



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS
ESTEROIDALES CON PROMISORIA APLICACIÓN COMO
SENSORES FLUORESCENTES**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

CLAUDIA MIREYA RAMÍREZ LOZANO

Director de tesis: Dr. Rodrigo González Olvera

Asesora de tesis: M. en C. María Eugenia Ochoa Becerra

CD. MX., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna RAMÍREZ LOZANO CLAUDIA MIREYA,
con número de cuenta 311331769 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 23 del mes de Marzo de 2020 a las 11:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARÍN
VOCAL*	M. en C. MARÍA EUGENIA OCHOA BECERRA
SECRETARIO	DR. RODRIGO GONZÁLEZ OLVERA
SUPLENTE	DR. en C. HOLBER ZULETA PRADA
SUPLENTE	DR. MANUEL LÓPEZ ORTIZ

El título de la tesis que se presenta es: **Síntesis y caracterización de
derivados esteroidales con promisoría aplicación como sensores fluorescentes**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 26 de Febrero de 2020.

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.





El presente trabajo se realizó en el laboratorio 20 del Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la supervisión de la Dra. Rosa Luisa Santillan Baca, la M. en C. María Eugenia Ochoa Becerra y del Dr. Rodrigo González Olvera.

Parte de este trabajo fue presentado en la XV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, celebrada del 08 al 12 de abril de 2019 en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.



Agradecimientos

A la Dra. Rosa Luisa Santillan Baca por abrir sus puertas y permitirme ser parte de su grupo de investigación, por su confianza y apoyo brindado en la asesoría de este trabajo.

A la M. en C. María Eugenia Ochoa Becerra por su apoyo, paciencia y valiosos consejos para la realización de este trabajo, pero sobre todo gracias por brindarme su amistad a lo largo de este proceso y considerarme una de sus hijas.

Al Dr. Rodrigo González Olvera, por el apoyo constante, su paciencia y la confianza depositada en mí, sus valiosos consejos fueron la guía que marco el camino para crecer en este proceso académico.

A los miembros del jurado Q.F.B. Evangelina Mercado Marín, Dr. en C. Holber Zuleta Prada y Dr. Manuel López Ortiz por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo y por sus observaciones y sugerencias para el enriquecimiento del mismo.

A María Teresa Cortez Picasso, María Luisa Rodríguez Pérez y Victor M. González Díaz por su apoyo en la obtención de los espectros de RMN de 1 y 2D.

Al Ing. Geiser Cuellar Rivera por su apoyo en la obtención de las masas de los compuestos.

A la Lic. Alicia Hernández y Gonzalo Trejo por su apoyo en la búsqueda bibliográfica y su excelente servicio en la biblioteca de Química (CINVESTAV-IPN).

Al Dr. Victor Jiménez Pérez y su grupo de investigación de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo en la obtención de las propiedades de fluorescencia y las imágenes de fluorescencia en células de algunos compuestos obtenidos en este trabajo.

Al grupo de investigación del Dr. Norberto Farfán en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la obtención de los datos de IR de los compuestos obtenidos en este trabajo.

Al CONACyT por la beca brindada para el desarrollo de este proyecto.



Dedicatorias

A mis padres, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad y ser los pilares de mis sueños, gracias por cada día creer en mí y en mis expectativas, por el amor y la dedicación con la que cada día se preocupaban; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. Ustedes merecen más de lo que puedo regresarles. Los amo profundamente.

A mi hermana, por ser el principal cimiento para construir mi vida profesional, por sentar en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación, gracias por tu apoyo y motivación en los momentos difíciles.

A mis abuelos, por ser mis segundos padres y ser las personas que me han ofrecido el amor y la calidez al tener lejos a mis padres, cada consejo y cada una de sus palabras han guiado mi vida para ser una mejor persona.



Índice General

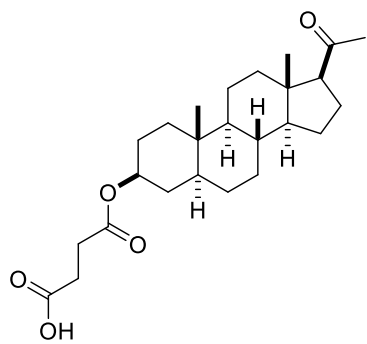
Índice de compuestos.....	i
Abreviaturas, símbolos y acrónimos.....	iv
Resumen.....	vii
1.Introducción.....	1
2.Fundamento teórico.....	3
2.1 Química supramolecular.....	3
2.2 Sensores moleculares.....	6
2.3 Sensores fluorescentes.....	8
2.4 Aplicación de sensores fluorescentes.....	10
2.5 Esteroides.....	11
2.6 Ácido cólico y ácido desoxicólico.....	15
2.7 Pregnenolona	17
2.8 Pregnanolona.....	19
2.9 3 β ,19-Dihidroxiesteroidepiandro-5-en-17-ona.....	20
2.10 Cumarinas.....	20
2.11 Sensores fluorescentes basados en compuestos esteroide-cumarina.....	22
3.Planteamiento del problema.....	27
4.Hipótesis.....	28
5.Objetivos.....	29
6.Resultados y discusión.....	30
6.1 Síntesis.....	30
6.1.1 Hemisuccinatos esteroideos.....	30
6.1.2 Aminocumarina.....	35



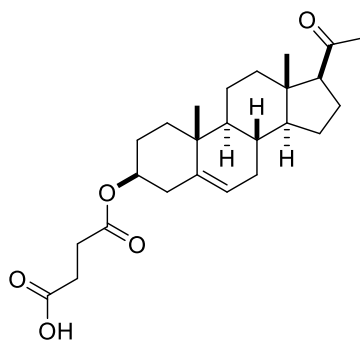
6.1.3 Derivados esteroidales conteniendo el fragmento cumarina.....	37
6.2 Caracterización.....	41
6.2.1 Caracterización por RMN.....	41
6.2.2 Caracterización por IR.....	45
6.2.3 Caracterización de las propiedades de fluorescencia.....	47
6.2.4 Estudio de imagen de fluorescencia en células vivas.....	50
7. Generalidades.....	52
8.Procedimiento experimental.....	55
8.1 Síntesis de hemisuccinatos esteroidales.....	55
8.2 Síntesis del éster del ácido cólico.....	59
8.3 Síntesis de 3-aminocumarinas.....	60
8.4 Acoplamiento de 3-aminoumarinas a hemisuccinatos.....	61
9.Conclusiones.....	69
10.Perspectivas.....	70
11.Referencias bibliográficas.....	71
ANEXO I. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C	79
ANEXO II. Tablas de desplazamientos en RMN ^{13}C	111



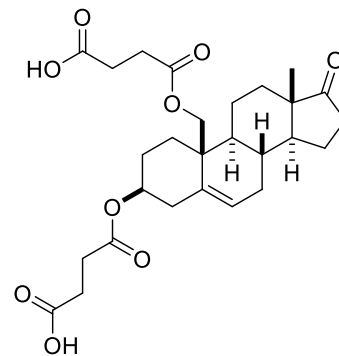
Índice de compuestos



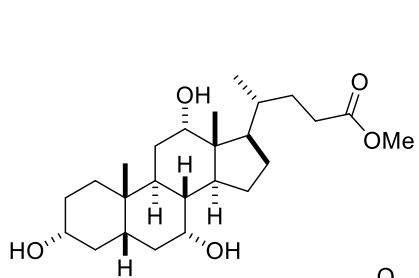
1a



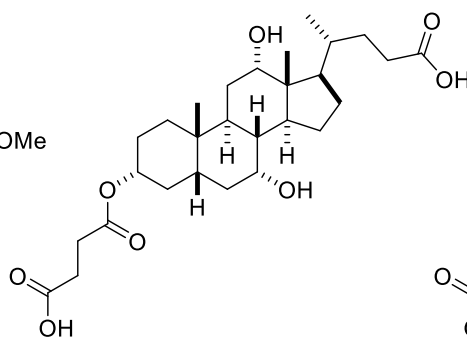
2a



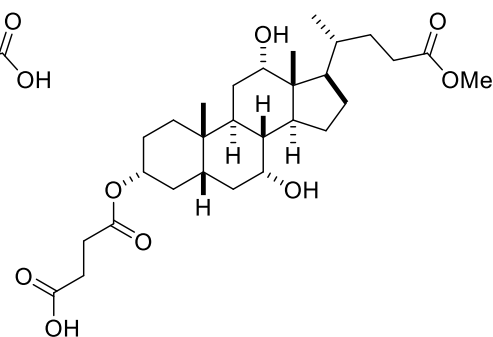
3a



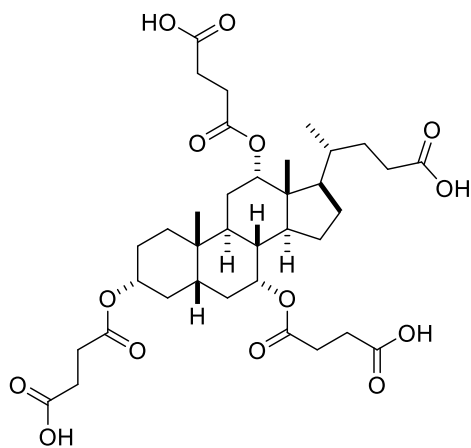
4a



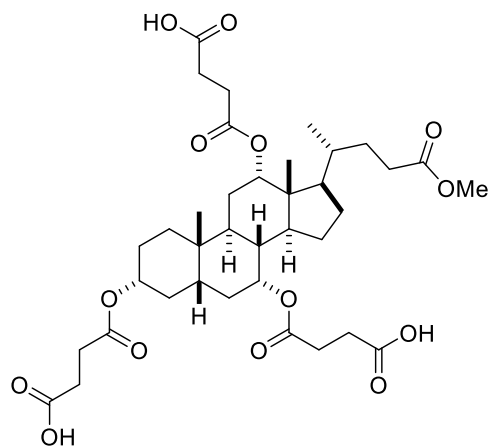
5a



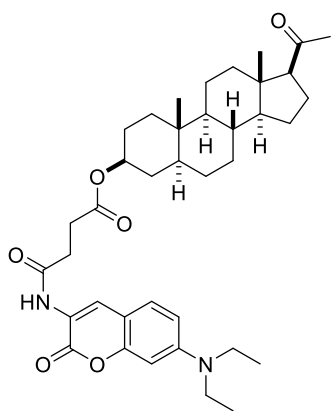
5b



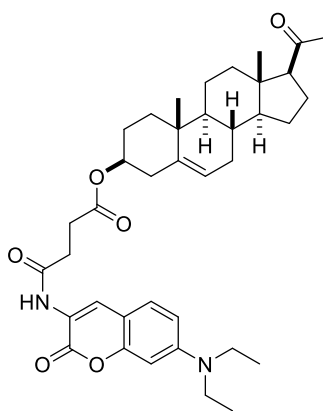
8a



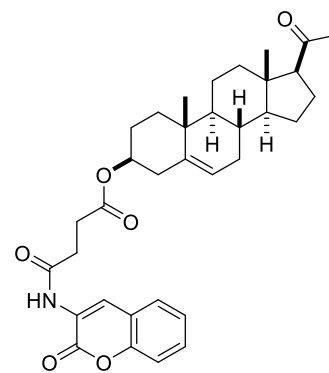
8b



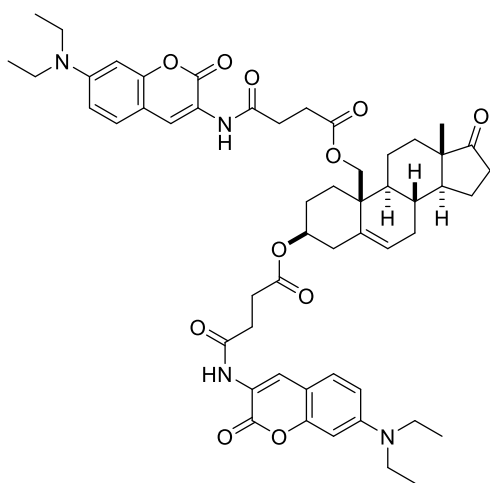
1b



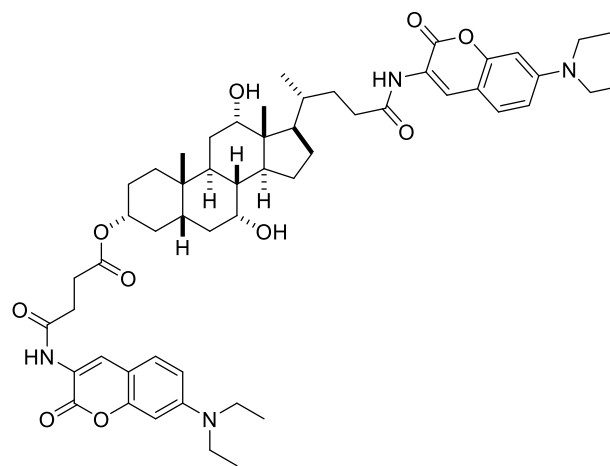
2b



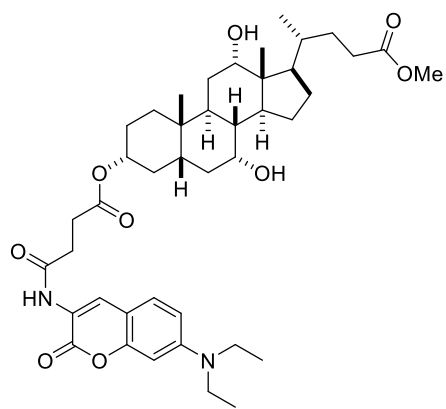
2c



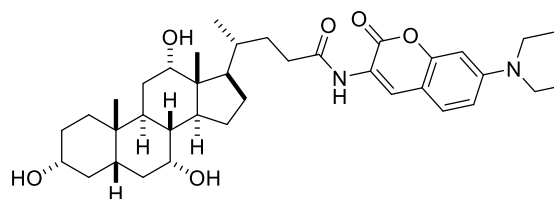
3b



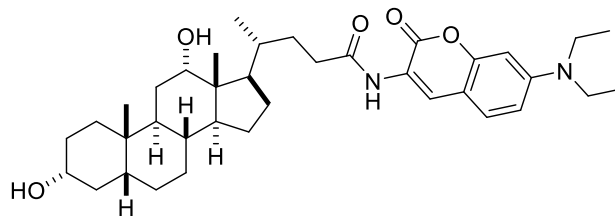
6a



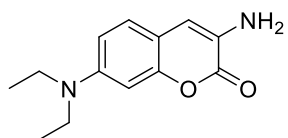
6b



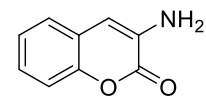
7a



7b



9a



9b



Abreviaturas, acrónimos y símbolos

AcOEt	Acetato de Etilo
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
cm	Centímetro
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
HSQC	Correlación Cuántica Simple Heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
COSY	Correlaciones espectroscópicas
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
δ	Desplazamiento químico
DHEA	Deshidroepiandrosterona
DMAP	4-dimetilaminopiridina
EtOH	Etanol
EEDQ	<i>N</i> -etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
Equiv.	Equivalente
MS	Espectrometría de Masas
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier
°C	Grado Celsius
g	Gramos
OH	Hidroxilo



h	Hora
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
ESI	Ionización por electrospray
Lit.	Literatura
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mmol	Milimol
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
APT	Prueba de enlace de protón (Attached Proton Test)
ATR	Reflexión Total Atenuada
Δ	Calentamiento a reflujo
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
c	Señal cuádruple
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
m	Señal múltiple
s	Señal simple
brs	Señal simple ancha
t	Señal triple



THF	Tetrahidrofurano
UV	Luz ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotometría Luz ultravioleta-Visible
ν	Vibración de tensión de enlace

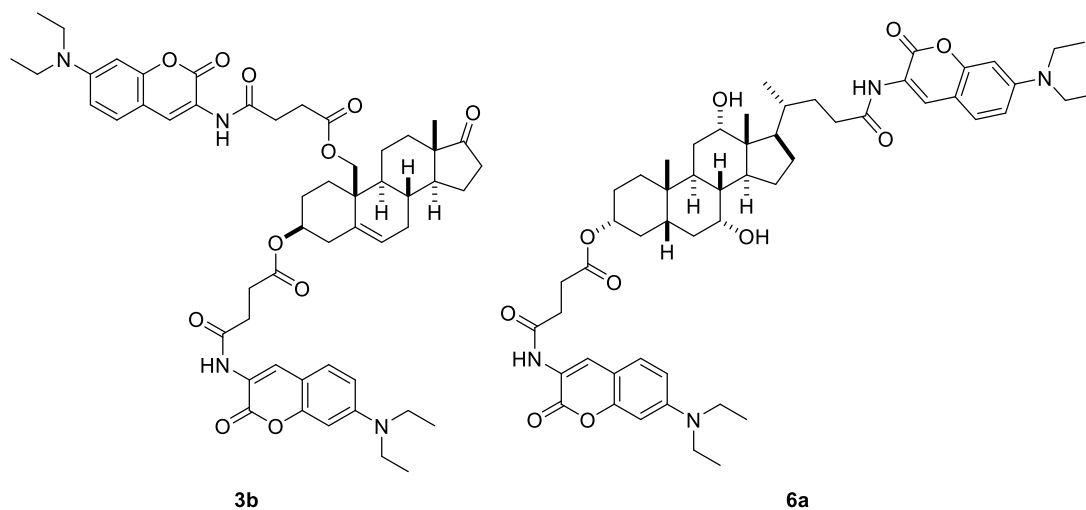
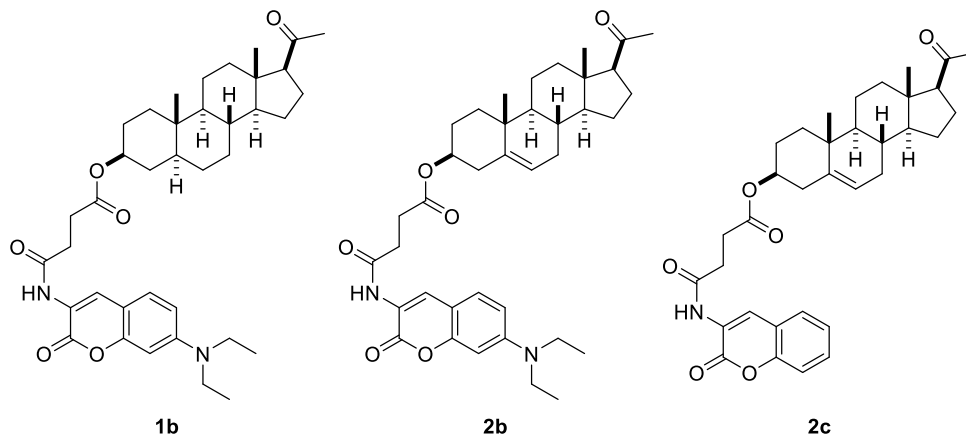


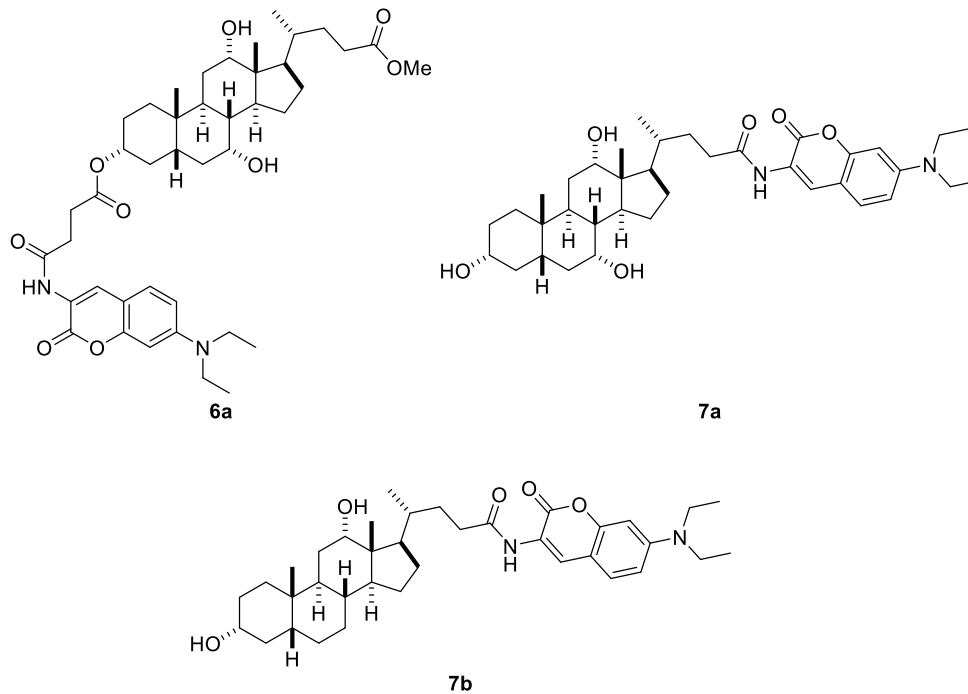
RESUMEN



Resumen

En el presente trabajo se sintetizaron ocho nuevos compuestos a partir de cinco diferentes núcleos esteroidales, isopregnanolona, pregnenolona, $3\beta,19$ -dihidroxiesteroideandro-5-en-17-ona, ácido cólico y ácido desoxicólico. Los esteroides en primera instancia se modificaron a partir de sus grupos hidroxilo incorporando un fragmento hemisuccinato empleando una reacción de Einhorn, obteniéndose así los compuestos **1a**, **2a**, **3a**, **5a**, y **5b** en buenos rendimientos. Por otro lado, se obtuvieron los compuestos trihemisuccinatos **8a** y **8b** derivados del ácido cólico bajo las mismas condiciones de reacción empleadas para los mono y dihemisuccinatos. Posteriormente, los hemisuccinatos esteroidales se hicieron reaccionar con un agente de acoplamiento para incorporar la 3-aminocumarina y la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina, obteniendo así los compuestos esteroide cumarina **1b**, **2b**, **2c**, **3b**, **6a**, **6b**, **7a**, y **7b**.





Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados por RMN (^1H y ^{13}C), infrarrojo y masas. Por otro lado, se llevó a cabo la caracterización de las propiedades de fluorescencia de los compuestos esteroide-cumarina **1b**, **2b**, **2c** y **7a**, los cuales mostraron buenos efectos de fluorescencia. Los compuestos **1b** y **7a** se evaluaron como sensores fluorescentes para generar imágenes de células cancerígenas *in vitro*. El compuesto **7a** exhibió una fuerte fluorescencia azul en las células del cáncer de mama, permitiendo obtener una buena imagen celular.



INTRODUCCIÓN



1. Introducción

Actualmente, la química supramolecular es un área científica de gran interés a nivel mundial y está definida como la "química más allá de las moléculas". El premio Nobel de Química (1987), Jean-Marie Lehn la describió como "la química de los enlaces intermoleculares (no covalentes), refiriéndose a las estructuras y las funciones de las entidades formadas por la asociación de dos o más especies químicas". El interés en esta área se debe a que permite entender fenómenos relevantes en las áreas química y biológica.¹

La búsqueda de nuevos métodos que permitan monitorear enfermedades o distintos procesos biológicos es de gran interés en distintos ámbitos científicos, por lo que es importante encontrar métodos que puedan reconocer una especie de manera específica.

Dentro de la química supramolecular uno de los campos de investigación se centra en diseñar y sintetizar receptores moleculares que sean capaces de detectar o unirse selectivamente a un analito, generando una señal de respuesta, lo que conduce a la obtención de los sensores moleculares, los cuales son moléculas de origen abiótico que pueden señalar o identificar la presencia de un analito enlazándose de manera selectiva y reversible a este.²

La elección de las moléculas que tengan la capacidad de indicar el reconocimiento del analito mediante la generación de una señal de respuesta hace que resulte atractivo que esta señal se refleje en un aumento en la intensidad de emisión, es por ello que surge el diseño de sensores ópticos fluorescentes que consisten en moléculas que incorporan un sitio de unión y un fluoróforo o cromóforo, este último es el encargado de señalar el evento de reconocimiento mostrando cambios en su fluorescencia, por lo que resultan ser muy sensibles y adecuados para el uso en sistemas biológicos.^{2,3}

A pesar del gran desarrollo de sensores fluorescentes, hay pocos sensores que son comerciales. Un ejemplo de un sensor comercial, es el sensor SBFI (por sus siglas en inglés, Sodium Binding Benzofuran Isophthalate, Thermo Fisher Scientific Inc.) que es utilizado para monitorear el nivel fisiológico de iones de sodio (Figura 1a). El sensor está conformado por el fragmento diaza-éter corona (receptor), mientras que el fragmento de 2-fenilbenzofurano es el responsable de la fluorescencia.^{3,4,5}

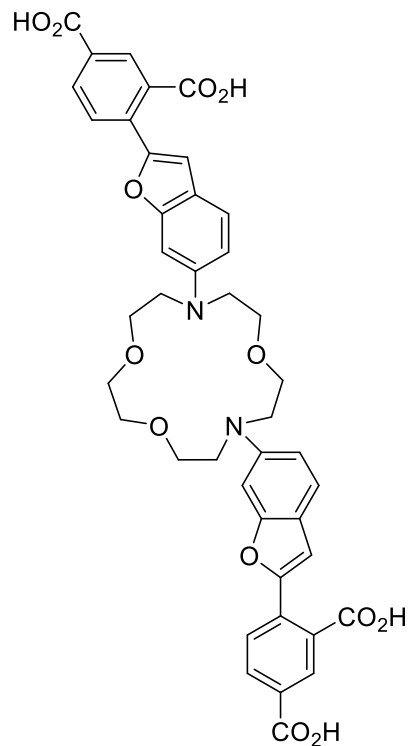


Figura I. Sensor fluorescente para detectar Na⁺.

En el presente trabajo se sintetizaron 8 nuevos compuestos a partir de 5 diferentes estructuras esteroidales, isopregnanolona, pregnenolona, 3 β ,19-dihidroxiesteroidepiandro-5-en-17-ona, ácido cólico y ácido desoxicólico, los cuales contienen fragmentos que aportan propiedades como fluorescencia, permeabilidad, solubilidad e interacción intermolecular, por lo que son candidatos promisorios para ser utilizados como sensores moleculares en sistemas químicos y/o biológicos.



FUNDAMENTO TEÓRICO



2. Fundamento teórico

2.1 Química supramolecular

En las últimas décadas una parte del campo de la química supramolecular se ha centrado en el estudio, diseño y síntesis de receptores moleculares que sean capaces de detectar o unirse selectivamente a un analito, con base en determinadas características químicas y estructurales, que puedan generar una señal de respuesta. La elección de estas moléculas que transmitan esta señal, e indiquen de alguna forma que se ha llevado a cabo la interacción, ha conducido al uso de conjuntos supramoleculares como sensores.²

La química supramolecular es un campo interdisciplinario que surge por la necesidad de entender las interacciones intermoleculares, no es un híbrido de las disciplinas comunes de la química como lo son la bioanalítica, organometálica, entre otras, sino que es un campo que abarca todas las disciplinas y subdisciplinas que involucran interacciones intermoleculares, además de los factores termodinámicos y cinéticos que intervienen en la formación de los complejos supramoleculares.⁶

El estudio de este tipo de interacciones y de los factores que mantienen y dirigen la formación de estos ensambles moleculares es lo que dio origen a la química supramolecular, también llamada “La química más allá de las moléculas”. En el siglo pasado el desarrollo de esta disciplina tuvo un gran impacto en el Premio Nobel de Química en 1987, otorgado a Jean-Marie Lehn, quien la definió como “la química de los enlaces intermoleculares, que cubre las estructuras y las funciones de las entidades formadas por la asociación de dos o más especies químicas”, formando así una supramolécula o conjunto supramolecular.¹

Las supramoléculas se definen como entidades formadas por dos o más moléculas, que se asocian por interacciones no covalentes ya que éstas constituyen la base de los procesos de autoensamblaje supramolecular. Éstas interacciones pueden ser electrostáticas (ion-ion, ion-dipolo, dipolo-dipolo), enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals (fuerzas de dispersión e inducción), apilamiento π - π .¹

Las atracciones electrostáticas están fundamentadas en la ley de Coulomb, es decir en la atracción de cargas opuestas (Figura 1). Las atracciones ion-ion no son direccionales, y son las que se



establecen entre iones de igual o distinta carga y por lo general son frecuentes entre una enzima y su sustrato, entre los aminoácidos de una proteína o entre los ácidos nucleicos y las proteínas. La atracción ion-dipolo es la atracción entre un ión y la carga parcial de un extremo de una molécula polar, en este caso los iones positivos son atraídos hacia el extremo negativo de un dipolo, mientras que los iones negativos son atraídos hacia el extremo positivo, por lo que se dice que es direccional. Por otro lado, las atracciones dipolo-dipolo se dan entre moléculas polares neutras, las cuales se atraen cuando el extremo positivo de una de ellas está cerca del extremo negativo de otra, por lo que también se dice que es direccional.^{3,7}

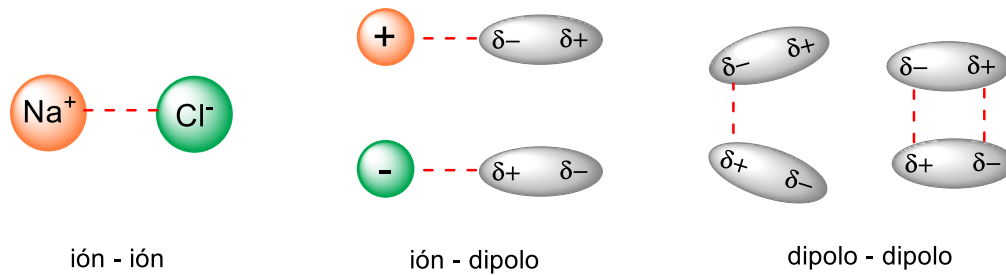


Figura 1. Atracciones electrostáticas.

Las interacciones por enlace de hidrógeno son un tipo especial de atracción intermolecular que se puede considerar un caso especial de interacción dipolo-dipolo pero ésta existe entre el átomo de hidrógeno de un enlace polar (sobre todo un enlace H-F, H-O o H-N) y un par de electrones no compartido en un ion o átomo electronegativo pequeño cercano (usualmente un átomo F, O, N de otra molécula) como se observa en la figura 2.⁷

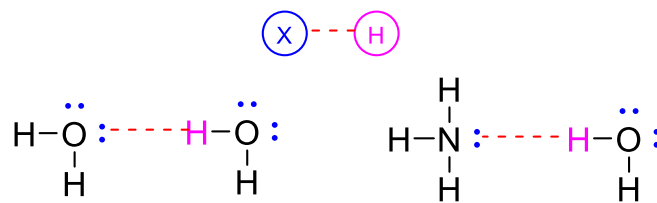


Figura 2. Ejemplos de interacción por puentes de hidrógeno.



Las interacciones mediante las fuerzas de dispersión (dipolo inducido): son fuerzas de atracción que se generan por los dipolos temporales inducidos en los átomos o moléculas se dan entre todas las moléculas, sean polares o no polares (Figura 3).⁷

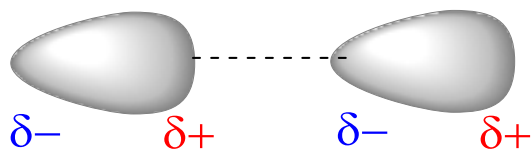


Figura 3. Atracción electrostática entre dos dipolos instantáneos.

La interacción de apilamiento π - π se da entre dos especies mediante una interacción electrostática, una entidad con carga negativa que interactúa con otra entidad de carga positiva, un sistema π rico en electrones puede interactuar con otro sistema π , sea un metal (catión o neutro), un anión u otras moléculas (Figura 4). Por lo general ocurren entre sistemas que contienen anillos aromáticos.³

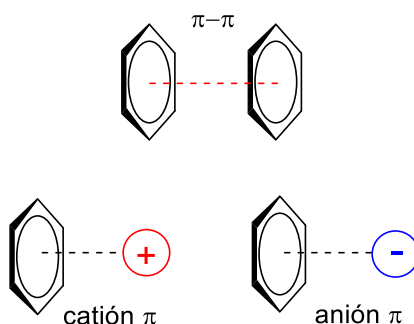


Figura 4. Interacciones π .

El estudio de las interacciones intermoleculares logra reproducir los procesos que se llevan a cabo en los organismos vivos; en especial, aquellos en donde una molécula denominada “anfitrión” interactúa selectivamente con otra molécula denominada “huésped” a través de interacciones intermoleculares, este proceso es denominado reconocimiento molecular, por lo que



esta asociación resulta ser una función esencial para la vida, ya que mediante este proceso se llevan a cabo procesos químicos, físicos, biológicos y bioquímicos fundamentales.¹

2.2 Sensores moleculares

Los sensores moleculares son moléculas de origen abiótico que son capaces de enlazarse selectiva y reversiblemente a un analito de interés con un cambio asociado a alguna de las propiedades del sistema tales como potencial oxidación-reducción, espectros de absorción o fluorescencia, entre otras, esta variación puede ser detectada y medible fácilmente en tiempo real lo que permite realizar mediciones continuas con respuesta a las concentraciones cambiantes del analito a través de un instrumento por lo que resultan atractivos en el campo de química analítica.²

En la detección del analito ocurren dos procesos básicos que son el reconocimiento molecular y la transducción de la señal. Para que estos dos procesos se lleven a cabo, los quimiosensores por lo general están constituidos por 3 componentes (Figura 5):⁸

1. Receptor: responsable de la unión selectiva del analito.
2. Unidad activa: encargada de dar la respuesta y cuyas propiedades cambian con el ensamblaje receptor-huésped.
3. Espaciador: el cual modula la interacción electrónica entre los dos componentes anteriores.

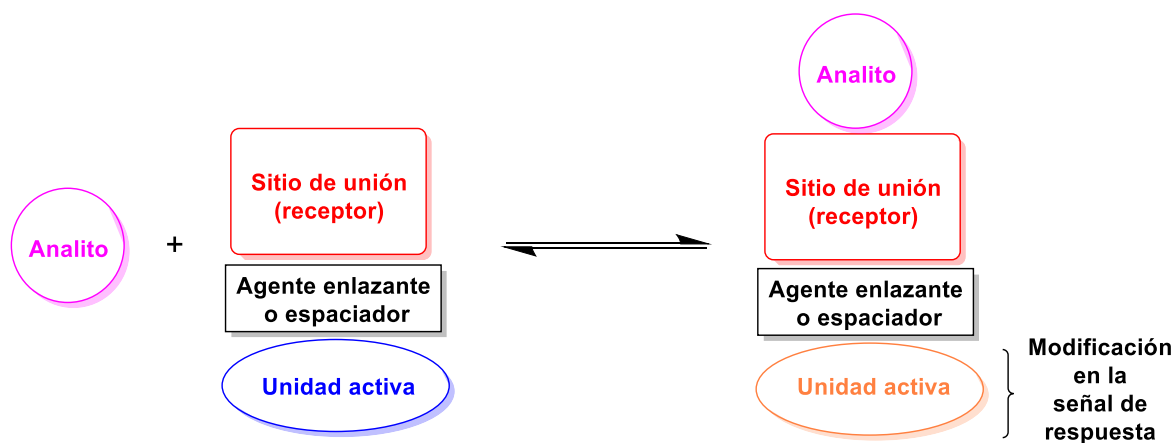


Figura 5. Representación esquemática de un sensor molecular.



La afinidad analítica es una cuestión primordial en el diseño de los sensores moleculares, por lo que el frecuente desafío es mejorar la sensibilidad al aumentar la fuerza de unión del receptor con el huésped. Un receptor artificial se une a la molécula huésped por una atracción electrostática, sea puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, receptor-donante π - π , interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, etc., es por ello que su estudio se incluye dentro del campo de la química supramolecular.⁹ Por definición el sitio de unión de un sensor molecular no puede ser de origen biológico (ej. un anticuerpo o enzima), sino que debe ser un receptor artificial esto por su origen abiótico, sin embargo, al incorporar un receptor biótico como lo es una biomolécula, se puede conseguir esa afinidad y selectividad por analitos biológicos, cuando estos sucede se habla de sensores biológicos, en los que el único cambio es el origen del receptor que se incorpora en la molécula.²

Los conjuntos supramoleculares se han utilizado ampliamente en áreas como medicina y biología en seguridad alimentaria, control de procesos, detección ambiental, catálisis molecular y generación de imágenes, como una herramienta de diagnóstico y monitoreo. Se ha prestado especial atención en la obtención de imágenes fluorescentes, porque éstas ofrecen alta selectividad, detección en tiempo real instrumentación de bajo costo y no son destructivas, por lo que se utilizan como una herramienta analítica para monitorear muchos procesos biológicos.^{9,10}

De esta manera surge el diseño de sensores ópticos, que son dispositivos moleculares que inducen cambios en las propiedades fotofísicas al unirse con el analito de interés, por lo que resultan ser muy sensibles y adecuados para el uso en sistemas biológicos. Se clasifican por su respuesta de señalización en fluorogénicos (también llamados fluorescentes), y cromogénicos. Los sensores fluorogénicos son aquellas moléculas que pueden interactuar selectiva y reversiblemente al analito, produciendo un cambio en la fluorescencia, mientras que los sensores cromogénicos son aquellas moléculas que pueden interactuar selectiva y reversiblemente con el sustrato mediante un cambio de color.⁹



2.3 Sensores fluorescentes

El concepto de sensor o quimiosensor fluorescente fue introducido por primera vez por Lynn R. Sousa y James M. Larson en 1977, quienes plantearon en su estudio que los cationes de varios compuestos de coordinación de metales alcalinos, provocaban una perturbación en la emisión de los éteres corona mostrados en la figura 6.

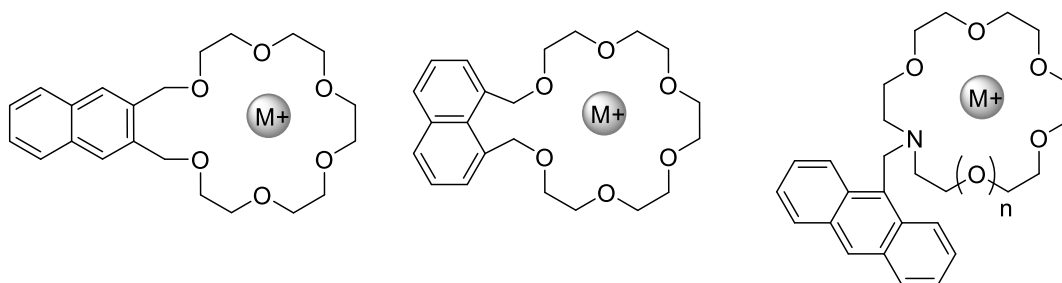
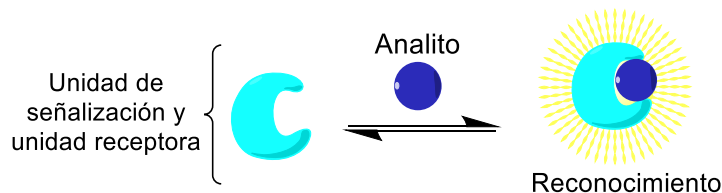


Figura 6. Primeros sensores fluorescentes.

El diseño de un sensor o quimiosensor fluorescente consta de un receptor responsable del reconocimiento molecular del analito y una unidad activa (fluoróforo) responsable de señalar el evento de reconocimiento, por lo general, la parte receptora y el fluoróforo están unidos por un agente enlazante o espaciador.¹¹

Existen 3 estrategias para el diseño de este tipo de sensores:¹²

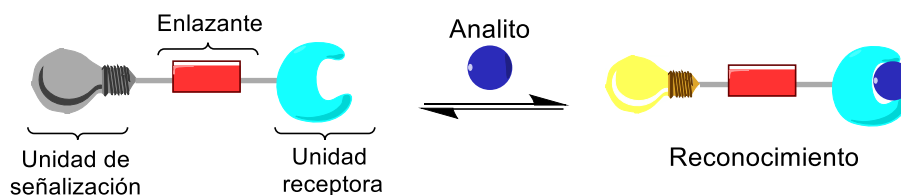
- I. Sensores fluorescentes intrínsecos: son moléculas en las que el mecanismo por el que se produce la transducción de la señal involucra la interacción del analito con un ligando que forma parte del sistema del fluoróforo. Es decir, la unidad receptora a su vez es la unidad de señalización (Esquema 1).



Esquema 1. Mecanismo de funcionamiento de sensores fluorescentes intrínsecos.

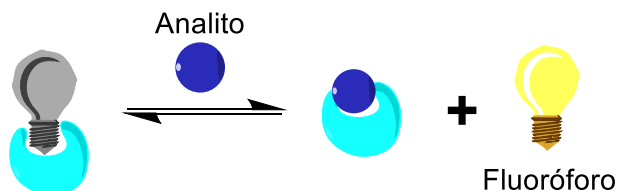


- II. Sensores fluorescentes extrínsecos: son aquellos en los que el receptor y el fluoróforo se encuentran unidos covalentemente, pero son electrónicamente independientes, esta unión covalente mediada por un agente enlazante hace que ambos constituyentes estén en estrecha relación, por lo que la interacción del receptor con el analito produce un cambio en el fluoróforo (Esquema 2).



Esquema 2. Mecanismo de funcionamiento de sensores fluorescentes extrínsecos.

- III. Sensores fluorescentes ensamblados: en este caso se da una interacción competitiva en la que el acoplamiento receptor-fluoróforo se disocia selectivamente por la adición de un analito que es capaz de interactuar con el receptor, induciendo una respuesta del fluoróforo (Esquema 3).



Esquema 3. Mecanismo de funcionamiento de sensores fluorescentes ensamblados.

En los últimos años, el diseño y síntesis de sensores fluorescentes basados en compuestos orgánicos se ha convertido en un campo de investigación de gran interés por diversos grupos de investigación a nivel internacional. En la literatura se pueden encontrar artículos de revisión



enfocados a la síntesis y aplicación de sensores fluorescentes. Las principales aplicaciones se enfocan en la detección de iones metálicos involucrados en procesos biológicos como la transmisión de impulsos nerviosos, contracción muscular regulación de la actividad celular, entre otros, los cuales son (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}),^{13,14} así como también iones metálicos tóxicos (Hg^{2+} , Pb^{2+})¹³, aniones (AcO^- , CN^- , F^- , ClO^- , H_2PO_4^-)^{11,13}, gases (H_2S)^{11,13}, entre otros analitos, cuya detección tanto en el organismo como en el medio ambiente es de suma importancia.

En la figura 7 se muestran algunos sensores selectos que detectan iones metálicos, aniones y gases de interés biológico.^{15,16,17,18,19,20,21,22}

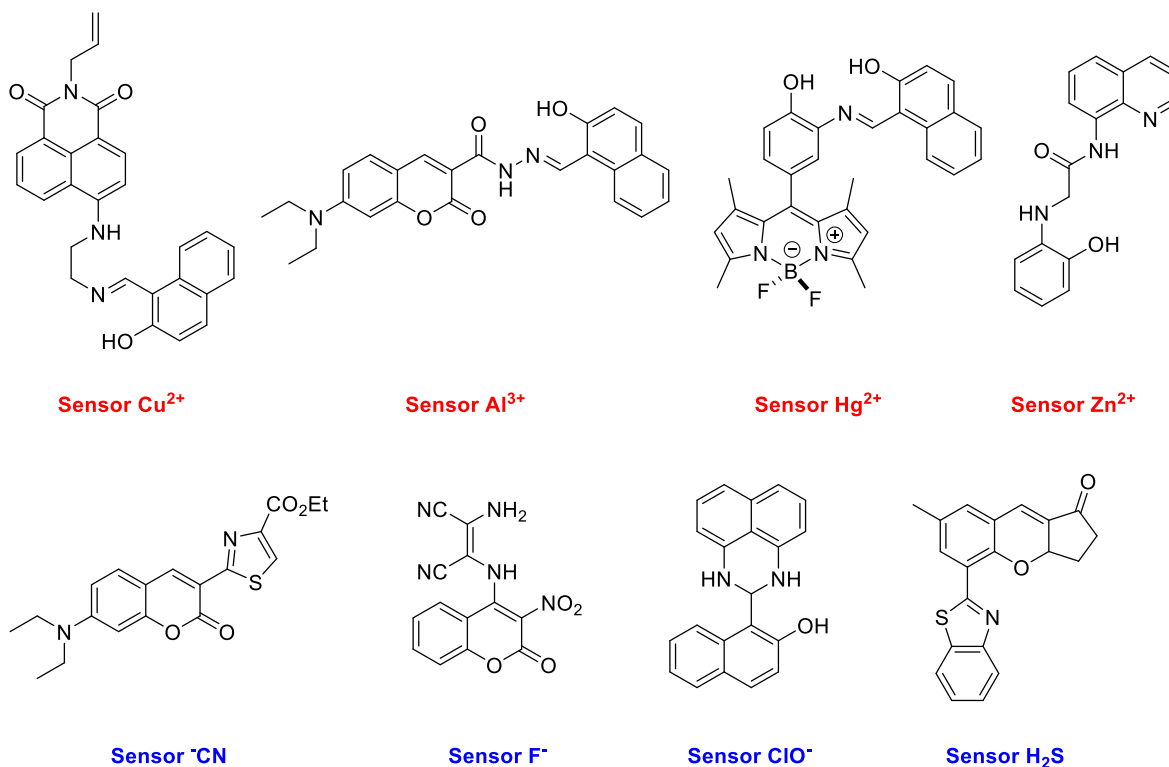


Figura 7. Ejemplos de sensores fluorescentes.

2.4 Aplicación de sensores fluorescentes

Como una alternativa para estudiar los sistemas biológicos, las tecnologías de bioimágenes se han convertido en herramientas de diagnóstico potentes y no invasivas, debido a que ofrecen un enfoque eficaz para monitorear muestras vivas intactas en tiempo real, además de que se vuelven



atractivas debido a que detectan una respuesta de activación, reflejada en una señal brillante sobre un fondo oscuro, lo que permite identificar un organelo específico, una célula o una especie química, en entornos biológicos. Esto, ha adquirido gran impacto en los últimos años en áreas como la biología celular, la biomedicina y la química supramolecular.¹⁰

Las técnicas de bioimágenes se basan principalmente en la capacidad de fluorescencia que presentan algunas moléculas presentes en los organismos vivos, sin embargo, para visualizar aquellas que no presentan fluorescencia se busca desarrollar herramientas que permitan captar imágenes *in-vivo*, además de que detecten y puedan responder a un objetivo específico en un sistema biológico, es por ello que en las últimas décadas muchos grupos de investigación han adoptado el diseño y síntesis de sensores moleculares, no sólo por su facilidad de uso, sino también por el hecho de que pueden proporcionar información específica, que ayude al estudio y comprensión de dichos sistemas.²³

De esta manera los sensores fluorescentes proporcionan cada vez más información sobre lo que anteriormente no se había visualizado como organelos celulares, metabolitos secundarios, metales e iones, diferenciación de tejidos, etc., funcionando incluso como herramientas de diagnóstico, aunado a esto el desarrollo de nuevas técnicas de imágenes de super-resolución ha permitido la visualización de características celulares con detalles que décadas atrás podrían parecer inaccesibles.^{24,25}

2.5 Esteroides

El nombre general de “esteroide” se introdujo en 1939 para reunir a todos los compuestos que poseen un esqueleto del tipo esterol. Los esteroides son lípidos derivados del colesterol y están ampliamente distribuidos en los organismos eucariontes, tanto en el reino animal como vegetal. En la figura 8 se muestran los esqueletos fundamentales encontrados en los esteroides naturales y sintéticos, que son el estrano (formado por 19 carbonos, con grupo metilo en C-13), el androstano (formado por 19 carbonos, con grupos metilo en C-10 y C-13), el pregnano (formado por 21 carbonos, con grupos metilo en C-10, C-13 y cadena lateral en C-17) y el colestano (formado por 24 carbonos, con grupos metilo en C-10, C-13 y cadena lateral en C-17).^{26,27}

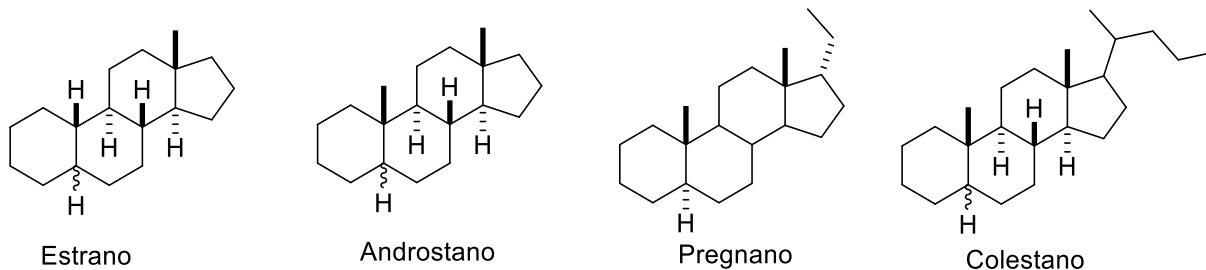


Figura 8. Esqueletos fundamentales de los esteroides.

