4 | -31.1 | -37.7 | 22.1 | -25.5 | -30.5 | 16.7 |
| 2 | -30.4 | -38.9 | 28.4 | -31.1 | -38.4 | 24.5 | -26.8 | -31.4 | 15.5 |
| 3 | -30.8 | -39.0 | 27.5 | -31.3 | -40.0 | 29.1 | -30.6 | -35.3 | 15.5 |
| 4 | -30.9 | -40.1 | 30.9 | -29.3 | -38.9 | 32.2 | -27.4 | -34.6 | 24.2 |
| 5 | -31.0 | -40.5 | 31.8 | -31.2 | -39.9 | 29.3 | -29.8 | -37.1 | 24.4 |

En cuanto a la variación de las E^{asoc} (Figura 4.13 a) se observa en el caso del complejo TF-(H₂O)₃ una estabilización notable del sistema. Esta estabilización se debe a que cuando el **TF** se encuentra rodeado por tres moléculas de H₂O se obtienen dos complejos muy similares que representan el 70 % del conjunto canónico total del sistema TF-(H₂O)₃, lo cual querría decir que la interacción del **TF** con tres moléculas de H₂O está descrita casi en su totalidad por dos configuraciones. En estas, además de estar presentes interacciones TF-H₂O, también ocurren asociaciones H₂O-H₂O las que hacen que se estabilice mucho la energía de asociación. Se puede pensar que este comportamiento se debe a problemas de exploración de la superficie de energía potencial. Sin embargo, para los conjuntos BR-(H₂O)₄ y BR-(H₂O)₅ se sigue observando una tendencia hacia la estabilización de estos sistemas.

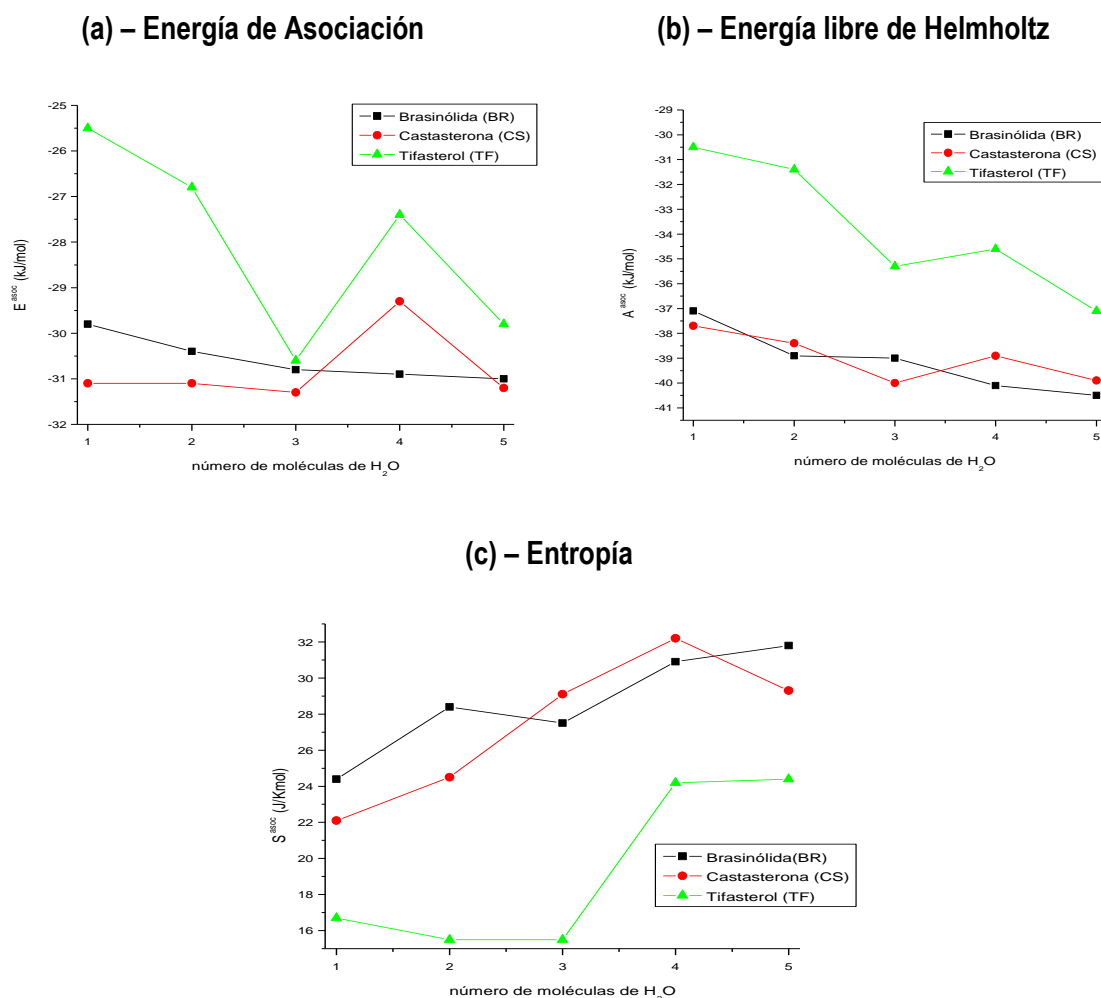


Figura 4.13 - Valores de: (a) energía de asociación (E^{asoc} , kJ/mol), (b) energía de asociación libre de Helmholtz (A^{asoc} , kJ/mol) y (c) entropía de asociación (S^{asoc} , $J/Kmol$) de **BR**, **CS** y **TF** contra el número de moléculas de H_2O obtenidas mediante MMH-AM1.

En el caso del sistema $CS-(H_2O)_4$ se muestra una desestabilización en cuanto a las E^{asoc} . Si observamos paralelamente el gráfico correspondiente a las S^{asoc} , (Figura 4.13 c), veremos que este conjunto presenta la mayor entropía de todos. Esto significa que en tal caso las probabilidades de existencia de todos los estados son muy parecidas, o sea, no existe una interacción preferencial entre la **CS** y las cuatro moléculas de H_2O ya que múltiples mínimos aportan en iguales cantidades a la función de partición del sistema. Al no existir un mínimo preferencial, como en los demás casos, disminuye ligeramente la E^{asoc} del sistema.

Los valores absolutos de A^{asoc} del **TF** son menores que los de la **BR** y la **CS**, lo cual podría indicar que la interacción del **TF** con H_2O está menos favorecida. El hecho de que el **TF** muestre las menores asociaciones por H_2O podría indicar la importancia que tiene la presencia del grupo diol en el

anillo A para la asociación y estabilidad de estos complejos. No obstante, las diferencias entre las A^{asoc} de estos tres BRS disminuyen a medida que aumenta el número de moléculas de H_2O . Lo anterior pudiera estar relacionado con el incremento de la formación de clusters H_2O-H_2O y constituye la causa de la estabilización que se observa en estas energías.

La entropía depende del número de mínimos que contribuyen a la función de partición. En este sentido, los clusters que tienen la misma o casi la misma energía y diferentes arreglos moleculares son relevantes al conjunto canónico y contribuyen de forma significativa a la entropía. Como se espera la tendencia de la entropía es a aumentar con el número de moléculas de H_2O , debido a que aumentan los grados de libertad del sistema con el número de conformaciones. En la Figura 4.13c se observa que en general se sigue el comportamiento anterior. Sin embargo, en algunos casos la entropía es mayor que en otros. Por ejemplo, en el caso de $CS-(H_2O)_4$ la entropía es mayor que cuando el soluto está rodeado de cinco moléculas de H_2O . Este incremento se debe a que el sistema muestra diferentes configuraciones con pequeñas diferencias de energías si se comparan con el mínimo.

Se puede distinguir para S^{asoc} , igual que para E^{asoc} y A^{asoc} , un comportamiento diferente para **BR** y **CS** con respecto a **TF**. Los menores valores de S^{asoc} referentes a la asociación de **TF**- H_2O , podrían deberse a la disminución de los grupos polares en su estructura.

A manera de resumen podemos decir que los resultados termodinámicos expuestos en este epígrafe nos confirman que los BRS más similares son la **BR** y la **CS**. El sistema diol del anillo A parece importante para mostrar una mayor asociación por el H_2O , mientras que la oxalactona del anillo B parece mostrar una menor participación en la asociación con este solvente. Los datos de energía calculados por AM1 deben ser utilizados principalmente para realizar análisis cualitativos y de tendencias. Uno de los valores de la metodología MMH es el cálculo de las propiedades de asociación termodinámicas, que proporciona usualmente resultados razonables, probablemente debido, como se ha dicho anteriormente a la cancelación sistemática de errores.

4.5.2.5. Interacciones preferenciales de $BRS-(H_2O)_n$ con $n=2$ a 5.

Los mínimos significativos obtenidos para la **BR**, **CS** y **TF** rodeados de dos a cinco moléculas de agua se muestran en las Figuras 4.14 - 4.16 y en el Anexo 4, Figuras A4.1 – A4.3. Muchos de los mínimos obtenidos en estos casos corresponden a configuraciones donde el agua está formando clusters entre sus propias moléculas. En todos los casos las distancias de enlace a las que se producen estas interacciones están por debajo de 2.5 Å, siendo típicas de enlaces de hidrógeno.

En la Figura 4.14 se observa que cuando el procedimiento MMH se realiza para $n=3$, el cluster $\text{BR}-(\text{H}_2\text{O})_3$ que contribuye en un 10% a la función de partición confirma los tres sitios hidrofílicos importantes de asociación de la **BR** por H_2O (Figura 4.14). Estos sitios fueron encontrados anteriormente en el caso de $\text{BR}-(\text{H}_2\text{O})_1$ (Epígrafe 3.5.2.1, Figura 4.11a-c). Para los clusters $\text{BR}-(\text{H}_2\text{O})_4$ y $\text{BR}-(\text{H}_2\text{O})_5$ las configuraciones de mínima energía muestran las moléculas de H_2O interactuando con la oxalactona y el grupo diol de la cadena lateral respectivamente (Figura A4.1). Aún en el caso $\text{BR}-(\text{H}_2\text{O})_5$, todas las moléculas de H_2O se encuentran interactuando tanto con el soluto como entre ellas.

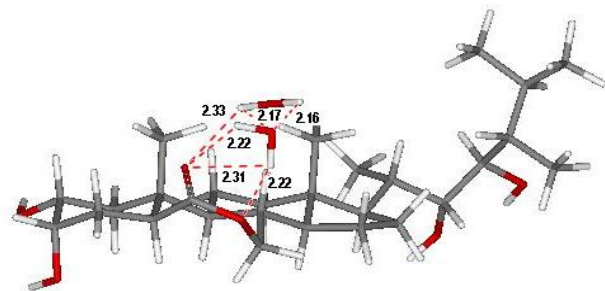
Los clusters de **CS** con $n=2-5$ moléculas de H_2O muestra un comportamiento similar al de la **BR** (Figura 4.15 y Figura A4.2). Esto es un resultado esperado ya que ambas moléculas son muy similares. En este caso, las moléculas de H_2O interactúan preferencialmente con ambos sistemas dioles (anillo A y cadena lateral). No obstante, también fue encontrada la interacción del grupo carbonilo del anillo B ($-\text{C}=\text{O}\dots\text{H}_2\text{O}$) en los clusters $\text{CS}-(\text{H}_2\text{O})_3$, $\text{CS}-(\text{H}_2\text{O})_4$ y $\text{CS}-(\text{H}_2\text{O})_5$. El hecho de que el grupo diol de la cadena lateral sea tan importante en la asociación con H_2O puede estar relacionado con las diferentes conformaciones que puede adoptar la cadena lateral y la disponibilidad que estas rotaciones libres le confieren a este grupo en particular.

En el caso de **TF** la falta del $-\text{OH}$ en el C_2 y por lo tanto la ausencia del enlace de hidrógeno intramolecular formado en el anillo A, facilita la asociación del $-\text{OH}$ en el C_3 con el grupo carbonilo del anillo B a través de enlaces de hidrógeno formados con las moléculas de H_2O . Los clusters $\text{TF}-(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{TF}-(\text{H}_2\text{O})_3$ (Figura 4.16) y $\text{TF}-(\text{H}_2\text{O})_5$ (Figura A4.3) presentan la interacción anteriormente descrita. En este caso debido a la ausencia del sistema diol en el anillo A se esperarían más clusters con poblaciones importantes que reflejaran la interacción del H_2O con el carbonilo en el anillo B y con el sistema diol de la cadena lateral. Sin embargo, la interacción que más estabiliza estos clusters vincula el $-\text{OH}$ en el C_2 y el $-\text{C}=\text{O}$ del anillo B a través de moléculas de solvente donde estas últimas también interactúan entre sí, aportando mayor estabilización a estos complejos.

H₂O

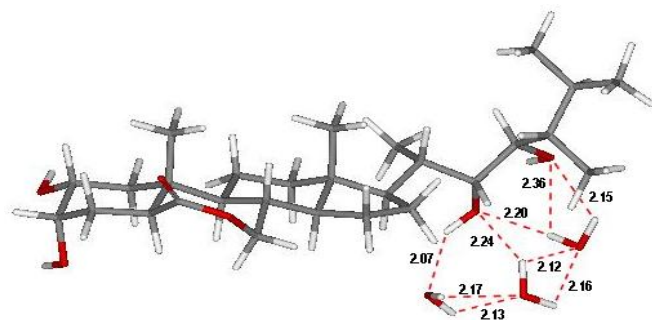
2

(8 %)



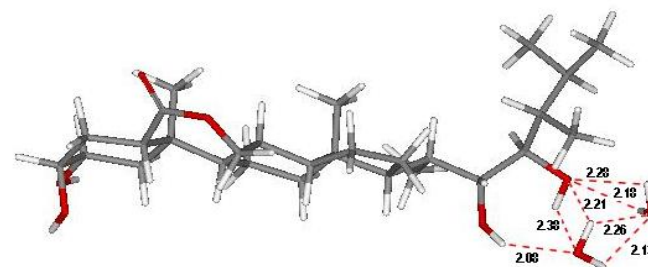
(24 %)

3



Brasinólida (BR)

(8%)



(10 %)

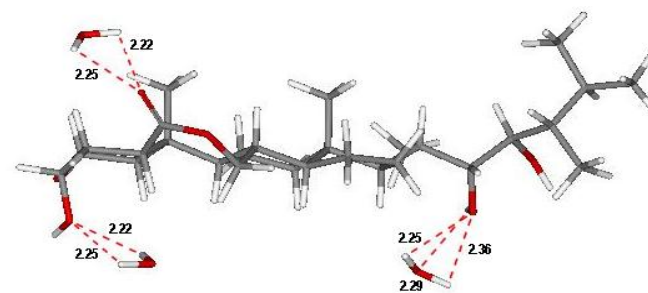


Figura 4.14 - Posiciones preferenciales y poblaciones relativas entre paréntesis de los clusters BR-(H₂O)₂ y BR-(H₂O)₃ según MMH-AM1.

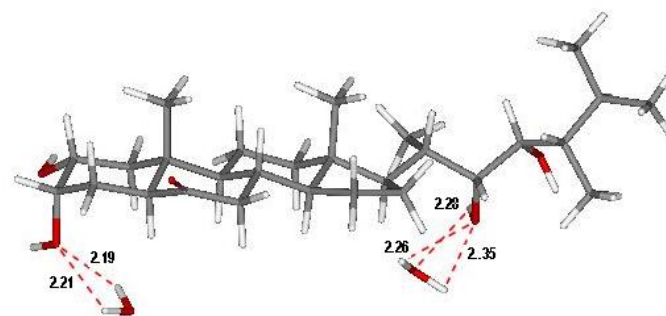
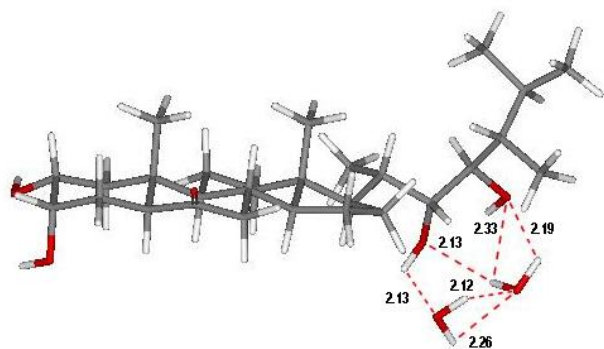
H₂O

Castasterona (CS)

2

(22 %)

(13 %)



3

(10 %)

(7 %)

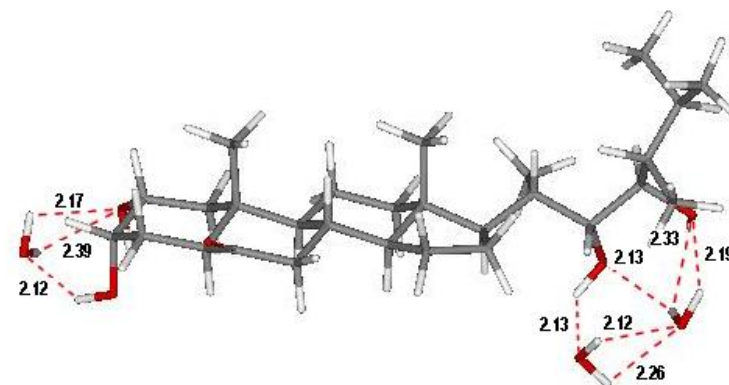
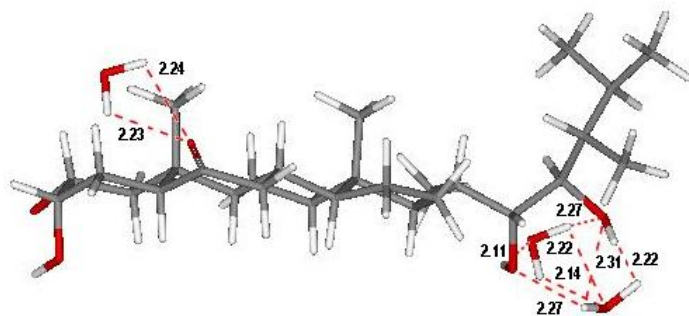


Figura 4.15 - Posiciones preferenciales y poblaciones relativas entre paréntesis de los clusters CS-(H₂O)₂ y CS-(H₂O)₃ según MMH-AM1.

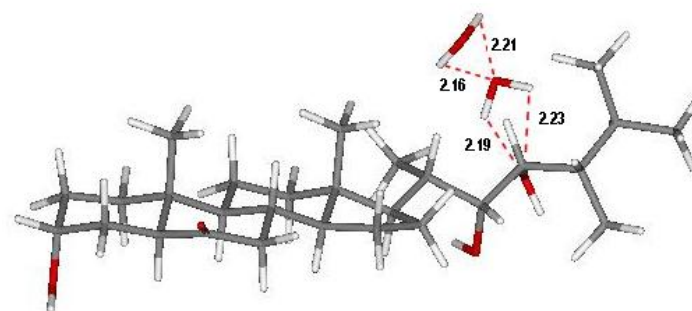
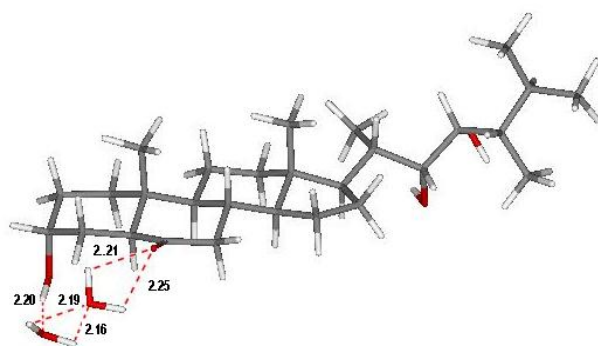
H₂O

Tifasterol (TF)

2

(40 %)

(23 %)



3

(51 %)

(17 %)

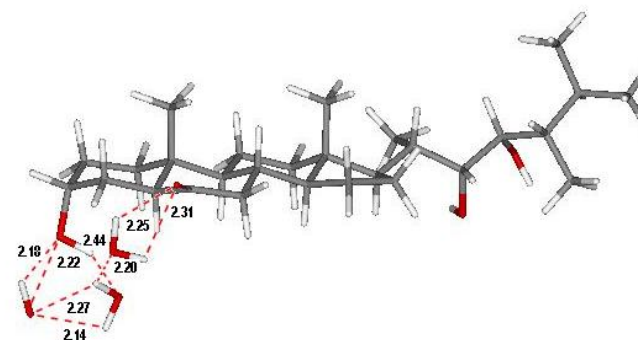
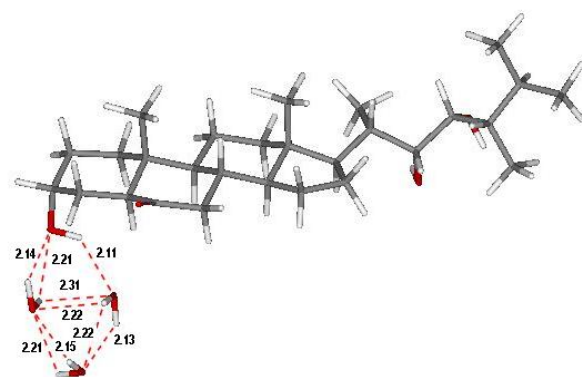


Figura 4.16 - Posiciones preferenciales y poblaciones relativas entre paréntesis de los clusters TF-(H₂O)₂ y TF-(H₂O)₃ según MMH-AM1

4.5.3. Estudio de la interacción de la brasinólida con los aminoácidos naturales.

Aunque se han desarrollado estudios bioquímicos que demuestran la interacción directa entre la brasinólida (**BR**) y la proteína receptora *BR1*^{21,22}, se conoce muy poco de cómo ocurre dicha interacción, esto se debe principalmente a que la *BR1* es una proteína de membrana cuyo posible sitio activo se encuentra en el dominio extracelular de la misma. Lo anterior hace muy difícil su aislamiento por la cercanía a la membrana celular y la baja estabilidad que presenta este complejo¹⁸⁹. En este epígrafe se desarrolla un estudio de la interacción de la **BR** con los 20 aa proteinogénicos. Es importante resaltar que a pesar de ser modelos simplificados de la realidad, consideramos que estos nos ayudarán desde un punto de vista local a lograr una mayor comprensión sobre las posibles interacciones de estas fitohormonas con el receptor en la planta. Este análisis se desarrolló mediante la metodología MMH, según la *variante uno*, como se describió con anterioridad.

En la Tabla 4.15 se muestran las energías de asociación ΔE^{asoc} y la energía libre de asociación de Gibbs, ΔG^{asoc} de la **BR** con cada aa obtenidas según la metodología MMH empleando el hamiltoniano semiempírico AM1. Es importante resaltar que según esta metodología todos los complejos BR-aa fueron estables desde el punto de vista termodinámico, teniendo una interacción más fuerte con los aa cargados. Del análisis de ΔE^{asoc} y ΔG^{asoc} se encontró el siguiente orden de afinidad teórico BR-aa: Glu > Asp > Arg > Lys > His > Thr > Ala, Val, Ser > Ile > Gln > Leu > Gly > Trp, Phe > Cys, Asn > Met > Pro > Tyr. Es importante resaltar que se pueden diferenciar dos grupos en cuanto a afinidad por la **BR**. El primer grupo está integrado por los complejos formados con los aa cargados ácidos y básicos, y en el segundo se pueden ubicar los complejos formados con el resto de los aa.

En la Figura 4.17-4.21 se muestran las estructuras y las poblaciones relativas obtenidas según MMH-AM1 de todos los complejos BR-aa según el grupo al que pertenecan. En el grupo de los aa alifáticos no polares, los complejos BR-ALA y BR-VAL son los que mostraron las mayores asociaciones como lo indica la Tabla 4.15. Con excepción del complejo BR-PRO todos los de este grupo de aa mostraron valores de ΔE^{asoc} y ΔG^{asoc} similares. La cadena lateral de estos aa es no polar, por lo tanto, y como podría esperarse, las interacciones más fuertes de las regiones hidrofílicas de la **BR** ocurren principalmente por los grupos peptídicos (zonas 2 o 3, Figura 3.2 b). Ejemplo de lo anterior constituyen los complejos BR(1)-ALA(3) (63 %), BR(2)-VAL(2) (88 %), BR(1)-ILE(2) (89 %), BR(1)-LEU(3) (85 %), y BR(1)-PRO(2) (54 %), que pueden observarse en la Figura 4.17.

Tabla 4.15 - Energía de asociación ΔE^{asoc} y energía libre de asociación ΔG^{asoc} en kJ/mol a 298.15 K obtenidas mediante la metodología MMH a nivel AM1 de los complejos formados entre la brasinólida (**BR**) y los 20 aa naturales, BR-aa.

| BR-aa | ΔE^{asoc} | ΔG^{asoc} |
|----------------------|-------------------|-------------------|
| Alifáticos: | | |
| BR-GLY | -38.8 | -45.9 |
| BR-ALA | -47.5 | -52.0 |
| BR-ILE | -45.8 | -49.6 |
| BR-LEU | -42.2 | -46.3 |
| BR-VAL | -47.3 | -51.2 |
| BR-PRO | -29.3 | -35.4 |
| Aromáticos: | | |
| BR-PHE | -37.2 | -41.9 |
| BR-TRP | -37.3 | -42.3 |
| BR-TYR | -28.2 | -36.8 |
| Contienen S: | | |
| BR-CYS | -36.7 | -41.8 |
| BR-MET | -32.5 | -37.7 |
| Polares no cargados: | | |
| BR-SER | -47.1 | -52.8 |
| BR-ASN | -36.5 | -44.4 |
| BR-GLN | -43.1 | -47.4 |
| BR-THR | -54.0 | -57.4 |
| Polares cargados: | | |
| BR-GLU | -155.7 | -158.5 |
| BR-ASP | -134.3 | -139.4 |
| BR-ARG | -123.5 | -128.9 |
| BR-LYS | -92.3 | -98.8 |
| BR-HIS | -79.1 | -85.5 |

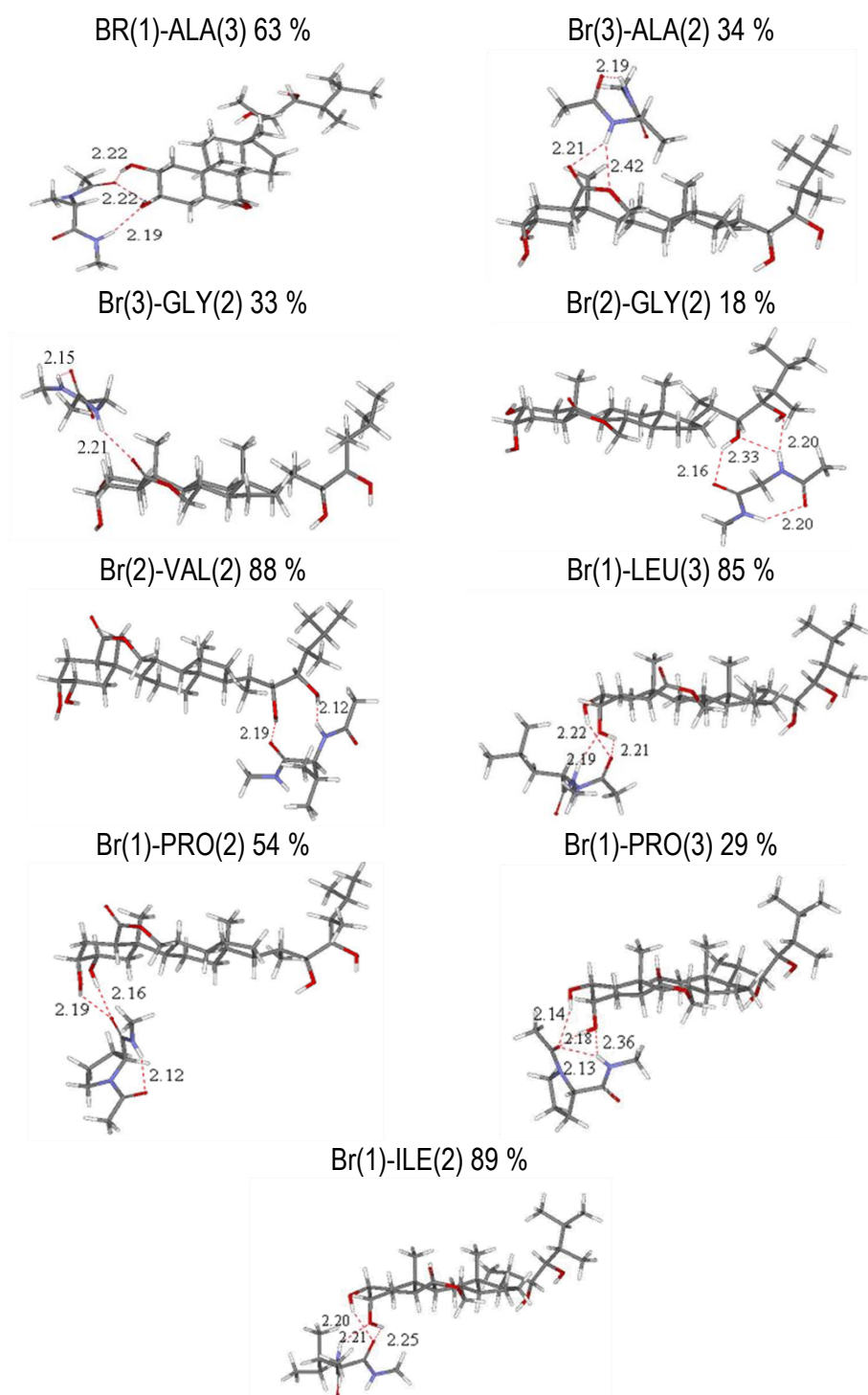


Figura 4.17 Geometrías AM1 y poblaciones relativas de los complejos formados entre la brasinólida (**BR**) y los aa alifáticos (MMH).

Se han realizado búsquedas en bases de datos de las interacciones más probables producidas en los complejos ligando-proteína, encontrándose que los enlaces C=O y NH de la cadena peptídica son responsables de la estabilidad de muchos sitios activos¹⁹⁰.

En el complejo formado con la mayor población relativa entre la **BR** y ALA, BR(1)–ALA(3) el grupo diol del anillo A de la **BR** interactúa con los grupos peptídicos de la ALA. El complejo BR(2)–VAL(2) es también muy estable, lo cual indica que la interacción con el grupo diol de la cadena lateral de la **BR** también está favorecida. Los complejos en los cuales la interacción es producida por el grupo oxalactona de la **BR** y los grupos peptídicos del aa mostraron una gran contribución a la función de partición sólo en los casos de la Gly y la Ala (complejos BR(3)–GLY(2) y BR(3)–ALA(2)). Este tipo de interacción es más difícil que ocurra cuando se incrementa la longitud de la cadena lateral debido al impedimento estérico provocado por el grupo metilo que se encuentra en el C_{10} .

En la Tabla 4.15 se puede observar que los complejos formados con aa aromáticos poseen menor estabilidad que los complejos formados con los alifáticos. Los aa Trp y Phe muestran las mayores asociaciones de este grupo por la **BR**. Como se puede observar en la Figura 4.18 la interacción ocurre preferentemente entre los grupos dioles de la **BR** (anillo A y cadena lateral) y la cadena peptídica de estos aa. Los complejos BR(1)–TRP(3)(73 %), BR(1)–PHE(3) (76 %) y BR(2)–PHE(2) (12 %) son ejemplo del comportamiento anterior. El complejo BR(3)–TRP(1) aparece contribuyendo muy poco a la función de partición (0.7 %), lo cual indica que la interacción con la cadena lateral del Trp está menos favorecida que la interacción con los grupos peptídicos. Los complejos BR-TYR son los menos estables de este grupo y las interacciones preferenciales involucran los enlaces peptídicos de este aminoácido, de lo cual es ejemplo el complejo BR(1)–TYR(3). Además se obtienen algunas asociaciones que muestran al grupo OH de la cadena lateral del mismo interactuando con los dioles del anillo A y la cadena lateral de la **BR**, siendo muestra los complejos: BR(1)–TYR(1) y BR(2)–TYR(1). Estos resultados indican que la interacción de **BR** con la cadena lateral de los aa aromáticos no está tan favorecida como la interacción con la cadena peptídica.

En el Epígrafe 3.5.1 donde fue realizado un estudio de la interacción de la cadena lateral de la **BR** con distintas moléculas que simulaban grupos funcionales importantes en el medio biológico, se obtuvo que la interacción con HCONH_2 estaba más favorecida que la interacción con las moléculas $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, C_6H_6 y $\text{C}_8\text{H}_6\text{NH}$. En el presente trabajo llegamos a la misma conclusión, pues claramente observamos una preferencia de los aa aromáticos a interactuar más por los enlaces peptídicos que por sus cadenas laterales.

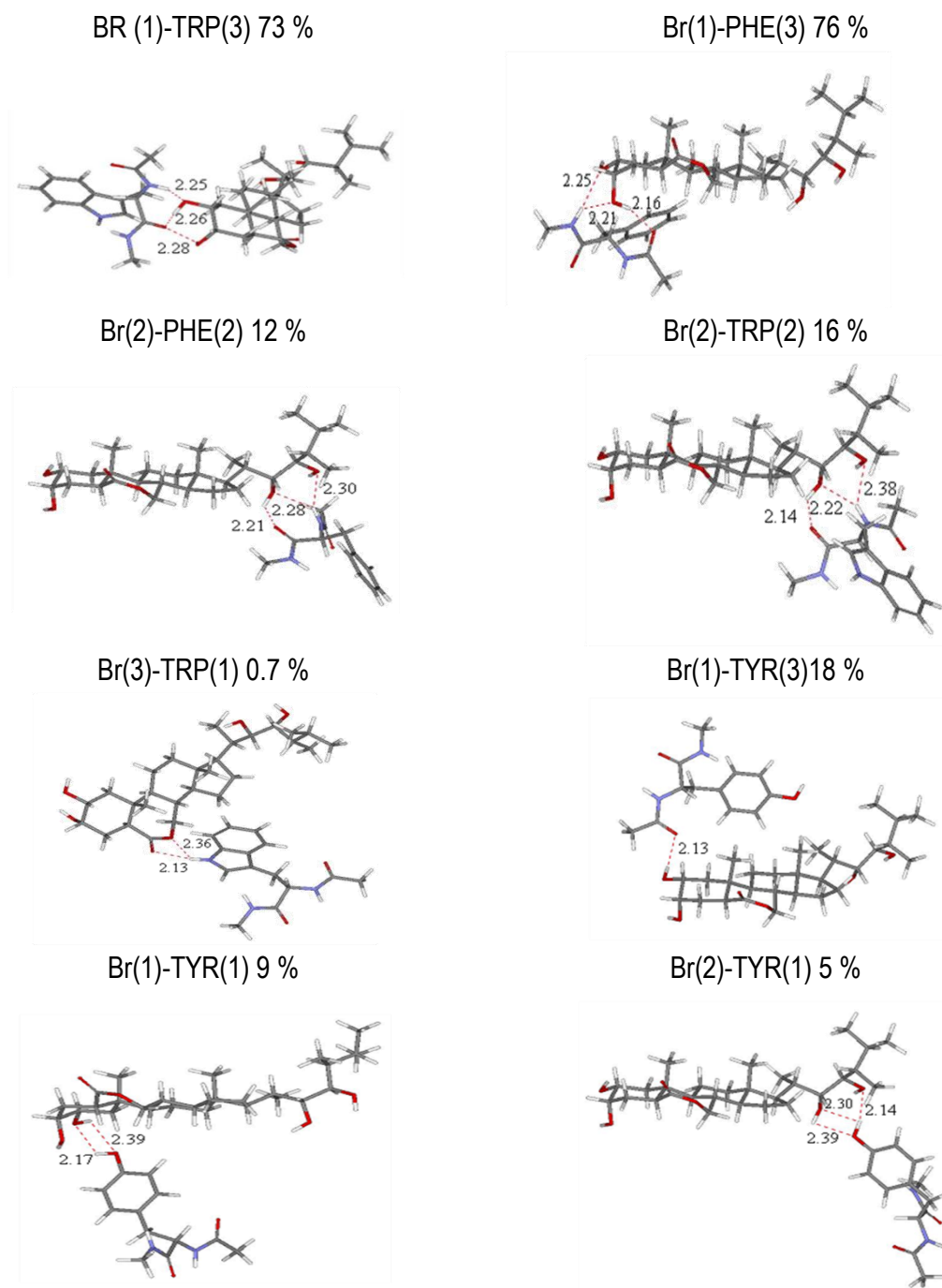


Figura 4.18 Geometrías AM1 y poblaciones relativas de los complejos formados entre la brasinólida (**BR**) y los aa aromáticos (MMH).

Es importante resaltar que el complejo Br(2)-TYR(1), que hemos obtenido por esta vía es muy similar al complejo más estable, $BR_m-C_6H_5OH$, obtenido al nivel de teoría M05-2X/6-31++G(d,p) luego

del análisis conformacional realizado en el Epígrafe 3.5.1. Se observan en este caso interacciones menores de 2.5 Å establecidas entre el grupo –OH de la Tyr y el sistema diol de la cadena lateral de la **BR**. Estos resultados nos permiten validar desde el punto de vista geométrico el modelo de cadena lateral utilizado en los estudios conformacionales. Este modelo además de haber sido validado anteriormente desde el punto de vista energético (Epígrafe 3.5.1), reproduce muy bien las geometrías de los complejos de mayor tamaño.

Los complejos formados entre **BR** y los aa que contienen azufre (Met y Cys) donde la interacción ocurre a través de este heteroátomo, BR(1)–CYS(1) 2e-4 %, poseen muy baja estabilidad y no contribuyen a la función de partición (Figura 4.19). La interacción más fuerte es producida entre los grupos peptídicos de estos aa y las zonas hidrofílicas de la **BR**, ejemplos: Br(2)–CYS(2), BR(3)–CYS(2), BR(2)–MET(2), BR(3)–MET(2) y BR(1)–MET(2). De forma reiterada, los modelos utilizados en el Epígrafe 3.5.1 reflejaron que las interacciones de la cadena lateral de la **BR** con la molécula H₂S poseen muy baja estabilidad.

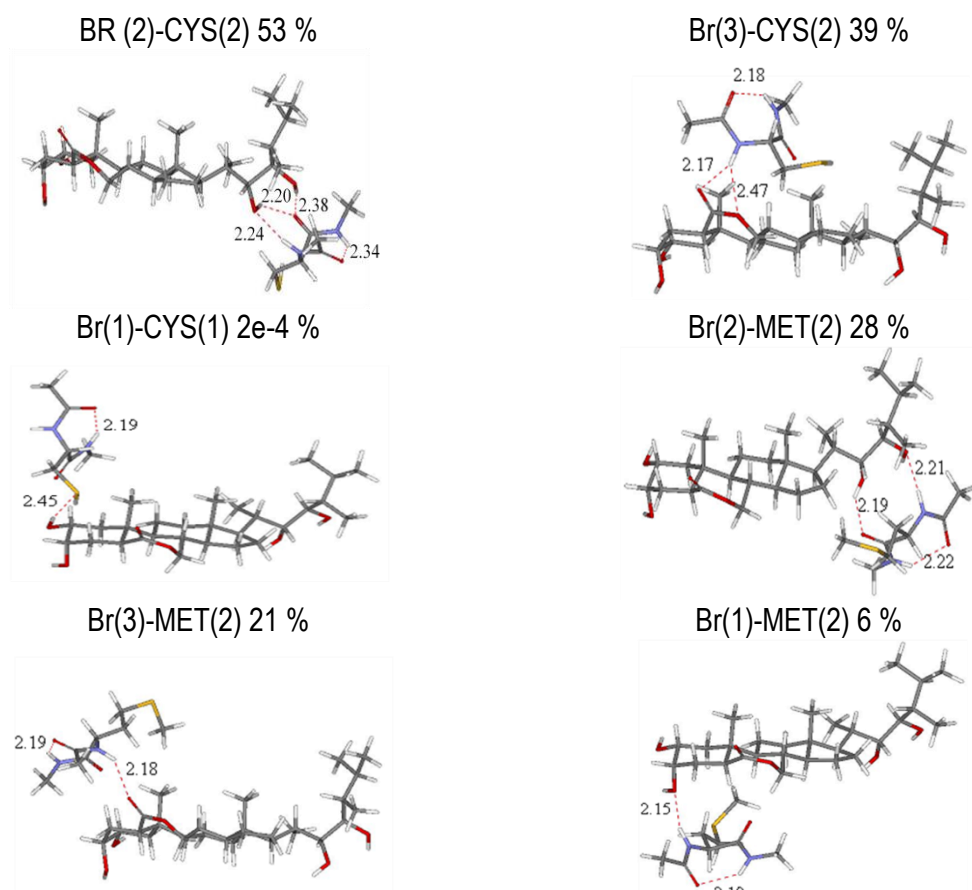


Figura 4.19 Geometrías AM1 y poblaciones relativas de los complejos formados entre la brasinólida (**BR**) y los aa que contienen átomos de azufre (MMH).

Los aa polares no cargados, como podría esperarse, interactúan con **BR** preferencialmente a través de las cadenas laterales. Estos compuestos muestran una estabilidad similar o moderadamente mayor que la de los aa alifáticos. Los complejos con Ser y Thr exhiben las mayores estabilidades dentro de este grupo. Los complejos BR(1)–THR(1;2) (92 %) y BR(1)–SER(1;3) (65 %) poseen las mayores poblaciones relativas de este grupo y muestran dos zonas de interacción entre la **BR** y estos aa. En el caso de BR(1)-THR(1;2) (Figura 4.20) la interacción ocurre entre el -OH del C₃ de la **BR** con dos regiones de la Thr que son el grupo hidroxilo de la cadena lateral y el carbonilo adyacente al C

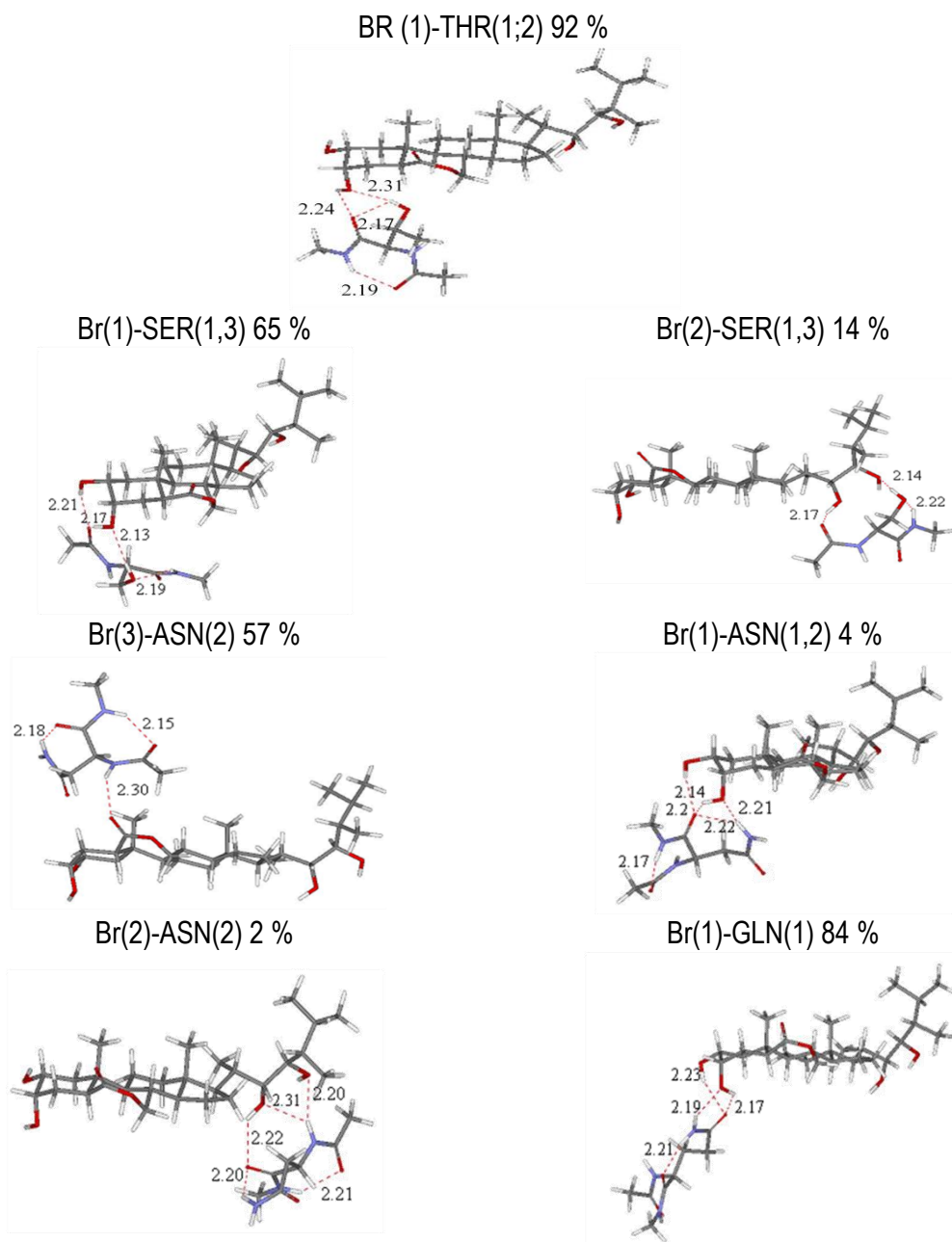


Figura 4.20 Geometrías AM1 y poblaciones relativas de los complejos formados entre la brasinólida (**BR**) y los aa polares no cargados (MMH)

En el caso de BR(1)–SER(1;3) el grupo diol del anillo A de la **BR** interactúa con el grupo -OH de la cadena lateral de la Ser y además con los grupos peptídicos de la misma. Estos dos complejos, BR(1)-THR(1;2) y BR(1)–SER(1;3), están muy estabilizados debido a las múltiples interacciones intra- e intermoleculares que forman. En estos casos aumentan las interacciones intramoleculares presentes en estos aa, lo cual constituye una causa de estabilización que explica las elevadas poblaciones de estos complejos. Los complejos BR(3)–ASN(2) (57 %) y BR(1)–GLN(1) (84 %) son los formados con estos aa que muestran las mayores poblaciones relativas. También se observan complejos como Br(1)-ASN(1,2) y Br(2)-ASN(2) con menores poblaciones y donde se producen también múltiples interacciones a distancias menores de 2.5 Å que estabilizan el sistema.

Los complejos formados entre la **BR** y los aa polares cargados muestran las mayores estabilidades, como lo reflejan los valores absolutos elevados de ΔE^{asoc} y ΔG^{asoc} en la Tabla 4.15. En el intervalo de pH fisiológico estos aa se encuentran completamente ionizados¹⁹¹, lo cual constituye la causa de sus mayores estabilidades. En la Figura 4.21 se muestra que la interacción con **BR** siempre ocurre a través de su cadena lateral, que es polar y cargada. Los aa Glu y Asp muestran las mayores asociaciones por **BR**.

En estos complejos, BR(1;2)-GLU(1;2) (98 %) y BR(1;2)-ASP(1;3) (46 %), la **BR** interactúa a través de dos zonas diferentes con estos aa y estos últimos también involucran dos sitios diferentes de interacción. Como algo interesante se observa que los aa se extienden debajo de la estructura de la **BR**. Sin embargo, este comportamiento puede que se aleje algo de la realidad, debido a que la cadena polipeptídica puede impedir este tipo de doble interacción. En el caso de BR(1;2)-GLU(1;2) los grupos hidroxilos en C₃ y C₂₂ de la **BR** interactúan con el grupo –COO⁻ de la cadena lateral polar y con la región 2 (Figura 3.2) del Glu respectivamente. También en estos casos se observa la presencia de enlaces intramoleculares que vinculan la cadena lateral y los enlaces peptídicos, brindando estabilización a estos complejos.

En el complejo BR(1;2)–ASP(1;3), el Asp también se acomoda debajo de la estructura de la **BR** para poder tener una doble interacción que involucra el sistema diol del anillo A y el –OH del C₂₂ de la misma. El complejo BR(1)-ASP(1) también muestra una contribución significativa a la función de partición del sistema BR-ASP (46 %), pero en este caso la cadena lateral de la **BR** se encuentra en otra conformación diferente a la adoptada en el complejo BR(1;2)–ASP(1;3). En esta conformación el -OH en el C₂₂ se encuentra a una distancia mayor del grupo –C=O del enlace peptídico del Asp y por lo tanto no se produce la doble interacción (BR(1)-ASP(1)).

Los mínimos encontrados por el procedimiento MMH-AM1 muestran la interacción entre los aa básicos cargados (Arg, Lys e His) con la oxalactona del anillo B de la **BR**, (BR(3)–ARG(1) (78 %), BR(3)–LYS(1) (52 %) y BR(3)–HIS(1) (47 %) (Figura 4.21).

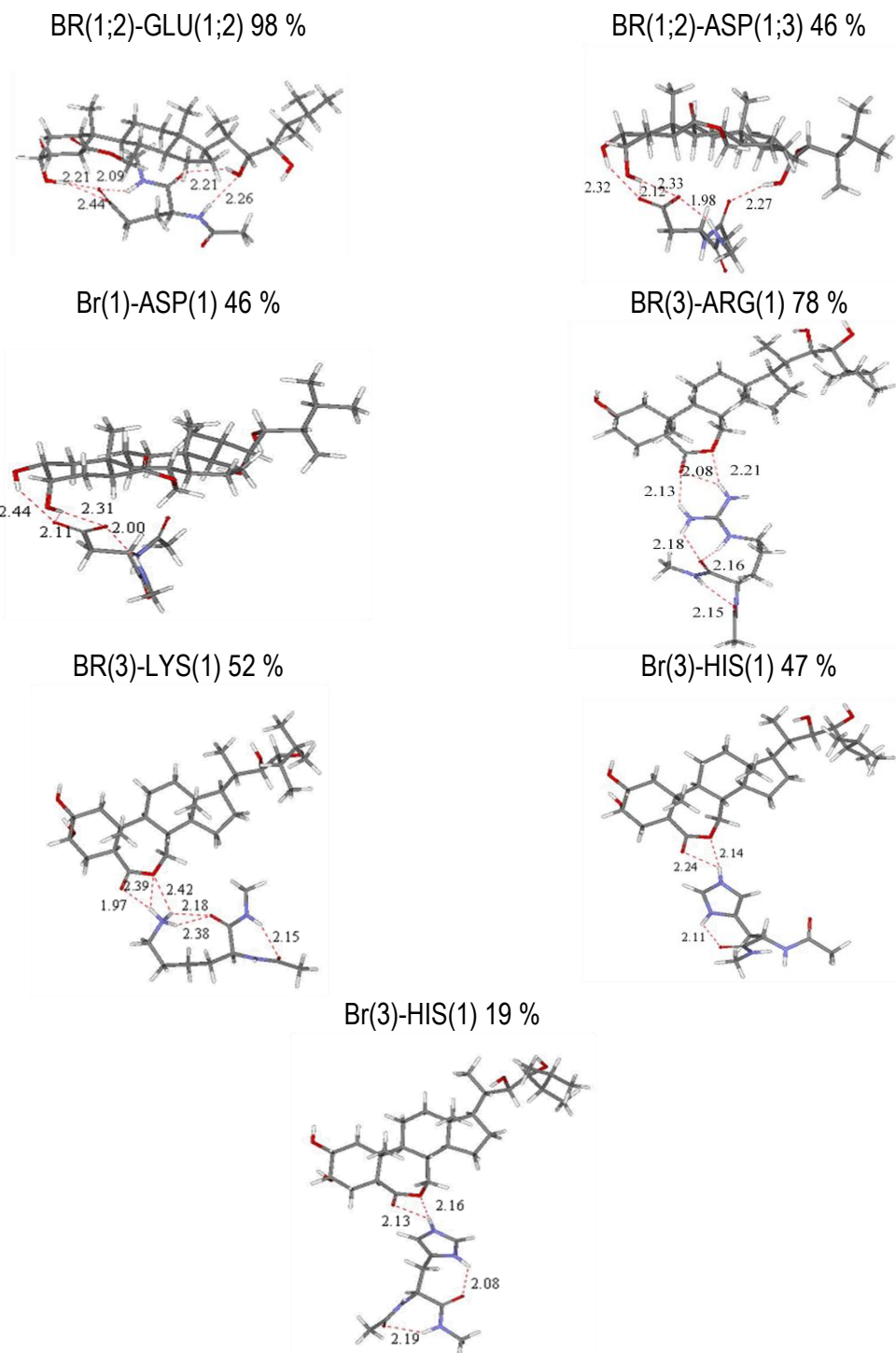


Figura 4.21 Geometrías AM1 y poblaciones relativas de los complejos formados entre la brasinólida (**BR**) y los aa polares cargados obtenidos mediante la metodología MMH.

