



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
SÍNTESIS DE ESTEROIDES CON CARACTERÍSTICAS
ESTRUCTURALES LUMINISCENTES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO JUAN LUIS CORTES MUÑOZ

DIRECTORAS:

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS YLIANA LÓPEZ CASTRO

**DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS ROSA LUISA SANTILLAN
BACA**

Morelia, Michoacán

Abril, 2018

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D.C. Yliana López Castro y la D.C. Rosa Luisa Santillan Baca, con el apoyo de los proyectos CONACYT (286638), CIC-UMSNH y con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro: 598845.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos:

- **Juan L. Cortes-Muñoz**, J. Pablo García Merinos, Yliana López, Mario A. Gómez-Hurtado, J. Betzabe Gonzalez-Campos, Mario A. Rodríguez, Rosa L. Santillán-Baca, **“COMPUESTOS ESTEROIDALES CON PROPIEDADES FLUORESCENTES”**, 3a Semana del Posgrado en Ciencias Químicas celebrada en la UMSNH el 27 de junio de 2016, Morelia Michoacán México.
- **Juan L. Cortes-Muñoz**, J. Pablo García-Merinos, Mario A. Gómez-Hurtado, J. Betzabe Gonzalez-Campos, Judit A. Aviña Verduzco, Rosa Santillan, Mario A. Rodríguez, Yliana López, **“ESTRUCTURAS ESTEROIDALES FLUORESCENTES VÍA ACOPLAMIENTO DE SONOGASHIRA”**, 13ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, celebrado del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.
- **Juan L. Cortes-Muñoz**, J. Pablo García-Merinos, Rosa E. del Río, J. Betzabe Gonzalez-Campos, Rosa Santillan, María Eugenia Ochoa, Yliana López, **“NUEVOS DERIVADOS DE ETINILESTRADIOL CON POTENCIALES PROPIEDADES FLUORESCENTES”**, 1er Foro del Posgrado en Ciencias Químicas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, celebrado del 31 de julio al 4 de agosto de 2017 en Morelia, Michoacán, México.
- **Juan L. Cortes-Muñoz**, J. Pablo García-Merinos, María Eugenia Ochoa, J. Betzabe González-Campos, Judit A. Aviña Verduzco, Rosa Santillan, Yliana López, **“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE ETINILESTRADIOL, CONTENIENDO GRUPOS CROMÓFOROS”**, 12º Congreso Estatal de Ciencia Tecnología e Innovación y sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 5 y 6 de octubre de 2017 en Morelia, Michoacán, México.

CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE ESQUEMAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	iv
ÍNDICE DE COMPUESTOS.....	v
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Luminiscencia.....	3
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Hormonas esteroidales.....	10
2.1.1 Estrógenos.....	10
2.1.2 Modificaciones químicas de los estrógenos.....	14
2.1.3 El estradiol en imágenes de diagnóstico.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo General.....	34
4.2 Objetivos Específicos	34
5. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	35
5.1 Obtención y caracterización espectroscópica de los compuestos 59-64	35
5.1.1 Caracterización del 17 α -(10'-bromoantracenetil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (59).....	36
5.1.2 Caracterización del 17 α -(7'-bromo- 9', 9'-espirobifluorenetil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (60).....	38
5.1.3 Caracterización del 17 α -(7'-dibromo-9'-fluorenona etil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (61).....	45
5.1.4 Caracterización del 17 α -[(5',6',6'-tris (10'-bromofenil)vinil)feniletinil] estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (62).....	52
5.1.5 Caracterización del 17 α -(9',9'-dioctil,7'-dibromofluorenilfenil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (63).....	59
5.1.6 Reactividad de los sustratos 38 y 73 frente a las condiciones de acoplamiento de Sonogashira	66
5.1.7 Reactividad de los sustratos 38 y 76 en el acoplamiento de Sonogashira	68