En las estructuras mostradas en la Figura 9 se distingue la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno el cual está constituido por cuatro anillos, tres de ellos son ciclohexanos y el restante es un ciclopentano, los cuales están fusionados y se denominan como anillos A, B, C y D. La conformación de estos anillos depende de la unión en los carbonos 5, 10, 8, 9, 13 y 14. En algunos esteroides la unión en los anillos A y B puede ser tanto *trans* como *cis*, mientras que en los anillos B y C esta unión es sólo *trans* (esteroides naturales) y la unión en los anillos C y D por lo general es *trans* pero hay casos de una unión *cis* (Figura 9).²⁶

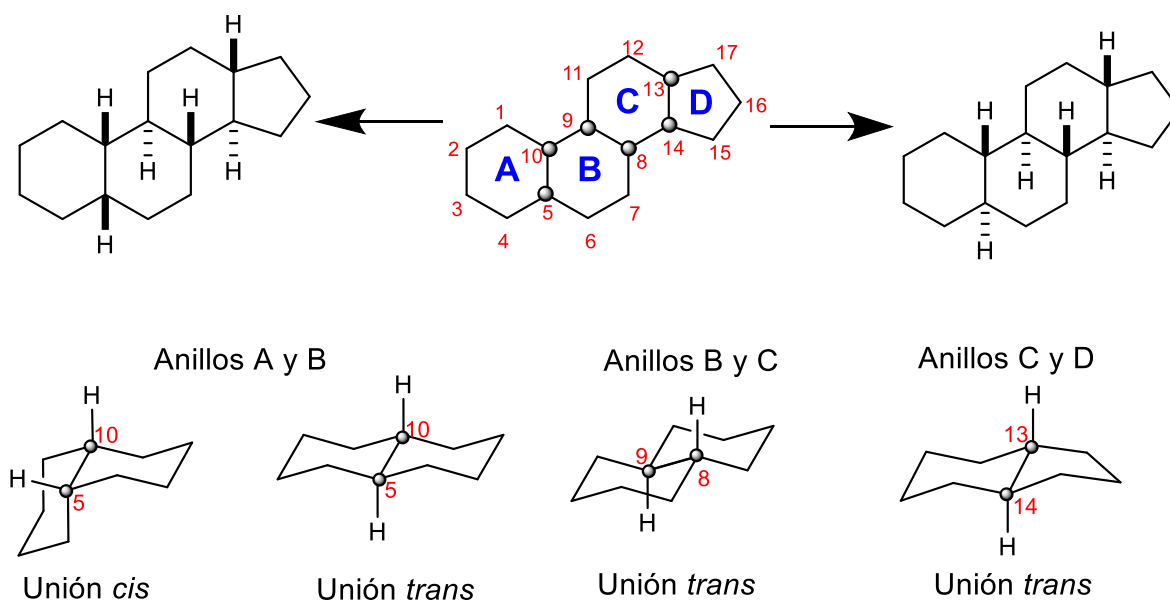


Figura 9. Esqueleto básico presente en los esteroides.



Los descriptores estereoquímicos de los sustituyentes y de las uniones anulares son importantes para entender la estereoquímica de los esteroides. Para los sustituyentes, su naturaleza se indica mediante los prefijos o sufijos acostumbrados (di-, tri-, tetra-, etc.) y la posición se indica mediante el número del átomo de carbono al cual está unido, si el sustituyente se encuentra orientado por encima del plano anular se designa el descriptor β (beta), representado por un trazo continuo, mientras que si el sustituyente se encuentra por debajo del plano anular se designa el descriptor α (alfa), y se representa por una línea punteada; si no se conoce la orientación se designa el descriptor ξ (epsilon).²⁶

Es importante destacar que la estereoquímica en el carbono 5 se designa siempre por el descriptor correspondiente α o β , esto debido a que las variaciones en este carbono son más frecuentes que en otras uniones anulares. Por otro lado, cuando existe una insaturación en tal posición, generalmente las posiciones 4-5 o 5-6, se utiliza el descriptor Δ , resultando Δ^4 si el doble enlace se encuentra entre el carbono 4-5 o Δ^5 si el carbono se encuentra en la posición 5-6.^{26,28}

La configuración de los cuatro anillos en el esqueleto esteroideal y la posición relativa de los grupos funcionales, determinan la actividad que presentan los esteroides. De tal modo que las modificaciones estructurales (transformaciones o adiciones de grupos funcionales) inducen cambios importantes en dicha actividad.²⁸

Los esteroides al ser biomoléculas ampliamente distribuidas en los eucariontes tienen un papel muy importante en el campo farmacológico debido a su actividad en el organismo. En el mercado de la medicina podemos encontrar fármacos derivados de esteroides, por ejemplo la Dexametasona indicada para el tratamiento de edema cerebral, traumatismo craneoencefálico, asma aguda, tratamiento parenteral de enfermedades dermatológicas, artritis reumatoide, entre otras indicaciones; la Prednisona indicada para el tratamiento de insuficiencia renal, enfermedades reumáticas, enfermedades inflamatorias oculares, entre otras y la Finasterida indicada para el tratamiento de cáncer de próstata, esto por mencionar algunos medicamentos (Figura 10).²⁹

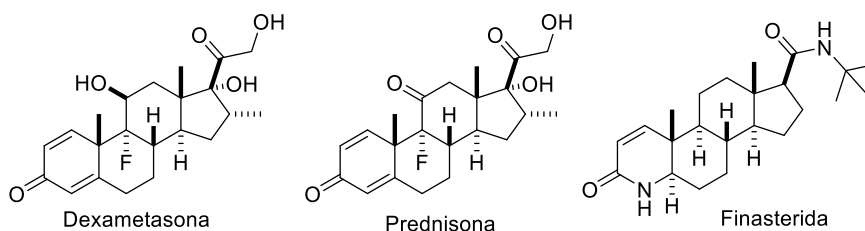


Figura 10. Estructuras de medicamentos derivados de esteroides.

Algunos derivados de la testosterona son comúnmente utilizados en el entorno deportivo y son mejor conocidos como esteroides anabolizantes androgénicos. Estos esteroides se administran con la finalidad de mejorar el rendimiento físico, aumentar la masa muscular y la fuerza. Sin embargo, estos fueron desarrollados con objetivos diferentes como tratar el hipogonadismo, la pubertad tardía, mejorar el dolor óseo en la osteoporosis y el cáncer de mama. Incluso en la segunda guerra mundial eran utilizados en el tratamiento de pacientes terminales, o que presentaban traumatismos, quemaduras o depresiones. Algunos ejemplos de esteroides anabolizantes androgénicos son el danazol, la luoximesterona, la metiltestosterona, la oxandrolona, la oximetolona, el estanozolol, el fenilpropionato de nandrolona y el propionato de testosterona (Figura 11).^{30,31}

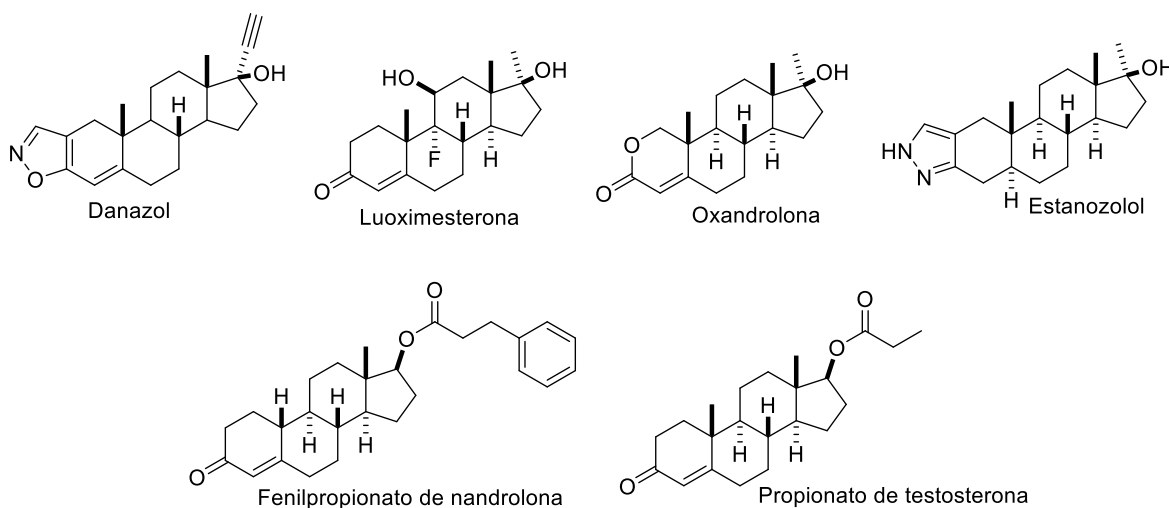
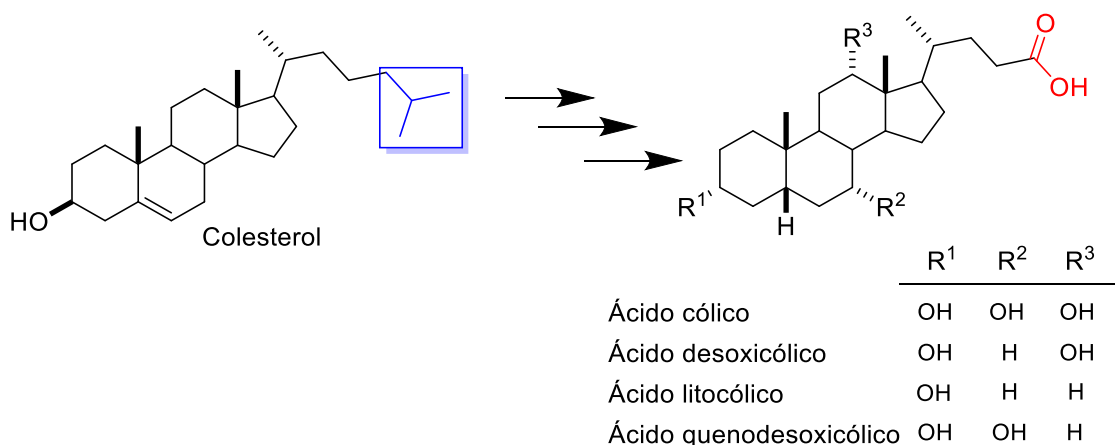


Figura 11. Esteroides anabolizantes androgénicos.



2.6 Ácido cólico y ácido desoxicólico

El ácido cólico (AC) y desoxicólico (ADC) son esteroides de la familia de los ácidos biliares (AB), que son metabolitos esteroideos que se encuentran predominantemente en la bilis de varios animales y su biosíntesis es a partir del colesterol, a través de una serie de hidroxilaciones seguida de la pérdida del fragmento isopropilo de la cadena lateral (Esquema 4). Estos AB tienen una estructura química específica, ya que están constituidos por 24 carbonos formando un núcleo esteroideo hidrofóbico, con grupos hidroxilo que varían en número, posición y orientación. El número de grupos hidroxilo y la cadena lateral que contiene un grupo ácido carboxílico son los responsables de la diferencia en la solubilidad y la actividad de estos compuestos.^{32,33}



Esquema 4. Colesterol y los ácidos biliares más abundantes.

Los principales AB humanos son cuatro, el cólico y quenodesoxicólico, que se denominan como ácidos primarios, mientras que el desoxicólico y litocólico se denominan ácidos secundarios. Estos últimos son producidos por la microbiota intestinal a partir de los AB primarios (Esquema 4).³²

Los AB naturales presentan una unión *cis* en los anillos A y B, lo que deriva en una ligera curvatura del esqueleto, por lo que estas moléculas presentan dos hemisferios bien definidos: un lado convexo, que es el lado β hidrofóbico (no polar) en el cual se encuentran los grupos metilo



angulares es decir C-18, C-19 y C-21, y un lado cóncavo, que es el lado α hidrofílico (polar), en donde se encuentran orientados los grupos hidroxilo, esto le confiere a los AB propiedades fisicoquímicas (Figura 12).^{32,34}

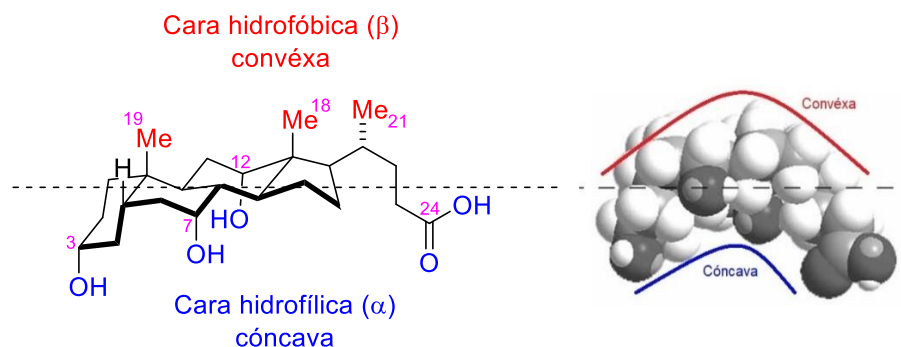


Figura 12. Hemisferios polar y no polar del ácido cólico.

Por ello es que los ácidos biliares en su mayoría son de naturaleza anfifílica lo que les confiere gran actividad superficial y en soluciones acuosas pueden formar pequeñas micelas o agregados supramoleculares, esto es conocido como proceso de solubilización micelar y tiene relevancia tanto en el campo fisiológico como farmacéutico ya que gracias a ello los ácidos biliares pueden emulsificar y absorber de la dieta, las grasas, vitaminas liposolubles y demás moléculas lipofílicas.^{34,35}

Después de su biosíntesis en el hígado los AB se concentran en la vesícula biliar, la ingesta de alimentos inicia la secreción de bilis en el intestino delgado, en donde los AB ejercen sus principales funciones fisiológicas, tales como solubilizar las grasas, los ácidos grasos y las vitaminas liposolubles facilitando su absorción y la regulación de la homeostasis de los lípidos, la glucosa y el colesterol.³³ Estas funciones son aprovechadas para distribuir en el mercado medicamentos como el ácido desoxicólico (Belkyra, solución inyectable, Almac Pharma Services, Ltd.), el cual es administrado en adultos para el tratamiento de la grasa no deseada debajo de la barbilla, y el ácido quenodesoxicólico (Cápsulas, Leadiant) utilizado para disolver los cálculos de colesterol con alto riesgo operatorio o inoperables.²⁹



Además de ejercer funciones fisiológicas los AB presentan actividades biológicas, que incluyen la acción antiinflamatoria, neuroprotectora (ácido ursodesoxicólico),³⁶ antifúngica (ácido cólico)³⁷ y antibacteriana (ácido cólico y desoxicólico).³⁸

2.7 Pregnenolona

La Pregnenolona es una hormona, que se origina del colesterol, y este a su vez es el esteroide precursor de la progesterona, esta conversión de colesterol en pregnenolona es el primer paso en la síntesis de los esteroides naturales. Este esteroide es producido principalmente por las glándulas suprarrenales, aunque también puede encontrarse en menor proporción en el cerebro, el hígado, la piel, los testículos y los ovarios.³⁹ Su estructura deriva del esqueleto del pregnano y está constituida de 21 carbonos con un grupo hidroxilo en el carbono 3 con orientación β , y con una insaturación en los carbonos 5 y 6 (Figura 13).

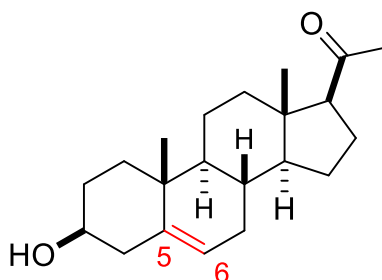


Figura 13. Estructura de la pregnenolona.

La pregnenolona se clasifica como un neuroesteroide debido a que un gran porcentaje se sintetiza en el cerebro y por tanto está involucrada en varias funciones cerebrales, estas funciones se establecen a través de receptores intracelulares específicos.⁴⁰ Existen estudios que demuestran que la pregnenolona y sus derivados (principalmente pregnenolona sulfatada) pueden mejorar la memoria y el aprendizaje en roedores, estableciendo efectos que toman importancia en trastornos o desordenes en los que la cognición se ve deteriorada.^{41,42} Particularmente los efectos de la pregnenolona han tenido impacto en pacientes con esquizofrenia, ya que a largo plazo ayuda a mejorar la calidad de vida de los pacientes.⁴³



Recientemente Krausova B. y colaboradores,⁴⁴ reportaron la síntesis de 24 ésteres de ácido carboxílico derivados de pregnenolona y andros-5-eno y evaluaron su relación estructura-actividad para modulación en los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales son canales de iones permeables al calcio, implicados en mecanismos de transmisión sináptica que derivan en procesos de memoria y aprendizaje. La serie de compuestos evaluados se caracterizan por contener un sustituyente hemiéster en la posición 3 que varía en el número de carbonos, un doble enlace entre las posiciones 5 y 6, además de varias modificaciones en el carbono 17 (Figura 14). Mediante sus estudios encontraron que todos los compuestos sintetizados tienen una actividad positiva como moduladores de la actividad de los receptores NMDA, resultando ser los más eficaces aquellos que contienen el fragmento hemisuccinato y hemipimelato, incluso mostrando una mejor actividad que la pregnenolona endógena; además, determinaron que el sustituyente en la posición 17 puede ser estructuralmente modificado, sin que los compuestos pierdan dicha actividad, con esto se ofrecen nuevas perspectivas de compuestos neuroactivos, para desarrollar nuevos medicamentos basados en esteroides.

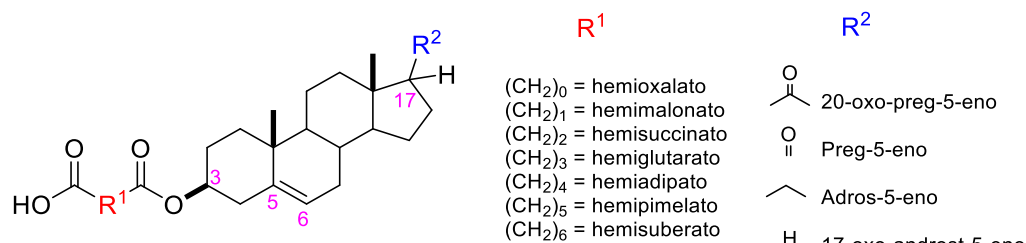


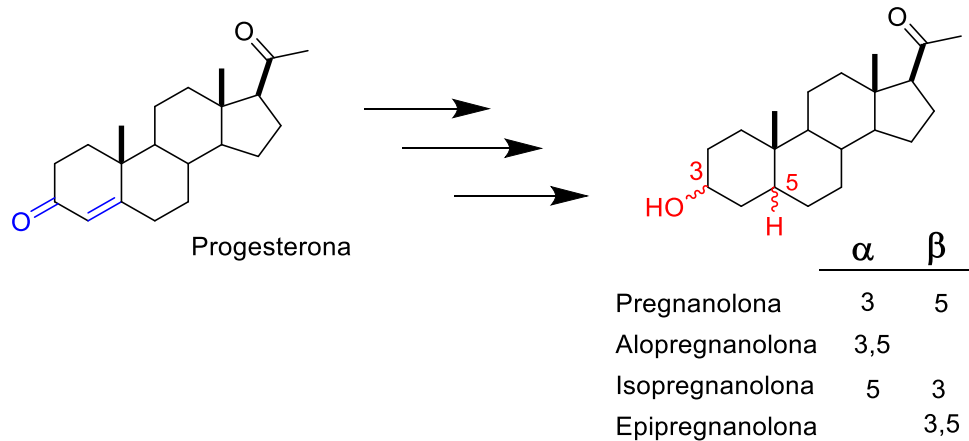
Figura 14. Hemiésteres derivados de pregnenolona y androsteno.

En el mercado se encuentra un suplemento de pregnenolona que es distribuido por *Quality Supplements and Vitamins, Inc.*, el cual está indicado para tratar la depresión, disminuir los niveles de estrés, mejorar el humor, estimular la concentración y las funciones mentales en general. Este suplemento es recomendado para personas mayores de 40 años, debido a que este metabolito natural va disminuyendo conforme el cuerpo envejece.



2.8 Pregnanolona

La pregnanolona es un esteroide natural que se origina a partir de la progesterona, es sintetizada en el sistema nervioso central, por lo que es considerada como un neuroesteroide. Su estructura se deriva del pregnano, la cual está constituida de 21 carbonos y presenta un grupo hidroxilo en el carbono 3, el cual puede variar en orientación α o β al igual que el hidrógeno del carbono 5. Esto se debe a que, en la biosíntesis a partir de la progesterona, la cual se da en dos pasos, pueden intervenir uno de los isómeros de las 2 enzimas, la 5α -reductasa o 5β -reductasa para el primer paso y la 3α -hidroxiesteroloxidoreductasa o 3β -hidroxiesteroloxidoreductasa para el segundo paso. Por esta razón existen 4 isómeros de la pregnanolona (Esquema 5).^{45,46}



Esquema 5. Pregnanolona y sus isómeros.

Tanto la progesterona como sus metabolitos (pregnanolona e isómeros) se sintetizan en diferentes regiones del cerebro, por lo que se clasifican como neuroesteroides, es por ello que poseen un amplio espectro de actividad biológica en el sistema nervioso central y periférico. El isómero alopregnanolona también ha demostrado poseer funciones anestésicas, analgésicas e hipnóticas ya que es un ligando potente de un receptor de esteroides, aunque en contraste el isómero isopregnanolona no se une directamente a receptores, pero si antagoniza de manera no competitiva con los receptores de la alopregnanolona. Este antagonismo potencia el efecto de ambos neuroesteroides.^{47,48}



2.9 3 β ,19-Dihidroxiesteroidepiandro-5-en-17-ona

La 3 β ,19-Dihidroxiesteroidepiandro-5-en-17-ona (19-OH-DHEA) es un esteroide sintético obtenido a partir de la deshidroepiandrosterona (DHEA). Su estructura se deriva del esqueleto del androstano, está constituida de 19 carbonos y presenta dos grupos hidroxilo en el carbono 3 y en el carbono 19, además presenta una insaturación en los carbonos 5 y 6 y un grupo carbonilo en la posición 17 (Figura 15).

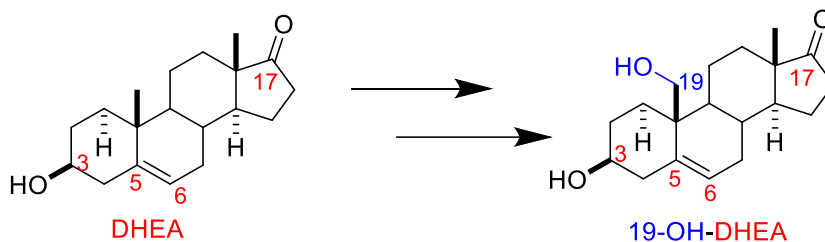


Figura 15. Obtención de 19-OH-DHEA.

P. Benes y colaboradores en el año 1971,⁴⁹ evaluaron una serie de derivados de la DHEA y de la pregnenolona como posibles inhibidores de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (enzima importante para el funcionamiento de los glóbulos rojos). Se encontró que aquellos derivados que contenían un grupo hidroxilo en la posición 3, en combinación con un grupo oxo en la posición 17 o 20, resultaron ser los inhibidores más potentes, mientras que la presencia de grupos oxo o hidroxilos adicionales en los carbonos 7 o 19, como es el caso de la 19-OH-DHEA, redujo la actividad inhibitoria considerablemente.

2.10 Cumarinas

Las cumarinas son compuestos heterocíclicos que están presentes en la naturaleza, pueden ser encontradas en plantas, hongos y bacterias. La estructura básica presente en las cumarinas es la 2H-1-cromen-2-ona, la cual consiste de dos anillos fusionados, una pirona y un benceno, además de un grupo carbonilo en la posición 2 (Figura 16).⁵⁰

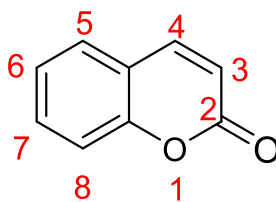


Figura 16. Estructura base de las cumarinas.

Las cumarinas están presentes en diversos productos naturales y sintéticos, presentando diversas actividades biológicas. Por ejemplo, el Dicumarol y la Warfarina (Aldocumar, Laboratorio ALDO-UNION, S.L.) son utilizados como anticoagulantes y el Novobiocin (Albamicina, Pfizer Inc.) que es un antibiótico producido por el actinomiceto *Streptomyces niveus*, indicado para el tratamiento de infecciones por estafilococos (Figura 17).⁵¹

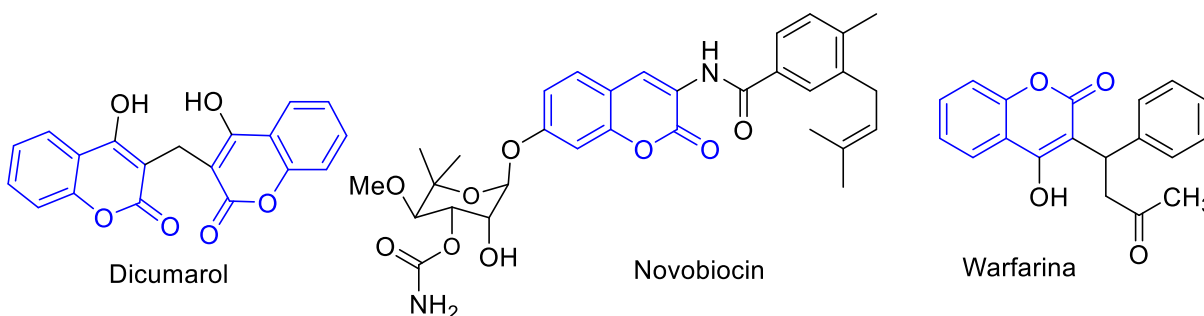


Figura 17. Fármacos que contienen el fragmento *2H*-1-cromen-2-ona.

Aunque la cumarina base no presenta fluorescencia o la presenta muy débil, es importante mencionar que las cumarinas adecuadamente sustituidas son fluorescentes en el rango de luz visible (380-750 nm), por lo que son de gran interés en la síntesis de sensores moleculares. De tal manera que grupos electrodonadores (NH_2 , OH , NR_2) en las posiciones 6 y 7 o grupos electroattractores (NO_2 , CN , $\text{RC}=\text{O}$) en las posiciones 3 o 4 de la cumarina, dan como resultado una emisión batocrómica, que es un efecto que consiste en el desplazamiento del espectro de absorción de una sustancia hacia longitudes de onda mayores (longitudes de onda de menor



energía), siendo que el color rojo tiene la mayor longitud de onda en el espectro visible a este efecto también se le denomina “desplazamiento al rojo” (Figura 18).⁵²

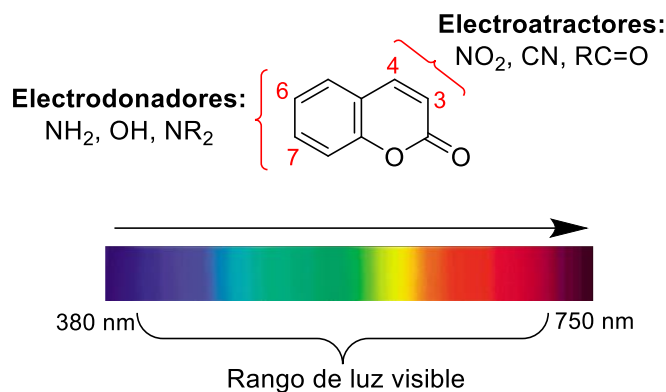


Figura 18. Sustituciones en la cumarina con fluorescencia en el rango de luz visible.

El grupo dietilamino es un grupo funcional que mejora la fluorescencia de la cumarina y su incorporación en la posición 7 es sintéticamente accesible, es por ello que la 7-dimetilaminocumarina es un compuesto muy atractivo en el diseño de sensores moleculares fluorescentes.⁵²

2.11 Sensores fluorescentes basados en compuestos esteroide-cumarina

Actualmente, hay pocos ejemplos de sensores fluorescentes basados en esteroides, permitiendo incursionar en la síntesis de una nueva clase de sensores que pueden ser aplicados tanto en la detección de analitos inorgánicos como orgánicos. En este contexto, Ju y colaboradores⁵³ reportaron la síntesis de un sensor fluorescente basado en el ácido desoxicólico. El sensor está conformado por el fragmento esteroidal que es la estructura base, el fragmento 1,2,3-triazol que es el agente enlazante y además actúa como ligante (punto clave para la función del sensor) y por último el fragmento de cumarina que es el fluoróforo (Figura 19).

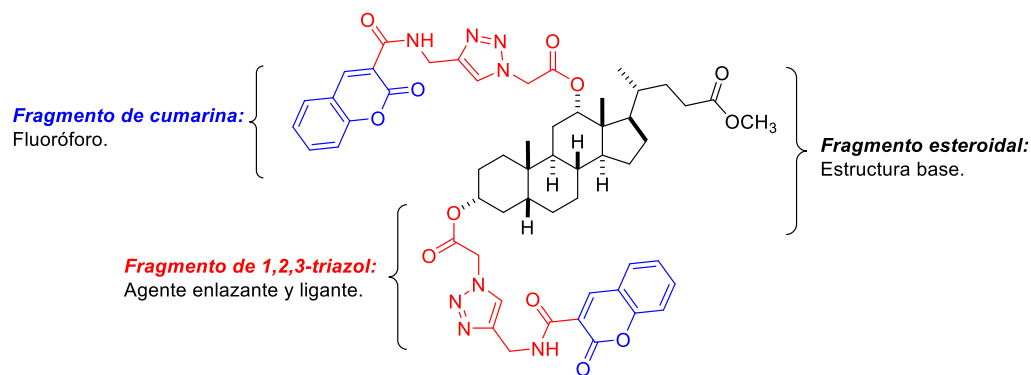


Figura 19. Sensor fluorescente basado en el ácido desoxicólico.

La evaluación de este sensor consistió en el reconocimiento de algunos iones metálicos divalentes, mostrando un reconocimiento selectivo hacia el ion Cu^{2+} , ya que la fluorescencia que presenta el sensor por si solo (turn-on), se pierde al formar un complejo entre el ion Cu^{2+} y el átomo de nitrógeno en la posición 3 del heterociclo triazol. Este complejo de cobre con una fluorescencia apagada (turn-off), actúa como segundo sensor selectivo para el ion H_2PO_4^- , ya que la respuesta de encendido del sensor (turn-on) no se observó con los otros aniones evaluados. Este segundo sensor del complejo de cobre, también demostró ser eficiente en la detección de α -aminoácidos, ya que se observó la respuesta de encendido del primer sensor (Figura 20).

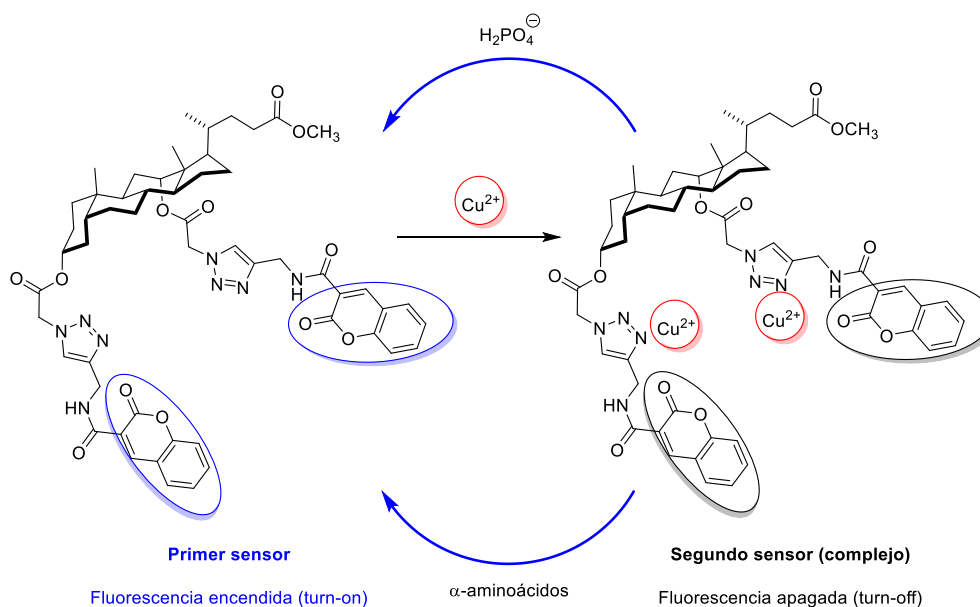


Figura 20. Aplicaciones del sensor fluorescente basado en un ácido biliar.



Recientemente, Zhou y colaboradores⁵⁴ reportaron la síntesis y aplicación de un sensor fluorescente basado en el etinilestradiol, un esteroide sintético utilizado en la preparación de anticonceptivos orales. El sensor está constituido por el fragmento de la 7-dietilaminocumarina que es la responsable de la fluorescencia, el fragmento esterooidal favorece la permeabilidad del sensor y el fragmento del 1,2,3-triazol actúa como agente enlazante. Este sensor con una fluorescencia encendida mostró una alta afinidad con los receptores de estrógeno debido a las interacciones no covalentes de los fragmentos cumarina y estradiol con la cavidad del receptor. Cabe mencionar que el sensor se evaluó en células vivas permitiendo visualizar los receptores de estrógeno, lo que contribuye al desarrollo de métodos de imagen en tiempo real, permitiendo llevar a cabo estudios biológicos relacionados a los receptores de estrógeno (Figura 21).

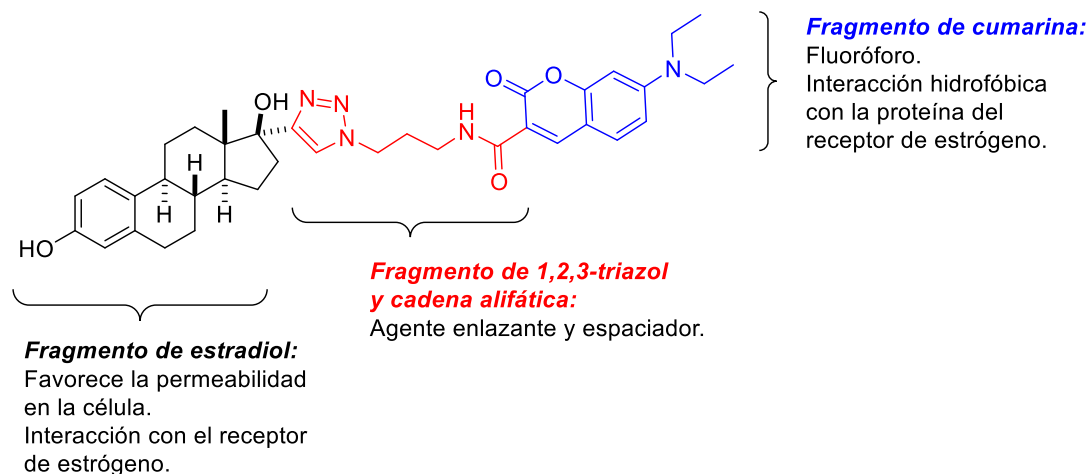


Figura 21. Sensor fluorescente basado en el etinilestradiol.

Otro ejemplo de sensor fluorescente es el reportado por Ming y colaboradores,⁵⁵ quienes en sus estudios diseñaron un sensor basado en un derivado del esteroide $5\alpha,8\alpha$ -endoperóxido. Los endoperóxidos naturales son farmacóforos importantes en compuestos biológicamente activos, además de que presentan una variedad de actividades como antifúngicos, antivirales y anticancerígenos; entre los epóxidos naturales se encuentran los endoperóxidos esteroideos, de los cuales los autores en estudios previos descubrieron que algunos presentaban actividad citotóxica contra algunas células cancerígenas, en especial los más prometedores son aquellos que contenían el puente peróxido en las posiciones 5 y 8. Con base en ello diseñaron y



sintetizaron el sensor constituido por un fragmento de un derivado de esterol $5\alpha,8\alpha$ -endoperóxido, que es la estructura base que posee la actividad y un fragmento de 3-carboxamido-7-(*N,N*-dimetilamino)cumarina que es el fluoróforo (Figura 22). Sus estudios mostraron una buena fluorescencia en imágenes de células de cáncer de hígado humano *in vitro*, revelando que este conjugado puede localizarse en la mitocondria; además, se encontró que el fluoróforo contribuyó en gran medida a que el derivado de esterol $5\alpha,8\alpha$ -endoperóxido presentará mayor actividad antiproliferativa.

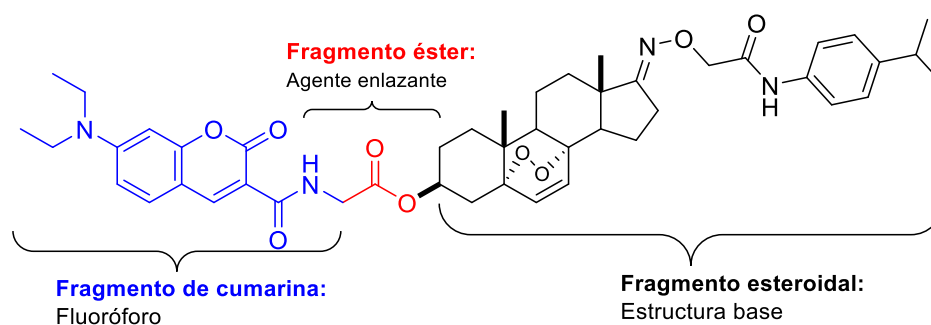


Figura 22. Sensor fluorescente basado en un derivado esterol $5\alpha,8\alpha$ -endoperóxido.

En la literatura se encuentran otros ejemplos de sensores basados en esteroides (principalmente a base de ácidos biliares), que detectan diferentes tipos de analitos. En la Figura 23 se muestran algunos sensores selectos que detectan iones metálicos y aniones de interés biológico.^{56,57,58,59}

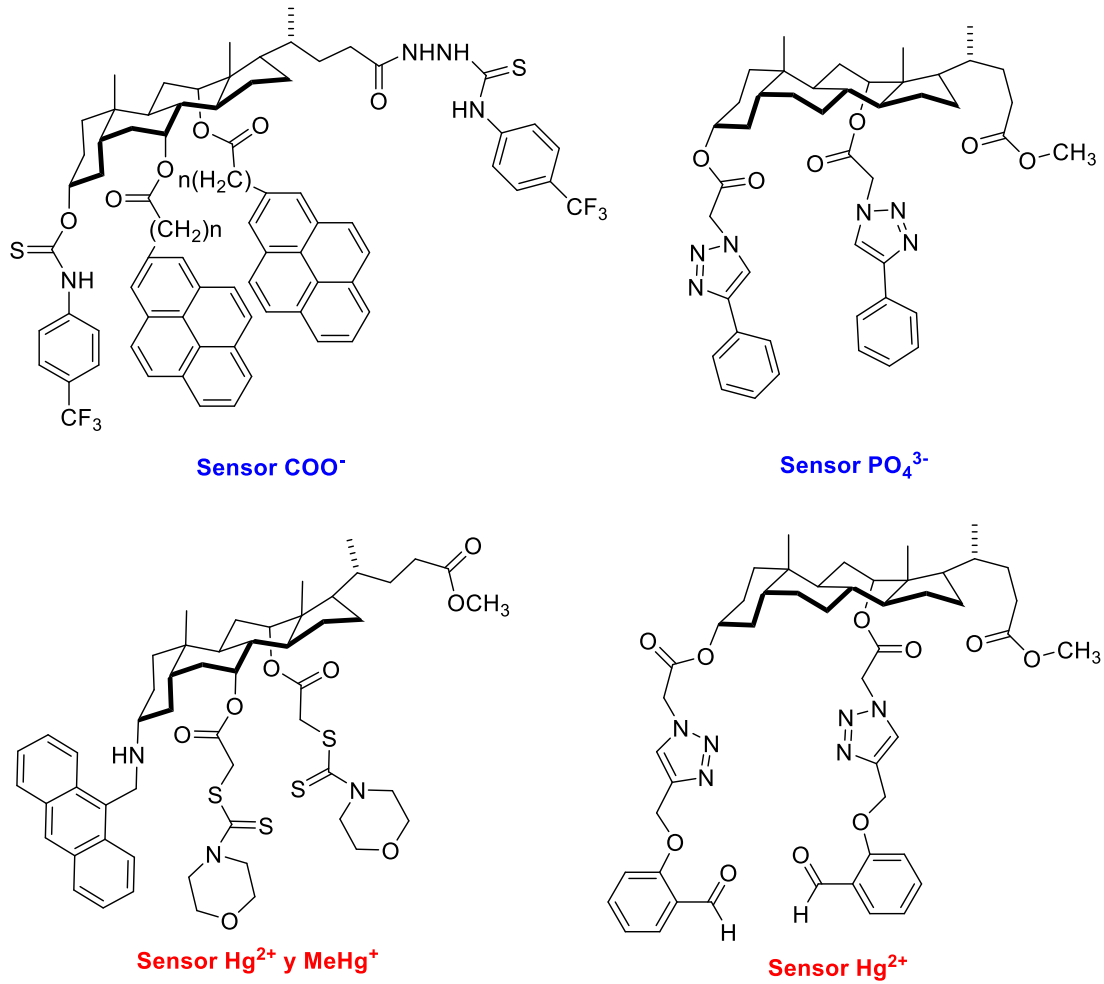


Figura 23. Ejemplos de sensores basados en ácidos biliares.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



3. Planteamiento del problema

Actualmente, el desarrollo de nuevos sensores fluorescentes basados en compuestos orgánicos es de gran interés a nivel mundial. En este sentido, diversos grupos de investigación han hecho importantes contribuciones al respecto, tanto en la síntesis como en la aplicación de dichos compuestos. En la literatura se encuentran muy pocos reportes de sensores fluorescentes basados en esteroides, permitiendo incursionar en la síntesis y aplicación de esta clase de compuestos.

Con el fin de contribuir en el desarrollo de sensores fluorescentes, en el presente proyecto se planteó sintetizar y caracterizar compuestos que combinan el fragmento esterooidal con el fragmento cumarina, los cuales resultan candidatos promisorios como sensores en sistemas químicos y/o biológicos para la generación de bioimágenes (Figura A).

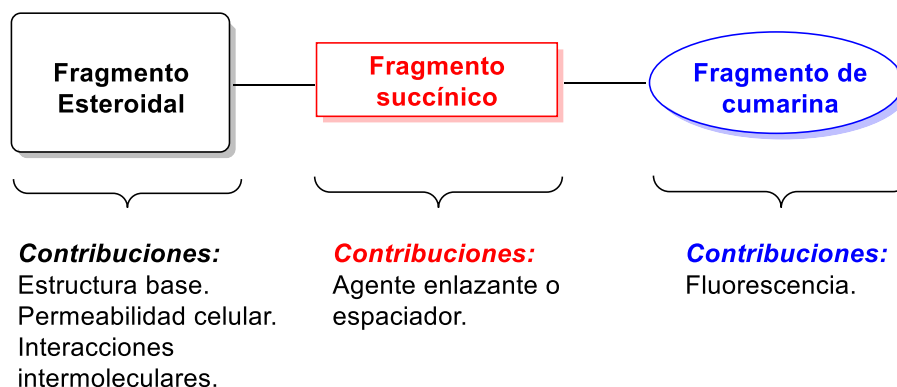


Figura A. Representación esquemática de los compuestos objetivo del presente trabajo.



HIPÓTESIS



4. Hipótesis

A partir de esteroides de origen natural y sintético se sintetizarán por metodologías novedosas nuevos compuestos que contengan el fragmento esterooidal y el fragmento cumarina, tales fragmentos aportarán ciertas propiedades (fluorescencia, permeabilidad, solubilidad, interacción intermolecular) a los compuestos objetivo.



OBJETIVOS



5. *Objetivos*

- *General*

Sintetizar, purificar y caracterizar los derivados esteroidales que incorporan el fragmento cumarina, por medio de metodologías novedosas, los cuales por su estructura podrán ser utilizados en sistemas químicos y/o biológicos para la generación de bioimágenes.

- *Particulares*

- I. Sintetizar y purificar los hemisuccinatos derivados de ácido cólico, isopregnanolona, pregnenolona y 3 β ,19-Dihydroxideshidroepiandro-5-en-17-ona empleando una reacción de Einhorn.
- II. Sintetizar y purificar la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina y la 3-aminocumarina empleando metodologías reportadas en la literatura.
- III. Sintetizar y purificar las amidas derivadas de los ésteres con ácido succínico de los derivados esteroidales empleando una reacción de acoplamiento.
- IV. Caracterizar los hemisuccinatos esteroidales y las amidas esteroidales, por RMN 1D (^1H y ^{13}C) y RMN 2D (HSQC, HMBC), así como por infrarrojo, espectrometría de masas y difracción de Rayos X de monocristal.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



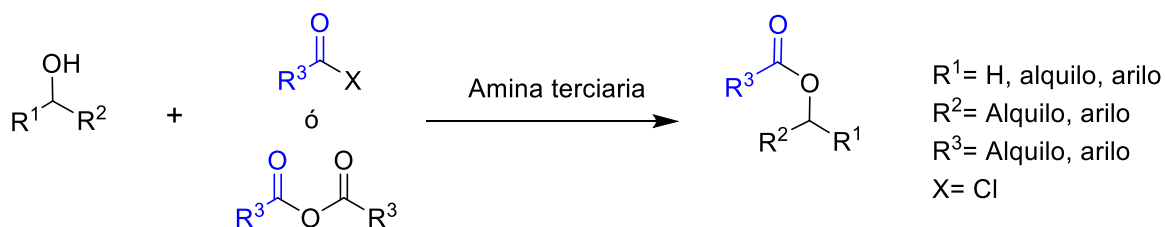
6. Resultados y discusión

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos del presente trabajo. La primera parte involucra la síntesis de los compuestos objetivo, continuando con la caracterización espectroscópica y por último la caracterización de fluorescencia y algunos resultados de la evaluación como sensores fluorescentes.

6.1 Síntesis

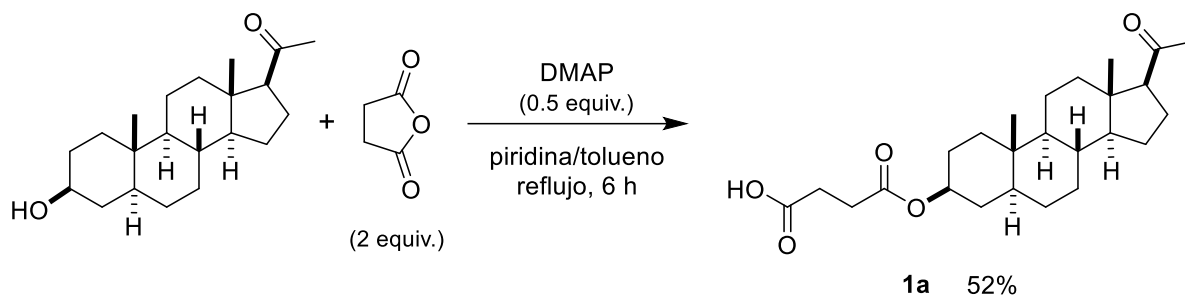
6.1.1 Hemisuccinatos esteroidales

La primera etapa de este trabajo consistió en la síntesis de los hemisuccinatos esteroidales necesarios para obtener los compuestos objetivo. La obtención de los compuestos **1a**, **2a**, **3a**, **5a**, **5b**, **8a** y **8b** se efectuó mediante una acilación de Einhorn, la cual consiste en hacer reaccionar un alcohol con un anhídrido o haluro de acilo en presencia de una amina terciaria. La función de la amina en este tipo de reacción se ha identificado como un catalizador, además de actuar como una base, la reacción general se puede observar en el esquema 6.⁶⁰



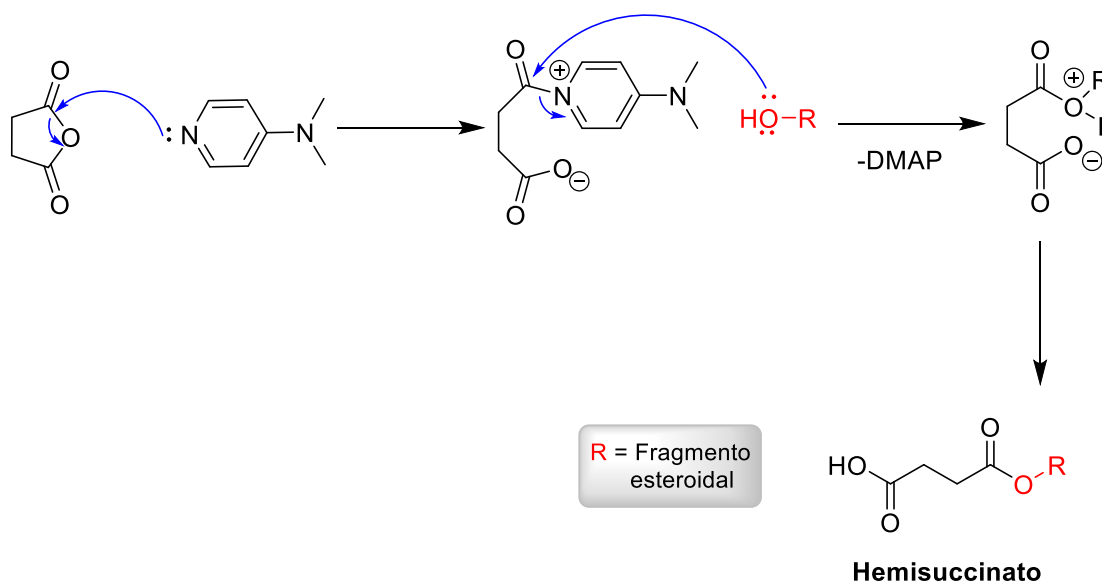
Esquema 6. Reacción de Einhorn.