Los complejos BR-ARG exhiben las mayores asociaciones de este grupo. En todos estos complejos se observa una mayor estabilización de las interacciones producidas entre la cadena lateral de estos aa cargados positivamente y la oxalactona del anillo B. Debido al mayor tamaño y flexibilidad de estas cadenas laterales también se forman enlaces de hidrógeno intramoleculares entre las mismas y la cadena peptídica, brindando una mayor estabilización a estos complejos. Cuando la interacción es producida entre los grupos dioles (anillo A y cadena lateral) de la **BR** y estos aa, se obtienen complejos de muy bajas estabilidades, y por lo tanto contribuyen muy poco a la función de partición. Recientemente se aisló la estructura 3D del receptor de los ecdiesteroides^{171,172} unida a la 20-hidroxicdisona. Como vimos en el Epígrafe 1.5, estas hormonas animales poseen una estructura esteroideal muy similar a la de los BRS, basada en la mayoría de los casos en el esqueleto 5 β -colestano (Figura 2.3) a diferencia de la brasinólida (5 α -colestano, Figura 2.1). Esta semejanza estructural ha hecho posible que el receptor de los ecdiesteroides reconozca a los BRS, lo cual convierte a los BRS en potentes inhibidores de estas hormonas animales. En la Figura 4.22 se muestra el sitio activo de esta proteína acoplada con la 20-hidroxicdisona. Como se puede observar fueron encontradas interacciones a menos de 3 Å con los aa Glu, Arg, Thr, Ala, Tyr y Asn¹⁷¹. Si bien la estructura de estas hormonas no es la misma, es importante destacar que los primeros cuatro aa presentaron en nuestro caso asociaciones importantes por la **BR**. En la Figura 4.22 se observa el grupo -COO⁻ interactuando con el sistema diol 2 β , 3 β del anillo A de la 20-hidroxicdisona, mientras que el enlace -NH adyacente al C α de la Ala formó un enlace de hidrógeno con el grupo -C=O del anillo B. Estas interacciones mostraron grandes similitudes con las encontradas en los complejos BR(1,2)-GLU(1,2) 98 % y BR(3)-ALA(2) 34 %. También se obtuvieron complejos BR-ARG, con poblaciones relativamente bajas, similares a los encontrados en el sitio activo de este ecdiesteroides. Aunque los aa Tyr y Asn mostraron baja asociación por la **BR** estos complejos son estables desde el punto de vista termodinámico, encontrándose interacciones similares entre los grupos -OH de la cadena lateral de la **BR** y las cadenas laterales polares de estos aa. Es importante resaltar que en el estudio desarrollado en el Epígrafe 3.5.1, los complejos formados entre el grupo diol de la cadena lateral de la **BR** y las moléculas C₆H₅OH y HCONH₂, utilizadas para simular las cadenas laterales de los aa Tyr, Asn y Gln, mostraron gran estabilidad.

Los aa Arg, Gln y Thr presentes en los sitios activos de proteínas receptoras de andrógeno mostraron interacciones a menos de 3 Å con esteroides como la progesterona, levonorgestrel y noretindrona (Epígrafe 1.5). Es muy común encontrar en estos sitios activos a la cadena lateral de la Arg formando interacciones con los grupos -C=O del anillo A de estos esteroides. Aunque los BRS difieren

estructuralmente de estos andrógenos, es importante resaltar que una de las interacciones que más estabiliza los complejos BR-ARG es precisamente la que ocurre entre el sistema oxalactona del anillo B de la **BR** y la cadena lateral de la Arg. Ejemplo de lo anterior constituye el complejo BR(3)-ARG(1) con una población estimada del 78 %.

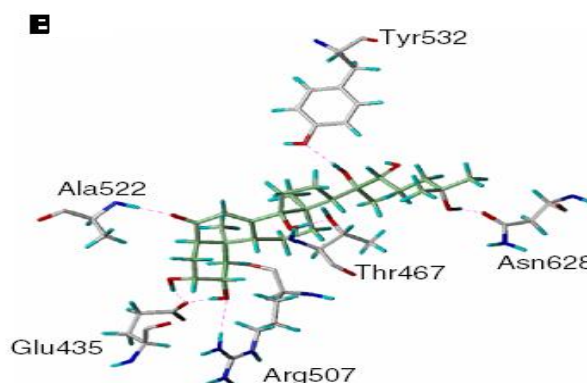


Figura 4.22 - Sitio activo del receptor de los ecdiesteroides acoplado con la 20-hidroxiecdisona¹⁷¹.

Estos resultados nos permiten validar nuestro estudio teórico, debido a que hemos encontrado aa que muestran asociaciones importantes por la **BR** en los sitios activos de diversos esteroides, así como patrones de interacción similares a los encontrados en dichos sitios activos. En este epígrafe hemos obtenido información termodinámica de la superficie de energía potencial de interacción de la **BR** por los diferentes aa, con lo cual podríamos reconocer motivos de la estructura primaria de la proteína receptora con elevada participación en la interacción con los BRS.

4.5.3.1-Estudio de los complejos brasinólida - aminoácidos más estables.

Las Tablas 4.16-4.19 muestran las variaciones en energía interna ($\Delta E^{298.15K}$) y en energía libre de Gibbs ($\Delta G^{298.15K}$) referida al proceso de asociación de la **BR** con Glu, Asp, Arg y Lys a 298.15 K. Las anteriores magnitudes termodinámicas fueron obtenidas mediante cálculos de frecuencia para los métodos AM1, B3LYP/6-31G, B3LYP/6-311+G(d)//B3LYP/6-31G y M05-2X/6-311+G(d)//B3LYP/6-31G añadiendo las correcciones *TCE* y *TCG* según se explicó anteriormente. Estos aa fueron los que mostraron mayor asociación por la **BR** en el análisis MMH-AM1 desarrollado en el epígrafe anterior. Las estructuras B3LYP/6-31G de estos complejos se muestran en las Figuras 4.23 - 4.26. Los complejos marcados con un asterisco fueron los que mayor población mostraron según la metodología MMH-AM1. La mayor exploración realizada de la SEP de asociación entre la **BR** y estos aa se debe a las mayores asociaciones por la **BR** que mostraron los mismos, y además, a que sus cadenas polares cargadas pueden formar una mayor cantidad de interacciones estables.

Tabla 4.16-Cambio en energía interna (^a $\Delta E^{298.15K}$) y en energía libre de Gibbs (^b $\Delta G^{298.15K}$) en kJ/mol del proceso de asociación entre la brasinólida (BR) y el ácido glutámico (Glu) a 298.15 K.

| Complejos | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G |
|------------------------------|------------|--------|-------------|---------------------------------------|--|
| BR(1)-GLU(1) | ΔE | -102.4 | -240.7 | -163.5 | -197.1 |
| | ΔG | -53.4 | -176.8 | -99.6 | -133.2 |
| BR(1)OH ₂ -GLU(1) | ΔE | -116.9 | -202.8 | -139.4 | -162.8 |
| | ΔG | -62.6 | -145.9 | -82.5 | -105.9 |
| BR(1)OH ₃ -GLU(1) | ΔE | -132.8 | -230.2 | -158.0 | -190.5 |
| | ΔG | -73.8 | -174.6 | -102.3 | -134.9 |
| BR(2)-GLU(1) | ΔE | -80.7 | -162.2 | -113.3 | -135.2 |
| | ΔG | -41.5 | -114.0 | -65.1 | -87.0 |
| BR(1;2)-GLU(1;2)* | ΔE | -145.3 | -236.0 | -173.6 | -245.7 |
| | ΔG | -70.3 | -166.3 | -103.9 | -176.0 |
| BR(1;2)-GLU(3;1) | ΔE | -124.1 | -240.0 | -154.8 | -196.0 |
| | ΔG | -61.0 | -169.9 | -84.6 | -125.8 |
| BR(1;2)-GLU(1;3) | ΔE | -103.5 | -210.1 | -137.0 | -173.7 |
| | ΔG | -44.2 | -143.3 | -70.2 | -106.9 |
| BR(3)-GLU(2) | ΔE | -44.3 | -96.9 | -48.5 | -85.6 |
| | ΔG | 9.3 | -38.7 | 9.8 | -27.3 |

^a $\Delta E^{298.15K}$ calculado como $\Delta E = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCE_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCE_{BR}) - (E_{aa} + TCE_{aa})$

^b $\Delta G^{298.15K}$ calculado como $\Delta G = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCG_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCG_{BR}) - (E_{aa} + TCG_{aa})$

TCE-Corrección de la energía interna para T=298.15K.

TCG-Corrección de la energía libre de Gibbs para T=298.15K.

Según los valores de $\Delta G^{298.15K}$ reportados en la Tabla 4.16 por los métodos AM1 y B3LYP/6-311+G(d) los dos complejos BR-GLU de mayor estabilidad, Br(1;2)-GLU(1;2) y BR(1)OH₃-GLU(1), difieren en menos de 4.2 kJ/mol, la que se encuentra en el orden de error esperable de estos métodos^{48,49}. Sin embargo, la diferencia de estabilidades encontrada al nivel de teoría M05-2X/6-311+G(d) para estos dos complejos es mucho mayor (41.1 kJ/mol). El complejo BR(1;2)-GLU(1;2) resultó ser también el más estable según los valores de $\Delta E^{298.15K}$ y $\Delta G^{298.15K}$ encontrados a los ma-

mayores niveles de teoría empleados, B3LYP/6-311+G(d) y M05-2X/6-311+G(d) (Tabla 4.16). Es importante destacar que existen pequeñas diferencias entre la geometría AM1 (Figura 4.21) y la geometría obtenida luego de la reoptimización a nivel B3LYP/6-31G para este complejo, BR(1;2)-GLU(1;2), Figura 4.23.

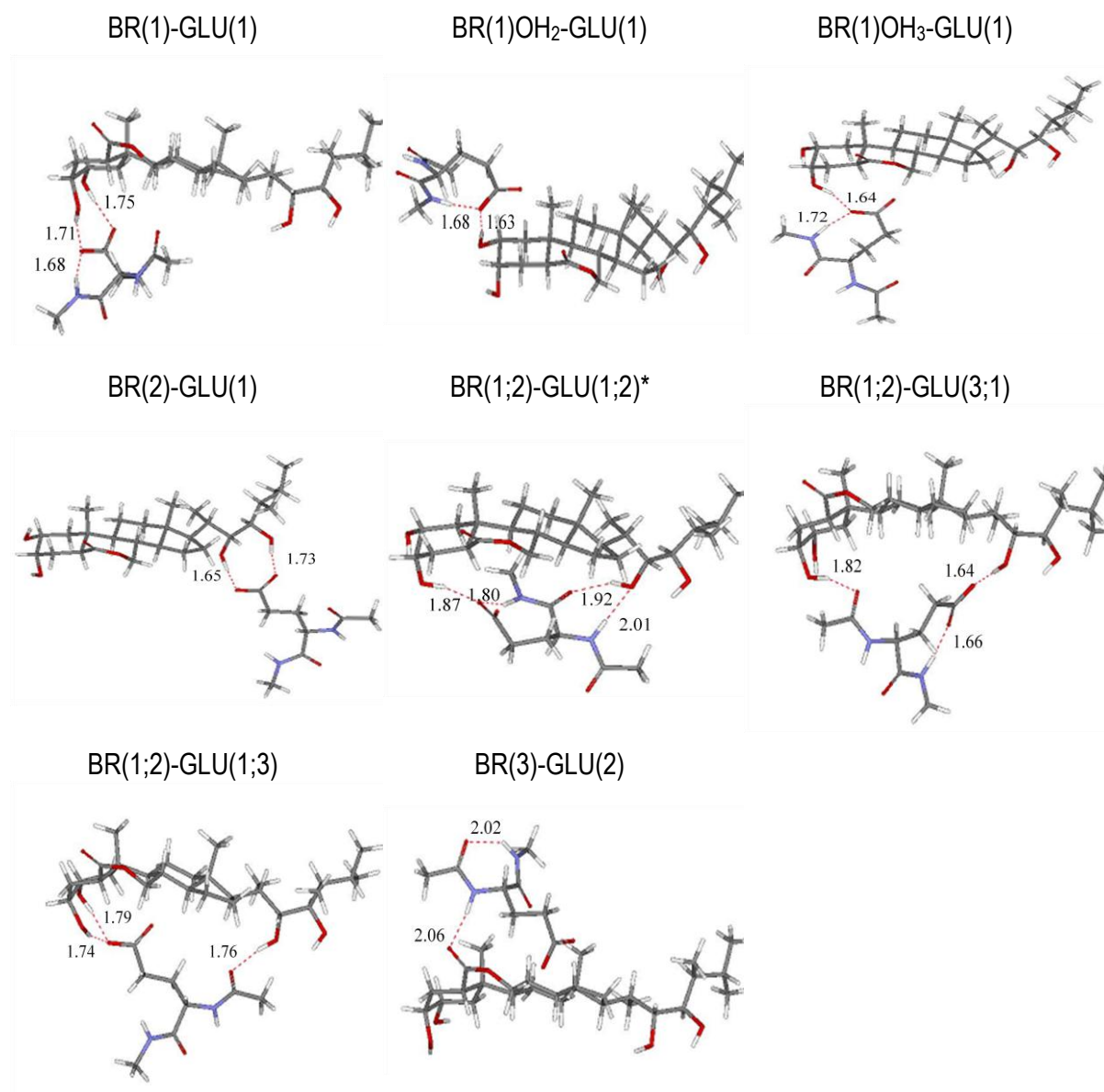


Figura 4.23-Complejos BR-GLU más estables obtenidos a nivel B3LYP/6-31G. *-Estructura de mínimo obtenida por la metodología MMH.

En la Figura 4.21 observamos que la geometría AM1 muestra a los dos átomos de oxígeno del grupo -COO^- involucrados en la interacción con el -OH del C₃ del anillo A de la **BR**. Sin embargo, después de la reoptimización sólo uno de los átomos de oxígeno de este grupo interactúa con el hidroxilo en el C₃ (Figura. 4.23). Todas las distancias de enlace se encuentran por debajo de 2.1 Å,

mostrando la fortaleza de estas interacciones. Como se vio anteriormente a pesar de estas diferencias este complejo resultó ser el más estable según el hamiltoniano semiempírico AM1 y los cálculos DFT desarrollados con la base 6-311+G(d).

El orden de estabildades obtenido según los valores de $\Delta G^{298.15K}$ es muy similar para los cuatro niveles de cálculo empleados. Los complejos: BR(1;2)–GLU(1;3), BR(2)–GLU(1) y BR(3)–GLU(2) son los de menor estabilidad obtenidos por AM1, B3LYP/6-31G y B3LYP/6-311+G(d). El método M05-2X/6-311+G(d) también muestra a los complejos BR(2)–GLU(1) y BR(3)–GLU(2) con las menores estabildades, pero el complejo BR(1;2)–GLU(1;3) es aproximadamente 1 kJ/mol más estable que el complejo BR(1)OH₂–GLU(1). Esta diferencia no rebasa al error esperable del método, por lo cual podemos considerar ambos complejos con similar estabilidad según M05-2X/6-311+G(d).

Es evidente que la interacción del Glu con el anillo B de la **BR** sólo puede producirse a través de su cadena peptídica, debido a la repulsión electrostática entre las cargas parciales negativas de la oxalactona y del grupo carboxilo. El complejo BR(3)–GLU(2), Figura 4.23, es ejemplo de lo anteriormente dicho. En este caso se observa una interacción entre el grupo –NH, adyacente al C α de este aminoácido, con el –C=O del anillo B de la **BR** a una distancia de 2.06 Å. Los valores de $\Delta G^{298.15K}$ positivos dados por los métodos AM1 y B3LYP/6-311+G(d) nos dicen que la formación de este complejo no está favorecida desde el punto de vista termodinámico. No obstante, el funcional M05-2X tiende a estabilizar más a estos complejos, mostrando valores absolutos más elevados de $\Delta E^{298.15K}$ y $\Delta G^{298.15K}$ que los obtenidos a nivel B3LYP/6-311+G(d). Esto puede deberse a que este funcional describe mejor las interacciones dispersivas presentes en estos complejos. Las distancias de enlace son menores de 2 Å en su gran mayoría, lo cual indica que los complejos están estabilizados por enlaces por enlaces de hidrógeno que poseen una fuerte componente electrostática que probablemente domine a los términos dispersivos e inductivos.

Dada la dificultad que presentan muchos métodos teóricos para evaluar las magnitudes termodinámicas, debido principalmente al gran número de aproximaciones que conlleva el cálculo de las mismas, es importante resaltar que los análisis desarrollados con respecto a estas magnitudes han sido esencialmente cualitativos, pero arrojan importante información que corrobora o complementa o sustituye a la intuición en el momento de comprender estas asociaciones.

Los BRS poseen una gran complejidad, presentando un gran número de grados de libertad internos, lo cual imposibilita el uso de mejores métodos para describirlos en términos de costo computacional y puede añadir imprecisiones en los cálculos de estas magnitudes. Es bien conocido que los métodos semiempíricos pueden presentar grandes desviaciones en el cálculo de las correcciones *TCE* y

TCG, sobre todo por la presencia de modos vibracionales de baja energía. Estos modos son característicos de torsiones de simples enlaces que involucran barreras energéticas muy pequeñas. Los valores positivos de $\Delta G^{298.15K}$ obtenidos para determinados complejos pueden deberse a que esta magnitud está más afectada por la aparición de estos modos vibracionales de baja energía. A pesar de lo anteriormente dicho, estos complejos están menos favorecidos que los demás desde el punto de vista termodinámico.

El complejo BR-ASP con la mayor población relativa obtenido mediante la metodología MMH-AM1 fue el complejo BR(1;2)-ASP(1;3), visto con anterioridad en la Figura 4.21.

Tabla 4.17-Cambio en energía interna ($^a \Delta E^{298.15K}$) y en energía libre de Gibbs ($^b \Delta G^{298.15K}$) en kJ/mol del proceso de asociación entre la brasinólida (**BR**) y el ácido aspártico (Asp) a 298.15 K.

| Complejos | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G |
|-------------------|------------|--------|-------------|---------------------------------------|--|
| BR(1)-ASP(1) | ΔE | -81.6 | -125.6 | -85.6 | -109.1 |
| | ΔG | -30.7 | -73.8 | -33.8 | -57.3 |
| BR(2)-ASP(1) | ΔE | -74.9 | -136.3 | -97.5 | -118.5 |
| | ΔG | -31.5 | -93.6 | -54.8 | -75.9 |
| BR(3)-ASP(2) | ΔE | -40.5 | -59.5 | -23.9 | -62.5 |
| | ΔG | 13.9 | -3.0 | 32.6 | -6.0 |
| BR(1;2)-ASP(1;3)* | ΔE | -124.4 | -194.7 | -129.6 | -167.2 |
| | ΔG | -66.4 | -133.3 | -68.1 | -105.7 |
| BR(1;2)-ASP(2;1) | ΔE | -105.0 | -185.0 | -101.4 | -156.2 |
| | ΔG | -34.6 | -112.6 | -29.0 | -83.8 |

^a $\Delta E^{298.15K}$ calculado como $\Delta E = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCE_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCE_{BR}) - (E_{aa} + TCE_{aa})$

^b $\Delta G^{298.15K}$ calculado como $\Delta G = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCG_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCG_{BR}) - (E_{aa} + TCG_{aa})$

TCE-Corrección de la energía interna para T=298.15K.

TCG-Corrección de la energía libre de Gibbs para T=298.15K.

En la Tabla 4.17 se puede ver que este es el complejo más estable obtenido a los cuatro niveles de teoría empleados y además se observa una total coincidencia en cuanto al orden de estabilidad de los complejos BR-ASP dado por los valores de $\Delta G^{298.15K}$ para los métodos AM1, B3LYP/6-31G y M05-2X/6-311+G(d). La geometría AM1 mostrada para el complejo BR(1;2)–ASP(1;3) en la Figura 4.21 posee algunas diferencias con respecto a la reoptimizada a nivel B3LYP/6-31G. En el primer caso el grupo diol del anillo A está participando completamente en la interacción con el grupo –COO[–] de la cadena lateral del Asp, sin embargo en la geometría B3LYP solamente el –OH en el C₃ de la **BR** interactúa con la cadena lateral del Asp.

El complejo BR(3)-ASP(2) es el que menor estabilidad posee, y como se puede observar en la Figura 4.24 no existe interacción entre la cadena peptídica de este aminoácido y la oxalactona del anillo B. De forma similar al complejo BR(3)-GLU(2) visto anteriormente, los métodos AM1 y B3LYP/6-311+G(d) concuerdan en que este complejo no es estable desde el punto de vista termodinámico. Sin embargo, el funcional M05-2X con la base 6-311+G(d) muestra valores de $\Delta E^{298.15K}$ y $\Delta G^{298.15K}$ negativos, lo cual puede deberse a la mejora del mismo en el tratamiento de interacciones de tipo dispersivas, que dominan principalmente a distancias de 2 a 5 Å.

Aunque el orden de estabilidad de los complejos entre la **BR** y los aa Glu y Asp obtenidos a los diferentes niveles: AM1, B3LYP/6-31G, B3LYP/6-311+G(d) y M05-2X/6-311+G(d) no es exactamente el mismo, existe un excelente acuerdo entre los complejos que poseen la mayor y menor estabilidad.

En el caso de los complejos formados entre la **BR** y los aa básicos, Arg y Lys, se obtiene un comportamiento similar. En estos casos los complejos que mayor población exhibieron después de aplicar el MMH-AM1 con una mayor cantidad de configuraciones fueron los mismos obtenidos en el caso del Epígrafe 3.5.3. Estos complejos, BR(3)–ARG(1) y BR(3)–LYS(1), mostraron a la Arg y la Lys interactuando por sus cadenas laterales con la oxalactona del anillo B de la **BR** (Figura 4.25 y 4.26) a distancias menores de 2 Å. El complejo BR(3)–ARG(1) exhibe la interacción entre el grupo carbonilo del anillo B de la **BR** y el grupo –NH₂ de la cadena lateral de la Arg. En el complejo BR(3)–LYS(1) el grupo carbonilo de la **BR** interactúa con el –NH₃⁺ de la Lys. En la Tabla 4.18 y 4.19 se muestran las magnitudes termodinámicas referentes al proceso de asociación BR-ARG y BR-LYS respectivamente. El orden de estabilidad dado por los valores de $\Delta G^{298.15K}$ obtenidos por AM1 para los complejos BR-ARG y BR-LYS coincide con el orden predicho por los tres cálculos realizados a nivel DFT, mientras que AM1 reprodujo completamente la tendencia en los valores de $\Delta E^{298.15K}$ dados por B3LYP/6-311+G(d).

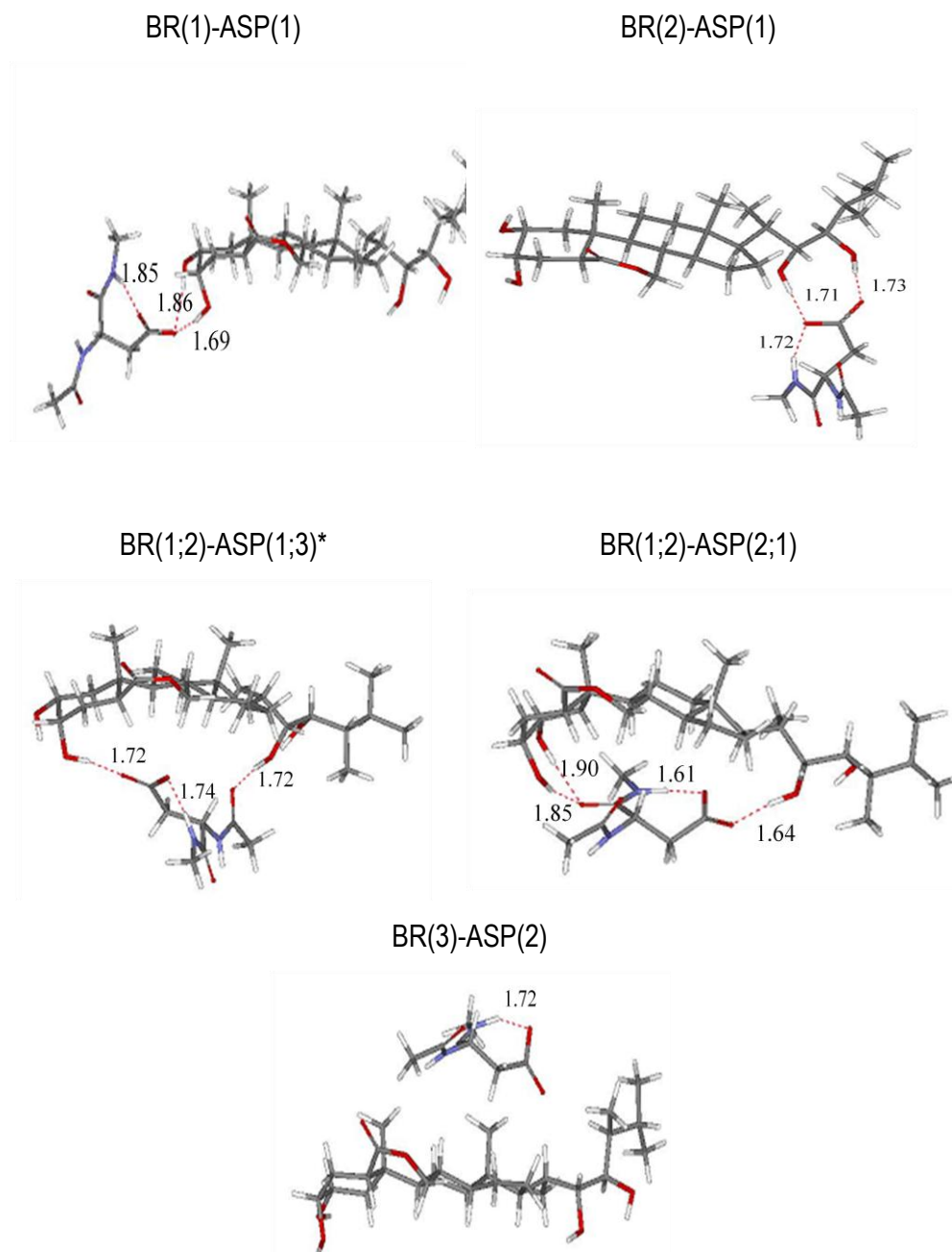


Figura 4.24- Complejos BR-ASP más estables obtenidos a nivel B3LYP/6-31G. *-

Estructura de mínimo obtenida por la metodología MMH

En estos casos se obtiene que la interacción de la cadena lateral de estos aa básicos está más favorecida con la oxalactona del anillo B de la **BR**. Además, también son estables los complejos BR(1)-ARG(1), BR(2)-ARG(1), BR(1)-LYS(1) y BR(2)-LYS(1), que muestran interacciones entre los grupos dioles (anillo A y cadena lateral) de la **BR** y la cadena lateral de estos aa. En el complejo BR(2)-LYS(1) la conformación que adopta el sistema diol de la cadena lateral de la **BR** es muy simi-

lar a la del modelo BR_m-NH₄⁺ resultante de la búsqueda conformacional realizada en el Epígrafe 4.5.1.

Tabla 4.18-Cambio en energía interna (^a $\Delta E^{298.15K}$) y en energía libre de Gibbs (^b $\Delta G^{298.15K}$) en kJ/mol del proceso de asociación entre la brasinólida (**BR**) y la arginina (Arg) a 298.15 K.

| Complejos | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G |
|------------------|------------|--------|-------------|---------------------------------------|--|
| BR(1)-ARG(1) | ΔE | -78.0 | -92.7 | -72.3 | -78.4 |
| | ΔG | -38.4 | -50.3 | -30.0 | -36.1 |
| BR(2)-ARG(1) | ΔE | -63.4 | -59.0 | -43.4 | -49.3 |
| | ΔG | -14.3 | -22.7 | -7.1 | -13.1 |
| BR(3)-ARG(1)* | ΔE | -102.1 | -111.4 | -95.6 | -102.8 |
| | ΔG | -58.2 | -71.9 | -56.1 | -63.3 |
| BR(1;2)-ARG(1;2) | ΔE | -35.2 | -60.3 | -29.5 | -48.4 |
| | ΔG | 24.4 | -3.5 | 27.3 | 8.4 |
| BR(1;2)-ARG(3;1) | ΔE | -44.9 | -77.3 | -34.5 | -60.0 |
| | ΔG | 11.9 | -21.9 | 20.9 | -4.6 |

^a $\Delta E^{298.15K}$ calculado como $\Delta E = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCE_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCE_{BR}) - (E_{aa} + TCE_{aa})$

^b $\Delta G^{298.15K}$ calculado como $\Delta G = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCG_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCG_{BR}) - (E_{aa} + TCG_{aa})$

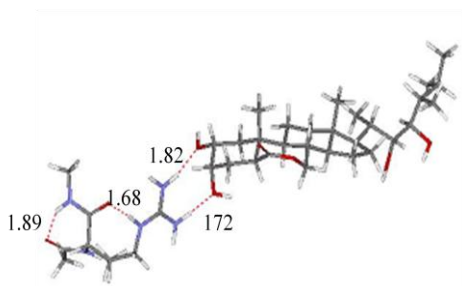
TCE-Corrección de la energía interna para T=298.15K.

TCG-Corrección de la energía libre de Gibbs para T=298.15K.

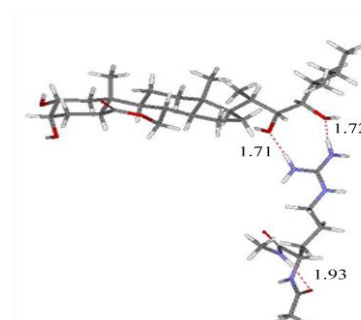
Se encontraron también complejos con poblaciones más bajas que mostraron una doble interacción con la **BR**, involucrando los grupos dioles (anillo A y cadena lateral) de la **BR** y las cadenas lateral y peptídica de estos aa. A diferencia del comportamiento encontrado para los complejos BR-GLU y BR-ASP, los que mostraron una doble interacción con la **BR**, BR(1;2)-ARG(1;2), BR(1;2)-ARG(3;1), Br(1;2)-LYS(1;2) y Br(1;2)-LYS(3;1), exhibieron muy baja estabilidad según los métodos utilizados. Esto puede estar relacionado a un decremento significativo en la entropía durante su formación. Además, esta doble interacción donde la cadena polipeptídica se sitúa debajo del esteroide es difícil que se presente en la realidad, debido a las repulsiones electrostáticas que la misma puede ejercer.

A pesar de las conocidas limitaciones del hamiltoniano semiempírico AM1 en el cálculo de magnitudes termodinámicas absolutas y para describir correctamente las interacciones de tipo dispersivas⁷⁷ presentes en los complejos estabilizados por enlaces de hidrógeno, las geometrías y estabilidades relativas obtenidas mediante este método mostraron buena concordancia con los resultados de B3LYP y M05-2X, especialmente para los complejos más y menos estables obtenidos con los aa Glu, Asp, Arg y Lys. La metodología MMH junto con el hamiltoniano semiempírico AM1 resulta, una vez más, ser una herramienta muy útil en la exploración de la SEP de asociación de la **BR** por los 20 aa.

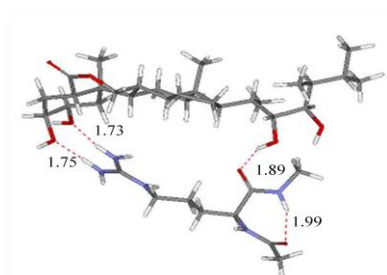
BR(1)-ARG(1)



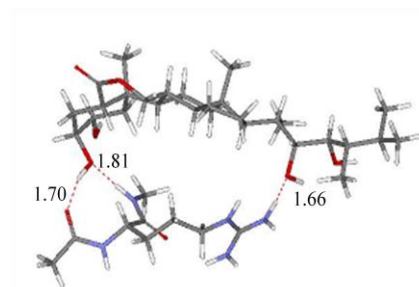
BR(2)-ARG(1)



BR(1;2)-ARG(1;2)



BR(1;2)-ARG(3;1)



BR(3)-ARG(1)*

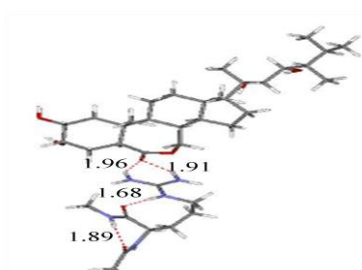


Figura 4.25- Complejos BR-ARG más estables obtenidos a nivel B3LYP/6-31G. *-Estructura de mínimo obtenida por la metodología MMH.

Tabla 4.19- Cambio en energía interna ($^a \Delta E^{298.15K}$) y en energía libre de Gibbs ($^b \Delta G^{298.15K}$) en kJ/mol del proceso de asociación entre la brasinólida (**BR**) y la lisina (Lys) a 298.15 K.

| Complejos | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/ 6-311+G(d)// B3LYP/6-31G |
|------------------|------------|-------|-------------|---------------------------------------|--|
| BR(1)-LYS(1) | ΔE | -62.8 | -83.9 | -63.9 | -70.4 |
| | ΔG | -26.6 | -43.9 | -24.0 | -30.5 |
| BR(2)-LYS(1) | ΔE | -75.1 | -92.8 | -69.9 | -80.7 |
| | ΔG | -35.9 | -50.2 | -27.3 | -38.1 |
| BR(3)-LYS(1)* | ΔE | -86.1 | -98.8 | -84.1 | -88.5 |
| | ΔG | -46.4 | -58.5 | -43.9 | -48.2 |
| BR(1,2)-LYS(1;2) | ΔE | -49.8 | -84.0 | -32.2 | -71.6 |
| | ΔG | 6.2 | -21.5 | 30.3 | -9.2 |
| BR(1,2)-LYS(3;1) | ΔE | -15.7 | -56.4 | -15.3 | -50.2 |
| | ΔG | 37.6 | 0.3 | 41.3 | 6.4 |

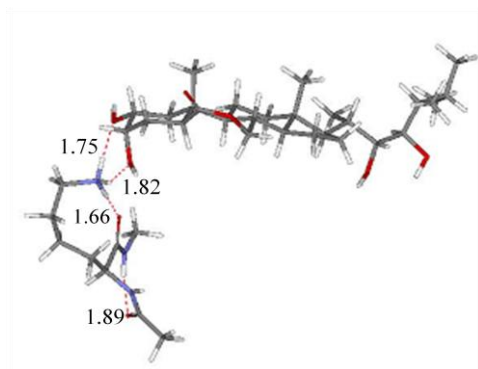
^a $\Delta E^{298.15K}$ calculado como $\Delta E = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCE_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCE_{BR}) - (E_{aa} + TCE_{aa})$

^b $\Delta G^{298.15K}$ calculado como $\Delta G = (E_{\text{complejo BR-aa}} + TCG_{\text{complejo BR-aa}}) - (E_{BR} + TCG_{BR}) - (E_{aa} + TCG_{aa})$

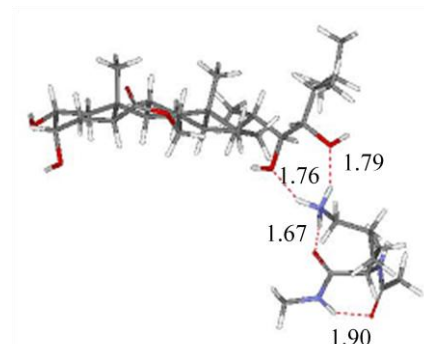
TCE -Corrección de la energía interna para T=298.15K.

TCG -Corrección de la energía libre de Gibbs para T=298.15K.

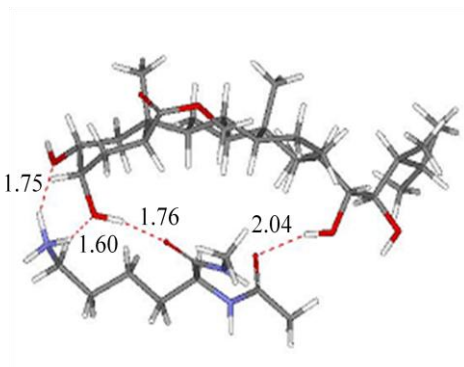
BR(1)-LYS(1)



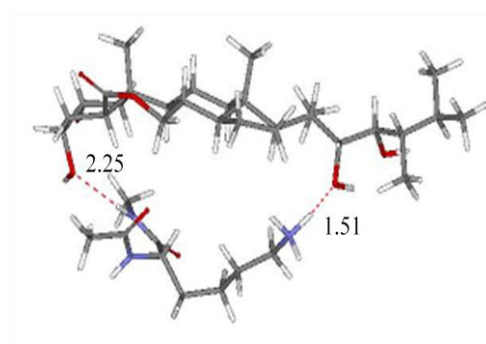
BR(2)-LYS(1)



BR(1;2)-LYS(1;2)



BR(1;2)-LYS(3;1)



BR(3)-LYS(1)*

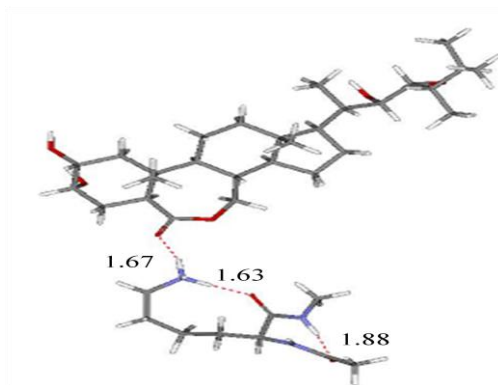


Figura 4.26- Complejos BR-LYS más estables obtenidos a nivel B3LYP/6-31G. *-Estructura de mínimo obtenida por la metodología MMH.

V. CONCLUSIONES

CAPITULO V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se estudió la estructura electrónica de los brasinoesteroides y sus interacciones moleculares mediante la modelación molecular cuántica. Se utilizó como una de las principales “herramientas” para ello la aplicación de la metodología de hipersuperficies de múltiples mínimos. Esto permitió alcanzar a las siguientes conclusiones:

- 1.- Se demostró por primera vez cómo la metodología MMH puede ser usada para la realización de búsquedas conformacionales. Para ello se aplicó en nuestro caso también al problema de la elevada flexibilidad conformacional que presentan las cadenas laterales de los brasinoesteroides naturales. Así, como estos entes son representativos de muchas moléculas complejas se puede esperar que la aplicación del método es prometedora también en estos casos.
- 2.- De todas las posibles conformaciones obtenidas de las cadenas laterales de los brasinoesteroides las más estables prefieren orientarse hacia la cara β del esteroide. El hamiltoniano semiempírico AM1 permitió la obtención de geometrías muy cercanas a la de DRX y debe utilizarse en combinación con los funcionales B3LYP y M05-2X para confirmar sus resultados en cuanto a las estabildades relativas de los confórmeros. Los resultados obtenidos de la aplicación del estudio conformacional mediante MMH-AM1, y DFT fueron muy similares a los resultados de dinámicas moleculares reportadas en los mismos sistemas.
- 3.- Los hamiltonianos semiempíricos AM1 y PDDG/PM3 y los funcionales/bases: B3LYP/6-31G(d,p) y M05-2X/6-31++G(d,p) pueden ser utilizados para la obtención de geometrías confiables de los brasinoesteroides.
- 4.- Mediante criterios geométricos y topológicos se infiere la existencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en los sistemas dioles del anillo A y la cadena lateral de los brasinoesteroides.
- 5.- La interacción del modelo de la cadena lateral de la brasinólida con grupos funcionales importantes no parece cambiar significativamente la conformación más estable de la molécula aislada, según nuestras modelaciones. Los complejos de mayor estabilidad aparecieron en las moléculas cargadas y de mayor polaridad. Todas las interacciones se muestran estabilizadas por enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals para los complejos más débiles.

- 6.- La interacción con H₂O parece estar ligeramente más favorecida para los grupos dioles que para la oxalactona o grupo carbonilo del anillo B. Las magnitudes termodinámicas de asociación de la brasinólida y la castasterona resultaron muy similares y diferentes de las del tifasterol, lo cual indicaría la semejanza estructural y una menor participación del anillo B en la interacción con H₂O.
- 7.- Mediante la metodología MMH se propuso un orden de afinidad teórico de la brasinólida por los aminoácidos. El método AM1 y los funcionales B3LYP y M05-2X fueron consistentes al describir no solo las geometrías de los complejos brasinólida-*aminoácidos* más estables, sino su orden de estabilidades.
- 8.- La zona de interacción de la brasinólida involucrada en la asociación con un aminoácido en particular se mostró dependiente de la naturaleza de este. La interacción de los aminoácidos ácidos involucra los grupos dioles de anillo A y la cadena lateral, mientras que la interacción con los aminoácidos básicos apareció favorecida por el grupo oxalactona.

VI. REFERENCIAS

- (1) Martí, I. J. Tesis de doctorado, Escuela técnica superior IQS, Universidad Ramón Lull, Fundación privada, 2005.
- (2) *Brassinosteroids: A new class of plant hormones*; Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; De Groot, A., Eds.; Academic Press: EUA, 1998.
- (3) Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; De Groot, A. *Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century*; *Annals of Botany (London)* **2000**, *86*, 441-447.
- (4) *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*; Sakurai, A., Ed.; Springer: Tokyo, 1999.
- (5) Bajguz, A.; Tretyn, A. *The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants*; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1027-1046.
- (6) Sasse, J. M. *Physiological actions of brassinosteroids: An update*; *J Plant Growth Regul* **2003**, *22*, 276-288.
- (7) Bajguz, A.; Hayat, S. *Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses*; *Plant Phys. Biochem.* **2009**, *47*, 1-8.
- (8) Krishna, P. *Brassinosteroid-mediated stress responses*; *J Plant Growth Regul* **2003**, *22*, 289-297.
- (9) Brosa, C.; Capdevila, J. M.; Zamora, I. *Brassinosteroids: A new way to define the structural requirements*; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2435-2448.
- (10) Capdevila, E.; Molist, M.; Vilaplana-Polo, M.; Brosa, C. *20 years of research on brassinosteroids at the Steroids Laboratory of IQS*; *Afinidad* **2007**, *64*, 303-323.
- (11) Brosa, C. In *Brassinosteroids*; Springer-Verlag Tokyo: Tokyo, 1999, p 191-222.
- (12) 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*; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7129-7141.
- (13) Back, T. G.; Janzen, L.; Nakajima, S. K.; Pharis, R. P. *Effect of chain length and ring size of alkyl and cycloalkyl side-chain substituents upon the biological activity of brassinosteroids. Preparation of novel analogues with activity exceeding that of brassinolide*; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3047-3052.
- (14) Back, T. G.; Pharis, R. P. *Structure-activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity*; *J. Plant Growth Regul.* **2003**, *22*, 350-361.
- (15) Baron, D. L.; Luo, W.; Janzen, L.; Pharis, R. P.; Back, T. G. *Structure-activity studies of brassinolide B-ring analogues*; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1849-1858.
- (16) Luo, W. D.; Janzen, L.; Pharis, R. P.; Back, T. G. *Bioactivity of brassinolide methyl ethers*; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 637-642.
- (17) Sung, G. C. Y.; Janzen, L.; Pharis, R. P.; Back, T. G. *Synthesis and bioactivity of 6 alpha- and 6 beta-hydroxy analogues of castasterone*; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 121-126.
- (18) Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Takematsu, T.; Takeuchi, Y.; Koguchi, M. *Structure-activity relationship of brassinosteroids*; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2437-2441.
- (19) Borisevich, N. A.; Buslov, D. K.; Zhabinskii, V. N.; Khripach, V. A. *IR spectra of stigmasterane series brassinosteroids differing in configuration and number of diol groups*; *J. Appl. Spectrosc.* **2009**, *76*, 617-622.
- (20) Belkhadir, Y.; Chory, J. *Brassinosteroid signaling: A paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface*; *Science* **2006**, *314*, 1410-1411.
- (21) Kinoshita, T.; Cano-Delgado, A.; Seto, H.; Hiranuma, S.; Fujioka, S.; Yoshida, S.; Chory, J. *Direct binding of brassinosteroids to the extracellular domain of leucine-rich repeat receptor kinase BRI1*; *Plant Cell Phys.* **2005**, *46*, S49-S49.
- (22) Kinoshita, T.; Cano-Delgado, A. C.; 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.
- (23) Sisa, M.; Vilaplana-Polo, M.; Ballesteros, C. B.; Kohout, L. *Brassinolide activities of 2 alpha,3 alpha-diols versus 3 alpha,4 alpha-diols in the bean second internode bioassay: Explanation by molecular modeling methods*; *Steroids* **2007**, *72*, 740-750.
- (24) He, Z. H.; Wang, Z. Y.; Li, J. M.; Zhu, Q.; Lamb, C.; Ronald, P.; Chory, J. *Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1*; *Science* **2000**, *288*, 2360-2363.
- (25) Li, J. M.; Chory, J. *A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction*; *Cell* **1997**, *90*, 929-938.

- (26) Yun, H. S.; Bae, Y. H.; Lee, Y. J.; Chang, S. C.; Kim, S. K.; Li, J. M.; Nam, K. H. *Analysis of phosphorylation of the BRI1/BAK1 complex in arabidopsis reveals amino acid residues critical for receptor formation and activation of BR signaling*; *Molecules and Cells* **2009**, 27, 183-190.
- (27) Hobza, P.; Zahradnik, R.; Muller, K. *The world of non-covalent interactions: 2006*; *Coll. of Czech. Chem. Comm.* **2006**, 71, 443-531.
- (28) Dethlefs, M.; Hobza, P. *Noncovalent interactions: A challenge for experiment and theory*; *Chem. Rev.* **2000**, 100, 143-167.
- (29) *Molecular Modelling, Principles and Applications*; Leach, A. R., Ed.; Produced by Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd.: Edinburgh Gate, Harlow, 1996.
- (30) 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*; *Coll. Czech. Chem. Comm.* **1998**, 63, 1635-1645.
- (31) Brosa, C.; Zamora, I.; Terricabras, E.; Soca, L.; Peracaula, R.; Rodriguez-Santamarta, C. *Synthesis and molecular modeling: Related approaches to progress in brassinosteroid research*; *Lipids* **1997**, 32, 1341-1347.
- (32) Drosihn, S.; Porzel, A.; Brandt, W. *Determination of preferred conformations of brassinosteroids by means of NMR investigations and Boltzmann statistical analysis of simulated annealing calculations*; *J. Mol. Model.* **2001**, 7, 34-42.
- (33) Yamamoto, S.; Watanabe, B.; Otsuki, J.; Nakagawa, Y.; Akamatsub, M.; Miyagawaa, H. *Synthesis of 26,27-bisnorcastasterone analogs and analysis of conformation-activity relationship for brassinolide-like activity*; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 1761-1770.
- (34) Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; Ivanova, G. V.; Fando, G. P.; Dmitrii, V. T.; Natalya, B. K.; Alexander, S. L.; Misarin, A. Y. *NMR and X-ray studies of isomeric 22,23-dihydroxy stigmastanes*; *J. Mol. Struct.* **2010**, 975, 242-246.
- (35) Rezac, J.; Fanfrlík, J.; Salahub, D.; Hobza, P. *Semiempirical quantum chemical PM6 method augmented by dispersion and H-bonding correction terms reliably describes various types of noncovalent complexes*; *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5, 1749-1760.
- (36) Montero, L. A.; Esteva, A. M.; Molina, J.; Zapardiel, A.; Hernandez, L.; Marquez, H.; Acosta, A. *A theoretical approach to analytical properties of 2,4-diamino-5-phenylthiazole in water solution. Tautomerism and dependence on pH*; *J. Amer. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12023-12033.
- (37) Montero, L. A.; Molina, J.; Fabian, J. *Multiple minima hypersurfaces of water clusters for calculations of association energy*; *International Journal of Quantum Chemistry* **2000**, 79, 8-16.
- (38) *Reviews in computational chemistry*; Lipkowitz, K. B., Boyd, D, Ed.; VCH Publishers (UK) Ltd.: Cambridge, 1992; Vol. III.
- (39) *Computational Chemistry: A practical guide for applying techniques to real world problems*. Wiley & Sons, ISBN: 0471333689D; Young, D., Ed., 2001.
- (40) *Essentials of Computational Chemistry: theories and models*. Cramer, C. J.; Wiley & Sons, ISBN: 0471485527., 2002.
- (41) *Elementos de Mecánica Cuántica y Estructura Atómica*; Ortiz, P. J.; Pérez, C. S., Eds. Facultad de Química, Universidad de la Habana, 1982.
- (42) *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Szabo, A. Ostlund, N. S.; Dover Publications: Mineola, N.Y., 1996.
- (43) Vanduijneveldt, F. B.; Vanduijneveldt-van derijdt, J. G. C. M.; Vanlenthe, J. H. *State of the art in counterpoise theory*; *Chem. Rev.* **1994**, 94, 1873-1885.
- (44) Boys, S. F.; Bemardi, F.; *Mol. Phys* **1970**, 19, 553-566.
- (45) Hobza, P.; Havlas, Z. *Counterpoise-corrected potential energy surfaces of simple H-bonded systems*; *Theor. Chem. Acc.* **1998**, 99, 372-377.
- (46) Lowdin, P. O. *Correlation problem in many-electron quantum mechanics .1. Review of different approaches and discussion of some current ideas*. ;*Adv. Chem. Phys.* **1959**, 2, 207-322.
- (47) Werner, H. J.; Frederick, R. M.; Knowles, P. J. *Fast linear scaling second-order Møller-Plesset perturbation theory (MP2) using local and density fitting approximations*; *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 8149-8161.
- (48) *A chemists guide to Density Functional Theory*. Koch, W and Holthausen, M. C.; 2nd edition, Wiley & Sons, ISBN: 3527303723., 2002.
- (49) *Química Cuántica*. Levine, I.N.; Prentice Hall, 2001.
- (50) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. *Conceptual Density Functional Theory*; *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1793-1873.

- (51) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *General Performance of Density Functionals*; *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 10439-10452.
- (52) Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. *Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin-density calculations- a critical analysis.* ;*Canadian Journal of Physics* **1980**, *58*, 1200-1211.
- (53) Becke, A. D. *Density functional calculations of molecular-bond energies*; *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4524-4529.
- (54) Becke, A. D. *Density-functional thermochemistry. 1. The effect of the exchange-only gradient correction*; *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 2155-2160.
- (55) Becke, A. D. *Density functional thermochemistry. 2. The effect of the Perdew-wang generalized gradient correlation correction.*; *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 9173-9177.
- (56) Becke, A. D. *Density functional thermochemistry. 3. the role of exact exchange.*; *J. Phys. Chem.* **1993**, *98*, 5648-5652.
- (57) Becke, A. D. *Density-functional thermochemistry .4. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing*; *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 1040-1046.
- (58) Becke, A. D. *Density-functional thermochemistry .5. Systematic optimization of exchange-correlation functionals*; *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 8554-8560.
- (59) Perdew, J. P.; Kurth, S.; Zupan, A.; Blaha, P. *Accurate density functional with correct formal properties: A step beyond the generalized gradient approximation*; *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 2544-2547.
- (60) Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density.*; *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
- (61) Becke, A. D. *A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories* *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372-1377.
- (62) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *Ab-initio calculation of vibrational absorption and circular-dichroism spectra using density-functional force-fields.*; *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623-11627.
- (63) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Density functionals with broad applicability in chemistry*; *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 157-167.
- (64) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Comparative DFT study of van der Waals complexes: Rare-gas dimers, alkaline-earth dimers, zinc dimer, and zinc-rare-gas dimers*; *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 5121-5129.
- (65) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Density functionals for noncovalent interaction energies of biological importance*; *J. Chem. Theor. Comp.* **2007**, *3*, 289-300.
- (66) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *How well can new-generation density functionals describe protonated epoxides where older functionals fail?*; *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 295-298.
- (67) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Exploring the Limit of Accuracy of the Global Hybrid Meta Density Functional for Main-Group Thermochemistry, Kinetics, and Noncovalent Interactions*; *J. Chem. Theor. Comp.* **2008**, *4*, 1849-1868.
- (68) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *How well can new-generation density functionals describe the energetics of bond-dissociation reactions producing radicals?*; *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1095-1099.
- (69) Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions*; *J. Phys. Chem.* **2005**, *123*.
- (70) Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and non-covalent interactions*; *J. Chem. Theor. Comp.* **2006**, *2*, 364-382.
- (71) Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*; Wiley & Sons, ISBN: 0471980554., 1999.
- (72) Thiel, W. *Ground states of molecules. The MNDO method. Approximations and parameters*; *J. Amer. Chem. Soc.* **1977** *99*, 4899-4907.
- (73) In *Semiempirical methods*; Thiel, W. J., Ed.; Grotendorst (Ed.: Julich, 2000, p 261-283.
- (74) Stewart, J. J. P.; *J. Comp. Chem.* **1989** *10*, 221-235.
- (75) Stewart, J. J. P.; *J. Comp. Chem.* **1991** *12*, 320-325.
- (76) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *A density functional that accounts for medium-range correlation energies in organic chemistry*; *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5753-5755.
- (77) Clark, T. *Quo Vadis semiempirical MO-theory?*; *J. Mol Struct, Theochem* **2000**, *530*, 1-10.