5.1.8 Obtención y caracterización del compuesto 64	68
5.2 Mediciones de UV-Vis y fluorescencia de los compuestos 59-63	72
5.2.1 Viscosidad contra sensibilidad en la emisión de fluorescencia.....	73
6. CONCLUSIONES.....	76
7. PARTE EXPERIMENTAL	78
7.1 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPO.....	78
7.2 Procedimiento general para la obtención de los derivados acoplados con el etinilestradiol.....	79
7.2.1 Obtención del 17α -(10'-bromoantraceniletinil) estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (59).....	79
7.2.2 Obtención del 17α -(7'-bromo-9',9''-espirobifluoreniletinil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (60).....	80
7.2.3 Obtención del 17α -(7'-bromo-fluore-9'-ona etinil) estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (61).....	81
7.2.4 Obtención del 17α -[(5',6',6'-tris (10'-bromofenil)vinil)feniletinil] estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (62)	82
7.2.5 Obtención del 17α -(9',9'-dioctil-7'-bromo-fluoreniletinil) estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (63).....	83
7.2.6 Obtención del 1,1,2,2-tetraquis (4-bromofenil)etileno (72).....	84
7.2.7 Obtención del compuesto (75)	84
7.2.8 Obtención del compuesto (64)	85
8. BIBLIOGRAFÍA.....	86
9. APÉNDICE.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de los espines en los orbitales.....	4
Figura 2. Diagrama simplificado de Perrin- Jablonski.....	5
Figura 3. Posibles vías de desactivación de moléculas excitadas.....	6
Figura 4. Información provista por exploradores, indicadores, marcadores y trazadores fluorescentes.....	7
Figura 5. Las moléculas luminoáficas planares, tales como el perileno y no planas como el hexafenilsililo (HPS).....	8
Figura 6. Hormonas esteroideas.....	11
Figura 7. 17 β -Estradiol dentro del sitio activo del ER.....	13
Figura 8. Conjugados de elipticina-estradiol preparados por Devraj y Col.....	15
Figura 9. Híbrido formado entre estradiol (E2) y GDM, sintetizado por Kuduk y Col.....	16
Figura 10. Conjugado daunorrubicina estradiol.....	17
Figura 11. Conjugado de Eneidiina-estradiol y ciclación de Bergman para producir radicales diilo.....	18
Figura 12. Complejos de platino-estradiol sintetizados por varios grupos de investigación.....	19
Figura 13. Conjugado estradiol-Taxol preparado por Changhui Liu y Col. en 2004.....	20
Figura 14. Conjugado estradiol-pirofeo forbido sintetizado por Sandler y Col.....	21
Figura 15. Conjugados de lípidos catiónicos recientemente desarrollados.....	22
Figura 16. Complejos de estradiol conteniendo Renio preparados por Wust.....	24
Figura 17. Complejos de estradiol-Renio.....	25
Figura 18. Síntesis de Complejos derivados de estradiol con diferentes metales.....	26
Figura 19. Conjugado estrógeno-piridina conteniendo Gd (III) y Eu (III).....	27
Figura 20. Estructuras de complejos de rutenio-estradiol.....	27

Figura 21. Derivados del etinilestradiol con carboxifluoresceína, el BODIPY y el Alexa Fluor 546.....	28
Figura 22. Conjugado PBI-estradiol.....	29
Figura 23. Derivado de estradiol radio-marcado.....	29
Figura 24. Compuestos de halofeniletinilo preparados por Neto y Col.....	30
Figura 25. Focalización de células por examinación de E2-Cy3.....	31
Figura 26. Conjugados EE2-BODIPYs preparados.....	32
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del etinilestradiol 38 (trazo superior) y el compuesto 59 (trazo inferior) en CDCl_3	37
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de 60 en CDCl_3	40
Figura 29. Experimento COSY de 60 en CDCl_3	41
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de 60 en CDCl_3	42
Figura 31. Experimento HETCOR de 60 en CDCl_3	43
Figura 32. Espectro HMBC de 60 en CDCl_3	44
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de 61 en CDCl_3	47
Figura 34. Experimento COSY de 61 en CDCl_3	48
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de 61 en CDCl_3	49
Figura 36. Experimento HETCOR de 61 en CDCl_3	50
Figura 37. Espectro HMBC de 61 en CDCl_3	51
Figura 38. Comparación de los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) de 71 y 72	53
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de 62 en CDCl_3	55
Figura 40. Experimento COSY de 62 en CDCl_3	56
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de 62 en CDCl_3	57
Figura 42. Experimento HETCOR de 62 en CDCl_3	58
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de 63 en CDCl_3	61
Figura 44. Experimento COSY de 63 en CDCl_3	62
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de 63 en CDCl_3	63