Con base en la reacción de Einhorn se llevó a cabo la síntesis del compuesto **1a** a partir de la isopregnanolona y 2 equivalentes de anhídrido succínico en presencia de DMAP y tolueno como disolvente. La reacción se mantuvo a reflujo por 6 horas, confirmando el término de la reacción por CCD (hexano-AcOEt 7:3 v/v). Después del aislamiento y purificación del hemisuccinato esteroidal **1a**, se obtuvo un rendimiento del 52% (Esquema 7).



Esquema 7. Síntesis del hemisuccinato esteroidal **1a**.

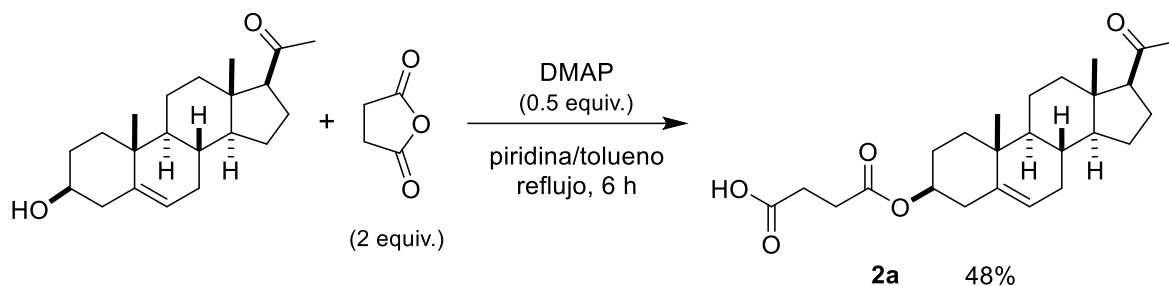
La reacción de Einhorn utilizada para sintetizar los hemisuccinatos esteroidales involucra una catálisis nucleofílica. En el esquema 8 se muestra el mecanismo de reacción conocido, el primer paso involucra una adición nucleofílica al anhídrido succínico para formar el ion *N*-acetil 4-dimetilaminopiridinio, que es el intermediario reactivo y es más electrofílico que el anhídrido; el segundo paso es el ataque nucleofílico del alcohol esteroidal al intermediario reactivo, liberando la DMAP y posteriormente protonando el carboxilato para formar el hemiéster deseado.⁶¹



Esquema 8. Mecanismo para la formación de los hemisuccinatos esteroidales.

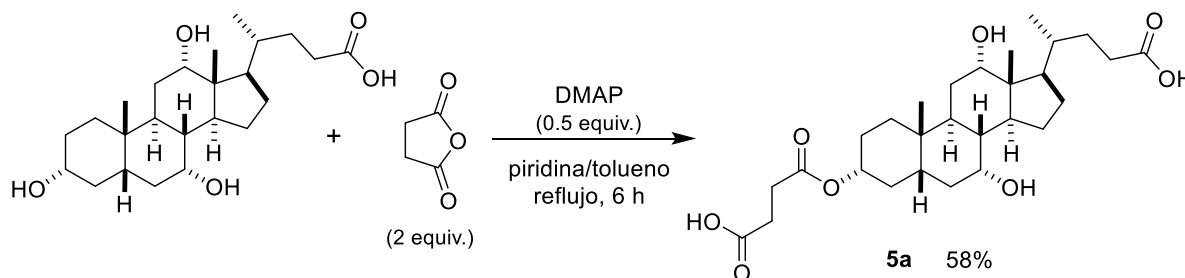


La síntesis del compuesto **2a** se llevó a cabo a partir de la pregnenolona y 2 equivalentes de anhídrido succínico en presencia de DMAP. La reacción se calentó a reflujo por 6 horas, decisión que se tomó por el monitoreo en CCD (hexano-AcOEt 7:3 v/v), verificando el consumo total materia prima. Después de la purificación por CC, el hemisuccinato esteroidal se obtuvo en un rendimiento del 48% (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis del hemisuccinato esteroidal **2a**.

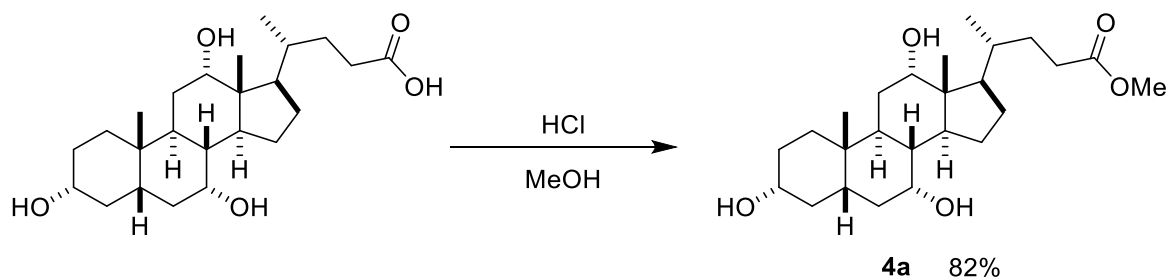
A partir del ácido cólico se llevó a cabo la síntesis del hemisuccinato **5a** utilizando 2 equivalentes de anhídrido succínico debido a que sólo se deseaba sustituir un grupo hidroxilo de los tres presentes en su estructura. Siguiendo las mismas condiciones de reacción utilizadas para los hemisuccinatos **1a** y **2a**, se obtuvo el compuesto **5a** en un 58% de rendimiento después de purificar por CC (Esquema 10), la regioselectividad para lograr la sustitución en la posición 3 se debe a que en reacciones de esterificación el grupo OH 3α (ecuatorial), reacciona más rápidamente que los OH 7α (axial) y 12α (axial).



Esquema 10. Síntesis del hemisuccinato esteroidal **5a**.

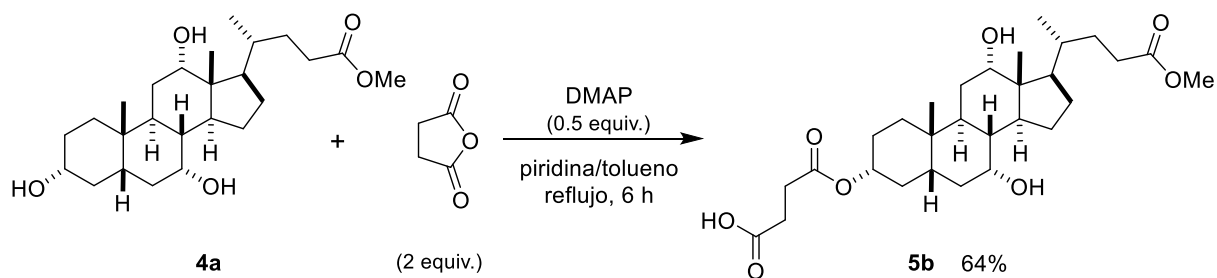


Para la síntesis del hemisuccinato **5b** fue necesario preparar el éster metílico del ácido cólico. La síntesis del éster **4a** se llevó a cabo mediante una esterificación de Fisher a partir del ácido correspondiente en metanol y cantidad catalítica de HCl, agitando a temperatura ambiente durante toda noche. El éster deseado **4a** se obtuvo en un 82% de rendimiento (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis del éster esteroideal **4a**.

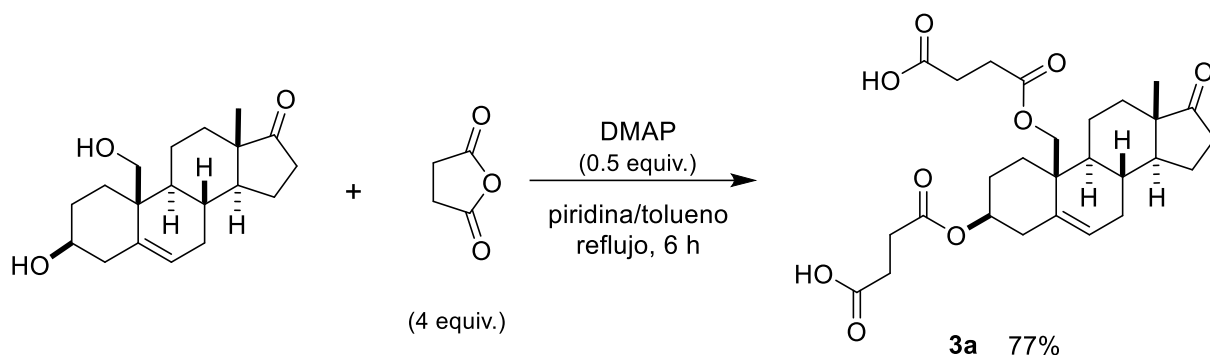
Con el éster esteroideal **4a** se llevó a cabo la síntesis del hemisuccinato **5b** empleando las condiciones de reacción establecidas previamente. Después de 6 horas de reacción y posterior purificación por CC, el compuesto deseado **5b** se obtuvo en un 64% de rendimiento (Esquema 12).



Esquema 12. Síntesis del hemisuccinato esteroideal **5b**.

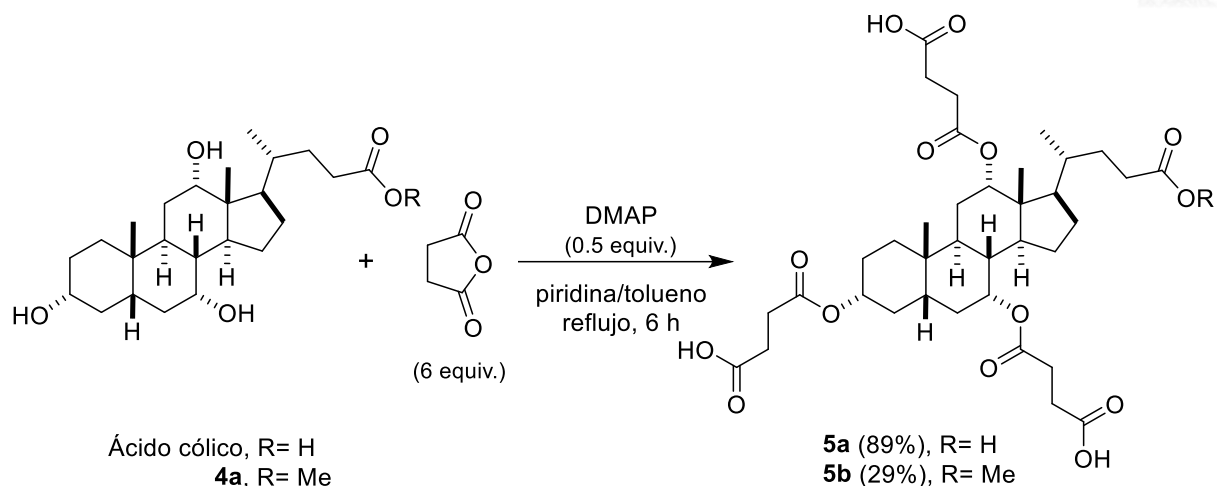


El siguiente hemisuccinato que se sintetizó fue el **3a** derivado del compuesto esterooidal 3 β ,19-dihidroxiesteroideandro-5-en-17-ona (19-OH-DHEA) y 4 equivalentes de anhídrido succínico para formar el dihemisuccinato en presencia de DMAP, calentando la reacción a reflujo por 6 horas. Concluido ese tiempo, la CCD (hexano-AcOEt 5:5 v/v) confirmó el consumo total de materia prima. Después de la purificación por CC del dihemisuccinato esterooidal **3a**, el rendimiento obtenido fue del 77% (Esquema 13).



Esquema 13. Síntesis del dihemisuccinato esterooidal **3a**.

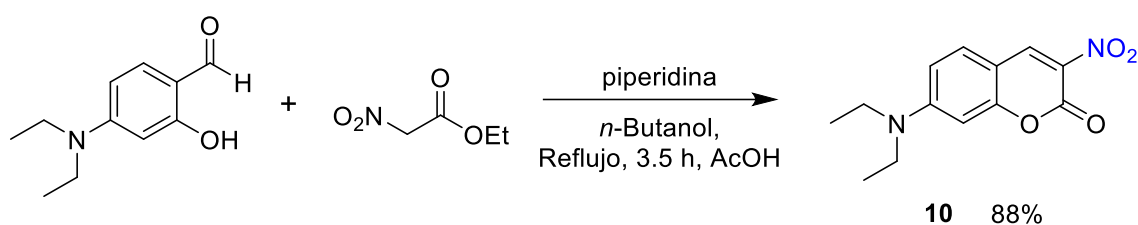
Finalmente, la síntesis de los compuestos **8a** y **8b** se llevó a cabo a partir del ácido cólico y de su éster metílico **4a**, respectivamente. Para el primer caso, el ácido cólico se hizo reaccionar con 6 equivalentes de anhídrido succínico (2 equivalentes por cada grupo hidroxilo), calentando la reacción a reflujo durante 6 horas. La placa cromatográfica eluida en AcOEt mostró la presencia de poca materia prima, sin embargo, se decidió dar por terminada la reacción y se procedió a aislar y purificar el compuesto de interés **8a**. El trihemisuccinato **8a** se obtuvo en un 89% de rendimiento. En el segundo caso, el éster esterooidal **4a** se sometió a las mismas condiciones de reacción que en el caso anterior, pero el rendimiento para **8b** fue del 29%. La placa cromatográfica de esta reacción mostró la presencia de un poco del éster **4a** (menos polar) y tres manchas más polares con R_f muy cercanos entre sí (Esquema 14).



Esquema 14. Síntesis de los trihemisuccinatos esteroidales **8a** y **8b**.

6.1.2 Aminocumarina

La síntesis de la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina **9a** se llevó a cabo en dos pasos de reacción. Primeramente, se preparó la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-nitrocumarina **10** a partir de 4-dietilaminosalicilaldehído y el 2-nitroacetato de etilo en presencia una cantidad catalítica de piperidina (condensación de Knoevenagel) y en *n*-butanol a reflujo por 3.5 horas. La 3-nitrocumarina **10** se obtuvo en un 88% de rendimiento (Esquema 15).

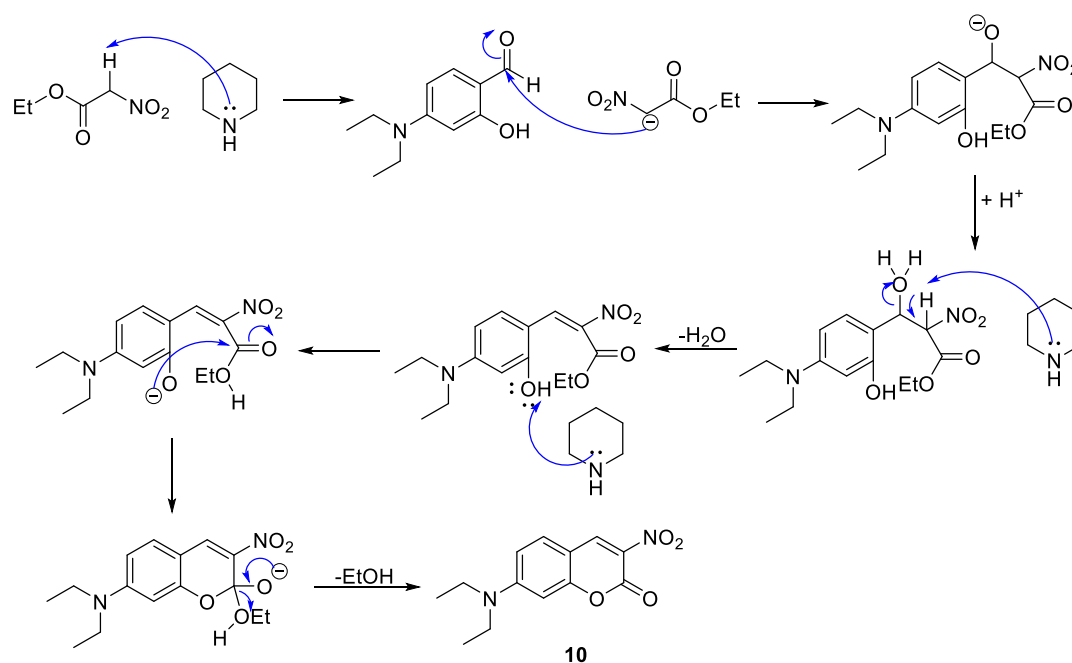


Esquema 15. Síntesis de la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-nitrocumarina **10**.

El mecanismo de esta reacción se presenta en el esquema 16, en donde como primer paso ocurre una desprotonación de uno de los hidrógenos de α del 2-nitroacetato de etilo por la piperidina para formar un carbanión el cual realiza una adición nucleofílica al carbonilo del 4-(*N,N*-dietilamino)salisaldehído, seguido de una deshidratación que genera el doble enlace,

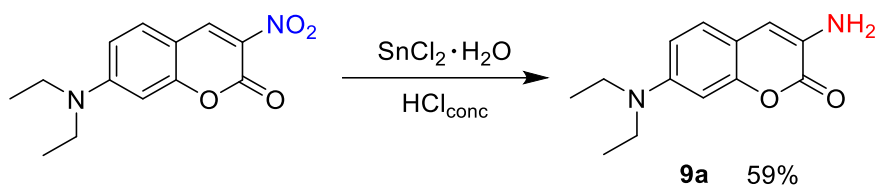


posteriormente mediante una ciclación intramolecular y por la pérdida de etanol conduce a la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-nitrocumarina.⁶²



Esquema 16. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de la cumarina **10**.

Después de sintetizar el compuesto **10**, se llevó a cabo la reducción del grupo nitro para obtener la cumarina **9a**. Con base en lo reportado en la literatura, se utilizó $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en medio ácido, obteniendo un 59% de rendimiento de la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina **9a** (Esquema 17).



Esquema 17. Síntesis para obtener la cumarina **9a**.



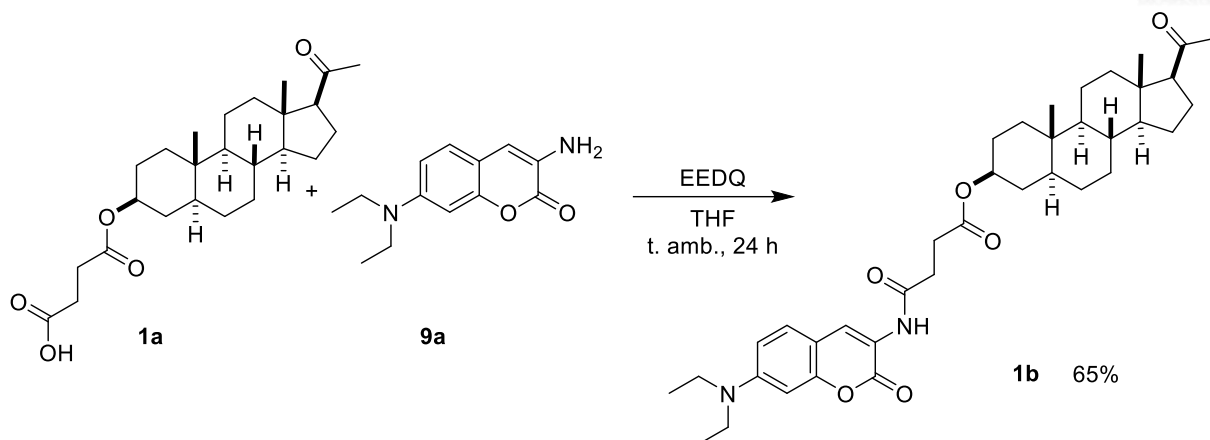
6.1.3 Derivados esteroideos que contienen el fragmento cumarina

Continuando con la estrategia de síntesis y teniendo en la mano las materias primas necesarias para preparar los compuestos objetivo, el último paso involucró la unión de los hemisuccinatos esteroideos **1a**, **2a**, **3a**, **5a-b**, ácido cólico y ácido desoxicólico con las 3-aminocumarinas **9a-b** formando un grupo amida.

Una forma de obtener un grupo amida es a partir de un ácido carboxílico y una amina. En la práctica la unión entre estos dos grupos funcionales no es tan simple, debido a la reactividad del carbono electrofílico del ácido carboxílico frente a un ataque nucleofílico directo y además de que el grupo hidroxilo no es un buen grupo saliente. La estrategia sintética para lograr esta unión es incrementar la reactividad del carbono electrofílico del ácido carboxílico, para ello se puede transformar el ácido carboxílico a un cloruro de ácido o un anhídrido, los cuales son grupos funcionales más reactivos y favorecen la formación del grupo amida.

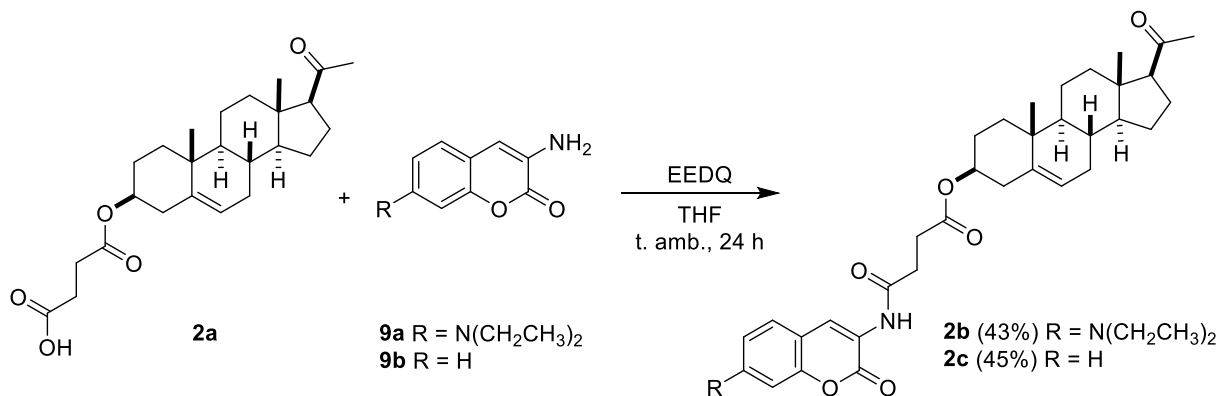
Para llevar a cabo la unión entre los hemisuccinatos **1a**, **2a**, **3a**, **5a-b**, ácido cólico y ácido desoxicólico y las 3-aminocumarinas **9a-b**, se decidió utilizar un agente de acoplamiento, el *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), el cual ha sido empleado en la síntesis de péptidos para formar enlaces peptídicos (grupo amida) en condiciones de reacción suaves.⁶³

Con base en lo anterior, el hemisuccinato **1a** se hizo reaccionar con el agente de acoplamiento EEDQ en THF seco y agitando a temperatura ambiente durante unos minutos. Posteriormente, la 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina **9a** fue adicionada al matraz de reacción, agitando durante 24 horas a temperatura ambiente. Después del aislamiento y purificación, el compuesto deseado **1b** se obtuvo en un rendimiento del 65% (Esquema 18).



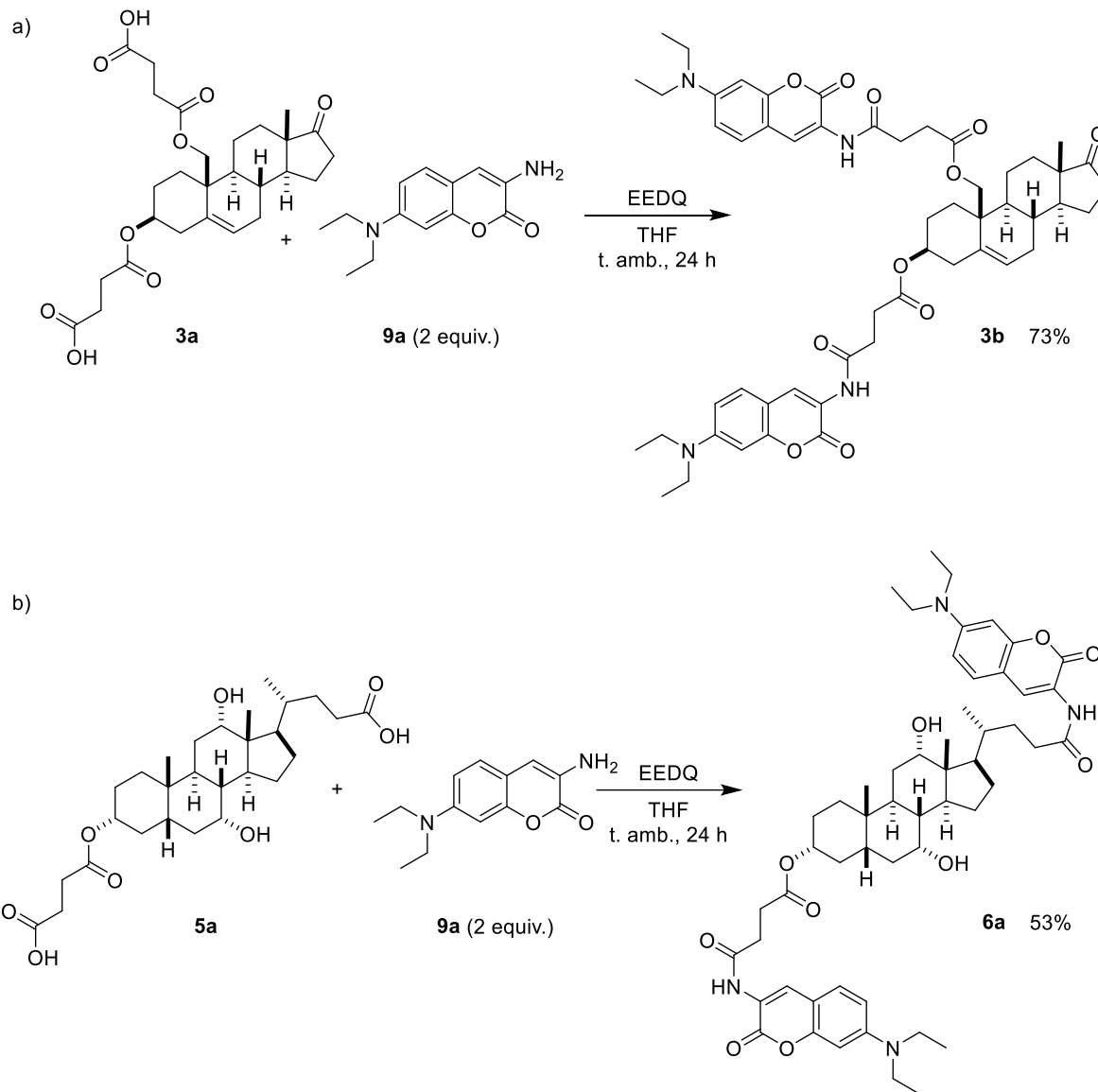
Esquema 18. Síntesis del compuesto **1b**.

Usando las condiciones de reacción previamente establecidas, se llevó a cabo la síntesis de los compuestos objetivo **2b** y **2c** derivados de la pregnenolona a partir del hemisuccinato **2a** y las aminocumarinas **9a-b**. Después de aislar y purificar, los productos deseados **2b** y **2c** se obtuvieron en 43% y 45% de rendimiento, respectivamente (Esquema 19).



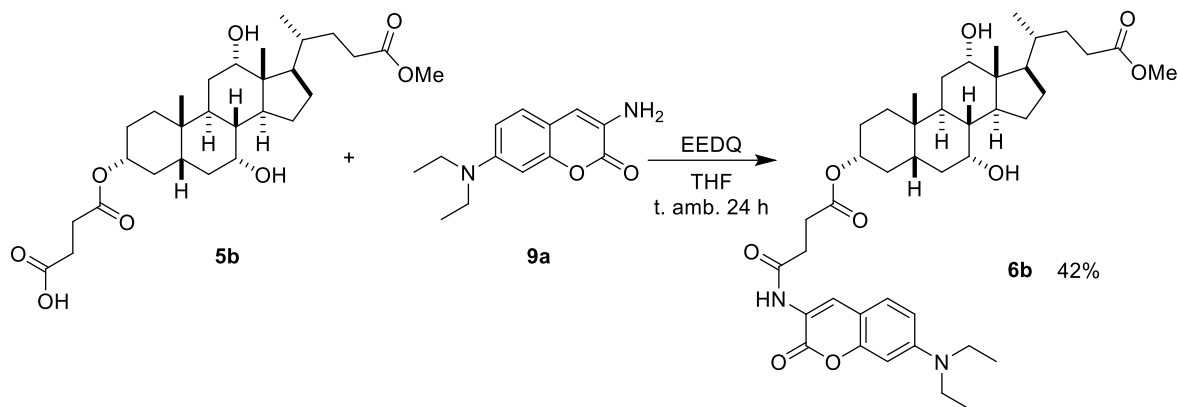
Esquema 19. Síntesis de los compuestos **2b** y **2c**.

Para sintetizar los compuestos **3b** y **6a** se requirió de los diácidos **3a** y **5a** derivados del 19-OH-DHEA y ácido cólico, respectivamente. Al llevar a cabo las reacciones se requirieron 2 equivalentes de EEDQ y la 3-aminocoumarina **9a**, obteniendo así los productos deseados que incorporan dos fragmentos de coumarina en moderados a buenos rendimientos (Esquema 20).



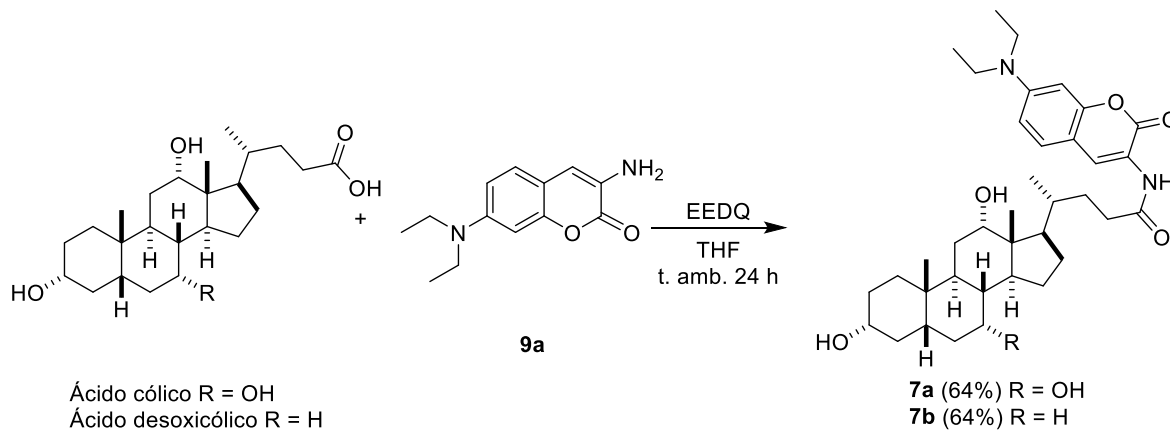
Esquema 20. Síntesis de los compuestos **3b** y **6a**.

La síntesis del compuesto **6b** se llevó a cabo a partir del hemisuccinato **5b** derivado del éster metílico del ácido cólico, empleando las mismas condiciones de reacción que en **1b**. Después de asilar y purificar, el producto deseado se obtuvo en un 42% de rendimiento (Esquema 21).



Esquema 21. Síntesis del compuesto **6b**.

Por último y cumpliendo con los objetivos planteados, se sintetizaron los compuestos **7a** y **7b** derivados de los ácidos biliares, cólico y desoxicólico empleando las mismas condiciones de reacción que en los casos anteriores. Los productos deseados se obtuvieron en un 64% de rendimiento después del aislamiento y purificación por cristalización (Esquema 22).



Esquema 22. Síntesis de los compuestos **7a** y **7b**.



6.2 Caracterización

6.2.1 Caracterización por RMN

Todos los compuestos sintetizados en este trabajo fueron caracterizados por RMN ^1H y ^{13}C , y en algunos casos se realizaron experimentos de 2D para lograr la asignación de todas las señales. A continuación, se discuten y se muestran los espectros de los compuestos **1a** y **1b**.

En la figura 24 se muestra el espectro de RMN ^1H para el hemisuccinato **1a** en donde se pueden observar las señales correspondientes de todos los hidrógenos presentes en este compuesto. Cabe mencionar que la mayoría de los hidrógenos presentan desplazamientos químicos (δ) muy cercanos entre sí lo que genera un solapamiento de señales, por lo que se resaltaron algunas señales relevantes en el espectro. La señal múltiple con un $\delta = 4.66\text{-}4.73$ ppm corresponde al hidrógeno H-3 donde se encuentra el fragmento de hemisuccinato, mientras que los hidrógenos de los metilenos H-23 y H-24 aparecen en $\delta = 2.66\text{-}2.63$ ppm y $2.58\text{-}2.55$ ppm, respectivamente. En 2.50 ppm se observa una señal triple con una constante de acoplamiento (J) de 9.0 Hz que corresponde al hidrógeno H-17. La señal simple observada en 2.10 ppm corresponde a los hidrógenos del grupo metilo de la cetona, asignado como H-21, mientras que las señales simples con un $\delta = 0.80$ ppm y 0.58 ppm corresponden a los hidrógenos de los grupos metilo H-19 y H-18.

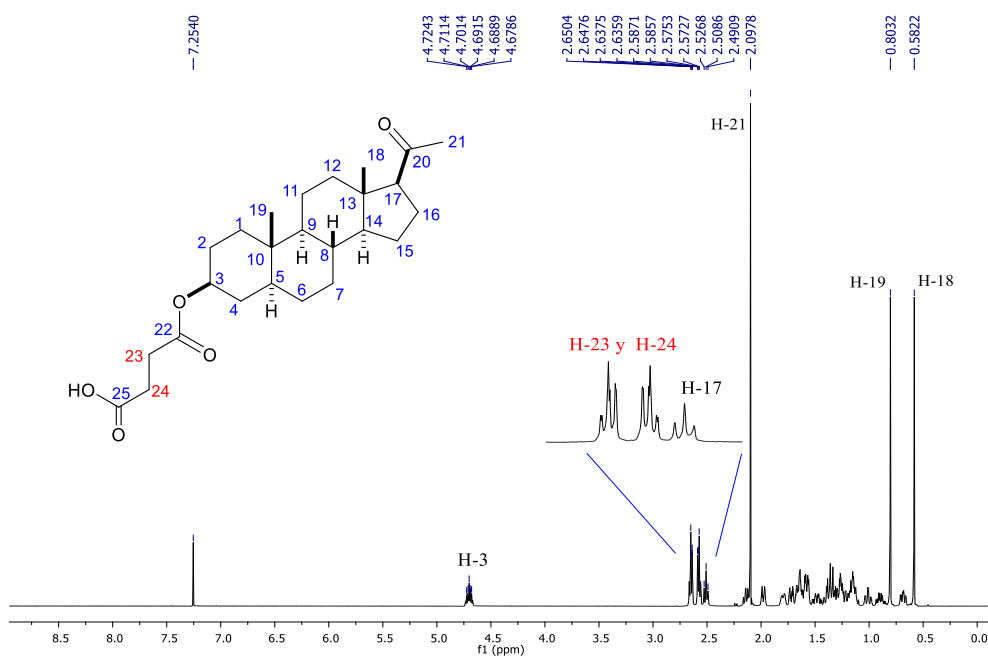


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) del hemisuccinato **1a** en CDCl_3 .



El espectro de RMN ^{13}C para el hemisuccinato **1a** se muestra en la figura 25, resaltando la asignación de algunas señales representativas. Cabe mencionar que la asignación se realizó por la comparación de los desplazamientos químicos reportados para isopregnanolona.⁶⁴ Las señales en 12.29 ppm y 13.54 ppm corresponden a los carbonos de los grupos metilo C-19 y C-18, respectivamente; mientras que el C-21 que corresponde al grupo metilo de la cetona aparece en 31.62 ppm. El C-3 presenta un $\delta = 74.3$ ppm, mientras que los carbonilos de ácido carboxílico y éster se observan en 171.8 ppm (C-25) y 177.9 ppm (C-22), respectivamente; confirmando así la presencia del fragmento hemisuccinato. Por último, la señal observada en 210 ppm corresponde al carbonilo de la cetona (C-20). El resto de las señales confirman la estructura del hemisuccinato esteroidal y su asignación completa se encuentra en la tabla I del anexo II.

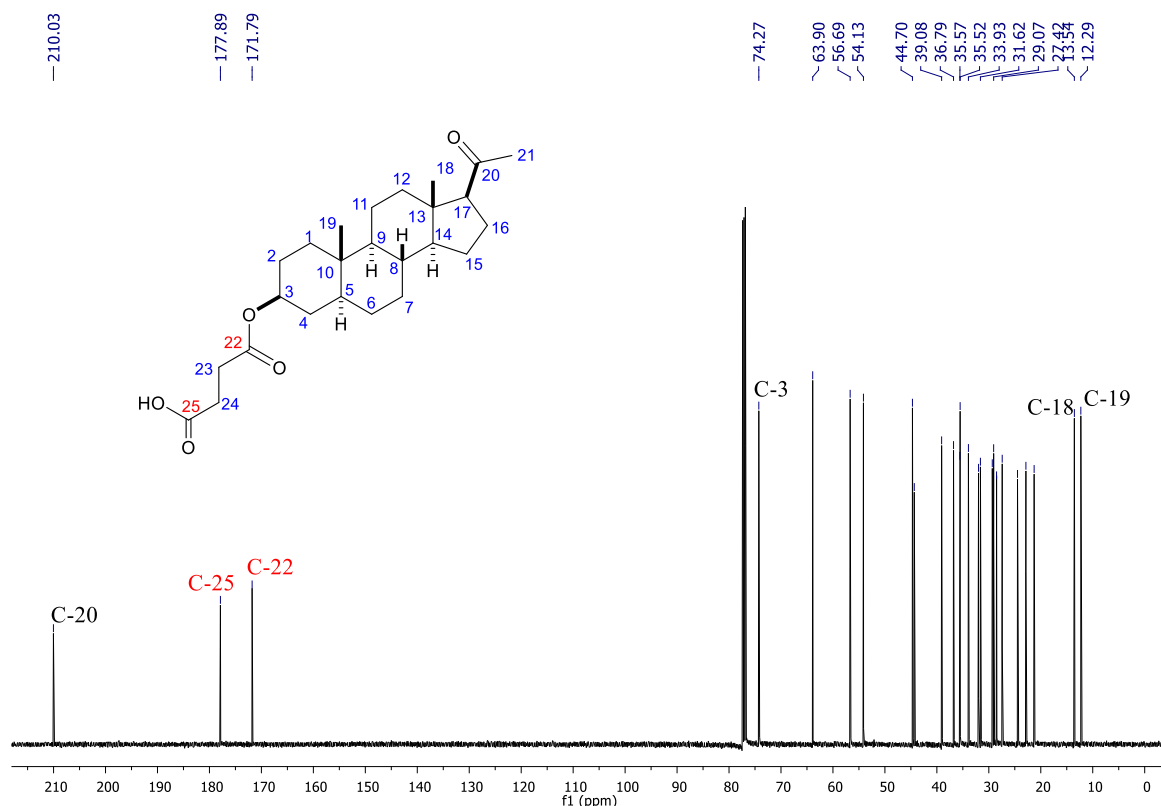


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (125.76 MHz) del hemisuccinato **1a** en CDCl_3 .



En la figura 26 se muestra el espectro de RMN ^1H para el compuesto esteroide-cumarina **1b**. Si comparamos los espectros de RMN ^1H de **1a** y **1b**, observamos señales que son similares (esqueleto esteroidal) y el resto de las señales corresponden a los protones de la cumarina **9a**. En 1.21 ppm se observa una señal triple con una $J = 7.1$ Hz que corresponde al metilo (H-10') del grupo dietilamino de la cumarina, mientras que su contra parte es un cuarteto (H-9') con un $\delta = 3.41$ ppm y una $J = 7.1$ Hz. Las señales que se observan en la región de los hidrógenos aromáticos corresponden a los hidrógenos H-5', H-6' y H-8' de la cumarina. La asignación de estos hidrógenos se realizó con base en sus constantes de acoplamiento vecinal (3J) y en W (4J). La señal doble en 6.51 ppm con una $^4J = 2.4$ Hz corresponde a H-8', mientras que la señal doble en 7.27 ppm con una $^3J = 8.8$ Hz corresponde a H-5'. La señal doble de dobles en 6.62 ppm presenta dos constantes de acoplamiento, la $^3J = 8.8$ Hz y una $^4J = 2.4$ Hz, esta señal corresponde a H-6'. Las señales simples que se observan a frecuencias altas corresponden al NH (8.06 ppm) y al hidrógeno vinílico H-4' (8.57 ppm).

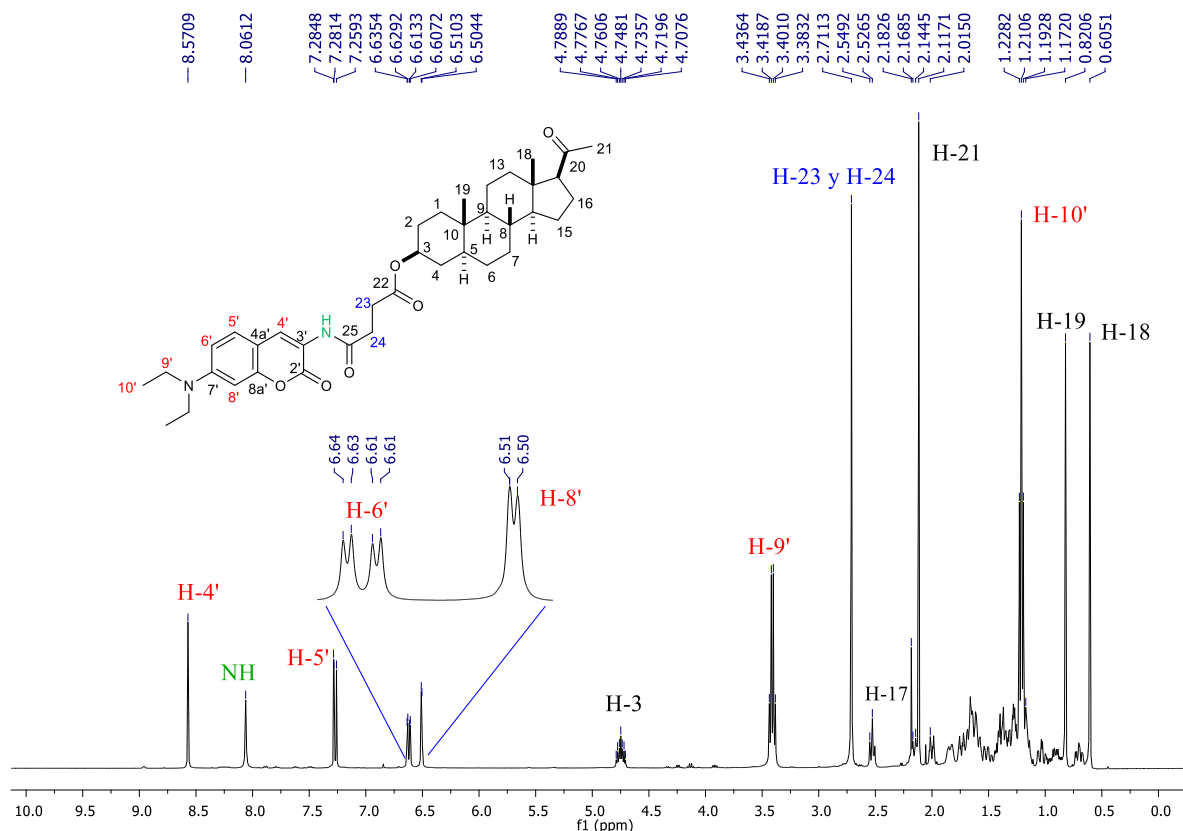


Figura 26. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) del compuesto **1b** en CDCl_3 .



Con el propósito de asignar completamente los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **1b**, recurrimos al experimento de 2D conocido como HSQC (**h**eteronuclear **s**ingle-**q**uantum **c**oherence, correlación cuántica simple heteronuclear). Este experimento HSQC nos permite correlacionar los núcleos de ^1H y ^{13}C , indicando cuales hidrógenos y carbonos están enlazados directamente.⁶⁵ Con ayuda de algunas señales asignadas en el espectro de RMN ^1H fue posible asignar las señales en el espectro de ^{13}C debido a la correlación observada en el espectro HSQC del compuesto **1b**. En la figura 27 se muestra una ampliación del espectro HSQC, donde se observan algunas correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, permitiendo asignar ambos espectros. Por mencionar algunas correlaciones, la señal para H-3 en 4.75 ppm correlaciona con la señal de 74.0 ppm (C-3), mientras que las señales para los hidrógenos aromáticos de la cumarina correlacionan con las señales que tienen un $\delta = 97.3$ ppm, 109.5 ppm y 128.6 ppm, las cuales corresponden a los carbonos C-8', C-6' y C-5', respectivamente. El carbono vinílico (C-4') fue asignado a la señal que presenta un $\delta = 125.6$ ppm.

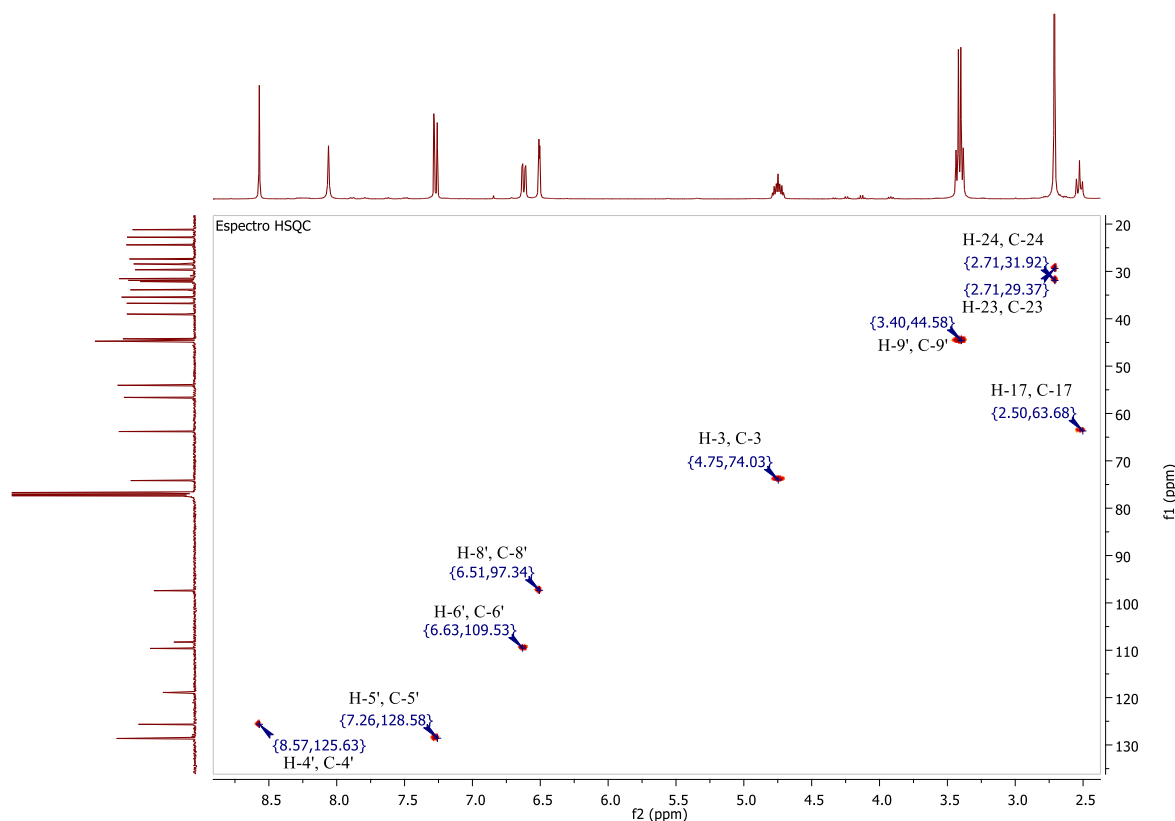


Figura 27. Espectro de 2D HSQC para el compuesto **1b**.