- (78) Winget, P.; Selcuki, C.; Horn, A. H. C.; Martin, B.; Clark, T. Towards a "next generation" neglect of diatomic differential overlap based semiempirical molecular orbital technique; *Theor. Chem. Acc.* **2003**, *110*, 254-266.
- (79) Bernal, M. I.; Ruiz, M. F. Basic ideas for the correction of semiempirical methods describing H-bonded systems; *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *330*, 118-124.
- (80) Ludwig, O.; Schinke, H.; Brandt, W. Reparametrisation of force constants in MOPAC 6.0/7.0 for better description of the activation barrier of peptide bond rotations; *J. Mol. Model.* **1996**, *2*, 341-350.
- (81) Repasky, M. P.; Chandrasekhar, J.; Jorgensen, W. L. PDDG/PM3 and PDDG/MNDO: Improved semiempirical methods; *J. Comp. Chem.* **2002**, *23*, 1601-1622.
- (82) Tubert, I.; Guimaraes, C. R. W.; Repasky, M. P.; Jorgensen, W. L. PDDG/PM3 and PDDG/MNDO: Extension to the halogens; *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2003**, 226, 127.
- (83) Tubert, I.; Guimaraes, C. R. W.; Repasky, M. P.; Jorgensen, W. L. Extension of the PDDG/PM3 and PDDG/MNDO semiempirical molecular orbital methods to the halogens; *J. Comp. Chem.* **2004**, *25*, 138-150.
- (84) Dewar, M. J. S.; Jie, C.; Yu, J.; *Tetrahedron* **1993**, *49*, 5003.
- (85) Ferguson, D. M.; Gould, W. A.; Glauser, W. A.; Schroeder, S.; Kollman, P. A. Comparison of *ab initio*, semiempirical, and molecular mechanics calculations for the conformational analysis of ring systems; *J. Comp. Chem.* **1992**, *13*, 525-532.
- (86) Davila, L. Y. A.; Caldas, M. J. Applicability of MNDO techniques AM1 and PM3 to ring-structured polymers; *J. Comp. Chem.* **2002**, *23*, 1135 - 1142.
- (87) Häber, T.; Kevorkiants, R.; Thiel, W.; Suhm, M. A. The performance of the semi-empirical AM1 method on small and nanometer-sized N₂O clusters; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 4939 - 4949.
- (88) Suna, Y. C., Dezhnan and Liu, Chengbu. Evaluation of the effectiveness of AM1 geometry used in calculating O-H bond dissociation enthalpy; *J. Mol Struct, Theochem* **2002**, *618*, 181-189.
- (89) Tomassi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models; *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999-3093.
- (90) <<http://karin.fq.uh.cu/mmh/>>. 2009.
- (91) Sánchez García, E. Computational Study of Weakly Interacting Complexes; Ruhr Universität Bochum, Dissertation for the Degree of Doktor der Naturwissenschaften **2006**.
- (92) Tanimoto, T. T.; IBM Internal Report 17th Nov. **1957**.
- (93) Lipkus, A. H. A proof of the triangle inequality for the Tanimoto distance; *J. Math. Chem.* **1999**, *26*, 263-265.
- (94) 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.
- (95) Bultinck, P.; Girones, X.; Carbo-Dorca, R. Molecular quantum similarity: Theory and applications; *Reviews in Computational Chemistry* **2005**, *21*, 127-207.
- (96) Girones, X.; Robert, D.; Carbo-Dorca, R. TGSA: A molecular superposition program based on topo-geometrical considerations; *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 255-263.
- (97) Crespo, R.; Perez-Badell, Y.; Padron-Garcia, J. A.; Montero-Cabrera, L. A. Exploring the potential energy surfaces of association of NO with aminoacids and related organic functional groups: the role of entropy of association; *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 649-663.
- (98) Codorniu, E.; Mesa, A.; Hernandez, R.; Montero, L. A.; Martinez, F.; Santana, J. L.; Borrmann, T.; Stohrer, W. D. Essential amino acids interacting with flavonoids: A theoretical approach; *International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *103*, 82-104.
- (99) Codorniu, E.; Mesa, A.; Montero, L.; Martinez, F.; Stohrer, W. D. MO-calculations on the solvation effects on the structure of natural flavonoids in aqueous and acetone phases; *J. Mol Struct, Theochem* **2005**, *715*, 227-239.
- (100) Codorniu, E.; Mesa, A.; Montero, L. A.; Martinez, F.; Borrmann, T.; Stohrer, W. D. Theoretical study of flavonoids and proline interactions. Aqueous and gas phases; *J. Mol Struct, Theochem* **2003**, *623*, 63-73.
- (101) Codorniu, E.; Rolo, A.; Montero, L. A. Theoretical affinity order among flavonoids and amino acid residues: An approach to understand flavonoid-protein interactions; *J. Mol Struct, Theochem* **2007**, *819*, 121-129.

- (102) Bader, R. F. W. *Quantum topology of molecular charge-distributions.3. The mechanics of an atom in a molecule.* ;*J. Chem. Phys.* **1980**, 73, 2871-2883.
- (103) Bader, R. F. W. *Atoms in molecules*; *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 9-15.
- (104) Pakiari, A. H.; Fakhraee, S. *Electron density analysis of weak van der Waals complexes*; *J. Theor. Comp. Chem.* **2006**, 5, 621-631.
- (105) Rozas, I.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Behavior of Ylides Containing N, O, and C Atoms as Hydrogen Bond Acceptors*; *J. Amer. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11154-11161.
- (106) Steiner, T.; Desiraju, G. R. *Distinction between the weak hydrogen bond and the van der Waals interaction*; *Chem. Comm.* **1998**, 891-892.
- (107) Sosa, G. L.; Peruchena, N. M.; Contreras, R. H.; Castro, E. A. *Topological and NBO analysis of hydrogen bonding interactions involving C-H...O bonds*; *J. Mol Struct, Theochem* **2002**, 577, 219-228.
- (108) Steiner, T. *Unrolling the hydrogen bond properties of C-H...O interactions*; *Chem. Comm.* **1997**, 8, 727-734.
- (109) Steiner, T. *Donor and acceptor strengths in C-H... O hydrogen bonds quantified from crystallographic data of small solvent molecules*; *New Journal of Chemistry* **1998**, 22, 1099-1103.
- (110) *The weak hydrogen bond : in structural chemistry and biology*; Gautam R. Desiraju, T. S., Ed. Oxford university press, 2001.
- (111) Koch, U.; Popelier, P. L. A. *Characterization of C-H-O hydrogen bonds on the basis of the charge density*; *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 9747-9754.
- (112) Popelier, P. L. A. *Characterization of a dihydrogen bond on the basis of the electron density*; *J. Chem. Phys. A* **1998**, 102, 1873-1878.
- (113) Hansch, C. *Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships*; *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2, 232-239.
- (114) Debnath, A. K. *Quantitative structure-activity relationship (QSAR) paradigm - Hansch era to new millennium*; *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2001**, 1, 187-195.
- (115) Pastor, M.; Cruciani, G.; Watson, K. A. *A Strategy for the Incorporation of water molecules present in a ligand binding site into a three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis*; *J. Med. Chem* **1997**, 40, 4089-4102.
- (116) Goodford, P. J. *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules*; *J. Med. Chem* **1985**, 28, 849-857.
- (117) Johri, M. M.; Mitra, D. *Action of plant hormones*; *Current Science* **2001**, 80, 199-205.
- (118) Gray, W. M. *Hormonal regulation of plant growth and development*; *Plos Biology* **2004**, 2, 1270-1273.
- (119) Chow, B.; McCourt, P. *Plant hormone receptors: perception is everything*; *Genes & Development* **2006**, 20, 1998-2008.
- (120) Spartz, A. K.; Gray, W. M. *Plant hormone receptors: new perceptions*; *Genes & Development* **2008**, 22, 2139-2148.
- (121) Peng, J. R.; Richards, D. E.; Hartley, N. M.; Murphy, G. P.; Devos, K. M.; Flintham, J. E.; Beales, J. *'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators*; *Nature* **1999**, 400, 256-261.
- (122) Mussig, C.; Altmann, T. *Brassinosteroid signaling in plants*; *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2001**, 12, 398-402.
- (123) Rajala, A. *Plant growth regulators to manipulate oat stands*; *Agric. Food. Sci.* **2004**, 13, 186-197.
- (124) Stover, E. W.; Greene, D. W. *Environmental effects on the performance of foliar applied plant growth regulators: A review focusing on tree fruits*; *Horttechnology* **2005**, 15, 214-221.
- (125) Mitchell, J. W.; Whitehead, M. R. *Responses of vegetative parts of plants following application of extract of pollen from Zea mays*; *Botanical Gazette* **1941**, 102, 770-790.
- (126) Mitchell, J. W.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Plimmer, J. R.; Smith, M. V. *Brassins-a new family of plant hormones from rape pollen.* ;*Nature* **1970**, 225, 1065-1066.
- (127) Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen, J. D.; Steffens, G. L.; Flippenanderson, J. L.; Cook, J. C. *Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from brassica napus pollen.*; *Nature* **1979**, 281, 216-217.
- (128) *Brassinosteroids*; Hayat, S.; Ahmad, A., Eds.; Kluwer Academic Publishers, printed in Netherlands, 2003.
- (129) Cutler, H. G.; Yokota, T.; Adam, G.; *ACS Symposium Series* **1991**, 474, 358.

- (130) Fujioka, S. *Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom*; *Brassinosteroids* **1999**, 21-45.
- (131) Altmann, T. *Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants*; *Planta* **1999**, 208, 1-11.
- (132) Anuradha, S.; Rao, S. *Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (Oryza Sativa L.)*; *Plant Growth Reg.* **2001**, 33, 151-153.
- (133) Dhaubhadel, S.; Chaudhary, S.; Dobinson, K. F.; Krishna, P. *Treatment With 24-Epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of brassica napus and tomato seedlings*; *Plant Mol. Biol.* **1999**, 40, 333-342.
- (134) Fujioka, S.; Sakurai, A. *Brassinosteroids*; *Natural Product Reports* **1997**, 14, 1-10.
- (135) Clouse, S. D.; Sasse, J. M. *Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development*; *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1998**, 49, 427-451.
- (136) Takatsuto, S. *Brassinosteroids-distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography mass spectrometry*; *J. Chromat. A.* **1994**, 658, 3-15.
- (137) Clouse, S. D. *Recent advances in brassinosteroid research: From molecular mechanisms to practical applications*; *J Plant Growth Regul* **2003**, 22, 273-275.
- (138) Adam G, M. V. *Brassinosteroids*; *Phytochemistry* **1986**, 25, 1787-1799.
- (139) Yun, H. R.; Joo, S. H.; Park, C. H.; Kim, S. K.; Chang, S. C.; Kim, S. Y. *Effects of Brassinolide and IAA on Ethylene Production and Elongation in Maize Primary Roots*; *J. Plant Biol.* **2009**, 52, 268-274.
- (140) Fukaki, H.; Tasaka, M. *Hormone interactions during lateral root formation*; *Plant. Mol. Biol.* **2009**, 69, 437-449.
- (141) Symons, G. M.; Ross, J. J.; Jager, C. E.; Reid, J. B. *Brassinosteroid transport*; *Journal of Experimental Botany* **2008**, 59, 17-24.
- (142) Kuppusamy, K.; Walcher, C.; Nemhauser, J. *Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling*; *Plant Mol. Biol.* **2009**, 69, 375-381.
- (143) Ishiguro, M. T., S.; Morisaki, M.; Ikekawa, N. *Synthesis of brassinolide, a steroidal lactone with plant-growth promoting activity*; *J. Amer. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1980**, 962-964.
- (144) Vazquez, M. N.; Rodriguez, C. R.; Manchado, F. C. *Synthesis and practical applications of brassinosteroid analogs*; *Brassinosteroids* **2003**, 87-117.
- (145) Takeuchi, Y.; Ogasawara, M.; Konnai, M.; Takematsu, T. *Application of brassinosteroids in agriculture in Japan*; *Proceedings - Plant Growth Regulation Society of America* **1992**, 19th, 343-352.
- (146) Yokota, T. *The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids*; *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 137-142.
- (147) Zullo, M. A.; Gunter, A. *Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications*; *Braz. J. Plant. Physiol.* **2002**, 14, 143-181.
- (148) Kaul, S.; Koo, H. L.; Jenkins, J.; Rizzo, M.; Rooney, T.; Tallon, L. J.; Feldblyum, T.; Nierman, W.; Benito, M. I.; Lin, X. Y.; Town, C. D.; Venter, J. C.; Et, a. *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*; *Nature* **2000**, 408, 796-815.
- (149) Meinke, D. W.; Cherry, J. M.; Dean, C.; Rounsley, S. D.; Koornneef, M. *Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis*; *Science* **1998**, 282, 662.
- (150) Thummel, C. S.; Chory, J. *Steroid signaling in plants and insects - common themes, different pathways*; *Genes & Development* **2002**, 16, 3113-3129.
- (151) Seok, C. P.; Laible, P. D.; Gellman, S. H. *Tripod amphiphiles for membrane protein manipulation*; *Mol. BioSyst.* **2010**, 6, 89-94.
- (152) Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N. *Synthesis and biological activity of brassinolide analogues, 26,27-bisnorbrassinolide and its 6-oxo analogue*. ; *Phytochemistry* **1984**, 23, 525-528.
- (153) Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Hiroshi, A. *Synthesis of (24R)-28-homobrassinolide analogues and structure-activity relationships of brassinosteroids in the rice-lamina inclination test*; *Phytochemistry* **1983**, 22, 1393-1397.
- (154) 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.
- (155) Back, T. G.; Janzen, L.; Nakajima, S. K.; Pharis, R. P. *Synthesis and biological activity of 25-methoxy-, 25-fluoro-, and 25-azabracassinolide and 25-fluorocastasterol: Surprising effects of heteroatom substituents at C-25*; *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5494-5498.

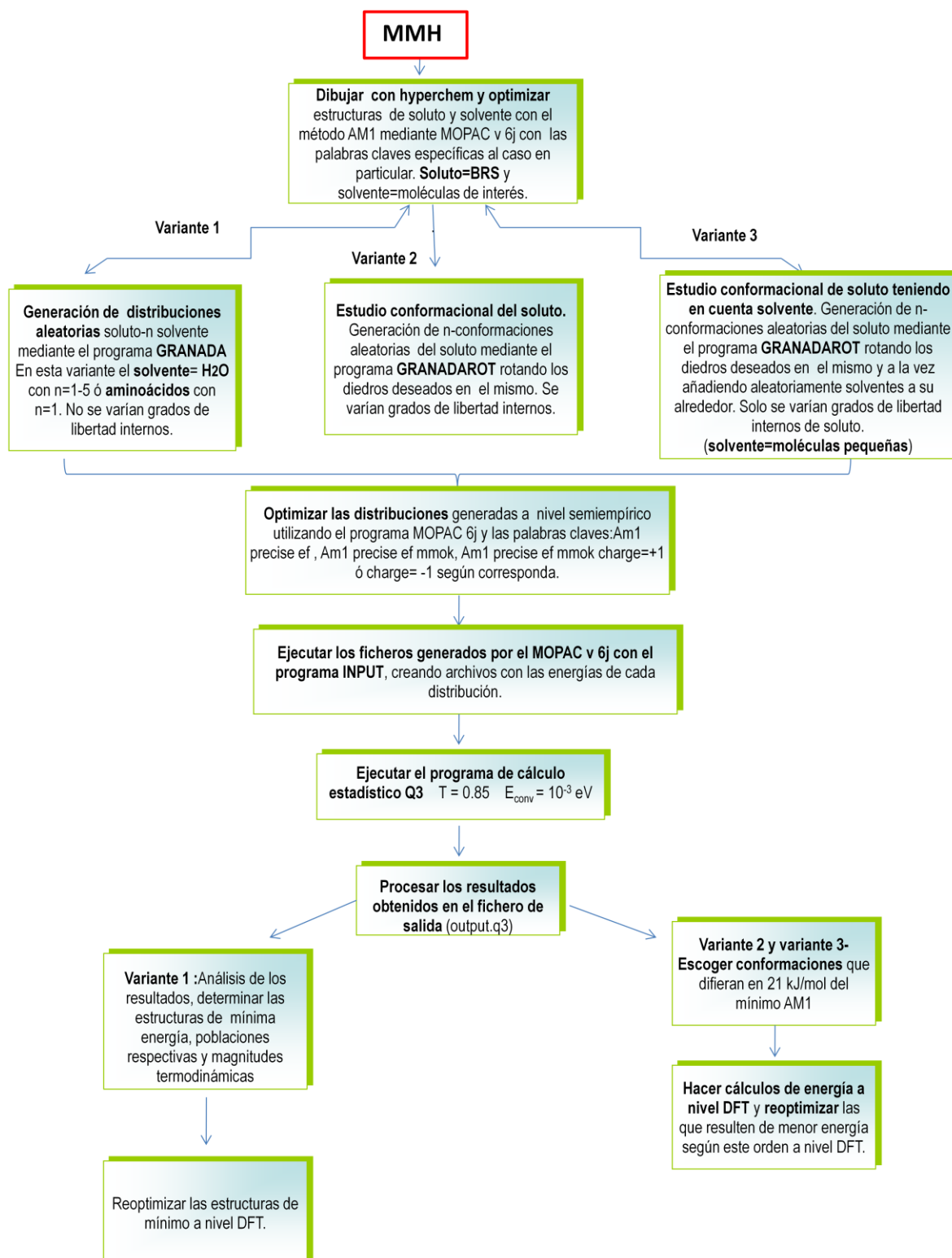
- (156) Back, T. G.; Janzen, L.; Pharis, R. P.; Yan, Z. H. *Synthesis and bioactivity of C-2 and C-3 methyl ether derivatives of brassinolide*; *Phytochemistry* **2002**, 59, 627-634.
- (157) Drosihn, S.; Porzel, A.; Voigt, B.; Brandt, W.; Wagner, C.; Merzweiler, K.; Adam, G. *Conformational studies of two new brassinosteroid analogues with a 22,23-trans diol function*; *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1999**, 233-238.
- (158) Stoldt, M.; Porzel, A.; Adam, G.; Brandt, W. *Side chain conformation of the growth-promoting phytohormones brassinolide and 24-epibrassinolide*; *Magn. Reson. Chem.* **1997**, 35, 629-636.
- (159) Andrianov, V. M.; Korolevich, M. V. *Calculation of the IR spectrum of (22S,23S)-24-epicastasterone*; *J. Appl. Spectrosc.* **2008**, 75, 771-778.
- (160) Borisevich, N. A.; Buslov, D. K.; Khripach, V. A.; Zhabinsky, V. N. *Infrared spectra of S- and R-isomers of biologically active brassinosteroids*; *J. Appl. Spectrosc.* **2008**, 75.
- (161) Borisevich, N. A.; Skorniyakov, I. V.; Khripach, V. A.; Tolstorozhev, G. B.; Zhabinskii, V. N. *Manifestation of structure and intermolecular interactions of biological active brassinosteroids in infrared spectra*; *J. Appl. Spectrosc.* **2007**, 74, 673-680.
- (162) Ferro, N.; Gonzalez-Jonte, R.; Carnesoltas, D.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Iglesias, M.; Coll, F. *Estudio y caracterización de brasinoesteroides y sus análogos mediante métodos químico cuántico computacionales y bioestadísticos*; *FCTL* **1999**, XXVII, 105-118.
- (163) Alvarez-Ginarte, Y. M.; Crespo, R.; Marrero-Ponce, Y.; Montero, L. A.; Ruiz, J. A.; Padron, A.; Torrens, F. *Quantitative Structure-Activity Relationship of the 4,5-Dihydrotestosterone Steroid Family*; *QSAR Comb. Sci.* **2006**, 25, 881.
- (164) Singh, P. P.; Srivastava, H. K.; Pasha, F. A. *DFT-based QSAR study of testosterone and its derivatives*; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 171-177.
- (165) Iglesias, M. A.; Velázquez, G. A.; Méndez, J. M.; Galano, A.; Alvarez, J. R. *The Baeyer-Villiger reaction of 23-oxosapogenins*; *ARKIVOC* **2005**, vi, 109-126.
- (166) Anastasia, M.; Allevi, P.; Colombo, R.; Giannini, E. *Elucidation of the opening of the epoxidic ring of the 3 β -acetoxy-14 α ,15 α -epoxy-5 α -cholest-8-en-7-one by methanol, using NMR techniques assisted by a conformational study through theoretical calculations*; *Steroids* **2007**, 72, 809-818.
- (167) Williams, S. P.; Sigler, P. B. *Atomic structure of progesterone complexed with its receptor*; *Nature* **1998**, 393, 392-396.
- (168) Matias, P. M.; Donner, P.; Coelho, R. *Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations*; *J. Biol. Chem* **2000**, 275, 26164.
- (169) Madauss, K. P.; Deng, J. S.; Austin, R. J. H.; Lambert, M. H.; McLay, I.; Pritchard, J.; Short, S. A.; Stewart, E. L.; Uings, I. J.; Williams, S. P. *Progesterone receptor ligand binding pocket flexibility: crystal structures of the norethindrone and mometasone furoate complexes*; *J. Med. Chem* **2004**, 47, 3381-3387.
- (170) Petit, I.; Turque, N.; Fagart, J.; Fay, M.; Ulmann, A.; Gainer, E.; Rafestin, M. E. *Met909 plays a key role in the activation of the progesterone receptor and also in the high potency of 13-ethyl progestins*; *Mol. Pharmacol.* **2009**, 75, 1317-1324.
- (171) Browning, C.; Martin, E.; Loch, C.; Wurtz, J. M.; Moras, M.; Stote, R. H.; Dejaegere, A. P.; Billas, I. M. L. *Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor* *J. Biol. Chem* **2007**, 282, 32924-32934.
- (172) Toshiyuki, H.; Nakagawa, Y.; Akamatsu, M.; H., M. *Evaluation of hydrogen bonds of ecdysteroids in the ligand-receptor interactions using a protein modeling system*; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5868-5873.
- (173) Lehmann, M.; Vorbrodt, H. M.; Adam, G.; Koolman, J. *Antiecdysteroid activity of brassinosteroids*; *Experientia* **1988**, 44, 355-356.
- (174) Stewart, J. J. P.; The 6J version with Jorgensen modified Hamiltonians was released in our laboratory for PC computers under both Windows and Linux operating systems: Universidad de la Habana, 2004.
- (175) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; et al.; Gaussian, I., Ed. Wallingford, CT, 2004.
- (176) In Copyright, Accelrys Software Inc; v1.5, A. D. V., Ed.; Discovery Studio: 2005.
- (177) M.J. Frisch, G. W. T., H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, et al.; Gaussian, I., Ed. Wallingford, CT, 2004.
- (178) In Copyright 2002, Hpercube; Hyperchem 7.0 release for windows Molecular Modeling systems: 2002.

-
- (179) In *Manual of Hyperchem release 7, tools for molecular modelling*; Copyright © 2002 Hypercube, Inc.
- (180) In *Copyright 2002 Hypercube, Inc.*; Hypercube, I., Ed.; Publication HC70-00-01-00.
- (181) Jones, S.; Barker, J. A.; Nobeli, I.; Thornton, J. M. *Using structural motif templates to identify proteins with DNA binding function*; *Nucleic acids research* **2003**, *3*, 2811-2823.
- (182) Carugo, O. *How root-mean-square distance (r.m.s.d) values depend on the resolution of protein structures that are compared*; *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 125-128.
- (183) Biegler-Konig, F. University of Applied Sciences, Bielefeld, Germany.
- (184) Rzepa, H. S.; Charlotte, S. M. *Racemization of Isobornyl Chloride via Carbocations: A Nonclassical Look at a Classic Mechanism*; *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*, 221-228.
- (185) Simon, S.; Bertran, J.; Sodupe, M. *Effect of counterpoise correction on the geometries and vibrational frequencies of hydrogen bonded systems*; *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 4359-4364.
- (186) P. Salvador, M. D., J.J. Dannenberg *Counterpoise-corrected ion-molecule complexes using two or three fragments*; *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6883-6889.
- (187) P. Salvador, M. D., The effect of counterpoise correction and relaxation energy term to internal rotation barriers: application to the $\text{BF}_3 \dots \text{NH}_3$ and $\text{C}_2\text{H}_4 \dots \text{SO}_2$ dimers; *J. Chem. Phys.* **1999** *111*, 4460-4465.
- (188) Xantheas, S. S.; *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 8821.
- (189) Seok Chae, P. L., Philip D and Gellman, Samuel H *Tripod amphiphiles for membrane protein manipulation*; *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 89-94.
- (190) Moreno, E.; León, K. *Geometric and chemical patterns of interaction in protein-ligand complexes and their application in docking*; *Proteins* **2002**, *47*, 1-13.
- (191) *Biochemistry*; Voet, D. a. J. G. V., Ed.; John Wiley and Sons: Rosewood Drive, Danvers, 2004; Vol. Third edition volume.

ANEXO 1

ANEXO 1

Esquema A1 Resumen de las tres variantes de la Metodología de Hipersuperficies de Múltiples Mínimos (MMH).



ANEXO 2

ANEXO 2

A2. Estudio conformacional de los restantes modelos de la cadena lateral.

En este anexo se muestran los resultados obtenidos en el estudio conformacional que se realizó mediante la metodología MMH-AM1 a los modelos de cadena lateral de la 24-epibrasinólida (epiBR_m), homobrasinólida (homBR_m), norbrasinólida (norBR_m) y dolicólida (DL_m).

Tabla A2.1: Energía relativa (kJ/mol) a la conformación del mínimo y población de Boltzman de cada conformero a nivel AM1, B3LYP/6-31G y M05/6-31G de los modelos de cadena lateral epiBR_m, norBR_m, DL_m y homBR_m.

| Conformación | Energía Relativa (AM1) | AM1 Población % | Energía Relativa (B3LYP) | B3LYP/6-31G Población % | Energía Relativa (M05-2X) | M05-2X/6-31G Población % |
|------------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 24-epibrasinólida | | | | | | |
| <i>epiBR_m 115</i> | 0.00 | 50.70 | 0.00 | 28.96 | 0.00 | 23.74 |
| <i>epiBR_m 50</i> | 2.30 | 18.32 | 3.68 | 6.53 | 3.72 | 5.29 |
| <i>epiBR_m 143</i> | 3.18 | 12.89 | 4.73 | 4.25 | 3.22 | 6.49 |
| <i>epiBR_m 58</i> | 5.40 | 5.20 | 5.52 | 6.16 | 3.05 | 13.92 |
| <i>epiBR_m 163</i> | 13.05 | 0.24 | 2.51 | 10.60 | 2.85 | 7.49 |
| <i>epiBR_m 56</i> | 17.99 | 0.03 | 1.67 | 14.71 | 3.14 | 6.67 |
| <i>epiBR_m 63</i> | 18.45 | 0.03 | 3.10 | 8.30 | 3.22 | 6.52 |
| <i>epiBR_m 141</i> | 18.70 | 0.02 | 4.81 | 4.15 | 2.97 | 7.17 |
| <i>epiBR_m 6</i> | 20.92 | 0.004 | 1.42 | 16.25 | 0.13 | 22.72 |
| Norbrasinólida | | | | | | |
| <i>norBR_m 15</i> | 0.00 | 50.45 | 2.55 | 12.55 | 3.35 | 11.77 |
| <i>norBR_m 120</i> | 4.35 | 33.44 | 8.74 | 1.02 | 19.96 | 0.01 |
| <i>norBR_m 197</i> | 15.40 | 0.07 | 0.17 | 32.48 | 0.46 | 38.11 |
| <i>norBR_m 9</i> | 15.52 | 0.07 | 8.74 | 1.02 | 11.09 | 0.52 |
| <i>norBR_m 3</i> | 15.86 | 0.06 | 0.00 | 34.96 | 0.00 | 45.78 |
| <i>norBR_m 89</i> | 15.90 | 0.06 | 10.08 | 0.60 | 8.87 | 1.27 |
| <i>norBR_m 8</i> | 16.23 | 0.05 | 15.52 | 0.07 | 18.66 | 0.02 |
| <i>norBR_m 169</i> | 16.40 | 0.05 | 3.89 | 7.31 | 11.13 | 0.52 |
| <i>norBR_m 93</i> | 16.61 | 0.04 | 11.92 | 0.28 | 11.05 | 0.53 |
| <i>norBR_m 90</i> | 16.95 | 0.04 | 3.89 | 7.32 | 17.11 | 0.05 |
| <i>norBR_m 103</i> | 18.83 | 0.02 | 10.63 | 0.48 | 12.64 | 0.28 |
| <i>norBR_m 70</i> | 20.71 | 0.01 | 7.24 | 1.90 | 9.16 | 1.13 |
| Dolicólida | | | | | | |
| <i>DL_m 59</i> | 0.00 | 27.43 | 4.48 | 7.67 | 6.40 | 4.41 |
| <i>DL_m 58</i> | 0.25 | 9.53 | 4.10 | 8.92 | 5.56 | 6.23 |
| <i>DL_m 56</i> | 15.19 | 0.06 | 1.26 | 28.09 | 2.97 | 17.64 |
| <i>DL_m 154</i> | 1.63 | 0.06 | 5.98 | 4.15 | 5.36 | 6.79 |
| <i>DL_m 38</i> | 18.49 | 0.02 | 5.90 | 4.26 | 5.82 | 5.62 |
| <i>DL_m 1</i> | 19.25 | 0.01 | 0.00 | 46.26 | 0.00 | 58.62 |
| <i>DL_m 42</i> | 20.92 | 0.004 | 10.54 | 0.66 | 11.00 | 0.70 |
| Homobrasinólida | | | | | | |
| <i>homBR_m 94</i> | 17.49 | 0.02 | 0 | 64.32 | 0 | 77.65 |
| <i>homBR_m 138</i> | 11.34 | 0.27 | 1.46 | 35.68 | 3.10 | 22.35 |

Tabla A2.2- Ángulos diedros de las geometrías obtenidas a nivel M05-2X/6-31G. Poblaciones relativas (entre paréntesis) de las conformaciones más estables del modelo de la cadena lateral de la 24-epibrasinólida (epiBR_m) a nivel B3LYP/6-31G y M05-2X/6-31G.

| Confórmero | C13-C17-C20-C22 | C17-C20-C22-C23 | C20-C22-C23-C24 | C22-C23-C24-C25 | C23-C24-C25-H25 |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| F1 | B3LYP-(24.6 %) | | M05-2X-(29.2 %) | | |
| epiBR _m 6 | 174.55 | 178.11 | 56.36 | 51.33 | -43.30 |
| epiBR _m 63 | 175.80 | -178.67 | 55.88 | 50.29 | -43.17 |
| F2 | B3LYP-(75.5 %) | | M05-2X-(70.8 %) | | |
| epiBR _m 115 | 174.91 | -179.78 | 153.99 | 158.53 | -62.03 |
| epiBR _m 50 | 175.22 | -178.84 | 144.32 | 57.75 | -37.68 |
| epiBR _m 143 | 176.34 | -177.77 | 149.74 | -66.13 | 71.91 |
| epiBR _m 58 | 175.67 | 178.46 | 149.52 | -62.94 | 76.10 |
| epiBR _m 163 | 177.65 | -177.76 | 146.42 | 53.14 | -41.85 |
| epiBR _m 141 | -175.59 | 54.47 | 152.90 | 158.62 | -61.48 |
| epiBR _m 56 | 175.99 | -178.06 | 154.40 | 158.41 | -61.75 |
| epiBR-RX^a | 178.73 | -153.45 | 96.32 | 68.03 | -29.80 |

^aBR-RX-Ángulos diedros de la cadena lateral de la estructura de RX de la 24-epibrasinólida

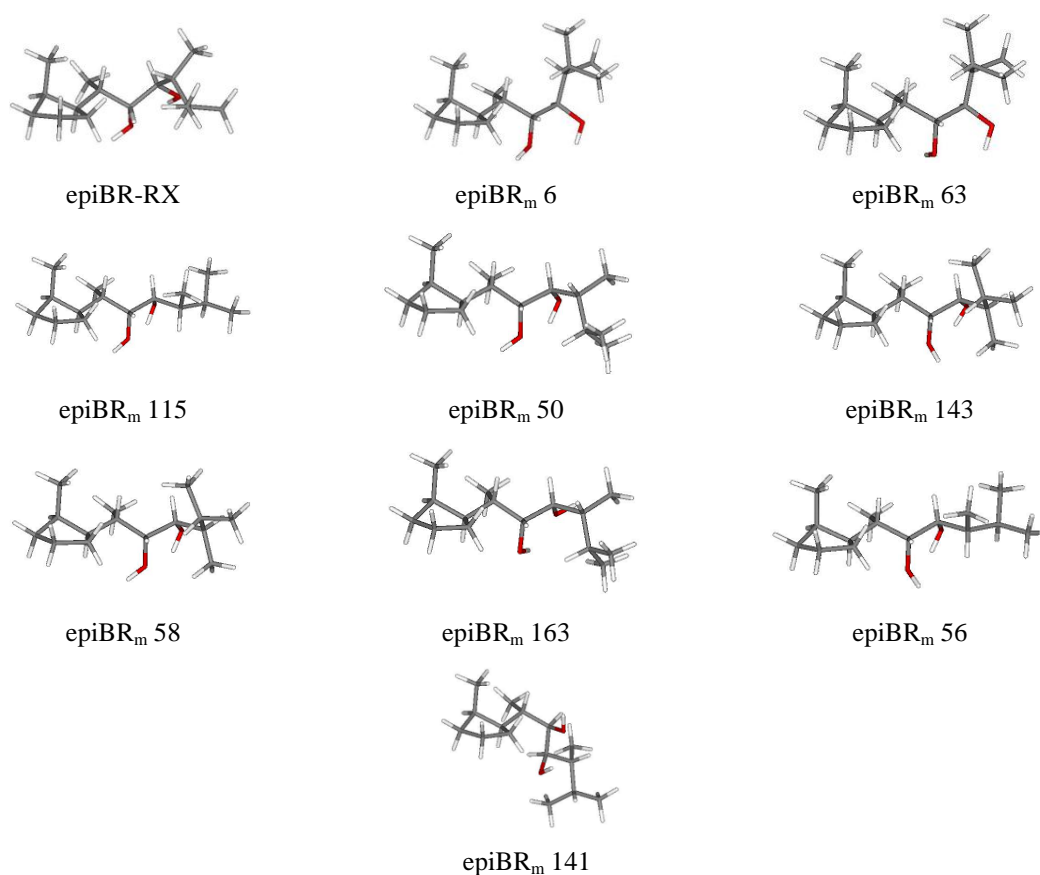


Figura A2.1- Estructura de RX de la 24-epibrasinólida (epiBR-RX) y nueve estructuras optimizadas al nivel M05-2X/6-31G.

Tabla A2.3- Ángulos diedros de las geometrías obtenidas a nivel M05-2X/6-31G. Poblaciones relativas (entre paréntesis) de las conformaciones más estables del modelo de la cadena lateral de la norbrasinólida (norBR_m) a nivel B3LYP/6-31G y M05-2X/6-31G.

| Confórmero | C13-C17-C20-C22 | C17-C20-C22-C23 | C20-C22-C23-C24 | C22-C23-C24-C25 | C23-C24-C25-H25 |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| F1 | B3LYP-(84.0 %) | | M05-2X-(85.6 %) | | |
| norBR _m 197 | 175.84 | 177.26 | 62.41 | 168.53 | -62.65 |
| norBR _m 3 | 174.88 | 177.07 | 61.62 | 168.85 | -62.42 |
| norBR _m 169 | 175.17 | -177.83 | 64.96 | -95.40 | 52.73 |
| norBR _m 90 | 178.80 | -163.54 | 84.24 | -155.34 | 59.04 |
| norBR _m 70 | 174.79 | 173.79 | 64.05 | -164.13 | -175.56 |
| F2 | B3LYP-(16.0 %) | | M05-2X-(14.4 %) | | |
| norBR _m 15 | 175.06 | -179.13 | 157.40 | 170.36 | -62.26 |
| norBR _m 120 | 177.29 | -169.47 | 99.83 | -63.90 | 57.55 |
| norBR _m 9 | 176.42 | 177.87 | 160.26 | -62.13 | 68.73 |
| norBR _m 89 | 174.92 | -178.38 | 160.64 | -62.38 | 69.08 |
| norBR _m 8 | 89.63 | -160.31 | 161.06 | 169.26 | -62.69 |
| norBR _m 93 | 175.47 | 56.09 | 160.79 | -67.51 | -78.38 |
| norBR _m 103 | -175.93 | 55.88 | 157.22 | -177.63 | 41.42 |
| norBR_m^a | 175.50 | 178.64 | 59.18 | 170.65 | -60.87 |

^anorBR_m- Angulos diedros del modelo de la cadena lateral de la norbrasinólida obtenida a nivel M05-2X/6-31++G(d,p).

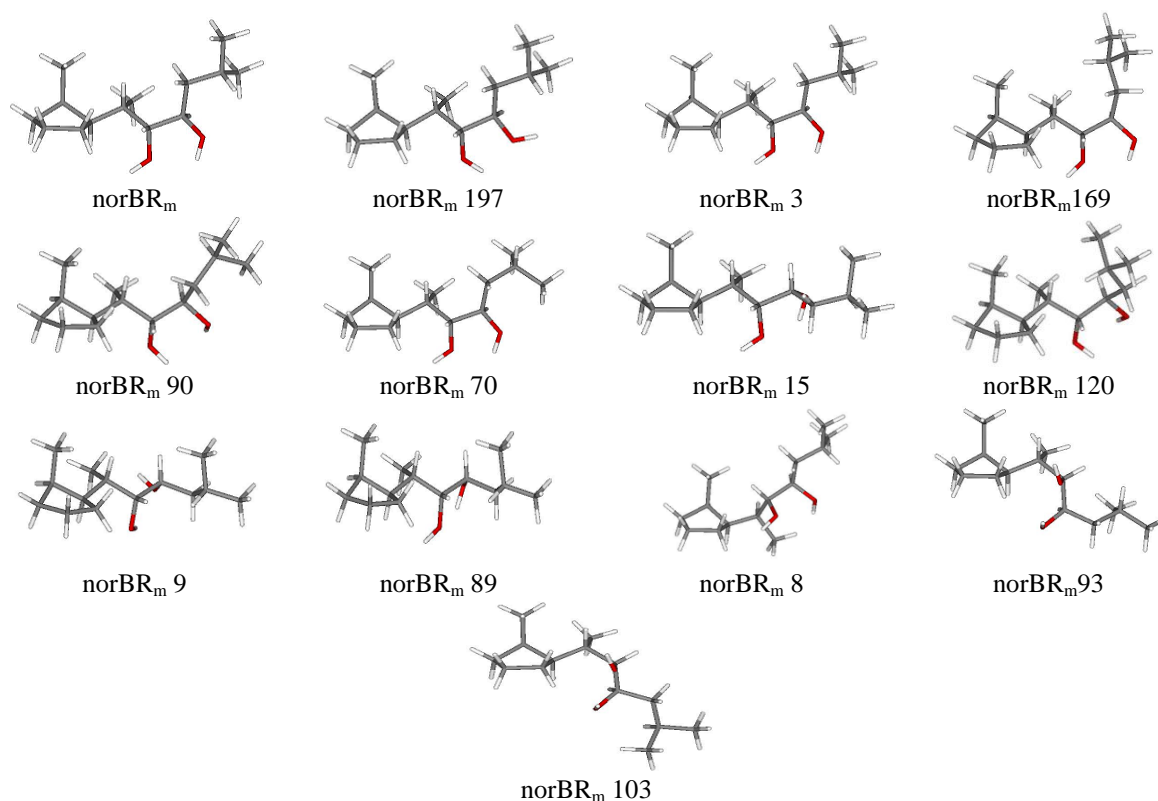


Figura A2.2- Estructura de partida del modelo de cadena lateral de la norbrasinólida (norBR_m) y 12 estructuras optimizadas al nivel M05-2X/6-31G.

Tabla A2.4- Ángulos diedros de las geometrías obtenidas a nivel M05-2X/6-31G. Poblaciones relativas (entre paréntesis) de las conformaciones más estables del modelo de la cadena lateral de la dolicólida (DL_m) a nivel B3LYP/6-31G y M05-2X/6-31G.

| Conformero | C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ | C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ | C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -H ₂₅ |
|-----------------------------------|--|--|--|--|--|
| F1 | B3LYP-(55.3 %) | | | M05-2X-(71.7 %) | |
| DL _m 1 | 174.86 | -178.17 | 63.88 | 73.08 | -15.79 |
| DL _m 154 | 178.39 | -166.01 | 69.29 | -126.06 | -178.30 |
| DL _m 38 | 175.77 | -171.93 | 63.61 | -101.98 | 39.57 |
| DL _m 42 | 174.53 | 177.59 | 62.63 | -154.17 | -172.24 |
| F2 | B3LYP-(44.7 %) | | | M05-2X-(28.3 %) | |
| DL _m 56 | 174.89 | -178.16 | 161.74 | -71.92 | 1.92 |
| DL _m 58 | 177.07 | -177.83 | 152.25 | -171.65 | 54.69 |
| DL _m 59 | 175.19 | -179.71 | 149.41 | 79.70 | -27.00 |
| DL_m^a | 174.86 | -176.46 | 60.13 | 69.00 | -10.73 |

^aDL_m- Ángulos diedros del modelo de la cadena lateral de la dolicólida obtenida a nivel M05-2X/6-31++G(d,p).

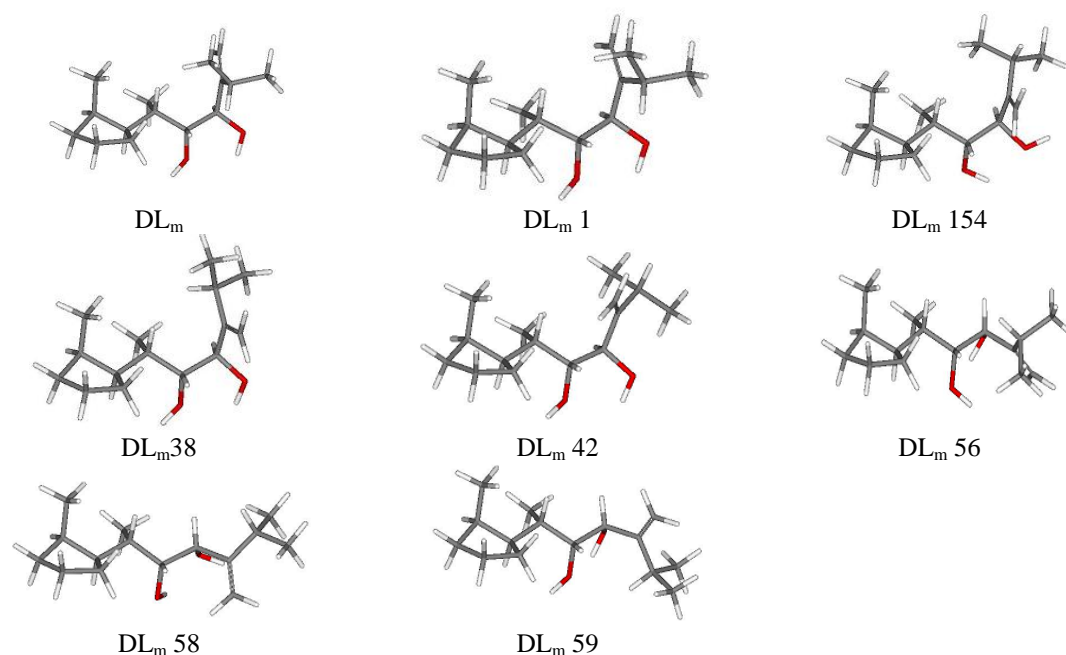


Figura A2.3- Estructura de partida del modelo de cadena lateral de la dolicólida (DL_m) y siete estructuras optimizadas a nivel M05-2X/6-31G.

Tabla A2.5- Ángulos diedros de las geometrías obtenidas a nivel M05-2X/6-31G. Poblaciones relativas (entre paréntesis) de las conformaciones más estables del modelo de la cadena lateral de la homobrasinólida (homBR_m) a nivel B3LYP/6-31G y M05-2X/6-31G.

| Confórmero | C13-C17-C20-C22 | C17-C20-C22-C23 | C20-C22-C23-C24 | C22-C23-C24-C25 | C23-C24-C25-H25 |
|---------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| F1 | B3LYP-(100%) | | | M05-2X-(100%) | |
| homBR _m 94 | 175.11 | 167.47 | 60.45 | 173.64 | -64.65 |
| homBR _m 138 | 175.79 | 179.04 | 59.61 | 173.10 | -64.73 |
| homBR _m ^a | 174.85 | 179.25 | 57.82 | 175.941 | -64.74 |

^ahomBR_m-Ángulos diedros del modelo de la cadena lateral de la homBR_m obtenida a nivel M05-2X/6-31++G(d,p).

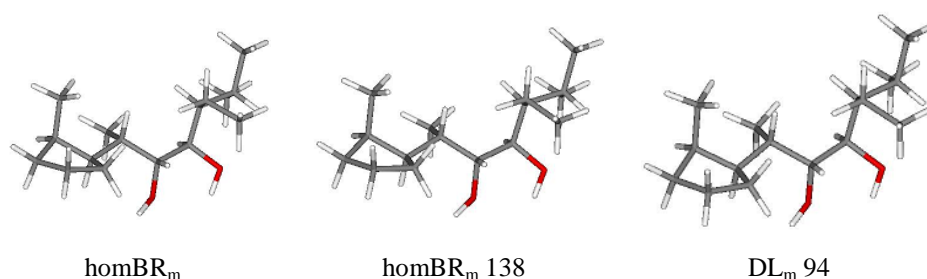


Figura A2.4- Estructura de partida del modelo de la cadena lateral de la homobrasinólida (homBR_m) y dos estructuras optimizadas a nivel M05-2X/6-31G.

ANEXO 3

ANEXO 3

A3. Parámetros geométricos calculados y experimentales para la validación de las geometrías.

Tabla-A3.1-Distancias de enlace (Å) experimentales y calculadas por los diferentes métodos de la brasinólida MD-Desviación media. Letras en negrita representan los parámetros más importantes.

| Distancias de enlace | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG /MNDO | PDDG/PM3 | B3LYP/ 6-31G | B3LYP/ 6-31G(d,p) | M05-2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) | Exp |
|--------------------------------------|-------|--------|--------|------------|----------|--------------|-------------------|---------------|----------------------|-------|
| C₆-O₇₅ | 1.364 | 1.371 | 1.363 | 1.351 | 1.358 | 1.378 | 1.354 | 1.367 | 1.345 | 1.336 |
| O₇₅-C₇ | 1.411 | 1.423 | 1.400 | 1.390 | 1.406 | 1.466 | 1.434 | 1.455 | 1.431 | 1.432 |
| C₂-O₇₀ | 1.41 | 1.423 | 1.401 | 1.387 | 1.410 | 1.467 | 1.433 | 1.457 | 1.430 | 1.440 |
| C₃-O₇₂ | 1.413 | 1.419 | 1.396 | 1.383 | 1.407 | 1.458 | 1.425 | 1.447 | 1.422 | 1.438 |
| C₆=O₇₄ | 1.214 | 1.233 | 1.228 | 1.232 | 1.219 | 1.232 | 1.210 | 1.226 | 1.207 | 1.221 |
| C₂₂-O₇₆ | 1.415 | 1.427 | 1.399 | 1.386 | 1.415 | 1.481 | 1.446 | 1.466 | 1.440 | 1.443 |
| C₂₃-O₇₈ | 1.411 | 1.423 | 1.399 | 1.382 | 1.412 | 1.460 | 1.427 | 1.451 | 1.425 | 1.441 |
| C₂₄-C₂₈ | 1.520 | 1.513 | 1.546 | 1.543 | 1.525 | 1.544 | 1.540 | 1.536 | 1.534 | 1.559 |
| O₇₀-H₇₁ | 0.948 | 0.964 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.977 | 0.966 | 0.972 | 0.962 | 0.953 |
| O₇₂-H₇₃ | 0.948 | 0.967 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.981 | 0.969 | 0.976 | 0.965 | 0.952 |
| O₇₆-H₇₇ | 0.952 | 0.964 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.976 | 0.965 | 0.972 | 0.961 | 0.950 |
| O₇₈-H₇₉ | 0.948 | 0.966 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.981 | 0.969 | 0.976 | 0.965 | 0.952 |
| C ₁ -C ₂ | 1,529 | 1,521 | 1,561 | 1,562 | 1,531 | 1,530 | 1,530 | 1,522 | 1,523 | 1.551 |
| C ₂ -C ₃ | 1,548 | 1,535 | 1,575 | 1,591 | 1,551 | 1,523 | 1,525 | 1,512 | 1,515 | 1.543 |
| C ₃ -C ₄ | 1,529 | 1,516 | 1,555 | 1,560 | 1,530 | 1,517 | 1,518 | 1,508 | 1,511 | 1.542 |
| C ₄ -C ₅ | 1,535 | 1,527 | 1,557 | 1,557 | 1,535 | 1,549 | 1,544 | 1,539 | 1,537 | 1.563 |
| C ₅ -C ₆ | 1,525 | 1,5108 | 1,5472 | 1,5573 | 1,5212 | 1,52650 | 1,5309 | 1,5183 | 1,52463 | 1.520 |
| C ₇ -C ₈ | 1,535 | 1,528 | 1,567 | 1,572 | 1,539 | 1,533 | 1,5325 | 1,524 | 1,525 | 1,557 |
| C ₈ -C ₉ | 1,546 | 1,537 | 1,578 | 1,563 | 1,548 | 1,568 | 1,561 | 1,555 | 1,550 | 1.570 |
| C ₉ -C ₁₀ | 1,571 | 1,558 | 1,610 | 1,586 | 1,566 | 1,592 | 1,583 | 1,574 | 1,567 | 1.589 |
| C ₁₀ -C ₅ | 1,555 | 1,544 | 1,585 | 1,573 | 1,5442 | 1,590 | 1,581 | 1,574 | 1,567 | 1.573 |
| C ₁₀ -C ₁ | 1,548 | 1,536 | 1,578 | 1,568 | 1,547 | 1,568 | 1,561 | 1,554 | 1,551 | 1.573 |
| C ₉ -C ₁₁ | 1,542 | 1,530 | 1,562 | 1,562 | 1,540 | 1,557 | 1,550 | 1,547 | 1,542 | 1.566 |
| C ₁₁ -C ₁₂ | 1,520 | 1,518 | 1,544 | 1,542 | 1,522 | 1,545 | 1,539 | 1,538 | 1,534 | 1.555 |
| C ₁₂ -C ₁₃ | 1,526 | 1,518 | 1,552 | 1,544 | 1,524 | 1,544 | 1,538 | 1,532 | 1,529 | 1.556 |
| C ₁₃ -C ₁₄ | 1,548 | 1,549 | 1,583 | 1,566 | 1,543 | 1,564 | 1,557 | 1,550 | 1,544 | 1.558 |
| C ₁₄ -C ₈ | 1,531 | 1,519 | 1,561 | 1,545 | 1,532 | 1,551 | 1,546 | 1,537 | 1,535 | 1.566 |
| C ₁₄ -C ₁₅ | 1,528 | 1,523 | 1,547 | 1,549 | 1,527 | 1,545 | 1,539 | 1,537 | 1,534 | 1.548 |
| C ₁₅ -C ₁₆ | 1,534 | 1,528 | 1,544 | 1,554 | 1,538 | 1,557 | 1,552 | 1,550 | 1,547 | 1.555 |
| C ₁₆ -C ₁₇ | 1,546 | 1,542 | 1,564 | 1,572 | 1,549 | 1,571 | 1,564 | 1,538 | 1,556 | 1.561 |
| C ₁₇ -C ₁₃ | 1,552 | 1,549 | 1,595 | 1,576 | 1,551 | 1,575 | 1,568 | 1,559 | 1,554 | 1.570 |
| C ₁₃ -C ₁₈ | 1,530 | 1,518 | 1,555 | 1,548 | 1,527 | 1,548 | 1,544 | 1,538 | 1,537 | 1.566 |
| C ₁₀ -C ₁₉ | 1,529 | 1,521 | 1,558 | 1,549 | 1,527 | 1,549 | 1,545 | 1,540 | 1,538 | 1.564 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| C ₁₇ -C ₂₀ | 1,534 | 1,527 | 1,572 | 1,554 | 1,536 | 1,557 | 1,553 | 1,543 | 1,541 | 1.575 |
| C ₂₀ -C ₂₁ | 1,521 | 1,513 | 1,547 | 1,545 | 1,520 | 1,541 | 1,537 | 1,532 | 1,531 | 1.556 |
| C ₂₀ -C ₂₂ | 1,553 | 1,537 | 1,589 | 1,582 | 1,554 | 1,551 | 1,550 | 1,538 | 1,539 | 1.574 |
| C ₂₂ -C ₂₃ | 1,560 | 1,545 | 1,607 | 1,608 | 1,569 | 1,537 | 1,542 | 1,523 | 1,528 | 1.565 |
| C ₂₃ -C ₂₄ | 1,552 | 1,535 | 1,586 | 1,582 | 1,550 | 1,542 | 1,541 | 1,528 | 1,530 | 1.566 |
| C ₂₄ -C ₂₅ | 1,539 | 1,534 | 1,575 | 1,558 | 1,543 | 1,565 | 1,560 | 1,551 | 1,547 | 1.574 |
| C ₂₅ -C ₂₆ | 1,523 | 1,517 | 1,548 | 1,546 | 1,526 | 1,543 | 1,538 | 1,535 | 1,533 | 1.560 |
| C ₂₆ -C ₂₇ | 1,521 | 1,515 | 1,547 | 1,546 | 1,527 | 1,544 | 1,537 | 1,535 | 1,532 | 1.560 |
| MD^a | 0.019 | 0.019 | 0.022 | 0.029 | 0.017 | 0.023 | 0.013 | 0.019 | 0.012 | |
| MD^b | 0.021 | 0.026 | 0.017 | 0.020 | 0.020 | 0.017 | 0.015 | 0.021 | 0.020 | |

^aMD - tomando distancias de enlace más importantes.