Figura 46. Experimento HETCOR de 63 en CDCl_3	64
Figura 47. Espectro HMBC de 63 en CDCl_3	65
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C en acetona- d_6 de 75	67
Figura 49. Derivado esteroideal del Bodipy 64	69
Figura 50. Espectros de RMN de ^1H del dipirrometano 80 y Bodipy 81 en CDCl_3	71
Figura 51. Comparación de los espectros de RMN de ^1H en CDCl_3 del compuesto 59 con los derivados 81 y 64	71
Figura 52. Compuestos en solución de CH_2Cl_2 y en sólido bajo la lámpara de UV a una longitud de onda de excitación de 365 nm.....	72
Figura 53. Espectro de IR del compuesto 61	92
Figura 54. Espectro de IR de 63	92
Figura 55. Espectro de IR de 60	93
Figura 56. Espectro de IR de 62	93

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formación de E2-PEG/BSA-AuNC como prueba fluorescente.....	31
Esquema 2. Reacción general del acoplamiento de Sonogashira.....	36
Esquema 3. Obtención del compuesto 72	52
Esquema 4. Reactividad de los sustratos 38 y 73 mediante las condiciones de acoplamiento de Sonogashira.....	66
Esquema 5. Acoplamiento de Sonogashira de los compuestos 38 y 76	68
Esquema 6. Análisis retrosintético para la síntesis de 64	70

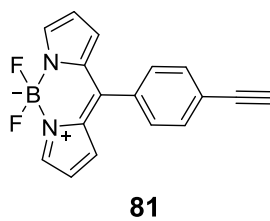
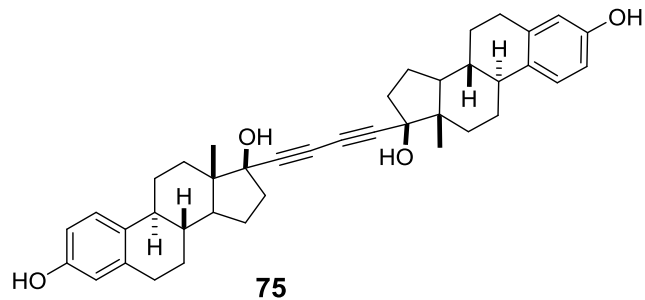
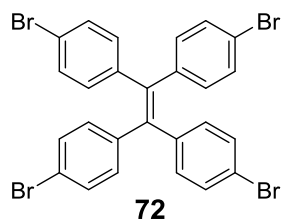
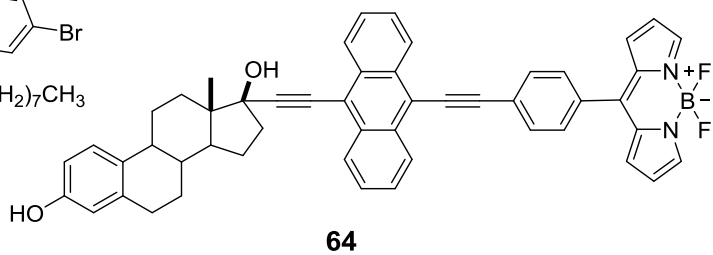
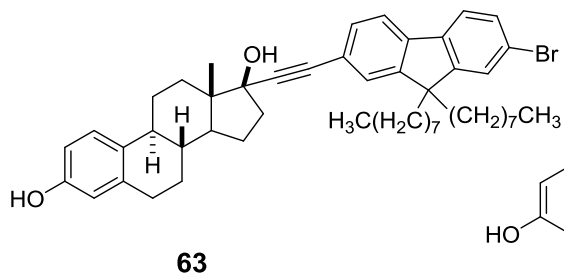
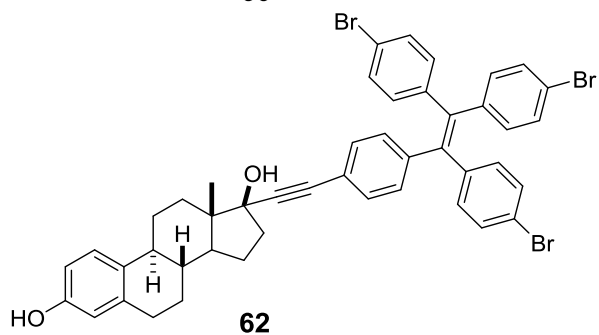
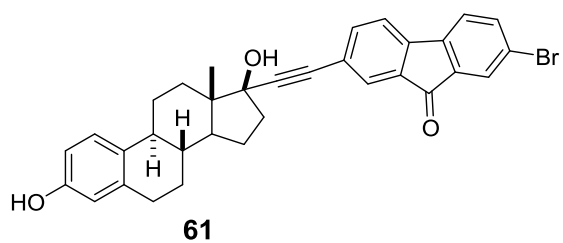
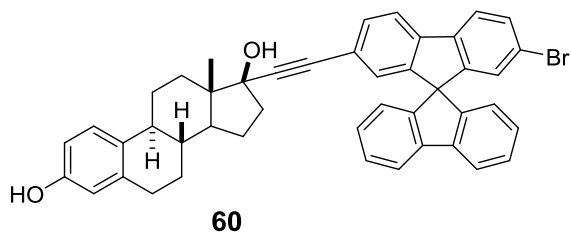
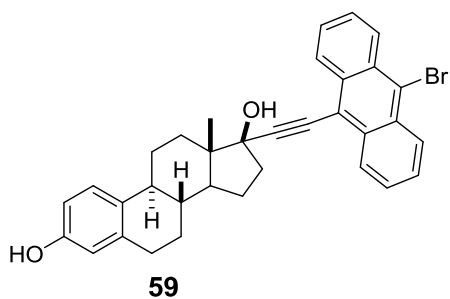
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de luminiscencia.....	3
Tabla 2. Determinación de la fluorescencia de las hormonas esteroideas por Fedorov y colaboradores.....	23
Tabla 3. Datos de Absorción UV-Vis y emisión de los compuestos 59-63	72