Otro experimento de resonancia que fue útil para la asignación de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de todos los compuestos sintetizados, fue el experimento ^{13}C -APT (**attached proton test**, prueba de enlace de protón), el cual permite diferenciar los carbonos CH_3 , CH_2 , CH y C . En la figura 28 se muestra una ampliación del espectro ^{13}C -APT asignado para el compuesto **1b**, donde se observan en fase positiva los carbonos cuaternarios y carbonilos presentes en el compuesto, mientras que en fase negativa se observan los carbonos CH (ver anexo II, tabla I).

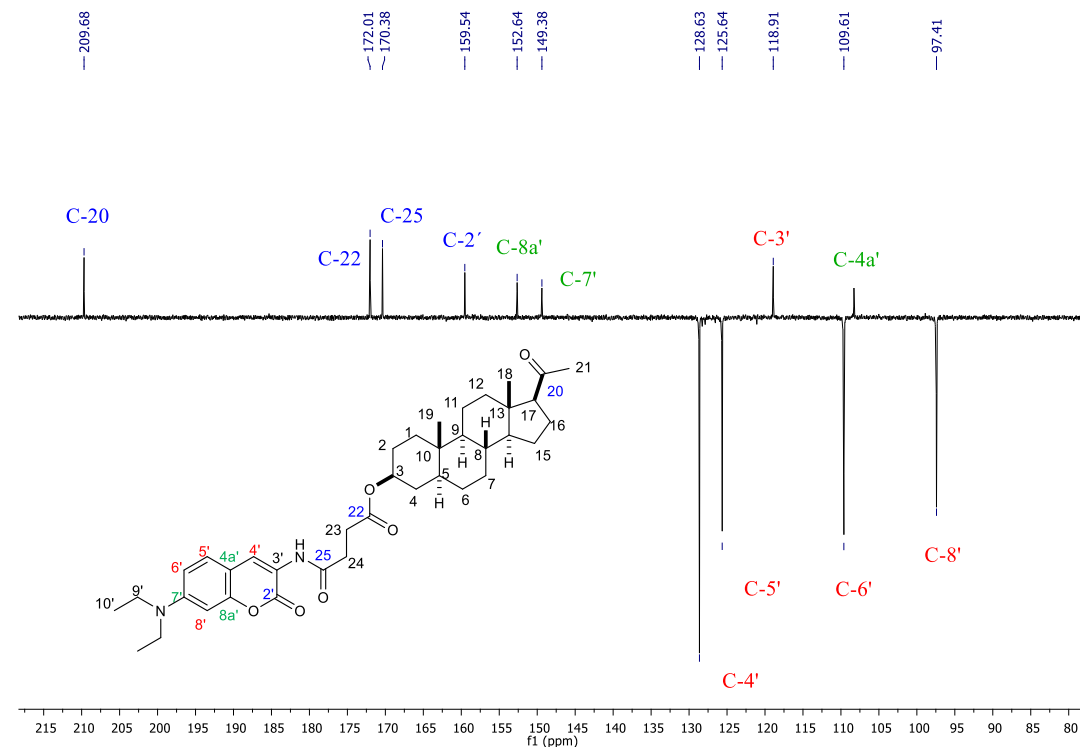


Figura 28. Espectro ^{13}C -APT para el compuesto **1b**.

6.2.2 Caracterización por IR

Continuando con la caracterización de los compuestos obtenidos en este trabajo, se adquirieron los espectros de infrarrojo de los hemisuccinatos esteroidales **1a**, **2a**, **3a**, **5a**, **5b**, **8a** y **8b**, y también de los compuestos esteroide-cumarina **1b**, **2b**, **2c**, **3b**, **6a**, **6b**, **7a** y **7b**. De manera similar a la espectroscopia de RMN, la espectroscopia de IR nos ayuda a elucidar la estructura de un compuesto dado. En un espectro de IR las bandas corresponden a un movimiento de vibración de un enlace presente en el compuesto que se esté analizando. Esto nos permite identificar un grupo funcional, además de ser la huella digital de un compuesto.



Al obtener los espectros de IR se logró identificar los grupos funcionales presentes en los compuestos sintetizados, ya que uno de los objetivos de este trabajo fue la modificación estructural de los esteroides isopregnanolona, pregnenolona, 3 β ,17-dihidroxiesteroidepiandrost-5-en-17-ona, ácido cólico y ácido desoxicólico. Como se mencionó anteriormente la primera parte de este trabajo consistió en la síntesis de los hemisuccinatos esteroidales necesarios para obtener los compuestos esteroide-cumarina. En la tabla 1 se muestran las vibraciones de tensión de algunas bandas para los grupos funcionales presentes en los hemisuccinatos esteroidales. Por ejemplo, la presencia del fragmento hemisuccinato puede confirmarse debido a las bandas de los grupos funcionales ácido carboxílico y éster. En el caso del compuesto **1a**, la banda de la vibración C=O del ácido se observa en 1728 cm⁻¹, mientras que la banda del grupo carbonilo del éster se observa 1714 cm⁻¹. La banda de la vibración C=O de la cetona en el compuesto **1a** aparece en 1699 cm⁻¹.⁶⁶

Tabla 1. Vibraciones de tensión de bandas características para los hemisuccinatos.

Compuesto	ν (cm ⁻¹)				
	O-H alcohol	C=O ácido	C=O éster	C-O éster (ν_{as})	C=O cetona
1a	-	1728	1714	1176	1699
2a	-	1729	1710	1176	1699
3a	-	1726	1712	1157	1708
5a	3594, 3532	1729	1710	1178	-
5b	3484	1725	1710	1164	-
8a	-	1708	a	1160	-
8b	-	1714	a	1170	-

^a Banda traslapada con la banda del ácido carboxílico.

En la tabla 2 se compilan algunas longitudes de onda de las bandas más representativas de los compuestos esteroide-cumarina **1b**, **2b**, **2c**, **3b**, **6a**, **6b**, **7a** y **7b**. Por ejemplo, para el compuesto



1b, las bandas correspondientes al grupo amida se observan en 3313 cm^{-1} para la ν N-H, mientras que la ν C=O aparece a 1596 cm^{-1} . Las bandas en 1732 cm^{-1} y 1701 cm^{-1} corresponden a las ν C=O de los ésteres, mientras que la ν C=O de la cetona aparece en 1662 cm^{-1} .

Tabla 2. Vibraciones de tensión de bandas características para los compuestos esteroide-cumarina.

Compuesto	ν (cm^{-1})					
	NH amida	C=O amida	C=O éster cumarina	C=O éster succinato	C=O cetona	O-H alcohol
1b	3313	1596	1732	1701	1662	---
2b	3313	1596	1733	1701	1662	---
2c	3324	a	1733	1720	1685	---
3b	3330	1604	1679	b	1720	---
6a	3311	1600	1675	1702	---	3482
6b	c	1602	1708	1708	---	3378
7a	3279	1600	1711	1711	---	3447
7b	3317	1603	1707	1707	---	3440

^a Banda traslapada con la banda de la cetona. ^b Banda traslapada con la banda del éster de la cumarina.

^c Banda traslapada con la banda del alcohol.

6.2.3 Caracterización de las propiedades de fluorescencia

Continuando con la caracterización de los compuestos sintetizados, fue posible llevar a cabo la caracterización de las propiedades de fluorescencia de cuatro compuestos esteroide-cumarina. Los espectros de absorción de los compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a** se muestran en el gráfico 1. En general se observan bandas de absorción amplias e intensas, lo cual se atribuye a las transiciones electrónicas π - π^* del sistema aromático de la cumarina. Para los compuestos **1b**, **2b** y **7a** las bandas de absorción muestran un $\lambda_{\text{máx}}$ principal en 391 nm y 392 nm, localizándose en la región que absorbe el color violeta, por lo que el color de luz que refleja es amarillo-verde, mientras que el compuesto **2c** muestra un $\lambda_{\text{máx}}$ principal en 324 nm en la región UV cercano.

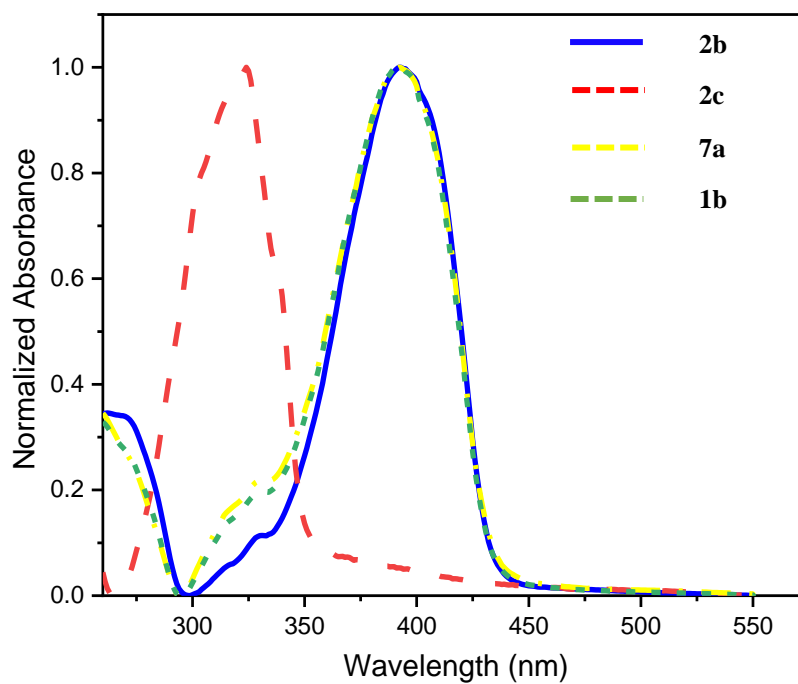


Gráfico 1. Espectros de absorción de los compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a** en CHCl_3 .

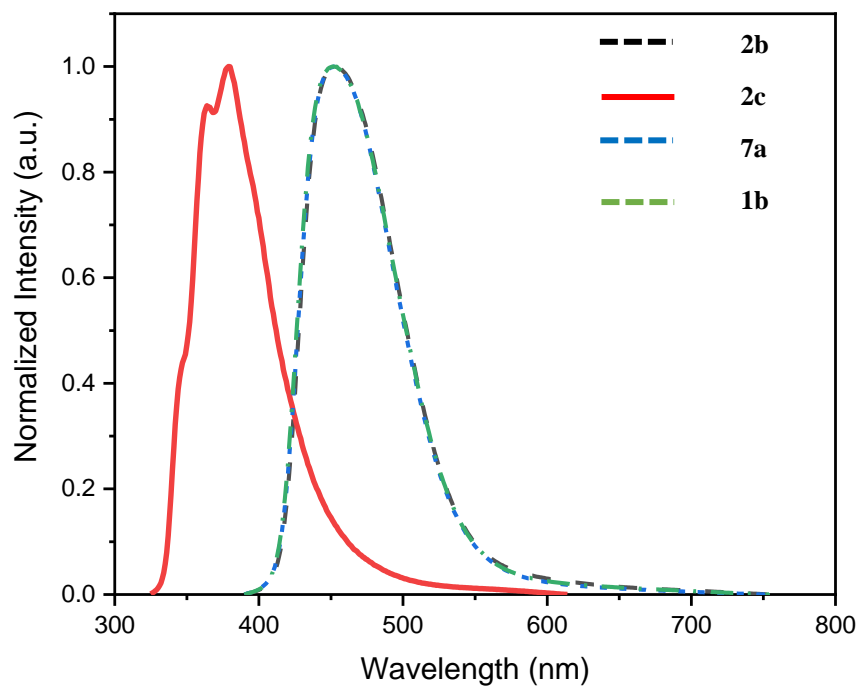


Gráfico 2. Espectros de emisión de los compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a** en CHCl_3 .



Por otro lado, todos los compuestos emiten en una región centrada en el azul del espectro electromagnético, **1b**, **2b** y **7a** muestran emisiones alrededor de 451 nm, mientras que para **2c** se puede observar un espectro de emisiones excitónicas con la banda principal a 364 nm y una réplica vibrónica a 378 nm (Gráfico 2).

En la tabla 3 se compilan las propiedades fotofísicas de los compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a**. La eficiencia de absorción se cuantifico en términos de los coeficientes de extinción molares (ϵ) de los compuestos, mismos que se encuentran en el rango de 4000-6200 $M^{-1} cm^{-1}$, estos valores permiten decir que la absorción de los compuestos es buena, por lo que la emisión de fluorescencia también, esto debido a que la emisión de fluorescencia de un fluoróforo orgánico depende de la eficiencia con la que absorbe (ϵ) y emite fotones. Los anchos de banda ópticos (E_g) calculados con base en el espectro de absorción se encuentran entre 2.87 eV para los compuestos **1b**, **2b** y **7a**, mientras que para el compuesto **2c** es de 3.55 eV. Estos valores nos permiten clasificar a estos compuestos como materiales semiconductores.

Tabla 3. Datos fotofísicos de los compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a** en $CHCl_3$.

Compuesto	λ_{max} [nm]	$\epsilon * 10^4 [M^{-1}cm^{-1}]$	E_g [eV]	λ_{em} [nm]
1b	391	0.62	2.87	451 (381)
2b	392	0.62	2.87	451 (382)
2c	324	0.40	3.55	378, 364 (314)
7a	392	0.52	2.88	452 (382)

λ_{max} máximo de absorción; λ_{em} máximo de emisión (en paréntesis, longitud de onda); ϵ coeficiente de absorción molar para dos absorciones; E_g espacios de banda ópticos.



En la figura 29 se muestra una imagen de los compuestos esteroide-cumarina **1b**, **2b**, **2c** y **7a** en cloroformo, los cuales se irradiaron a 312 nm observando una fluorescencia azul a simple vista. Estos resultados nos indican que los compuestos sintetizados presentan buenas propiedades fluorescentes y son candidatos promisorios para su aplicación en imágenes fluorescentes en células vivas.



Figura 29. Compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a** en CHCl_3 bajo irradiación UV de 312 nm.

6.2.4 Estudio de imagen de fluorescencia en células vivas

Motivados por los resultados previamente discutidos acerca de las propiedades de fluorescencia de las moléculas obtenidas, los compuestos **1b** y **7a** se evaluaron como sensores fluorescentes para generar imágenes de células *in vitro*. En la Figura 30 se muestran las imágenes visualizadas mediante la microscopía láser confocal, excitando a 405 nm. Las imágenes de la derecha corresponden a las células cancerígenas sin el sensor orgánico (imagen control), mientras que las imágenes de la izquierda corresponden a las células cancerígenas tratadas con los compuestos esteroide-cumarina **1b** y **7a**, emitiendo una fluorescencia azul. El compuesto **7a** exhibe una señal fuerte de fluorescencia en las células cancerígenas, permitiendo visualizar el citoplasma, esto a su vez nos permite visualizar el núcleo de la célula con una tonalidad más oscura.

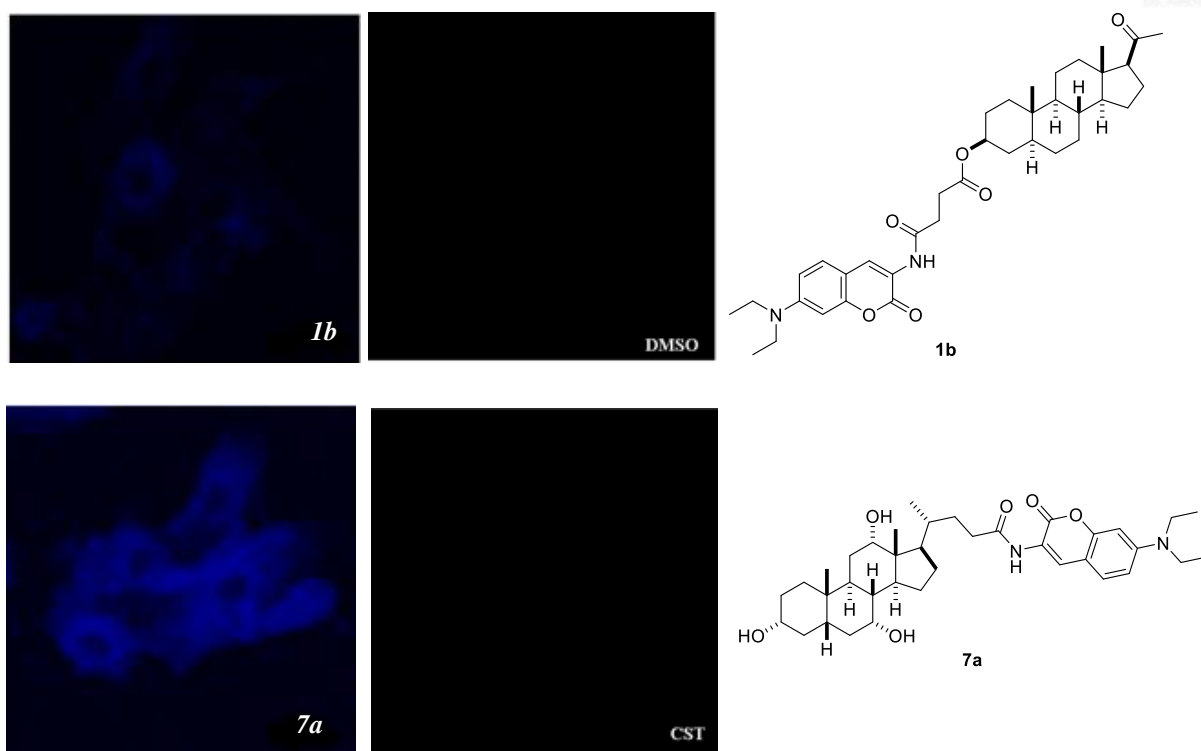


Figura 30. Imágenes obtenidas de las células de cáncer de mama tratadas con los compuestos **1b** y **7a** (izquierda) y el control negativo (derecha).

Estos resultados son alentadores y es necesario continuar con este estudio para conocer el potencial de los compuestos sintetizados en este trabajo. Actualmente, los compuestos **2b**, **2c**, **3b**, **6a**, **6b** y **7b** se encuentran en etapa de evaluación en imágenes de fluorescencia en células vivas.



PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



7. Generalidades

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , bidimensionales de correlación heteronuclear carbón-hidrógeno (HSQC y HMBC) y Homonuclear hidrógeno-hidrógeno (COSY) se obtuvieron en espectrómetros Bruker Avance 300, Bruker Avance 400, JEOL Eclipse 270 y JEOL ECA 500 ubicados en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), en CDCl_3 o Metanol- d_4 . Los valores de desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz), para indicar la multiplicidad de las señales de ^1H se utilizan las abreviaturas: (s) simple, (brs) simple ancha, (d) doble, (dd) doble de dobles, (t) triple, (c) cuádruple, y (m) múltiple.

Los espectros de Infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrómetro Varian FTIR series 640 ATR y en un espectrómetro Agilent series, modelo Cary Spectrum 600 FT-IR ubicados en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los valores se reportan en números de onda para los principales máximos de absorción.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns y no están corregidos.

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) fueron obtenidos en un espectrómetro Agilent G1969A con la técnica de ionización por electrospray (ESI). Los espectros de masas de baja resolución se determinaron en un equipo HPLC/acoplado a masas Agilent Technologies de Cuádrupolo Simple por ionización por electrospray (ESI), ubicados en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Los espectros de absorción UV-Vis se midieron en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 365 ubicado en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron con un espectrofluorómetro Horiba Scientific Fluorolog-3 ubicado en la Universidad Autónoma de Nuevo León, por excitación de 10 nm por debajo de la banda de absorción de longitud de onda más larga.

Las bioimágenes de fluorescencia se recolectaron utilizando una microscopía láser confocal (Olympus IX70).



Los disolventes y reactivos (4-dimetilaminopiridina, anhídrido succínico, tolueno, trietilamina, piridina, tetrahidrofurano, etc.) se compraron de la casa comercial Merck Sigma-Aldrich Corp. Los compuestos esteroideos isopregnanolona, pregnenolona, 19-hidroxideshidroepiandrosterona, ácido cólico y ácido desoxicólico fueron donados por la compañía PROQUINA S.A. de C.V.

El THF anhidro se obtuvo por destilación sobre sodio/benzofenona y bajo atmósfera de N₂. La piridina se destiló sobre NaOH y bajo atmósfera de N₂.

Para la síntesis del compuesto **9b** se siguió la misma metodología reportada por Das, Deb-K y colaboradores.⁶⁷

El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (CCD) utilizando placas (TLC) sílica gel 60 F254, de 0.2 mm de espesor, utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo. Para la purificación de los productos crudos se realizó cromatografía en columna (CC), utilizando columnas empacadas con gel de sílice 60 (malla 70-230), con mezclas de disolventes como eluyente.

Los reveladores utilizados fueron lámpara de luz UV y Molibdato de Amonio Cérico el cual se preparó mezclando sulfato de cerio (5g) a una solución de molibdato de amonio (25g en 450 mL de agua) a 0°C bajo agitación. La solución resultante se tornó color amarillo y bajo agitación vigorosa y lentamente se adicionó una solución de H₂SO₄ 18 M (50 mL), la reacción es muy exotérmica por lo que se realizó dentro de una campana de extracción y sobre hielo. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente resultando una solución amarilla.⁶⁸

Las propiedades ópticas de los compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a** se obtuvieron en cloroformo y los resultados obtenidos se muestran en el apartado de discusión y resultados. En general, los compuestos presentan una banda de absorción principal en la región UV. Con los datos de absorción, se obtuvo el coeficiente de extinción molar en solución “ε” de cada compuesto.

Los compuestos **1b** y **7a** se evaluaron como sensores fluorescentes en células *in vitro*, mediante la siguiente metodología. Se sembraron células de cáncer de mama humano MCF-7 (ATCC-CRL-HTB-22) en placas de 12 pocillos a una densidad de 1x10⁻⁵ células por pocillo en 2 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen Life Technologies) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Gibco Life Technologies) 100 UI / mL de penicilina y 100 µg / mL



de estreptomicina. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda controlada de CO₂ al 5% y aire al 95%. Después de 24 horas se renovó el medio y se cargaron las células. Las células se expusieron a los compuestos **1b** y **7a** a una concentración de 10 µg/mL y se incubaron durante 30 minutos, y finalmente se lavaron con PBS (Phosphate buffered saline, buffer fosfato salino). Las células no tratadas se usaron como controles. Los resultados obtenidos se muestran en el apartado de resultados y discusión.



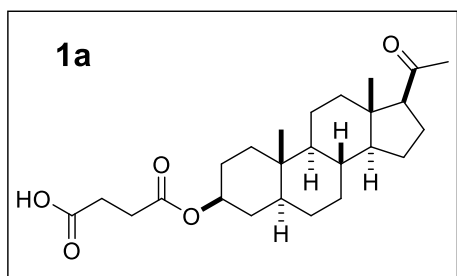
8. Procedimiento experimental

8.1 Síntesis de hemisuccinatos esteroideos.

La síntesis de los compuestos **1a**, **2a**, **3a**, **5a**, **5b**, **8a** y **8b** se llevó a cabo empleando la siguiente metodología general.

En un matraz balón se colocó el derivado esteroideo (1.0 equivalente) y anhídrido succínico (2.0 equivalentes por cada OH libre), la mezcla de reacción se secó al vacío durante 30 minutos, seguido de la adición de DMAP (0.55 equivalentes por cada equivalente del derivado esteroideo) en piridina y tolueno bajo atmósfera de N₂ (las cantidades necesarias varían de acuerdo a la cantidad de materias primas utilizadas). La reacción se mantuvo en reflujo por 6 horas y en agitación constante. El término de la reacción se confirmó por CCD, después se adicionó H₂O (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, posteriormente se evaporó el disolvente al vacío. El producto crudo se purificó por columna de gel de sílice (70-230), con mezclas de disolventes.⁶⁹

Hemisuccinato de 5 α -(20-oxo-pregnan-3 β -ilo) (Hemisuccinato de isopregnanolona) (1a).



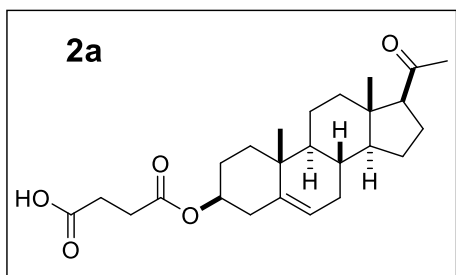
Preparado a partir de 3 β ,5 α -pregnanolona (100 mg, 0.314 mmol), anhídrido succínico (63 mg, 0.628 mmol), DMAP (21 mg, 0.172 mmol) y 3 mL de piridina en 20 mL de tolueno. Fase para CCD hexano:AcOEt 7:3 v/v. El producto crudo se purificó por columna en gel de sílice con hexano:AcOEt 95:5, obteniéndose 68 mg de un sólido

blanco con un rendimiento del 52%, p.f. = 140-141°C. FTIR-ATR (ν , cm⁻¹): 1728 (C=O ácido), 1714 (C=O éster), 1699 (C=O cetona), 1176 (C-O éster). RMN-¹H [500 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 4.72-4.68 (1H, m, H-3), 2.64 (2H, t, J = 6.2 Hz, H-23^b), 2.58 (2H, t, J = 6.2 Hz, H-24^b), 2.51 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-17), 2.10 (3H, s, H-21), 0.80 (3H, s, H-19), 0.58 (3H, s, H-18). RMN-¹³C [125.76 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 210.0 (C-20), 177.9 (C-25^a), 171.8 (C-22^a), 74.3 (C-3), 63.9 (C-17), 56.7 (C-14), 54.1 (C-9), 44.7 (C-5), 44.3 (C-13), 39.1 (C-4), 36.8 (C-1), 35.6 (C-10) 35.5 (C-8), 33.9 (C-12), 32.0 (C-2), 31.6 (C-21), 29.3 (C-23^b), 29.1 (C-24^b), 28.5 (C-7), 27.4 (C-6), 24.5 (C-15),



22.9 (C-16), 21.3 (C-11), 13.5 (C-18), 12.3 (C-19). MS (ESI), cálc. para $[(C_{25}H_{38}O_5) + H^+]$: 419.27; encontrado: 419.3.

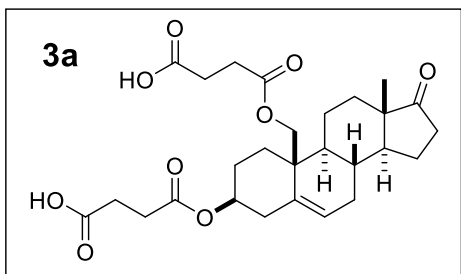
Hemisuccinato de 20-oxo-pregn-5-en-3 β -ilo (2a).



Preparado a partir de 3 β -pregnenolona (100 mg, 0.316 mmol), anhídrido succínico (63 mg, 0.632 mmol), DMAP (20 mg, 0.172 mmol) y 3 mL de piridina en 20 mL de tolueno. Fase para CCD hexano:AcOEt 7:3 *v/v*. El producto crudo se purificó por columna de gel de sílice con hexano:AcOEt 6:4, obteniéndose 63.5 mg de un sólido

blanco cristalino con un rendimiento del 48%, p.f. = 153-155°C. (Lit.⁴⁴ 161-163 °C). FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 1729 (C=O ácido), 1710 (C=O éster), 1699 (C=O cetona), 1176 (C-O éster). RMN-¹H [500 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 5.36 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-6), 4.64 – 4.59 (1H, m, H-3), 2.66 (2H, t, J = 8.4 Hz, H-23^a), 2.59 (2H, t, J = 9.8 Hz, H-24^a), 2.52 (1H, t, J = 8.9 Hz, H-17), 2.4 (3H, s, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, s, H-18). RMN-¹³C [125.76 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 209.9 (C-20), 177.9 (C-25), 171.7 (C-22), 139.6 (C-5), 122.5 (C-6), 74.5 (C-3), 63.8 (C-17), 56.9 (C-14), 49.9 (C-9), 44.1 (C-13), 38.9 (C-12), 38.0 (C-4), 37.0 (C-1), 36.7 (C-10), 31.9 (C-8) 31.8 (C-7), 31.6 (C-21), 29.3 (C-23^a), 29.1 (C-24^a), 27.7 (C-2), 24.6 (C-16), 22.9 (C-15), 21.1 (C-11), 19.4 (C-19), 13.3 (C-18). MS (ESI), cálc. para $[(C_{25}H_{36}O_5) + H^+]$: 417.26; encontrado: 417.3.

Dihemisuccinato de 3 β ,19 β -dihidroxi-androst-5-en-17-ona (3a)



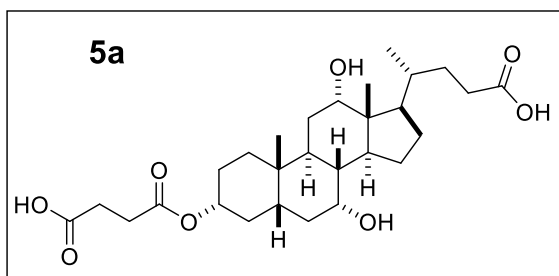
Preparado a partir de 19-OH-DHEA (1.0 g, 3.28 mmol), anhídrido succínico (1.320 g, 13.12 mmol), DMAP (220 mg, 1.80 mmol) y 10 mL de piridina en 20 mL de tolueno. Fase para CCD hexano:AcOEt 5:5 *v/v*. El producto crudo se purificó por columna de gel de sílice con hexano:AcOEt 7:3, obteniéndose 1.27 g de un sólido blanco con un

rendimiento del 77%, p.f = 128-129°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 1726 (C=O ácido), 1712 (C=O éster), 1708 (C=O cetona), 1157 (C-O éster). RMN-¹H [270 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 9.75 (1H, s, OH), 5.61 (1H, brs, H-6), 4.64 (1H, brs, H-3), 4.44 (1H, d, J = 12.4, H-19a) y 4.00 (1H, d, J = 12.1 Hz, H-19b), 0.86 (3H, s, H-18). RMN-¹³C [67.93 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 221.3 (C-17), 178.2 (C-23^b), 178.1 (C-23^b), 171.9 (C-20^a), 171.5 (C-20^a), 134.7 (C-5), 126.3 (C-6), 73.6 (C-3), 64.5 (C-19),



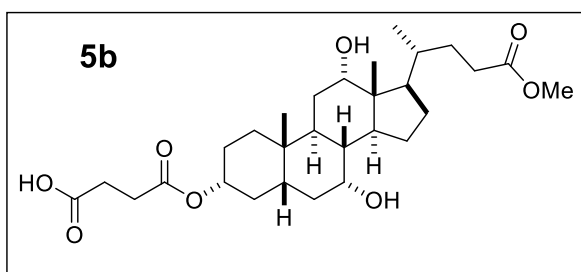
52.1 (C-14), 50.1 (C-9) 47.7 (C-13), 40.0 (C-4), 37.9 (C-10), 35.8 (C-16), 32.9 (C-1), 32.3 (C-7), 31.5 (C-8), 30.3 (C-12), 29.4, 29.2, 29.0 (C-21, C-21', C-22 y C-22'), 27.7 (C-2), 21.9 (C-15), 21.1 (C-11), 13.7 (C-18). MS (ESI), cálc. para $[C_{27}H_{36}O_9]$: 505.56; encontrado: 505.3.

Hemisuccinato de ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanóico (5a).



Preparado a partir de ácido cólico (1.0 g, 2.44 mmol), anhídrido succínico (247 mg, 4.88 mmol) y DMAP (164 mg, 1.34 mmol) y 10 mL de piridina. La reacción se calentó a 100°C en agitación constante durante 6 horas. Fase para CCD AcOEt (elución dos veces). El producto crudo se purificó por columna de gel de sílica con acetona, obteniéndose 711 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 58%, p.f. = 255-256°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3594, 3532 (OH alcohol), 1729 (C=O ácido), 1710 (C=O éster), 1178 (C-O éster). RMN- 1H [500 MHz, Metanol- d_3] (δ , ppm): 4.57 - 4.50 (1H, m, H-3), 3.94 (1H, s, H-12), 3.78 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-7), 1.00 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.92 (3H, s, H-19), 0.70 (3H, s, H-18). RMN- ^{13}C [125.77 MHz, Metanol- d_3] (δ , ppm): 176.9 (C-24, COOH), 174.7 (C-28 a , C=O COOH), 172.6 (C-25 a , C=O éster), 75.1 (C-3), 72.7 (C-12), 67.6 (C-7), 46.7, 46.2, 41.7, 41.6, 39.7, 35.4, 35.1, 34.7, 34.6, 34.3, 31.0, 30.7, 29.1, 28.4, 28.2, 27.4, 26.5, 26.2, 22.9, 21.7 (C-19), 16.3 (C-21), 11.7 (C-18). MS (ESI), cálc. para $[(C_{32}H_{48}O_{11})]$: 508.30; encontrado: 508.3.

Hemisuccinato de 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (5b).

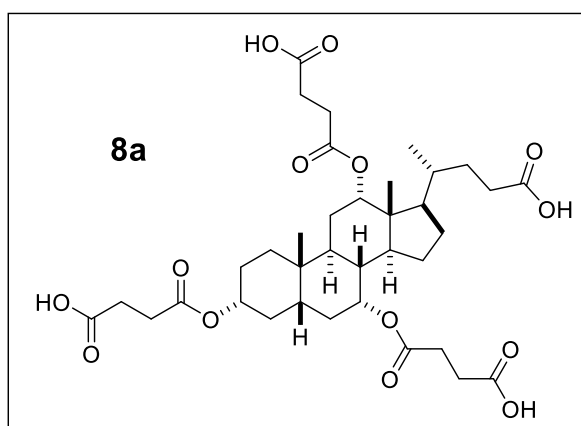


Preparado a partir de 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (1.0 g, 2.36 mmol), anhídrido succínico (238 mg, 4.72 mmol), DMAP (158 mg, 1.29 mmol) y 10 mL de piridina. La reacción se calentó a 100°C. Fase para CCD AcOEt (elución dos veces). El producto crudo se purificó por columna de sílica gel con hexano: AcOEt 4:6, obteniéndose 780 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 64%, p.f. = 255-257°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3484, (OH alcohol), 1725 (C=O ácido), 1710 (C=O éster), 1164 (C-O éster). RMN- 1H [270 MHz, Metanol- d_3] (δ , ppm): 4.59 - 4.52 (1H, m, H-3), 3.94 (1H, s, H-12), 3.78 (1H, s, H-7), 2.62 (3H, s, H-25), 3.53 (4H, m,



H-27 y H-28), 0.99 (3H, d, $J = 6.3$, H-21), 0.92 (3H, s, H-19), 0.69 (3H, s, H-18). RMN- ^{13}C [67.93 MHz, Metanol- d_3] (δ , ppm): 175.2 (C-24, COOH), 174.7 (C-29^a COOH), 172.6 (C-26^a C=O éster), 75.1 (C-3), 72.6 (C-12), 67.6 (C-7), 50.7 (C-25), 46.6 (C-17), 46.2 (C-14), 41.7 (C-5), 41.6 (C-13), 39.6 (C-8), 35.4 (C-20), 35.1 (C-10), 34.7 (C-4), 34.6 (C-6), 34.3 (C-1), 30.9 (C-22), 30.5 (C-23), 29.2 (C-2), 28.5 (C-28), 28.2 (C-27), 27.3 (C-11), 26.5 (C-9), 26.2 (C-16), 22.9 (C-15), 21.7 (C-19), 16.2 (C-21), 11.6 (C-18). MS (ESI), cálc. para [(C₂₉H₄₆O₈) + H⁺]: 523.67; encontrado: 523.3.

Tris-hemisuccinato de ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanólico (8a).

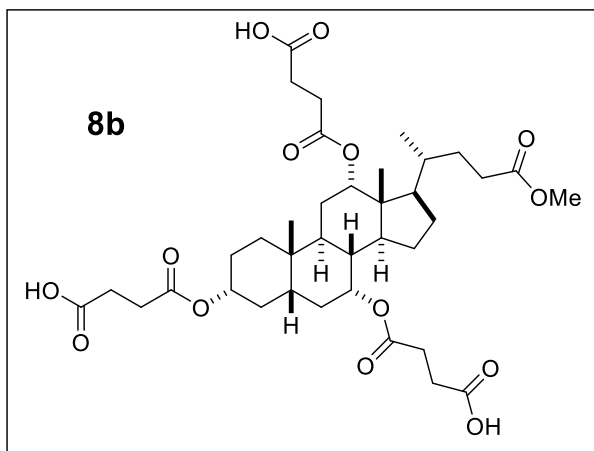


Preparado a partir de ácido cólico (1.00 g, 2.44 mmol), anhídrido succínico (1.47 g, 14.64 mmol), DMAP (0.16 g, 1.34 mmol) y 3 mL de piridina en 20 mL de tolueno. Fase para CCD, AcOEt (elución dos veces). El producto crudo se purificó por columna de silica gel con hexano:AcOEt 6:4, obteniéndose 1.48 g de un líquido viscoso amarillo con un rendimiento del

86%. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 1708 (C=O ácido y éster), 1160 (C-O éster). RMN- ^1H [500 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 5.13 (1H, s, H-12), 4.90 (1H, s, H-7), 4.58 – 4.50 (1H, s, H-3), 0.95(3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-21), 0.70 (3H, s, H-18). RMN- ^{13}C [100.5 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 177.0 (C-24, COOH) 174.6, 174.5 y 174.4 (C-28, C-28' y C-28''^a, COOH), 172.6, 172.3 y 172.2 (C-25, C-25' y C-25''^b, C=O éster), 75.8 (C-12), 74.4 (C-3), 71.3 (C-7), 45.0 (C-14), 43.2 (C-17), 40.9 (C-5), 37.8 (C-4 y C-8), 34.9 (C-20), 34.6 (C-1), 34.4 (C-6), 34.1 (C-10), 30.9, 30.7, 30.6, 29.1 (C-9, C-13, C-22, C-23), 29.5 y 29.4 (C-27^c, C-27''^c C-27''^c), 28.7 y 28.5 (C-26^c, C-26''^c, C-26''^c), 27.0 (C-2), 26.3 (C-11), 25.0 (C-16), 22.5 (C-15), 21.5 (C-19), 16.6 (C-21), 11.2 (C-18). MS (ESI), cálc. para [(C₃₆H₅₂O₁₄) + H⁺]: 709.79; encontrado:709.3.



Tris-hemisuccinato de 3 α ,7 α ,12 α -(trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (8b).

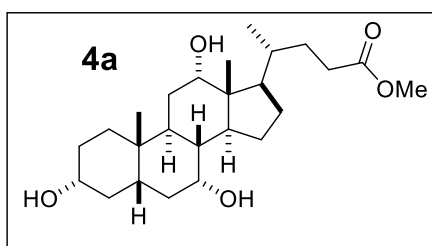


Preparado a partir de 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (676 mg, 1.60 mmol), anhídrido succínico (967 mg, 9.60 mmol), DMAP (107 mg, 0.88 mmol) y 2 mL de Et₃N en 20 mL de tolueno bajo atmósfera de N₂. La reacción se calentó a 90°C en agitación constante durante 6 horas. Fase para CCD, AcOEt (elución dos veces). El producto crudo se purificó por columna de sílica gel con acetona, obteniéndose

334 mg de un líquido viscoso café con un rendimiento del 29%. FTIR-ATR (ν , cm⁻¹): 1714 (C=O ácido y éster), 1170 (C-O éster). RMN-¹H [270 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 6.3 (4H, sa, OH), 5.07 (1H, s, H-12), 4.92 (1H, s, H-7), 4.52 (1H, s, H-3), 3.64 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-19), 0.77 (1H, d, J = 5.9 Hz, H-21), 0.70 (1H, s, H-18). RMN-¹³C [67.93 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 178.5 (C-24 COO), 174.9 (C-29, C-29' y C-29''^a, COOH), 171.8 y 171.1 (C-26, C-26' y C-26''^b, C=O éster), 76.4 (C-12), 74.8 (C-3), 71.4 (C-7), 51.7 (C-25), 47.5, 45.4, 43.3, 40.8, 38.0, 34.7, 34.6, 31.4, 31.0, 30.9, 30.4, 30.0, 29.3, 28.7, 27.2, 26.4, 22.9, 22.6 (C-19), 17.6 (C-21), 12.2 (C-18). MS (ESI), cálc. para [(C₃₇H₅₄O₁₄) + H⁺]: 723.816; encontrado: 723.3.

8.2 Síntesis del éster del ácido cólico

3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (4a).

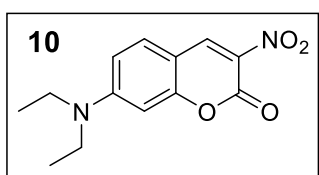


En un matraz balón de 100 mL se colocaron (3.0 g, 7.34 mmol) de ácido cólico y 10-20 mL de metanol para disolver, posteriormente se adicionaron (0.20 mL, 7.34 mmol) de HCl concentrado. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación toda la noche. Transcurridas 10 horas se adicionaron unas gotas de solución de NaOH para neutralizar, formándose un precipitado, el cual se filtró al vacío y se lavó con hexano, obteniéndose 2.530 g de un sólido blanco con un rendimiento del 82%, p.f. = 152-154°C. (Lit.⁷⁰ 155.1-155.9 °C) FTIR-ATR (ν , cm⁻¹): 3392 (OH), 1725 (C=O éster), 1076 (C-O éter). RMN-¹H [500 MHz, Metanol-*d*₃] (δ , ppm): 3.93 (1H, s, H-12), 3.78 (1H,



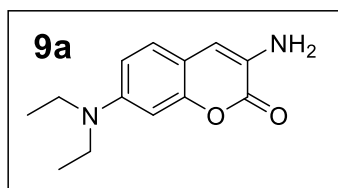
s, H-7), 3.63 (3H, s, H-25), 3.37 – 3.33 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.90 (3H, s, H-19), 0.69 (3H, s, H-18). RMN- ^{13}C [125.77 MHz, Metanol- d_3] (δ , ppm): 175.2 (C-24, COOH), 72.7 (C-12), 71.5 (C-3), 67.7 (C-7), 50.7 (C-25), 46.6 (C-17), 46.1 (C-14), 41.9 (C-13), 41.7 (C-5), 39.7 (C-8), 39.1 (C-4), 35.4 (C-6), 35.2 (C-10), 34.6 (C-20), 34.5 (C-1), 30.9 (C-22), 30.5 (C-23), 29.8 (C-2), 28.2 (C-11), 27.3 (C-16), 26.5 (C-9), 22.9 (C-15), 21.8 (C-19), 16.2 (C-21), 11.6 (C-18). MS (ESI), cálc. para $[(\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_5) + \text{H}^+]$: 423.59; encontrado: 423.3.

8.3 Síntesis de 3-aminocumarinas



3-nitrocumarina. Una mezcla de 4-(*N,N*-dietilamino)-salisalaldehído (1.0 equivalente), 2-nitroacetato de etilo (1.0 equivalente), piperidina, etanol, y mallas 4Å en *n*-BuOH bajo atmosfera de N_2 , se colocó a reflujo durante 3.5 horas. Después de ese tiempo, el disolvente se redujo a la mitad por destilación y se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y después a 0°C . El sólido se aisló por filtración a vacío lavando con *n*-BuOH frío y las mallas 4Å se retiraron manualmente. Después de secar a vacío se recuperó un sólido naranja brillante con un rendimiento del 73 % y p.f. = 200-201 $^\circ\text{C}$ (Lit.⁷¹ 200-201 $^\circ\text{C}$).

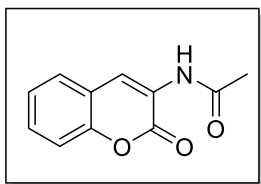
7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (9a). En un matraz bola, sobre una suspensión de



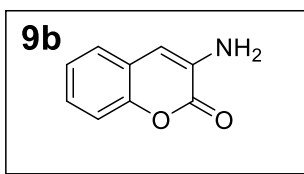
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.2 g, 14.18 mmol) en HCl_{conc} (10 mL) a temperatura ambiente, se adicionó en pequeñas porciones, durante un lapso de 30 minutos 7-(*N,N*-dietilamino)-3-nitrocumarina (0.5 g, 1.9 mmol). La reacción se agitó a esa misma temperatura durante 6 horas. Terminado el tiempo la suspensión formada se vertió sobre una mezcla de hielo/agua y se llevó a pH alcalino con una solución de NaOH. La mezcla resultante se extrajo con AcOEt (3x20 mL), se lavó con H_2O (20 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Posteriormente, el disolvente se evaporó al vacío para obtener 0.26 g de un sólido marrón con un rendimiento del 59% y p.f. = 84-85 $^\circ\text{C}$ (Lit.⁷² 81-82 $^\circ\text{C}$).



3-acetamidocumarina.⁶⁷ En un matraz balón se adiciona salicilaldehído (1.0 equivalente), *N*-acetilglicina anhidra (0.1 equivalentes), NaOAc anhidro (0.3 equivalentes), Ac₂O recién destilado, bajo atmósfera de N₂, esta mezcla permanece bajo reflujo durante 3.5 horas. Transcurrido el tiempo se enfría la reacción a temperatura ambiente y se filtra el sólido a vacío lavando abundantemente con H₂O. El crudo de reacción se purifica por recristalización simple de acetato de etilo, recuperando cristales blancos, con un rendimiento del 74% y p.f. = 206-207 °C (Lit.⁷³= 202-203°C).



3-aminocumarina (9b). En un matraz bola, sobre una suspensión de 3-acetamidocumarina (0.203 g, 1mmol) en H₂SO₄ al 70% *p/v* (1 mL), se calentó a 120°C durante 15 minutos. Durante ese período la reacción adquirió una coloración roja. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y al sólido formado se le adiciono H₂O para formar una suspensión a la cual se trato con una solución de NaOH al 50% *p/v* hasta pH alcalino y se enfrió a 0°C, el sólido formado se lavó abundantemente con H₂O, para luego filtrar a vacío, obteniéndose 0.135 g de un sólido café con um rendimiento del 84% y p.f. = 135-136 °C (Lit.⁷⁴ 135-136 °C).



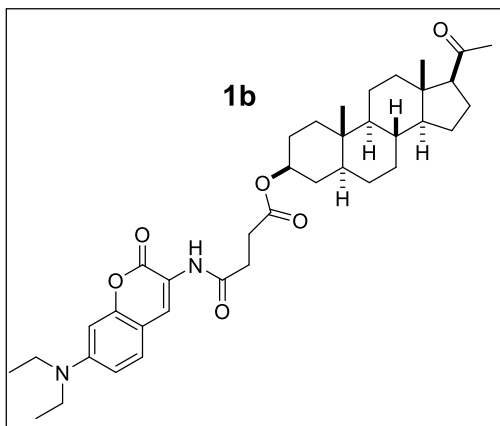
8.4 Acoplamiento de 3-aminoumarinas a Hemisuccinatos

La síntesis de los compuestos **1b**, **2b**, **2c**, **3b**, **6a**, **6b**, **7a** y **7b** se llevó a cabo empleando la siguiente metodología general.