^bMD -tomando todas las distancias de enlace.

Tabla A3.2- Ángulos de valencia (grados) experimentales y calculados por diferentes métodos de la brasinólida.MD
Desviación media. Letras en negrita representan los ángulos más importantes.

| Angulos Valencia | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/ MNDO | PDDG/ PM3 | B3LYP/ 6-31G | B3LYP/ 6-31G(d,p) | M05-2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) | Exp |
|---|-------|-------|-------|---------------|--------------|-----------------|----------------------|------------------|-------------------------|-------|
| C₂-O₇₀-H₇₁ | 106.7 | 107.2 | 111.7 | 117.2 | 105.0 | 110.9 | 108.6 | 111,9 | 109,8 | 113.1 |
| C₃-O₇₂-H₇₃ | 106.6 | 106.4 | 112.0 | 117.5 | 105.3 | 107.2 | 105.3 | 107,9 | 107,0 | 112.0 |
| C₆-O₇₅-C₇ | 118.1 | 117.7 | 124.5 | 124.7 | 118.8 | 121.6 | 121.5 | 121,7 | 121,2 | 117.9 |
| O₇₄=C₆-O₇₅ | 108.1 | 111.9 | 113.0 | 113.1 | 109.1 | 117.6 | 117.8 | 118,0 | 118,2 | 115.8 |
| C₁₃-C₁₇-C₁₆ | 103.1 | 103.8 | 102.7 | 103.4 | 102.2 | 103.2 | 103.2 | 103,3 | 103,2 | 102.6 |
| C₁₇-C₂₀-C₂₁ | 111.7 | 112.1 | 113.1 | 111.0 | 110.8 | 113.4 | 113.3 | 112,9 | 112,9 | 112.6 |
| C₁₇-C₂₀-C₂₂ | 110.4 | 110.2 | 112.8 | 113.3 | 110.4 | 110.0 | 110.0 | 109,5 | 109,6 | 112.1 |
| C₂₀-C₁₇-H₈₀ | 106.4 | 107.9 | 105.3 | 108.0 | 108.9 | 107.2 | 106.9 | 107,4 | 107,5 | 107.2 |
| C₂₀-C₂₂-O₇₆ | 112.6 | 111.8 | 108.8 | 113.4 | 111.5 | 111.2 | 111.2 | 111,2 | 111,4 | 111.6 |
| C₂₀-C₂₂-C₂₃ | 110.5 | 114.7 | 113.3 | 109.9 | 113.2 | 116.7 | 116.6 | 115,9 | 115,7 | 116.7 |
| C₂₂-O₇₆-H₇₇ | 105.7 | 107.0 | 111.8 | 116.5 | 104.9 | 110.6 | 108.3 | 107,3 | 109,5 | 114.7 |
| C₂₂-C₂₃-C₂₄ | 109.4 | 114.2 | 113.3 | 109.1 | 113.4 | 115.9 | 115.8 | 115,0 | 115,0 | 117.5 |
| C₂₂-C₂₃-O₇₈ | 112.4 | 108.3 | 111.8 | 112.1 | 108.6 | 107.7 | 108.2 | 107,6 | 108,4 | 108.8 |
| C₂₃-C₂₂-O₇₆ | 108.1 | 103.7 | 112.0 | 109.6 | 104.4 | 102.8 | 103.7 | 103,1 | 103,9 | 104.6 |
| C₂₃-O₇₈-H₇₉ | 106.9 | 106.5 | 111.8 | 117.9 | 105.6 | 106.3 | 104.6 | 107,3 | 106,2 | 112.9 |
| C₂₃-C₂₄-C₂₈ | 110.8 | 110.8 | 112.6 | 111.6 | 111.4 | 111.2 | 111.3 | 110,6 | 110,9 | 110.6 |
| C₂₃-C₂₄-C₂₅ | 111.0 | 109.5 | 112.4 | 112.3 | 111.3 | 111.7 | 112.0 | 111,2 | 111,3 | 111.8 |
| C₂₄-C₂₃-O₇₈ | 108.1 | 107.5 | 108.9 | 111.1 | 106.8 | 107.5 | 108.0 | 107,5 | 107,9 | 107.3 |
| C₂₄-C₂₅-C₂₆ | 110.5 | 110.8 | 112.9 | 111.8 | 110.9 | 113.3 | 111.2 | 107,5 | 110,9 | 112.8 |
| C₂₄-C₂₅-C₂₇ | 111.8 | 112.3 | 114.6 | 110.9 | 110.1 | 111.2 | 113.8 | 112,6 | 112,7 | 112.3 |
| C ₁ -C ₂ -O ₇₀ | 112,7 | 110,6 | 111,8 | 112,9 | 111,4 | 110,2 | 110,7 | 109,7 | 110,3 | 110.7 |
| C ₃ -C ₂ -O ₇₀ | 107,5 | 105,8 | 108,4 | 109,4 | 106,8 | 104,9 | 105,8 | 104,8 | 106,1 | 107.2 |
| C ₂ -C ₃ -O ₇₂ | 113,8 | 111,8 | 114,0 | 114,2 | 114,1 | 109,6 | 110,3 | 109,1 | 110,5 | 11.4 |
| C ₄ -C ₃ -O ₇₂ | 108,2 | 108,5 | 109,6 | 111,4 | 107,6 | 108,4 | 109,1 | 108,5 | 108,9 | 109.6 |
| C ₁ -C ₂ -C ₃ | 109,7 | 110,7 | 112,4 | 109,5 | 109,1 | 111,2 | 110,7 | 110,9 | 110,8 | 109.3 |
| C ₂ -C ₃ -C ₄ | 107,6 | 108,4 | 108,9 | 106,4 | 106,4 | 109,9 | 109,3 | 109,4 | 108,6 | 107.9 |
| C ₃ -C ₄ -C ₅ | 114,4 | 113,5 | 115,9 | 115,0 | 113,2 | 113,8 | 113,9 | 113,0 | 113,0 | 112.4 |
| C ₄ -C ₅ -C ₆ | 106,8 | 106,0 | 108,6 | 107,1 | 106,6 | 106,4 | 106,4 | 105,9 | 105,9 | 105.6 |
| C ₄ -C ₅ -C ₁₀ | 114,0 | 115,0 | 116,1 | 111,8 | 114,1 | 114,5 | 114,6 | 114,5 | 114,6 | 114.4 |
| C ₅ -C ₆ =O ₇₄ | 128,6 | 126,7 | 126,6 | 126,9 | 128,1 | 123,7 | 123,2 | 123,3 | 122,9 | 120.9 |
| C ₅ -C ₆ -O ₇₅ | 123,3 | 121,4 | 120,4 | 119,9 | 122,7 | 118,8 | 119,0 | 118,7 | 118,9 | 123.3 |
| C ₅ -C ₁₀ -C ₁ | 107,6 | 109,6 | 108,0 | 107,6 | 107,4 | 107,7 | 107,7 | 108,3 | 108,2 | 108.8 |
| C ₅ -C ₁₀ -C ₉ | 112,3 | 110,1 | 110,7 | 113,3 | 111,6 | 111,2 | 111,0 | 110,9 | 110,7 | 114.4 |
| C ₅ -C ₁₀ -C ₁₉ | 110,3 | 109,4 | 110,5 | 109,1 | 110,9 | 109,9 | 110,0 | 109,6 | 109,8 | 109.1 |
| C ₆ -C ₅ -C ₁₀ | 112,7 | 111,5 | 113,2 | 113,6 | 111,1 | 112,1 | 112,2 | 111,2 | 111,4 | 112.6 |
| O ₇₅ -C ₇ -C ₈ | 112,7 | 111,5 | 113,9 | 105,7 | 112,3 | 112,6 | 113,2 | 112,1 | 112,9 | 113.6 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| C7-C8-C9 | 111,9 | 111,5 | 112,9 | 112,9 | 111,4 | 113,8 | 113,7 | 113,2 | 113,3 | 112,0 |
| C7-C8-C14 | 108,2 | 108,3 | 109,3 | 106,1 | 102,1 | 108,8 | 109,2 | 108,5 | 108,5 | 109,1 |
| C8-C9-C10 | 115,6 | 114,4 | 117,5 | 113,8 | 117,0 | 117,8 | 117,6 | 117,0 | 116,9 | 116,7 |
| C8-C9-C11 | 110,7 | 112,6 | 111,6 | 110,7 | 108,6 | 109,6 | 109,8 | 110,3 | 110,2 | 110,7 |
| C8-C14-C13 | 111,8 | 112,5 | 115,4 | 113,1 | 112,7 | 114,7 | 114,9 | 114,2 | 114,4 | 115,2 |
| C8-C14-C15 | 118,6 | 118,5 | 120,5 | 117,1 | 118,1 | 118,9 | 119,0 | 118,1 | 118,3 | 118,3 |
| C9-C10-C1 | 105,5 | 106,2 | 106,8 | 106,7 | 105,5 | 105,9 | 106,2 | 106,0 | 106,3 | 108,0 |
| C9-C10-C19 | 111,6 | 112,2 | 111,7 | 110,0 | 111,3 | 111,9 | 111,9 | 112,0 | 112,0 | 111,8 |
| C9-C8-C14 | 108,6 | 109,3 | 110,3 | 110,0 | 106,9 | 108,5 | 108,6 | 108,6 | 108,6 | 109,5 |
| C9-C11-C12 | 115,2 | 116,3 | 118,5 | 115,6 | 113,0 | 114,9 | 114,9 | 114,8 | 114,6 | 114,6 |
| C10-C1-C2 | 112,5 | 115,0 | 117,8 | 113,2 | 112,9 | 116,6 | 116,9 | 116,4 | 116,4 | 116,8 |
| C10-C9-C11 | 109,1 | 109,9 | 111,9 | 109,0 | 108,9 | 111,5 | 111,9 | 111,2 | 111,6 | 113,2 |
| C1-C10-C19 | 109,4 | 109,4 | 109,0 | 110,0 | 109,8 | 110,1 | 109,9 | 109,9 | 109,7 | 108,5 |
| C11-C12-C13 | 110,3 | 110,8 | 113,9 | 109,6 | 109,9 | 111,7 | 111,9 | 111,2 | 111,3 | 111,7 |
| C12-C13-C14 | 106,4 | 105,3 | 104,6 | 106,3 | 106,2 | 106,2 | 106,2 | 106,1 | 106,2 | 104,6 |
| C12-C13-C17 | 115,5 | 115,8 | 115,9 | 116,4 | 115,3 | 116,5 | 116,6 | 116,5 | 116,5 | 115,9 |
| C12-C13-C18 | 110,6 | 111,1 | 110,1 | 111,0 | 110,6 | 111,0 | 110,8 | 111,1 | 111,0 | 111,5 |
| C13-C14-C15 | 103,3 | 104,2 | 103,8 | 102,1 | 103,0 | 104,1 | 104,1 | 104,2 | 104,1 | 102,8 |
| C13-C17-C20 | 116,7 | 117,4 | 120,5 | 116,2 | 117,2 | 119,3 | 119,6 | 118,8 | 118,9 | 121,0 |
| C13-C17-H80 | 108,5 | 106,9 | 106,3 | 106,9 | 107,2 | 105,7 | 105,7 | 105,9 | 105,7 | 105,4 |
| C14-C15-C16 | 104,7 | 104,8 | 105,2 | 103,6 | 104,1 | 104,0 | 104,0 | 104,0 | 103,9 | 104,0 |
| C14-C13-C17 | 101,0 | 101,3 | 100,9 | 101,3 | 100,3 | 100,1 | 100,1 | 100,3 | 100,3 | 100,6 |
| C14-C13-C18 | 112,0 | 112,7 | 114,1 | 110,4 | 114,2 | 112,5 | 112,5 | 112,4 | 112,5 | 114,0 |
| C15-C16-C17 | 107,4 | 107,7 | 108,4 | 107,4 | 107,2 | 107,2 | 107,3 | 107,0 | 107,0 | 107,4 |
| C16-C17-C20 | 113,2 | 111,5 | 114,5 | 114,1 | 110,7 | 112,4 | 112,6 | 111,7 | 112,0 | 111,9 |
| C16-C17-C80 | 108,7 | 109,0 | 106,7 | 107,8 | 110,4 | 108,6 | 108,3 | 109,3 | 109,1 | 108,0 |
| C17-C13-C18 | 111,0 | 110,2 | 110,9 | 110,8 | 110,0 | 110,1 | 110,1 | 109,9 | 109,9 | 109,7 |
| MD^a. | 3.3 | 2.3 | 2.3 | 3.2 | 3.0 | 1.7 | 2.2 | 1.9 | 1.8 | |
| MD^b. | 2.3 | 1.7 | 1.9 | 2.6 | 2.2 | 1.2 | 1.3 | 1.3 | 1.2 | |

^a**MD** -tomando ángulos de valencia más importantes.

^b**MD** - tomando todos los valores

Tabla A3.3- Ángulos diedros (grados) experimentales y calculados por diferentes métodos de la brasinólida.MD-Desviación media. Letras en negrita representan los ángulos más importantes.

| Angulos Diedros | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/ /MNDO | PDDG/ PM3 | B3LYP/ 6-31G | B3LYP/ 6-31G(d,p) | M05-2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) | Exp |
|--|------------|------------|-------------|----------------|--------------|-----------------|----------------------|------------------|-------------------------|--------|
| C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₁ | -60.3 | -61.3 | -57.7 | -73.7 | -62,7 | -57.8 | -57.9 | -60,2 | -59,6 | -58.8 |
| C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | 176.7 | 175.6 | 174.4 | 160.0 | 173,9 | 177.1 | 177.1 | 175,5 | 175,8 | 176.0 |
| C ₁₆ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₁ | -179.7 | -179.2 | -179.1 | -166.1 | -179,3 | -178.8 | -179.3 | -179,7 | -179,8 | -179.9 |
| C ₁₆ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | 57.3 | 56.1 | 51.2 | 39.9 | 57,3 | 56.2 | 55.7 | 55,5 | 55,6 | 54.9 |
| H ₈₀ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₁ | 60.9 | 59.5 | 62.3 | 46.3 | 59,1 | 62.0 | 61.9 | 59,8 | 60,3 | 61.8 |
| H ₈₀ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | -62.1 | -63.6 | -65.7 | -79.9 | -64,2 | -63.0 | -63.1 | -64,4 | -64,3 | -63.4 |
| C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -O ₇₆ | 66.1 | 68.1 | 76.5 | 70.2 | 64,5 | 65.6 | 64.2 | 61,5 | 62,3 | 67.7 |
| C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | -173.0 | -174.2 | -158.1 | -166.9 | -178,1 | -177.0 | -177.2 | -178,9 | -179,5 | -172.1 |
| C ₂₀ -C ₂₂ -O ₇₆ -H ₇₇ | -40.5 | -62.6 | -152.3 | -51.1 | -74,4 | -74.3 | -81.2 | -73,6 | -78,4 | -65.1 |
| C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -O ₇₈ | 171.9 | 173.8 | 136.4 | 163.9 | 168,6 | 178.5 | 179.6 | 178,3 | 176,4 | 170.2 |
| C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ | 67.9 | 54.0 | 100.1 | 72.5 | 50,1 | 61.1 | 59.0 | 58,5 | 55,6 | 48.1 |
| C ₂₁ -C ₂₀ -C ₂₂ -O ₇₆ | -57.9 | -56.2 | -52.2 | -55.9 | -58,7 | -60.8 | -62.1 | -63,8 | -63,3 | -58.7 |
| C ₂₁ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | 63.1 | 61.5 | 73.2 | 67.1 | 58,7 | 56.6 | 56.5 | 53,5 | 55,0 | 61.5 |
| C ₂₂ -C ₂₃ -O ₇₈ -H ₇₉ | 57.9 | 56.4 | 83.9 | 63.1 | 72,3 | 47.0 | 45.8 | 49,6 | 49,4 | 55.3 |
| C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₈ | 67.7 | 61.2 | 75.4 | 69.8 | 55,1 | 54.8 | 55.6 | 53,4 | 54,3 | 56.0 |
| C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ | -166.5 | -174.5 | -154.7 | -164.4 | -177,8 | -179.5 | -179.5 | -177,0 | -178,6 | -179.8 |
| C ₂₃ -C ₂₂ -O ₇₆ -H ₇₇ | 162.8 | 173.3 | 81.5 | 174.2 | 163,0 | 160.1 | 152.7 | 161,6 | 156,5 | 167.8 |
| C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -C ₂₆ | 62.2 | 74.9 | 69.6 | 61.6 | 51,8 | 43.9 | 41.6 | 41,9 | 43,8 | 57.5 |
| C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -C ₂₇ | -176.1 | -162.9 | -165.0 | -176.7 | -171,7 | -167.4 | -165.3 | -164,4 | -165,9 | -179.7 |
| C ₂₄ -C ₂₃ -O ₇₈ -H ₇₉ | -178.8 | -179.7 | -150.1 | -174.5 | -165,0 | -172.6 | -172.0 | -174,1 | -174,5 | -176.7 |
| C ₂₄ -C ₂₃ -C ₂₂ -O ₇₆ | 168.5 | 176.2 | 136.3 | 162.3 | 171,6 | 177.0 | 178.5 | 179,7 | 178,0 | 172.0 |
| C ₂₅ -C ₂₄ -C ₂₃ -O ₇₈ | 70.7 | 65.3 | 80.2 | 71.4 | 58,2 | 59.0 | 58.9 | 57,1 | 57,5 | 57.3 |
| C ₂₆ -C ₂₅ -C ₂₄ -C ₂₈ | -173.0 | -161.6 | -161.1 | -172.4 | -175,5 | -168.7 | -166.6 | -165,4 | -167,9 | -178.4 |
| C ₂₆ -C ₂₅ -C ₂₄ -H ₈₁ | -53.9 | -41.7 | -45.5 | -54.2 | -65,6 | -72.5 | -74.9 | -75,0 | -72,8 | -60.9 |
| C ₂₇ -C ₂₅ -C ₂₄ -C ₂₈ | -51.3 | -39.4 | -35.7 | -50.8 | -64,6 | -67.8 | -69.7 | -72,1 | -70,0 | -55.7 |
| C ₂₇ -C ₂₅ -C ₂₄ -H ₈₁ | 67.9 | 80.6 | 80.0 | 67.5 | 54,4 | 51.0 | 48.9 | 47,5 | 49,3 | 61.9 |
| O ₇₆ -C ₂₂ -C ₂₃ -O ₇₈ | -48.4 | -64.0 | -12.7 | -38.2 | -69,9 | -56.6 | -57.0 | -59,9 | -61,2 | -65.9 |
| C ₂₈ -C ₂₄ -C ₂₃ -O ₇₈ | -55.1 | -59.1 | -49.7 | -54.3 | -64,5 | -56.6 | -57.1 | -66,5 | -66,8 | -66.9 |
| MD^b. | 6.1 | 6.1 | 22.8 | 10.5 | 4.3 | 5.6 | 6.7 | 6.4 | 5.0 | |

^bMD- tomando todos los ángulos diedros.

Tabla-A3.4-Distancias de enlace (Å) experimentales y calculadas por los diferentes métodos de la 24 Epibrasinólida.MD-Desviación media. Letras en negrita representan los parámetros más importantes.

| Distancias de enlace | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/ MNDO | PDDG/ PM3 | B3LYP/ 6-31G | B3LYP/6- 31G(d,p) | M05- 2X/ 6-31G | M05-2X/ 6- 31++G(d,p) | Exp |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|---------------|--------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-------|
| C₆-O₇₅ | 1,365 | 1,371 | 1,363 | 1,352 | 1,358 | 1,378 | 1,354 | 1,367 | 1,345 | 1,361 |
| O₇₅-C₇ | 1,410 | 1,423 | 1,400 | 1,393 | 1,406 | 1,466 | 1,434 | 1,455 | 1,430 | 1,433 |
| C₂-O₇₀ | 1,414 | 1,423 | 1,401 | 1,387 | 1,410 | 1,467 | 1,433 | 1,457 | 1,430 | 1,431 |
| C₃-O₇₂ | 1,413 | 1,419 | 1,396 | 1,383 | 1,407 | 1,458 | 1,425 | 1,447 | 1,422 | 1,430 |
| C₆=O₇₄ | 1,214 | 1,233 | 1,228 | 1,231 | 1,219 | 1,232 | 1,210 | 1,226 | 1,207 | 1,220 |
| C₂₂-O₇₆ | 1,414 | 1,424 | 1,398 | 1,388 | 1,409 | 1,480 | 1,446 | 1,466 | 1,439 | 1,429 |
| C₂₃-O₇₈ | 1,410 | 1,417 | 1,397 | 1,380 | 1,409 | 1,460 | 1,427 | 1,451 | 1,426 | 1,428 |
| C₂₄-C₂₈ | 1,518 | 1,514 | 1,546 | 1,543 | 1,518 | 1,544 | 1,539 | 1,535 | 1,533 | 1,537 |
| O₇₀-H₇₁ | 0,948 | 0,964 | 0,947 | 0,941 | 0,951 | 0,977 | 0,966 | 0,972 | 0,962 | 0,950 |
| O₇₂-H₇₃ | 0,948 | 0,967 | 0,947 | 0,941 | 0,951 | 0,981 | 0,969 | 0,976 | 0,965 | 0,950 |
| O₇₆-H₇₇ | 0,949 | 0,964 | 0,947 | 0,945 | 0,951 | 0,976 | 0,965 | 0,971 | 0,961 | 0,949 |
| O₇₈-H₇₉ | 0,948 | 0,966 | 0,947 | 0,941 | 0,950 | 0,982 | 0,970 | 0,976 | 0,964 | 0,950 |
| C ₁ -C ₂ | 1,530 | 1,521 | 1,561 | 1,561 | 1,531 | 1,530 | 1,530 | 1,521 | 1,522 | 1,525 |
| C ₂ -C ₃ | 1,548 | 1,535 | 1,575 | 1,591 | 1,551 | 1,523 | 1,525 | 1,512 | 1,515 | 1,501 |
| C ₃ -C ₄ | 1,529 | 1,516 | 1,555 | 1,561 | 1,530 | 1,517 | 1,518 | 1,508 | 1,511 | 1,505 |
| C ₄ -C ₅ | 1,535 | 1,527 | 1,556 | 1,556 | 1,535 | 1,550 | 1,545 | 1,540 | 1,537 | 1,547 |
| C ₅ -C ₆ | 1,525 | 1,511 | 1,547 | 1,555 | 1,521 | 1,528 | 1,532 | 1,518 | 1,525 | 1,511 |
| C ₇ -C ₈ | 1,537 | 1,529 | 1,567 | 1,569 | 1,539 | 1,534 | 1,533 | 1,525 | 1,525 | 1,518 |
| C ₈ -C ₉ | 1,548 | 1,537 | 1,578 | 1,564 | 1,548 | 1,567 | 1,561 | 1,554 | 1,549 | 1,544 |
| C ₉ -C ₁₀ | 1,571 | 1,558 | 1,610 | 1,584 | 1,566 | 1,592 | 1,583 | 1,574 | 1,568 | 1,577 |
| C ₁₀ -C ₅ | 1,555 | 1,544 | 1,585 | 1,571 | 1,544 | 1,591 | 1,582 | 1,574 | 1,568 | 1,572 |
| C ₁₀ -C ₁ | 1,548 | 1,536 | 1,578 | 1,574 | 1,547 | 1,568 | 1,561 | 1,554 | 1,551 | 1,539 |
| C ₉ -C ₁₁ | 1,542 | 1,530 | 1,562 | 1,560 | 1,540 | 1,557 | 1,551 | 1,547 | 1,543 | 1,540 |
| C ₁₁ -C ₁₂ | 1,520 | 1,518 | 1,544 | 1,545 | 1,522 | 1,546 | 1,540 | 1,538 | 1,534 | 1,544 |
| C ₁₂ -C ₁₃ | 1,526 | 1,517 | 1,552 | 1,546 | 1,524 | 1,542 | 1,538 | 1,532 | 1,529 | 1,512 |
| C ₁₃ -C ₁₄ | 1,546 | 1,548 | 1,583 | 1,569 | 1,542 | 1,564 | 1,557 | 1,550 | 1,544 | 1,545 |
| C ₁₄ -C ₈ | 1,529 | 1,519 | 1,561 | 1,547 | 1,532 | 1,550 | 1,545 | 1,537 | 1,535 | 1,536 |
| C ₁₄ -C ₁₅ | 1,530 | 1,524 | 1,547 | 1,546 | 1,527 | 1,545 | 1,539 | 1,537 | 1,534 | 1,524 |
| C ₁₅ -C ₁₆ | 1,533 | 1,529 | 1,544 | 1,555 | 1,539 | 1,557 | 1,552 | 1,550 | 1,548 | 1,549 |
| C ₁₆ -C ₁₇ | 1,544 | 1,542 | 1,564 | 1,576 | 1,549 | 1,571 | 1,564 | 1,560 | 1,556 | 1,531 |
| C ₁₇ -C ₁₃ | 1,554 | 1,548 | 1,595 | 1,574 | 1,552 | 1,575 | 1,568 | 1,558 | 1,554 | 1,568 |
| C ₁₃ -C ₁₈ | 1,531 | 1,519 | 1,555 | 1,549 | 1,528 | 1,548 | 1,544 | 1,538 | 1,537 | 1,536 |
| C ₁₀ -C ₁₉ | 1,529 | 1,521 | 1,558 | 1,549 | 1,527 | 1,549 | 1,545 | 1,540 | 1,538 | 1,537 |
| C ₁₇ -C ₂₀ | 1,534 | 1,524 | 1,571 | 1,553 | 1,535 | 1,558 | 1,553 | 1,543 | 1,540 | 1,553 |
| C ₂₀ -C ₂₁ | 1,520 | 1,516 | 1,547 | 1,543 | 1,521 | 1,541 | 1,537 | 1,532 | 1,531 | 1,525 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| C ₂₀ -C ₂₂ | 1,546 | 1,541 | 1,589 | 1,587 | 1,556 | 1,551 | 1,550 | 1,537 | 1,537 | 1.542 |
| C ₂₂ -C ₂₃ | 1,563 | 1,546 | 1,606 | 1,606 | 1,572 | 1,537 | 1,542 | 1,523 | 1,529 | 1.570 |
| C ₂₃ -C ₂₄ | 1,552 | 1,538 | 1,584 | 1,587 | 1,549 | 1,544 | 1,544 | 1,531 | 1,532 | 1.533 |
| C ₂₄ -C ₂₅ | 1,543 | 1,531 | 1,570 | 1,561 | 1,540 | 1,564 | 1,559 | 1,550 | 1,548 | 1.539 |
| C ₂₅ -C ₂₆ | 1,518 | 1,514 | 1,544 | 1,543 | 1,519 | 1,543 | 1,538 | 1,536 | 1,532 | 1.536 |
| C ₂₆ -C ₂₇ | 1,523 | 1,517 | 1,548 | 1,551 | 1,526 | 1,544 | 1,539 | 1,534 | 1,533 | 1.514 |
| MD^a | 0.013 | 0.014 | 0.018 | 0.023 | 0.013 | 0.028 | 0.010 | 0.020 | 0.009 | |
| MD^b | 0.012 | 0.013 | 0.027 | 0.027 | 0.013 | 0.019 | 0.012 | 0.012 | 0.009 | |

^aMD - tomando distancias de enlace más importantes.

^bMD -tomando todas las distancias de enlace.

Tabla A3.5- Ángulos de valencia (grados) experimentales y calculados por diferentes métodos de la 24 Epibrasinólida.MD-Desviación media. Letras en negrita representan los ángulos más importantes.

| Angulos Valencia | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | B3LYP/6-31G | B3LYP/6-31G(d,p) | M05-2X/6-31G | M05-2X/6-31++G(d,p) | Exp |
|---|-------|-------|-------|-----------|----------|-------------|------------------|--------------|---------------------|-------|
| C₂-O₇₀-H₇₁ | 106,7 | 107,2 | 111,7 | 117,4 | 105,0 | 110.9 | 108.6 | 112,0 | 109,7 | 109.5 |
| C₃-O₇₂-H₇₃ | 106,6 | 106,4 | 112.0 | 117,2 | 105,3 | 107.2 | 105.4 | 108,0 | 106,9 | 109.4 |
| C₆-O₇₅-C₇ | 118,2 | 117,6 | 124,5 | 123,7 | 118,8 | 121.7 | 121.5 | 121,6 | 121,1 | 119.9 |
| O₇₄=C₆-O₇₅ | 108.0 | 111.9 | 113,0 | 113,5 | 109,1 | 117.5 | 117.8 | 118,0 | 118,2 | 120.2 |
| C₁₃-C₁₇-C₁₆ | 103,3 | 103,7 | 102,7 | 103,6 | 102.0 | 103.2 | 103.2 | 103,3 | 103,2 | 103.6 |
| C₁₇-C₂₀-C₂₁ | 110,8 | 111,9 | 113,1 | 111,5 | 110,2 | 113.3 | 113.4 | 113,0 | 113,0 | 112.9 |
| C₁₇-C₂₀-C₂₂ | 113,2 | 110,4 | 112,8 | 110,7 | 111,3 | 110.1 | 109.9 | 109,5 | 109,7 | 110.3 |
| C₂₀-C₁₇-H₈₀ | 107,7 | 107,7 | 105,3 | 105,9 | 108,6 | 107.9 | 106.8 | 107,5 | 107,6 | 106.1 |
| C₂₀-C₂₂-O₇₆ | 112,9 | 111,5 | 108,8 | 112,9 | 112,6 | 111.2 | 111.1 | 111,3 | 111,5 | 109.3 |
| C₂₀-C₂₂-C₂₃ | 110,3 | 111,9 | 113,3 | 110,0 | 111,7 | 116.9 | 117.0 | 116,2 | 115,9 | 110.5 |
| C₂₂-O₇₆-H₇₇ | 106.0 | 106,9 | 111,8 | 115,5 | 104,8 | 110.6 | 108.3 | 111,6 | 109,5 | 109.4 |
| C₂₂-C₂₃-C₂₄ | 110,7 | 111,4 | 113,7 | 109,4 | 110,3 | 116.5 | 116.5 | 115,8 | 115,5 | 111.2 |
| C₂₂-C₂₃-O₇₈ | 112,1 | 110,8 | 111,9 | 112,2 | 109,8 | 107.5 | 108.0 | 107,3 | 108,1 | 110.7 |
| C₂₃-C₂₂-O₇₆ | 118,5 | 105,6 | 112,2 | 110,3 | 105,4 | 102.8 | 103.7 | 103,0 | 103,9 | 111.5 |
| C₂₃-O₇₈-H₇₉ | 106,9 | 106,5 | 111,8 | 117,9 | 105,6 | 106.2 | 104.5 | 107,2 | 106,2 | 112.9 |
| C₂₃-C₂₄-C₂₈ | 110,6 | 109,5 | 110,7 | 110,1 | 110,3 | 109.1 | 109.0 | 108,7 | 109,0 | 110.3 |
| C₂₃-C₂₄-C₂₅ | 113,6 | 112,9 | 116,2 | 114,6 | 113,5 | 115.3 | 115.6 | 114,9 | 115,0 | 114.7 |
| C₂₄-C₂₃-O₇₈ | 108,5 | 108,2 | 109,8 | 111,6 | 107,4 | 109.1 | 109.5 | 109,4 | 109,4 | 110.2 |
| C₂₄-C₂₅-C₂₆ | 114,4 | 113,2 | 116,6 | 114,4 | 113,8 | 114.1 | 114.5 | 113,5 | 113,9 | 114.2 |
| C₂₄-C₂₅-C₂₇ | 110.0 | 110,3 | 111,6 | 111,3 | 109.0 | 110.8 | 111.1 | 110,5 | 110,4 | 111.9 |
| C ₁ -C ₂ -O ₇₀ | 112,7 | 110,6 | 111,8 | 112,9 | 111,4 | 110,3 | 110,7 | 109,7 | 110,4 | 106.3 |
| C ₃ -C ₂ -O ₇₀ | 107,5 | 105,9 | 108,4 | 109,2 | 106,8 | 104,9 | 105,8 | 104,8 | 106,0 | 110.4 |
| C ₂ -C ₃ -O ₇₂ | 113,8 | 111,8 | 114,0 | 113,9 | 114,1 | 109,7 | 110,3 | 109,1 | 110,5 | 111.5 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| C4-C3-O72 | 108,1 | 108,5 | 109,6 | 111,4 | 107,6 | 108,5 | 109,2 | 108,5 | 108,9 | 109,7 |
| C1-C2-C3 | 109,8 | 110,7 | 112,4 | 110,2 | 109,2 | 111,2 | 110,7 | 110,9 | 110,8 | 111,6 |
| C2-C3-C4 | 107,6 | 108,4 | 108,9 | 106,9 | 106,4 | 109,8 | 109,3 | 109,4 | 108,7 | 109,9 |
| C3-C4-C5 | 114,3 | 113,5 | 115,9 | 114,5 | 113,2 | 113,9 | 114,0 | 112,9 | 113,0 | 113,9 |
| C4-C5-C6 | 106,8 | 106,0 | 108,6 | 107,8 | 106,6 | 106,3 | 106,4 | 105,9 | 105,9 | 105,8 |
| C4-C5-C10 | 113,8 | 115,0 | 116,1 | 111,5 | 114,1 | 114,7 | 114,7 | 114,5 | 114,5 | 113,2 |
| C5-C6=O74 | 128,5 | 126,7 | 126,6 | 127,1 | 128,1 | 123,7 | 123,2 | 123,3 | 122,9 | 120,2 |
| C5-C6-O75 | 123,4 | 121,3 | 120,4 | 119,3 | 122,7 | 118,8 | 119,0 | 118,6 | 118,9 | 119,5 |
| C5-C10-C1 | 107,5 | 109,6 | 108,0 | 107,2 | 107,4 | 107,9 | 107,8 | 108,4 | 108,2 | 106,6 |
| C5-C10-C9 | 112,3 | 110,1 | 110,7 | 113,1 | 111,6 | 111,1 | 110,8 | 110,9 | 110,8 | 111,4 |
| C5-C10-C19 | 110,4 | 109,4 | 110,5 | 109,4 | 110,9 | 109,8 | 110,0 | 109,5 | 109,7 | 109,9 |
| C6-C5-C10 | 113,0 | 111,5 | 113,2 | 113,7 | 111,1 | 112,1 | 112,1 | 111,1 | 111,4 | 113,2 |
| O75-C7-C8 | 112,6 | 111,5 | 113,9 | 112,6 | 112,3 | 112,6 | 113,3 | 112,1 | 112,8 | 113,1 |
| C7-C8-C9 | 111,5 | 111,6 | 112,9 | 113,3 | 111,4 | 113,3 | 113,4 | 113,0 | 113,0 | 112,2 |
| C7-C8-C14 | 108,2 | 108,2 | 109,3 | 107,0 | 107,0 | 108,9 | 109,2 | 108,6 | 108,6 | 107,8 |
| C8-C9-C10 | 115,1 | 114,4 | 117,5 | 117,2 | 117,1 | 117,4 | 117,5 | 116,8 | 116,7 | 116,3 |
| C8-C9-C11 | 110,9 | 112,6 | 111,6 | 109,3 | 108,5 | 110,3 | 110,2 | 110,6 | 110,5 | 111,1 |
| C8-C14-C13 | 112,7 | 112,6 | 115,4 | 113,0 | 112,9 | 114,5 | 114,8 | 114,1 | 114,3 | 114,3 |
| C8-C14-C15 | 118,8 | 118,6 | 120,5 | 117,1 | 118,0 | 118,7 | 118,9 | 118,0 | 118,2 | 118,8 |
| C9-C10-C1 | 105,7 | 106,2 | 106,8 | 105,5 | 105,5 | 106,0 | 106,3 | 106,0 | 106,3 | 106,2 |
| C9-C10-C19 | 111,4 | 112,2 | 111,7 | 112,3 | 111,2 | 112,0 | 111,9 | 112,0 | 112,0 | 111,5 |
| C9-C8-C14 | 108,9 | 109,3 | 110,3 | 109,0 | 106,9 | 108,9 | 108,9 | 108,8 | 108,9 | 109,7 |
| C9-C11-C12 | 114,7 | 116,3 | 118,5 | 114,6 | 112,9 | 115,1 | 115,0 | 114,9 | 114,7 | 114,8 |
| C10-C1-C2 | 112,6 | 115,0 | 117,8 | 113,9 | 112,9 | 116,4 | 116,7 | 116,4 | 116,3 | 115,9 |
| C10-C9-C11 | 109,6 | 109,9 | 111,9 | 109,5 | 108,9 | 111,4 | 111,9 | 111,1 | 111,5 | 110,8 |
| C1-C10-C19 | 109,4 | 109,4 | 109,0 | 109,1 | 109,8 | 109,9 | 109,8 | 109,8 | 109,7 | 111,0 |
| C11-C12-C13 | 109,1 | 110,8 | 113,9 | 109,7 | 109,9 | 111,8 | 112,0 | 111,3 | 111,5 | 111,7 |
| C12-C13-C14 | 106,6 | 105,8 | 104,6 | 106,4 | 106,4 | 106,0 | 106,1 | 106,1 | 106,2 | 105,5 |
| C12-C13-C17 | 115,2 | 115,7 | 115,9 | 117,1 | 115,3 | 116,4 | 116,5 | 116,5 | 116,4 | 116,3 |
| C12-C13-C18 | 109,8 | 111,0 | 110,1 | 110,3 | 110,6 | 111,0 | 110,8 | 111,2 | 111,1 | 112,1 |
| C13-C14-C15 | 103,3 | 103,9 | 103,8 | 101,9 | 102,6 | 104,2 | 104,2 | 104,1 | 104,0 | 104,2 |
| C13-C17-C20 | 114,7 | 116,7 | 120,5 | 117,5 | 116,2 | 119,3 | 119,7 | 118,8 | 118,8 | 117,7 |
| C13-C17-H80 | 107,7 | 107,6 | 106,3 | 108,0 | 107,9 | 105,8 | 105,7 | 105,8 | 105,7 | 107,8 |
| C14-C15-C16 | 104,4 | 104,8 | 105,2 | 103,1 | 104,0 | 104,1 | 104,0 | 104,0 | 103,9 | 104,5 |
| C14-C13-C17 | 100,8 | 101,2 | 100,9 | 101,3 | 100,3 | 100,1 | 100,1 | 100,3 | 100,3 | 100,1 |
| C14-C13-C18 | 112,9 | 112,5 | 114,1 | 110,8 | 113,9 | 112,5 | 112,6 | 112,4 | 112,4 | 111,9 |
| C15-C16-C17 | 107,4 | 107,6 | 108,4 | 107,2 | 107,2 | 107,2 | 107,2 | 107,0 | 107,0 | 107,2 |
| C16-C17-C20 | 114,7 | 112,3 | 114,5 | 113,3 | 111,9 | 112,4 | 112,5 | 111,7 | 112,0 | 112,6 |
| C16-C17-C80 | 108,4 | 108,7 | 106,7 | 108,3 | 109,9 | 108,6 | 108,3 | 109,3 | 109,1 | 108,8 |
| C17-C13-C18 | 111,4 | 110,2 | 110,9 | 110,5 | 110,0 | 110,2 | 110,3 | 109,9 | 110,0 | 110,3 |
| C21-C20-C22 | 111,3 | 109,8 | 111,7 | 111,2 | 110,4 | 111,2 | 111,1 | 111,0 | 111,2 | 110,5 |
| MD^a | 2.5 | 2.1 | 1.8 | 2.3 | 2.8 | 2.0 | 2.1 | 2.0 | 1.8 | |
| MD^b | 2.1 | 1.7 | 1.8 | 2.0 | 2.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.2 | |

^aMD -tomando ángulos de valencia más importantes.

^bMD - tomando todos los valores.

Tabla A3.6- Ángulos diedros (grados) experimentales y calculados por diferentes métodos de la 24-Epibrasinólida.MD
Desviación media. Letras en negrita representan los ángulos más importantes.

| Ángulos Diedros | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/ MNDO | PDDG/ PM3 | B3LYP /6-31G | B3LYP/ 6-31G(d,p) | M05-2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) | Exp |
|------------------------|-------------|------------|-------------|---------------|--------------|-----------------|----------------------|------------------|-------------------------|--------|
| C13-C17-C20-C21 | -78,1 | -59,5 | -57,7 | -50,9 | -62,8 | -58.8 | -57.8 | -59,8 | -59,4 | -58,5 |
| C13-C17-C20-C22 | 156,1 | 177,8 | 174,3 | 175,2 | 174,4 | 176.1 | 177.2 | 176,0 | 176,0 | 177,4 |
| C16-C17-C20-C21 | -162,6 | -179.0 | -179,1 | -171,7 | -179,4 | -179.7 | -179.2 | -179,9 | -179,6 | -178,9 |
| C16-C17-C20-C22 | 36,8 | 58,3 | 51,1 | 64.0 | 57,8 | 55.1 | 55.8 | 55,9 | 55,7 | 56,9 |
| H80-C17-C20-C21 | 41,8 | 61,4 | 62,2 | 69,8 | 59,0 | 61.1 | 62.0 | 60,2 | 60,5 | 62,2 |
| H80-C17-C20-C22 | -84,0 | -61,3 | -65,8 | -54,6 | -63,8 | -64.1 | -63.0 | -64,1 | -64,2 | -62.0 |
| C17-C20-C22-O76 | 71,8 | 88,6 | 75,7 | 66,7 | 80,5 | 65.1 | 64.6 | 63,0 | 64,2 | 73,4 |
| C17-C20-C22-C23 | -168,3 | -153,4 | -158,8 | -169,7 | -161,0 | -177.3 | -176.6 | -179,6 | -177,1 | -162,6 |
| C20-C22-O76-H77 | -54,9 | -54,2 | -153,5 | -42.0 | -55,1 | -46,8 | -80.9 | -73,3 | -78,5 | -57,5 |
| C20-C22-C23-O78 | -174,1 | -160,8 | -133,2 | -162,4 | -174,5 | -178.6 | -179.4 | -177,8 | -174,3 | -140,8 |
| C20-C22-C23-C24 | 64,6 | 78,7 | 101,6 | 73,3 | 56,4 | 58.6 | 57.0 | 55,4 | 51,4 | 96,3 |
| C21-C20-C22-O76 | -53,8 | -35,4 | -53.0 | -57,8 | -42,2 | -61.3 | -61.7 | -62,4 | -61,5 | -51,1 |
| C21-C20-C22-C23 | 66,1 | 82,7 | 72,5 | 65,8 | 76,3 | 56.3 | 57.1 | 55,0 | 57,2 | 71,9 |
| C22-C23-O78-H79 | 58,4 | 52,9 | 82,2 | 61,8 | 72,0 | 48.3 | 46.3 | 51,6 | 52,6 | 56,6 |
| C22-C23-C24-C28 | -171,1 | -155,7 | -154,2 | -163,3 | -174,4 | -176.9 | -177.5 | -179,4 | -178,2 | -162,3 |
| C22-C23-C24-C25 | 59,8 | 78,0 | 73,1 | 67,4 | 58,0 | 54.4 | 53.5 | 51,9 | 53,8 | 68,4 |
| C23-C22-O76-H77 | -176,6 | -175,9 | -80,38 | -165,5 | -177,1 | -159.4 | -152.6 | -161,5 | -155,9 | -180,0 |
| C23-C24-C25-C26 | 91,1 | 88,6 | 90,9 | 92,2 | 95,6 | 75.5 | 73.2 | 76,5 | 80,1 | 86,5 |
| C23-C24-C25-C27 | -144,6 | -147,6 | -141.0 | -143,9 | -142,8 | -158.9 | -160.8 | -158,9 | -155,4 | -147,8 |
| C24-C23-O78-H79 | -179,1 | -175,3 | -150,6 | -175,1 | -168,1 | -175.5 | -174.0 | -177,9 | -179,2 | -180,0 |
| C24-C23-C22-O76 | -172,1 | -159,9 | -134,7 | -161,6 | -179,1 | -179.3 | -179.8 | -177,3 | -174,2 | -141,9 |
| C25-C24-C23-O78 | -63,5 | -44,0 | -53,2 | -57,3 | -61,6 | -67.5 | -69.3 | -69,4 | -68,4 | -54,7 |
| C26-C25-C24-C28 | -36,5 | -36,1 | -40,1 | -35,4 | -30,7 | -51.1 | -53.7 | -48,9 | -45,9 | -41,2 |
| C26-C25-C24-H81 | -154,2 | -154,6 | -154,4 | -153,3 | -148,1 | -168.4 | -170.7 | -167,0 | -163,5 | -157,1 |
| C27-C25-C24-C28 | 87,8 | 87,8 | 88,0 | 88,5 | 91.0 | 74.5 | 72.3 | 75,7 | 78,6 | 84,4 |
| C27-C25-C24-H81 | -29,9 | -30,7 | -26,3 | -29,4 | -26,5 | -42.8 | -44.7 | -42,4 | -39,0 | -31,5 |
| O76-C22-C23-O78 | -50.8 | -39,4 | -9,6 | -37,3 | -62,8 | -56.6 | -56.7 | -60,3 | -62,9 | -19,0 |
| C28-C24-C23-O78 | 65,6 | 82,2 | 79,0 | 72,0 | 66.0 | 61.2 | 59.7 | 58,2 | 59,7 | 74,6 |
| MD^b. | 11.7 | 7.0 | 12.3 | 7.9 | 10.9 | 12.2 | 13.0 | 12.6 | 11.4 | |

^bMD- tomando todos los ángulos diedros.