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Espectros de UV-vis del Compuesto 61 en mezcla MeOH:Glicerol.....	75
Gráfica 2. Espectro de fluorescencia de 61 en mezcla MeOH:Glicerol.....	75
Gráfica 3. Gráfica de % de glicerol contra desplazamiento de Stokes del compuesto 61 en Mezcla de MeOH:Glicerol.....	75
Gráfica 4. Gráfica de Intensidad de Fluorescencia contra fracción molar de glicerol de 61 en mezcla de MeOH:Glicerol.....	75
Gráfica 5. Mediciones de UV-Vis de 59	94
Gráfica 6. Mediciones de UV-Vis de 61	94
Gráfica 7. Mediciones de UV-Vis de 62	94
Gráfica 8. Mediciones de UV-Vis de 60	94
Gráfica 9. Mediciones de UV-Vis de 63	95
Gráfica 10. Mediciones de Fluorescencia de 61 una λ_{exc} , 428 nm.....	95
Gráfica 11. Mediciones de Fluorescencia de 59 a una λ_{exc} , 330 nm.....	95

ÍNDICE DE COMPUESTOS



ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

ACQ	Extinción causada por agregación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIE	Emisión inducida por agregación
ATP	Adenosintrifosfato
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3 α , 4 α - diaza-s-indacenos
COSY	Correlación espectroscópica
Col.	Colaboradores
DEPT	Mejoramiento sin distorsiones por medio de transferencia de polarización
E2	Estradiol
EE2	17 α -etinilestradiol
EM	Espectrometría de masas
eq	Equivalente
ER	Receptor de estrógenos
ETC	Conjugado estradiol-taxol
EtOH	Etanol
g	Gramos
GDM	Geldamicina
GPR30	Receptor acoplado a la proteína G
h	Horas
HETCOR	Correlación heteronuclear
HMBC	Correlación heteronuclear vía múltiples enlaces
HPS	Hexafenilsiloil
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC.	Correlación heteronuclear a un enlace de distancia
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento

LED	Dispositivos emisores de luz
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MRI	Resonancia magnética de imagen
m	Señal múltiple
M	Molar
<i>m/z</i>	Relación masa carga
min	Minutos
mL	Mililitros
nM	Nanomolar
OMS	Organización mundial de la salud
PDT	Terapia fotodinámica del cáncer
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PBI	Perilene-bis-imida
PET	Tomografía de emisión de positrones
TC	Tomografía computarizada
RM	Resonancia magnética
TEP	Tomografía por emisión de positrones
RIR	Restricción de la rotación intramolecular
RBA	Valor relativo de afinidad de unión
ROS	Especies reactivas de oxígeno
OLED	Diodos orgánicos emisores de Luz
<i>R_f</i>	Factor de retardo
s	Señal simple
t	Señal triple
ta	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
Uv-vis	Espectroscopía ultravioleta-visible
vs	Versus
<i>v</i>	Frecuencia

RESUMEN

La reacción de Sonogashira proporciona un método valioso para la síntesis de sistemas acetilénicos conjugados, estos compuestos son de gran importancia por su aplicación en la obtención de productos naturales y productos farmacéuticos, entre otras moléculas de interés en áreas como la biotecnología y los materiales.