En un matraz balón se colocó el compuesto hemisuccinato (**1a** a **7b**) (1.0 equivalente) y *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) (1.0 equivalente), en 5 mL de THF, agitando durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 7-(*N,N*-dietilamino-3-aminocumarina (1.0 equivalente) previamente disuelta en 2 mL de THF, bajo atmosfera de N₂. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación durante la noche. El término de la reacción se confirmó por CCD, seguido de evaporar el disolvente y el producto crudo se disolvió en la mínima cantidad posible de acetato de etilo y se agregó 1-5 mL de hexano hasta obtener un sólido. El sólido obtenido se purificó por filtración a vacío y se lavó de 5-7 veces con hexano.



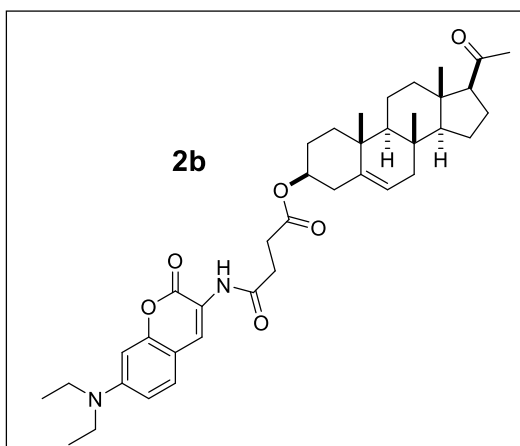
4-(7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de 5 α -pregnan-20-ona-3 β -ilo (**1b**).



Preparado a partir de **1a** (0.535 g, 1.28 mmol), EEDQ (0.315 g, 1.28 mmol) en 5 mL de THF y 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.297 g, 1.28 mmol) previamente disuelta en 2 mL de THF. Fase para CCD hexano:AcOEt 5:5 v/v. Obteniéndose 0.520 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 65%, p.f. = 211-212°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3313 (NH amida), 1732 (C=O éster cumarina), 1701 (C=O éster succinato), 1662 (C=O cetona). RMN¹H [400 MHz, CDCl₃] (δ , ppm):

8.57 (1H, s, H-4'), 8.06 (1H, s, NH), 7.28 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.62 (1H, dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, H-6'), 6.51 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8'), 4.79 - 4.71 (1H, m, H-3), 3.41 (1 H, c, $J = 7.1$ Hz, H-9'), 2.71 (4H, s, H-23 y H-24) 2.53 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-17), 2.12 (3H, s, H-21) 1.21 (2CH₃, t, $J = 7.1$ Hz, H-10'), 0.82 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, s, H-18). RMN-¹³C [100.5 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 209.7 (C-20), 172.0 (C-22), 170.4 (C-25), 159.5 (C-2'), 152.6 (C-8a'), 149.4 (C-7'), 128.6 (C-4'), 125.6 (C-5'), 118.9 (C-3'), 109.6 (C-6'), 108.3 (C-4a'), 97.4 (C-8'), 74.2 (C-3), 63.8 (C-17), 56.6 (C-14), 54.1 (C-9), 44.7 (C-9'), 44.6 (C-5), 44.2 (C-13), 39.0 (C-4), 36.7 (C-1), 35.5 y 35.4 (C-10 y C-8), 33.9 (C-12), 32.1 (C-2), 31.9 (C-24^b), 31.5 (C-21), 29.7 (C-7), 28.4 (C-23^b), 27.4 (C-6), 24.4 (C-15), 22.8 (C-16), 21.2 (C-11), 13.4 (C-18), 12.5 (C-10'), 12.2 (C-19). HRMS (ESI-TOF), cálculo para [(C₃₈H₅₂N₂O₆) + H⁺]: 633.38; encontrado: 633.38.

4-(7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de 20-oxo-pregn-5-en-3 β -ilo (**2b**).



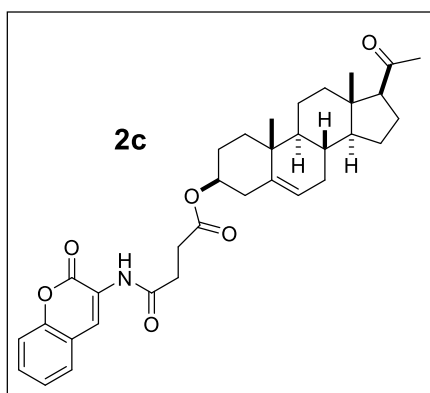
Preparado a partir de **2a** (0.100 g, 0.24 mmol), EEDQ (0.059 g 0.024 mmol) en 5 mL de THF y 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.056 g, 0.24 mmol) previamente disuelta en 2 mL de THF. Fase para CCD hexano:AcOEt 7:3 v/v. Obteniéndose 0.066 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 43%, p.f. = 216-217°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3313 (NH amida), 1733 (C=O éster cumarina), 1701 (C=O éster succinato), 1662 (C=O cetona). RMN-¹H [500 MHz, CDCl₃] (δ ,

ppm): 8.55 (1H, s, H-4'), 8.02 (1H,s, NH), 7.25 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.60 (1H, dd, $J = 8.8,$



2.5 Hz, H-6'), 6.49 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8'), 5.36 (1H, d, $J = 5.2$, H-6) 4.67-4.62 (1H, m, H-3), 3.39 (4H, c, $J = 7.1$ Hz, H-9'), 2.70 (4H, s, H-23 y H-24), 2.52 (1H, t, $J = 8.9$, H-17), 2.11 (3H, s, H-21), 1.19 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10'), 1.00 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, s, H-18). RMN¹³C [100.54 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 209.8 (C-20), 172.0 (C-22), 170.4 (C-25), 159.7 (C-2'), 152.7 (C-8a'), 149.5 (C-7'), 139.7 (C-5), 128.7 (C-4'), 126.8 (C-5'), 122.5 (C-6), 118.9 (C-3'), 109.7 (C-6'), 108.3 (C-4a'), 97.5 (C-8'), 74.5 (C-3), 63.8 (C-17), 56.9 (C-14), 49.9 (C-9), 44.8 (C-9'), 44.1 (C-13), 38.9 (C-4), 38.1 (C-12), 37.1 (C-1), 36.7 (C-10), 32.2 (C-7), 31.9 (C-8), 31.8 (C-24^a), 31.7 (C-21), 29.7 (C-23^a), 27.8 (C-2), 24.6 (C-16), 22.9 (C-15), 21.1 (C-11), 19.4 (C-19), 13.3 (C-18), 12.5 (C-10'). MS (ESI), cálc. para [(C₃₈H₅₀N₂O₆) + H⁺]: 631.36; encontrado: 631.4.

4-(-3-aminocumarina)oxobutanoato de 20-oxo-pregn-5-en-3 β -ilo (2c).

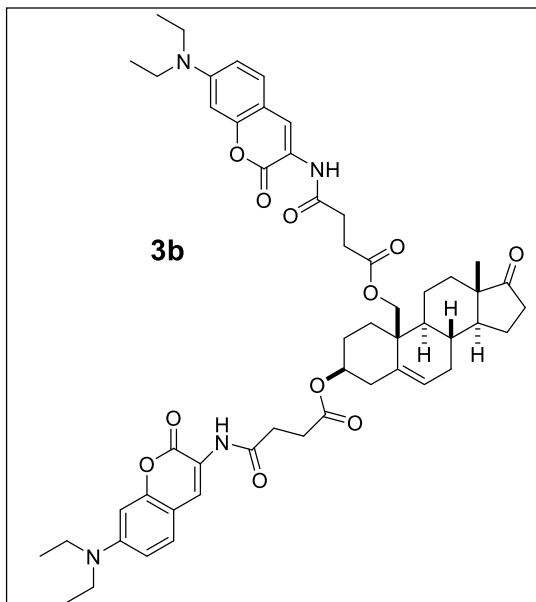


Preparado a partir de **2a** (0.300 g, 0.721 mmol), EEDQ (0.178 g 0.721 mmol) en 5 mL de THF y 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.116 g, 0.721 mmol) previamente disuelta en 2 mL de THF. CCD hexano: AcOEt 7:3 v/v, revelador: luz UV. El producto crudo de reacción se purifica por columna de silica gel (70-230) con hexano:AcOEt 8:2, obteniéndose 0.180 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 45%, p.f. = 138-140°C.

FTIR-ATR (ν , cm⁻¹): 3324 (NH amida), 1733 (C=O éster cumarina), 1720 (C=O éster succinato), 1685 (C=O cetona). RMN-¹H [400 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 8.67 (1H, s, H-4'), 8.30 (1H, s, NH), 7.50-7.42 (2H, m, H-5' y H-6'), 7.33-7.28 (2H, m, H-7' y H-8'), 5.37 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-6), 4.71-4.64 (1H, m, H-3), 2.79-2.72 (4H, m, H-23 y H-24), 2.54 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-17), 2.13 (3H, s, H-21), 1.02 (3H, s, H-19), 0.63 (3H, s, H-18). RMN-¹³C [100.5 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 209.5 (C-20), 171.8 (C-22^a), 171.0 (C-25^a), 158.7 (C-2'), 149.9 (C-8a'), 139.5 (C-5), 129.6 (C-4'), 127.8 (C-6'), 125.1 (C-7'), 124.0 (C-3'), 123.4 (C-5'), 122.4 (C-6), 119.8 (C-4a'), 116.4 (C-8'), 74.5 (C-3), 63.7 (C-17), 56.8 (C-14), 49.9 (C-9), 44.0 (C-13), 38.8 (C-12), 38.0 (C-4), 37.0 (C-1), 36.6 (C-10), 32.1 (C-7), 31.8 (C-21), 31.7 (C-2), 31.6 (C-8), 29.4 (C-24^b), 27.7 (C-23^b), 24.5 (C-16), 22.8 (C-15), 21.0 (C-11), 19.3 (C-19), 13.2 (C-18). MS (ESI), cálc. para [(C₃₈H₅₀O₆) + H⁺]: 631.81; encontrado: 631.4.



4,19-(di-7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de 3 β ,19-(dihidroxiandrost-5-en-17-ona (3b).

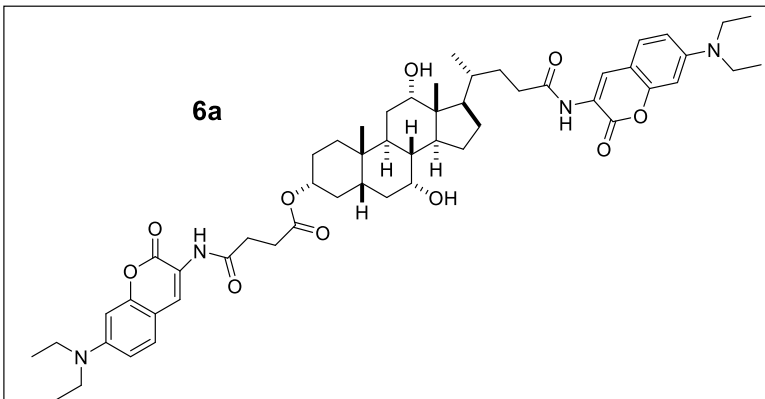


Preparado a partir de **3a** (0.200 g, 0.383 mmol), EEDQ (0.189 g 0.766 mmol) en 5 mL de THF y 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.177 g, 0.766 mmol) previamente disuelta en 2 mL de THF. Fase para CCD hexano: AcOEt 5:5 v/v. Obteniéndose 0.261 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 73%, p.f. = 157-158°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3330 (NH amida), 1733 (C=O éster cumarina), 1720 (C=O cetona), 1679 (C=O éster cumarina y succinato), 1604 (C=O amida). RMN- ^1H [270 MHz, CDCl_3] (δ , ppm): 8.54 (1H, s, H-4'), 8.52 (1H, s, H-4''), 8.06 (1H, s, NH), 8.02 (1H, s, NH'), 7.24 (2H, d, $J = 4.7$

Hz, H-5' y H-5''), 6.60 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-6' y H-6''), 6.48 (2H, sa, H-8', H-8''), 5.61 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 4.66 – 4.60 (1H, m, H-3), 4.54 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-19a) y 4.00 (1H, $J = 12.1$ Hz, H-19b), 3.38 (8H, c, $J = 7.1$ Hz, H-9' y H-9''), 2.68 (8H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21, H-21', H-22 y H-22'), 1.17 (12H, t, $J = 7.8$, H-10' y H-10''), 0.89 (3H, s, H-18). RMN- ^{13}C [67.93 MHz, CDCl_3] (δ , ppm): 220.9 (C-17), 172.3 (C-20^a), 172.0 (C-20^a), 171.9 (C-23^b), 171.7 (C-23^b), 159.6 (C-2' y C-2''), 152.7 (C-8a' y C-8a''), 149.5 (C-7' y 7''), 134.8 (C-5), 128.7 (C-5' y C-5''), 126.2 (C-6, C-4' y C-4''), 125.8 (C-3' y C-3''), 118.9 (C-4a' y C-4a''), 109.8 (C-6' y C-6''), 97.5 (C-8' y C-8''), 73.7 (C-3), 64.6 (C-19), 52.3 (C-14), 50.2 (C-9), 47.7 (C-13), 44.9 (C-9' y C-9''), 40.0 (C-10), 38.1 (C-4), 35.8 (C-16), 33.3 (C-7), 32.5 (C-8), 32.1 (C-1), 31.9 (C-22^c), 31.6 (C-22^c), 30.3 (C-12), 29.6 (C-21^d), 29.3 (C-21^d), 27.8 (C-2), 21.9 (C-11), 21.1 (C-15), 13.8 (C-18), 12.5 (C-10' y C-10''). MS (ESI), cálculo para $[\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_{11}]$: 933.096; encontrado: 933.4.



4-(7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanólico (6a)

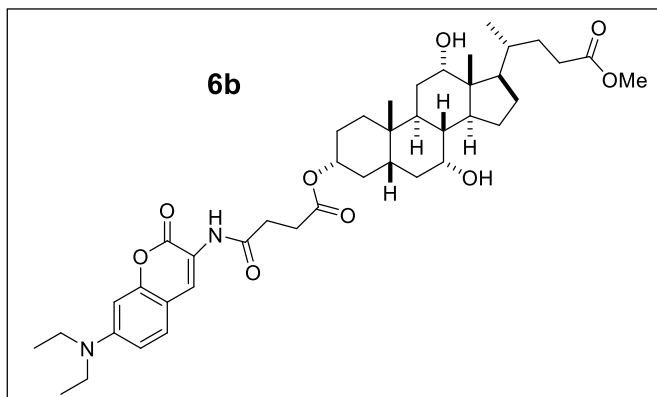


Preparado a partir de **5a** (0.100 g, 0.138 mmol), EEDQ (0.068g 0.276 mmol) en 5 mL de THF y 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.064 g, 0.276 mmol) previamente disuelta en 2 mL de THF. Fase para CCD hexano:AcOEt 5:5 v/v. Obteniéndose 0.068 g de un sólido

amarillo con un rendimiento del 53%, p.f. = 154-155°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3482 (OH), 3311 (NH amida), 1702 (C=O éster succinato), 1675 (C=O éster amida), 1600 (C=O amida). RMN-¹H [500 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 8.56 (1H, s, H-4'), 8.53 (1H, s, H-4''), 8.10 (1H, s, NH), 7.93 (1H, s, NH'), 7.24 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-5'), 7.23 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-5''), 6.58 (2H, dd, $J = 8.8, 1.5$ Hz H-6', H-6''), 6.46 (2H, dd, $J = 7.1, 2.4$ Hz, H-8', H-8''), 4.63 – 4.58 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, s, H-12), 3.78 (1H, s, H-7), 3.37 (8H, c, $J = 7.1$ Hz, H-9', H-9''), 1.17 (12H, t, $J = 7.1$, H-10', H-10''), 1.04 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 0.86 (3H, s, H-19), 0.68 (3H, s, H-18). RMN-¹³C [67.93 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 172.7 (C-24, C=O), 171.6 (C-25^a, NH-C=O), 170.8 (C-28^a, C=O), 159.8 y 159.7 (C-2', C-2'', C=O), 152.7 y 152.6 (C-8a' y C-8a''), 149.5 y 149.4 (C-7' y C-7''), 128.8 y 128.7 (C-5' y C-5''), 126.1 y 125.7 (C-4' y C-4''), 119.1 y 118.9 (C-3' y C-3''), 109.7 y 109.6 (C-6' y C-6''), 108.4 y 108.3 (C-4a' y C-4a''), 97.4 y 97.3 (C-8' y C-8''), 75.5 (C-3), 73.0 (C-12), 68.2 (C-7), 47.2 (C-17), 46.7 (C-13), 44.8 (C-9' y C-9''), 42.0 (C-14), 41.2 (C-5), 39.6 (C-8), 35.5, 35.1, 34.9, 34.8, 34.7, 34.4, 32.6, 31.5, 30.3, 28.4, 27.7, 26.8, 26.6, 23.3 (C.15), 22.5 (C-19), 17.5 (C-21), 12.7 (C-18), 12.6 y 12.5 (C-10' y C-10''). MS (ESI), cálc. para [C₃₃H₅₀O₁₁]: 937.170; encontrado: 937.5.



4-(7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (6b).

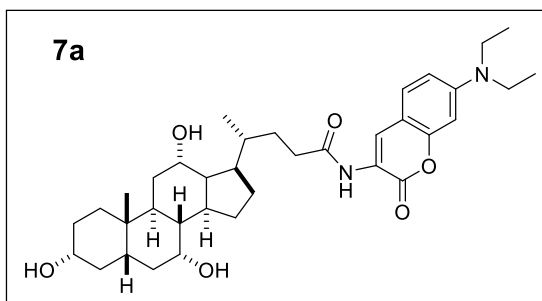


Preparado a partir de **5b** (0.200 g, 0.280 mmol), EEDQ (0.069 g 0.280 mmol) en 5 mL de THF y 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.064 g, 0.280 mmol) previamente disuelta en 2 mL de THF. Fase para CCD hexano:AcOEt 5:5 v/v. Obteniéndose 0.150 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 42%, p.f.

= 159°C-160°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3378 (NH y OH), 1708 (C=O éster cumarina y succinato), 1602 (C=O amida). RMN- ^1H [400 MHz, CDCl_3] (δ , ppm): 8.59 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-4'), 8.11 (1H, d, $J = 19.1$ Hz, NH), 7.28 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5') 6.63 (1H, dd, $J = 7.7, 2.3$ Hz, H-6'), 6.51 (2H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8'), 4.68-4.63 (1H, m, H-3), 4.00 (1H, s, H-12), 3.81 (1H, s, H-7) 3.69 (3H, s, H-25), 3.42 (2CH₂, c, $J = 7.1$ Hz, H-9'), 1.22 (2CH₃, t, $J = 7.1$ Hz, H-10'), 1.04 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-21), 0.91 (3H, s, H-19) 0.72 (3H, s, H-18). RMN- ^{13}C [67.93 MHz, CDCl_3] (δ , ppm): 174.7 (C-24, COOH), 171.4 (C-26), 170.8 (C-29), 159.8 (C-2', C=O), 152.7 (C-8a'), 149.4 (C-7'), 128.7 (C-5'), 125.8 (C-4'), 118.8 (C-3'), 109.7 (C-6'), 108.3 (C-4a'), 97.2 (C-8'), 74.9 (C-3), 72.9 (C-12), 68.1 (C-7), 51.5 (C-25), 47.2 (C-17), 46.7 (C-13), 44.8 (C-9'), 42.0 (C-5), 41.2 (C-14), 39.6 (C-8), 35.3 (C-20), 35.0, 34.8, 34.7 y 34.3 (C-1, C-10, C-4 y C-6), 32.7 (C-28), 31.2 (C-22), 30.9 (C-23), 30.4 (C-27), 28.4 (C-2 y C-11), 27.6 (C-16), 26.7 (C-9), 23.3 (C-15), 22.5 (C-19), 17.3 (C-21), 12.6 (C-18), 12.5 (C-10'). MS (ESI), cálc. para [(C₃₃H₅₀O₁₁) + H⁺]: 737.934; encontrado: 737.4.

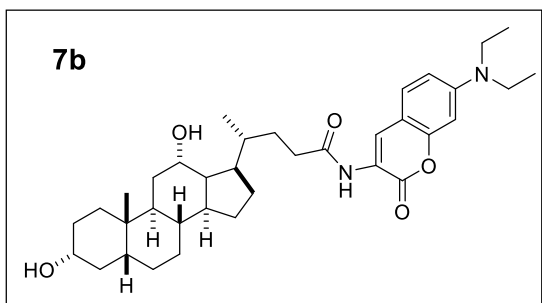


3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato de 4-(7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina) (7a).



Preparado a partir de ácido cólico (0.615 g, 1.50 mmol), 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.350 g, 1.50 mmol) y (0.373 g, 1.50 mmol) de EEDQ en 20 mL de THF. Fase para CCD hexano:AcOEt 5:5 v/v. El producto crudo se filtró y se lavó con hexano:acetato de etilo (8:2 v/v), obteniéndose 0.595 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 64%, p.f. = 243-244°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3448 (OH), 3279 (NH), 1711 (C=O éster cumarina y succinato), 1600 (C=O amida). RMN- ^1H [400 MHz, CDCl_3] (δ , ppm): 8.60 (1H, s, H-4'), 7.95 (1H, sa, NH), 7.28 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5'), 6.63 (1H, dd, $J = 2.5, 8.9$ Hz, H-6'), 6.51 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8'), 4.01 (1H, brs, H-12), 3.88 (1H, brs, H-7), 3.50 - 3.44 (1H, m, H-3), 3.42 (2CH $_2$, c, $J = 7.1$ Hz H-9'), 1.22 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10'), 1.05 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-21), 0.91 (3H, s, H-19), 0.71 (3H, s, H-18). RMN- ^{13}C [100.5 MHz, CDCl_3] (δ , ppm): 172.6 (C-24, NH-C=O), 159.7 (C-2', C=O), 152.6 (C-8a'), 149.4 (C-7'), 128.6 (C-5'), 125.6 (C-4'), 119.0 (C-3'), 109.6 (C-6'), 108.3 (C-4a'), 97.4 (C-8'), 73.0 (C-12), 72.0 (C-3), 68.4 (C-7), 47.0 (C-17), 46.5 (C-13), 44.7 (C-9'), 41.8 (C-14), 41.5 (C-5), 39.7 (C-4), 39.6 (C-8), 35.3, 35.2, 34.7, 34.6 y 34.5 (C-6, C-23, C-10, C-1, C-20), 31.4 (C-2), 30.5 (C-22), 28.3 (C-11), 27.6 (C-16), 26.5 (C-9), 23.3 (C-15), 22.5 (C-19), 17.5 (C-21), 12.6 (C-18), 12.5 (C-10'). HRMS (ESI-TOF), cálc. para [(C $_{37}$ H $_{54}$ N $_2$ O $_6$) + H $^+$]: 623.83; encontrado: 623.40.

3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de 4-(7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina) (4b).



Preparado a partir de ácido desoxicólico (0.615 g, 1.50 mmol), 7-(*N,N*-dietilamino)-3-aminocumarina (0.350 g, 1.50 mmol) y (0.373 g, 1.50 mmol) de EEDQ en 20 mL de THF. Fase para CCD hexano:AcOEt 5:5 v/v. El producto crudo se filtró y se lavó con hexano: AcOEt (8:2 v/v). Obteniéndose 0.595 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 64%, p.f. = 245-246°C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3440 (OH), 3317 (NH amida), 1707 (C=O éster amida y succinato), 1603 (C=O amida). RMN- ^1H [500 MHz, CDCl_3](δ , ppm): 8.57 (1H, s, H-4'), 7.94 (1H, s, NH), 7.26 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.60 (1H, dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz, H-6'), 6.48 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8'), 4.64 (1H, brs, OH), 3.98 (1H, s, H-12), 3.62 - 3.58 (1H, m, H-3), 3.38 (2CH $_2$, c, $J = 7.1$ Hz H-9'), 1.18 (2CH $_3$, t, $J = 7.1$



Hz, H-10'), 1.00 (1H, d, $J = 6.1$ Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-19), 0.67 (3H, s, H-18). RMN-¹³C [100.5 MHz, CDCl₃] (δ , ppm): 172.7 (C-24, NH-C=O), 159.8 (C-2', C=O), 152.7 (C-8a'), 149.4 (C-7'), 128.7 (C-5'), 125.8 (C-4'), 119.1 (C-3'), 109.7 (C-6'), 108.4 (C-4a'), 97.4 (C-8'), 73.3 (C-12), 71.9 (C-3), 48.3 (C-14), 47.3 (C-17), 46.6 (C-13), 44.8 (C-9'), 42.2 (C-5), 36.5 (C-4), 36.1 (C-8), 35.3 (C-1), 34.7 (C-10), 34.2 (C-23), 33.7 (C-9 y C-20), 31.5 (C-2), 30.5 (C-22), 28.7 (C-11), 27.6 (C-6), 27.2 (C-7), 26.2 (C-16), 23.8 (C-15), 23.2 (C-19), 17.5 (C-21), 12.9 (C-18), 12.5 (C-10'). MS (ESI), cálc. para [(C₃₇H₅₄N₂O₆) + H⁺]: 607.83; encontrado: 607.5.



CONCLUSIONES



9. Conclusiones

Se logró la síntesis de ocho nuevos compuestos esteroide-cumarina derivados de isopregnanolona (**1b**), pregnenolona (**2b** y **2c**), 3 β ,19-dihidroxiandrost-5-en-17-ona (**3b**), ácido cólico (**6a**, **6b** y **7a**) y ácido desoxicólico (**7b**). Tales compuestos fueron obtenidos con rendimientos del 43% al 73% y fueron caracterizados por RMN ^1H y ^{13}C , espectroscopia de IR y espectrometría de masas. Por otro lado, se logró la caracterización de las propiedades de fluorescencia de los compuestos **1b**, **2b**, **2c** y **7a**, los cuales mostraron una buena fluorescencia azul. Estos resultados permitieron llevar a cabo la evaluación de los compuestos **1b** y **7a** como sensores fluorescentes en células de cáncer de mama *in vitro*. Tales compuestos mostraron una buena imagen de fluorescencia, indicando que los compuestos sintetizados son candidatos promisorios para la generación de imágenes de fluorescencia.



PERSPECTIVAS



10. Perspectivas

- Sintetizar los compuestos esteroide-cumarina **8a** y **8b** derivados del ácido cólico.
- Realizar la caracterización de las propiedades de fluorescencia de los compuestos **3b**, **6a**, **6b**, **7c**, **8a** y **8b**.
- Evaluar los compuestos **2b**, **2c**, **3b**, **6a**, **6b**, **7c**, **8a** y **8b** como sensores fluorescentes en células vivas.
- Continuar con la evaluación de los compuestos **1b** y **7a** en la generación de imágenes fluorescentes.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



11. Referencias bibliográficas

1. Mondragón, K.; Domínguez, J.; Cen, F. ¿Qué es la química supramolecular? *Ciencia* **2018**, *69*, 6-13.
2. Bell, T.; Hext, N. Supramolecular optical chemosensors for organic analytes. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 589–598.
3. Beer P.; Gale P.; Smith D. *Supramolecular Chemistry*. Oxford University Press. E.U.A.; 1999. p. 81-88.
4. Kim, M. K.; Lim, C. S.; Hong, J. T.; Han, J. H.; Jang, Hye-Y.; Kim, H. M.; Cho, B. R. Sodium-Ion-Selective Two-Photon Fluorescent Probe In Vivo Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 364-367.
5. Thermo Fisher Scientific.com [Internet]. México: Thermo Fisher Scientific Inc. 2016. [actualizado agosto 2019: citado 15 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx>
6. Anslyn, E. Supramolecular Analytical Chemistry. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687-699.
7. Brown, T.; LeMay, E.; Bursten, B.; Burdge, J. Química. La ciencia central. 9ª ed. Pearson, México, **2004**.
8. Prodi, L.; Bolletta F.; Montaltini, M.; Zaccheroni, N. Luminescent chemosensors for transition metal ions. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 59-83.
9. Wu, J.; Kwon, B.; Liu, W.; Anslyn, Erin-V.; Wang, P.; Kim, Jong-S. Chromogenic/Fluorogenic Ensemble Chemosensing Systems. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7893–7943.
10. Chan, J.; Dodani, C.; Chang, C. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973-984.
11. Kwon, N.; Hu, Y.; Yoon, J. Fluorescent Chemosensors for various analytes including reactive oxygen species, biothiol, metal ions, and toxic gases. *ACS Omega* **2018**, *3*, 13731-13751.



12. Basabe-D, L.; Reinhoudt, D.; Crego-C, M. Design of fluorescent materials for chemical sensing. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 993–1017.
13. Kumar, A.; Goswami, S. 2-Hydroxy-1-naphthaldehyde: A versatile building block for the development of sensors in supramolecular chemistry and molecular recognition. *Sensors Actuat. B: Chem.* **2017**, *245*, 1062-1125.
14. Kolanowski, L.; Liu, F.; New, J. Fluorescent probes for the simultaneous detection of multiple analytes in biology. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 195-208.
15. Singh, N.; Kaur, N.; McCaughan, B.; Callan, J. Ratiometric fluorescent detection of Cu (II) in semi-aqueous solution using a two-fluorophore approach. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3385-3387.
16. Quin, J.; Yang, Z. Ratiometric fluorescent probe for Al³⁺ based on coumarin derivate in aqueous media. *Anal Methods* **2015**, *7*, 2036-2040.
17. Xiao, H.; Li, J.; Wu, K.; Yin, G.; Quan, Y.; Wang, R. A turn-on BODIPY-based fluorescent probe for Hg (II) and its biological applications. *Sensors Actuat B: Chem.* **2015**, *213*, 343-350.
18. Yue, Y.; Dong, Q.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Gong, Y. A highly selective “turn-on” fluorescent chemosensor based on 8-aminoquinoline for detection of Zn²⁺. *Anal Methods* **2015**, *7*, 5661-5666.
19. Park, S.; Kim, H. Highly selective chemodosimeter for cyanide based on a doubly activated Michael acceptor type of coumarin thiazole fluorophore. *Sensors Actuat B: Chem.* **2012**, *161*, 317-321.
20. Park, G.; Jo, H.; Ryu, K.; Kim, C. A new coumarin-based chromogenic chemosensor for the detection of dual analytes Al³⁺ and F⁻. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 63882-63890.
21. Goswami, S.; Manna, A.; Paul, S.; Quah, C.; Fun, Hoong. Rapid and ratiometric detection of hypochlorite with real application in tap water: molecules to low cost devices. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11656-11658.
22. Chen, L.; Wu, D.; Lim, Chang-S.; Kim, D.; Nam, Sang-J.; Lee, W.; Kim, G.; Kim, Hwan-M.; Yoon, J. A two-photon fluorescent probe for specific detection of hydrogen sulfide



- based on a familiar ESIPT fluorophore bearing AIE characteristics. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 4791-4794.
23. New, E. Harnessing the Potential of Small Molecule Intracellular Fluorescent Sensors. *ACS Sens.* **2006**, *1*, 328-333.
24. Specht, E.; Braselmann, E.; Palmer A. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 93-117.
25. Fernández-Suárez, M.; Ting, A. Fluorescent probes for superresolution imaging in living cells. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *9*, 929-943.
26. Klyne, W. Química de los esteroides. Compañía Editorial Continental, México, **1960**.
27. Fox, S. Fisiología Humana. 12ª ed. Mc Graw Hill, México, **2011**. p. 36-39.
28. Shoppe, C. Chemistry of the steroids. Butter Worths Scientific Publications. London. **1958**. p. 249-283.
29. Vademecum.es [Internet]. Madrid: Vademécum Internacional; 2011. [actualizado 9 agosto 2019: citado 11 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/>
30. Evans, N. Current concepts in anabolic androgenic steroids. *Am. J. Sports Med.* **2004**, *32*, 534-542.
31. Daigle, R. Anabolic steroids. *J. Psychoact. Drugs.* **1990**, *22*, 77-80.
32. Popadyuk, I.; Salomatina, O.; Salakhutdinov N. Modern approaches to modification of bile acids for the syntesis of compounds possessing valuable physicochemical and biological properties. *Russ. Chem. Rev.* **2017**, *86*, 388-443.
33. Monte, M.; Marin, J.; Antelo, A.; Vázquez, J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.*, **2009**, *15*, 804-816.
34. Pavlović, N.; Goločorbin-Kon, S.; Đanić, M.; Stanimirov, B.; Al-Salami, H.; Stankov, K.; Mikov, M. Bile acids and their derivatives as potential modifiers of drug reléase and pharmacokinetic profiles. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, número de artículo 1283.
35. Hofmann, A.; Hagey, L. Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1553-1595.



36. Sharma, R.; Long, A.; Gilmer, J. Advances in bile acid medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4029-4052.
37. Kong, W.; Wanga, J.; Xing, X.; Xiao, X.; Zhao, Y.; Zang, Q.; Zhang, P.; Jin, C.; Li, Z.; Liu, W. Antifungal evaluation of cholic acid and its derivatives on *Candida albicans* by microcalorimetry and chemometrics. *Anal. Chem. Acta* **2011**, *689*, 250-256.
38. Kong, W.; Jin, C.; Xiao, X.; Zhao, Y.; Li, Z.; Zhang, P.; Liu W.; Li, X. Comparative study of effects of two bile acid derivatives on *Staphylococcus aureus* by multiple analytical methods. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *179*, 742-747.
39. Valleé, M. Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *160*, 78-87.
40. Marx, C.; Bradford, D.; Hamer, R.; Naylor, J.; Allen, T.; Lieberman, J.; Strauss, J.; Kilts, J. Pregnenolone as a novel therapeutic candidate in schizophrenia: emerging preclinical and clinical evidence. *Neuroscience* **2011**, *191*, 78-90.
41. Darnaudéry, M.; Pallarès, M.; Piazza, P.; Le Moal, M.; Mayo, W. The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the medial septum nucleus increases hippocampal acetylcholine and spatial memory in rats. *Brain Res.* **2002**, *951*, 237-242.
42. Akwa, Y.; Ladurelle, N.; Covey, D.; Baulieu, E. The synthetic enantiomer of pregnenolone sulfate is very active on memory in rats and mice, even more so than its physiological neurosteroid counterpart: distinct mechanisms?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14033-14037.
43. Harvey, P.; Green, M.; Keefe, R.; Velligan, D. Cognitive functioning in schizophrenia: a consensus statement on its role in the definition and evaluation of effective treatments for the illness. *J. Clin. Psychiatry.* **2004**, *65*, 361-372.
44. Krausova, B.; Slavikova, B.; Nekardova, M.; Hubalkova, P.; Vyklicky, V.; Chodounska, H., Vyklicky, L.; Kudova, E. Positive Modulators of the N-Methyl-D-aspartate Receptor: Structure-Activity Relationship Study of Steroidal 3-Hemiesters. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4505-4516.
45. Anker, J.; Carroll, M. The role of progestins in the behavioral effects of cocaine and other drugs of abuse: Human and animal research. *Neuro. Biobehav. Rev.* **2010**, *35*, 315-333.



46. Kancheva, R.; Hill, M.; Cibula, D.; Včeláková, H.; Kancheva, L., Vrbíková, J., Fait, T.; Pařízek, A.; Stárka, L. Relationships of circulating pregnanolone isomers and their polar conjugates to the status of sex, menstrual cycle, and pregnancy. *J. Endocrinol.* **2007**, *195*, 67-78.
47. Morales Arroyo I. Efecto de la pregnanolona (PNA) sobre la arquitectura del sueño de ratas intactas y estresadas. [Tesis de pregrado]. México: Departamento de biología de la reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana; 2006.
48. Gonzáles, G. Neuroendocrinología: Neuroesteroides. *Rev. Peruana Endocrinol.* **1999**, *4*, 57-82.
49. Benes, P.; Freund, R.; Menzel, P.; Starka, L.; Oertel, G. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. *J. Steroid Biochem.* **1970**, *1*, 287-290.
50. Sainsbury, M. *Herocyclic chemistry*. Great Britain Royal Society oh Chemistry. 2001. p. 68-73.
51. Drugbank.ca [Internet]. Canadá: Drugbank; 2005. [actualizado 2 agosto 2019: citado 11 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/>
52. Cao, D.; Liu, Z.; Verwilst, P.; Koo, S.; Jangjili, P.; Seung, J.; Lin, W. Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10403-10519.
53. Wu, J.; Gao, Y.; Lua, J.; Hu, J.; Jua, Y. A steroid–coumarin conjugate for cascade recognition of copper ion and dihydrogen phosphate: Microstructural features and IMPLICATION logic gate properties. *Sensors Actuat B: Chem.* **2015**, *206*, 516-523.
54. Yang, L.; Meng, Q.; Hu, Z.; Ning, W.; Zheng, J.; Dong, C.; Zhou, H. Estrogen receptor sensing in living cells by a high affinity turn-on fluorescent probe. *Sens. Act. B. Chem.* **2018**, *272*, 589-597.
55. Ming, B.; Tingting, C.; Hongxia, L.; Mingzhou, G.; Burton-B. Y.; Chengchu, Z.; Yue, Z.; Na, Z.; Liming, H. Synthesis and biological evaluation of novel steroidal 5 α ,8 α -epidioxyandrost-6-ene-3 β -ol-17-(O-phenylacetamide)oxime derivatives as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3856-3861.
56. Liu, S.; He, Y.; Chan, W.; Lee, A. Cholic acid-based high sensitivity fluorescent sensor for α,ω -dicarboxylate: an intramolecular excimer emission quenched by complexation. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11687-11696.



57. Kumar, A.; Pandey, P. Anion Recognition by 1,2,3-Triazolium Receptors: Application of Click Chemistry in Anion Recognition. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 165-168.
58. Wang, H.; Chan, Wing-H.; Cholic acid-based fluorescent sensor for mercuric and methyl mercuric ion in aqueous solutions. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8825-8830.
59. Kumar, A.; Pandey, P. Steroidal 1,2,3-triazole-based sensors for Hg²⁺ ion and their logic gate behaviour. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5842-5845.
60. Wang, Z. Einhorn Acylation. En *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*; Wang, Z., Editor; John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, United States, **2010**; Vol. 1, p. 967-970.
61. Chen, Y.; McDaid.; Deng Li.; Asymmetric Alcoholysis of Cyclic Anhydrides. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2965-2983.
62. Sharma, R.; Priyanka.; Katiyar, D. L-Proline catalyzed condensation of salicylaldehydes with ethyl nitroacetate: an efficient access to 3-nitrocoumarins. *Monatsh. Chem.* **2016**, *147*, 2157-2161.
63. a) Belleau, B.; Martel, R.; Lacasse, G.; Menard, M.; Weinberg, N.; Perron Y. N-carboxylic acid esters of 1,2- and 1,4-dihydroquinolines. New class of irreversible inactivators of the catechol amine alpha-receptors and potent central nervous system depressants. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 823-824. b) Kakarla, R.; Li, G.; Gerritz, S. W. Synthesis and applications of a novel polymer-supported EEDQ reagent. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 745-747. c) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631. d) Yang, H.-K.; Zhao, H.; Wang, X.-M.; Li, Y.-K. A survey of the influence of EEDQ on efficient post-functionalization of an Anderson-type polyoxomolybdate towards construction of organic-inorganic hybrids. *Colloid. Surf. A* **2018**, *538*, 711-719.
64. Ruíz, J.; Verdecia, F.; Vélez, H. ¹³C NMR Spectroscopy of some 20-Ketopregnanes. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 547-568.
65. Ariza-Castolo, A. A.; Bakhmutov, V.; Contreras-Theurel, R.; Farfán-García, N.; Flores-Parra, A.; Gordillo-Román, B.; Juaristi-Cossio, E.; Paz-Sandoval, A.; Rosales-Hoz, M. de J.; Santillán-Baca, R. L. Ejemplos prácticos del uso de la Resonancia Magnética



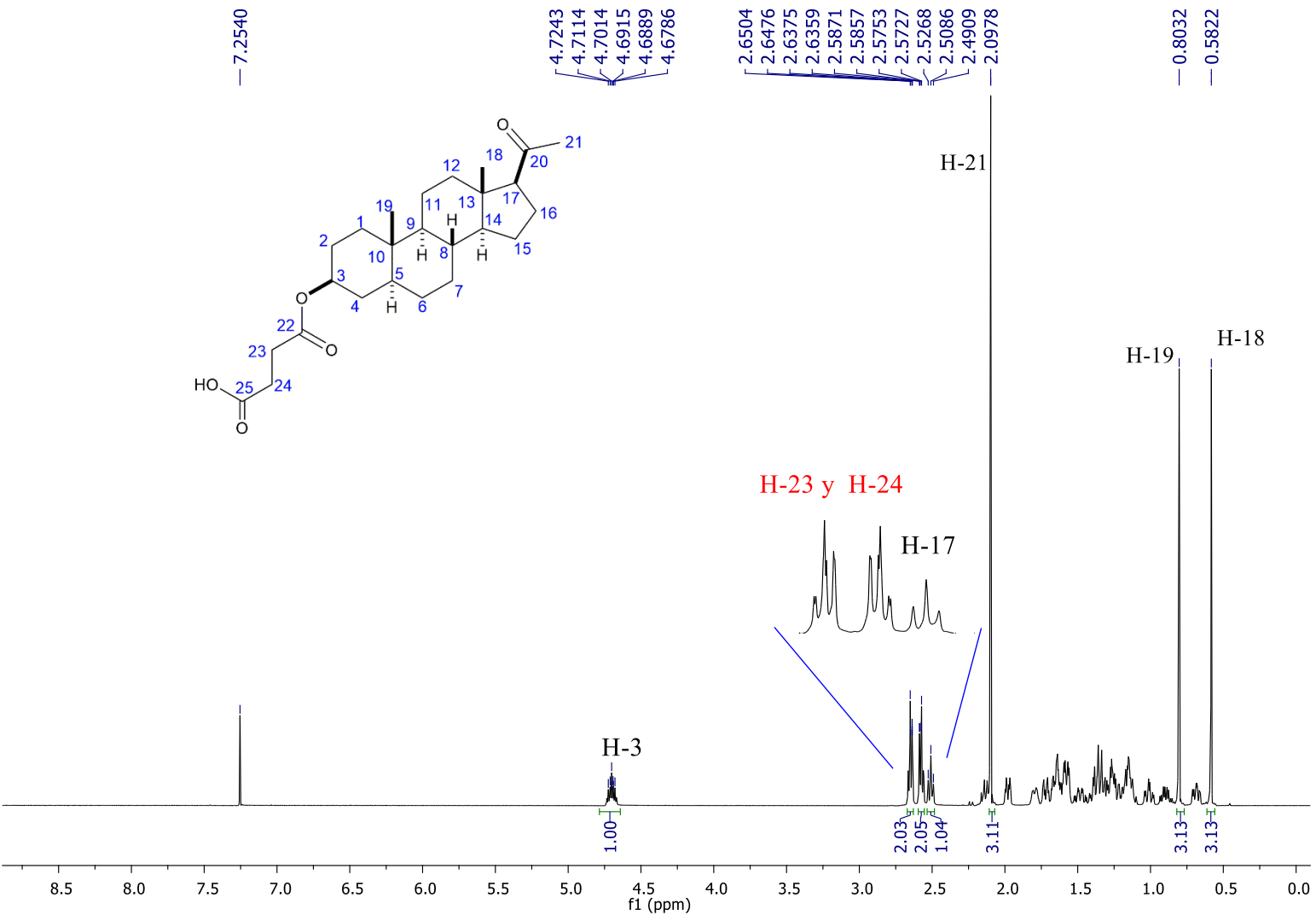
- Nuclear en la química; Ariza-Castolo, A., Flores-Parra, A., Paz-Sandoval, A. Eds.; Edit. Cinvestav: México D. F. **2006**.
66. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, **2000**.
67. Das, Deb-K.; Sarkar, S.; Khan, M.; Belal, Md.; Khan, A. A mild efficient method for large scale synthesis of 3-aminocoumarins and its further application for the preparation of 4-bromo-3-aminocoumarins. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4869-4874.
68. D. Seebach. *Helv. Chim. Acta.* **1987**, *70*, 458.
69. Stastna, E.; Choudounska, H.; Pouzar, V.; Kapras, V.; Borovska, J.; Casi, Ondrej.; Vyklícky, Jr. L. Synthesis of C3, C5 and C7 pregnane derivatives and their effect on NMDA receptor responses in cultured rat hippocampal neurons. *Steroids* **2009**, *74*, 256-263.
70. a) Čebular, K.; Božić, B.; Stavber, S. Esterification of Aryl/Alkyl Acids Catalysed by N-bromosuccinimide under Mild. Reaction Conditions. *Molecules* **2018**, *23*, número de artículo 2235. b) Rohacova, J.; Marin, M.; Martínez-Romero, A.; O'Connor, J.; Gomez-Lechon, M.; Donato M.; Castell, J.; Miranda, M. Synthesis of the new, UV-photoactive dansyl derivates for Flow cytometric studies on bile acid uptake. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4973-4980.
71. Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, Brandon-M.; Long, Su.; Barnhill, Hannah-N.; Wang, Q. A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603-4606.
72. a) Li, J.; Zhang, C.; Yang, S.; Yang, W.; Yang, G. A coumarin-based fluorescent Probe for selective and sensitive detection of thiophenols and its application. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *86*, 3037-3042. b) Valizadeh, H.; Shockravi, A. An efficient and facile synthesis of substituted 3-aminocoumarins under mw irradiation in dry media. *Heterocycl. Commun.* **2004**, *10*, 475-478.
73. Maddi, V.; Mamledesai, S.; Satyanarayana, D.; Swamy, S. Synthesis and Antiinflammatory Activity of Substituted (2-oxochromen-3-yl)benzamides. *Indian J. Pharm. Sci.* **2007**, *69*, 847-849.



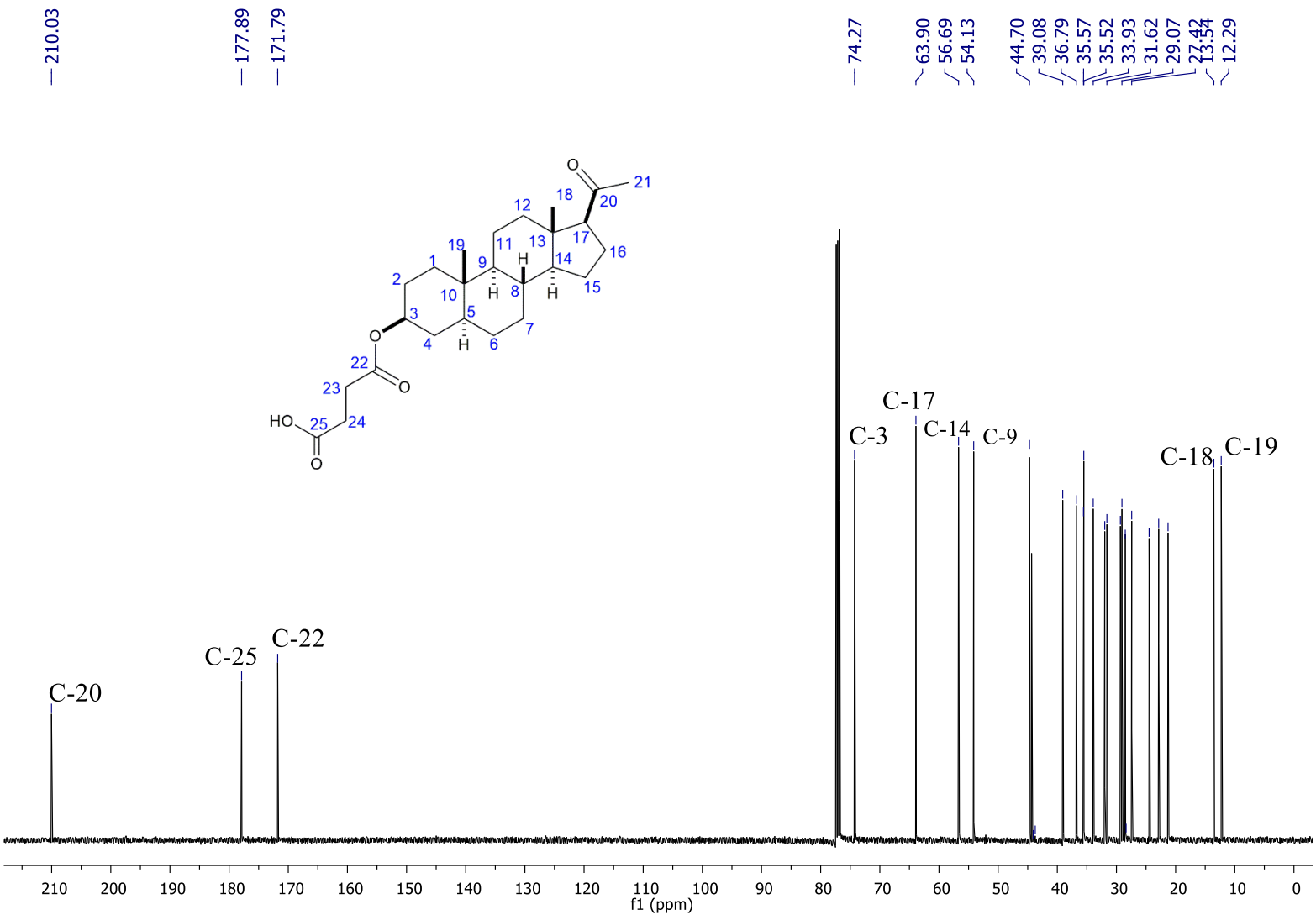
74. Kudale, A.; Kendall, J.; Warford, C.; Wilkins, N.; Bodwell, G. Hydrolysis-free synthesis of 3-aminocoumarins. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5077-5080.
75. Szendi, Z.; Forgó, P.; Sweet, F. Complete ^1H and ^{13}C NMR spectra of pregnenolone. *Steroids* **1995**, *60*, 442-446.
76. Bensasson, C.; Hanson, J.; Hunter, C. The Hydroxylation of Δ^5 -Androstenes by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2355-2358.
77. Omkar, B.; Somashekar, B.; Jadegoud, Y.; Nagana, G. ^1H and ^{13}C NMR Characterization and Stereochemical Assignments of Bile Acids in Aqueous Media. *Lipids*. **2005**, *40*, 1031-1041.