Tabla-A3.7-Distancias de enlace (Å) experimentales y calculadas por los diferentes métodos de la 22,23-diepi-28 homobrasinólida.MD-Desviación media. Letras en negrita representan los parámetros más importantes.

| Distancias de enlace | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/ MNDO | PDDG/ PM3 | B3LYP/6- 31G | B3LYP/ 6- 31G(d,p) | M05-2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) | Exp |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|---------------|--------------|-----------------|--------------------------|------------------|-------------------------|-------|
| C₆-O₇₅ | 1,334 | 1,371 | 1,363 | 1,350 | 1,357 | 1,377 | 1,353 | 1,367 | 1,344 | 1.335 |
| O₇₅-C₇ | 1,410 | 1,423 | 1,400 | 1,390 | 1,406 | 1,466 | 1,434 | 1,455 | 1,431 | 1.431 |
| C₂-O₇₀ | 1,407 | 1,423 | 1,401 | 1,380 | 1,408 | 1,467 | 1,433 | 1,457 | 1,430 | 1.440 |
| C₃-O₇₂ | 1,415 | 1,419 | 1,396 | 1,386 | 1,407 | 1,458 | 1,425 | 1,448 | 1,422 | 1.439 |
| C₆=O₇₄ | 1,214 | 1,233 | 1,228 | 1,232 | 1,219 | 1,233 | 1,210 | 1,226 | 1,207 | 1.220 |
| C₂₂-O₇₆ | 1,409 | 1,420 | 1,394 | 1,382 | 1,402 | 1,470 | 1,434 | 1,463 | 1,420 | 1.438 |
| C₂₃-O₇₈ | 1,416 | 1,416 | 1,397 | 1,388 | 1,407 | 1,461 | 1,430 | 1,455 | 1,429 | 1.444 |
| C₂₄-C₂₈ | 1,537 | 1,524 | 1,561 | 1,554 | 1,540 | 1,553 | 1,546 | 1,539 | 1,536 | 1.565 |
| O₇₀-H₇₁ | 0,950 | 0,964 | 0,947 | 0,940 | 0,951 | 0,977 | 0,966 | 0,972 | 0,962 | 0.952 |
| O₇₂-H₇₃ | 0,947 | 0,967 | 0,947 | 0,941 | 0,951 | 0,981 | 0,969 | 0,976 | 0,965 | 0.952 |
| O₇₆-H₇₇ | 0,952 | 0,964 | 0,948 | 0,943 | 0,952 | 0,974 | 0,964 | 0,969 | 0,961 | 0.952 |
| O₇₈-H₇₉ | 0,952 | 0,967 | 0,947 | 0,944 | 0,953 | 0,983 | 0,970 | 0,977 | 0,960 | 0.949 |
| C₂₈-C₂₉ | 1,512 | 1,507 | 1,534 | 1,537 | 1,516 | 1,539 | 1,535 | 1,533 | 1,531 | 1.555 |
| C ₁ -C ₂ | 1,529 | 1,521 | 1,561 | 1,562 | 1,532 | 1,530 | 1,530 | 1,521 | 1,523 | 1.551 |
| C ₂ -C ₃ | 1,550 | 1,535 | 1,575 | 1,589 | 1,546 | 1,523 | 1,526 | 1,512 | 1,516 | 1.542 |
| C ₃ -C ₄ | 1,527 | 1,516 | 1,555 | 1,561 | 1,534 | 1,517 | 1,518 | 1,508 | 1,511 | 1.545 |
| C ₄ -C ₅ | 1,535 | 1,527 | 1,556 | 1,557 | 1,534 | 1,549 | 1,544 | 1,539 | 1,537 | 1.562 |
| C ₅ -C ₆ | 1,525 | 1,511 | 1,547 | 1,557 | 1,521 | 1,527 | 1,531 | 1,518 | 1,524 | 1.521 |
| C ₇ -C ₈ | 1,535 | 1,529 | 1,567 | 1,572 | 1,539 | 1,533 | 1,532 | 1,524 | 1,524 | 1.558 |
| C ₈ -C ₉ | 1,545 | 1,536 | 1,578 | 1,562 | 1,547 | 1,568 | 1,561 | 1,554 | 1,550 | 1.571 |
| C ₉ -C ₁₀ | 1,571 | 1,558 | 1,610 | 1,586 | 1,567 | 1,592 | 1,583 | 1,574 | 1,567 | 1.588 |
| C ₁₀ -C ₅ | 1,554 | 1,544 | 1,585 | 1,573 | 1,544 | 1,590 | 1,581 | 1,574 | 1,566 | 1.572 |
| C ₁₀ -C ₁ | 1,547 | 1,536 | 1,578 | 1,567 | 1,547 | 1,568 | 1,561 | 1,555 | 1,551 | 1.573 |
| C ₉ -C ₁₁ | 1,541 | 1,530 | 1,562 | 1,561 | 1,538 | 1,557 | 1,550 | 1,546 | 1,567 | 1.567 |
| C ₁₁ -C ₁₂ | 1,520 | 1,518 | 1,544 | 1,542 | 1,523 | 1,545 | 1,539 | 1,538 | 1,542 | 1.554 |
| C ₁₂ -C ₁₃ | 1,528 | 1,517 | 1,552 | 1,547 | 1,527 | 1,543 | 1,538 | 1,533 | 1,530 | 1.555 |
| C ₁₃ -C ₁₄ | 1,547 | 1,549 | 1,584 | 1,568 | 1,544 | 1,563 | 1,556 | 1,551 | 1,545 | 1.558 |
| C ₁₄ -C ₈ | 1,531 | 1,519 | 1,561 | 1,545 | 1,532 | 1,551 | 1,546 | 1,538 | 1,537 | 1.567 |
| C ₁₄ -C ₁₅ | 1,527 | 1,524 | 1,547 | 1,545 | 1,524 | 1,543 | 1,538 | 1,537 | 1,532 | 1.547 |
| C ₁₅ -C ₁₆ | 1,531 | 1,529 | 1,545 | 1,551 | 1,537 | 1,557 | 1,552 | 1,550 | 1,547 | 1.555 |
| C ₁₆ -C ₁₇ | 1,548 | 1,544 | 1,565 | 1,578 | 1,555 | 1,576 | 1,568 | 1,561 | 1,562 | 1.566 |
| C ₁₇ -C ₁₃ | 1,556 | 1,551 | 1,598 | 1,578 | 1,555 | 1,579 | 1,572 | 1,559 | 1,558 | 1.572 |
| C ₁₃ -C ₁₈ | 1,529 | 1,519 | 1,555 | 1,548 | 1,527 | 1,550 | 1,546 | 1,538 | 1,539 | 1.568 |
| C ₁₀ -C ₁₉ | 1,528 | 1,521 | 1,558 | 1,549 | 1,526 | 1,549 | 1,545 | 1,540 | 1,537 | 1.564 |
| C ₁₇ -C ₂₀ | 1,539 | 1,523 | 1,570 | 1,554 | 1,535 | 1,558 | 1,554 | 1,547 | 1,542 | 1.573 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| C ₂₀ -C ₂₁ | 1,523 | 1,518 | 1,548 | 1,549 | 1,529 | 1,547 | 1,541 | 1,534 | 1,536 | 1.562 |
| C ₂₀ -C ₂₂ | 1,561 | 1,546 | 1,603 | 1,598 | 1,565 | 1,563 | 1,565 | 1,551 | 1,557 | 1.581 |
| C ₂₂ -C ₂₃ | 1,566 | 1,550 | 1,602 | 1,607 | 1,579 | 1,548 | 1,543 | 1,524 | 1,533 | 1.566 |
| C ₂₃ -C ₂₄ | 1,551 | 1,542 | 1,591 | 1,586 | 1,558 | 1,561 | 1,558 | 1,544 | 1,540 | 1.576 |
| C ₂₄ -C ₂₅ | 1,546 | 1,533 | 1,575 | 1,573 | 1,544 | 1,567 | 1,563 | 1,554 | 1,552 | 1.575 |
| C ₂₅ -C ₂₆ | 1,521 | 1,513 | 1,543 | 1,545 | 1,521 | 1,544 | 1,539 | 1,536 | 1,533 | 1.558 |
| C ₂₆ -C ₂₇ | 1,522 | 1,516 | 1,547 | 1,549 | 1,525 | 1,543 | 1,538 | 1,535 | 1,533 | 1.559 |
| MD^a | 0.017 | 0.020 | 0.022 | 0.028 | 0.020 | 0.025 | 0.013 | 0.020 | 0.006 | |
| MD^b | 0.021 | 0.028 | 0.017 | 0.020 | 0.022 | 0.016 | 0.014 | 0.002 | 0.009 | |

^aMD - tomando distancias de enlace más importantes.

^bMD -tomando todas las distancias de enlace.

Tabla A3.8- Ángulos de valencia (grados) experimentales y calculados por diferentes métodos de la 22,23-diepi-28 homobrasinólida.MD-Desviación media. Letras en **negrita** representan los ángulos más importantes.

| Ángulos Valencia | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/ MNDO | PDDG/ PM3 | B3LYP/ 6-31G | B3LYP/ 6-31G(d,p) | M05- 2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) | Exp |
|---|-------|-------|-------|---------------|--------------|-----------------|----------------------|----------------------|-------------------------|-------|
| C₂-O₇₀-H₇₁ | 107,5 | 107,2 | 111,7 | 116,7 | 104,9 | 110,9 | 108,5 | 111,9 | 109,8 | 113,3 |
| C₃-O₇₂-H₇₃ | 106,0 | 106,4 | 112,0 | 117,1 | 104,1 | 107,1 | 105,3 | 107,9 | 106,9 | 112,9 |
| C₆-O₇₅-C₇ | 118,3 | 119,7 | 124,5 | 125,0 | 118,9 | 121,6 | 121,4 | 121,5 | 121,1 | 117,9 |
| O₇₄=C₆-O₇₅ | 108,0 | 111,9 | 113,0 | 113,1 | 109,2 | 117,6 | 117,9 | 118,0 | 118,3 | 115,9 |
| C₁₃-C₁₇-C₁₆ | 102,6 | 103,5 | 102,4 | 102,8 | 102,5 | 102,6 | 102,4 | 102,8 | 102,8 | 101,9 |
| C₁₇-C₂₀-C₂₁ | 111,2 | 112,3 | 114,0 | 110,5 | 111,6 | 113,8 | 114,0 | 112,5 | 113,5 | 114,1 |
| C₁₇-C₂₀-C₂₂ | 113,2 | 114,0 | 116,9 | 114,4 | 113,8 | 114,1 | 113,6 | 109,4 | 113,5 | 114,0 |
| C₂₀-C₁₇-H₈₀ | 107,1 | 108,1 | 105,4 | 105,9 | 108,5 | 107,9 | 107,8 | 109,4 | 107,9 | 106,3 |
| C₂₀-C₂₂-O₇₆ | 114,3 | 114,7 | 115,1 | 115,0 | 115,3 | 115,5 | 116,0 | 111,1 | 115,9 | 116,8 |
| C₂₀-C₂₂-C₂₃ | 109,7 | 110,0 | 113,3 | 108,9 | 107,8 | 111,6 | 111,3 | 114,7 | 111,8 | 113,8 |
| C₂₂-O₇₆-H₇₇ | 107,1 | 107,0 | 111,4 | 116,9 | 105,0 | 111,1 | 108,6 | 112,6 | 108,8 | 113,9 |
| C₂₂-C₂₃-C₂₄ | 112,5 | 111,4 | 114,3 | 113,6 | 111,1 | 114,0 | 115,7 | 115,2 | 114,9 | 116,0 |
| C₂₂-C₂₃-O₇₈ | 111,9 | 108,8 | 110,2 | 110,3 | 110,0 | 106,3 | 108,1 | 112,6 | 110,4 | 109,8 |
| C₂₃-C₂₂-O₇₆ | 106,2 | 105,2 | 108,6 | 108,4 | 105,9 | 102,5 | 103,7 | 102,5 | 106,2 | 106,1 |
| C₂₃-O₇₈-H₇₉ | 106,5 | 107,2 | 111,7 | 116,2 | 104,7 | 106,5 | 105,3 | 107,1 | 110,1 | 116,4 |
| C₂₃-C₂₄-C₂₈ | 110,2 | 108,8 | 111,6 | 110,5 | 107,0 | 109,3 | 112,1 | 111,5 | 112,0 | 113,3 |
| C₂₃-C₂₄-C₂₅ | 111,0 | 111,1 | 114,0 | 110,8 | 110,7 | 110,3 | 108,3 | 107,5 | 108,0 | 109,3 |
| C₂₄-C₂₃-O₇₈ | 108,6 | 112,8 | 109,3 | 110,3 | 108,8 | 112,6 | 110,2 | 109,7 | 105,6 | 104,2 |
| C₂₄-C₂₅-C₂₆ | 113,1 | 113,8 | 116,0 | 113,5 | 113,1 | 113,3 | 113,6 | 113,5 | 113,4 | 114,3 |
| C₂₄-C₂₅-C₂₇ | 110,8 | 111,2 | 112,8 | 111,3 | 111,8 | 113,7 | 113,8 | 113,1 | 113,4 | 114,7 |
| C₂₅-C₂₄-C₂₈ | 112,3 | 114,0 | 112,8 | 111,9 | 113,3 | 115,2 | 116,1 | 115,9 | 115,4 | 115,2 |
| C₂₆-C₂₅-C₂₇ | 110,3 | 110,5 | 110,9 | 109,4 | 109,3 | 111,1 | 111,2 | 110,8 | 110,9 | 110,9 |
| C₂₄-C₂₈-C₂₉ | 112,8 | 113,8 | 115,9 | 112,6 | 113,5 | 116,1 | 116,5 | 115,3 | 115,2 | 117,1 |
| C ₁ -C ₂ -O ₇₀ | 112,8 | 110,6 | 111,8 | 112,8 | 111,8 | 110,3 | 110,7 | 109,6 | 110,4 | 110,8 |
| C ₃ -C ₂ -O ₇₀ | 112,4 | 105,9 | 108,4 | 112,4 | 107,1 | 104,8 | 105,8 | 104,8 | 106,0 | 107,6 |
| C ₂ -C ₃ -O ₇₂ | 112,5 | 111,8 | 114,0 | 111,2 | 109,5 | 109,6 | 110,3 | 109,1 | 110,4 | 109,7 |
| C ₄ -C ₃ -O ₇₂ | 108,8 | 108,6 | 109,6 | 114,5 | 112,0 | 108,4 | 109,1 | 108,5 | 108,8 | 111,4 |
| C ₁ -C ₂ -C ₃ | 109,8 | 110,7 | 112,4 | 109,5 | 109,7 | 111,2 | 110,7 | 110,9 | 110,8 | 109,3 |
| C ₂ -C ₃ -C ₄ | 108,1 | 108,4 | 108,8 | 106,5 | 106,5 | 109,9 | 109,4 | 109,4 | 108,8 | 107,7 |
| C ₃ -C ₄ -C ₅ | 114,8 | 113,5 | 115,9 | 115,0 | 113,0 | 113,9 | 114,0 | 112,8 | 113,0 | 112,2 |
| C ₄ -C ₅ -C ₆ | 106,7 | 106,0 | 108,6 | 107,7 | 106,6 | 106,3 | 106,4 | 106,0 | 105,9 | 105,6 |
| C ₄ -C ₅ -C ₁₀ | 113,8 | 115,0 | 116,1 | 111,7 | 114,0 | 114,6 | 114,6 | 114,5 | 114,5 | 114,5 |
| C ₅ -C ₆ =O ₇₄ | 128,5 | 126,7 | 126,5 | 126,7 | 128,0 | 123,6 | 123,2 | 123,4 | 122,9 | 120,8 |
| C ₅ -C ₆ -O ₇₅ | 123,4 | 121,3 | 120,4 | 120,0 | 122,8 | 118,8 | 119,0 | 118,6 | 118,8 | 123,1 |
| C ₅ -C ₁₀ -C ₁ | 107,4 | 109,6 | 108,0 | 107,5 | 107,6 | 107,6 | 107,5 | 108,3 | 107,9 | 108,8 |
| C ₅ -C ₁₀ -C ₉ | 112,4 | 110,1 | 110,7 | 113,4 | 111,7 | 111,3 | 111,1 | 111,0 | 111,0 | 110,5 |

| | | | | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| C ₅ -C ₁₀ -C ₁₉ | 110,2 | 109,4 | 110,5 | 109,1 | 110,8 | 109,8 | 110,0 | 109,6 | 109,9 | 109,2 |
| C ₆ -C ₅ -C ₁₀ | 112,8 | 111,5 | 113,2 | 113,7 | 111,3 | 112,1 | 112,1 | 111,1 | 111,3 | 112,5 |
| O ₇₅ -C ₇ -C ₈ | 112,8 | 111,6 | 113,9 | 113,4 | 112,4 | 112,5 | 113,2 | 111,9 | 112,7 | 113,6 |
| C ₇ -C ₈ -C ₉ | 111,9 | 111,6 | 112,9 | 112,9 | 111,2 | 113,7 | 113,8 | 113,3 | 114,0 | 112,0 |
| C ₇ -C ₈ -C ₁₄ | 108,2 | 108,1 | 109,3 | 106,2 | 107,2 | 108,8 | 109,1 | 108,7 | 108,4 | 109,2 |
| C ₈ -C ₉ -C ₁₀ | 115,7 | 114,4 | 117,5 | 114,0 | 117,3 | 117,8 | 117,9 | 117,4 | 117,8 | 116,8 |
| C ₈ -C ₉ -C ₁₁ | 110,5 | 112,5 | 111,5 | 110,3 | 108,2 | 109,7 | 109,5 | 109,9 | 109,0 | 110,3 |
| C ₈ -C ₁₄ -C ₁₃ | 111,8 | 112,8 | 115,6 | 113,7 | 113,2 | 114,7 | 115,0 | 114,2 | 114,7 | 115,4 |
| C ₈ -C ₁₄ -C ₁₅ | 118,5 | 118,5 | 120,4 | 116,4 | 117,8 | 118,8 | 119,0 | 118,0 | 118,6 | 118,3 |
| C ₉ -C ₁₀ -C ₁ | 105,4 | 106,3 | 106,8 | 106,7 | 105,5 | 105,9 | 106,2 | 105,9 | 106,2 | 108,1 |
| C ₉ -C ₁₀ -C ₁₉ | 111,7 | 112,1 | 111,6 | 110,0 | 111,2 | 112,0 | 111,9 | 112,0 | 111,8 | 111,7 |
| C ₉ -C ₈ -C ₁₄ | 108,5 | 109,4 | 110,4 | 110,1 | 106,8 | 108,7 | 108,7 | 108,4 | 108,2 | 109,7 |
| C ₉ -C ₁₁ -C ₁₂ | 115,4 | 116,1 | 118,4 | 115,5 | 113,2 | 114,8 | 114,6 | 114,8 | 114,0 | 114,4 |
| C ₁₀ -C ₁ -C ₂ | 112,7 | 115,1 | 117,9 | 113,2 | 113,2 | 116,3 | 116,6 | 116,4 | 116,2 | 116,8 |
| C ₁₀ -C ₉ -C ₁₁ | 109,1 | 109,9 | 111,9 | 108,9 | 108,9 | 111,5 | 111,9 | 111,2 | 111,5 | 113,2 |
| C ₁ -C ₁₀ -C ₁₉ | 109,4 | 109,4 | 109,0 | 110,1 | 109,9 | 110,1 | 109,9 | 110,0 | 109,9 | 108,5 |
| C ₁₁ -C ₁₂ -C ₁₃ | 110,5 | 110,8 | 113,9 | 109,5 | 110,0 | 111,8 | 112,0 | 111,5 | 111,3 | 111,5 |
| C ₁₂ -C ₁₃ -C ₁₄ | 106,0 | 105,7 | 104,6 | 105,7 | 105,8 | 106,4 | 106,5 | 105,8 | 106,8 | 105,0 |
| C ₁₂ -C ₁₃ -C ₁₇ | 115,7 | 115,6 | 115,8 | 117,1 | 115,5 | 116,4 | 116,5 | 116,5 | 116,6 | 115,4 |
| C ₁₂ -C ₁₃ -C ₁₈ | 110,3 | 111,3 | 110,4 | 110,7 | 111,0 | 111,2 | 111,0 | 111,4 | 111,1 | 111,6 |
| C ₁₃ -C ₁₄ -C ₁₅ | 103,5 | 103,6 | 103,6 | 102,0 | 102,6 | 103,7 | 103,8 | 104,3 | 103,4 | 102,2 |
| C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ | 117,1 | 116,4 | 121,0 | 117,8 | 116,8 | 118,0 | 118,8 | 119,4 | 117,4 | 120,1 |
| C ₁₃ -C ₁₇ -C ₈₀ | 107,5 | 107,4 | 105,6 | 107,3 | 107,8 | 105,7 | 105,2 | 106,0 | 105,8 | 106,7 |
| C ₁₄ -C ₁₅ -C ₁₆ | 104,6 | 104,5 | 105,2 | 103,4 | 103,5 | 104,0 | 103,9 | 103,9 | 103,6 | 103,6 |
| C ₁₄ -C ₁₃ -C ₁₇ | 101,4 | 101,3 | 100,8 | 101,5 | 100,8 | 100,3 | 100,1 | 100,3 | 100,4 | 100,7 |
| C ₁₄ -C ₁₃ -C ₁₈ | 112,4 | 112,0 | 113,7 | 110,4 | 113,8 | 111,7 | 111,8 | 112,4 | 111,4 | 113,4 |
| C ₁₅ -C ₁₆ -C ₁₇ | 108,0 | 107,8 | 108,5 | 107,8 | 107,6 | 107,4 | 107,3 | 107,2 | 107,2 | 107,7 |
| C ₁₆ -C ₁₇ -C ₂₀ | 112,8 | 112,0 | 114,2 | 113,5 | 110,8 | 113,2 | 113,3 | 112,7 | 113,0 | 112,6 |
| C ₁₆ -C ₁₇ -H ₈₀ | 109,4 | 109,2 | 107,5 | 109,3 | 110,1 | 108,9 | 108,6 | 108,4 | 109,4 | 108,7 |
| C ₁₇ -C ₁₃ -C ₁₈ | 110,7 | 110,5 | 111,2 | 110,8 | 109,7 | 110,3 | 110,4 | 109,9 | 109,9 | 110,2 |
| C ₂₁ -C ₂₀ -C ₂₂ | 107,3 | 107,3 | 106,7 | 106,8 | 105,4 | 105,7 | 106,1 | 111,5 | 106,0 | 108,2 |
| MD^a | 3.4 | 3.3 | 2.1 | 2.7 | 3.8 | 2.5 | 2.4 | 1.4 | 1.4 | |
| MD^b | 2.6 | 2.4 | 1.9 | 2.3 | 2.6 | 1.6 | 1.5 | 0.9 | 0.9 | |

^aMD - tomando ángulos de valencia más importantes.

^bMD- tomando todos los valores.

Tabla A3.9- Ángulos diedros (grados) experimentales y calculados por diferentes métodos de la 22,23-diepi-28 homobrasinólida. MD-Desviación media. Letras en negrita representan los ángulos más importantes.

| Angulos Diedros | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/ MNDO | PDDG/ PM3 | B3LYP/6-31G | B3LYP/ 6-31G(d,p) | M05-2X/ 6-31G | M05-2X/ 6-31++G(d,p) | Exp |
|--|-------------|-------------|-------------|---------------|--------------|-------------|----------------------|------------------|-------------------------|--------|
| C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₁ | -47,2 | -56,7 | -49,5 | -48,7 | -49,7 | -48.8 | -46.5 | -53,5 | -50,5 | -52,4 |
| C ₁₃ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | -168,1 | -178,9 | -174,8 | -169,3 | -168,8 | -170.3 | -168.3 | -178,0 | -171,6 | -177,4 |
| C ₁₆ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₁ | -166.0 | -175,5 | -172,4 | -168,8 | -166,6 | -168.6 | -166.9 | -174,3 | -169,9 | -172,4 |
| C ₁₆ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | 73,1 | 62,3 | 62,3 | 70,6 | 74,3 | 69.9 | 71.4 | 61,2 | 68,9 | 62,6 |
| H ₈₀ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₁ | 73,5 | 64,2 | 69,9 | 71,3 | 72,4 | 70.9 | 72.9 | 66,6 | 68,9 | 68,7 |
| H ₈₀ -C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ | -47,4 | -58,1 | -55,5 | -49,3 | -46,8 | -50.6 | -48.9 | -57,9 | -52,2 | -56,3 |
| C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -O ₇₆ | -52,9 | -14.0 | 0.0 | -44,4 | -34,1 | -32.9 | -30.6 | -83,5 | -26,4 | -13,4 |
| C ₁₇ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | -172,1 | -132,3 | -125,8 | -166,2 | -152,2 | -149.4 | -148.9 | -160,9 | -148,3 | -137,6 |
| C ₂₀ -C ₂₂ -O ₇₆ -H ₇₇ | 59,0 | 63,0 | 116,4 | 57,7 | 70,9 | 67.5 | 63.2 | 65,7 | 67,3 | 69,3 |
| C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -O ₇₈ | 67,2 | 67.0 | 77,2 | 70,8 | 93,6 | 71.2 | 63.4 | 55,1 | 63,2 | 68,9 |
| C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ | -170,2 | -168,0 | -159,3 | -164,7 | -145,8 | -164.1 | -172.5 | -177,7 | -177,5 | -173,4 |
| C ₂₁ -C ₂₀ -C ₂₂ -O ₇₆ | -175,9 | -138,9 | -129.0 | -167.0 | -156,8 | -158.7 | -156.7 | -151,4 | -151,6 | -141,4 |
| C ₂₁ -C ₂₀ -C ₂₂ -C ₂₃ | 64,9 | 102,7 | 105,3 | 71,2 | 85,2 | 84.8 | 85.1 | 35,8 | 86,5 | 94,4 |
| C ₂₂ -C ₂₃ -O ₇₈ -H ₇₉ | -27,7 | -58,6 | -90,3 | -39,5 | -55,2 | -47.3 | -53.5 | -52,9 | -67,3 | -65,6 |
| C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₈ | 59,0 | 74,7 | 66,2 | 51,4 | 62,6 | 69.8 | 47.6 | 46,8 | 42,7 | 45,4 |
| C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ | 176.0 | 159.0 | 164,5 | 176.0 | 173,5 | 162.6 | 176.9 | 174,7 | 170,8 | 175,4 |
| C ₂₃ -C ₂₂ -O ₇₆ -H ₇₇ | -179,8 | -176.0 | -147,1 | -179,8 | -170,0 | -171.0 | -174.5 | -171,3 | -168,0 | -162,7 |
| C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₈ -C ₂₉ | -144,2 | -165,5 | -115,9 | -171,1 | -171,7 | -169.5 | -176.3 | -178,3 | -176,0 | -177,8 |
| C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -C ₂₆ | -71.0 | -87,8 | -65,6 | -96,8 | -81,2 | -81.4 | -83.9 | -83,0 | -85,3 | -81,6 |
| C ₂₃ -C ₂₄ -C ₂₅ -C ₂₇ | 164,6 | 146,6 | 164,9 | 139,2 | 154,9 | 150.5 | 147.6 | 149,7 | 147,1 | 148,8 |
| C ₂₄ -C ₂₃ -O ₇₈ -H ₇₉ | 152,6 | 65,6 | 143,2 | 165,8 | 177,1 | 78.2 | 73.8 | 73,0 | 157,8 | 169,6 |
| C ₂₄ -C ₂₃ -C ₂₂ -O ₇₆ | 65,8 | 67,9 | 71,6 | 69,5 | 90,3 | 71.7 | 62.1 | 57,2 | 55,2 | 56,8 |
| C ₂₅ -C ₂₄ -C ₂₃ -O ₇₈ | -51,5 | -36,2 | -40,5 | -59,5 | -52,2 | -41.4 | -60.1 | -64,0 | -67,2 | -63,8 |
| C ₂₆ -C ₂₅ -C ₂₄ -C ₂₈ | 52,8 | 35,5 | 63,2 | 27,0 | 39,0 | 42.9 | 43.1 | 42,4 | 40,9 | 47,3 |
| C ₂₆ -C ₂₅ -C ₂₄ -H ₈₁ | 172,0 | 155,6 | 179,7 | 145,6 | 159,7 | 163.2 | 162.5 | 162,7 | 161,5 | 164,8 |
| C ₂₇ -C ₂₅ -C ₂₄ -C ₂₈ | -71,6 | -90,1 | -66,4 | -97,0 | -84,9 | -85.1 | -85.4 | -84,9 | -86,7 | -82,3 |
| C ₂₇ -C ₂₅ -C ₂₄ -H ₈₁ | 47,6 | 30,0 | 50,2 | 21,6 | 35,8 | 35.1 | 34.0 | 35,5 | 33,9 | 35,2 |
| O ₇₆ -C ₂₂ -C ₂₃ -O ₇₈ | -56,8 | -57,1 | -51,9 | -54,9 | -30,3 | -53.0 | -62.0 | -65,4 | -64,0 | -60,9 |
| C ₂₈ -C ₂₄ -C ₂₃ -O ₇₈ | 176,4 | 162,5 | 169,8 | 175,9 | 176,1 | 169.0 | 170.6 | 168,1 | 164,6 | 166,2 |
| MD^b | 14.4 | 10.9 | 14.9 | 12.0 | 10.9 | 11.1 | 8.9 | 11.4 | 4.6 | |

^bMD- tomando todos los ángulos diedros.

ANEXO 4

ANEXO 4

A4. GEOMETRIAS DE CLUSTERS $\text{BRS}-(\text{H}_2\text{O})_n$ CON $n=4$ y 5 .

H_2O

Brassinolide (BR)

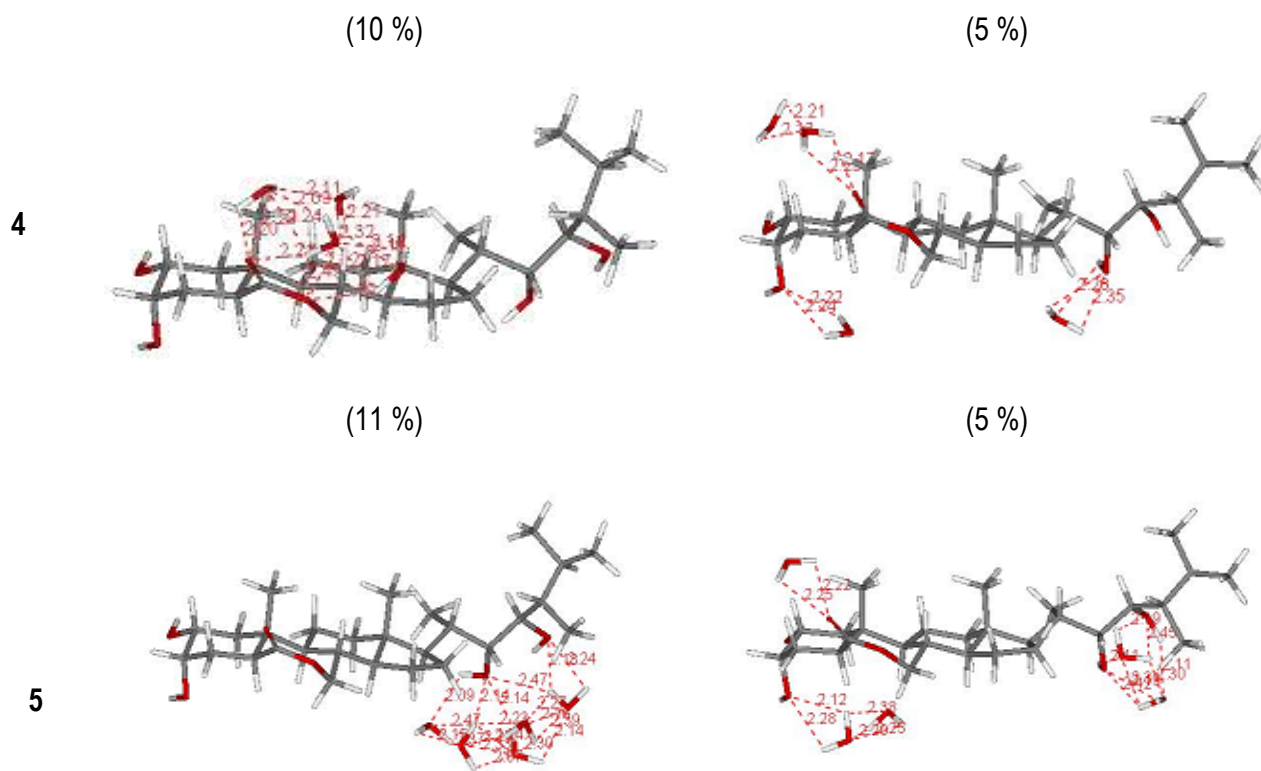


Figura A4.1-Posiciones preferenciales y poblaciones relativas entre paréntesis de los clusters: $\text{BR}-(\text{H}_2\text{O})_4$ y $\text{BR}-(\text{H}_2\text{O})_5$ según MMH-AM1.

H₂O

Castasterona (CS)

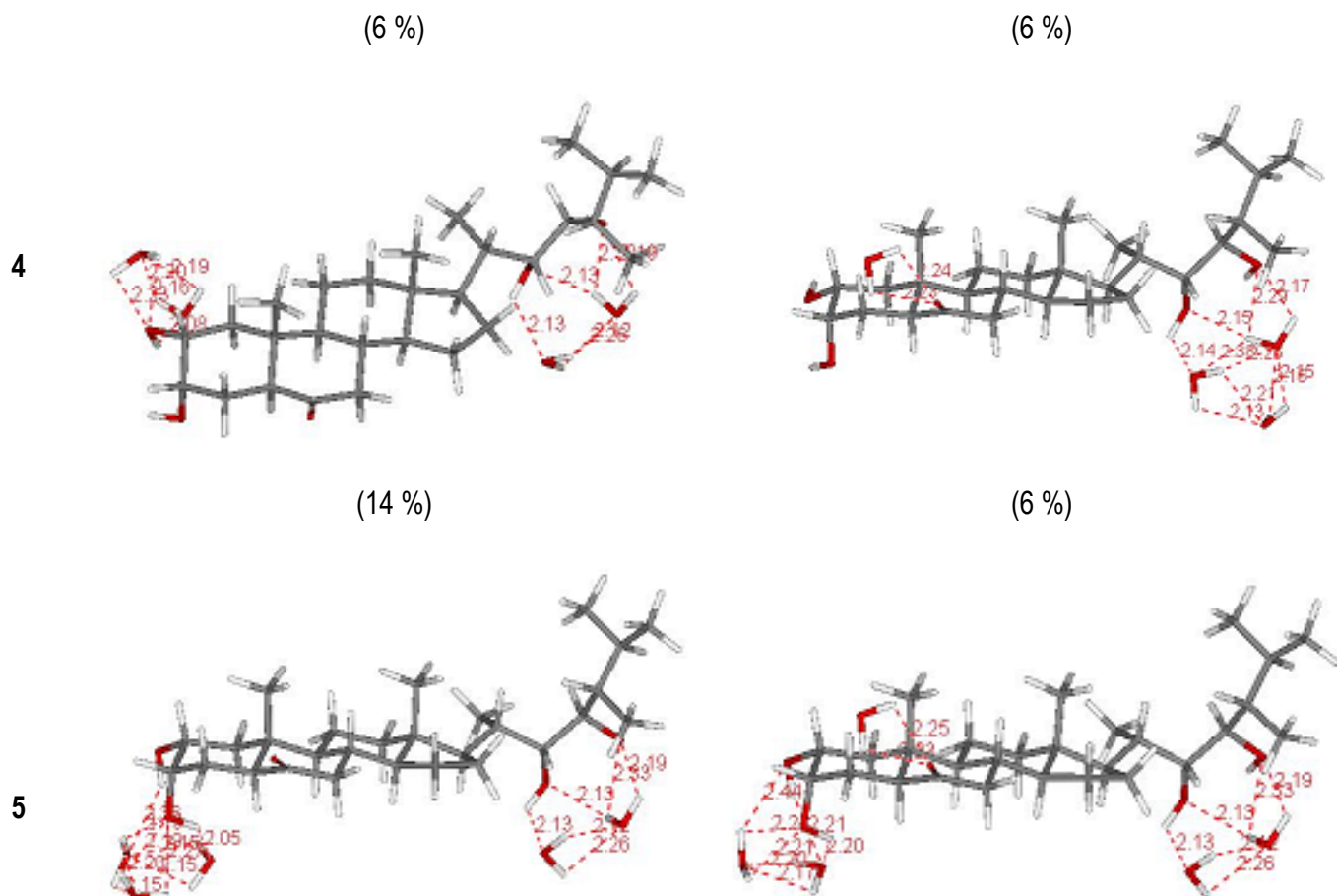


Figura A4.2-Posiciones preferenciales y poblaciones relativas entre paréntesis de los clusters: CS-(H₂O)₄ y CS-(H₂O)₅ según MMH-AM1.

Tifasterol (TF)

(4 %)

(25 %)

(6 %)

| Atom | U ¹¹ | U ²² | U ³³ | U ¹² | U ¹³ | U ²³ |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| C1 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C2 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C3 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C4 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C5 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C6 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C7 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C8 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C9 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C10 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C11 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C12 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C13 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C14 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C15 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C16 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C17 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C18 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C19 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C20 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C21 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C22 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C23 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C24 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C25 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C26 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C27 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C28 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C29 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C30 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C31 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C32 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C33 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C34 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C35 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C36 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C37 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C38 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C39 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C40 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C41 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C42 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C43 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C44 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C45 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C46 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C47 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C48 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C49 | 0.022 | 0. | | | | |

Figura A4.3-Posiciones preferenciales y poblaciones relativas entre paréntesis de los clusters: TF-(H₂O)₄ y TF-(H₂O)₅ según MMH-AM1.

ANEXO 5

Validation of performances of some semiempirical Hamiltonians for predicting molecular structure calculation of natural brassinosteroids: Towards understanding their biological activity by electron exchange effects

Cercis Morera-Boado ^a, Esther Alonso-Becerra ^a, Luis A. Montero-Cabrera ^{a,*},
Raul González-Jonte ^b

^a *Laboratorio de Química Computacional y Teórica, Facultad de Química, Universidad de La Habana, 10400 Havana, Cuba*

^b *Dep. de Química Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain*

Received 27 March 2007; received in revised form 24 May 2007; accepted 25 May 2007

Available online 31 May 2007

Abstract

Calculations on the molecular structure of three natural brassinosteroids using several semiempirical Hamiltonians: MNDO, AM1, PM3, PDDG/MNDO, PDDG/PM3 have been done to test their accuracy for predicting structural features of these molecules when compared with available crystallographic data. The best molecular structures were obtained by AM1 and PDDG/PM3 semiempirical Hamiltonians. The worst performances were observed for MNDO and PDDG/MNDO. Molecular orbitals (i.e. highest occupied molecular orbital (HOMO) and lower unoccupied molecular orbital (LUMO)), electrostatic potential maps, and atomic charges with all semiempirical methods were also calculated. Results showed that the HOMO was always located in the lateral chain and the LUMO in the lactone group of ring B for the three systems analyzed. Lactone group elicited higher electrostatic potentials than hydroxyl groups. Analysis of charges also revealed an accumulation of charges in the lactone group and in the lateral chain. These modelling results explain how the biological activity process of these molecules occurs when there is electron exchange. The results also indicate that the interaction of brassinosteroids with receptors could involve specific areas of the molecule.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Brassinosteroids; Semiempirical calculation: AM1, PM3, MNDO, PDDG/MNDO, PDDG/PM3

1. Introduction

Plant growth and development involves the integration of many environmental and endogenous signals that together with the intrinsic genetic program determine plant form. Fundamental to this process are several growth regulators collectively called plant hormones or phytohormones. This group includes auxin, cytokinin, gibberellins, abscisic acid, ethylene, jasmonic acid, and brassinosteroids,

each of which act at low concentrations to regulate many aspects of plant growth and development [1].

Brassinosteroids are a unique class of plant hormones structurally related to animal and insect steroid hormones. These plant hormones regulate the expression of numerous genes; have an impact in the activity of complex metabolic pathways; contribute to the regulation of cell division, expansion and differentiation; stimulate vegetative growth and seed germination; regulate reproduction, senescence and interact at endogenous levels with other hormones [2,3].

These phytohormones have been identified in 27 families of higher plants and three families of lower plants. They are

* Corresponding author. Tel.: +537 8781263; fax: +537 8735774.

E-mail address: luis.montero@quimica.uh.cu (L.A. Montero-Cabrera).

present in plants at extremely low concentrations (nanogram levels). Levels of endogenous brassinosteroids vary among plant tissues. Young growing tissues contain higher levels of brassinosteroids than mature tissues [4,5].

Considerable progress has been made over the last few years in our understanding of brassinosteroids, and many of the questions about their roles as plant hormones are being successfully investigated. Presently many of the proteins required for steroid response in plants have been identified. The process begins when the brassinosteroid binds directly to the extra cellular domain of the protein brassinosteroid insensitive receptor (BRI1) [5,6], thereby initiating an intracellular signal transduction cascade which results in the altered expression of hundreds of genes [7].

Much effort had been devoted not only to synthesize and obtain natural brassinosteroids and their high activity analogues because of their applications in agriculture, but also to increase our knowledge about them from the structural, physiological, and biogenetic point of view [8]. Predictive Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) has been one of the theoretical fields of study that scientists are carrying out in order to explain the relationship between brassinosteroid structures and their biological activity [9,10].

Natural brassinosteroids identified so far, have a common 5 α -cholestan skeleton, and their structural variations come from the kind and orientation of functionalities in the skeleton. The compounds can be classified as C27, C28 or C29 brassinosteroids depending on the alkyl-substitution pattern of the side chain (Fig. 1) [11].

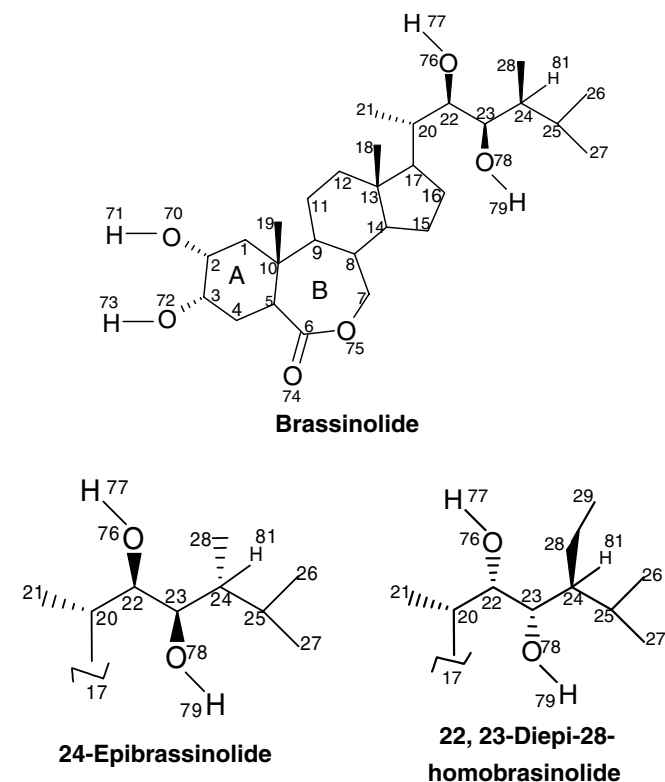


Fig. 1. Structural differences of brassinosteroids.

Structural variations lie in the substitution of A/B rings, different alkylation at C-24, various substitutions at C-25 and different hydroxylations in the side chain of the steroids (Fig. 1). All natural brassinosteroids possess a 22R-23R-diol structural feature in the steroidal side chain which is essential for a high biological activity [4]. With respect to ring A, brassinosteroids having vicinal hydroxy groups (at C-2 α and C-3 α) generally have high biological activity, and all combinations of hydroxyl groups at C-2 and C-3 (2 α , 3 α ; 2 α , 3 β ; 2 β , 3 α ; 2 β , 3 β) have been isolated [12]. With respect to ring B, 7-oxalactone structures possess greater biological activity than the 6-oxo forms, while the 6-deoxo forms have the least biological activity [13].

Among all the well known brassinosteroids, Brassinolide is clearly the most biologically active because it possesses all the structural requirements that make this possible [14]. Other natural brassinosteroids such as 24-epibrassinolide and 22,23-diepi-28-homobrassinolide also possess high bioactivity and historically have been used in different Cultures as plant growth promoters [15].

Some of the above mentioned QSAR works [9,10] together with other more recent papers on steroid hormonal activity by some of the authors of this paper [16,17] suggest the role of molecular orbitals in selective activity. It is an unbeatable argument pointing to the influence of electron exchange interactions in the biological pathways conducive to the desired effect. Unfortunately, the available molecular modelling methods for such large molecules and their interactions are based mostly on classical potentials which simulate quantum interactions on an “a-posteriori” basis and therefore lack predictive value. On the other hand, as more accurate a Hamiltonian is in calculating electron exchange, more unable it is to calculate huge molecules in routine work, because the computational time expenditure is prohibitive. Therefore, testing commonly available semiempirical Hamiltonians for predicting molecular properties for this family of steroids becomes essential in determining how reliable are their predictions, given the well known inaccuracy of the Hamiltonians in some cases.

Here we present the results obtained with five semiempirical Hamiltonians calculations (MNDO, AM1, PM3, PDDG/MNDO, and PDDG/PM3) for molecular geometry optimizations, total energy, and electronic structure of two natural brassinosteroids and one brassinosteroid analogue in order to implement a working routine for modeling derivatives of brassinosteroids in future investigations and to understand relevant differentiating factors related to orbital topology. To test the accuracy of these semiempirical methods for predicting the structure of these molecules, calculated geometrical parameters were compared with available crystallographic data [18].

2. Methods of calculation

Full geometry optimization of *brassinolide*, *24-epibrassinolide*, and *22,23-diepi-28-homobrassinolide* was

carried at five different semiempirical Hamiltonian hypersurfaces: MNDO [19], AM1 [20], PM3 [21], PDDG/MNDO, PDDG/PM3 [22]. All geometry optimizations were done with the MOPAC 6.0j program [18,23] starting from an experimental X-ray crystallographic structure. In all these calculations the eigenvector following (EF) routine for searching minima was used and then the final optimization using the desired method was carried out using default optimizers and the convergence criteria for gradient of 0.01 kcal/mol Å. Some common problems of MOPAC optimizations of non-standard structures can be avoided by using the keyword “precise”, as it has been used in all calculations of this paper [24].

Mean deviations (MD) were calculated taking into account the differences between the internal coordinates estimated by a particular semiempirical method and the experimental values. In the following formulae X_i represents bond distances, angles, and dihedral angles given by a semiempirical method in particular, and X_{exp} the experimental internal coordinates given by the X-ray structures.

$$\text{MD} = \frac{\sum_{i=1}^N |X_i - X_{\text{exp}}|}{N}$$

For the calculation of the root mean square (RMS) gradients we made use of the tool RMS fit and overlay contained in the Hyperchem package 7.0 [25] that allows to superimpose two structures and to compare them.

The keyword “vectors” was used in Mopac to obtain the occupied and virtual eigenvalues and the software used for the representation of the frontier orbitals (i.e. highest occupied molecular orbital (HOMO) and lower unoccupied molecular orbital (LUMO)), and electrostatic potential maps was Spartan’02 windows [26].

3. Results and discussion

3.1. Molecular geometry

Brassinosteroids contain more than 80 atoms and require a large number of geometrical parameters for a unique characterization. For comparison purposes we have selected a set of the major parameters that included several bond length, bond angle, and dihedral angle. Then the theoretical structures of three brassinosteroids were compared with the corresponding experimental X-ray information [18].

Tables 1–9 show the resulting bond distances, valence, and dihedral angles for the three compounds and the mean deviations of each semiempirical method with regard to the experimental X-ray internal coordinate data.

From Tables 1, 4, and 7 we have found certain regularities. The semiempirical method that better reproduces all O—H and C=O distances was PDDG/PM3; AM1 reproduces better the distances C—O presented in the lateral chain and ring A. It was also found that all semiempirical methods underestimate C—O, and O—H bond distances.

Tables 2, 5, and 8 show that valence angles were better reproduced with AM1 and MNDO methods, and from Tables 3, 6, and 9 we conclude that PDDG/PM3 and AM1 semiempirical Hamiltonians reproduce quite well dihedral angles. These results were obtained analyzing the mean deviations calculated and reported on each table.

In almost all tables it can be seen that the mean deviation given by PM3 method for the main important distances, bond angles, and dihedral angles were greater than the total mean deviations reported for all the internal coordinates described.

The resume in Table 10 shows that the average correspondence of all calculated geometrical properties with experimental values is fair well, in general. It means that semiempirical Hamiltonians are not a bad choice to calcu-

Table 1
Calculated and experimental selected bond lengths for brassinolide

| Bond length ^a | Brassinolide | | | | | |
|----------------------------------|--------------|-------|-------|-----------|----------|-------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₆ —O ₇₅ | 1.364 | 1.371 | 1.363 | 1.351 | 1.358 | 1.336 |
| O ₇₅ —C ₇ | 1.411 | 1.423 | 1.400 | 1.390 | 1.406 | 1.432 |
| C ₂ —O ₇₀ | 1.41 | 1.423 | 1.401 | 1.387 | 1.410 | 1.440 |
| C ₃ —O ₇₂ | 1.413 | 1.419 | 1.396 | 1.383 | 1.407 | 1.438 |
| C ₆ —O ₇₄ | 1.214 | 1.233 | 1.228 | 1.232 | 1.219 | 1.221 |
| C ₂₂ —O ₇₆ | 1.415 | 1.427 | 1.399 | 1.386 | 1.415 | 1.443 |
| C ₂₃ —O ₇₈ | 1.411 | 1.423 | 1.399 | 1.382 | 1.412 | 1.441 |
| C ₂₄ —C ₂₈ | 1.520 | 1.513 | 1.546 | 1.543 | 1.525 | 1.559 |
| O ₇₀ —H ₇₁ | 0.948 | 0.964 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.953 |
| O ₇₂ —H ₇₃ | 0.948 | 0.967 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.952 |
| O ₇₆ —H ₇₇ | 0.952 | 0.964 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.950 |
| O ₇₈ —H ₇₉ | 0.948 | 0.966 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.952 |
| Mean dev. ^b | 0.019 | 0.019 | 0.022 | 0.029 | 0.017 | |

^a All values in Å.

^b Mean deviation refers to principal distances.

Table 2
Calculated and experimental selected bond angles for brassinolide

| Bond angle ^a | Brassinolide | | | | | |
|---|--------------|-------|-------|-----------|----------|-------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₂ —O ₇₀ —H ₇₁ | 106.7 | 107.2 | 111.7 | 117.2 | 105.0 | 113.1 |
| C ₃ —O ₇₂ —H ₇₃ | 106.6 | 106.4 | 112.0 | 117.5 | 105.3 | 112.0 |
| C ₆ —O ₇₅ —C ₇ | 118.1 | 117.7 | 124.5 | 124.7 | 118.8 | 117.9 |
| O ₇₄ —C ₆ —O ₇₅ | 108.1 | 111.9 | 113.0 | 113.1 | 109.1 | 115.8 |
| C ₁₃ —C ₁₇ —C ₁₆ | 103.1 | 103.8 | 102.7 | 103.4 | 102.2 | 102.6 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | 111.7 | 112.1 | 113.1 | 111.0 | 110.8 | 112.6 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | 110.4 | 110.2 | 112.8 | 113.3 | 110.4 | 112.1 |
| C ₂₀ —C ₁₇ —H ₈₀ | 106.4 | 107.9 | 105.3 | 108.0 | 108.9 | 107.2 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ | 112.6 | 111.8 | 108.8 | 113.4 | 111.5 | 111.6 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ | 110.5 | 114.7 | 113.3 | 109.9 | 113.2 | 116.7 |
| C ₂₂ —O ₇₆ —H ₇₇ | 105.7 | 107.0 | 111.8 | 116.5 | 104.9 | 114.7 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ | 109.4 | 114.2 | 113.3 | 109.1 | 113.4 | 117.5 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ | 112.4 | 108.3 | 111.8 | 112.1 | 108.6 | 108.8 |
| C ₂₃ —C ₂₂ —O ₇₆ | 108.1 | 103.7 | 112.0 | 109.6 | 104.4 | 104.6 |
| C ₂₃ —O ₇₈ —H ₇₉ | 106.9 | 106.5 | 111.8 | 117.9 | 105.6 | 112.9 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₈ | 110.8 | 110.8 | 112.6 | 111.6 | 111.4 | 110.6 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ | 111.0 | 109.5 | 112.4 | 112.3 | 111.3 | 111.8 |
| C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ | 108.1 | 107.5 | 108.9 | 111.1 | 106.8 | 107.3 |
| C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₆ | 110.5 | 110.8 | 112.9 | 111.8 | 110.9 | 112.8 |
| C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₇ | 111.8 | 112.3 | 114.6 | 110.9 | 110.1 | 112.3 |
| Mean dev. ^b | 3.3 | 2.3 | 2.3 | 3.2 | 3.0 | |

^a All values in degrees.

^b Mean deviation refers to principal bond angles.

Table 3
Calculated and experimental selected dihedral angles for brassinolide

| Dihedral angle ^a | Brassinolide | | | | | |
|--|--------------|--------|--------|-----------|----------|--------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₁₃ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | −60.3 | −61.3 | −57.7 | −73.7 | −62.7 | −58.8 |
| C ₁₃ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | 176.7 | 175.6 | 174.4 | 160.0 | 173.9 | 176.0 |
| C ₁₆ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | −179.7 | −179.2 | −179.1 | −166.1 | −179.3 | −179.9 |
| C ₁₆ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | 57.3 | 56.1 | 51.2 | 39.9 | 57.3 | 54.9 |
| H ₈₀ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | 60.9 | 59.5 | 62.3 | 46.3 | 59.1 | 61.8 |
| H ₈₀ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | −62.1 | −63.6 | −65.7 | −79.9 | −64.2 | −63.4 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ | 66.1 | 68.1 | 76.5 | 70.2 | 64.5 | 67.7 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ | −173.0 | −174.2 | −158.1 | −166.9 | −178.1 | −172.1 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ —H ₇₇ | −40.5 | −62.6 | −152.3 | −51.1 | −74.4 | −65.1 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ | 171.9 | 173.8 | 136.4 | 163.9 | 168.6 | 170.2 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ | 67.9 | 54.0 | 100.1 | 72.5 | 50.1 | 48.1 |
| C ₂₁ —C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ | −57.9 | −56.2 | −52.2 | −55.9 | −58.7 | −58.7 |
| C ₂₁ —C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ | 63.1 | 61.5 | 73.2 | 67.1 | 58.7 | 61.5 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ —H ₇₉ | 57.9 | 56.4 | 83.9 | 63.1 | 72.3 | 55.3 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₈ | 67.7 | 61.2 | 75.4 | 69.8 | 55.1 | 56.0 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ | −166.5 | −174.5 | −154.7 | −164.4 | −177.8 | −179.8 |
| C ₂₃ —C ₂₂ —O ₇₆ —H ₇₇ | 162.8 | 173.3 | 81.5 | 174.2 | 163.0 | 167.8 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₆ | 62.2 | 74.9 | 69.6 | 61.6 | 51.8 | 57.5 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₇ | −176.1 | −162.9 | −165.0 | −176.7 | −171.7 | −179.7 |
| C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ —H ₇₉ | −178.8 | −179.7 | −150.1 | −174.5 | −165.0 | −176.7 |
| C ₂₄ —C ₂₃ —C ₂₂ —O ₇₆ | 168.5 | 176.2 | 136.3 | 162.3 | 171.6 | 172.0 |
| C ₂₅ —C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ | 70.7 | 65.3 | 80.2 | 71.4 | 58.2 | 57.3 |
| C ₂₆ —C ₂₅ —C ₂₄ —C ₂₈ | −173.0 | −161.6 | −161.1 | −172.4 | −175.5 | −178.4 |
| C ₂₆ —C ₂₅ —C ₂₄ —H ₈₁ | −53.9 | −41.7 | −45.5 | −54.2 | −65.6 | −60.9 |
| C ₂₇ —C ₂₅ —C ₂₄ —C ₂₈ | −51.3 | −39.4 | −35.7 | −50.8 | −64.6 | −55.7 |
| C ₂₇ —C ₂₅ —C ₂₄ —H ₈₁ | 67.9 | 80.6 | 80.0 | 67.5 | 54.4 | 61.9 |
| O ₇₆ —C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ | −48.4 | −64.0 | −12.7 | −38.2 | −69.9 | −65.9 |
| C ₂₈ —C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ | −55.1 | −59.1 | −49.7 | −54.3 | −64.5 | −66.9 |
| Mean dev. ^b | 6.1 | 6.1 | 22.8 | 10.5 | 4.3 | |

^a All values in degrees.