Actualmente la síntesis de derivados de etinilestradiol ha tomado gran interés con el fin de conseguir una mayor afinidad por los receptores estrogénicos. En este sentido, diversas metodologías para la modificación estructural de este compuesto han sido documentadas en los últimos años.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se describe la síntesis de nuevos derivados de etinilestradiol **59-64**, obtenidos mediante acoplamiento cruzado de Sonogashira, en rendimientos de moderados a buenos (25-74%). Adicionalmente, durante el desarrollo de esta metodología se obtuvo el derivado dimérico del etinilestradiol (**75**) en un rendimiento del 54%. La asignación estructural de los compuestos se realizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Se realizaron las mediciones de Uv-vis y de fluorescencia de los compuestos **59-63**, encontrando que los compuestos **59** y **61** presentan máximos de absorción a longitud de onda mayores con respecto a los demás compuestos, así como, fluorescencia en solución. También se realizó un análisis de la fluorescencia vs viscosidad del compuesto **61**.

Palabras Clave: Etinilestradiol, Sonogashira, Fluorescencia, esteroides, RMN.

ABSTRACT

The Sonogashira reaction provides a valuable method for the synthesis of conjugated acetylenic systems, which have a wide range of applications in the preparation of natural products and pharmaceuticals, among other structures of interest in areas such as biotechnology and materials.

The synthesis of ethinylestradiol derivatives has acquired a great interest in trying to achieve a high-affinity toward estrogen receptors, in this respect, several methodologies for the structural modification on this compound have been documented in recent years.

Based on the above, the present work describes the synthesis of the new ethinylestradiol derivatives **59-64**, which were obtained by cross-coupling Sonogashira in moderate to good yields (25-74%). In addition, the dimeric derivative of ethinyl estradiol (**75**) was obtained in a 54% yield, during the optimization of the reaction conditions. The structure of all new compounds were assigned by spectroscopic and spectrometric methods.

Uv-vis and fluorescence measurements were carried out for compounds **59-63**, finding that compounds **59** and **61** have the maximum absorption wavelengths with respect to the rest of compounds, as well as, fluorescence in solution. Moreover the analysis of fluorescence vs viscosity was carried out for compound **61**.

Keywords: Ethinylestradiol, Sonogashira, fluorescence, steroids, NMR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Luminiscencia

La palabra luminiscencia, del latín (lumen = luz) fue introducida por primera vez como *luminescentz* por el físico e historiador Eilhardt Wiedemann en 1888, para describir a "todos aquellos fenómenos de luz que no son únicamente condicionados por el aumento de la temperatura".

La luminiscencia se define como la emisión espontánea de radiación de una especie electrónicamente excitada o de una especie excitada por vibración que no está en equilibrio térmico con su entorno. Los diversos tipos de luminiscencia se clasifican de acuerdo con el modo de excitación (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de luminiscencia

Fenómeno	Modo de excitación
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia, fluorescencia retardada)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizada (Rayos-X, α , β , γ)
Catodoluminiscencia	Rayos catódicos (haz de electrones)
Electroluminiscencia	Campo eléctrico
Termoluminiscencia	Calentamiento después del almacenamiento previo de energía (irradiación radioactiva)
Quimioluminiscencia	Reacción Química (ej. Oxidación)
Bioluminiscencia	Reacción bioquímica <i>in vivo</i>
Triboluminiscencia	Fuerzas friccionales y electrostáticas
Sonoluminiscencia	Ultrasonido

Los compuestos luminiscentes pueden ser de diferentes tipos:

- Compuestos orgánicos: hidrocarburos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, perileno, porfirinas, ftalocianinas, etc.) y derivados, tintes (fluoresceína, rodaminas, cumarinas, oxazinas), polienos, difenilpolienos y algunos aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina), etc.
- Compuestos inorgánicos: ion uranilo (UO^{2+}), iones lantanidos (ej., Eu^{3+} , Tb^{3+}), lentes dopados (ej., con Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), cristales (ZnS , CdS , ZnSe , CdSe , GaS , GaP ,

$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cr}^{3+}$ (ruby)), nanocristales semiconductores (ej., CdSe), trozos metálicos, nanotubos de carbono y algunos fulerenos, etc.