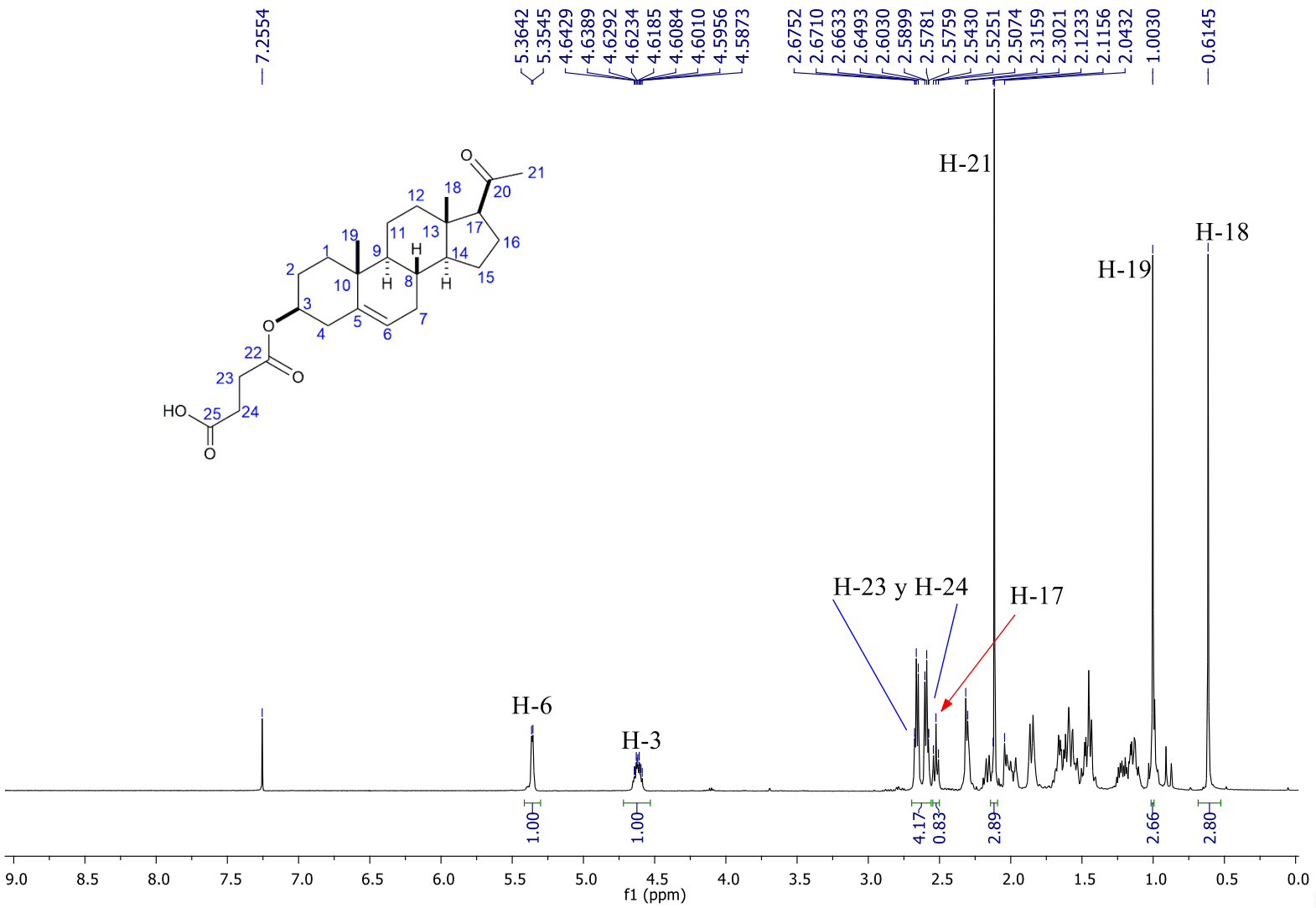
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C



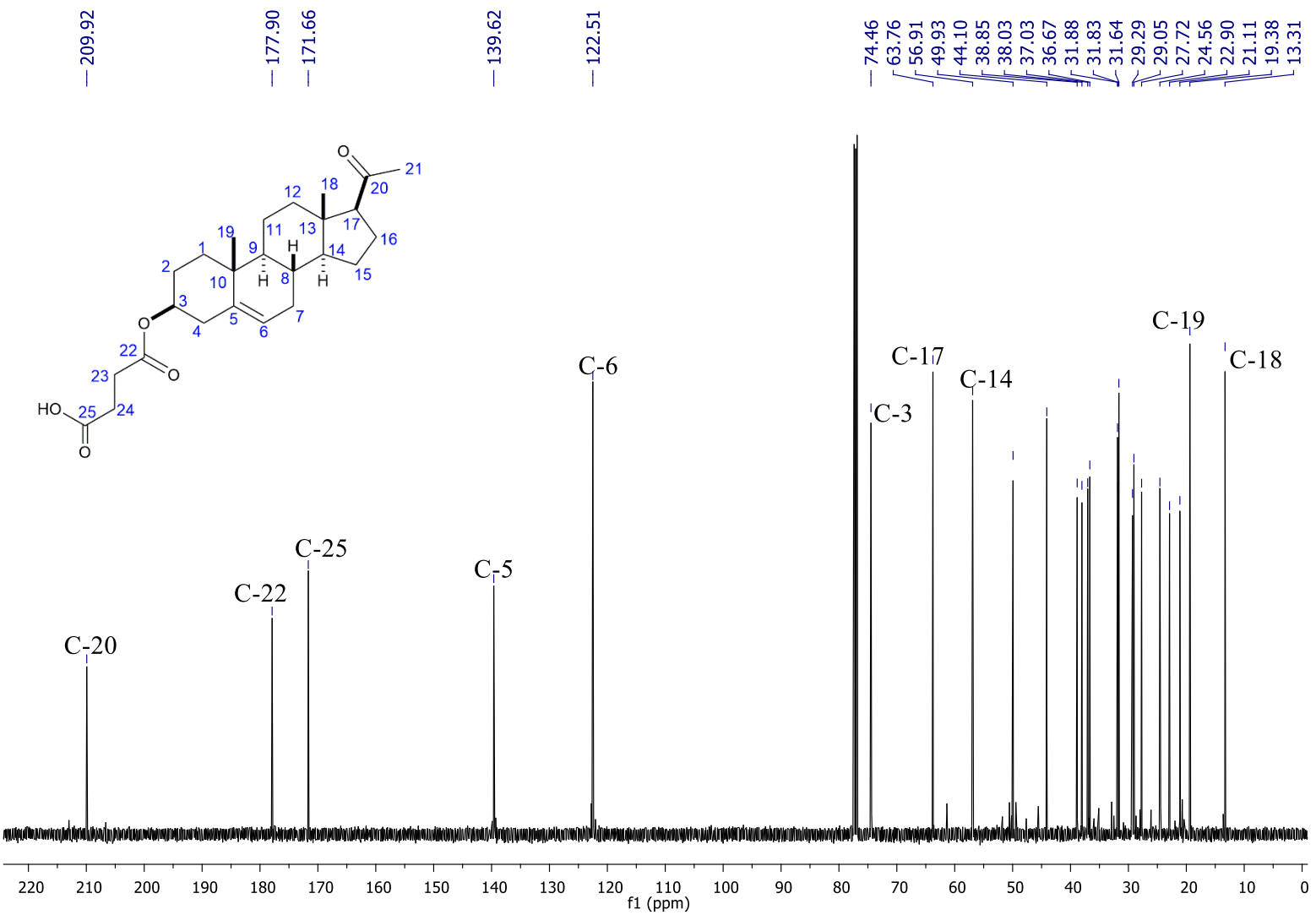
Espectro 1. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) del compuesto 1a en CDCl₃.



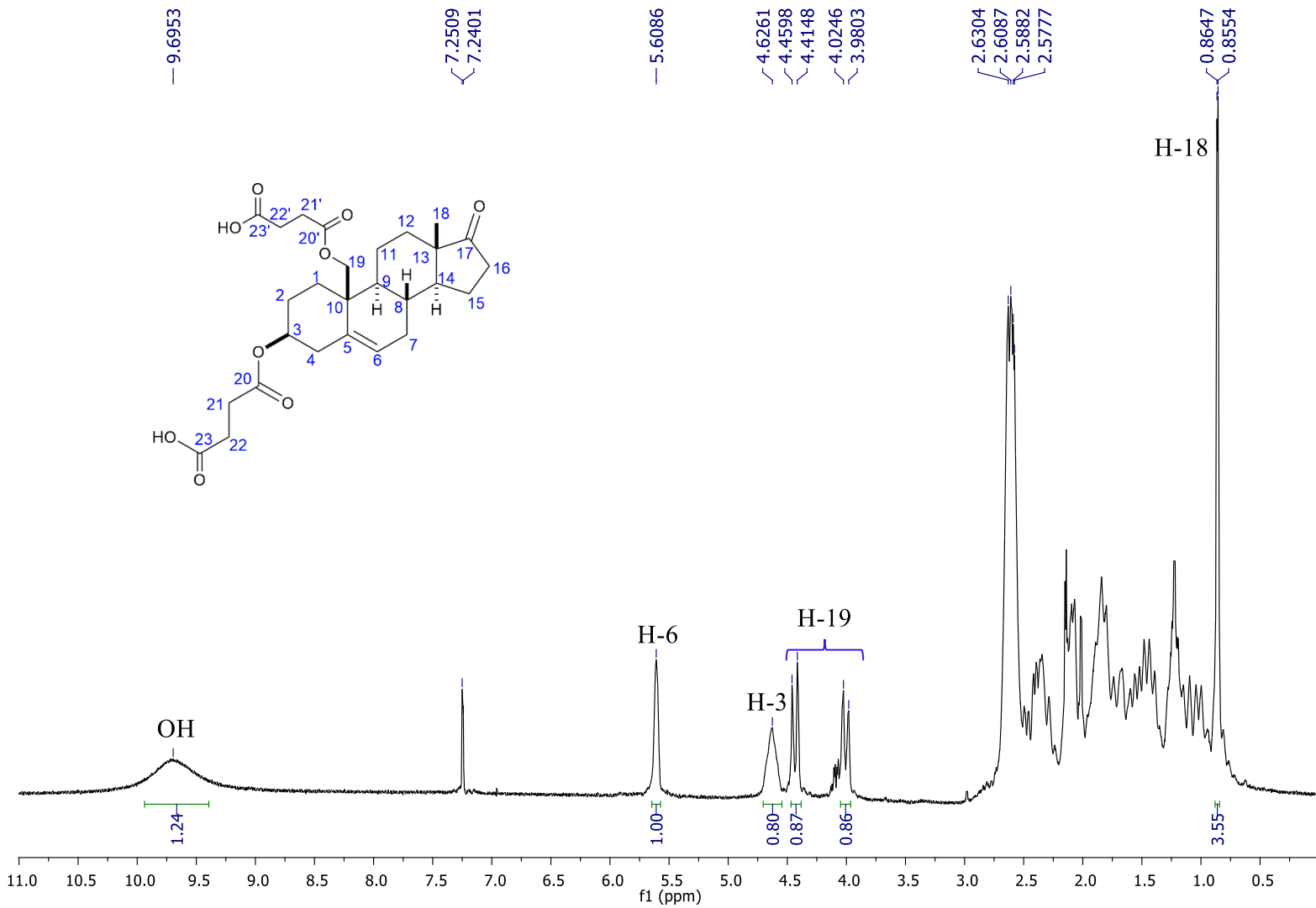
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C (125.76 MHz) del compuesto **1a** en CDCl_3 .



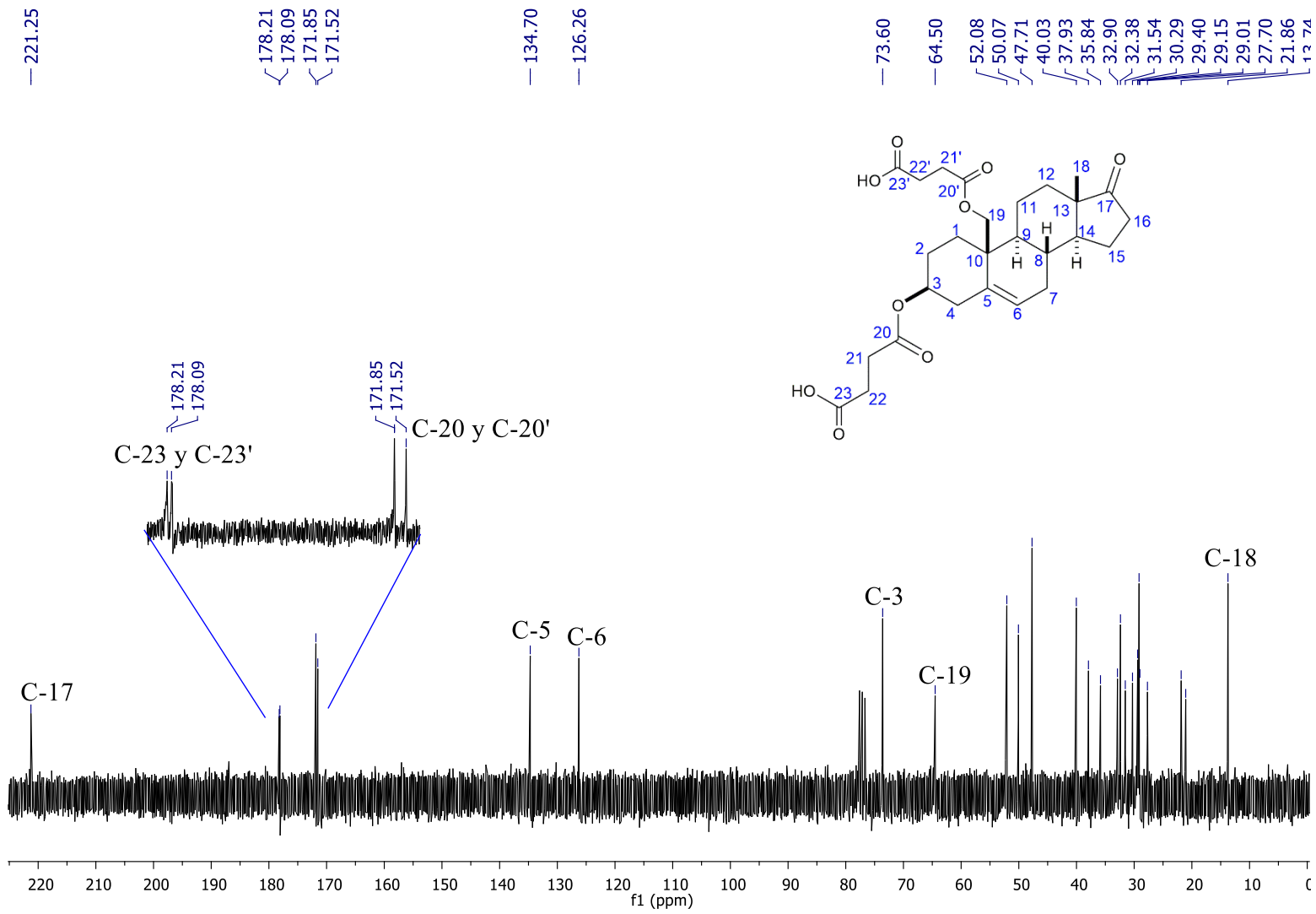
Espectro 3. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) del compuesto **2a** en CDCl₃.



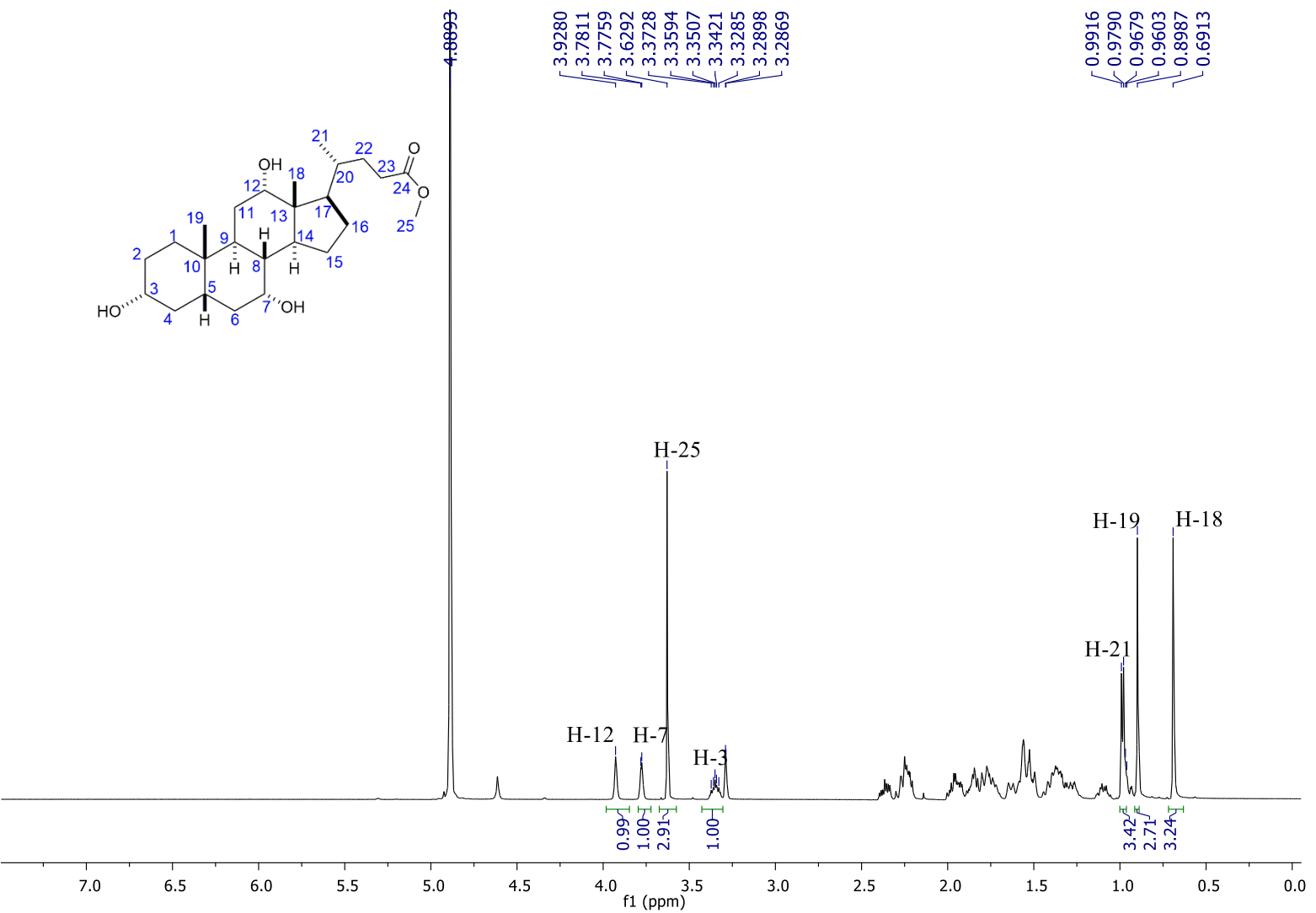
Espectro 4. Espectro de RMN ¹³C (125.76 MHz) del compuesto 2a en CDCl₃.



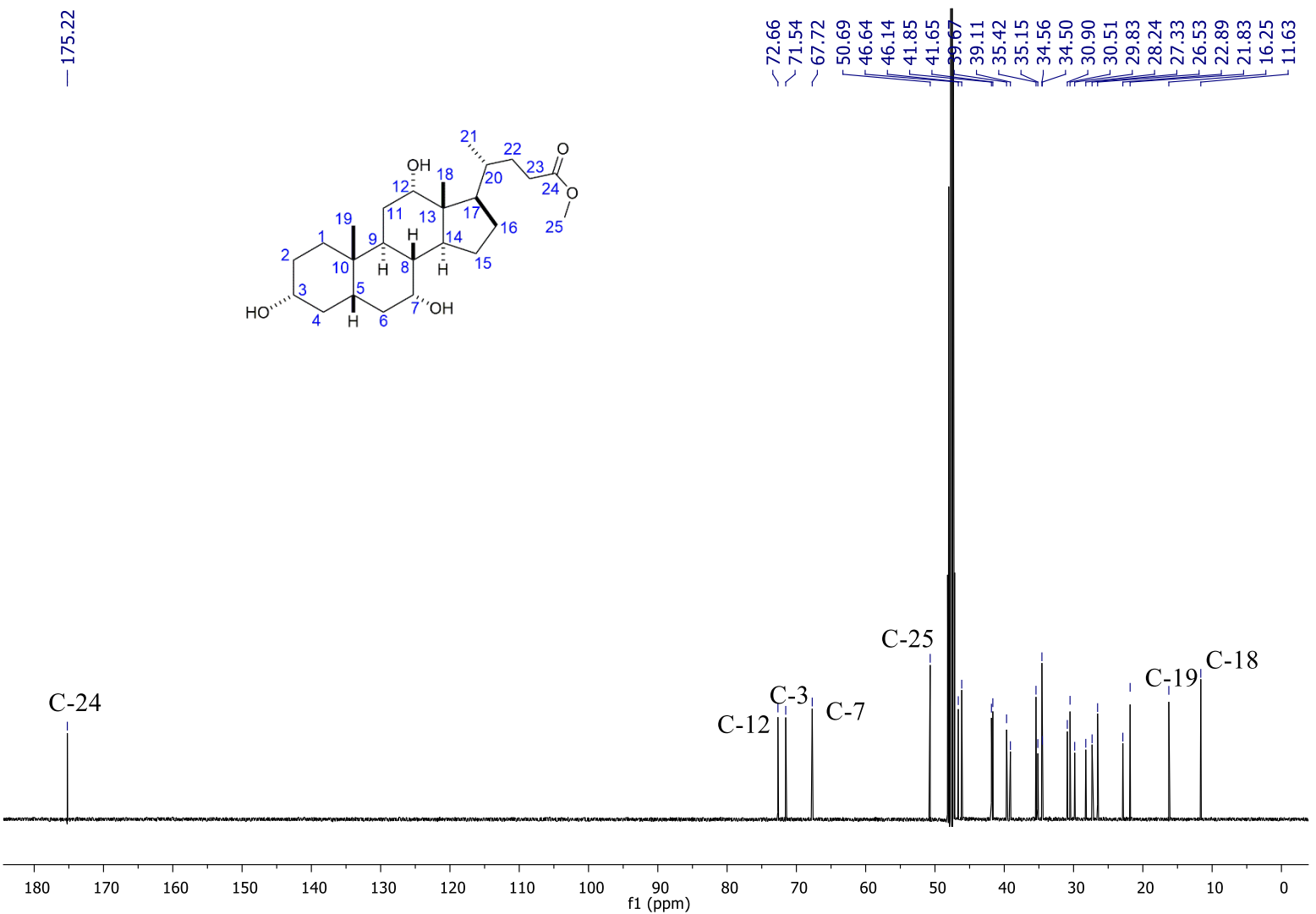
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H (270 MHz) del compuesto 3a en CDCl_3 .



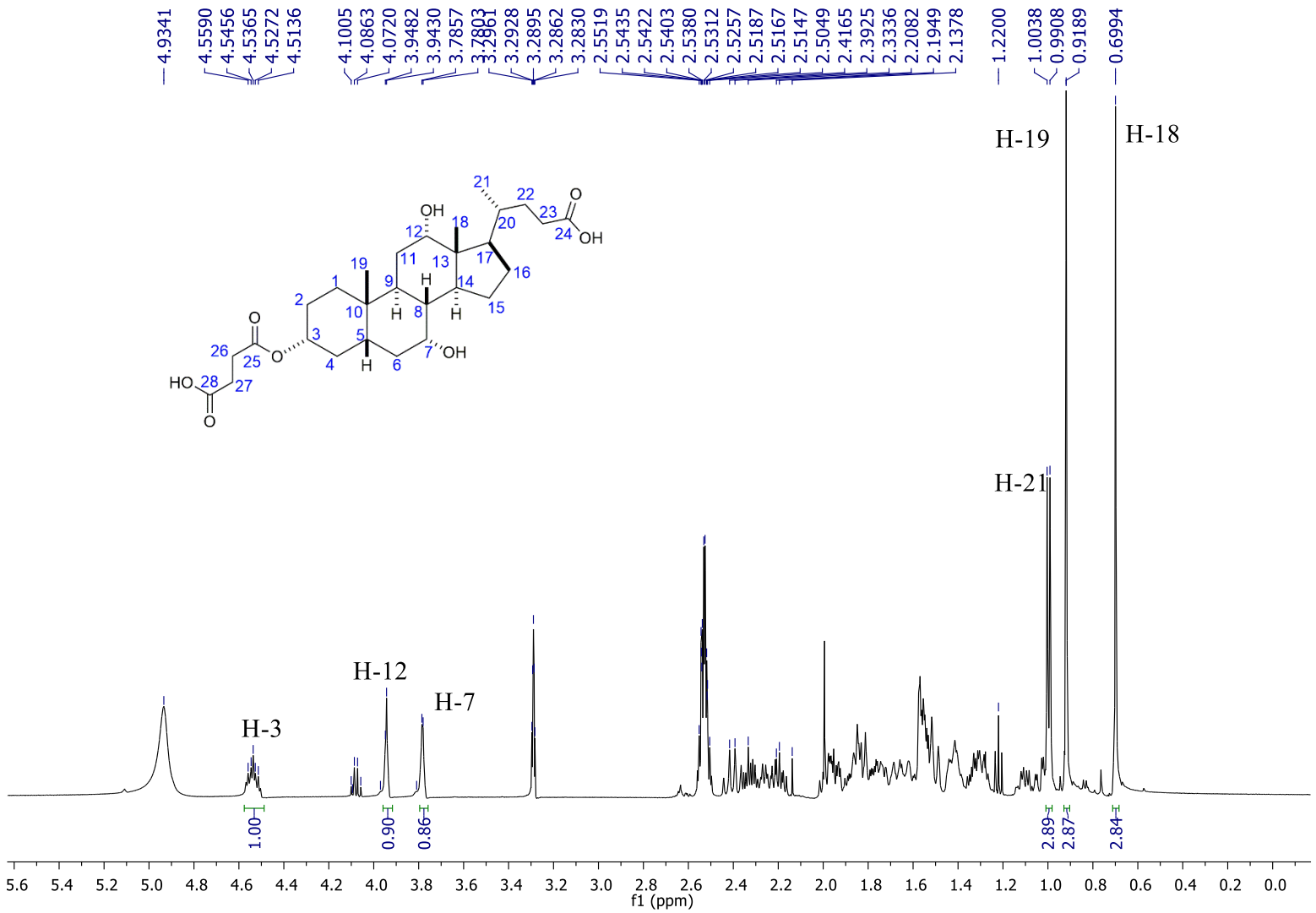
Espectro 6. Espectro de RMN ¹³C (67.93 MHz) del compuesto **3a** en CDCl₃.



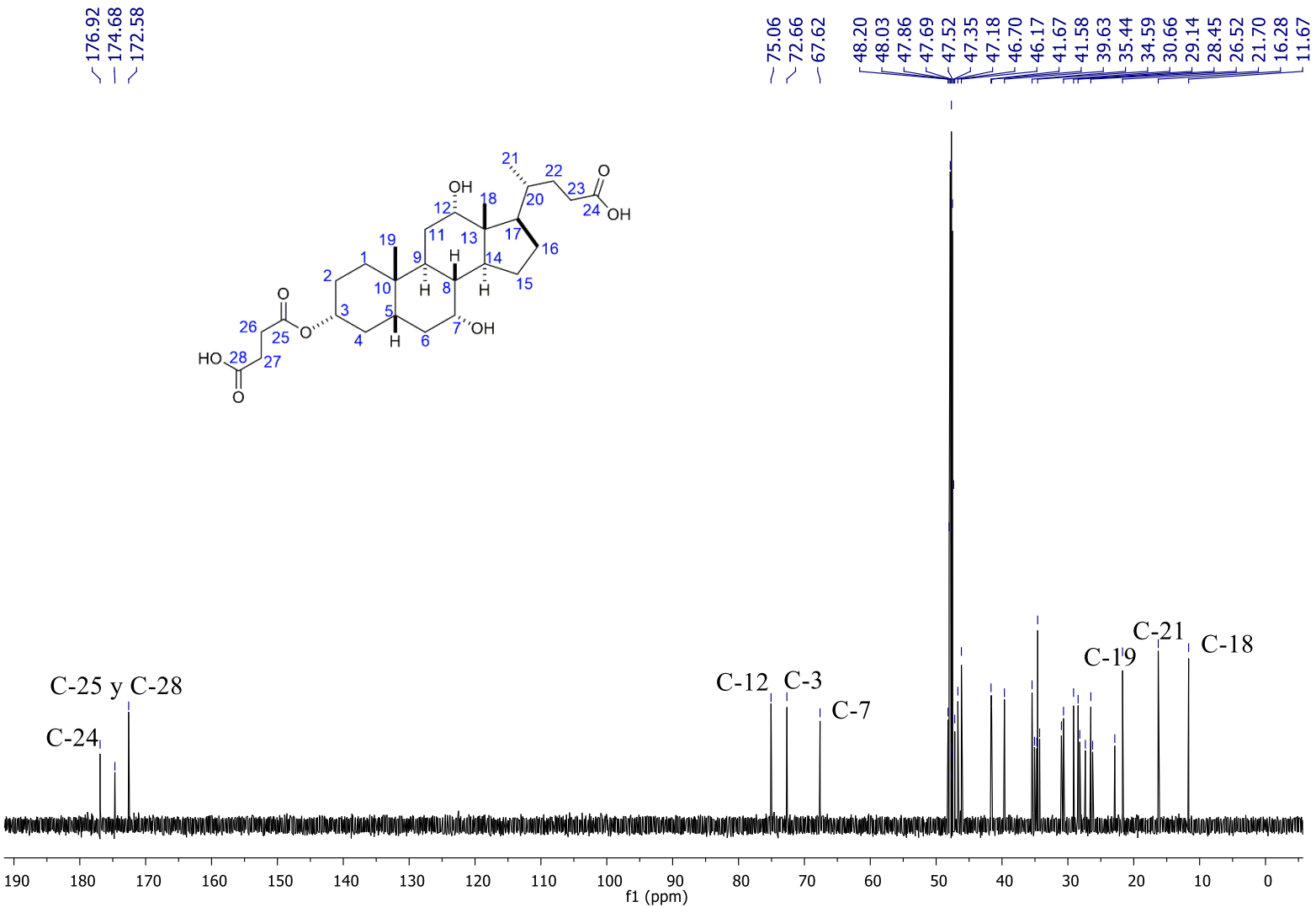
Espectro 7. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) del compuesto **4a** en CD₃OD.



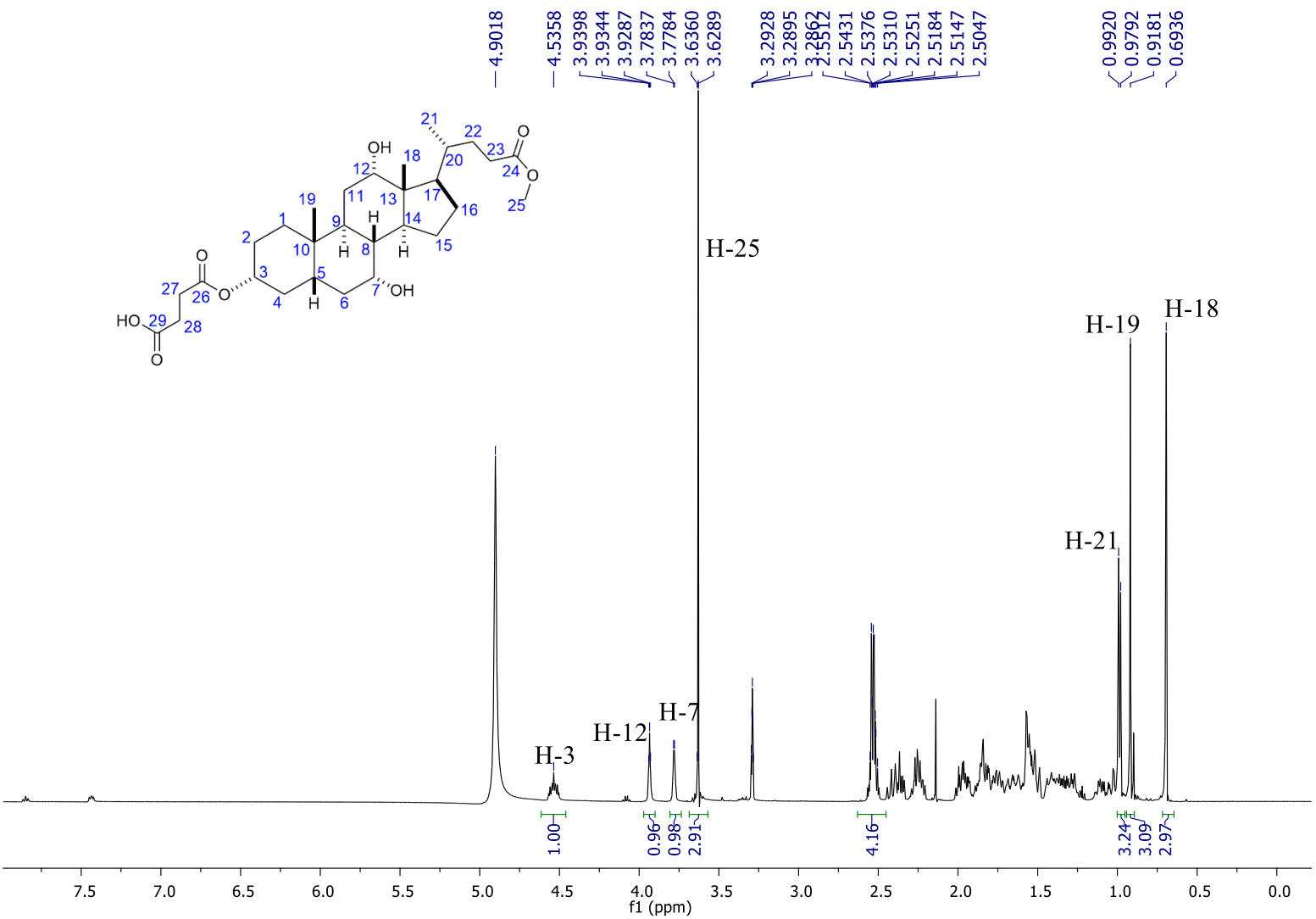
Espectro 8. Espectro de RMN ^{13}C (125.76 MHz) del compuesto **4a** en CD_3OD .



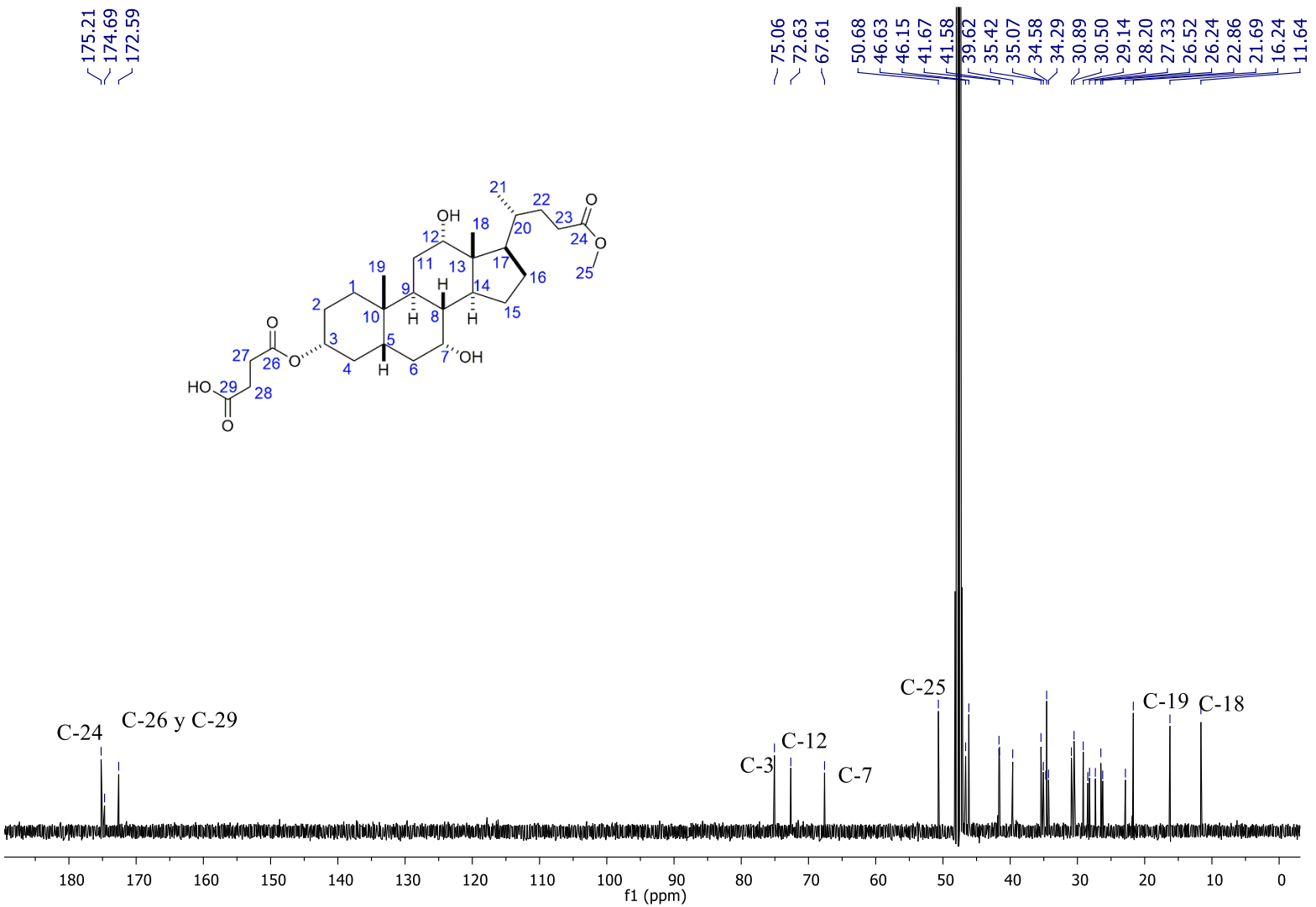
Espectro 9. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) del compuesto **5a** en CD₃OD.



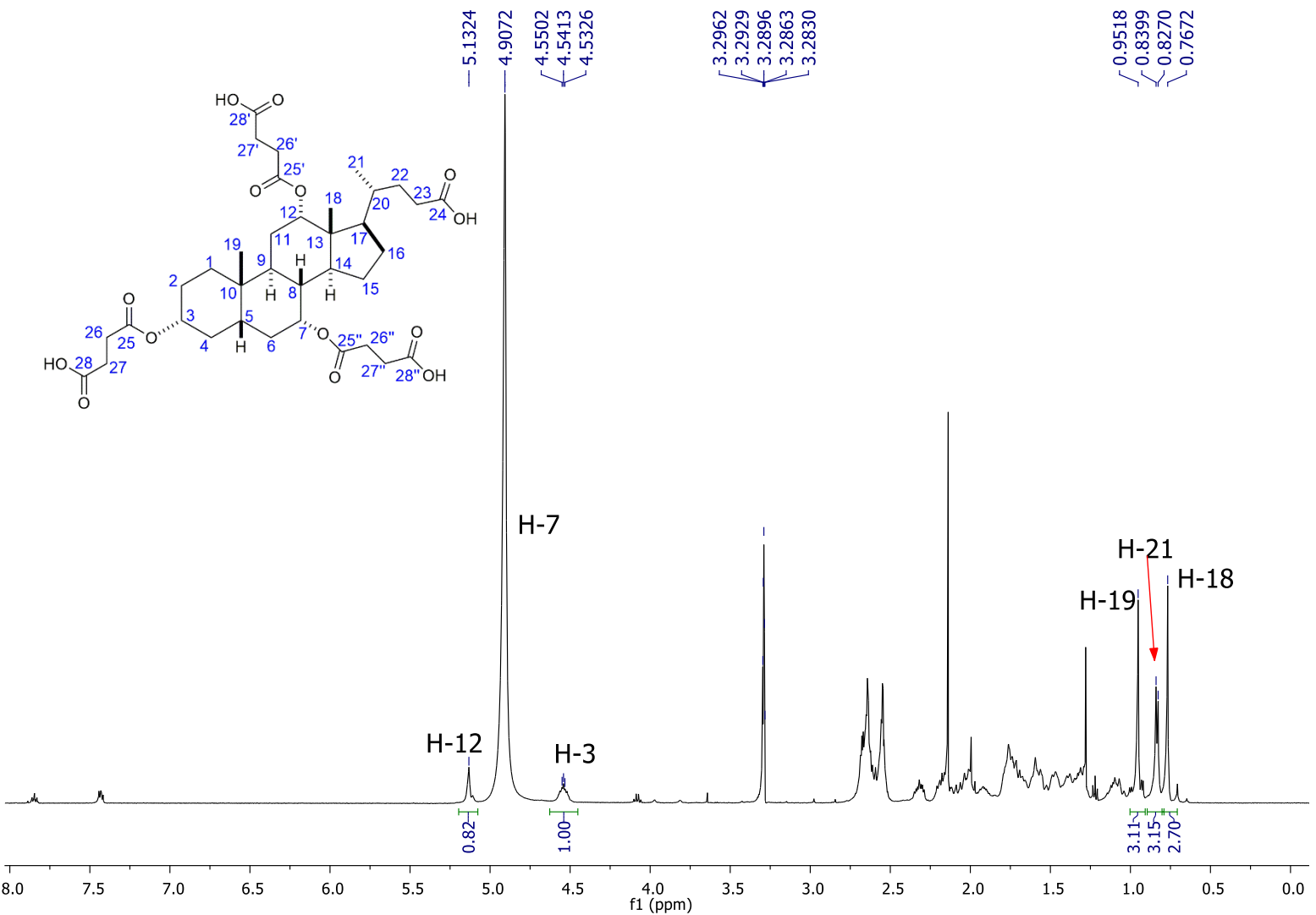
Espectro 10. Espectro de RMN ¹³C (125.76 MHz) del compuesto **5a** en CD₃OD.



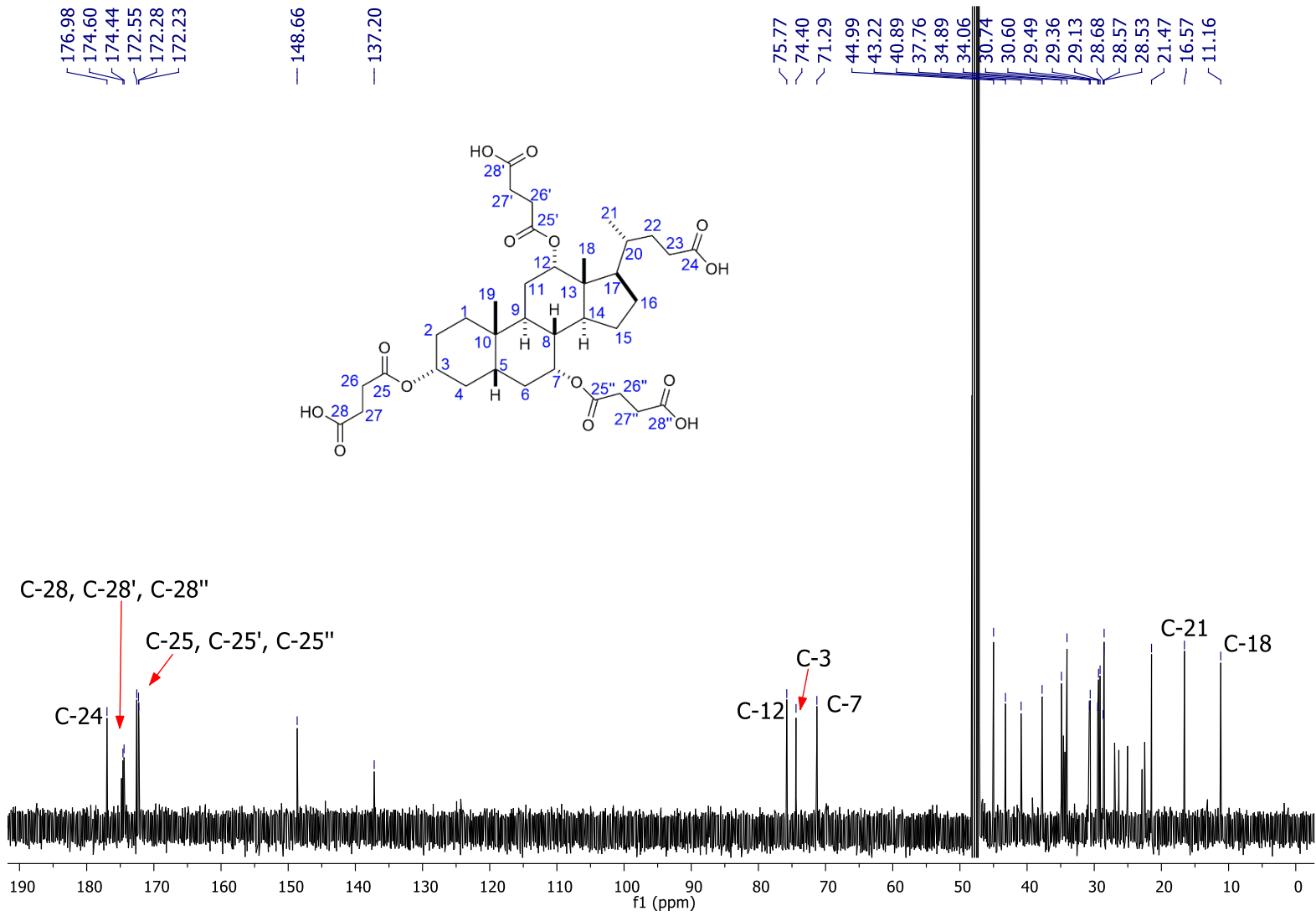
Espectro II. Espectro de RMN ¹H (270 MHz) del compuesto **5b** en CD₃OD.