^b Mean deviation refers to principal dihedral angles.

Table 4
Calculated and experimental selected bond lengths for 24-epibrassinolide

| Bond length ^a | 24-Epibrassinolide | | | | | |
|----------------------------------|--------------------|-------|-------|-----------|----------|-------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₆ —O ₇₅ | 1.365 | 1.371 | 1.363 | 1.352 | 1.358 | 1.361 |
| O ₇₅ —C ₇ | 1.410 | 1.423 | 1.400 | 1.393 | 1.406 | 1.433 |
| C ₂ —O ₇₀ | 1.414 | 1.423 | 1.401 | 1.387 | 1.410 | 1.431 |
| C ₃ —O ₇₂ | 1.413 | 1.419 | 1.396 | 1.383 | 1.407 | 1.430 |
| C ₆ —O ₇₄ | 1.214 | 1.233 | 1.228 | 1.231 | 1.219 | 1.220 |
| C ₂₂ —O ₇₆ | 1.414 | 1.424 | 1.398 | 1.388 | 1.409 | 1.429 |
| C ₂₃ —O ₇₈ | 1.410 | 1.417 | 1.397 | 1.380 | 1.409 | 1.428 |
| C ₂₄ —C ₂₈ | 1.518 | 1.514 | 1.546 | 1.543 | 1.518 | 1.537 |
| O ₇₀ —H ₇₁ | 0.948 | 0.964 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.950 |
| O ₇₂ —H ₇₃ | 0.948 | 0.967 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.950 |
| O ₇₆ —H ₇₇ | 0.949 | 0.964 | 0.947 | 0.945 | 0.951 | 0.949 |
| O ₇₈ —H ₇₉ | 0.948 | 0.966 | 0.947 | 0.941 | 0.950 | 0.950 |
| Mean dev. ^b | 0.013 | 0.014 | 0.018 | 0.023 | 0.013 | |

^a All values in Å.

^b Mean deviation refers to principal distances.

Table 5
Calculated and experimental selected bond angles for 24-epibrassinolide

| Bond angle ^a | 24-Epibrassinolide | | | | | |
|---|--------------------|-------|-------|-----------|----------|-------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₂ —O ₇₀ —H ₇₁ | 106.7 | 107.2 | 111.7 | 117.4 | 105.0 | 109.5 |
| C ₃ —O ₇₂ —H ₇₃ | 106.6 | 106.4 | 112.0 | 117.2 | 105.3 | 109.4 |
| C ₆ —O ₇₅ —C ₇ | 118.2 | 117.6 | 124.5 | 123.7 | 118.8 | 119.9 |
| O ₇₄ —C ₆ —O ₇₅ | 108.0 | 111.9 | 113.0 | 113.5 | 109.1 | 120.2 |
| C ₁₃ —C ₁₇ —C ₁₆ | 103.3 | 103.7 | 102.7 | 103.6 | 102.0 | 103.6 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | 110.8 | 111.9 | 113.1 | 111.5 | 110.2 | 112.9 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | 113.2 | 110.4 | 112.8 | 110.7 | 111.3 | 110.3 |
| C ₂₀ —C ₁₇ —H ₈₀ | 107.7 | 107.7 | 105.3 | 105.9 | 108.6 | 106.1 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ | 112.9 | 111.5 | 108.8 | 112.9 | 112.6 | 109.3 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ | 110.3 | 111.9 | 113.3 | 110.0 | 111.7 | 110.5 |
| C ₂₂ —O ₇₆ —H ₇₇ | 106.0 | 106.9 | 111.8 | 115.5 | 104.8 | 109.4 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ | 110.7 | 111.4 | 113.7 | 109.4 | 110.3 | 111.2 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ | 112.1 | 110.8 | 111.9 | 112.2 | 109.8 | 110.7 |
| C ₂₃ —C ₂₂ —O ₇₆ | 118.5 | 105.6 | 112.2 | 110.3 | 105.4 | 111.5 |
| C ₂₃ —O ₇₈ —H ₇₉ | 106.9 | 106.5 | 111.8 | 117.9 | 105.6 | 112.9 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₈ | 110.6 | 109.5 | 110.7 | 110.1 | 110.3 | 110.3 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ | 113.6 | 112.9 | 116.2 | 114.6 | 113.5 | 114.7 |
| C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ | 108.5 | 108.2 | 109.8 | 111.6 | 107.4 | 110.2 |
| C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₆ | 114.4 | 113.2 | 116.6 | 114.4 | 113.8 | 114.2 |
| C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₇ | 110.0 | 110.3 | 111.6 | 111.3 | 109.0 | 111.9 |
| C ₂₅ —C ₂₄ —C ₂₈ | 113.6 | 112.6 | 114.3 | 113.4 | 112.7 | 113.3 |
| C ₂₆ —C ₂₅ —C ₂₇ | 109.9 | 110.1 | 110.4 | 108.9 | 108.8 | 109.9 |
| Mean dev. ^b | 2.5 | 2.1 | 1.8 | 2.3 | 2.8 | |

^a All values in degrees.

^b Mean deviation refers to principal bond angles.

late brassinosteroids, and it provides a useful tool for molecular modelling of these compounds that include electron densities and all properties depending on them, as charges, dipole moments, and bonding by electron exchange. In particular, the performance of PDDG/PM3 appears as the best, mostly because the good results in the case of dihedral angles. These geometrical properties are particularly sensible for molecular associations because they show the highest degrees of freedom when bond torsions show low potential energy barriers.

Semiempirical methods reduce the computational cost by reducing the number of two-electron integrals necessary for constructing the Fock matrix. The first step in reducing the computational problem is to consider only the valence electrons explicitly; the core electrons are accounted for by reducing the nuclear charge or introducing functions to model the combined repulsion due to the nuclei and core electrons. The main limitations of these semiempirical methods are that weak interactions, such as van der Waals complexes or hydrogen bonds, are poorly predicted. Either

Table 6
Calculated and experimental selected dihedral angles for 24-epibrassinolide

| Dihedral angle ^a | 24-Epibrassinolide | | | | | |
|--|--------------------|--------|--------|-----------|----------|--------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₁₃ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | −78.1 | −59.5 | −57.7 | −50.9 | −62.8 | −58.5 |
| C ₁₃ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | 156.1 | 177.8 | 174.3 | 175.2 | 174.4 | 177.4 |
| C ₁₆ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | −162.6 | −179.0 | −179.1 | −171.7 | −179.4 | −178.9 |
| C ₁₆ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | 36.8 | 58.3 | 51.1 | 64.0 | 57.8 | 56.9 |
| H ₈₀ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₁ | 41.8 | 61.4 | 62.2 | 69.8 | 59.0 | 62.2 |
| H ₈₀ —C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ | −84.0 | −61.3 | −65.8 | −54.6 | −63.8 | −62.0 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ | 71.8 | 88.6 | 75.7 | 66.7 | 80.5 | 73.4 |
| C ₁₇ —C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ | −168.3 | −153.4 | −158.8 | −169.7 | −161.0 | −162.6 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ —H ₇₇ | −54.9 | −54.2 | −153.5 | −42.0 | −55.1 | −57.5 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ | −174.1 | −160.8 | −133.2 | −162.4 | −174.5 | −140.8 |
| C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ | 64.6 | 78.7 | 101.6 | 73.3 | 56.4 | 96.3 |
| C ₂₁ —C ₂₀ —C ₂₂ —O ₇₆ | −53.8 | −35.4 | −53.0 | −57.8 | −42.2 | −51.1 |
| C ₂₁ —C ₂₀ —C ₂₂ —C ₂₃ | 66.1 | 82.7 | 72.5 | 65.8 | 76.3 | 71.9 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ —H ₇₉ | 58.4 | 52.9 | 82.2 | 61.8 | 72.0 | 56.6 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₈ | −171.1 | −155.7 | −154.2 | −163.3 | −174.4 | −162.3 |
| C ₂₂ —C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ | 59.8 | 78.0 | 73.1 | 67.4 | 58.0 | 68.4 |
| C ₂₃ —C ₂₂ —O ₇₆ —H ₇₇ | −176.6 | −175.9 | −80.38 | −165.5 | −177.1 | −180.0 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₆ | 91.1 | 88.6 | 90.9 | 92.2 | 95.6 | 86.5 |
| C ₂₃ —C ₂₄ —C ₂₅ —C ₂₇ | −144.6 | −147.6 | −141.0 | −143.9 | −142.8 | −147.8 |
| C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ —H ₇₉ | −179.1 | −175.3 | −150.6 | −175.1 | −168.1 | −180.0 |
| C ₂₄ —C ₂₃ —C ₂₂ —O ₇₆ | −172.1 | −159.9 | −134.7 | −161.6 | −179.1 | −141.9 |
| C ₂₅ —C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ | −63.5 | −44.0 | −53.2 | −57.3 | −61.6 | −54.7 |
| C ₂₆ —C ₂₅ —C ₂₄ —C ₂₈ | −36.5 | −36.1 | −40.1 | −35.4 | −30.7 | −41.2 |
| C ₂₆ —C ₂₅ —C ₂₄ —H ₈₁ | −154.2 | −154.6 | −154.4 | −153.3 | −148.1 | −157.1 |
| C ₂₇ —C ₂₅ —C ₂₄ —C ₂₈ | 87.8 | 87.8 | 88.0 | 88.5 | 91.0 | 84.4 |
| C ₂₇ —C ₂₅ —C ₂₄ —H ₈₁ | −29.9 | −30.7 | −26.3 | −29.4 | −26.5 | −31.5 |
| O ₇₆ —C ₂₂ —C ₂₃ —O ₇₈ | −50.8 | −39.4 | −9.6 | −37.3 | −62.8 | −19.0 |
| C ₂₈ —C ₂₄ —C ₂₃ —O ₇₈ | 65.6 | 82.2 | 79.0 | 72.0 | 66.0 | 74.6 |
| Mean dev. ^b | 11.7 | 7.0 | 12.3 | 7.9 | 10.9 | |

^a All values in degrees.

^b Mean deviation refers to principal dihedral angles.

Table 7
Calculated and experimental selected bond lengths for 22,23-diepi-28-homobrassinolide

| Bond length ^a | 22,23-Diepi-28-homobrassinolide | | | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|-------|-------|-----------|----------|-------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₆ —O ₇₅ | 1.334 | 1.371 | 1.363 | 1.350 | 1.357 | 1.335 |
| O ₇₅ —C ₇ | 1.410 | 1.423 | 1.400 | 1.390 | 1.406 | 1.431 |
| C ₂ —O ₇₀ | 1.407 | 1.423 | 1.401 | 1.380 | 1.408 | 1.440 |
| C ₃ —O ₇₂ | 1.415 | 1.419 | 1.396 | 1.386 | 1.407 | 1.439 |
| C ₆ =O ₇₄ | 1.214 | 1.233 | 1.228 | 1.232 | 1.219 | 1.220 |
| C ₂₂ —O ₇₆ | 1.409 | 1.420 | 1.394 | 1.382 | 1.402 | 1.438 |
| C ₂₃ —O ₇₈ | 1.416 | 1.416 | 1.397 | 1.388 | 1.407 | 1.444 |
| C ₂₄ —C ₂₈ | 1.537 | 1.524 | 1.561 | 1.554 | 1.540 | 1.565 |
| O ₇₀ —H ₇₁ | 0.950 | 0.964 | 0.947 | 0.940 | 0.951 | 0.952 |
| O ₇₂ —H ₇₃ | 0.947 | 0.967 | 0.947 | 0.941 | 0.951 | 0.952 |
| O ₇₆ —H ₇₇ | 0.952 | 0.964 | 0.948 | 0.943 | 0.952 | 0.952 |
| O ₇₈ —H ₇₉ | 0.952 | 0.967 | 0.947 | 0.944 | 0.953 | 0.949 |
| C ₂₈ —C ₂₉ | 1.512 | 1.507 | 1.534 | 1.537 | 1.516 | 1.555 |
| Mean dev. ^b | 0.017 | 0.020 | 0.022 | 0.028 | 0.020 | |

^a All values in Å.

^b Mean deviation refers to principal distances.

the interaction is too weak, or the minimum energy geometry is wrong [27].

The X-ray structures of brassinolide, 24-epibrassinolide, and 22,23-diepi-28-homobrassinolide exhibits intramolecu-

lar hydrogen bonds between the diol groups in the lateral chain and in ring A. Semiempirical method MNDO does not predict hydrogen bonds of X-ray structures and this is one of the main limitations that poses this method.

Table 8
Calculated and experimental selected bond angles for 22,23-diepi-28-homobrassinolide

| Bond angle ^a | 22,23-Diepi-28-homobrassinolide | | | | | |
|---|---------------------------------|-------|-------|-----------|----------|-------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₂ –O ₇₀ –H ₇₁ | 107.5 | 107.2 | 111.7 | 116.7 | 104.9 | 113.3 |
| C ₃ –O ₇₂ –H ₇₃ | 106.0 | 106.4 | 112.0 | 117.1 | 104.1 | 112.9 |
| C ₆ –O ₇₅ –C ₇ | 118.3 | 119.7 | 124.5 | 125.0 | 118.9 | 117.9 |
| O ₇₄ –C ₆ –O ₇₅ | 108.0 | 111.9 | 113.0 | 113.1 | 109.2 | 115.9 |
| C ₁₃ –C ₁₇ –C ₁₆ | 102.6 | 103.5 | 102.4 | 102.8 | 102.5 | 101.9 |
| C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₁ | 111.2 | 112.3 | 114.0 | 110.5 | 111.6 | 114.1 |
| C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₂ | 113.2 | 114.0 | 116.9 | 114.4 | 113.8 | 114.0 |
| C ₂₀ –C ₁₇ –H ₈₀ | 107.1 | 108.1 | 105.4 | 105.9 | 108.5 | 106.3 |
| C ₂₀ –C ₂₂ –O ₇₆ | 114.3 | 114.7 | 115.1 | 115.0 | 115.3 | 116.8 |
| C ₂₀ –C ₂₂ –C ₂₃ | 109.7 | 110.0 | 113.3 | 108.9 | 107.8 | 113.8 |
| C ₂₂ –O ₇₆ –H ₇₇ | 107.1 | 107.0 | 111.4 | 116.9 | 105.0 | 113.9 |
| C ₂₂ –C ₂₃ –C ₂₄ | 112.5 | 111.4 | 114.3 | 113.6 | 111.1 | 116.0 |
| C ₂₂ –C ₂₃ –O ₇₈ | 111.9 | 108.8 | 110.2 | 110.3 | 110.0 | 109.8 |
| C ₂₃ –C ₂₂ –O ₇₆ | 106.2 | 105.2 | 108.6 | 108.4 | 105.9 | 106.1 |
| C ₂₃ –O ₇₈ –H ₇₉ | 106.5 | 107.2 | 111.7 | 116.2 | 104.7 | 116.4 |
| C ₂₃ –C ₂₄ –C ₂₈ | 110.2 | 108.8 | 111.6 | 110.5 | 107.0 | 113.3 |
| C ₂₃ –C ₂₄ –C ₂₅ | 111.0 | 111.1 | 114.0 | 110.8 | 110.7 | 109.3 |
| C ₂₄ –C ₂₃ –O ₇₈ | 108.6 | 112.8 | 109.3 | 110.3 | 108.8 | 104.2 |
| C ₂₄ –C ₂₅ –C ₂₆ | 113.1 | 113.8 | 116.0 | 113.5 | 113.1 | 114.3 |
| C ₂₄ –C ₂₅ –C ₂₇ | 110.8 | 111.2 | 112.8 | 111.3 | 111.8 | 114.7 |
| C ₂₅ –C ₂₄ –C ₂₈ | 112.3 | 114.0 | 112.8 | 111.9 | 113.3 | 115.2 |
| C ₂₆ –C ₂₅ –C ₂₇ | 110.3 | 110.5 | 110.9 | 109.4 | 109.3 | 110.9 |
| C ₂₄ –C ₂₈ –C ₂₉ | 112.8 | 113.8 | 115.9 | 112.6 | 113.5 | 117.1 |
| Mean dev. ^b | 3.4 | 3.3 | 2.1 | 2.7 | 3.8 | |

^a All values in degrees.

^b Mean deviation refers to principal bond angles.

However, PM3, AM1, PDDG/MNDO, and PDDG/PM3 reproduces very well these intramolecular hydrogen bonds. It is well known that PM3 semiempirical method stabilize unphysical short H–H interactions, showing in these case interactions of H–H at distances less than 1.80 Å while AM1 does not present this unphysical behaviour. Recently, have been reported a new method that substantially improved PM3 methods by a proper reparameterization of the core–core energy terms. These new method define a new PM3 core–core correction function that behaves like the original PM3 term at short interatomic distance and goes smoothly to parameterized interaction functions [28].

Fig. 2 shows the theoretical predicted semiempirical molecular brassinolide structure superimposed against those from X-ray data, from simple inspection we notice that the PDDG/PM3 method is the semiempirical method that best reproduce the brassinolide structure, followed by AM1.

In order to simplify, the structures of 24-epibrassinolide and 22,23-diepi-28-homobrassinolide were also superimposed it against the corresponding X-ray structures, and Table 11 shows the resulting RMS deviations obtained making use of the RMS tool fit and overlay as described above.

The best semiempirical method to reproduce the 24-epibrassinolide molecular structure was MNDO, presenting the lower RMS value, however, it does not predict the hydrogen bond of the X-ray 24-epibrassinolide structure.

For the 22,23-diepi-28-homobrassinolide the lower RMS value was found for PDDG/MNDO.

We concluded that different methods can be used for the optimization of these three compounds, and we propose the use of either PDDG/PM3 or AM1 methods, because the principal bond lengths, angles, and dihedral angles are well reproduced by them. In any case, it must be remembered that calculations assume *in vacuo* conditions and crystal packing force molecules to some extent. Nevertheless, the resulting geometries are reasonably good with regard to the experimental ones.

3.2. HOMO and LUMO energies

The main origin of brassinosteroids high biological activity must be considered the result of some of the specific structural characteristics they possess. They are: (i) vicinal hydroxyl groups (at C_{2α} and C_{3α}) in ring A; (ii) the presence of 7-oxalactone in the ring B; (iii) the existence of a diol system in positions 22 and 23, with configuration RR or SS; (iv) and a methyl or ethyl group in position 24 in the lateral chain [29]. Relevant frontier orbital locations give us an idea of the region of the molecule involved in the electron exchange interactions with other molecules, such as the regions of the molecule where the binding may occur with specific receptors present in plant cells to regulate the expression of specific genes.

Table 9
Calculated and experimental selected dihedral angles for 22,23-diepi-28-homobrassinolide

| Dihedral angle ^a | 22,23-Diepi-28-homobrassinolide | | | | | |
|--|---------------------------------|--------|--------|-----------|----------|--------|
| | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 | Exp. |
| C ₁₃ –C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₁ | –47.2 | –56.7 | –49.5 | –48.7 | –49.7 | –52.4 |
| C ₁₃ –C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₂ | –168.1 | –178.9 | –174.8 | –169.3 | –168.8 | –177.4 |
| C ₁₆ –C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₁ | –166.0 | –175.5 | –172.4 | –168.8 | –166.6 | –172.4 |
| C ₁₆ –C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₂ | 73.1 | 62.3 | 62.3 | 70.6 | 74.3 | 62.6 |
| H ₈₀ –C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₁ | 73.5 | 64.2 | 69.9 | 71.3 | 72.4 | 68.7 |
| H ₈₀ –C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₂ | –47.4 | –58.1 | –55.5 | –49.3 | –46.8 | –56.3 |
| C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₂ –O ₇₆ | –52.9 | –14.0 | 0.0 | –44.4 | –34.1 | –13.4 |
| C ₁₇ –C ₂₀ –C ₂₂ –C ₂₃ | –172.1 | –132.3 | –125.8 | –166.2 | –152.2 | –137.6 |
| C ₂₀ –C ₂₂ –O ₇₆ –H ₇₇ | 59.0 | 63.0 | 116.4 | 57.7 | 70.9 | 69.3 |
| C ₂₀ –C ₂₂ –C ₂₃ –O ₇₈ | 67.2 | 67.0 | 77.2 | 70.8 | 93.6 | 68.9 |
| C ₂₀ –C ₂₂ –C ₂₃ –C ₂₄ | –170.2 | –168.0 | –159.3 | –164.7 | –145.8 | –173.4 |
| C ₂₁ –C ₂₀ –C ₂₂ –O ₇₆ | –175.9 | –138.9 | –129.0 | –167.0 | –156.8 | –141.4 |
| C ₂₁ –C ₂₀ –C ₂₂ –C ₂₃ | 64.9 | 102.7 | 105.3 | 71.2 | 85.2 | 94.4 |
| C ₂₂ –C ₂₃ –O ₇₈ –H ₇₉ | –27.7 | –58.6 | –90.3 | –39.5 | –55.2 | –65.6 |
| C ₂₂ –C ₂₃ –C ₂₄ –C ₂₈ | 59.0 | 74.7 | 66.2 | 51.4 | 62.6 | 45.4 |
| C ₂₂ –C ₂₃ –C ₂₄ –C ₂₅ | 176.0 | 159.0 | 164.5 | 176.0 | 173.5 | 175.4 |
| C ₂₃ –C ₂₂ –O ₇₆ –H ₇₇ | –179.8 | –176.0 | –147.1 | –179.8 | –170.0 | –162.7 |
| C ₂₃ –C ₂₄ –C ₂₈ –C ₂₉ | –144.2 | –165.5 | –115.9 | –171.1 | –171.7 | –177.8 |
| C ₂₃ –C ₂₄ –C ₂₅ –C ₂₆ | –71.0 | –87.8 | –65.6 | –96.8 | –81.2 | –81.6 |
| C ₂₃ –C ₂₄ –C ₂₅ –C ₂₇ | 164.6 | 146.6 | 164.9 | 139.2 | 154.9 | 148.8 |
| C ₂₄ –C ₂₃ –O ₇₈ –H ₇₉ | 152.6 | 65.6 | 143.2 | 165.8 | 177.1 | 169.6 |
| C ₂₄ –C ₂₃ –C ₂₂ –O ₇₆ | 65.8 | 67.9 | 71.6 | 69.5 | 90.3 | 56.8 |
| C ₂₅ –C ₂₄ –C ₂₃ –O ₇₈ | –51.5 | –36.2 | –40.5 | –59.5 | –52.2 | –63.8 |
| C ₂₆ –C ₂₅ –C ₂₄ –C ₂₈ | 52.8 | 35.5 | 63.2 | 27.0 | 39.0 | 47.3 |
| C ₂₆ –C ₂₅ –C ₂₄ –H ₈₁ | 172.0 | 155.6 | 179.7 | 145.6 | 159.7 | 164.8 |
| C ₂₇ –C ₂₅ –C ₂₄ –C ₂₈ | –71.6 | –90.1 | –66.4 | –97.0 | –84.9 | –82.3 |
| C ₂₇ –C ₂₅ –C ₂₄ –H ₈₁ | 47.6 | 30.0 | 50.2 | 21.6 | 35.8 | 35.2 |
| O ₇₆ –C ₂₂ –C ₂₃ –O ₇₈ | –56.8 | –57.1 | –51.9 | –54.9 | –30.3 | –60.9 |
| C ₂₈ –C ₂₄ –C ₂₃ –O ₇₈ | 176.4 | 162.5 | 169.8 | 175.9 | 176.1 | 166.2 |
| Mean dev. ^b | 14.4 | 10.9 | 14.9 | 12.0 | 10.9 | |

^a All values in degrees.

^b Mean deviation refers to principal dihedral angles.

Table 10
Mean absolute errors for prediction of different internal coordinates including all values for each molecule (lowest values are shown in *italics*)

| | Compound | PM3 | AM1 | MNDO | PDDG/MNDO | PDDG/PM3 |
|---------------------|------------|--------------|------------|--------------|-----------|-------------|
| Bond length (Å) | I | 0.021 | 0.026 | <i>0.017</i> | 0.020 | 0.020 |
| | II | <i>0.012</i> | 0.013 | 0.027 | 0.027 | 0.013 |
| | III | 0.021 | 0.028 | <i>0.017</i> | 0.02 | 0.022 |
| Bond angles (°) | I | 2.3 | <i>1.7</i> | 1.9 | 2.6 | 2.2 |
| | II | 2.1 | <i>1.7</i> | 1.8 | 2 | 2.3 |
| | III | 2.6 | 2.4 | <i>1.9</i> | 2.3 | 2.6 |
| Dihedral angles (°) | I | 5.9 | 6.1 | 23 | 10.3 | <i>4.4</i> |
| | II | 13.7 | 7 | 12.3 | 7.9 | 10.9 |
| | III | 14.4 | 10.9 | 14.9 | 12 | <i>10.8</i> |

Interestingly, for all three considered molecules both HOMO and LUMO were located at the same place using all the semiempirical methods described in this article. It is a well known invariance that serves for very reliable conclusions. Thus, the HOMO was delocalized in the lateral chain, while the LUMO is localized in the lactone group presented in ring B.

Fig. 3 shows the frontier orbitals of the studied brassinosteroids by the AM1 semiempirical Hamiltonian. Fron-

tier orbital location is coincident for all tested semiempirical Hamiltonians. Therefore, we selected AM1 to draw images of HOMO and LUMO for the three molecules.

Normally, the energy properties of isomers are similar, as in this case, where both brassinolide and 24-epibrassinolide are diastereoisomers differentiated only by chirality at C24 (Fig. 1). Both molecules show the same HOMO and LUMO energies.

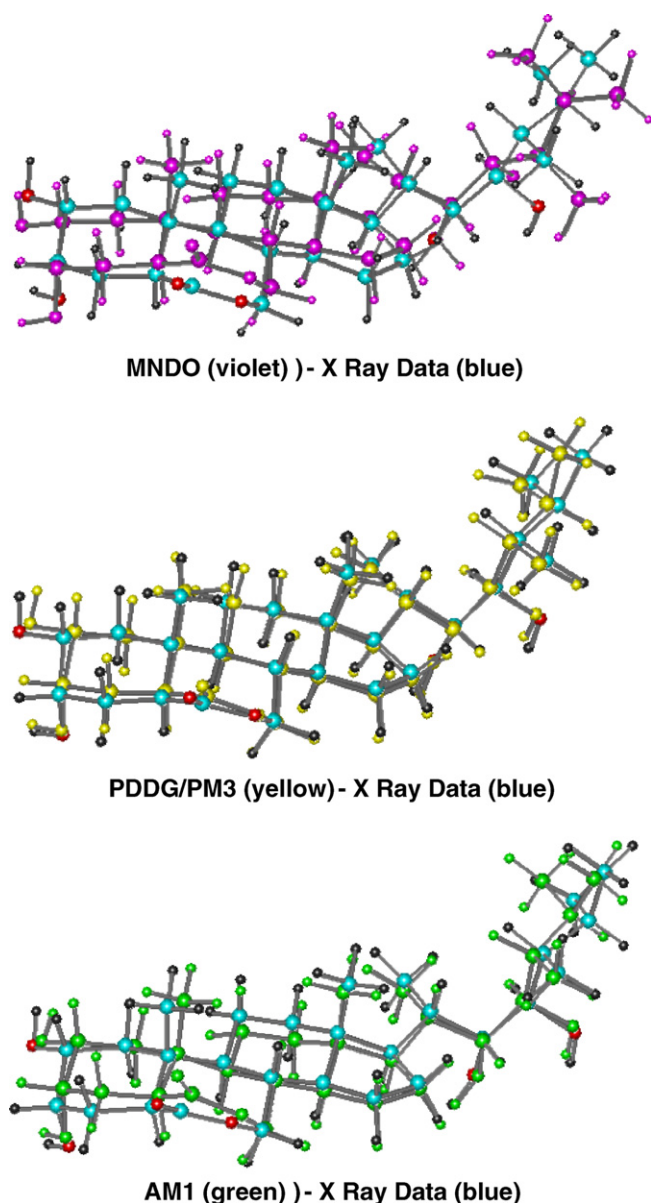


Fig. 2. Superimposed calculated geometrical structure of brassinolide against X-ray data. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this paper.)

The LUMO is always localized on the 7-oxalactone group, and is an antibonding π orbital formed by atomic p_y orbitals of C6, O74, and O75 indicating that a nucleo-

philic attack could occur in this region. Since in these cases there is more than one possible centre of attack, the preferred nucleophilic attack will occur on the atom having the largest LUMO coefficient and that is precisely the C6. Also C6 possess a partial positive charge due to the polarization of the bond toward the electronegative oxygen atoms making this site a good target for a nucleophilic attack.

The HOMO was mainly formed by atomic p_x and p_y orbitals of C17, C21, C22, C23, C25, C28, O78, O79, and C29 (only in the case of 22,23-diepi-28-homobrassinolide). Thus, the HOMO is delocalized in the lateral chain. Similarly, the attack of an electrophile will involve the HOMO of the reactant, and the reaction should occur preferentially on the atom having the largest HOMO coefficient. These atoms are C22, C23, O78, and O76, meaning that this is the site of the molecule that more likely will interact with an electrophile. Thus, the localization of the frontier orbitals indicate where the interaction with receptors localized in plants may occur, and as we have shown before these regions are consistent with the ones previously described as responsible for brassinosteroid higher biological activity. It is evident that electron exchange plays a crucial role in this kind of molecular interaction and that quantum mechanical methods, at any level, are unavoidable to model brassinosteroids processes at the molecular level.

These results corroborate the work carried out previously by Brosa et al., where they created a model based on brassinosteroid–receptor interaction and proved that the areas of the molecule responsible for binding are the same where the HOMO and LUMO are located and that hydrogen bonding could be one of the type of interactions that take place on binding [30].

3.3. Electrostatic potentials map and atomic charges

The electrostatic potential map is probably one of the most useful functions to represent the reactivity of a molecule [31]. These maps paint the value of the electrostatic potential onto an electron density surface. By convention, colors toward the red depict negative potential, while colors toward the blue depict positive potentials [32]. In Fig. 4 are represented the electrostatic potential maps of the three brassinosteroids using AM1 semiempirical

Table 11
Overall RMS comparing different methods against experimental data for the three compounds

| X-ray – semiempirical method | Root mean square (RMS) ^a | | |
|------------------------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| | Brassinolide | 24-Epibrassinolide | 22,23-Diepi-28-homobrassinolide |
| X-ray – PM3 | 0.683 | 1.170 | 0.756 |
| X-ray – AM1 | 0.503 | 0.423 | 0.713 |
| X-ray – MNDO | 1.142 | 0.306 | 0.784 |
| X-ray – PDDG/MNDO | 0.973 | 0.360 | 0.689 |
| X-ray – PDDG/PM3 | 0.307 | 0.837 | 0.815 |

^a All values of RMS in Å.

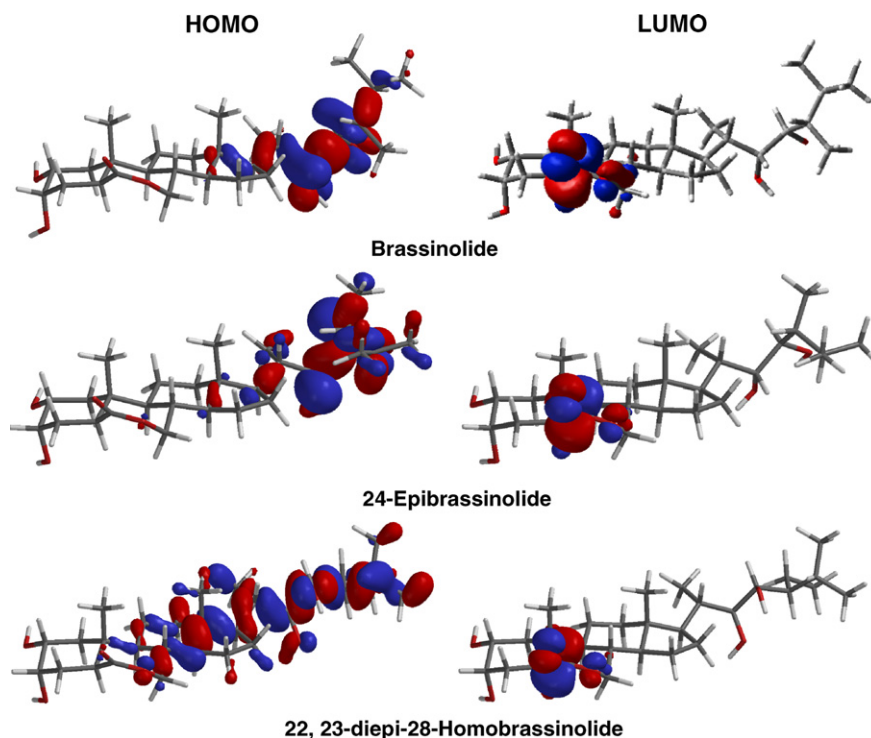


Fig. 3. Frontier orbitals.

method. The negative part of the electrostatic potential map was associated with the oxygen centres of the functional groups, which make the lactone (ring B), and hydroxyl groups in ring A and lateral chain suitable for the interaction with positive particles charges. Lactone groups elicited larger electrostatic potentials than hydroxyl groups. The three molecules show similar behaviours as can be seen in Fig. 4.

Table 12 shows atomic charges of the main atoms of rings A, B, and lateral chain, through a Mulliken analysis of population of the three molecules with the semiempirical method AM1. This analysis allows us to differentiate the regions of the molecule which possess accumulation of electrostatic charges from the zones with low charge density in a quantitative way. Similar results were found by the other semiempirical methods. The lactone group in ring B presents an accumulation of negative charges for the three molecules, making this region of the molecules suitable for electrophilic attacks, but also the C6 possesses the higher positive charge of all atoms for the three molecules, making this site suitable too for a nucleophilic attack and reaching the same conclusions that in Section 3.2 when we analyze the frontier orbitals. Ring A and lateral chain possess regions of negative and positive charges due to the functional hydroxyl groups presented in these sites, where oxygen atoms exhibit negative charges and hydrogen atoms positive charges. These results corroborate the regions of the molecules that may be involved in the interaction with a receptor or other molecules. These are the lactone

group in ring B, where the LUMO was localized, and the lateral chain, where the HOMO was delocalized.

Atomic charges of diastereoisomers are almost the same. Insignificant differences are found in the lateral chain, and this is a logical result, since the methyl group in position 24 of 24-epibrassinolide has another configuration (R configuration). 22,23-Diepi-28-homobrassinolide only shows differences in the atomic charges of the atoms in the lateral chain with respect to the brassinolide and 24-epibrassinolide. The main difference between the last of the three compounds and the diastereoisomers is the charge on C 24, since 22,23-diepi-28-homobrassinolide is a C28 brassinosteroid with an ethyl group substitution in position 24, while brassinolide and 24-epibrassinolide are C27 brassinosteroids (see Fig. 1).

4. Conclusions

A validation of reliability to predict molecular properties of three brassinosteroids has been done with different semiempirical methods, and the best geometrical results compared with X-ray crystallographic data were obtained by AM1 and PDDG/PM3 methods. The analyses of frontier orbital were performed with AM1 method, and it showed the delocalized HOMO in the lateral chain, and the localized LUMO in the lactone group, indicating that electronic exchange with other molecules is able to occur in these positions. An analysis of the electrostatic potential maps, and atomic charges guides us to the same sensitive and reactive sites of these

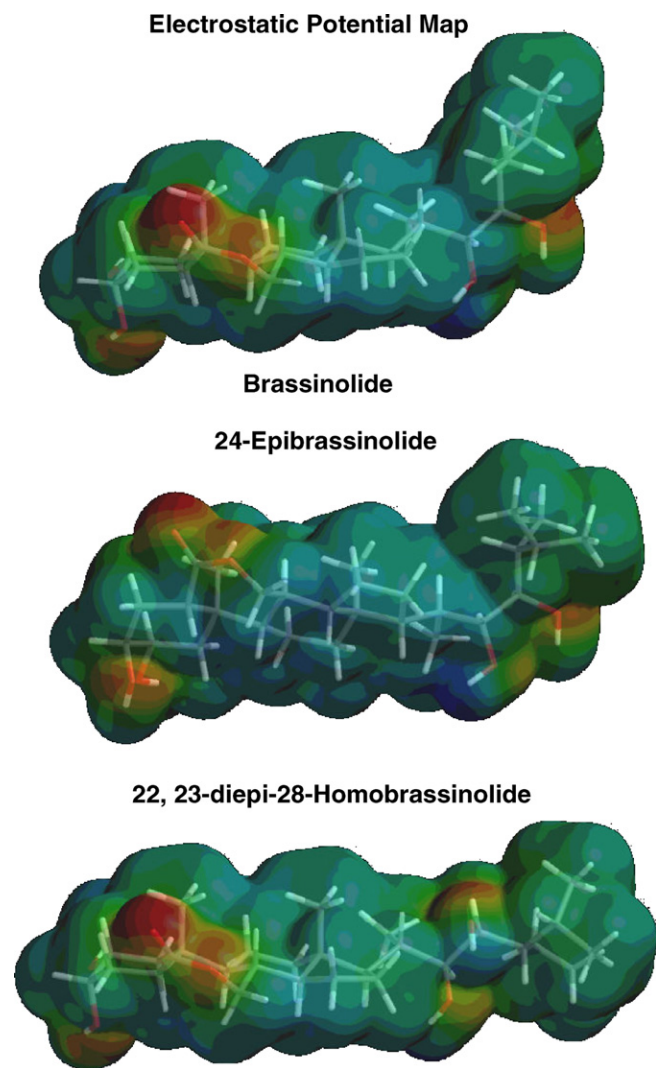


Fig. 4. Electrostatic potentials maps.

Table 12

Main electrostatic charges of brassinolide, 24-epibrassinolide, and 22,23-diepi-28-homobrassinolide

| Main atoms ^a | Brassinolide | 24-Epibrassinolide | 22,23-Diepi-28-homobrassinolide |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------|
| Ring A | C ₂ −0.01 | −0.01 | −0.01 |
| | O ₇₀ −0.34 | −0.34 | −0.34 |
| | H ₇₁ 0.21 | 0.21 | 0.21 |
| | C ₃ 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| | O ₇₂ −0.33 | −0.33 | −0.33 |
| | H ₇₃ 0.22 | 0.22 | 0.22 |
| Ring B | C ₆ 0.30 | 0.30 | 0.30 |
| | O ₇₄ −0.31 | −0.31 | −0.31 |
| | O ₇₅ −0.25 | −0.25 | −0.25 |
| Lateral chain | C ₂₂ −0.01 | −0.01 | −0.004 |
| | O ₇₆ −0.34 | −0.34 | −0.34 |
| | H ₇₇ 0.20 | 0.21 | 0.21 |
| | C ₂₃ 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| | O ₇₈ −0.33 | −0.32 | −0.32 |
| | H ₇₉ 0.21 | 0.22 | 0.22 |
| | C ₂₄ −0.09 | −0.09 | −0.13 |

^a All values of charges in a.u.

molecules, and it indicates the possibility that those sites might also be the target for receptors of brassinosteroids in plants.

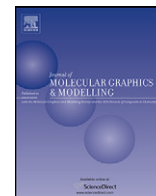
Acknowledgements

The authors are indebted to the financial support of the Universidad de la Habana, Cuba and the Universidad Autónoma de Madrid.

References

- [1] W.M. Gray, PLoS Biol. 2 (2004) 1270.
- [2] S.D. Clouse, in: C.R. Somerville, E.M. Meyerowitz (Eds.), *Brassinosteroids, The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi: 10.1199/tab.0009,2002. Available from: <<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>>.
- [3] J.M. Sasse, J. Plant Growth Regul. 22 (2003) 276.
- [4] A. Bajguz, A. Tretyn, Phytochemistry 62 (2003) 1027.
- [5] T. Kinoshita, A. Caño-Delgado, H. Seto, S. Hiranuma, S. Fujioka, S. Yoshida, J. Chory, Nature 433 (2005) 167.
- [6] G. Vert, J.L. Nemhauser, N. Geldner, F. Hong, J. Chory, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21 (2005) 177.
- [7] J. Chory, Y. Belkadir, Science 314 (2006) 1410.
- [8] M.A. Zullo, G. Adam, Braz. J. Plant. Physiol. 14 (3) (2002) 143.
- [9] C. Brosa, L. Soca, E. Terrabras, J.C. Ferrer, A. Alsina, Tetrahedron 54 (1998) 12337.
- [10] N. Ferro, R. González-Jonte, D. Carnesoltas, J.R. Alvarez-Idaboy, M. Iglesias, F. Coll, FCTI XXVII (1999) 105.
- [11] S. Seeta Ram Rao, B. Vidya Vardhini, E. Sujatha, S. Anuradha, Curr. Sci. Indian 82 (2002) 1239.
- [12] T. Yokota, S. Koba, S.-K. Kim, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Sakakibara, K. Okada, K. Mori, N. Takahashi, Agric. Biol. Chem. 51 (1987) 1625.
- [13] S. Fujioka, A. Sakurai, Nat. Prod. Rep. 14 (1997) 1.
- [14] T. Yokota, Trends Plant Sci. 2 (1997) 137.
- [15] M.D. Groove, G.F. Spencer, W.K. Rohwedder, N.B. Mandaba, J.F. Worley, J.D. Warthen Jr., G.L. Steffens, J.L. Flippen-Anderson, J.C. Cook Jr., Nature (London) 281 (1979) 216.
- [16] Y.M. Álvarez-Ginarte, R. Crespo, L.A. Montero-Cabrera, J.A. Ruiz-García, Y. Marrero-Ponce, R. Santana, E. Pardillo-Fontdevila, E. Alonso-Becerra, QSAR Comb. Sci. 24 (2005) 218.
- [17] Y.M. Álvarez-Ginarte, R. Crespo-Otero, Y. Marrero-Ponce, L.A. Montero, J.A. Ruiz-García, A. Padrón-García, F. Torrens-Zaragoza, QSAR Comb. Sci. 25 (2006) 881.
- [18] S. Droschin, A. Porzel, W. Brandt, J. Mol. Modeling 7 (2001) 34.
- [19] M.J.S. Dewar, W. Thiel, J. Am. Chem. Soc. 99 (1977) 4899.
- [20] M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy, J.P. Stewart, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 3902.
- [21] J.J.P. Stewart, J. Comp. Chem. 10 (1989) 221.
- [22] M.P. Repasky, Jayaraman Chandrasekhar, W.L. Jorgensen, J. Comp. Chem. 23 (2002) 1601.
- [23] J.J.P. Stewart, MOPAC, v. 6. The 6J version with Jorgensen modified Hamiltonians was released in our laboratory for PC computers under both Windows and Linux operating systems, Universidad de la Habana, 2004, 1993.
- [24] E. Codorníu-Hernández, A. Mesa-Ibérico, R. Hernández-Santesteban, et al., Int. J. Quantum Chem. 103 (2005) 82.
- [25] Hyperchem Release 7.0, Hypercube, Inc., Irvine.
- [26] B.J. Deppmeier, J. Driessen, W.J. Hehre, J.A. Johnson, P.E. Kluzinger, M. Watanabe, J. Yu, PC Spartan Pro. Wavefunction, Inc. Copyright, 1996–2000.
- [27] F. Jensen, Introduction to Computational Chemistry, Wiley, New York, 1999 (Chapter 3, pp. 81–92).

- [28] M.I. Bernal-Uruchurtu, M.F. Ruiz-López, Chem. Phys. Lett. 330 (2000) 118–124.
- [29] T. Yokota, K. Mori, in: M. Bohl, W.L. Duax (Eds.), Molecular Structure and Biological Activity of Steroids, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, p. 317 (Chapter 9).
- [30] C. Brosa, I. Zamora, E. Terricabras, L. Kohout, Collect. Czech. Chem. Commun. 63 (1998) 1635.
- [31] Available from: <<http://www.uam.es/departamentos/ciencias/quimica/alcami/informatica/PRACTICA8/práctica8.pdf>>.
- [32] Spartan Manual 02. Wavefunction, Inc. Copyright 2006 by Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Avenue, Suite 370 Irvine, CA 92612 and Wavefunction, Inc., Japan Branch Office 3-5-2, Koujimachi, Suite 608 Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-0083. ISBN 1-890661-34-1.



A theoretical approach to the solvation of brassinosteroids

Cercis Morera-Boado^a, Esther Alonso-Becerra^{a,*}, Raúl González-Jonte^b, Luis Alberto Montero-Cabrera^a, José Manuel García-de-la-Vega^b

^a Laboratorio de Química Computacional y Teórica, Facultad de Química, Universidad de La Habana, 10400 Havana, Cuba

^b Departamento de Química Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2008

Received in revised form 18 September 2008

Accepted 30 September 2008

Available online 14 October 2008

Keywords:

Brassinosteroids

Biological activity

Solvation

Semiempirical calculations

Density functional theory

ABSTRACT

The interaction of three different brassinosteroids with water was studied by the Multiple Minima Hypersurface (MMH) procedure to model molecular interactions explicitly. The resulting thermodynamic data give useful information on properties of molecular association with water. This application can serve as a tool for future investigations and modelling concerning interactions of brassinosteroids with receptor proteins in plants. DFT/B3LYP calculations were also made in order to correlate and test the performance of the current AM1 Hamiltonian calculations of these complexes, which are inherent to MMH routine. Diol functionalities located in ring A and lateral chain appears as the sites that show the highest affinity to water. The oxalactone group does not appear to be a key structural requirement in the association with water. Parallel calculations with a “polarizable continuum method” (PCM) agreed with the reported experimental order of biological activities, where Brassinolide exhibited the best solubility features.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Brassinosteroids (BRs) are plant growth promoting molecules found at low concentrations throughout the plant kingdom and are widely distributed in both reproductive and vegetative plant tissues [1,2]. Natural brassinosteroids identified so far, have a common 5 α -cholestan skeleton, and their structural variations come from the kind and orientation of oxygenated functions in rings A and B. These modifications are produced by oxidation and reduction reactions during biosynthesis. These steroids can be classified as C₂₇, C₂₈ or C₂₉ brassinosteroids depending on the alkyl-substitution on the C₂₄ in the side chain [3]. These side chain structures are all common in plants sterols.

Up to date, 61 naturally occurring BRs have been discovered [1]. Brassinolide (**Br**) [(22R,23R,24S)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-homo-7-oxa-5 α -cholestan-6-one] is the most active brassinosteroid. It has a lactone function at C₆/C₇ in ring B, 2 α ,3 α -vicinal hydroxyl at A-ring and in the lateral chain exhibits R configuration of the diol at C₂₂/C₂₃ and 24S methyl substitution (Fig. 1).

As regards the B-ring oxidation, brassinosteroids are divided into 7-oxalactone, 6-ketone (6-oxo) and 6-deoxo (non-oxidized).

In general, 7-oxalactone BRs have stronger biological activity than 6-ketone types (such as Castasterone (**Cs**)) and non-oxidized BRs reveal no activity in biological tests.

BRs with either a 3 α -hydroxyl (e.g. Typhasterol (**Tp**)), 3 β -hydroxyl or 3-ketone in the A-ring are precursors of BRs carrying 2 α ,3 α -vicinal diol; those with 2 α ,3 β -, 2 β ,3 α -, or 2 β ,3 β -vicinal diol can be metabolites of active BRs with a 2 α ,3 α -vicinal diol. Decreasing order of activity (2 α ,3 α > 2 α ,3 β > 2 β ,3 α > 2 β ,3 β) shown by structure–activity relationship suggests that α -oriented hydroxyl group at C₂ is essential for a greater biological activity of BRs in plants [1,4]. Recent studies have shown that 3 α ,4 α -diols are more active than 2 α ,3 α . This fact is in strong contrast with the structure requirements mentioned above. Sisa et al. [5] suggest that the higher activity of unnatural 3 α ,4 α -diols could be explained by twisting and distortion of the molecule due to the seven- or eight-membered B-ring and also by the position of a carbonyl group relative to the A-ring diol.

With the exception of some not fully characterized BRs with an oxo function at C₂₃, all bioactive BRs possess a vicinal 22R-23R-diol structural functionality, which appears essential for a high biological activity [1,6–8].

Although the existence and biological activity of these plant steroids have been described in a huge body of literature since 1979, significant progress has been produced in the last 10 years on our understanding of BRs biology, including their distribution in plants, the role of BRs in plant growth, BRs biosynthesis, perception, signal

* Corresponding author. Tel.: +537 8703922; fax: +537 8735774.

E-mail address: esther@fq.uh.cu (E. Alonso-Becerra).

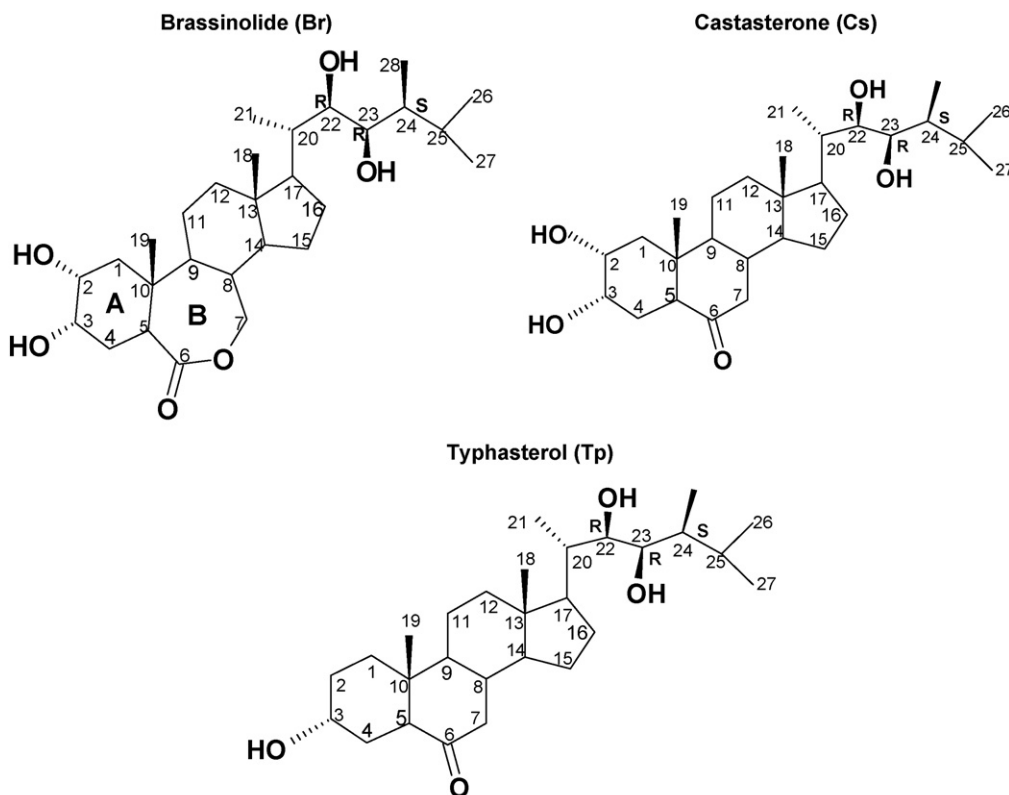


Fig. 1. Structures of brassinosteroids studied.

transduction and the interaction between BRs and other plants hormones [9]. Several previous experimental works suggest that transport inside cells play a determinant role in BRs activity [2].

In a previous study by Brosa et al. [10], a model based on brassinosteroid–receptor interaction was proposed. According their results the activity exhibited by brassinosteroids can be explained by considering the putative H-bonding interactions in the brassinosteroid–receptor complex, and most importantly this H-bonding seems to be essential for activity when it is located in a specific zone. The zone that seems to be most important for increasing biological activity is the electronegative part of the side chain, and it appeared to be even more important than the diol system of the A-ring. Another requirement was that these molecules must be in a so-called “active conformation”, which is defined as the one that is able to bind to the receptor. Brosa et al. also tested with a common theoretical “docking” procedure the interaction between BRs side chain analogs and different probes that simulated different kind of interactions. Water was chosen among the probes tested in that work owing to the well-known capacity for acting both as acceptor and donor of hydrogen bonds. The diol group of Brassinolide shows a strong interaction with all the probes used.

In order to interpret molecular interactions of brassinosteroids with the biological media we show here the results of modelling preferred clusters of these phytohormones with water according the MMH routine. It allows us to select those preferred cluster structures that represent the highest expected populations in their respective molecular ensembles. Water solvations probably have an important role in BR transport in plants and in BR binding to their receptor protein BRI1.