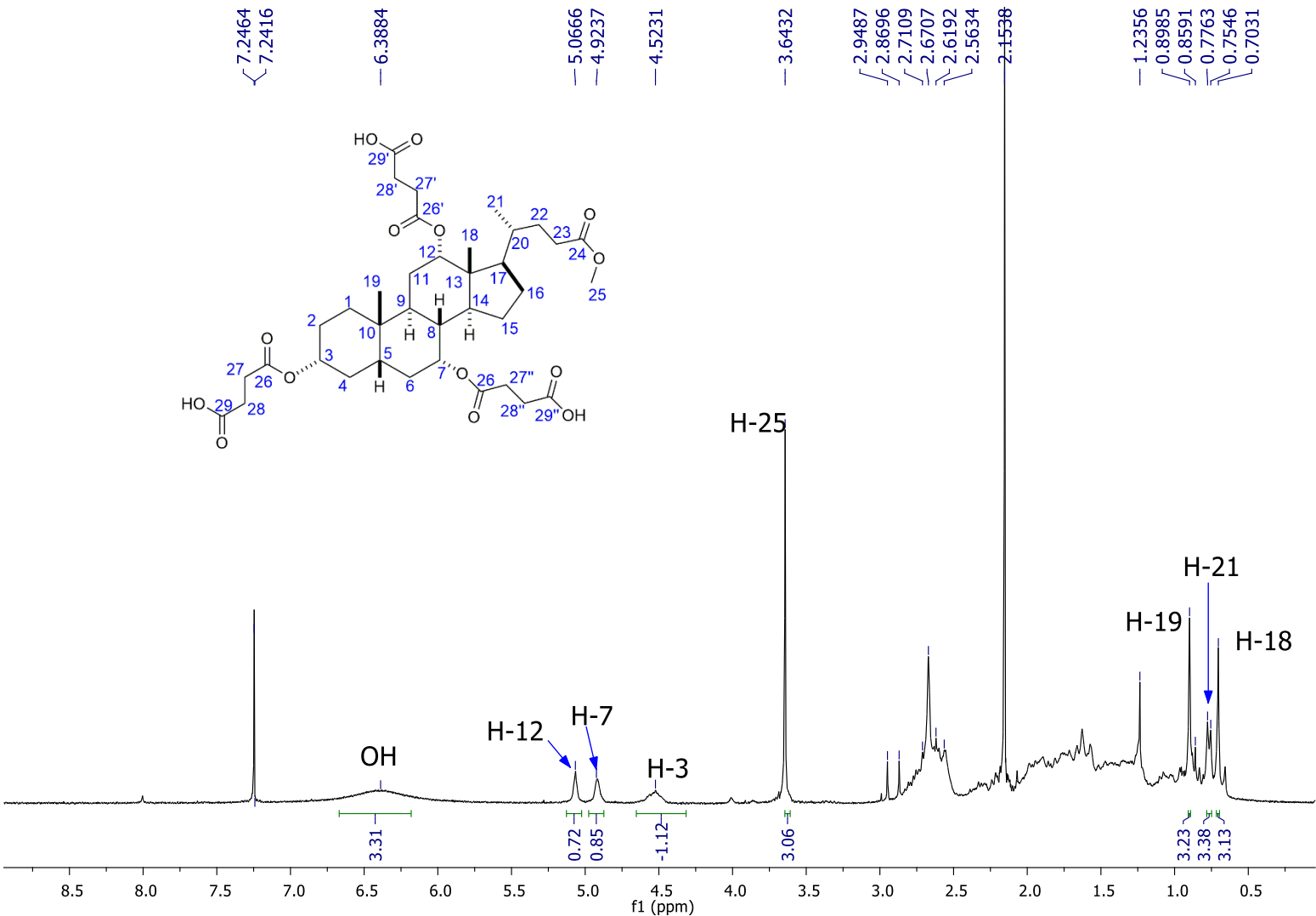


Espectro 12. Espectro de RMN ¹³C (67.93 MHz) del compuesto **5b** en CD₃OD.



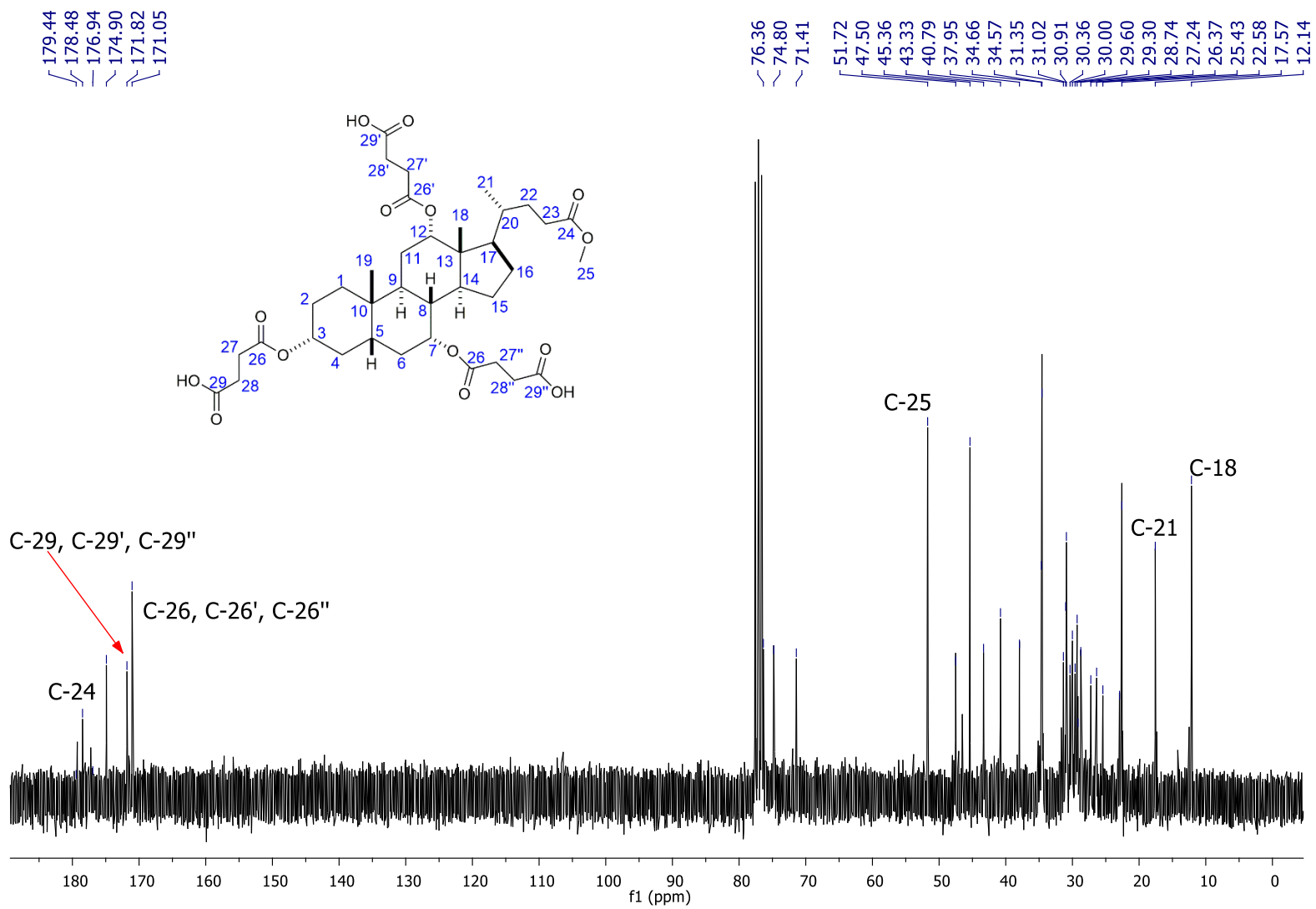
Espectro 13. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) del compuesto 8a en CDCl₃.

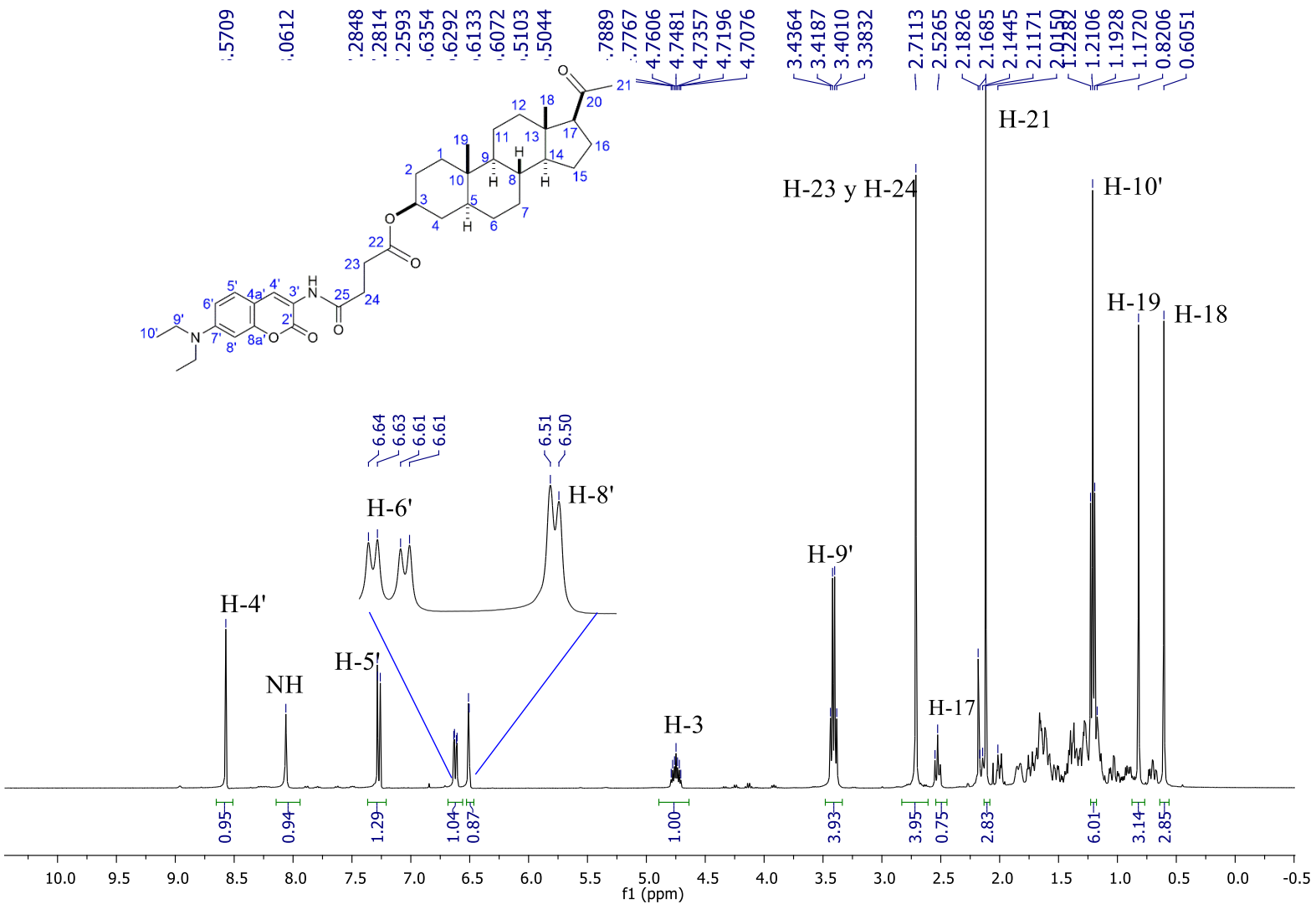




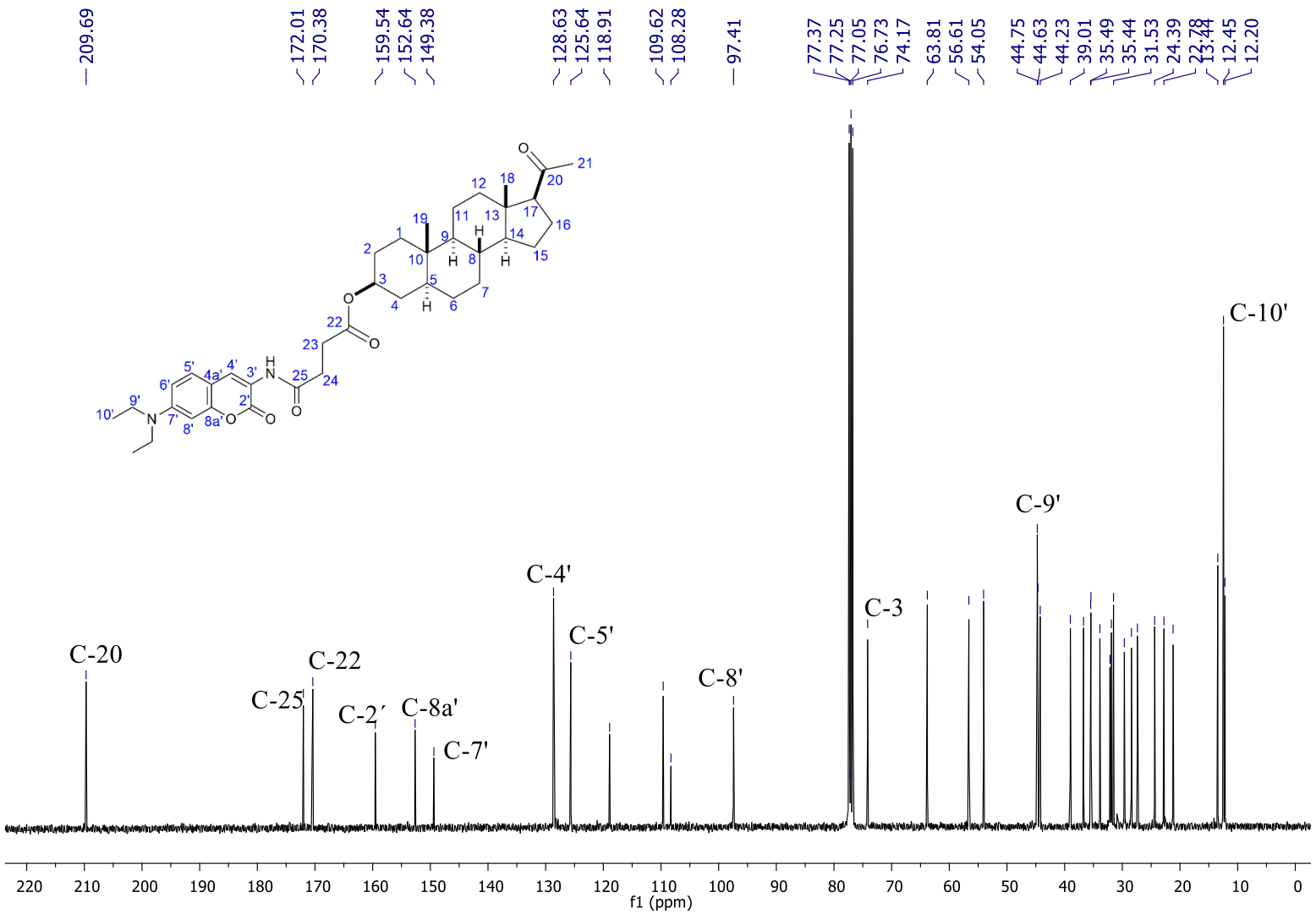
Espectro 15. Espectro de RMN ^1H (270 MHz) del compuesto **8b** en CDCl_3 .

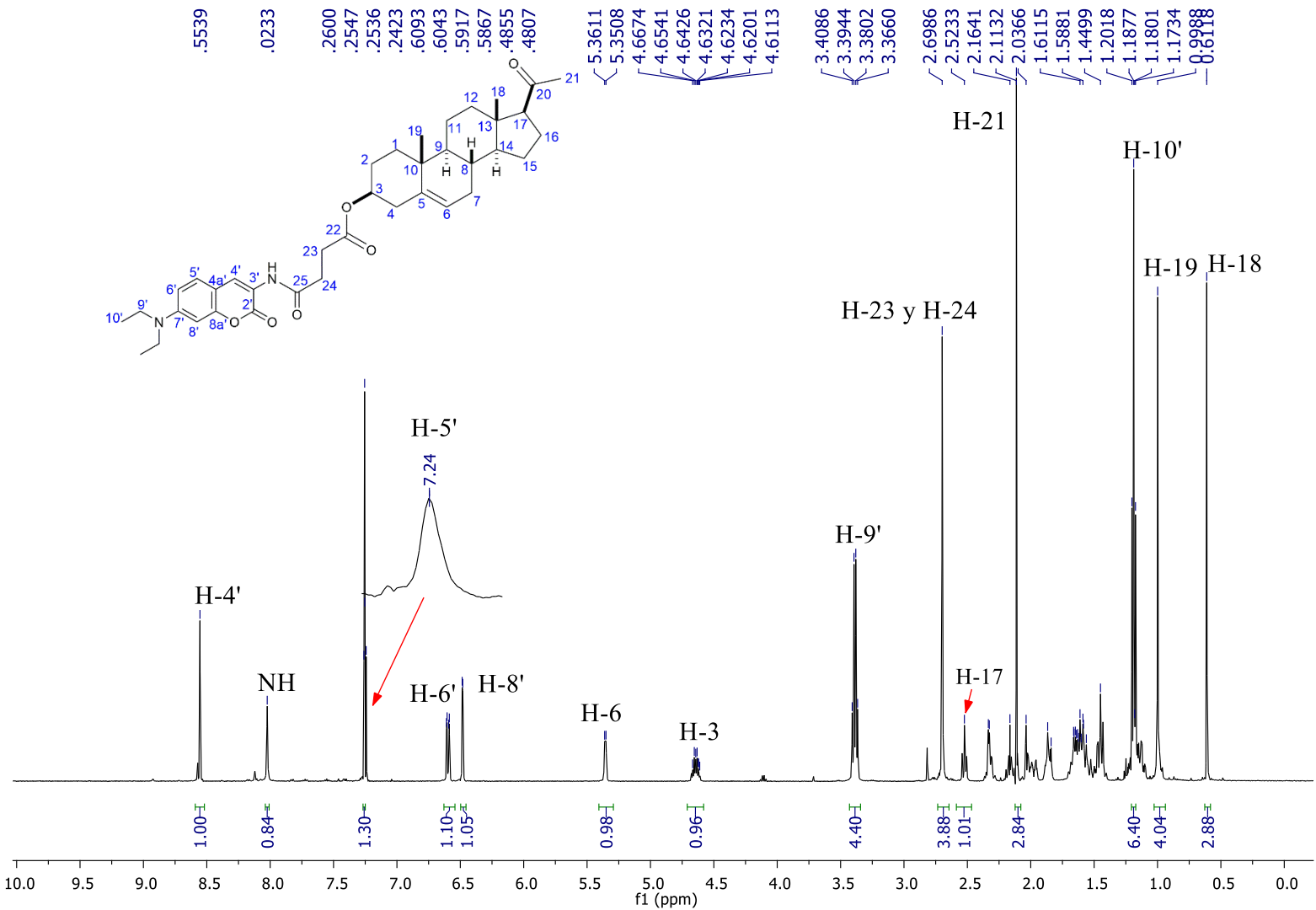
Espectro 16. Espectro de RMN ^{13}C (67.93 MHz) del compuesto **8b** en CD_3OD .



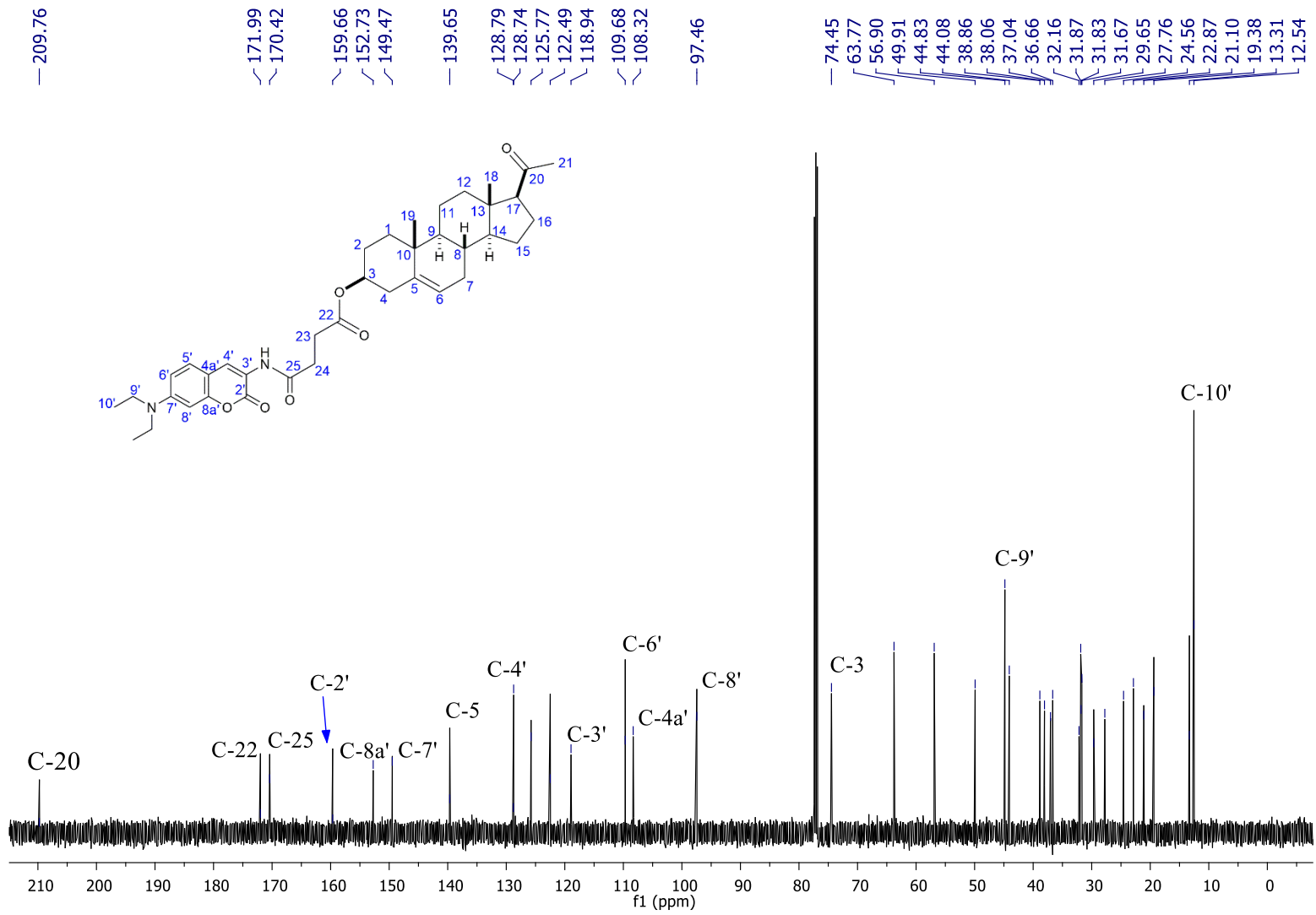


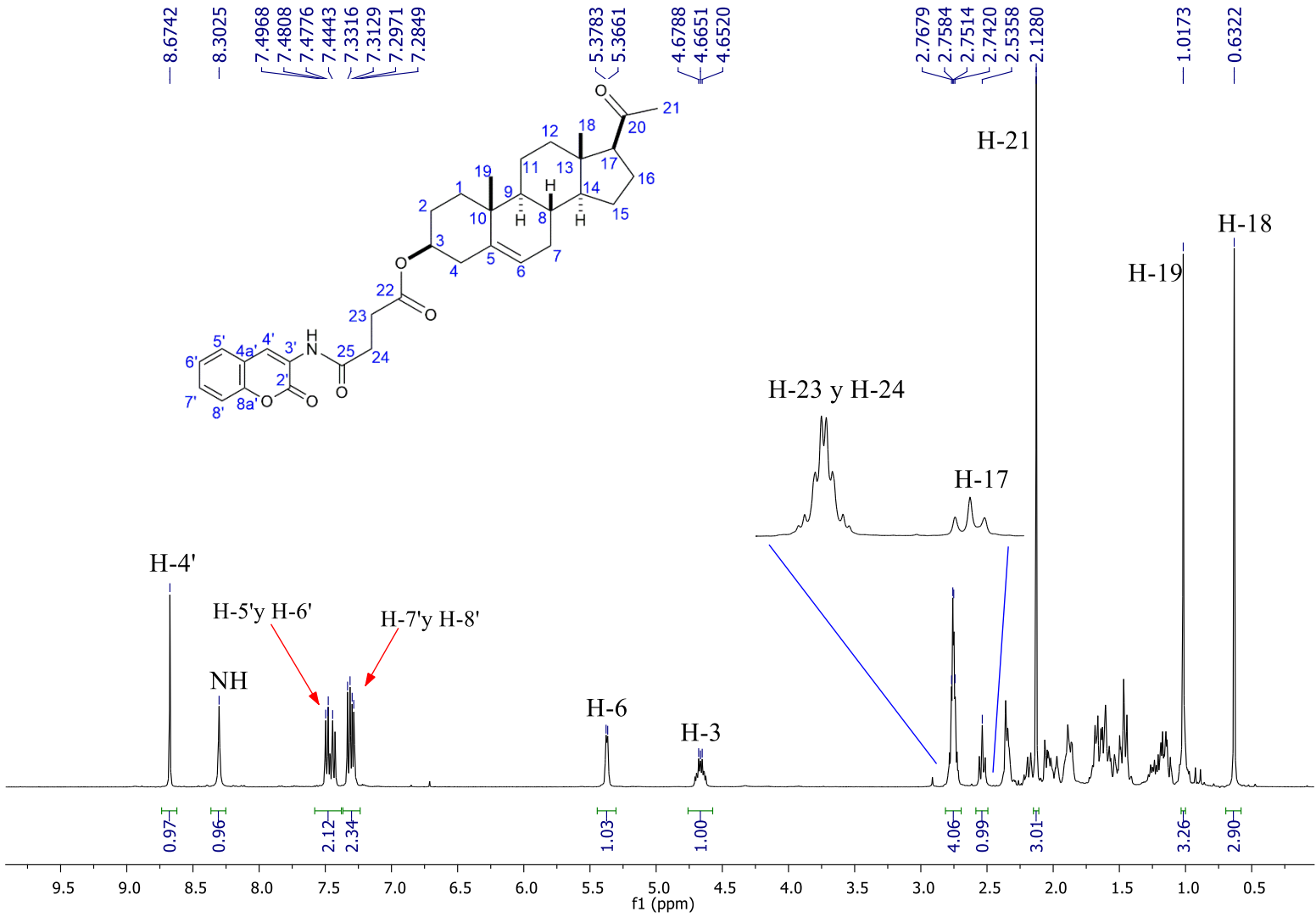
Espectro 17. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) del compuesto **1b** en CDCl₃.



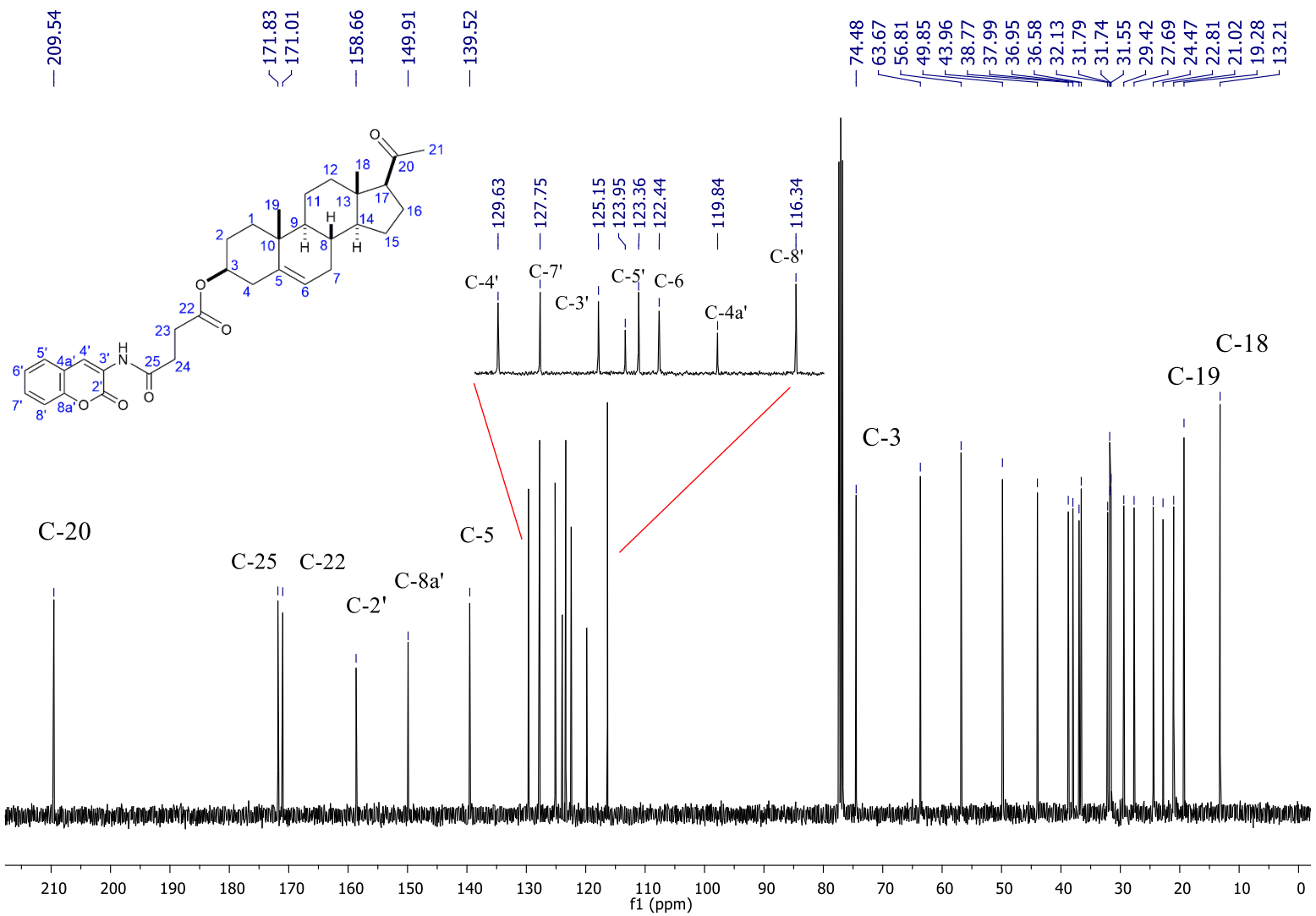


Espectro 19. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) del compuesto **2b** en CDCl₃.

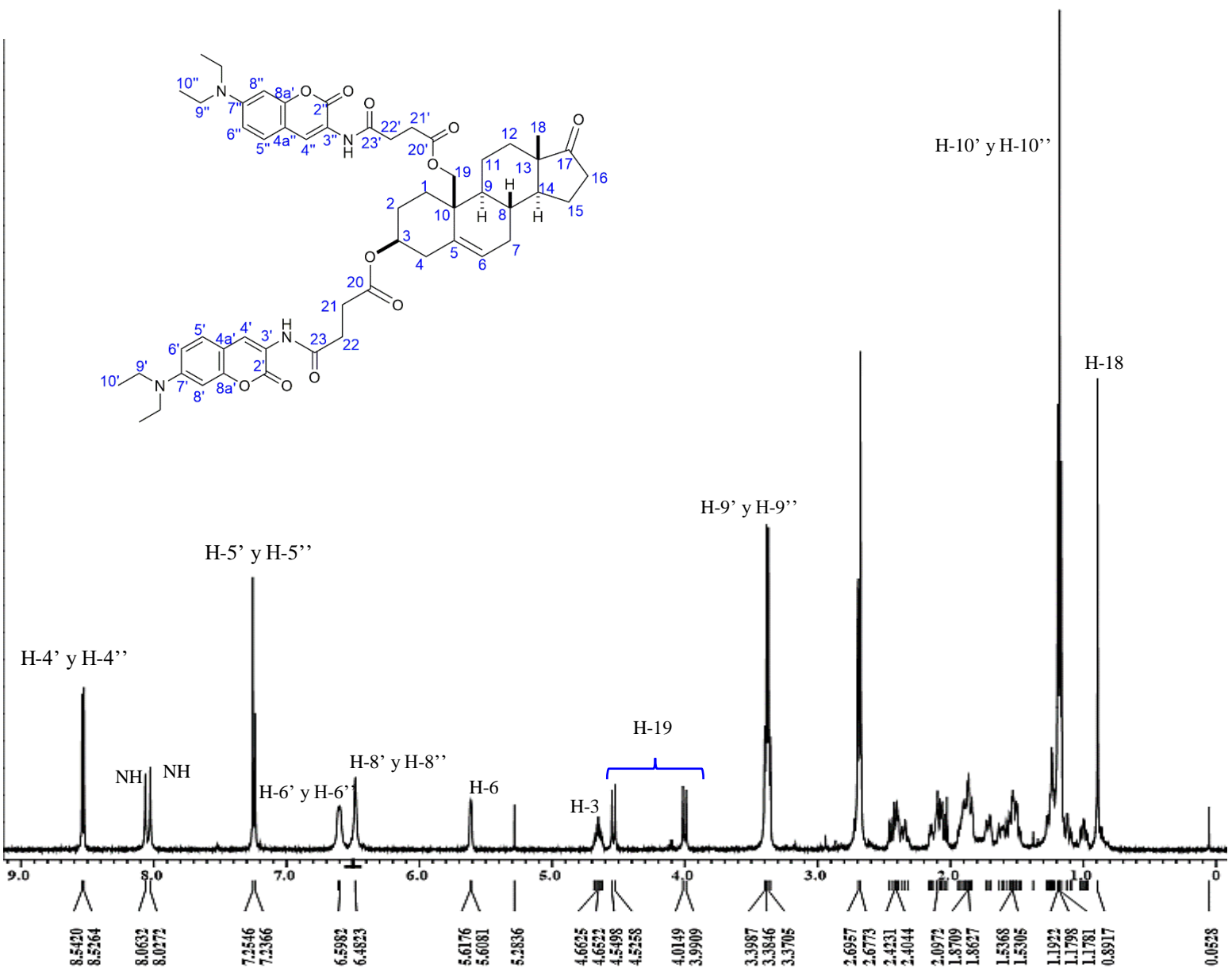




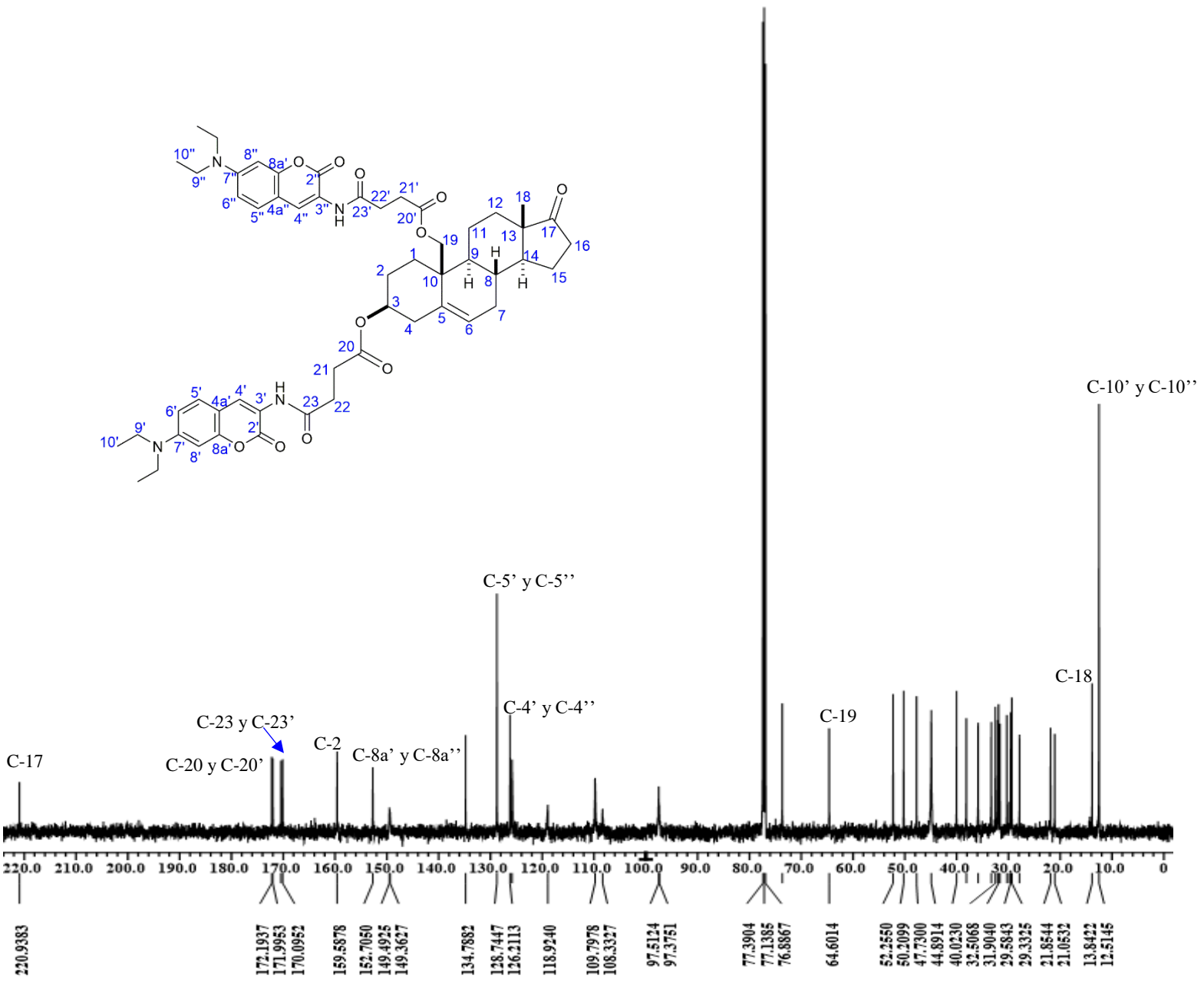
Espectro 21. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) del compuesto **2c** en CDCl_3 .



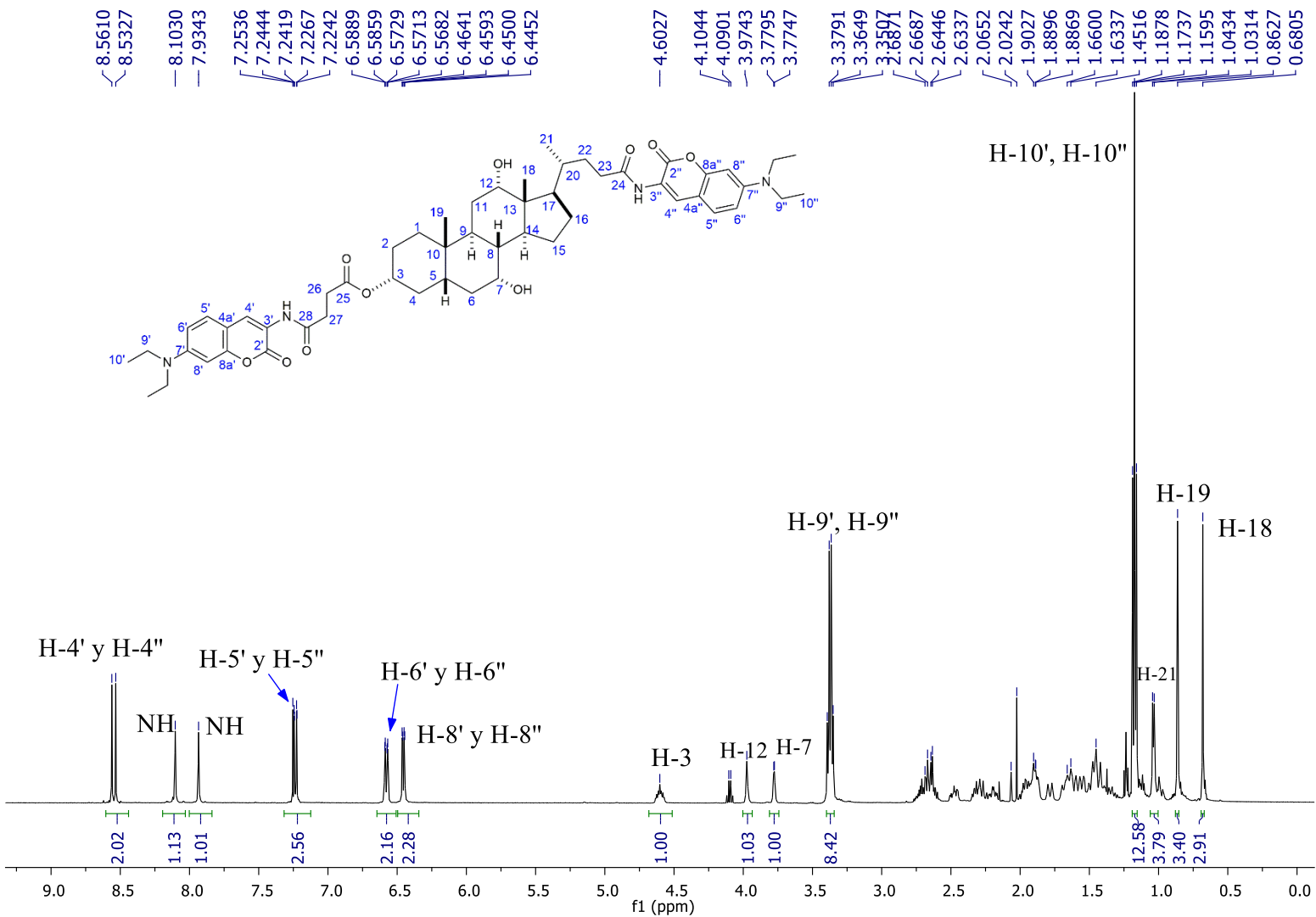
Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C (100.5 MHz) del compuesto **2c** en CD_3OD .

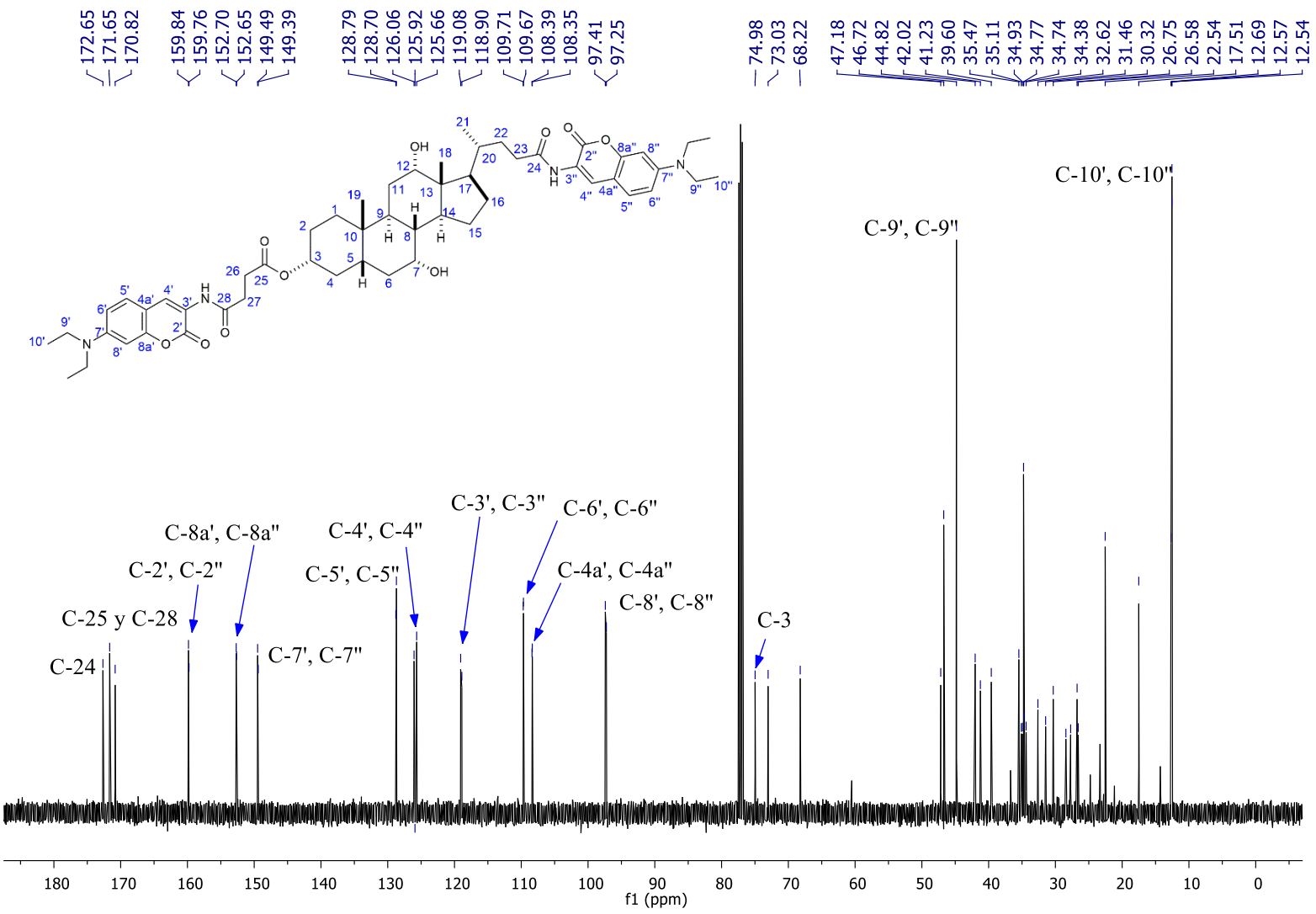


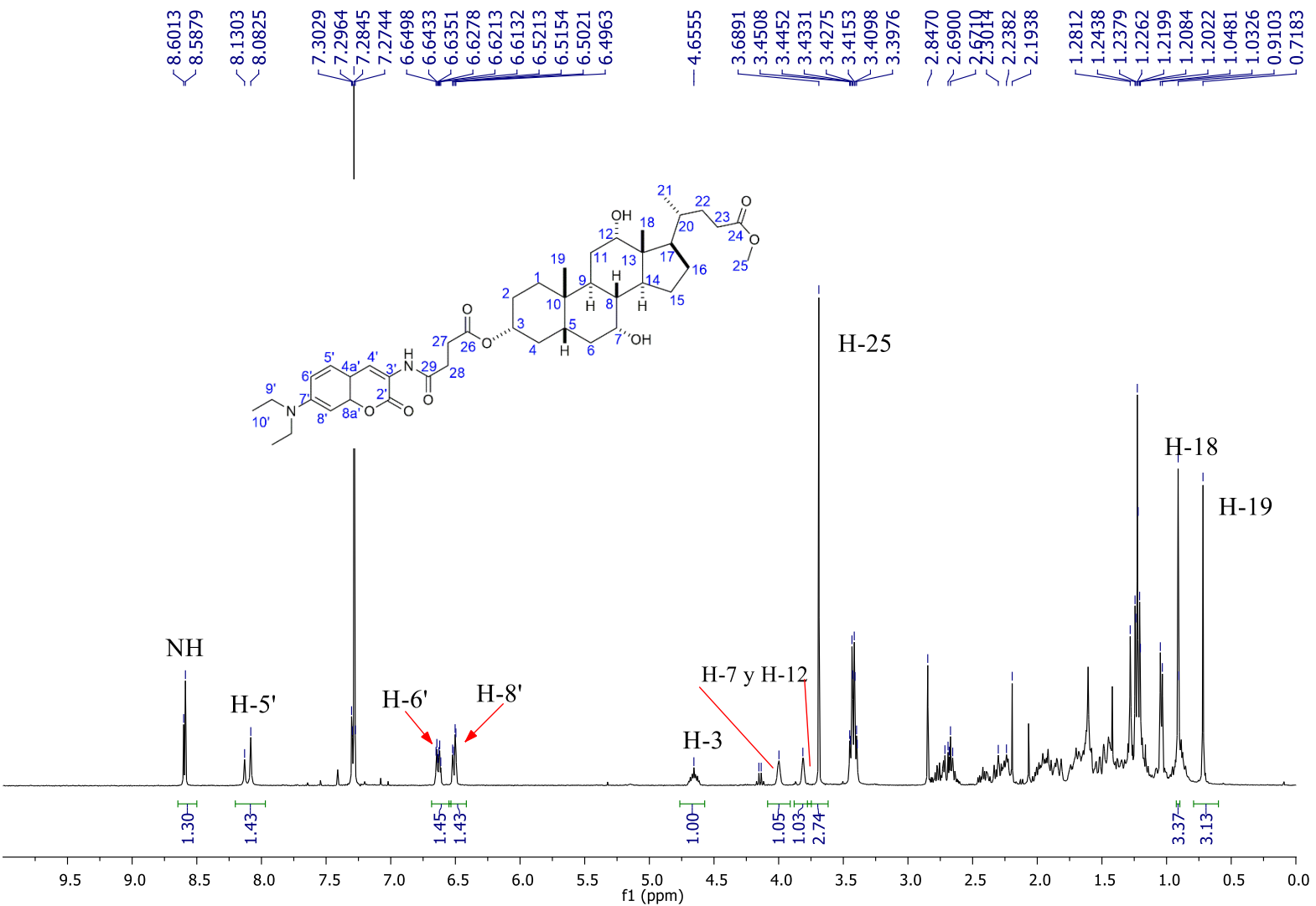
Espectro 23. Espectro de RMN ¹H (270 MHz) del compuesto **3b** en CDCl₃.



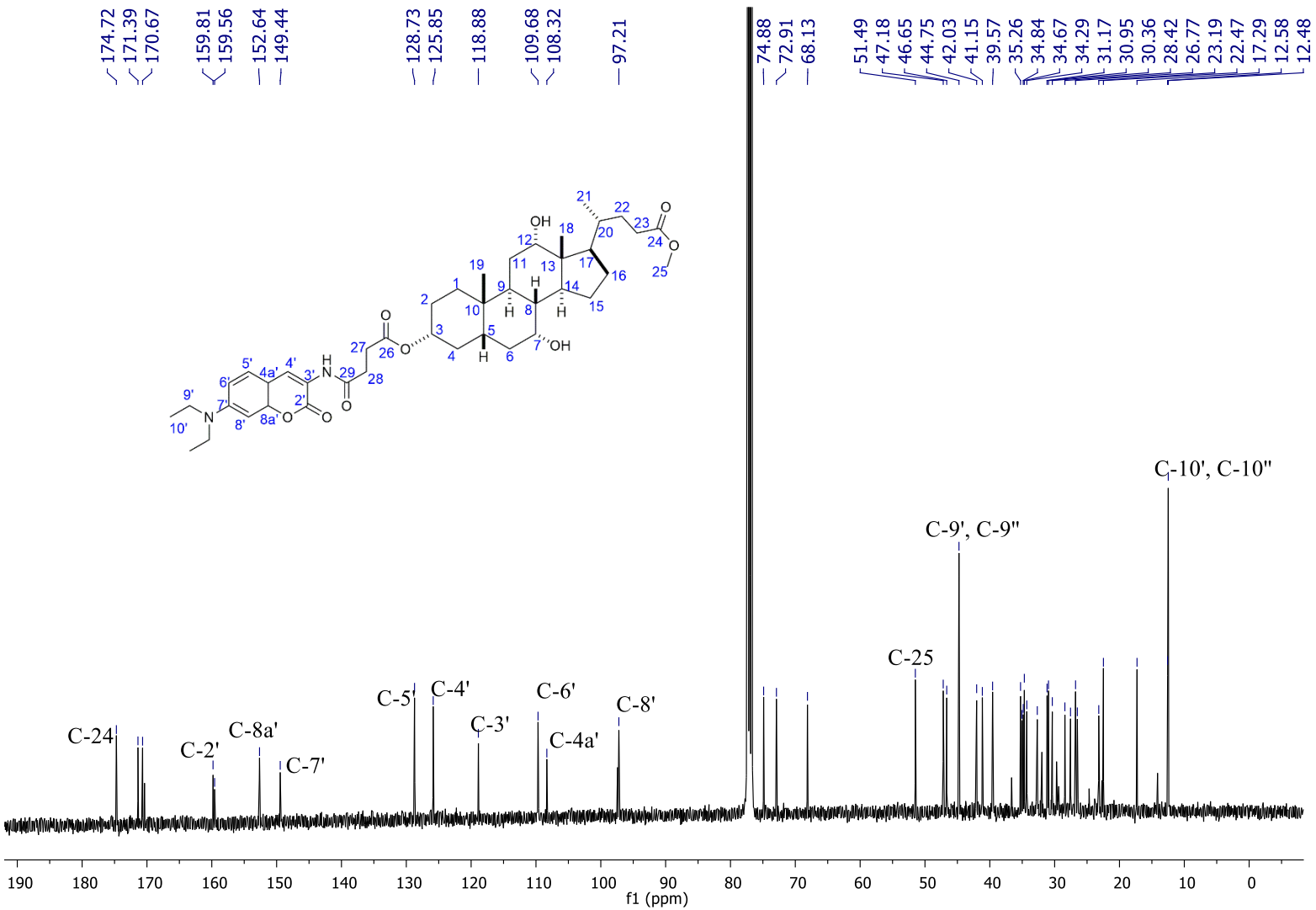
Espectro 24. Espectro de RMN ^{13}C (67.93 MHz) del compuesto **3b** en CDCl_3 .

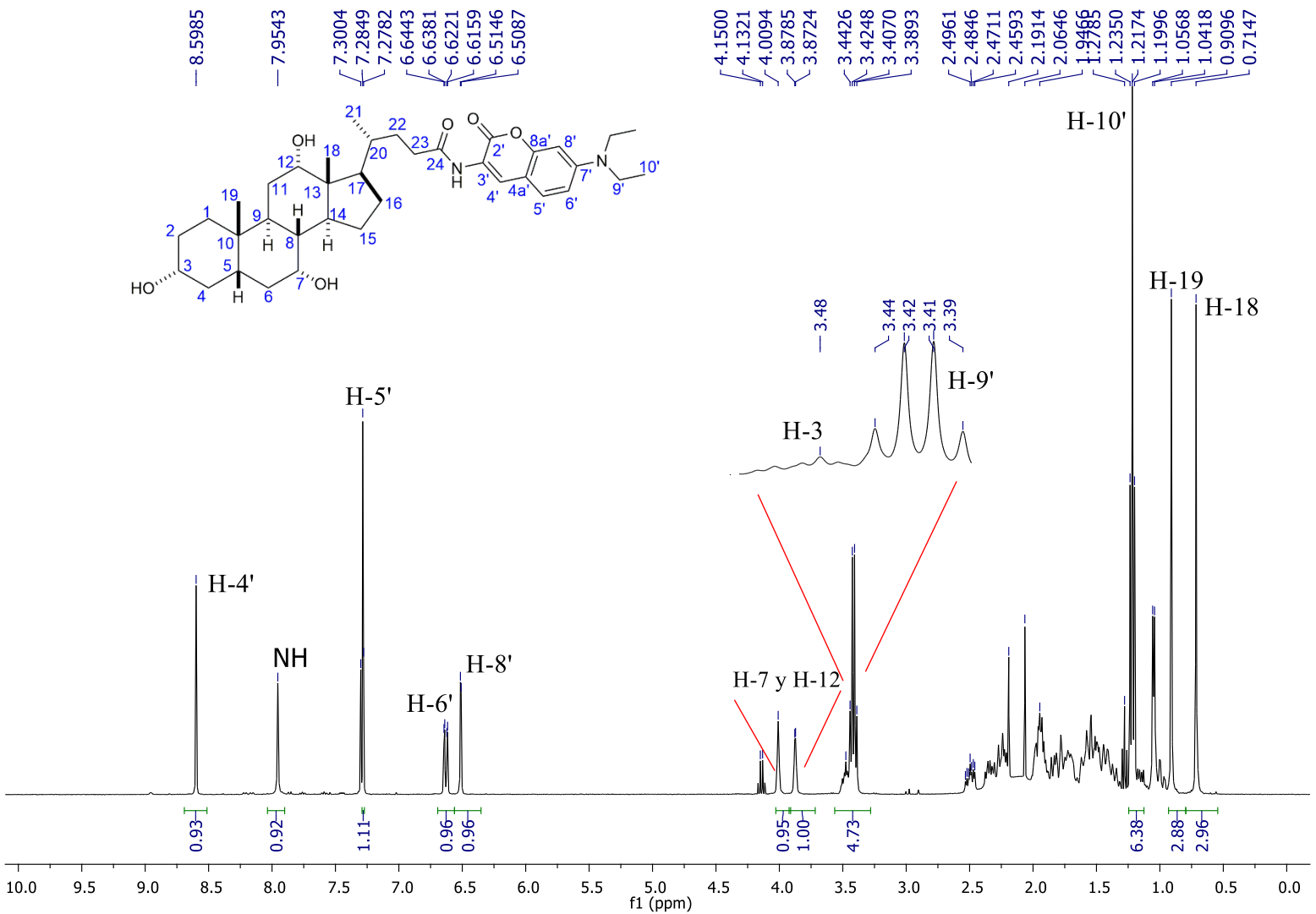




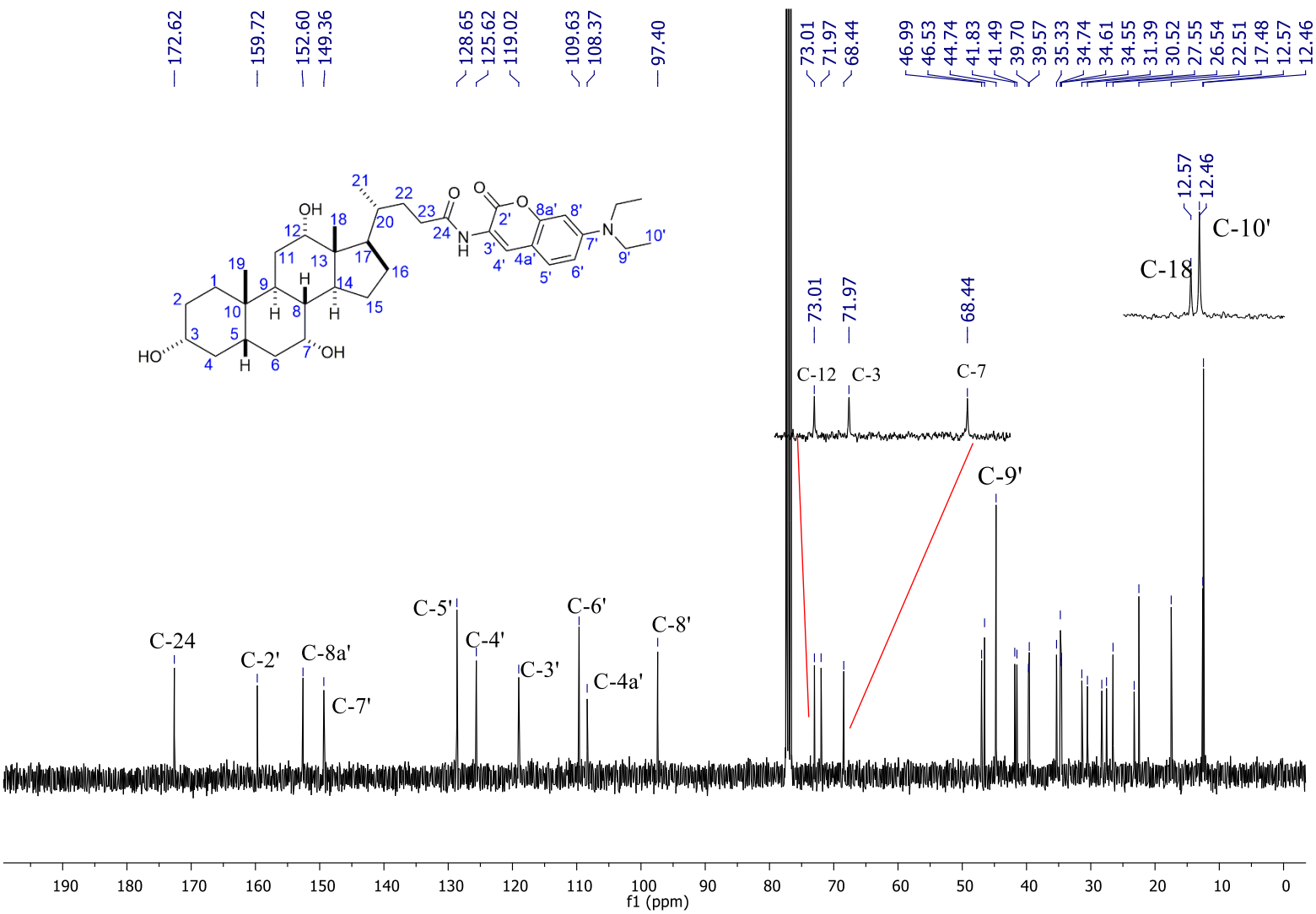


Espectro 27. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) del compuesto **6b** en CDCl₃.

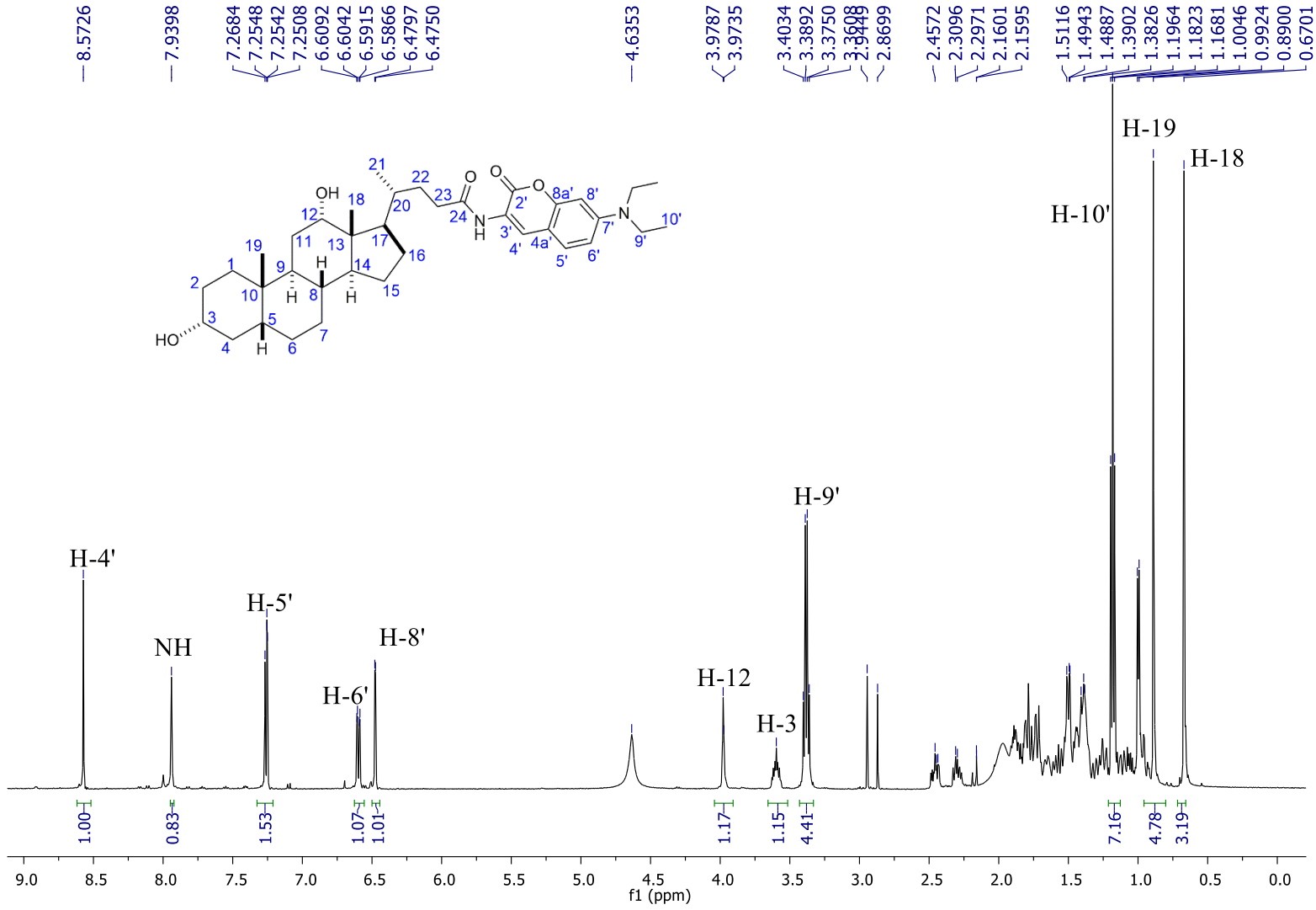


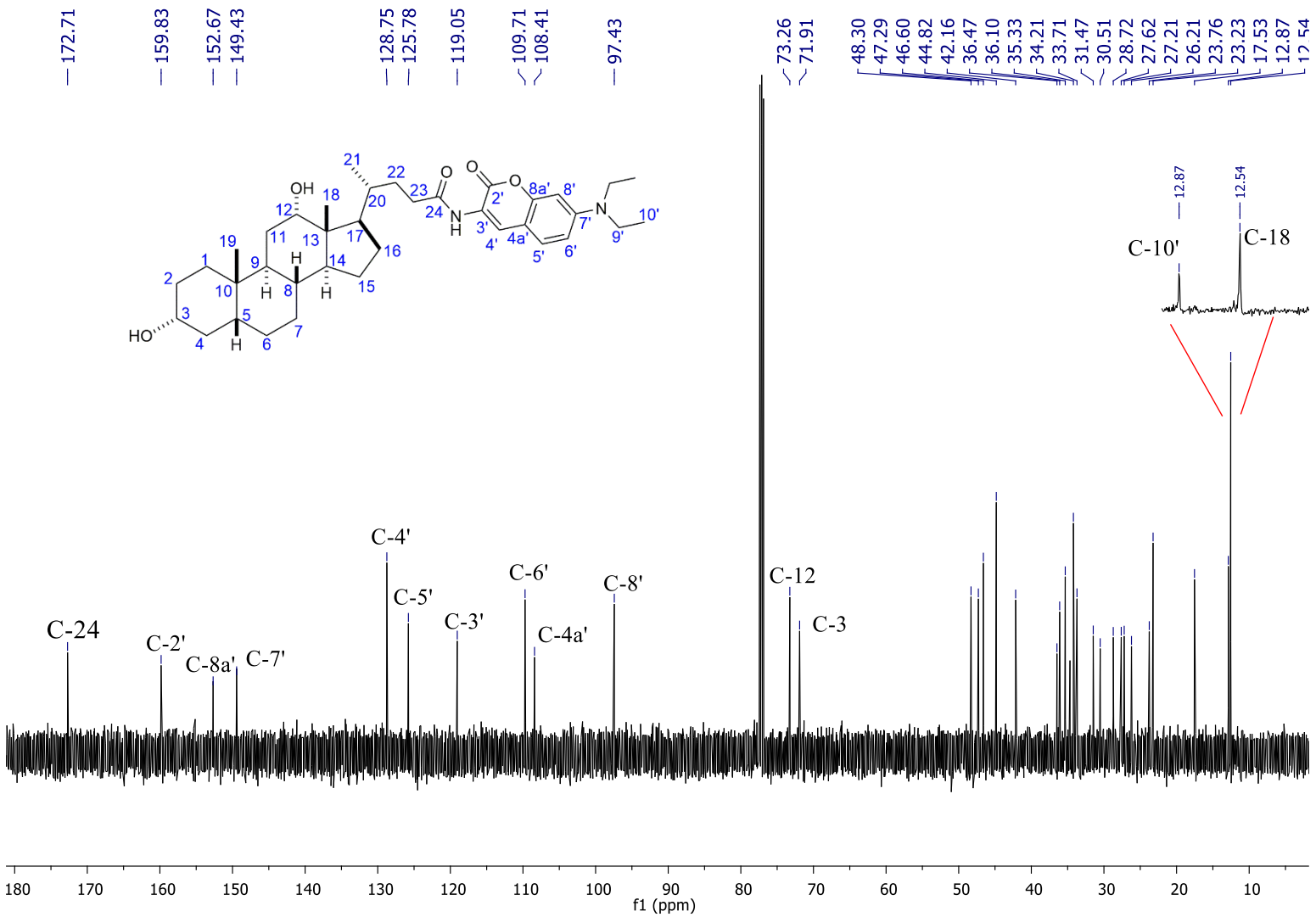


Espectro 29. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) del compuesto **7a** en CDCl_3 .



Espectro 30. Espectro de RMN ^{13}C (100.5 MHz) del compuesto **7a** en CDCl_3 .





Espectro 32. Espectro de RMN ^{13}C (100.5 MHz) del compuesto **7b** en CDCl_3 .

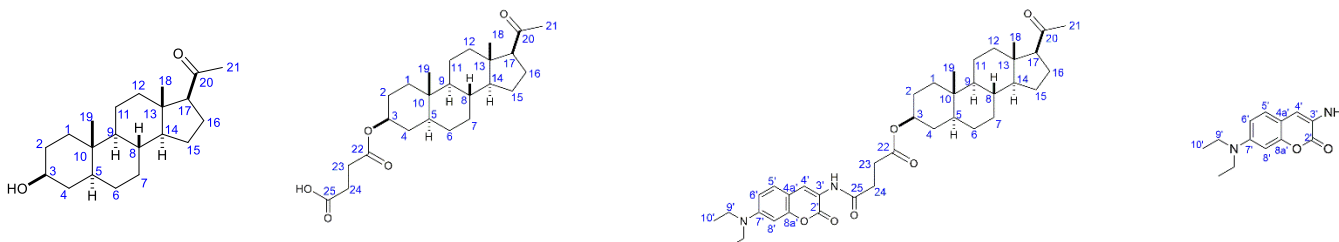


***ANEXO II: TABLAS DE
DESPLAZAMIENTOS EN RMN ¹³C***



ANEXO II. Tablas de desplazamientos en RMN ^{13}C

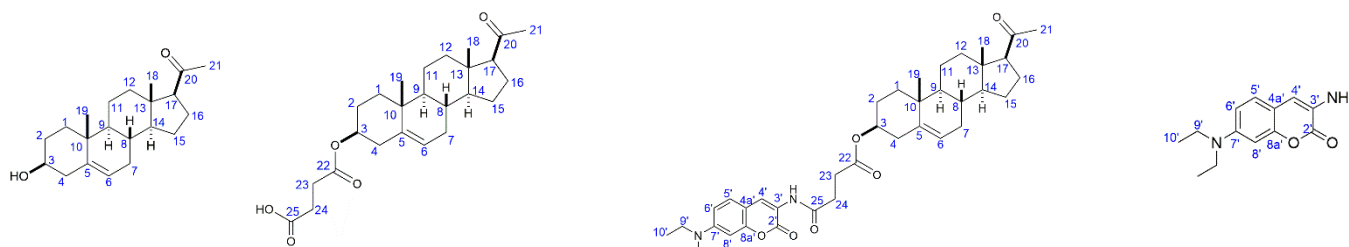
Tabla I. Desplazamientos en RMN ^{13}C en ppm para los compuestos **1a** y **1b** comparados con materia prima isopregnanolona y 3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona.



No. de C	Isopregnanolona ⁶⁴ CDCl ₃	Hemisuccinato de 5α-pregnan-20-ona-3β-ilo (1a)	4-(7-(N,N-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de 5α-pregnan-20-ona-3β-ilo (1b)	3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona ^{72a} CD ₂ -CN-d ₃
1	37.0	36.8	36.7 (19)HMBC	1'
2	32.7	32.0	32.1 HSQC	2'
3	71.0	74.3 (22)HMBC, HSQC	74.2	3'
4	38.1	39.1 (5)HMBC	39.0	4'
5	44.8	44.7 APT	44.5 APT	4a'
6	28.6	27.4 APT	27.4	5'
7	31.4	28.5 APT	29.7	6'
8	35.4	35.5 APT	35.4 APT	7'
9	54.2	54.1 (5, 19)HMBC	54.1 (19)HMBC	8'
10	35.4	35.6 APT	35.5 APT	8a'
11	21.2	21.3 (9)HMBC	21.2 (17)HMBC	9'
12	31.0	33.9	33.9 APT	10'
13	44.2	44.3 HSQC, (17) HMBC	44.2 (17)HMBC, APT	
14	56.6	56.7 (16, 18)HMBC	56.6 (21,18)HMBC	
15	24.3	24.5	24.4 APT	
16	22.8	22.9 (14, 17)HMBC	22.8 APT	
17	63.7	63.9 (13, 16, 20, 21)HMBC	63.8 HSQC, (16, 18)HMBC	
18	13.4	13.5 HSQC	13.4 HSQC, (17)HMBC	
19	12.3	12.3 HSQC	12.2 HSQC	
20	209.2	210.0 (17, 18)HMBC	209.7 (21, 17)HMBC	
21	31.4	31.6 APT, HSQC	31.5 HSQC	
22	-	171.8 ^a (3, 23, 24)HMBC	172.0 (3)HMBC	
23	-	29.3 ^b HSQC	28.4 ^b HSQC	
24	-	29.1 ^b HSQC	31.9 ^b HSQC	
25	-	177.9 ^a	170.4 (NH, 23, 24)HMBC	



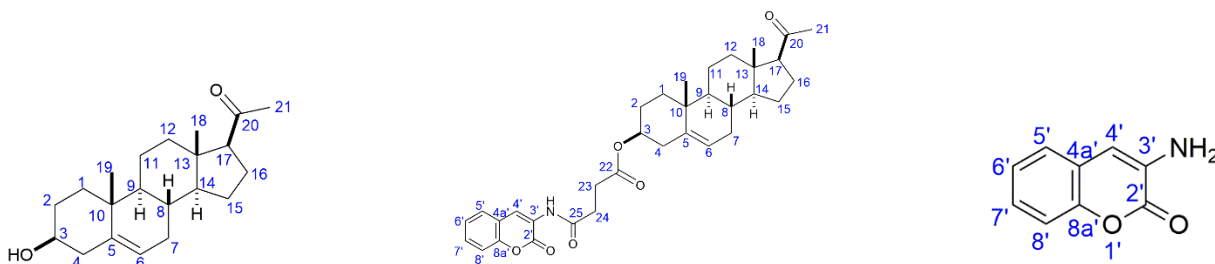
Tabla II. Desplazamientos en RMN ¹³C en ppm para los compuestos **2a** y **2b** comparados con materia prima pregnenolona y 3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona.



No. de C	Pregnenolona ⁷⁵ CDCl ₃	Hemisuccinato de 20-oxo-pregn-5-en-3β-ilo (2a)	4-(7-(N,N-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de 20-oxo-pregn-5-en-3β-ilo (2b)		3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona ^{72a}
1	37.30	37.0	37.1 APT, (6, 19)HMBC	1'	---
2	31.65	27.7 (3, 10)HMBC	27.8 APT	2'	159.7 (NH, 4', 5')HMBC
3	71.72	74.5 HSQC, (4)HMBC	74.5 HSQC	3'	118.9 (4')HMBC
4	42.21	38.0	38.9 APT	4'	128.7
5	140.86	139.6 (19)HMBC	139.7 HSQC, (19)HMBC	4a'	108.3
6	121.40	122.5	122.5	5'	126.8 (NH)HMBC
7	31.80	31.8	32.2 APT	6'	109.7
8	31.90	31.9 APT	31.9 APT	7'	149.5 (9')HMBC
9	50.05	49.9 (19)HMBC	49.9 (17)HMBC	8'	97.5
10	36.59	36.7 HSQC	36.7 APT	8a'	152.7 (5', 4')HMBC
11	21.12	21.1	21.1 APT	9'	44.8 (10')HMBC
12	38.89	38.9 (17)HMBC	38.1 APT	10'	12.5 (9')HMBC
13	44.02	44.1 (17)HMBC	44.1 APT (17, 18)HMBC		
14	56.95	56.9 (18)HMBC	56.9 APT (18)HMBC		
15	24.51	22.9 (17)HMBC	22.9 APT		
16	22.88	24.6	24.6		
17	63.75	63.8 (21)HMBC	63.8 APT, HSQC, (18)HMBC		
18	13.24	13.3 HSQC	13.3 (17)HMBC, HSQC		
19	19.40	19.4 HSQC	19.4 HSQC		
20	209.39	209.9 (17, 21)HMBC	209.8		
21	31.52	31.6 HSQC	31.7 HSQC		
22	-	171.7 (23, 24)HMBC	172.0 (23, 24)HMBC		
23	-	29.3 ^a HSQC	29.7 ^a HSQC		
24	-	29.1 ^a HSQC	31.8 ^a HSQC		
25	-	177.9 (23, 24)HMBC	170.4 (NH)HMBC		



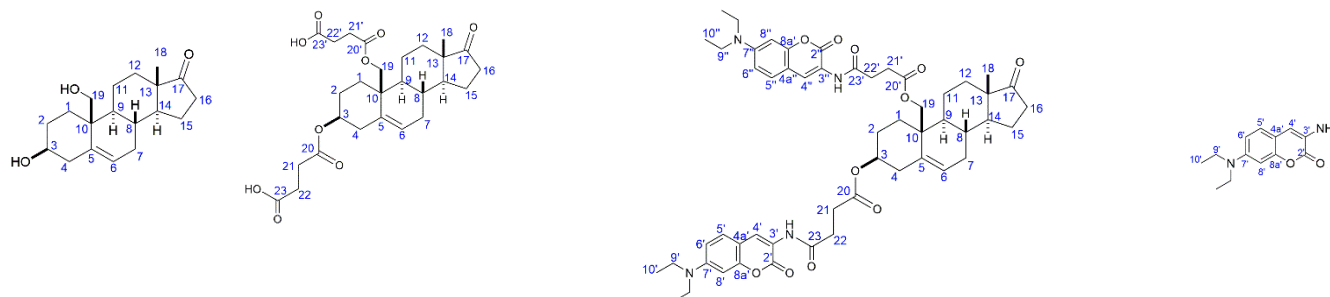
Tabla III. Desplazamientos en RMN ¹³C en ppm para el compuesto **2c** comparado con materia prima pregnenolona y 3-aminocumarina.



No. de C	Pregnenolona ⁷⁴ CDCl ₃	4-(-3-aminocumarina)oxobutanoato de 20-oxo-pregn-5-en-3β-ilo (2c)		3-aminocumarina
1	37.30	37.0	1'	---
2	31.65	31.7	2'	158.7 (4', NH)HMBC
3	71.72	74.5 HSQC	3'	124.0
4	42.21	38.0 (6)HMBC	4'	129.6 HSQC, (6')HMBC
5	140.86	139.5 (19)HMBC	4a'	119.8 (7')HMBC
6	121.40	122.4 HSQC, (4)HMBC	5'	123.4 HSQC, (4', NH, 6')HMBC
7	31.80	32.1	6'	127.8 HSQC, (4')HMBC
8	31.90	31.6 APT, (6)HMBC	7'	125.1 HSQC
9	50.05	49.9	8'	116.4 HSQC (7')HMBC
10	36.59	36.6 (19)HMBC	8a'	149.9 (5', 8')HMBC
11	21.12	21.1		
12	38.89	38.8		
13	44.02	44.0		
14	56.95	56.8 (18)HMBC		
15	24.51	22.8		
16	22.88	24.5		
17	63.75	63.7 (21, 18)HMBC		
18	13.24	13.2 HSQC, (14, 17)HMBC		
19	19.40	19.3 HSQC		
20	209.39	209.5 (21)HMBC		
21	31.52	31.8 HSQC		
22	-	171.8 ^a (22, 23)HMBC		
23	-	27.7 ^b HSQC		
24	-	29.4 ^b HSQC		
25	-	171.0 ^a (22, 23)HMBC		



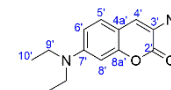
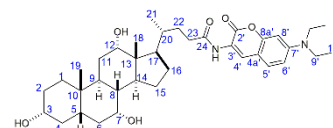
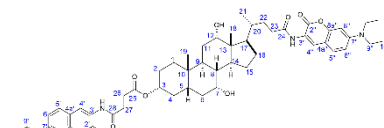
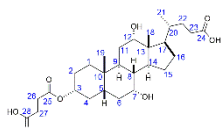
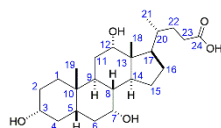
Tabla IV. Desplazamientos en RMN ¹³C en ppm para los compuestos **3a** y **3b** comparados con materia prima **3β**, 19-dihidroxiandrost-5-en-17-ona y 3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona.



No. de C	3β , 19-dihidroxiandrost-5-en-17-ona ⁷⁶ CDCl ₃	Di-hemisuccinato de 3β,19-dihidroxiandrost-5-en-17-ona (3a)	4,19-(Di-7-(N,N-dietilamino)-3-aminocumarina)oxobutanoato de 3β,19-dihidroxiandrost-5-en-17-ona (3b)		3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona ^{72a}	
1	33.9	32.9	32.1	1' y 1''	---	
2	31.9	27.7	27.8	2' y 2''	159.6 (NH, 4')HMBC	160.73
3	70.8	73.6	73.7 HSQC	3' y 3''	125.8 (NH, 5')HMBC	113.39
4	42.7	40.0	38.1 (6)HMBC	4' y 4''	126.2 (5', 6')HMBC, HSQC	129.33
5	137.5	134.7	134.8	4a' y 4a''	118.9 (6')HMBC	110.85
6	126.8	126.3	126.2 (8)HMBC	5' y 5''	128.7 (4', 7')HMBC, HSQC	126.82
7	32.1	32.3	33.3	6' y 6''	109.8 (8')HMBC, HSQC	110.18
8	32.8	31.5	32.5 APT, (6)HMBC	7' y 7''	149.5 (5', 9')HMBC	147.88
9	50.8	50.1	50.2	8' y 8''	97.5 (5', 6')HMBC, HSQC	98.37
10	41.7	37.9	40.0 (19)HMBC	8a' y 8a''	152.7 (4')HMBC	152.11
11	21.0	21.1	21.9	9' y 9''	44.9	45.07
12	30.4	30.3	30.3	10' y 10''	12.5	12.65
13	47.8	47.7	47.7 (13)HMBC			
14	52.5	52.1	52.3 (18)HMBC			
15	21.8	21.9	21.1			
16	35.8	35.8	35.8			
17	221.2	221.3	220.9 (18)HMBC			
18	13.9	13.7	13.8 HSQC			
19	62.6	64.5	64.6 HSQC			
20	-	171.9 ^a	172.3 ^a			
21	-	29.2 ^c	29.6 ^d HSQC			
22	-	29.4 ^c	31.9 ^c HSQC (21)HMBC			
23	-	178.2 ^b	171.9 ^b (NH)HMBC			
20'	-	171.5 ^a	172.0 ^a			
21'	-	29.0 ^c	29.3 ^d HSQC			
22'	-	29.2 ^c	31.6 ^c HSQC			
23'	-	178.1 ^b	171.7 ^b (NH)HMBC			



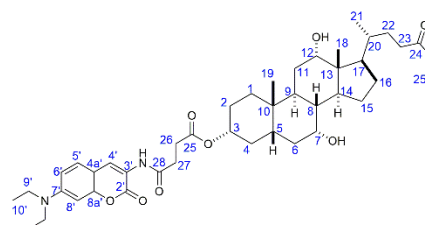
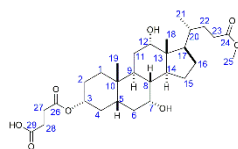
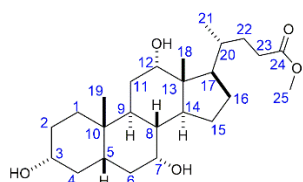
Tabla V. Desplazamientos en RMN ¹³C en ppm para los compuestos **5a**, **6a** y **7a** comparados con materia prima ácido cólico y 3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona.



N o. de C	Ácido cólico ⁷⁷		Hemisuccinato de ácido 3a,7a,12a-trihidroxi- 5β-colanólico (5a)	4-(7-(N,N-dietilamino)-3- aminocumarina)oxobutanoato de ácido 3a,7a,12a-trihidroxi-5β- colanólico (6a)		3a,7a,12a-trihidroxi-5β-colan- 24-oato de 4-(7-(N,N- dietilamino)-3-aminocumarina (7a)		3-amino-7- dietilamino- cromeno-2-ona ^{72a}		
	D ₂ O	CD ₃ OD								
1	37.69	35.16	35.1	35.5	1'	---	35.2 ^a	1'	---	---
2	32.05	29.84	29.1	28.4	2' y 2''	159.8 y 159.7 (NH) HMBC	31.4 HMBC	2'	159.7 (NH, 4') HMBC	160.73
3	74.41	71.5 HETCOR	75.1 HSQC	75.5 HSQC	3' y 3''	119.1 y 118.9 (4') HMBC	72.0 HSQC	3'	119.0 (NH) HMBC	113.39
4	41.18	34.5	34.7	34.9	4' y 4''	126.1 y 125.7 HSQC, (5') HMBC	39.7	4'	125.6 (NH, 5') HMBC	129.33
5	43.93	41.9 (7,9,12) HMBC	41.6	41.2 (7,19) HMBC	4a' y 4a''	108.4 y 108.3	41.5 (19)HMBC	4a'	108.3 (8a') HMBC	110.85
6	36.67	28.2	34.3	34.7	5' y 5''	128.8 y 128.7 HSQC, (4') HMBC	34.7 ^a	5'	128.6 (4') HMBC	126.82
7	71.12	67.7 (5,19)) HMBC	67.6 HSQC	68.2 HSQC (5) HMBC	6' y 6''	109.7 y 109.6 HSQC, (5', 6', 8a')HMBC	68.4 HSQC	6'	109.6 (5') HMBC	110.18
8	42.09	35.4 (19) APT	39.7	39.6 APT	7' y 7''	149.5 y 149.4 (8') HMBC	39.6	7'	149.4 (5') HMBC	147.88
9	29.17	26.5 (19,7,12) HMBC	26.5	26.6	8' y 8''	97.4 y 97.3 HSQC, (6', 7') HMBC	26.5 (19)HMBC	8'	97.4 (5', 6') HMBC	98.37
10	37.19	28.2	34.7	34.8	8a' y 8a''	152.7 y 152.6 (4', 5' 8') HMBC	34.5 ^a	8a'	152.6 (4', 5') HMBC	152.11
11	30.52	31.0	27.4	27.7	9' y 9''	44.8 (10')	28.3	9'	44.7 (10') HMBC	45.07
12	75.98	72.7 (18) HMBC	72.7 HSQC	73.0 HSQC	10' y 10''	12.6 y 12.5 (9') HMBC	73.0 HSQC (18) HMBC	10'	12.5 (9') HMBC	12.65
13	48.93	47.2 (21,18) HMBC	46.2	46.7 (18) HMBC			46.5 (18) HMBC			
14	44.33	47.3 (18) HMBC	41.7	42.0 (12, 18) HMBC			41.8 (18)HMBC			
15	25.76	22.9 APT	22.9	23.3			23.3			
16	30.06	27.3 (20) HMBC	26.6	26.8			27.6			
17	49.39	41.7 (20) HMBC	46.7	47.2 (21) HMBC			47.0 (21) HMBC			
18	14.94	11.7 APT	11.7 HSQC	12.7 HSQC (21) HMBC			12.6 HSQC			
19	24.92	21.8 APT	21.7 HSQC	22.5 HSQC			22.5 HSQC			
20	38.32	39.7 (22,23) APT	35.4	35.1			35.3 ^a			
21	19.57	16.3 APT	16.3 HSQC	17.5 HSQC			17.5 HSQC			
22	35.11	39.1 HETCOR	31.0	31.5			30.5 (21)HMBC			
23	37.30	30.7 HETCOR	30.7	34.4			34.6 ^a			
24	187.24	176.9 (20,22) HMBC	176.9	172.7 (NH) HMBC			172.6 (21) HMBC			
25	-		172.6 ^a	171.6 ^a						
26	-		28.4	30.3						
27	-		28.2	32.6						
28	-		174.7 ^a	170.8 ^a (NH) HMBC						



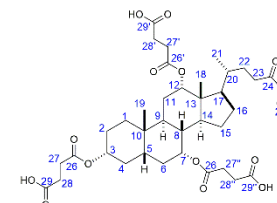
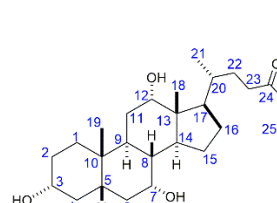
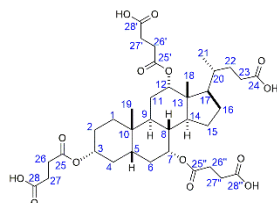
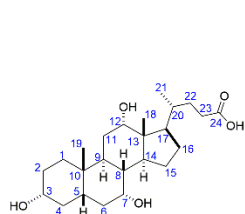
Tabla VI. Desplazamientos en RMN ¹³C en ppm para los compuestos **4a**, **5b** y **6b** comparados con materia prima **3a**, **7a**, **12a**-trihidroxi-**5β**-colan-**24**-oato de metilo y **3**-amino-**7**-dietilamino-cromeno-**2**-ona.



No. de C	<i>3a</i> , <i>7a</i> , <i>12a</i> -trihidroxi- <i>5β</i> -colan- <i>24</i> -oato ⁷⁰ CDCl ₃	<i>3a</i> , <i>7a</i> , <i>12a</i> -trihidroxi- <i>5β</i> -colan- <i>24</i> -oato de metilo (<i>4a</i>)	Hemisuccinato de <i>3a</i> , <i>7a</i> , <i>12a</i> -trihidroxi- <i>5β</i> -colan- <i>24</i> -oato de metilo (<i>5b</i>)	<i>4</i> -(<i>7</i> -(<i>N,N</i> -dietilamino)- <i>3</i> -aminocumarina)oxobutanoato de <i>3a</i> , <i>7a</i> , <i>12a</i> -trihidroxi- <i>5β</i> -colan- <i>24</i> -oato de metilo (<i>6b</i>)		<i>3</i> -amino- <i>7</i> -dietilaminocromeno- <i>2</i> -ona ^{72a}	
1	34.6	34.5	34.3	35.0 ^b	1'	---	---
2	28.0	29.8	29.2	28.4 ^c	2'	159.8	160.73
3	71.7	71.5	75.1	74.9	3'	118.8	113.39
4	39.3	39.1 APT	34.7	34.7 ^b	4'	125.8	129.33
5	39.3	41.7 (19)HMBC	41.7 (7)HMBC	42.0 APT	4a'	108.3	110.85
6	35.2	35.4	34.6	34.3 ^b	5'	128.7	126.82
7	68.3	67.7	67.6	68.1	6'	109.7	110.18
8	41.4	39.7 APT	39.6 APT	39.6 APT	7'	149.4	147.88
9	30.8	26.5 (19)HMBC	26.5 APT	26.7	8'	97.2	98.37
10	35.2	35.2 (19)HMBC	35.1	34.8 ^b	8a'	152.7	152.11
11	27.4	28.2	27.3	28.4 ^c	9'	44.8	45.07
12	72.9	72.7	72.6	72.9	10'	12.5	12.65
13	41.4	41.9 (12)(18)	41.6 (12)HMBC	46.7 APT			
14	46.2	46.1 (18)HMBC	46.2	41.2 APT			
15	23.1	22.9	22.9	23.3 APT			
16	26.1	27.3	26.2 APT	27.6 APT			
17	46.8	46.6 (21)HMBC	46.6	47.2 APT			
18	12.3	11.6	11.6	12.6			
19	22.3	21.8	21.7	22.5			
20	34.6	34.6	35.4 APT	35.3 APT			
21	17.2	16.2	16.2	17.3			
22	31.0	30.9 (21)HMBC	30.9	31.2 HETCOR			
23	30.2	30.5	30.5	30.9 HETCOR			
24	174.7	175.2	175.2	174.7			
25	51.3	50.7	50.7	51.5			
26	-		172.6 ^a	171.4			
27	-		28.2 HETCOR	30.4 HETCOR			
28	-		28.5 HETCOR	32.7 HETCOR			
29	-		174.7 ^a	170.8			



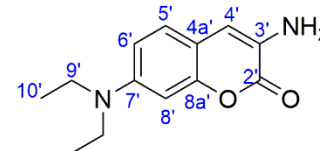
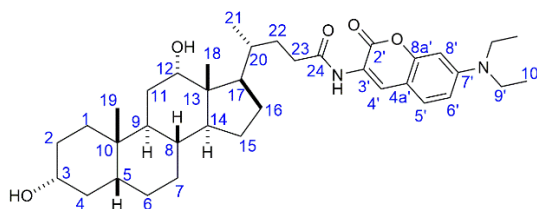
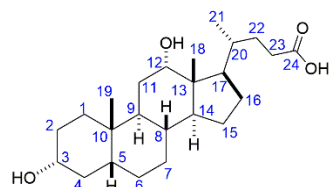
Tabla VII. Desplazamientos en RMN ¹³C en ppm para el compuesto **8a** comparado con materia prima ácido cólico y **8b** comparado con materia prima 3 α , 7 α , 12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato.



No. de C	Ácido cólico ⁷⁶		Tris-hemisuccinato de ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanóico (8a)	No. de C	3 α , 7 α , 12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-oato ⁷⁰ CDCl ₃	Tris-hemisuccinato de 3 α ,7 α ,12 α -(trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (8b)
	D ₂ O	CD ₃ OD				
1	37.69	35.16	34.6 (19)HMBC	1	34.6	34.6
2	32.05	29.84	27.0 APT	2	28.0	28.7
3	74.41	71.5 HETCOR	75.8 HSQC	3	71.7	74.8 HSQC
4	41.18	34.5	37.8 APT	4	39.3	38.0
5	43.93	41.9 (7,9,12) HMBC	40.9 APT	5	39.3	40.8
6	36.67	28.2	34.4 APT	6	35.2	30.9
7	71.12	67.7 (5,19) HMBC	71.3 HSQC (19)HMBC	7	68.3	71.4 HSQC
8	42.09	35.4 (19) APT	37.8 APT	8	41.4	34.7
9	29.17	26.5 (19,7,12) HMBC	30.9	9	30.8	30.0*
10	37.19	28.2	34.1 (19)HMBC	10	35.2	31.0
11	30.52	31.0	26.3 APT	11	27.4	27.2
12	75.98	72.7 (18) HMBC	75.8 HSQC, (18)HMBC	12	72.9	76.4 HSQC
13	48.93	47.2 (21,18) HMBC	30.7	13	41.4	43.3
14	44.33	47.3 (18) HMBC	45.0 APT, (18)HMBC	14	46.2	45.4
15	25.76	22.9 APT	22.5 APT	15	23.1	22.9
16	30.06	27.3 (20) HMBC	25.0 APT	16	26.1	26.4
17	49.39	41.7 (20) HMBC	43.2 APT, (12, 18)HMBC	17	46.8	47.5
18	14.94	11.7 APT	11.2 HSQC	18	12.3	12.2 HSQC
19	24.92	21.8 APT	21.5 HSQC, (21)HMBC	19	22.3	22.6 HSQC
20	38.32	39.7 (22,23) APT	34.9 (19)HMBC	20	34.6	31.4
21	19.57	16.3 APT	16.6 HSQC	21	17.2	17.6 HSQC
22	35.11	39.1 HETCOR	30.6	22	31.0	30.4
23	37.30	30.7 HETCOR	29.1	23	30.2	30.0*
24	187.24	176.9 (20,22) HMBC	177.0	24	178.5	178.5
25	-		172.6 ^b (12)HMBC	25	51.3	51.7 HSQC
26	-		28.7 ^c	26	-	171.8 ^b
27	-		29.5 ^c	27	-	29.3
28	-		174.6 ^a (26,27)HMBC	28	-	29.3
25'	-		172.3 ^b (12)HMBC	29	-	174.9 ^a
26'	-		28.5 ^c	26'	-	171.1 ^b
27'	-		29.4 ^c	27'	-	29.3
28'	-		174.5 ^a (26,27)HMBC	28'	-	29.3
25''	-		172.2 ^b (12)HMBC	29'	-	174.9 ^a
26''	-		28.5 ^c	26''	-	171.1 ^b
27''	-		29.4 ^c	27''	-	29.3
28''	-		174.4 ^b (26, 27)HMBC	28''	-	29.3
	-			29''	-	174.9 ^a



Tabla VIII. Desplazamientos en RMN ¹³C en ppm para el compuesto **7b** comparado con materia prima ácido desoxicólico y 3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona.



No. de C	Ácido desoxicólico ⁷⁶ D:0	3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oato de 4-(N,N-dietilamino)-3-aminocumarina (7b)	3-amino-7-dietilamino-cromeno-2-ona ^{72a}
1	37.96	35.3	1'
2	32.01	31.5	2'
3	74.25	71.9 HSQC	3'
4	38.09	36.5	4'
5	44.90	42.2 (19)HMBC	4a'
6	29.93	27.6	5'
7	28.90	27.2	6'
8	38.81	36.1 APT	7'
9	36.23	33.7 ^a HSQC, APT, (20)HMBC	8'
10	36.74	34.7 (20)HMBC	8a'
11	31.09	28.7	9'
12	76.04	73.3 HSQC, (18)HMBC	10'
13	49.01	46.6 APT	
14	50.63	48.3 (18)HMBC	
15	26.54	23.8	
16	30.36	26.2	
17	49.37	47.3 APT, (21)HMBC	
18	15.39	12.9 HSQC	
19	25.76	23.2 HSQC, (20)HMBC	
20	38.61	33.7 ^a (21)HMBC	
21	19.54	17.5 HSQC	
22	35.28	30.5	
23	37.2	34.2	
24	187.04	172.7 (20, NH)HMBC	