Three natural brassinosteroids with different structural characteristics and biological activities have been selected for study in their association with water molecules (Fig. 1). The first one is Brassinolide, which possesses the highest biological activity of all

natural brassinosteroids. The second one is Castasterone, the best known 6-oxo BR, which is a direct biosynthetic precursor of Brassinolide [11] and is believed to have an independent biological activity in some plants. The last one is Typhasterol, which also has a 6-ketone group in ring B, but does not possess the α -hydroxyl group in C₂.

The order of bioactivity (relative activities) shown by these BRs in the rice lamina inclination test [12] is the following:

Br (100%) > **Cs** (20%) > **Tp** (2%)

2. Methodology

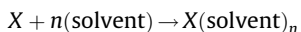
In order to explore the conformational space in the interaction of each brassinosteroid with water, Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) [13–18] procedures were applied. Then a molecular alignment approach with the most relevant local minima obtained by the MMH method in the case of association with one water molecule was performed. This molecular alignment procedure called Topo-Geometrical Superposition Approach (TGSA) [19] allows us to obtain the set of relevant semiempirical local minima, which is later refined using a density functional theory method (DFT), B3LYP with the 6-31G and the 6-31+G* basis set [20]. The PCM method [21,22] has been used to calculate bulk solvent effects.

MMH is a very useful and reliable approach for localizing the minima of hydrogen-bonded and weakly interacting systems and therefore has been successfully employed in several studies [15,23–27]. This procedure combines quantum mechanical methods for the calculations of energy with statistical mechanics to obtain thermodynamic quantities related to the molecular association process. The main procedure of this approach will be outlined briefly.

An appropriate construction of several random molecular geometries initially generates a set of n solute-solvent cluster configurations, starting from the independently optimized structures of BRs (solute) and water (solvent). Randomness has been carefully tested [13]. It produces a set of typical clusters of local minima in the solute-solvent interaction configuration space after an appropriate molecular optimization procedure of the previously obtained random structures, normally following an energy gradient pathway. The energy, ε_i , of every i th cluster of the ensemble is thus obtained. As our attention is focused on finding a reduced set of configurations, which can represent the most significant contributions to the i th state for the whole system we select only those that can represent a significant population after a Boltzmann distribution treatment of such ε_i . In some cases different arrangements converge to the same minimum and they must be eliminated after deciding if they are redundant or not. Non-redundant are, for example, those minima that correspond to multiplicities originated in molecular symmetry. For this purpose a Tanimoto similarity index was used for discriminating such statistically redundant information.

Obviously, the partition function of molecular association must be calculated by assuming the appropriate energy scale with respect to a reference value that is chosen to be the same set of non-interacting molecules. This means that we make the approximation of considering the translational, rotational and vibrational states of clustered molecules as identical to those in the reference states, which means that the association process is taken as isothermal.

Thus, the association process between a solute and n solvent molecules can be described by



Thermodynamic properties such as association energy, entropy, and Helmholtz free energy are then calculated by this procedure [13,14].

It must be noticed that this approach can provide, at the same time, important model structures of solute-solvent cluster interactions with true statistical significance together with the thermodynamic variables.

Previous studies report that the AM1 semiempirical method reproduces quite well the geometry of natural brassinosteroids and some analogues [28,29]. The most important fact to decide exploration of hypersurfaces with parametric, i.e. semiempirical Hamiltonians, is that they allow a huge number of calculations with a computational cost that is lower than that with *ab initio* methods and the computations are much faster for large supermolecules [30], as in our case. Semiempirical calculations should be a good choice to explore the energy hypersurfaces of the complexes, although they must be correlated with other independent calculations for testing reliability.

Then, to obtain energy minima structures of isolated molecules, the AM1 semiempirical Hamiltonian was applied to three brassinosteroids i.e. **Br**, **Cs**, **Tp** and also to the water molecule, using the MOPAC v. 6.0 program [31]. In the case of **Br** we used as input the X-ray structure [32].

In all calculations the eigenvector-following routine “EF” for searching minima was used, and all convergence thresholds were refined 100 times with respect to the defaults.

A study of the association energy evolution per mol of solvent, corresponding to solvated shells with an increasing number of solvent molecules was performed. It has been built by taking into account all 100 optimized sets formed by solute (**Br**, **Cs**, **Tp**) and n solvent molecules (water), with $n = 1$ to 5. The procedure explained in detail and all programs for processing are available on a web page [16]. Hundreds of thousands of SCF cycles with their

respective supermolecular geometries were calculated during the process for each set. The program used for processing the output data is called Q3 [16].

In some cases the Tanimoto index does not completely eliminate the similarity degeneracy produced with clusters that possess the same energy and molecular geometry. Then we used a molecular alignment procedure with the most relevant local minima obtained by the MMH method in the case of association with one water molecule ($n = 1$). This procedure, called Topo-Geometrical Superposition Approach (TGSA) [19], is only based on comparisons of atom types and interatomic distances. Hence, the procedure can handle large molecular sets within affordable computational costs. This algorithm performs the molecular superposition within a molecular set in two ways: (1) calculating all pairwise alignments; and (2) choosing a molecule as a template [19]. Then we calculate all pairwise alignments between the most important configurations of each brassinosteroids with one molecule of water, to be absolutely sure that no redundant degenerate clusters were obtained for further analysis.

As mentioned before, semiempirical results provide a preliminary overview of the interactions in these complexes. For this reason, the set of relevant semiempirical local minima obtained after TGSA analysis were reoptimized using the B3LYP/6-31G scheme. All calculations were performed with Gaussian 03 package [33].

Finally the PCM method [21,22] has been used to calculate bulk solvent effects. In this method the solvent, i.e. water in this case, is represented by an infinite dielectric medium characterized by the dielectric constant of the bulk and the so-called UAHF predefined radii are used for building the effective cavity occupied [34]. The solvent effects are considered by PCM single point energy calculations at the B3LYP/6-31G and B3LYP/6-31+G* levels applied to the BSSE uncorrected structures of the most important previously optimized clusters [35].

3. Results and discussion

The activity of BRs could be related with the formation of hydrogen bonds in the receptor binding sites [10,36]. Moreover the exploration of the sites of the BRs molecules that more likely will interact with water by hydrogen-bond interactions is important to understand how may occur the hydrophilic interactions of these phytohormones with the receptor.

The first step of this study was to explore hypersurfaces of the brassinosteroids–water complexes. The solvation shell refers to the amount of solvent molecules to be considered in a single solute-solvent cell to achieve the most significant effects [37]. A study of the evolution of the association energy (E^{assoc} , mol) of solvent corresponding to solvation shells with one up to five solvent molecules was performed. It was built by taking into account all 100 optimized sets. It must be stated that in order to obtain a full representation of solvent effects on the solute, a larger number of solvent molecules is needed. Perhaps the best cluster is produced when the association energy per solvent molecule converges to a certain value [13,37]. However, since our purpose is to take into account the main effects of the environmental molecules on the physical and chemical solute properties, we have decided that a relatively small solvation shell of five water molecules should represent the main perturbations to these properties with respect to the isolated solute.

Thermodynamic results are shown in Table 1 and some conclusions can be obtained after processing 100 configurations of each brassinosteroid with one up to five molecules of water. The thermodynamic properties of **Br** with $n = 4$ and 5 do not change significantly with respect to the cluster containing three solvent

Table 1Association energies (E^{assoc} , kJ/mol), Helmholtz free energies (A^{assoc} , kJ/mol) and entropies (S , J/Kmol) of selected BRs as obtained at the AM1 level.

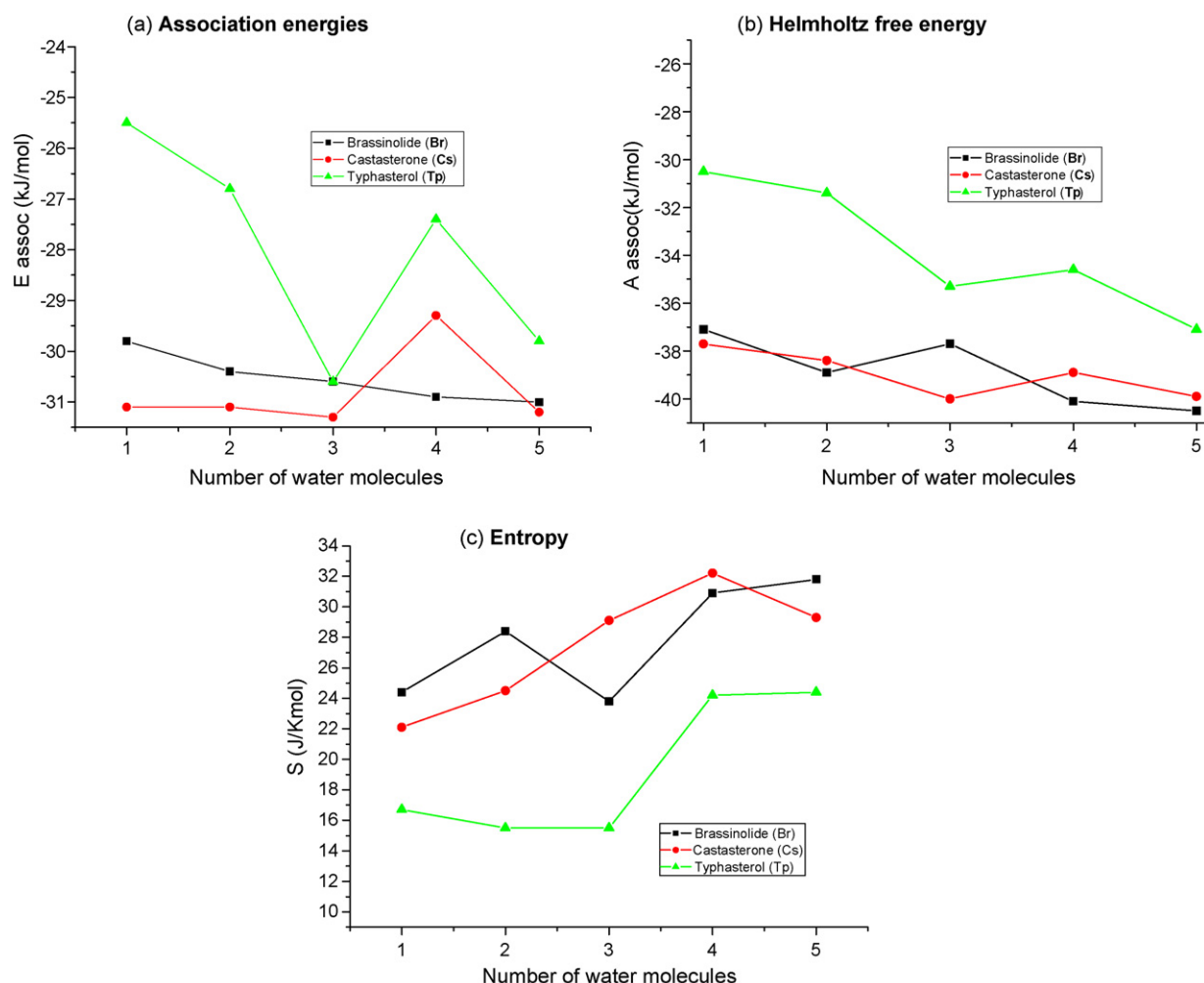
| No. molecules H ₂ O | Brassinolide (Br) | | | Castasterone (Cs) | | | Typhasterol (Tp) | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|------|--------------------|--------------------|------|--------------------|--------------------|------|
| | E^{assoc} | A^{assoc} | S | E^{assoc} | A^{assoc} | S | E^{assoc} | A^{assoc} | S |
| 1 | −29.8 | −37.1 | 24.4 | −31.1 | −37.7 | 22.1 | −25.5 | −30.5 | 16.7 |
| 2 | −30.4 | −38.9 | 28.4 | −31.1 | −38.4 | 24.5 | −26.8 | −31.4 | 15.5 |
| 3 | −30.6 | −37.7 | 23.8 | −31.3 | −40.0 | 29.1 | −30.6 | −35.3 | 15.5 |
| 4 | −30.9 | −40.1 | 30.9 | −29.3 | −38.9 | 32.2 | −27.4 | −34.6 | 24.2 |
| 5 | −31.0 | −40.5 | 31.8 | −31.2 | −39.9 | 29.3 | −29.8 | −37.1 | 24.4 |

molecules. Then in the case of Brassinolide three molecules of water, as microstates in a canonical statistical ensemble, can represent the main perturbation to these properties with respect to the isolated solute molecule. The thermodynamic properties of the three kinds of BRs molecular clusters studied are very similar, but as can be seen from Fig. 2a, the association energies of **Br** and **Cs** behave in a different way to the same property of **Tp**. In Fig. 2b the Helmholtz free energies of association (A^{assoc} , mol) versus the number of water molecules are presented. The presence of two groups can be clearly distinguished. **Br** and **Cs** possess greater absolute A^{assoc} than **Tp**. This is expected and is related to a self-evident molecular similarity principle: the more similar two molecules are, the more similar will be their properties.

The only feature that distinguishes **Br** and **Cs** is the structure of the B-ring (Fig. 1). The fact that the thermodynamic behaviour of

both molecules is very similar also means that the oxalactone group is not so important in the association of these molecules with water. Table 1 also shows that the absolute values of the energies and Helmholtz free energies of association of **Tp** are lower than those of all the other molecules in the study. Typhasterol shows the lowest association for water and forms the least stable complex with it. This is also expected, since this molecule does not contain the diol system in ring A. It is the less hydrophilic, and also possesses the lowest biological activity [1–4,12]. The fact that this molecule shows the lowest association for water could be a strong indication that the diol group in ring A is very important in the association and stabilities of these complexes.

The entropy can be understood as depending on the number of possible minima structures that contributes to the partition function. In this sense, optimized clusters having the same or

**Fig. 2.** Values of association energies of Brs versus the number of solvent molecules.

nearly the same energy and different molecular arrangements are relevant to the ensemble and contribute in a significant way to the entropy [38] and therefore to the probability of such structures to determine the biological activity.

In Fig. 2c the entropies of these systems (S , mol) versus the number of water molecules are presented. As expected the tendency of the entropies is to increase with the number of water molecules, because as the degrees of freedom of the system increase several conformations become possible. In some cases the entropy is higher than in others. For example, in **Br** with $n = 1$ and 2 the entropy is greater than when the solute is surrounded by three water molecules, and the increase in the entropy is derived from the fact that the system shows several different configurations with small differences of energy if compared to the global minimum. The same two groups can also be distinguished here. Fig. 2c shows that **Br** and **Cs** present higher entropies than **Tp**. For the systems **Br** and **Cs**, the water molecules can interact with the diol groups in ring A and lateral chain, the oxalactone ring of **Br** and the carbonyl group of **Cs**. Nevertheless, in the case of **Tp** the entropy is reduced because the diol system of ring A is absent.

Thermodynamic data confirm us that the most similar BRs of those studied here are **Br** and **Cs**. The diol system in ring A appears essential to provide a high association for water while the oxalactone group is not a key functionality in the association of these molecules with water.

The energetic data computed with AM1 must be used with care. Nevertheless one of the values of MMH methodology is the calculation of thermodynamic association properties. The statistics obtained by MMH usually produce reasonable results, probably due to systematic error cancellations [14].

3.1. Topo-geometrical superposition analysis

One of the abilities of the MMH procedures is the selection of the configurations of major stability. Therefore, we can check the preferential positions of interactions between the solvent molecules and the solute, after an accurate exploration of the potential energy surface by a stochastic method [38].

TGSA [19] is an algorithm that only requires the atomic numbers and coordinates of the molecules to be superposed, it considers the molecules as rigid bodies [39]. In these cases the quality of the superposition, evaluated by the Carbó index [40] is quite high. This is in disagreement with our requirements since we need clusters with different configuration and with an important contribution to the partition function. The problem is that as we are applying TGSA [19] to the most important configurations given as a result of the MMH procedure, the solute is the same. Therefore, it is the part of the system that superposes almost entirely and then the only feature that differentiates each configuration from another is the position of the solvent. This explains why Carbó

index values are so high. Then it was necessary to choose a similarity Carbó index threshold, above which the clusters are either the same or almost the same. This value was fixed to 0.9990. Then, if two clusters possess a Carbó index lower than this fixed value, we can consider these two configurations as different.

The relative populations, energies of each configuration and the Carbó similarity index after pairwise superpositions with TGSA99 program [19] of each cluster are summarized in Table 2. In each case the configurations that represent the 50% of all cluster population were selected. This program was only carried out to all systems with one molecule of water because when $n \geq 2$ we could have the possibility of two clusters having at least a solvent molecule in the same place. In this case the similarity would be very high and therefore it would be reasonable that these clusters are almost the same, eliminating by this way useful information for the system in study.

For the dimers of **Br**, 4 configurations were found to contribute 46% to the system (see Table 2). The cluster Br3 was eliminated because the similarity Carbó index of the pair Br2–Br3 is 1. We then keep the cluster Br2 since it possesses a lower energy than the cluster Br3. Although the cluster Br4 possesses the highest energy of the four configurations we cannot eliminate it, because this cluster shows a different zone of interaction, i.e. the oxalactone group.

Then Br1, Br2 and Br4 represent the hydrophilic interactions of water with the molecule of Brassinolide and can be seen in Fig. 3a–c.

For **Cs** with one molecule of water, 4 configurations were found to show similar energies, which represent almost 54% of the whole system population (Table 2). The clusters Cs2 and Cs3 are eliminated because the similarity Carbó index is 1. Cs1 is the minimum-energy cluster and the water molecule interacts with the diol system in ring A. Then, in order to keep non-degenerate and non-redundant information we eliminate the Cs2 and Cs3 clusters since both possess similarity Carbó indexes greater than 0.9990, i.e. 0.9997. From the 100 configurations generated by the MMH procedure only one, representing 0.3% of all cluster population showed the water molecule interacting with the carbonyl group of ring B. Cs1 and Cs4 structures are shown in Fig. 3d and e.

Tp shows two configurations with a total contribution of 52% and with a Carbó index of 0.9980. In this case only two configurations have shown the H_2O molecule interacting with the carbonyl group and with a very low contribution (3%). Tp1 and Tp2 structures are shown in Fig. 3f and g

As a result of the TGSA procedure [19] a total of 7 non-degenerate structures were finally obtained in the case of $n = 1$ for all brassinosteroids studied i.e. 3 for Brassinolide (Br1, Br2, Br4), 2 for Castasterone (Cs1, Cs4) and 2 for Typhasterol (Tp1, Tp2). The similarity degeneracy was completely eliminated from our results.

Table 2

Relative populations of principal minima clusters, energies of the minima and Carbó indexes (C_{AB}) of the BRs studied.

| BRs | Cluster | n/N % | ϵ_i (kJ/mol) | C_{AB} |
|----------------------------|---------|---------|-----------------------|--|
| Brassinolide (Br) | Br1 | 14 | –32.2 | $C_{Br1-Br2} = 0.9973$, $C_{Br1-Br3} = 0.9973$, $C_{Br1-Br4} = 0.9988$ $C_{Br2-Br3} = 1$, $C_{Br2-Br4} = 0.9979$ $C_{Br3-Br4} = 0.9977$ |
| | Br2 | 14 | –32.1 | |
| | Br3 | 12 | –31.8 | |
| | Br4 | 6 | –30.3 | |
| Castasterone (Cs) | Cs1 | 21 | –33.8 | $C_{Cs1-Cs2} = 0.9997$, $C_{Cs1-Cs3} = 0.9997$, $C_{Cs1-Cs4} = 0.9971$ $C_{Cs2-Cs3} = 1$, $C_{Cs2-Cs4} = 0.9979$ $C_{Cs3-Cs4} = 0.9979$ |
| | Cs2 | 13 | –32.6 | |
| | Cs3 | 11 | –32.2 | |
| | Cs4 | 9 | –31.8 | |
| Typhasterol (Tp) | Tp1 | 32 | –27.7 | $C_{Tp1-Tp2} = 0.9980$ |
| | Tp2 | 20 | –26.5 | |

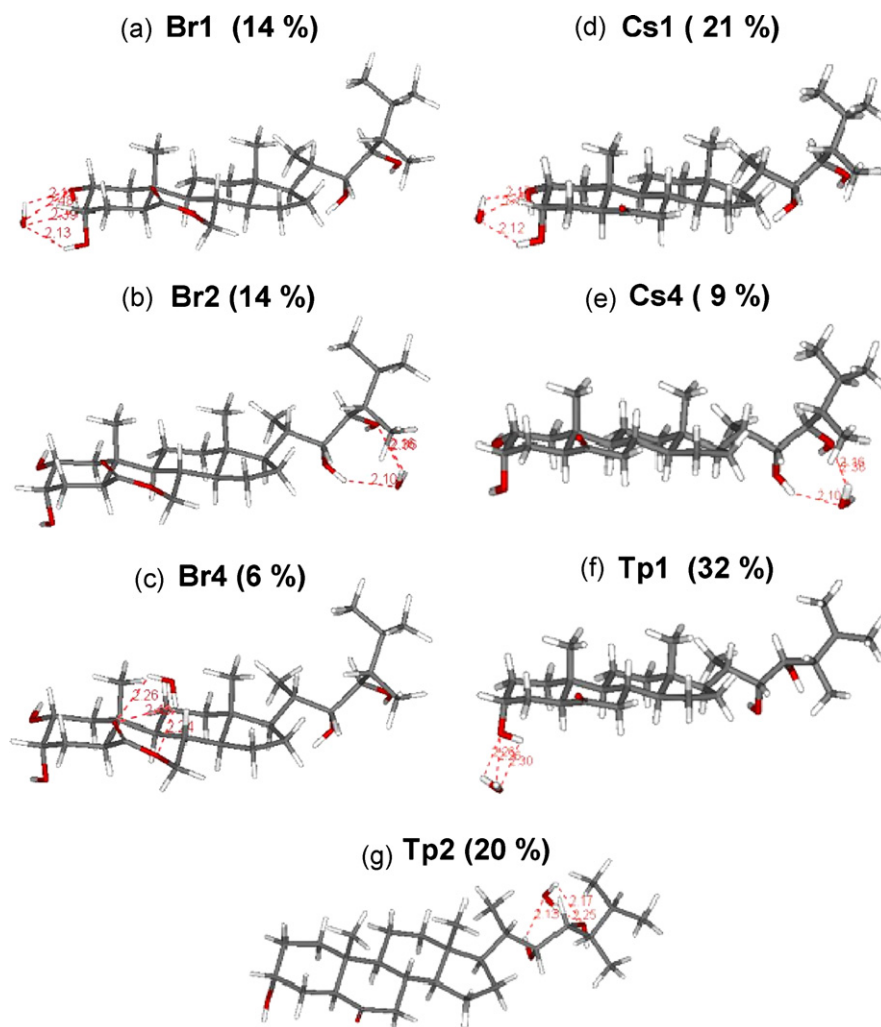


Fig. 3. Most stable clusters obtained by MMH procedure applied to Brassinolide (**Br**), Castasterone (**Cs**) and Typhasterol (**Tp**) and relative population in parenthesis.

Superposition of the most important clusters of Brassinolide, Castasterone and Typhasterol are shown in [Supplementary material](#).

3.2. Interaction between brassinosteroids and one water molecule

In the association of water with the diol group in positions 2 and 3 of ring A (structures Br1, Cs1) the OH in position 2 is reoriented, favouring then the interaction of the hydrogen of the hydroxyl group with the oxygen of the water, $\text{OH} \cdots \text{OH}_2$ (Fig. 3a). The most common interaction of the OH in C₂ produced in these cases is of the type $\text{HO} \cdots \text{H}_2\text{O}$. This interaction is observed in both structures (Fig. 3a and d) and represents the interaction of the oxygen of the hydroxyl group with the two hydrogen atoms of the water molecule. The interaction of the OH group in position 3 is of the type $\text{OH} \cdots \text{OH}_2$.

The cases of Tp1 and Tp2 are different; the OH in 2 is absent (Fig. 3f and g). The OH in 3 has a different orientation that makes possible not only the interaction $\text{OH} \cdots \text{OH}_2$ presented in the structures Br1 and Cs1, Fig. 3a and d, but also the interaction $\text{HO} \cdots \text{H}_2\text{O}$ that can be seen for Tp1 in Fig. 3f. The different orientation of the OH in position 3 in structures Tp1 and Tp2 with respect to Br1, Cs1 and Br2, Cs4 could be due to the lack of the OH in position 2. The presence of intramolecular hydrogen bonds between the OH in the diol group of ring A force the OH in 3 to

be oriented towards the OH in 2. Therefore when the OH in position 2 is not present the OH in 3 can rotate freely and adopt other conformations.

In the association of water with the diol group of the side chain (structures Br2, Cs4 and Tp2) the OH in position 22 seems to be more important in the formation of hydrogen bonds. As can be seen from Fig. 3b, e and g the hydrogen of OH in position 22 is always oriented towards the oxygen atom of the water, contrary to the OH in position 23, where the hydrogen is oriented towards the other face of the molecule. The conformation of the diol system in ring A of structures Br2 and Cs4 remains unaltered since the interaction of the water molecules is with the lateral chain of the molecule (Fig. 3b and e). The hydroxyl group of C₂₂ experienced always the interaction $\text{OH} \cdots \text{OH}_2$, and the OH in C₂₃ the type $\text{HO} \cdots \text{H}_2\text{O}$.

Br4 is the only structure that possesses a water molecule interacting with the polar groups of ring B (Fig. 3c).

3.3. Refinement of geometries

The geometries obtained by the AM1 semiempirical Hamiltonian were further optimized with density functional B3LYP/6-31G calculations. Therefore, the most important configurations obtained for compounds studied in the case of $n=1$ were optimized at this expectedly higher level because B3LYP is one of the most widely used hybrid density functionals in biological

Table 3

B3LYP calculations. Association energies on the CP-uncorrected and corrected PES with 6-31G and 6-31+G* basis set.

| BRs | Cluster | ΔE (kJ/mol) ^a | BSSE (kJ/mol) ^b | ΔE^{CP} (kJ/mol) ^c | ΔE^{CP} (kJ/mol) ^d | ΔE^{CP} (kJ/mol) ^e |
|----------------------------|---------|----------------------------------|----------------------------|--|--|--|
| Brassinolide (Br) | Br1 | −69.65 | 19.66 | −49.99 | −51.46 | −33.01 |
| | Br2 | −67.55 | 23.56 | −44.00 | −45.80 | −33.99 |
| | Br4 | −46.38 | 19.29 | −27.09 | −29.98 | −26.54 |
| Castasterone (Cs) | Cs4 | −67.22 | 23.51 | −43.71 | −45.40 | −33.88 |
| | Cs1 | −64.06 | 20.86 | −43.23 | −44.30 | −33.36 |
| Typhasterol (Tp) | Tp2 | −64.56 | 21.15 | −43.40 | −44.20 | −29.85 |
| | Tp1 | −50.90 | 20.24 | −30.66 | −33.19 | −22.77 |

^a Energy of stabilization as $\Delta E = E_{(\text{BS}-\text{H}_2\text{O})} - E_{(\text{BS})} - E_{(\text{H}_2\text{O})}$ at the B3LYP/6-31G level without BSSE correction.^b BSSE is the total defect of energy originated due to the basis set superposition error at the uncorrected geometry using the B3LYP/6-31G basis set.^c ΔE^{CP} is the CP-corrected interaction energy at the uncorrected geometry using the B3LYP/6-31G basis set.^d ΔE^{CP} is the CP-corrected interaction energy at the CP-corrected geometry using the B3LYP/6-31G basis set.^e ΔE^{CP} is the CP-corrected interaction energy at the B3LYP/6-31+G*/B3LYP/6-31G.

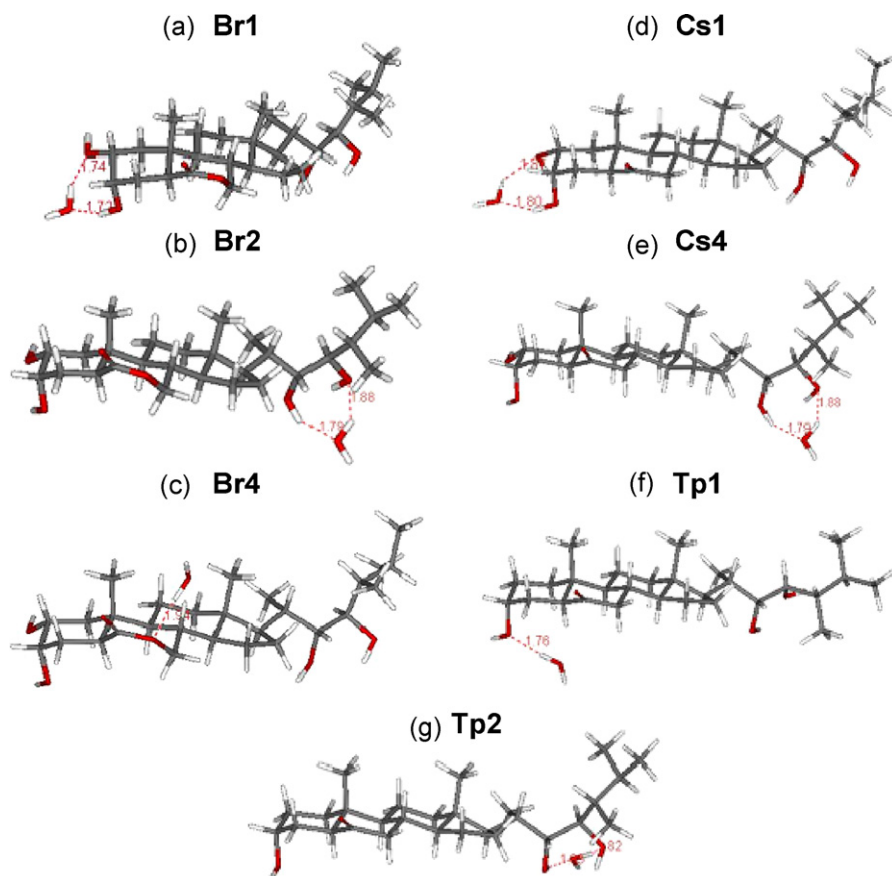
systems [41–43]. The stabilization energies obtained at the DFT level were corrected using the counterpoise procedure (CP) of Boys and Bernardi [44] although there is a tendency to believe that DFT calculations are much less influenced by the Basis Set Superposition Error's (BSSE) worst consequences than correlated ab initio methods [45]. The first step was the complete optimization of the clusters on the CP-uncorrected potential energy surface (PES) with a single point evaluation of BSSE. Then the uncorrected minima obtained were optimized in the CP-corrected PES. Finally a single point evaluation of the energies of the 7 CP-corrected geometries with the 6-31+G* basis set have been performed.

Calculations of interaction energies at the B3LYP/6-31G level have been performed and the results are presented in Table 3. Clearly the CP-optimized geometry (Table 3d) possesses a larger

stabilization than the normally optimized geometry plus the single point CP correction (Table 3c) [46,47].

In some cases the effect of BSSE in intermolecular distances is well known to be critical, mostly when there is a very weak complex [48,49].

The magnitude of BSSE correction at energy minima configuration is about 20–40% of total uncorrected energy of interaction. When calculating interaction energies of molecules that differ quantitatively in size, the BSSE could be very high, as is our case, since the small molecule possess a high BSSE and the larger molecule makes its estimation difficult [50]. Br1 possesses the lowest magnitudes of BSSE. Although the BSSE of these complexes are high and the interaction energies should be corrected for it, the differences between the uncorrected and corrected minima

**Fig. 4.** Brassinolide (**Br**), Castasterone (**Cs**) and Typhasterol (**Tp**) CP-corrected structures.

geometries are very small. For the sake of simplicity uncorrected geometries are not shown in this work.

In order to analyze the effect of BSSE correction on geometries of clusters $\text{BRs} \cdots \text{H}_2\text{O}$ and its differences with semiempirical calculations, the CP-corrected structures are presented in Fig. 4a–g. Moreover these structures were superposed with the 7 clusters obtained by the MMH procedure (Fig. 3a–g) and presented in Supplementary material. As expected in all cases the water molecule is closer to the polar sites of the BRs studied, because an optimization at a higher level was performed to the clusters obtained by MMH. The interaction $\text{HO} \cdots \text{H}_2\text{O}$ has changed in all cases by the type $\text{HO} \cdots \text{HOH}$ as can be seen in Fig. 4a–g. Then the clusters Br1, Cs1 and Tp1, which earlier had shown the first type of interaction, now possess the oxygen of the hydroxyl group interacting with a hydrogen atom of the water molecule (Fig. 4a, d and f).

In Br4 the water molecule is not interacting with the entire oxalactone group (Fig. 3c) but only with the ether function $\text{C}-\text{O} \cdots \text{HOH}$ (Fig. 4c).

The most stable complexes were obtained when the water molecule is interacting with both diol groups (ring A and lateral chain) see Table 3d. These clusters are presented in decreasing order of energy: Br1 and Br2 (Fig. 4a and b), Cs4 and Cs1 (Fig. 4e and d), and Tp2 (Fig. 4g). The diol group in ring A is very important because the interaction energy decreases when is not present in the molecule, that is the case of Tp1 (Fig. 4f). In Tp2 as the water molecule interacts with the diol system of the lateral chain; the interaction energies are very similar to Br2 and Cs4. When the interaction is produced with the oxalactone group in ring B the energy also decreases, that is the case of Br4 (Fig. 4c). This indicates that the interaction of water with the oxalactone group is not favoured.

It is generally believed that diffuse functions are very important for DFT calculations, particularly when studying weak interactions. Then we went over the calculations of the 7 CP-corrected structures with a higher level of theory, the B3LYP/6-31+G*, which possesses diffuse functions that are so important to describe relative energies. We found that the calculated relative energy among the selected Br4 cluster were very similar by either of the two methods: a full optimization at the B3LYP/6-31+G* level or a single point calculation using this level of theory with the B3LYP/6-31G CP-corrected geometry. Hence it appeared that an alternative was desirable. These results also show that the geometries of Br4 cluster are not much different by either method. Therefore, the single point energy calculation at the B3LYP/6-31+G* level using the counterpoise-corrected B3LYP/6-31G geometries seemed to be an expedient choice (B3LYP/6-31+G*/B3LYP/6-31G). As can be seen in Table 3e, the order of stabilities is almost the same: Br4 and Tp1 possess the lowest stabilities meanwhile the clusters where

Table 4

NBO natural atomic charges (a.u.) of the main groups (diol groups of ring A, lateral chain, and oxalactone group in ring B).

| | Brassinolide (Br) | Castasterone (Cs) | Typhasterol (Tp) |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>Ring A</i> | | | |
| OH-2 | O −0.78, H 0.48 | O −0.78, H 0.48 | – |
| OH-3 | O −0.77, H 0.49 | O −0.78, H 0.49 | O −0.77, H 0.47 |
| <i>Ring B</i> | | | |
| O-6 | −0.56 | −0.53 | −0.53 |
| −O− | −0.54 | – | – |
| <i>Lateral chain</i> | | | |
| O-22 | O −0.78, H 0.48 | O −0.78, H 0.48 | O −0.78, H 0.48 |
| O-23 | O −0.78, H 0.49 | O −0.78, H 0.49 | O −0.78, H 0.49 |

the water molecule interaction is produced with the diol groups of BRs shows the greatest stabilities (Br2, Cs4, Cs1 and Br1).

Since **Br** present more polar sites than the other BRs it is expected that this compound exhibit a higher association for water. Previous results have shown that almost no water molecules interact with the ring B, unless the oxalactone ring is present (**Br**). To explain this fact a Natural Bond Orbital (NBO) [51,52] analysis of population has been performed with the B3LYP method and the natural atomic charges are presented in Table 4. This analysis allows us to differentiate the regions of the molecule that possess an accumulation of charges from the zones with low charge density in a quantitative way. As can be seen in Table 4 the zones with higher charge density are the oxygen atoms corresponding to the hydroxyl groups that form the diol groups of ring A and the lateral chain, and therefore the hydrogen atoms of these hydroxyl groups possess higher positive charges. The oxygen atoms that correspond to the lactone group possess a smaller charge. This could be the reason why the water molecule will tend preferentially to associate with the diol groups of ring A and the lateral chain. In the cases when the oxalactone functionality is not present (**Cs** and **Tp**) the probability to found association by the carbonyl group is even lower, since the charge density of this zone has decreased.

3.4. Polarizable continuum model

In Table 5 the total Gibbs free energies of solvation of the solutes (Brassinolide, Castasterone, Typhasterol) and complexes (7 cluster uncorrected structures) at the 6-31G and 6-31+G* levels are shown. Both theoretical levels agree that **Br**, followed by **Cs**, appears the best solvation. We have tried to calculate the effect of solvation on the interaction energies. However, it is known that PCM has its obvious limitations associated with the need to constrain an arbitrarily shaped solute to an artificial cavity, and

Table 5

Computed solvation free energies of the solute and complexes.

| Solute | ΔG_{solute} (kJ/mol) ^a | ΔG_{solute} (kJ/mol) ^b | Complexes | $\Delta G_{\text{complex}}$ (kJ/mol) ^c | $\Delta G_{\text{complex}}$ (kJ/mol) ^d |
|-----------|--|--|-----------|---|---|
| Br | −18.49 | −39.66 | Br1 | −24.94 | −23.14 |
| | | | Br4 | −13.68 | −14.27 |
| | | | Br2 | −12.47 | −12.80 |
| Cs | −6.86 | −28.17 | Cs1 | −5.15 | −7.11 |
| | | | Cs4 | −1.42 | −4.30 |
| Tp | 9.96 | −9.89 | Tp1 | 3.31 | −3.49 |
| | | | Tp2 | 16.61 | 2.44 |

^a Total Gibbs free energies of solvation of the solutes at the B3LYP/6-31G level.

^b Total Gibbs free energies of solvation of the solutes at the B3LYP/6-31+G* level.

^c Total Gibbs free energies of solvation of the uncorrected clusters at the B3LYP/6-31G level.

^d Total Gibbs free energies of solvation of the uncorrected clusters at the B3LYP/6-31+G* level.

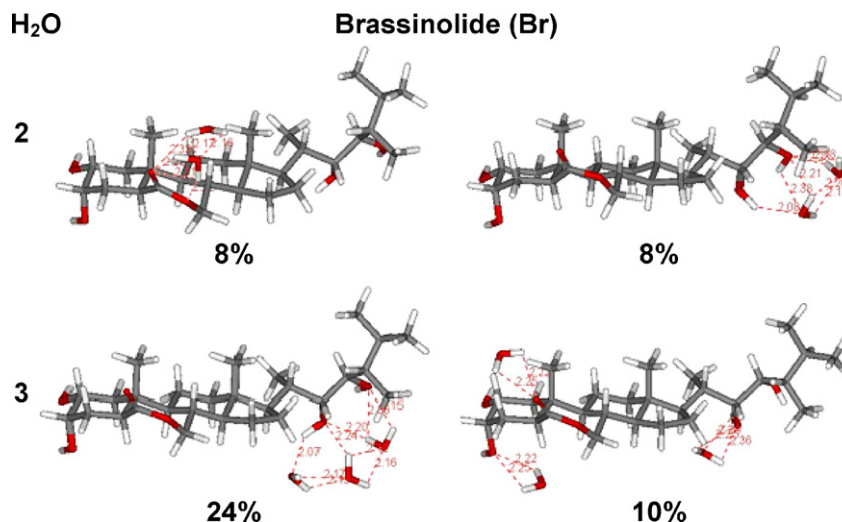


Fig. 5. Preferential positions of interactions between Brassinolide (**Br**) and 2 or 3 water molecules and relative populations.

these molecules possess a large area to be acceptably covered by the spheres described in the PCM method. Nevertheless, the two levels of calculation correctly described the order of association for water.

3.5. Interaction of brassinosteroids with $n = 2$ to 5 water molecules

The significant minima obtained for Brassinolide, Castasterone and Typhasterol surrounded by 2–5 water molecules are shown in Figs. 5–7 and in [Supplementary material](#). The global minimum obtained in these cases corresponds to configurations where the water is forming solvent clusters.

When the MMH procedure is applied to **Br** with $n = 3$, the cluster which contributes 10% to the partition function of this system confirms the main three hydrophilic sites of association of this molecule with water (see Fig. 5), found earlier with $n = 1$ and presented in Fig. 3a–c. When $n = 4$ and 5 the minimum-energy configuration possesses the n molecules interacting with the oxalactone functionality and the diol group of the lateral chain respectively. The other two configurations contribute 5% and possess the n water molecules interacting with the different polar sites of the molecule. In these cases ($n = 4$ and 5) the entropy is very high since the possibilities of different arrangements of water

molecules around the solute increases, see [Table 1](#). Even in the case where $n = 5$ all the water molecules interact with the solute as well as among them (see [Supplementary material](#)).

The interaction of **Cs** with water shows a similar behaviour to that of **Br**. This is an expected result since these molecules are very similar. In this case the water molecules interact preferentially with both diol systems (ring A, and lateral chain) as oxalactone function has changed by a carbonyl group (see Fig. 6). In spite of the differences found when $n = 1$ the clusters with $n = 3, 4$ and 5 exhibit the interaction $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ with an important contribution to the partition function. When the system possesses more than two water molecules the diol groups are not available because they are already interacting with water. Then when $n = 3, 4$ and 5 the solvent has two possibilities, either interacts first with the oxalactone group (available site) or associates directly with the water already present. Once again it is demonstrated that the preferable sites of association are the diol groups presented in these structures. The fact that diol groups are very important could also be related with the different conformations that may adopt the lateral chain and the availability that confers to this particular group (diol).

In **Tp** the lack of OH in C_2 facilitates the association of the OH in C_3 and carbonyl group (ring B) through hydrogen bonds formed by

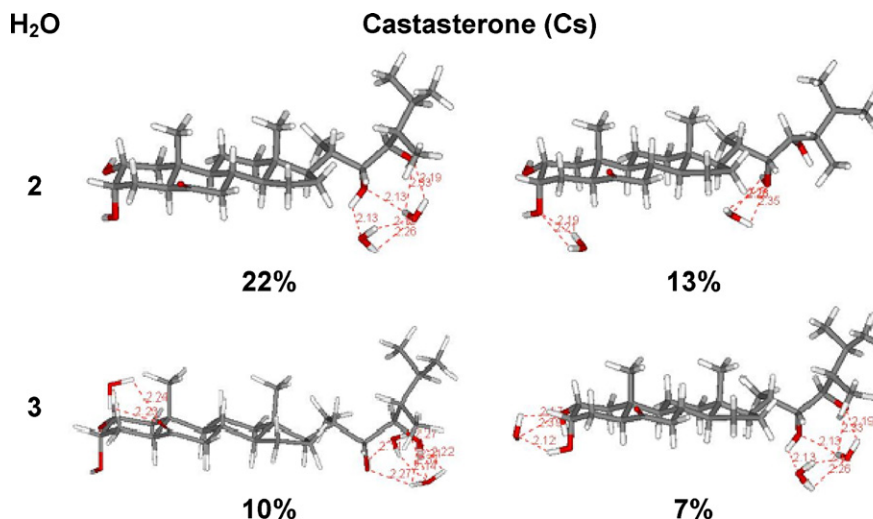


Fig. 6. Preferential positions of interactions between Castasterone (**Cs**) and 2 or 3 water molecules and relative populations.

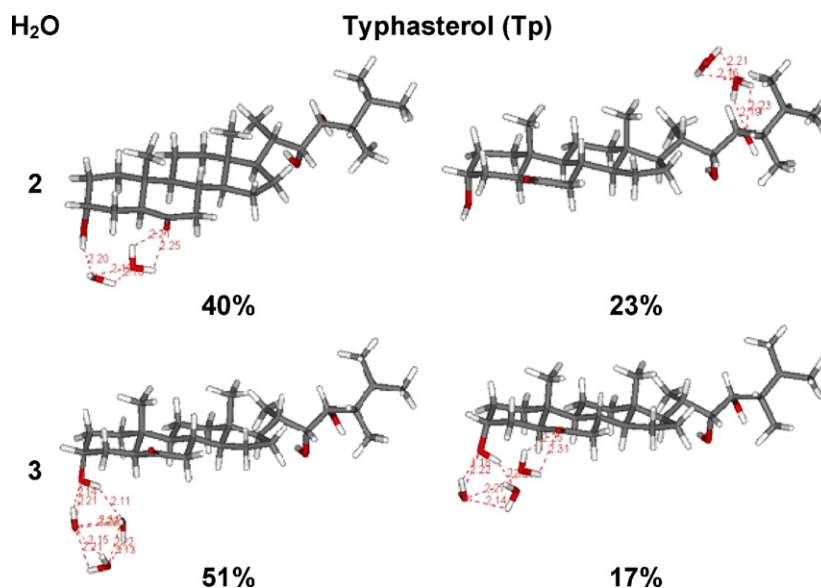


Fig. 7. Preferential positions of interactions between Typhasterol (Tp) and 2 or 3 water molecules and relative populations.

the molecules of water. This trend is only observed in the case of **Tp**. This behaviour is found for $n = 2, 3$ (see Fig. 7) and in the case of $n = 5$.

When $n = 2$ and 4 the water molecules do not interact with the entire diol group of the lateral chain, but specifically with the –OH in C₂₃. These clusters where the interaction is through –OH in C₂₃ possess the greatest contribution to the partition function. Nevertheless, the MMH method has well explored all the possible configurations since it has also generated clusters with water molecules interacting with –OH in C₂₂ but with a low contribution to the partition function.

3.6. Supporting material

- Superposition of the most important clusters of Brassinolide, Castasterone and Typhasterol are shown in Figs. 1S, 2S and 3S.
- Superposition of the CP-corrected structures of Brasinolide, Castasterone and Typhasterol with the clusters optimized by the AM1 semiempirical method can be found in Figs. 4S, 5S and 6S.
- Clusters with $n = 4$ and 5 of BRs studied can be found in Figs. 7S, 8S and 9S.

4. Conclusions

A theoretical model for understanding the interaction between brassinosteroids and water molecules has been built. These are the main conclusions of this study:

- The MMH method allows us to explore the hydrophilic interaction sites of these molecules using the AM1 semiempirical Hamiltonian.
- All analyzed theoretical complexes of association between water and BRs are thermodynamically stable, and thermodynamic properties of Brassinolide and Castasterone are very similar, due to the structure similarity.
- The positive values of association entropies are related to several stable complexes obtained and also to the presence of different sites of association of these compounds for water.
- Calculations performed show that the association of brassinosteroids with water preferentially occurs by the hydroxyl groups of these molecules. These sites are (diol ring A and lateral chain)

the most active positions of brassinosteroids for hydrophilic interactions.

- The interaction energies of the complexes brassinosteroids–water calculated at the DFT/B3LYP/6-31G and 6-31+G* levels follow the same behaviour as the biological activities of the three molecules studied.
- The magnitude of BSSE of the complexes is large but it does not change significantly the geometries.
- PCM calculations at the B3LYP/6-31G and 6-31+G* levels correctly describe the order of association for water of the brassinosteroids studied.

Acknowledgements

The authors are indebted to the financial support of the Universidad de la Habana, Cuba and the Universidad Autónoma de Madrid. We also want to acknowledge Ramón Carbó-Dorca for the program TGSA99 and the support and Rachel Crespo-Otero for her helpful discussions. RGJ and JMGV gratefully acknowledge financial support from MEC, Spain (Project: CTQ2007-63332).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmngm.2008.09.013.

References

- [1] A. Bajguz, A. Tretyn, The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants, *Phytochemistry* 62 (2003) 1027–1046.
- [2] G.M. Symons, J.J. Ross, C.E. Jager, J.B. Reid, Brassinosteroid transport, *J. Exp. Bot.* 59 (2007) 1–8.
- [3] S. Seeta Ram Rao, B. Vidya Vardhini, E. Sujatha, S. Anuradha, Brassinosteroids: a new class of phytohormones, *Curr. Sci. Indian.* 82 (2002) 1239–1245.
- [4] M.A. Zullo, G. Adam, Brassinosteroid phytohormones—structure, bioactivity and applications, *Braz. J. Plant Physiol.* 14 (2002) 143–181.
- [5] M. Sisa, M. Vilaplana-Polo, C. Ballesteros, L. Kohout, Brassinolide activities of 2 α ,3 α -diols versus 3 α ,4 α -diols in the bean second internode bioassay: explanation by molecular modeling methods, *Steroids* 72 (2007) 740–750.
- [6] T. Yokota, S. Koba, S.K. Kim, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Sakakibara, K. Okada, K. Mori, N. Takahashi, Diverse structural variations of the brassinosteroids in *Phaseolus vulgaris* seed, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 1625–1631.
- [7] S. Fujioka, A. Sakurai, Brassinosteroids, *Nat. Prod. Rep.* 14 (1997) 1–10.

- [8] G. Akhila, K. Rani, G. Adam, J. Schmidt, B. Schneider, in: W. Herz, H. Falk (Eds.), *Progress in the Chemistry of Natural Products*, Springer, New York, 1999, pp. 1–36, Chapter Brassinosteroids.
- [9] J.M. Sasse, Physiological actions of brassinosteroids: an update, *J. Plant Growth Regul.* 22 (2003) 276–288.
- [10] C. Brosa, I. Zamora, E. Terricabras, L. Kohout, The effect of electrostatic properties and ability to form hydrogen-bonds on the activity of brassinosteroid side-chain analogs, *Collect. Czech Chem. Commun.* 63 (1998) 635–1645.
- [11] T.W. Kim, S.Ch. Chang, J.S. Lee, S. Takatsuto, T. Yokota, S.K. Kim, Novel biosynthetic pathway of Castasterone from cholesterol in tomato, *Plant Physiol.* 135 (2004) 1231–1242.
- [12] T. Yokota, The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 137–142.
- [13] L.A. Montero, A.M. Esteve, J. Molina, A. Zapardiel, L. Hernández, H. Márquez, A. Acosta, A theoretical approach to analytical properties of 2,4-diamino-5-phenylthiazole in water solution: Tautomerism and dependence on pH, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 12023–12033.
- [14] L.A. Montero, J. Molina, J. Fabian, Multiple minima hypersurfaces of water clusters for calculations of association energy, *Int. J. Quantum Chem.* 79 (2000) 8–16.
- [15] E. Codorniú, A. Mesa, L.A. Montero, F. Martínez, T. Borrmann, W.D. Stohrer, Theoretical study of flavonoids and proline interactions: aqueous and gas phases, *J. Mol. Struct. (Theochem.)* 623 (2002) 63–73.
- [16] Available by request: <<http://karin.qct.fq.oc.uh.cu/mmh/>>.
- [17] L. George, E. Sanchez, W. Sander, Matrix isolation infrared and ab initio study of formic acid–acetylene interaction: example of H... π and C–H...O interaction, *J. Phys. Chem. A* 107 (2004) 6850–6858.
- [18] E. Sanchez, L. George, L.A. Montero, W. Sander, 1:2 formic acid/acetylene complexes: ab initio and matrix isolation studies of weakly interacting systems, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 11846–11854.
- [19] X. Gironés, D. Robert, R. Carbó, TGS: a molecular superposition program based on topo-geometrical-considerations, *J. Comp. Chem.* 22 (2001) 255–263.
- [20] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction, *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 2155–2160.
- [21] J. Tomasi, M. Persico, Molecular interactions in solution: an overview of methods based on continuous distributions of the solvent, *Chem. Rev.* 94 (1994) 2027–2094.
- [22] M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution, *J. Chem. Phys.* 117 (2002) 43–54.
- [23] E. Codorniú, A. Mesa, R. Hernández, L.A. Montero, F. Martínez, J.L. Santana, T. Borrmann, W.D. Stohrer, Essential amino acids interacting with flavonoids: a theoretical approach, *Int. J. Quantum Chem.* 103 (2005) 83–104.
- [24] J.A. Padrón, R. Crespo, E.W. Hernández, P. Garriga, L.A. Montero, J.C. García, Patterns of retinal light absorption related to retinitis pigmentosa mutants from in silico model structures of Rhodopsin, *Proteins* 57 (2004) 392–399.
- [25] P. Schönfeld, J. Fabian, L.A. Montero, A combined experimental and quantum chemical study of the putative protonophoric activity of thiocyanate, *J. Biophys.* 89 (2005) 1–12.
- [26] J.L. Gu, Coronado, E. Martín, L.A. Montero, J.L.G. Fierro, J.M. García de la Vega, Effects of the 3- and 4-methoxy and acetamide substituents and solvent environment on the electronic properties of N-substituted 1,8-naphthalimide derivatives, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 9724–9732.
- [27] L.A. Montero, Y. Perez, M.J. Mora, An approach to hydration of model silica materials by exploring their multiple minima hypersurfaces: the role of entropy of association, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 2880–2887.
- [28] C. Morera, E. Alonso, L.A. Montero, R. González, Validation of performances of some semiempirical Hamiltonians for predicting molecular structure calculation of natural brassinosteroids: towards understanding their biological activity by electron exchange effects, *J. Mol. Struct. (Theochem.)* 819 (2007) 109–120.
- [29] N. Ferro, R. González, D. Carnesolts, J.R. Alvarez, M. Iglesias, F. Coll, Estudio y Caracterización de Brasinosteroides y sus análogos mediante métodos químico cuántico computacionales y bioestáticos, *FCTL XXVII* (1999) 105–118.
- [30] R. Crespo, Y. Pérez, J.A. Padrón, L.A. Montero, Exploring the potential energy surfaces of association of NO with amino acids and related organic functional groups: the role of entropy of association, *Theor. Chem. Account.* 118 (2007) 649–663.
- [31] MOPAC, v. 6.0, J. J. P. Stewart. The 6J version with Jorgensen modified Hamiltonians was released in our laboratory for PC computers under both Windows and Linux operating systems, Universidad de la Habana, 2004, 1993.
- [32] S. Droschin, A. Porzel, W. Brandt, Determination of preferred conformations of brassinosteroids by means of NMR investigations and Boltzmann statistical analysis of simulated annealing calculations, *J. Mol. Model.* 7 (2001) 34–41.
- [33] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery, R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, Gaussian 03, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1999.
- [34] V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi, A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model, *J. Chem. Phys.* 107 (1997) 3210–3221.
- [35] T. Brown, N. Mora-Diez, Computational determination of aqueous pKa values of protonated benzimidazoles, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 20546–20554.
- [36] C. Brosa, I. Zamora, E. Terricabras, L. Soca, R. Peracaula, C. Rodríguez, Synthesis and molecular modeling: related approaches to progress in brassinosteroid research, *Lipids* 32 (1997) 1341–1347.
- [37] E. Codorniú, A. Mesa, L.A. Montero, F. Martínez, W.D. Stohrer, MO-calculations on the solvation effects on the structure of natural flavonoids in aqueous and acetona phases, *J. Mol. Struct. (Theochem.)* 715 (2005) 227–239.
- [38] E. Sánchez, Computational study of weakly interacting complexes. Dissertation for the degree of Doktor der Naturwissenschaften, Ruhr- Universität Bochum, 2006.
- [39] X. Gironés, R. Carbó, Molecular quantum similarity-based QSARs for binding affinities of several steroids sets, *J. Chem. Inf. Sci.* 42 (2002) 1185–1193.
- [40] R. Carbó, J. Arnau, L. Leyda, How similar is a molecule to another? An electron density measure of similarity between two molecular structures, *Int. J. Quantum Chem.* 17 (1980) 1185–1189.
- [41] S.F. Sousa, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, General performance of density functionals, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 10439–10452.
- [42] D.J. Becke, Density-functional thermochemistry. I. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [43] P.E.M. Siegbahn, M.R.A. Blomberg, Transition-metal systems in biochemistry studied by high-accuracy quantum chemical, *Methods Chem. Rev.* 100 (2000) 421–437.
- [44] S.F. Boys, F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies: some procedures with reduced errors, *Mol. Phys.* 9 (1970) 553–566.
- [45] W. Koch, M.C.A. Holthausen, *Chemist Guide to Density Functional Theory*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2001 (Chapter 12).
- [46] S. Simón, M. Durán, How does superposition error change the potential surfaces for hydrogen-bonded dimers? *J. Chem. Phys.* 105 (1996) 11024–11031.
- [47] P. Salvador, M. Durán, C–H...OH-bonded complexes: How does basis set superposition error change their potential-energy surfaces? *J. Chem. Phys.* 113 (2000) 5666–5674.
- [48] P. Salvador, M. Durán, The effect of counterpoise correction and relaxation energy term to internal rotation barriers: application to the BF₃...NH₃ and C₂H₄...SO₂ dimers, *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 4460–4465.
- [49] P. Salvador, M. Durán, J.J. Dannenberg, Counterpoise-corrected ion–molecule complexes using two or three fragments, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 6883–6889.
- [50] A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy, A new approach to counterpoise correction to BSSE, *J. Comp. Chem.* 27 (2006) 1203–1210.
- [51] J.P. Foster, F. Weinhold, Natural hybrid orbitals, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1988) 7211–7218.
- [52] A.E. Reed, L.A. Curtiss, F. Weinhold, Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor–acceptor viewpoint, *Chem. Rev.* 88 (1988) 899–926.



Interaction of brassinolide with essential amino acid residues: A theoretical approach

Cercis Morera-Boado^{a,b}, Nelaine Mora-Diez^{b,c}, Luis A. Montero-Cabrera^a, Esther Alonso-Becerra^a, Raul H. González-Jonte^b, Jose M. García de la Vega^{b,*}

^a Laboratorio de Química Computacional y Teórica, Facultad de Química, Universidad de la Habana, 10400 Habana, Cuba

^b Departamento de Química Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^c Department of Chemistry, Thompson Rivers University, Kamloops, BC, V2C 5N3, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2009

Received in revised form 16 December 2009

Accepted 17 December 2009

Available online 4 January 2010

Keywords:

Brassinosteroids

Brassinolide

Amino acids

Biological activity

Density functional theory

ABSTRACT

The interaction of the most active natural brassinosteroid, brassinolide, with the twenty natural amino acids is studied applying the multiple minima hypersurface method to model the molecular interactions explicitly. The resulting thermodynamic data gives useful information about the amino acids with the greatest association for brassinolide and the stabilities of such complexes. Density functional theory (DFT) optimizations were further carried out to test the performance of semiempirical calculations. Additional calculations with a more accurate DFT method were performed to explore the formation of this type of molecular complexes. The semiempirical geometries and stability order of these complexes are in good agreement with the DFT calculations. Each group of amino acids possesses a preferential zone of interaction with brassinolide, forming the polar-charged amino acids the most stable complexes. This study could contribute to future investigations of the interaction of brassinosteroids with the receptor protein in plants.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Brassinosteroids (BR) are a group of plant-originated steroidal lactones that promote growth [1]. These molecules are important plant regulators in multiple developmental processes at nanomolar and micromolar concentrations, including cell division, cell elongation, vascular differentiation, reproductive development and modulation of gene expression [2]. They are found at low concentrations throughout the plant kingdom and are widely distributed in both reproductive and vegetative tissues [3,4].

To date, 61 naturally occurring BR have been discovered [3]. Natural brassinosteroids identified so far have a common 5 α -cholestan skeleton and their structural variations come from the kind and orientation of the oxygenated functions in rings A and B. These modifications are produced by oxidation and reduction reactions during biosynthesis. All hitherto known native BR

possess a 22R,23R diol structural feature in the side chain moiety which is essential for high biological activity [5].

Brassinolide (Br) [(22R,23R,24S)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-homo-7-oxa-5 α -cholestan-6-one] (see Fig. 1) is the most active brassinosteroid [6]. It has 2 α ,3 α -vicinal hydroxyl groups at the A-ring (Region 1). Moreover, the lateral chain exhibits another diol group with R configuration at C₂₂/C₂₃ (Region 2) and 24S methyl substitution. A lactone group in C₆/C₇ (Region 3) is also important for the biological activity of Br.

BR biosynthesis is produced in the endoplasmic reticulum but its recognition occurs outside the cell. Therefore, these phytohormones must move from the inside to the outside of the cell where they are recognized by either the same cell or neighbouring ones [4]. The investigation of BR signalling, which has become a pressing research priority in recent years [7], is related to the study of BR biosynthesis. In plants, BRI1 (brassinosteroid receptor insensitive 1), which is a leucine rich repeat (LRR) receptor kinase localized in the plasma membrane, is a critical component of a receptor complex for BR. The BRI1 gene encodes a receptor serine/threonine kinase with an extracellular domain containing 25 LRR. This domain is interrupted by a 70-amino-acid island domain (ID) located between the 21 and 22 LRR [8]. The analysis of Br binding to BRI1 has provided further pieces of evidence indicating that the extracellular domain of BRI1 recognizes Br. It has also been shown

* Corresponding author.

E-mail addresses: cercis@fq.uh.cu (C. Morera-Boado), nmora@tru.ca (N. Mora-Diez), lmc@fq.uh.cu (L.A. Montero-Cabrera), esther@fq.uh.cu (E. Alonso-Becerra), raul.gonzalezjonte@uam.es (R.H. González-Jonte), garcia.delavega@uam.es (J.M.G. de la Vega).

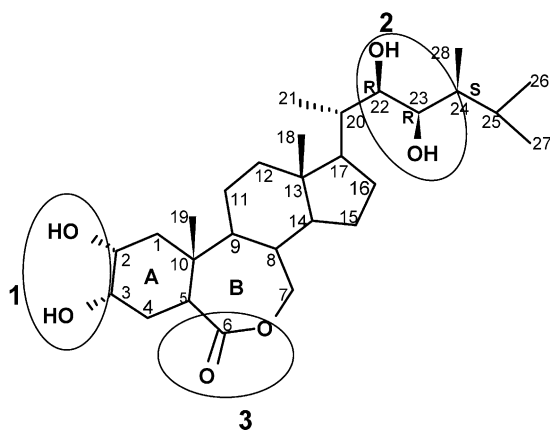


Fig. 1. Structure of brassinolide indicating specific zones of hydrophilic interaction.

that Br-binding activity ceases when the 70-amino acid ID is mutated. In contrast, mutations on the kinase domain of BRI1 have no effects on Br binding. These observations strongly indicate that the 70-amino-acid ID in the extracellular domain of BRI1 is able to detect BR [9]. Despite significant progress in understanding the molecular and cellular effects of BR, key issues about their biological activity and mode of action remain unknown [7]. Since the 3D structure of the brassinolide receptor is not accurately known, the Br docking into the binding site is speculative and indirect methods must be used [10,11]. Knowledge of the interaction of BR with amino acids is undoubtedly essential to understand how the binding of these phytohormones with the BRI1 receptor in plants occurs.

This work deals with the study of the interaction of Br with the essential amino acids as an important step in understanding how the interaction of these phytohormones with the BRI1 receptor protein occurs. This work approaches the Br–amino acid interaction independent of the different cavities where they could be located in the interaction with BRI1.

2. Methodology

In order to explore the conformational space in the interaction of Br with the twenty naturally selected amino acids, the *multiple minima hypersurfaces* (MMH) procedure is applied [12–17]. MMH has been successfully employed in the study of several systems [14,18–24]. This methodology is used to explore the energy hypersurface and subsequently find stationary points of minimum energy which significantly contribute to the thermodynamic properties of the system. This procedure combines quantum mechanical methods for energy calculations with statistical mechanics to obtain thermodynamic quantities related to the molecular association process.

To simulate the electronic density of amino acids in proteins a model system shown in Fig. 2 is used, with R being the lateral chain that determines a given amino acid (aa). In this model, peptide bonds are simulated with methylamine (NHCH₃) and acetyl groups

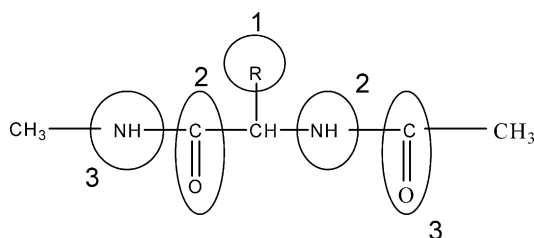


Fig. 2. Example of a blocked amino acid indicating specific zones of interaction.

(COCH₃). To analyze the results, amino acids are classified into five groups according to polarity and the character of the R moiety: non-polar aliphatic, non-polar aromatic, sulphur, polar-uncharged and polar-charged amino acids. Three areas of possible interactions have been indicated in Fig. 2.

It has been previously shown by our group that the AM1 semiempirical method [25] effectively reproduces the geometry of natural brassinosteroids and some analogues [24,26]. After having optimized the structure of Br and the 20 amino acids with the AM1 method, a set of 50 random complexes of Br and each aa were generated using the GRANADA program [15], and later optimized with the AM1 method as implemented in the MOPAC v. 6.0 program [27]. The eigenvector following routine for searching minima was used and all convergence thresholds were increased 100 times with respect to the default values. The MMOK option for optimizing the peptidic bonds by means of a local molecular mechanic term was also used because it is better suited to reproduce the planar geometry of the peptidic bond and the experimental values of the rotational barriers [28]. The partition function for each Br–aa system is calculated from the electronic energies of the 50 optimized complexes taking as the reference state the isolated molecules (Br and a given aa). Any thermodynamic property of the association process (Br + aa → Br–aa), e.g., the association energy (ΔE^{assoc}) and Gibbs free energy (ΔG^{assoc}), can be calculated from the partition function of the system [12–14].

The MMH procedure was used to determine the amino acids with the highest absolute association energy for Br. Additional complexes between Br and each of these amino acids were created. AM1 optimizations and frequency calculations were carried out to ensure that all the relevant regions of interaction between Br and the amino acids were explored.

B3LYP is one of the most widely used density functionals in biological systems and still remains a valid and particularly efficient alternative for the “average” quantum chemistry problems [29]. Therefore B3LYP/6-31G geometry optimizations and frequency calculations were performed. There are, however, still some problems with most common density functionals, and is the description of non-bonded interactions in which dispersion plays an important role [29]. The M05-2X density functional [30] has been proved to successfully describe non-covalent interactions for biological systems and is used in this work to test the performance of B3LYP and semiempirical calculations. Then single-point energy calculations using B3LYP and M05-2X density functionals at the 6-311 + G(d) level of theory were further carried out on the B3LYP geometries. These calculations were performed with the Gaussian 03 package [31].

The nomenclature used to identify the complexes is Br(*u*; *v*)–aa(*x*; *y*), where *u* and *v* are the Br regions interacting with regions *x* and *y* of the given aa. For example, Br(1)–GLU(1) identifies the complex in which region 1 of Br (see Fig. 1) interacts with region 1 (the lateral chain) of glutamic acid (GLU) (see Fig. 2). When a chemical group is specified, the interaction occurs with such a group: e.g., Br(1)OH₂–GLU(1) identifies the complex in which the OH group in position 2 (region 1) of Br interacts with region 1 of GLU.

3. Results and discussion

The hypersurface of the Br–aa complexes was initially explored following the MMH procedure. Examples of AM1 structures of these complexes along with their relative populations are shown in Figs. 3 and S1–S5 of the Electronic Supplementary Material. Table 1 shows the calculated association energy (ΔE^{assoc}) and Gibbs free energy (ΔG^{assoc}) of Br with each aa. The MMH procedure leads to the following Br–aa affinity order: GLU > ASP > ARG > LYS > HIS

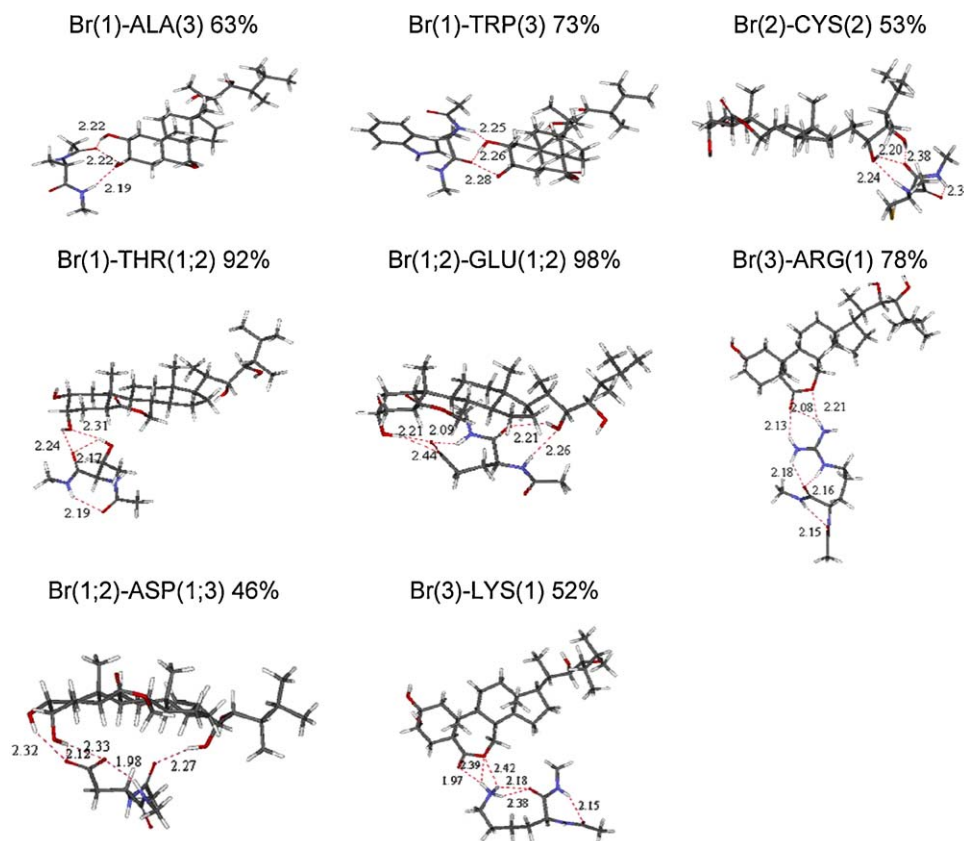


Fig. 3. AM1 structures and relative populations of the most stable complexes of brassinolide (Br) with the different types of amino acids obtained by applying the MMH methodology.

> THR > ALA > VAL > SER > ILE > GLN > LEU > GLY > TRP > PHE > CYS > ASN > MET > PRO > TYR. Recently, the receptor of ecdysteroids, an animal steroid hormone that shows structural similarities with BR has been isolated, and some of the amino acids

Table 1

Calculated ΔE^{assoc} and ΔG^{assoc} (kcal/mol at 298.15 K) of the brassinolide complexes with the twenty natural amino acid residues obtained at the AM1 level applying the MMH methodology.

| Amino acids | ΔE^{assoc} | ΔG^{assoc} |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| Aliphatic | | |
| GLY | −9.27 | −10.96 |
| ALA | −11.34 | −12.42 |
| ILE | −10.95 | −11.85 |
| LEU | −10.08 | −11.06 |
| VAL | −11.31 | −12.23 |
| PRO | −6.99 | −8.45 |
| Aromatic | | |
| PHE | −8.89 | −10.02 |
| TRP | −8.91 | −10.12 |
| TYR | −6.74 | −8.79 |
| Sulphur | | |
| CYS | −8.77 | −9.98 |
| MET | −7.77 | −9.01 |
| Polar uncharged | | |
| SER | −11.26 | −12.63 |
| ASN | −8.73 | −10.60 |
| GLN | −10.29 | −11.33 |
| THR | −12.91 | −13.71 |
| Polar charged | | |
| GLU | −37.22 | −37.87 |
| ASP | −32.09 | −33.32 |
| ARG | −29.51 | −30.82 |
| LYS | −22.07 | −23.62 |
| HIS | −18.91 | −20.43 |

implicated in the binding pocket agree with the highest associated amino acid residues obtained (e.g., GLU, ARG, THR, and ALA) [32].

In the group of aliphatic non-polar amino acids, Br-ALA and Br-VAL are the complexes with the greatest association. With the exception of the Br-PRO complex, all the complexes with this group of amino acids possess similar ΔE^{assoc} and ΔG^{assoc} values. The lateral chain of these amino acids is non-polar, therefore, as expected, the strongest interactions with the hydrophilic regions of Br occur mainly through the backbone (zones 2 or 3, see Fig. 2) of these amino acids; see, for example, Br(1)-ALA(3) (63%), Br(2)-VAL(2) (88%), Br(1)-ILE(2) (89%), Br(1)-LEU(3) (85%), and Br(1)-PRO(2) (54%) (Figs. 3 and 1S). In the complex with the highest relative population between Br and ALA, Br(1)-ALA(3) (see Fig. 3), the diol group of ring A of Br interacts with the simulated backbone of ALA. The complex Br(2)-VAL(2) (see Fig. S1) is also very stable, which indicates that the interaction with the diol group of the lateral chain of Br is also favoured. Complexes with an important contribution to the partition function in which the interaction is produced between the oxalactone group of Br and the backbone of the amino acid were only obtained in the cases of GLY and ALA (e.g., Br(3)-GLY(2) and Br(3)-ALA(2), see Fig. S1). This type of interaction cannot take place when the length of the aliphatic lateral chain increases due to steric hindrance with the methyl group in C₁₈.

Br complexes with aromatic amino acids possess lower absolute ΔE^{assoc} and ΔG^{assoc} values than those obtained for the complexes with aliphatic amino acids. TRP and PHE show the highest association for Br. The interaction occurs preferentially between the diol groups of ring A and the lateral chain of Br and the backbone of these amino acids. An example of this is the Br-TRP complex with the highest relative population (Br(1)-TRP(3), 73%, see Fig. 3), and the complexes Br(1)-PHE(3) (76%) and Br(2)-PHE(2) (12%) (see Fig. S2). The complex Br(3)-TRP(1) has a low contribution to the partition function (0.7%), which indicates that

the interaction with the lateral chain of TRP is not favoured. The complexes with TYR – the least stable of this group – with the highest relative populations, Br(1)–TYR(1) and Br(2)–TYR(1), show this particular aa interacting through its lateral chain (see Fig. S2). These results seem to indicate that the interaction of Br with the lateral chain of aromatic amino acids is not as favoured as with their backbone.

The complexes between Br and sulphur amino acids (MET and CYS) where the interaction occurs through the sulphur atom (e.g., Br(1)–CYS(1), 2e–4%, see Fig. S3) possess very low stability and do not contribute to the partition function. The strongest interaction is produced between the backbone of these amino acids and the hydrophilic zones of Br, e.g., Br(2)–CYS(2), Br(3)–CYS(2), Br(2)–MET(2), Br(3)–MET(2) and Br(1)–MET(2) (see Figs. 3 and S3). Sulphur amino acids tend to show lower associations to Br than the aromatic amino acids.

The polar-uncharged amino acids interact with Br preferentially through their polar-uncharged lateral chains, as expected. These complexes show similar or slightly higher association stabilities than those with aliphatic amino acids. The complexes with THR and SER exhibit the greatest stabilities within this group of amino acids. Br(1)–THR(1;2) (92%) and Br(1)–SER(1;3) (65%), which show two zones of interaction between Br and the aa, are the complexes in these two groups with highest relative population. In Br(1)–THR(1;2) (see Fig. 3) the interaction occurs between the –OH in C₃ of Br and the hydroxyl group of the lateral chain and the carbonyl group near C_α of THR. In the case of Br(1)–SER(1;3) (see Fig. S4), the diol functionality of ring A of Br interacts with the –OH group of the lateral chain and the backbone of SER. Br(3)–ASN(2) (57%) and Br(1)–GLN(1) (84%) are the complexes of ASN and GLN with the highest relative populations (see Fig. S4).

The complexes between Br and the polar-charged amino acids show the greatest stabilities as reflected by the highest absolute values of ΔE^{assoc} and ΔG^{assoc} in Table 1. The interaction with Br is always produced through the polar-charged lateral chain of these amino acids. The acid amino acids, GLU and ASP, show the highest association for Br. In these complexes, e.g., Br(1;2)–GLU(1;2) (98%) and Br(1;2)–ASP(1;3) (46%) (see Fig. 3), Br and the amino acids – which appear extended below the Br structure – interact through two distinct areas in each molecule. In Br(1;2)–GLU(1;2), the hydroxyl groups in C₃ and C₂₂ of Br interact with the polar lateral chain (region 1) and the backbone (region 2) of GLU, respectively.

In the Br(1;2)–ASP(1;3) complex, the diol group of Br and the –OH in C₂₂ interact with the polar lateral chain of ASP and the extended backbone (region 3), respectively. The complex Br(1)–ASP(1) (46%, see Fig. S5) also shows a significant contribution to the partition function of the Br–ASP system.

The minima found by the MMH procedure show the interaction between the basic amino acids (ARG, LYS and HIS) and the oxalactone functionality of Br, e.g., Br(3)–ARG(1) (78%), Br(3)–LYS(1) (52%) and Br(3)–HIS(1) (47%) (see Figs. 3 and S5). The complexes Br–ARG show the highest association in this group. The complexes where the interaction is produced between the diol groups of the lateral chain and ring A of Br and these amino acids possess very low stabilities and, therefore, quite low contributions to the partition function.

To ensure all significant Br–aa complexes were taken into account, additional complexes between Br and the amino acids with the highest affinity, i.e., GLU, ASP, ARG and LYS, were further explored, first with the AM1 method and later on with the B3LYP and M05-2X functionals, as described in Section 2. Eight Br–GLU complexes were considered together with five complexes between Br and the each of the other amino acids.

Tables 2–5 display the energy (ΔE) and Gibbs free energy (ΔG) of the association process for the different complexes found between Br and the previously mentioned amino acids at 298.15 K. The values reported correspond to the four levels of theory considered: AM1, B3LYP/6-31G, B3LYP/6-311 + G(d)//B3LYP/6-31G and M05-2X/6-311 + G(d)//B3LYP/6-31G. The B3LYP/6-31G structures of these complexes are shown in Figs. 4–7. The complexes marked with an asterisk are the lowest-energy complexes previously found following the MMH procedure.

Polar interactions are always accompanied by dispersive interactions. AM1 and B3LYP have shown problems when describing medium-range dispersion-like interactions [33,34]. Therefore, we have used the M05-2X density functional to validate the performance of AM1 and B3LYP calculations on these systems. The M05-2X density functional has been proved to successfully describe non-covalent interactions for biological systems, especially weak interactions, hydrogen bonding, π – π stacking and interaction energies of nucleobases. The good performance of M05-2X comes from its improved correlation functional, which gives a better description of the medium-range part of non-covalent interactions [35].

Table 2

Change in internal thermal energy and Gibbs free energy (in kcal/mol) of the association process for the brassinolide (Br) complexes with glutamic acid (GLU) at 298.15 K.

| Complexes | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G |
|-------------------------------|------------|--------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Br(1)–GLU(1) | ΔE | –24.48 | –57.53 | –39.08 | –47.11 |
| | ΔG | –12.75 | –42.26 | –23.81 | –31.84 |
| Br(1)OH ₂ –GLU(1) | ΔE | –27.95 | –48.48 | –33.32 | –38.90 |
| | ΔG | –14.97 | –34.88 | –19.72 | –25.30 |
| Br(1)OH ₃ –GLU(1) | ΔE | –31.73 | –55.02 | –37.76 | –45.54 |
| | ΔG | –17.63 | –41.72 | –24.45 | –32.24 |
| Br(2)–GLU(1) | ΔE | –19.28 | –38.77 | –27.08 | –32.32 |
| | ΔG | –9.91 | –27.24 | –15.55 | –20.79 |
| Br(1;2)–GLU(1;2) ^a | ΔE | –34.73 | –56.40 | –41.50 | –58.72 |
| | ΔG | –16.80 | –39.74 | –24.83 | –42.06 |
| Br(1;2)–GLU(3;1) | ΔE | –29.66 | –57.37 | –37.00 | –46.84 |
| | ΔG | –14.57 | –40.60 | –20.23 | –30.07 |
| Br(1;2)–GLU(1;3) | ΔE | –24.74 | –50.21 | –32.74 | –41.51 |
| | ΔG | –10.56 | –34.26 | –16.78 | –25.56 |
| Br(3)–GLU(2) | ΔE | –10.58 | –23.17 | –11.60 | –20.46 |
| | ΔG | 2.23 | –9.24 | 2.33 | –6.53 |

^aStructure obtained by applying the MMH methodology.

Table 3

Change in internal thermal energy and Gibbs free energy (in kcal/mol) of the association process for the brassinolide (Br) complexes with aspartic acid (ASP) at 298.15 K.

| Complexes | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G |
|-------------------------------|------------|--------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Br(1)–ASP(1) | ΔE | –19.49 | –30.02 | –20.45 | –26.08 |
| | ΔG | –7.34 | –17.64 | –8.07 | –13.70 |
| Br(2)–ASP(1) | ΔE | –17.90 | –32.58 | –23.30 | –28.33 |
| | ΔG | –7.53 | –22.38 | –13.10 | –18.13 |
| Br(3)–ASP(2) | ΔE | –9.69 | –14.23 | –5.71 | –14.94 |
| | ΔG | 3.31 | –0.72 | 7.79 | –1.44 |
| Br(1;2)–ASP(1;3) ^a | ΔE | –29.72 | –46.54 | –30.97 | –39.95 |
| | ΔG | –15.86 | –31.85 | –16.27 | –25.25 |
| Br(1;2)–ASP(2;1) | ΔE | –25.09 | –44.21 | –24.23 | –37.32 |
| | ΔG | –8.28 | –26.91 | –6.93 | –20.02 |

^a Structure obtained by applying the MMH methodology.**Table 4**

Change in internal thermal energy and Gibbs free energy (in kcal/mol) of the association process for the brassinolide (Br) complexes with arginine (ARG) at 298.15 K.

| Complexes | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G |
|---------------------------|------------|--------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Br(1)–ARG(1) | ΔE | –18.64 | –22.15 | –17.27 | –18.73 |
| | ΔG | –9.17 | –12.03 | –7.16 | –8.62 |
| Br(2)–ARG(1) | ΔE | –15.16 | –14.09 | –10.37 | –11.79 |
| | ΔG | –3.41 | –5.42 | –1.69 | –3.12 |
| Br(3)–ARG(1) ^a | ΔE | –24.39 | –26.63 | –22.85 | –24.57 |
| | ΔG | –13.90 | –17.19 | –13.41 | –15.13 |
| Br(1;2)–ARG(1;2) | ΔE | –8.41 | –14.41 | –7.05 | –11.57 |
| | ΔG | 5.84 | –0.83 | 6.53 | 2.01 |
| Br(1;2)–ARG(3;1) | ΔE | –10.74 | –18.48 | –8.24 | –14.35 |
| | ΔG | 2.84 | –5.24 | 5.00 | –1.11 |

^a Structure obtained by applying the MMH methodology.**Table 5**

Change in internal thermal energy and Gibbs free energy (in kcal/mol) of the association process for the brassinolide (Br) complexes with lysine (LYS) at 298.15 K.

| Complexes | | AM1 | B3LYP/6-31G | B3LYP/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G | M05-2X/6-311 + G(d)// B3LYP/6-31G |
|---------------------------|------------|--------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Br(1)–LYS(1) | ΔE | –15.00 | –20.04 | –15.27 | –16.83 |
| | ΔG | –6.36 | –10.50 | –5.73 | –7.29 |
| Br(2)–LYS(1) | ΔE | –17.96 | –22.18 | –16.70 | –19.28 |
| | ΔG | –8.57 | –12.00 | –6.52 | –9.10 |
| Br(3)–LYS(1) ^a | ΔE | –20.57 | –23.61 | –20.11 | –21.16 |
| | ΔG | –11.10 | –13.97 | –10.48 | –11.53 |
| Br(1,2)–LYS(1;2) | ΔE | –11.89 | –20.07 | –7.70 | –17.12 |
| | ΔG | 1.49 | –5.14 | 7.23 | –2.19 |
| Br(1;2)–LYS(3;1) | ΔE | –3.76 | –13.47 | –3.66 | –12.00 |
| | ΔG | 8.99 | 0.07 | 9.88 | 1.54 |

^a Structure obtained by applying the MMH methodology.

The two most stable Br–GLU complexes at the AM1 and B3LYP/6-311 + G(d) levels of theory, Br(1;2)–GLU(1;2) and Br(1)OH₃–GLU(1), differ by less than 1 kcal/mol, but this energy difference becomes 10 kcal/mol with the M05-2X functional. Br(1;2)–GLU(1;2), the MMH (AM1) complex obtained with the highest relative population, is the most stable complex found at the highest levels of theory (see Table 2 and Fig. 4).

The stability order is almost the same at the four levels of calculation. The three least-stable complexes, Br(1;2)–GLU(1;3), Br(2)–GLU(1) and Br(3)–GLU(2), are equally ranked by AM1, B3LYP/6-31G and B3LYP/6-311 + G(d). M05-2X/6-311 + G(d) also shows the Br(2)–GLU(1) and Br(3)–GLU(2) complexes with the lowest stability, but the complex Br(1;2)–GLU(1;3) is less than 1 kcal/mol more stable than the complex Br(1)OH₂–GLU(1). The interaction of the lateral chain of GLU with the oxalactone

functionality of Br is not favoured due to the electrostatic repulsion between the negative partial charges of the oxalactone and the carboxylate groups. Hence, the most stabilizing interaction of the oxalactone group of Br should take place with the –NH group of the backbone of this aa, e.g., Br(3)–GLU(2).

The MMH (AM1) Br–ASP complex with the highest relative population, Br(1;2)–ASP(1;3), is the most stable among the extended set of complexes explored (see Fig. 5) at the four levels of theory (see Table 3). As previously discussed, this complex possesses a double stabilizing Br–ASP interaction.

The structures of the lowest-energy complexes, e.g., Br(1;2)–GLU(1;2) and Br(1;2)–ASP(1;3) at the AM1 (see Fig. 3) and B3LYP/6-31G (see Figs. 4 and 5) levels of calculation, show some differences. In the AM1 complex Br(1;2)–GLU(1;2) the interaction is produced between the entire –COO[–] group of the lateral chain of

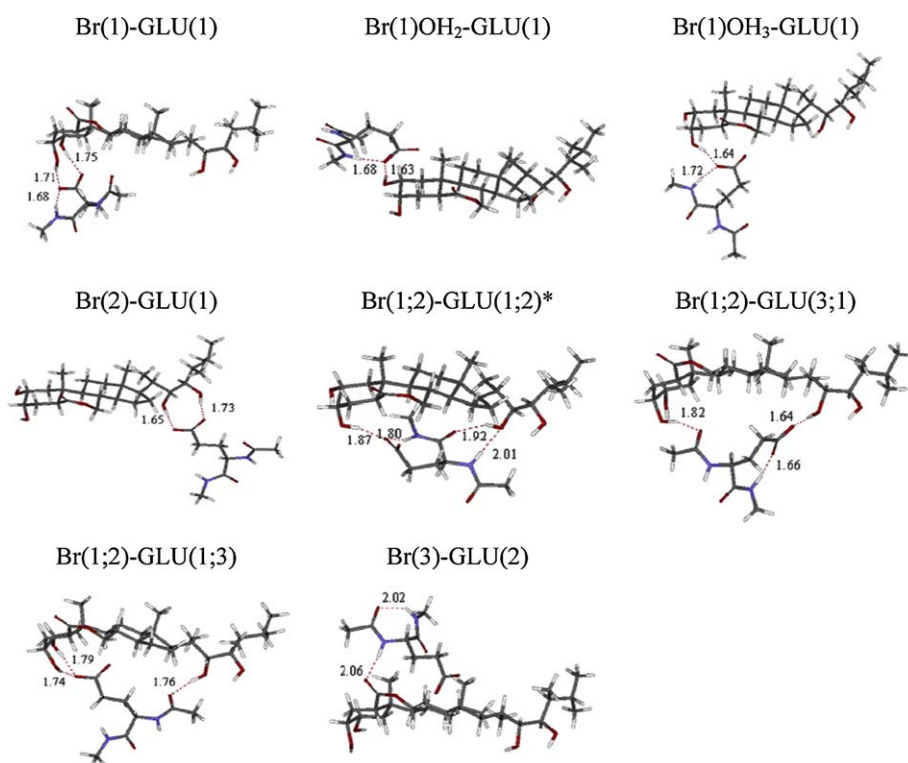


Fig. 4. Preferential positions of interaction (B3LYP/6-31G) between brassinolide (Br) and glutamic acid (GLU). *Structure of the minimum obtained by applying the MMH methodology.

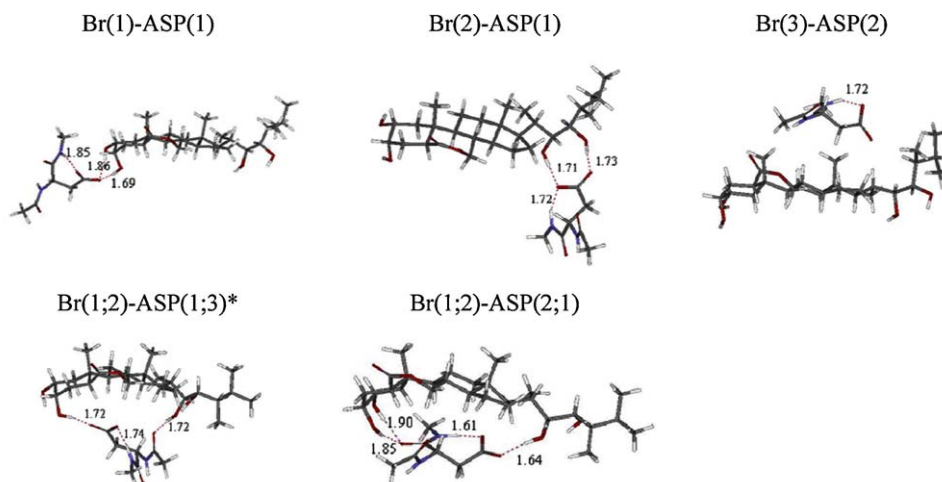


Fig. 5. Preferential positions of interaction (B3LYP/6-31G) between brassinolide (Br) and aspartic acid (ASP). *Structure of the minimum obtained by applying the MMH methodology.

GLU and the –OH in C₃ of Br. When this complex is reoptimized at the B3LYP/6-31G level of theory, the –COO[–] group is not entirely participating in the interaction with the –OH in C₃. In the AM1 complex Br(1;2)–ASP(1;3) the entire diol group of ring A of Br interacts with the –COO[–] group of the lateral chain of ASP. However, in the B3LYP geometry the –OH in C₃ of Br is the only group interacting with the lateral chain of ASP.

Although the AM1, B3LYP/6-311 + G(d) and M05-2X/6-311 + G(d) stability order for the complexes between Br and the acid amino acids is not exactly the same, there is excellent agreement between the predicted complexes with the greatest and lowest stability. For the Br–ASP complexes, the AM1 stability order agrees with the B3LYP/6-31G and M05-2X/6-311 + G(d) results.

For the Br complexes with basic amino acids, ARG and LYS, the same situation applies. The MMH (AM1) complexes with the highest relative populations, Br(3)–ARG(1) and Br(3)–LYS(1), are also the most stable among the extended set of complexes explored (see Figs. 6 and 7) at the four levels of theory (see Tables 4 and 5). The AM1 stability order of the Br complexes with ARG and LYS coincide with the order predicted by the three DFT calculations.

Br(3)–ARG(1) exhibits the interaction between the carbonyl group of ring B of Br and the –NH₂ groups of the lateral chain of ARG. In Br(3)–LYS(1) the carbonyl group of Br interacts with the –NH₃ of LYS. Other Br–ARG and Br–LYS complexes showing a double interaction involving two regions of both molecules, e.g., Br(1;2)–

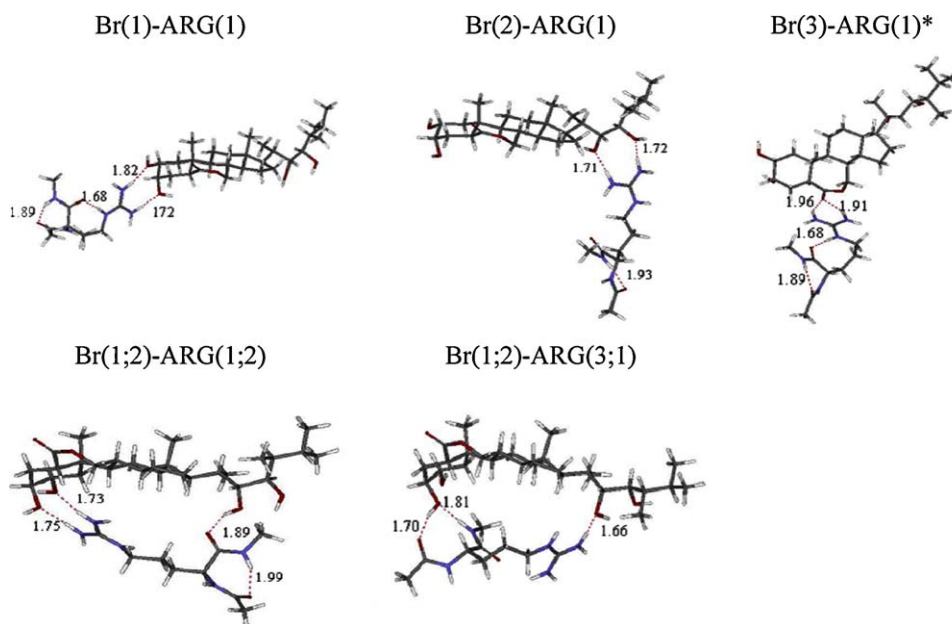


Fig. 6. Preferential positions of interaction (B3LYP/6-31G) between brassinolide (Br) and arginine (ARG). *Structure of the minimum obtained by applying the MMH methodology.

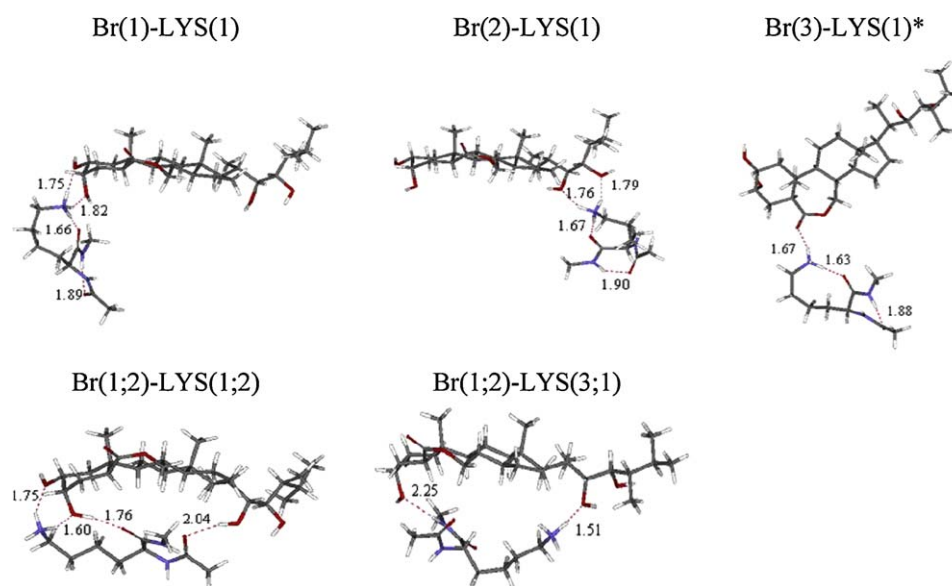


Fig. 7. Preferential positions of interaction (B3LYP/6-31G) between brassinolide (Br) and lysine (LYS). *Structure of the minimum obtained by applying the MMH methodology.

ARG(1;2) and Br(1;2)–ARG(3;1) (see Fig. 6), Br(1;2)–LYS(1;2) and Br(1;2)–LYS(3;1) (see Fig. 7), possess a much lower stability which is probably associated with a significant decrease in entropy during formation.

In spite of the known limitations of AM1 Hamiltonian to correctly describe interactions dominated by dispersion [33], the AM1 results (geometries and energies) have shown to be in excellent agreement with the B3LYP and M05-2X results obtained, especially for the most and least-stable complexes with each amino acid. The values of statistical properties found with AM1 were not significantly different due to error compensation of this method. On the other hand, dispersion-stabilized structures can be obtained after refinement of AM1 geometries with M05-2X density functional.

4. Conclusions

A theoretical model for understanding the interaction between brassinosteroids and amino acids has been established. The MMH methodology, using the semiempirical Hamiltonian AM1, allows the determination of the degree of association between Br and the amino acids based on the thermodynamical properties of the complexes they form. The order of association found is: GLU > ASP > ARG > LYS > HIS > THR > ALA > VAL > SER > ILE > GLN > LEU > GLY > TRP > PHE > CYS > ASN > MET > PRO > TYR. The Br–amino acid association is the strongest with the polar-charged amino acids. The MMH Br–aa association order for the four amino acids with the highest association for Br has been reproduced with the B3LYP and M05-2X density functional methods.

It has also been shown that each group of amino acids possesses a preferential zone of interaction with Br. While polar-charged and uncharged amino acids interact most strongly through their polar lateral chains, the other amino acids prefer their backbones. Br possesses three main zones of hydrophilic interaction with amino acids and the association with one area or another depends on the particular aa. The association of acid amino acids occurs through the diol groups of ring A and the lateral chain of Br, however, the interaction with basic amino acids is produced through the oxalactone group of ring B of this phytohormone.

The M05-2X/6-311 + G(d) results indicate that AM1 and B3LYP are suitable methods for describing not only the geometries of these complexes but also their order of stability. The most stable complexes obtained by means of the MMH-AM1 approach are also the most stable ones when applying the B3LYP and M05-2X functionals with the TZ basis set.

Acknowledgments

The authors are indebted to the financial support from MEC, Spain (Project: CTQ2007-63332), the Universidad de la Habana, the Universidad Autónoma de Madrid, AECID, Spain (Project: D/019558/08) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Thanks are also due to CCC-UAM and Information Technology Services at Thompson Rivers University. NMD acknowledges a sabbatical fellowship from MEC, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmgm.2009.12.006.

References

- [1] S. Choe, Brassinosteroid biosynthesis and inactivation, *Phys. Plant.* 126 (2006) 539–548.
- [2] A. Bajguz, Metabolism of brassinosteroids in plants, *Plant. Physiol. Biochem.* 45 (2007) 95–107.
- [3] A. Bajguz, A. Tretyn, The chemical characteristic and distribution of brassinosteroid in plants, *Phytochemistry* 62 (2003) 1027–1046.
- [4] G.M. Symons, J.J. Ross, C.E. Jager, J.B. Reid, Brassinosteroid transport, *J. Exp. Bot.* 59 (2007) 1–8.
- [5] S. Droschin, A. Porzel, V. Brunhilde, W. Brandt, C. Wagner, K. Merzweiler, G.J. Adam, Conformational studies of two new brassinosteroid analogues with a 22,23-trans diol function, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1999) 233–238.
- [6] M.D. Groove, G.F. Spencer, W.K. Rohwedder, N.B. Mandaba, J.F. Worley, J.D. Warthen Jr., G.L. Steffens, J.L. Flippen-Anderson, J.C. Cook Jr., Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature* 281 (1979) 216–217.
- [7] M. Fellner, in: S. Hayat, A. Ahmad (Eds.), *Recent Progress in Brassinosteroid Research: Hormone Perception and Signal Transduction*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2003, pp. 69–86.
- [8] T. Kinoshita, A. Caño, H. Seto, S. Hiranuma, S. Fujioka, S. Yoshida, J. Chory, Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1, *Nature* 433 (2005) 167–171.
- [9] Z.Y. Wang, H. Seto, S. Fujioka, S. Yoshida, J. Chory, BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids, *Nature* 410 (2001) 380–383.
- [10] M. Sisa, M. Vilaplana, C. Ballesteros, L. Kohout, Brassinolide activities of 2 α ,3 α -diols versus 3 α ,4 α -diols in the bean second internode bioassay: explanation by molecular modelling, *Steroids* 72 (2007) 740–750.
- [11] Y. Belkhadir, J. Chory, Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface, *Cell Signalling* 314 (2006) 1468–1470.
- [12] L.A. Montero, A.M. Esteve, J. Molina, A. Zapardiel, L. Hernández, H. Márquez, A. Acosta, A theoretical approach to analytical properties of 2,4-diamino-5-phenylthiazole in water solution: tautomerism and dependence on pH, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 12023–12033.
- [13] L.A. Montero, J. Molina, J. Fabian, Multiple minima hypersurfaces of water clusters for calculations of association energy, *Int. J. Quant. Chem.* 79 (2000) 8–16.
- [14] E. Codorniú, A. Mesa, L.A. Montero, F. Martínez, T. Borrmann, W.D. Stohrer, Theoretical study of flavonoids and proline interactions. Aqueous and gas phases, *J. Mol. Struct. (Theochem.)* 623 (2003) 63–73.
- [15] Available by request: <<http://karin.fq.uh.cu/mmh/>>.
- [16] L. George, E. Sanchez, W. Sander, Matrix isolation infrared and ab initio study of formic acid-acetylene interaction: example of H... π and C-H...O interaction, *J. Phys. Chem. A* 107 (2004) 6850–6858.
- [17] E. Sanchez, L. George, L.A. Montero, W. Sander, 1,2 Formic acid/acetylene complexes: ab initio and matrix isolation studies of weakly interacting systems, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 11846–11854.
- [18] E. Codorniú, A. Mesa, R. Hernández, L.A. Montero, F. Martínez, J.L. Santana, T. Borrmann, W.D. Stohrer, Essential amino acids interacting with flavonoids: a theoretical approach, *Int. J. Quant. Chem.* 103 (2005) 83–104.
- [19] J.A. Padrón, R. Crespo, E.W. Hernández, P. Garriga, L.A. Montero, J.C. García, Patterns of retinal light absorption related to retinitis pigmentosa mutants from in silico model structures of Rhodopsin, *Proteins* 57 (2004) 392–399.
- [20] P. Schönfeld, J. Fabian, L.A. Montero, A combined experimental and quantum chemical study of the putative protonophoric activity of thiocyanate, *J. Biophys.* 89 (2005) 1–12.
- [21] J.L. Gu Coronado, E. Martín, L.A. Montero, J.L.G. Fierro, J.M. García de la Vega, Effects of the 3- and 4-methoxy and acetamide substituents and solvent environment on the electronic properties of N-substituted 1,8-naphthalimide derivatives, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 9724–9732.
- [22] L.A. Montero, Y. Perez, M.J. Mora, An approach to hydration of model silica materials by exploring their multiple minima hypersurfaces: the role of entropy of association, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 2880–2887.
- [23] R. Crespo, Y. Pérez, J.A. Padrón, L.A. Montero, Exploring the potential energy surfaces of association of NO with aminoacids and related organic functional groups: the role of entropy of association, *Theor. Chem. Acc.* 118 (2007) 649–663.
- [24] C. Morera, E. Alonso, R. González, L.A. Montero, J.M. García de la Vega, A theoretical approach to the solvation of brassinosteroids, *J. Mol. Graphics Modell.* 27 (2009) 600–610.
- [25] M.J.S. Dewar, W. Thiel, MINDO/3 study of the addition of singlet oxygen to 1,1-butadiene, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 2338–2339.
- [26] C. Morera, E. Alonso, L.A. Montero, R. González, Validation of performances of some semiempirical Hamiltonians for predicting molecular structure calculation of natural brassinosteroids: towards understanding their biological activity by electron exchange effects, *J. Mol. Struct. (Theochem.)* 819 (2007) 109–120.
- [27] MOPAC, v. 6, Stewart, J.J.P. The 6J version with Jorgensen modified Hamiltonians was released in our laboratory for PC computers under both Windows and Linux operating systems, Universidad de la Habana, 2004, 1993.
- [28] O. Ludwig, H. Schinke, W. Brandt, Reparametrisation of force constants in MOPAC 6.0/7.0 for better description of the activation barrier of peptide bond rotations, *J. Mol. Mod.* 2 (1996) 341–350.
- [29] S.F. Sousa, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, General performance of density functionals, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 10439–10452.
- [30] Y. Zhao, N.E. Schultz, D.G. Truhlar, Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions, *J. Chem. Theory Comput.* 2 (2006) 364–382.
- [31] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, et al., *Gaussian 03*, Revision E. 1, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [32] C. Browning, E. Martin, C. Loch, J.M. Wurtz, M. Moras, R.H. Stote, A.P. Dejaegere, I.M.L. Billas, Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 32924–32934.
- [33] T. Clark, Quo vadis semiempirical MO-theory? *J. Mol. Struct. (Theochem.)* 530 (2000) 1–10.
- [34] Y. Zhao, D.G. Truhlar, Density functionals with broad applicability in chemistry, *Acc. Chem. Res.* 41 (2007) 157–167.
- [35] Y. Zhao, D.G. Truhlar, Density functionals for noncovalent interaction energies of biological importance, *J. Chem. Theory Comput.* 3 (2007) 289–300.