- Compuestos organometálicos: complejos metálicos de porfirinas, complejos de rutenio (ej. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$), complejos de cobre, complejos con iones de lantánidos, complejos con agentes quelantes fluorogénicos (ej. 8-hidroxi-quinoleína), etc.

La fluorescencia y la fosforescencia son casos particulares de fotoluminiscencia; la fosforescencia es la emisión de luz a partir de los estados de excitación tripletes, en el cual el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación espín que el electrón del estado fundamental (Figura 1). En este caso, las transiciones al estado fundamental son prohibidas por lo que la velocidad de emisión es lenta (10^3 a 100 s^{-1}), así el tiempo de vida de la fosforescencia es típicamente de milisegundos a segundos.¹ El término fosforescencia proviene del griego: $\phi\omega\varsigma$ = luz (caso genitivo: $\phi\omicron\tau\omicron\varsigma$ = fotón) y $\phi\omicron\rho\epsilon\iota\nu$ = soportar. Por lo tanto, el fósforo significa "Que tiene luz". El término fósforo ha sido asignado desde la edad media a los materiales que brillan en la oscuridad después de la exposición a la luz.

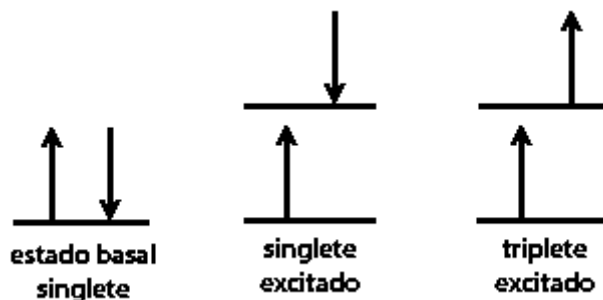


Figura 1. Representación gráfica de los espines en los orbitales, en el estado basal y excitado.

Por otra parte en la fluorescencia, en el estado de excitación singlete, el electrón del orbital excitado es apareado (por espín opuesto) con el segundo electrón en el orbital del estado basal (Figura 1). Consecuentemente, el regreso al estado basal del espín es permitido y ocurre rápidamente con la emisión de un fotón. La velocidad de fluorescencia es típicamente de 10^8 s^{-1} , de modo que el tiempo de vida de fluorescencia es cercano a 10 ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$).¹ El término fluorescencia fue introducido por George Gabriel Stokes, a mediados del siglo XIX, después de

observar que la fluorita (fluoruro de calcio) y una solución de quinina emitían luz después de absorber o ser expuestos a la luz.

Los procesos que ocurren entre la absorción y emisión de luz son usualmente ilustrados por el diagrama de Jablonski (Figura 2).²

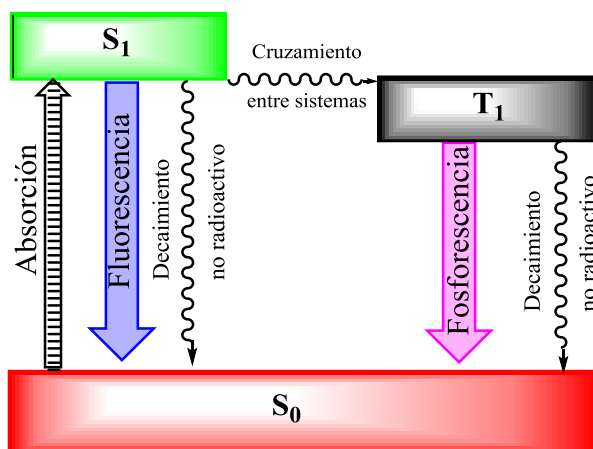


Figura 2. Diagrama simplificado de Perrin- Jablonski. La fluorescencia es la emisión a partir del primer estado singlete excitado S_1 que se alcanza después de la absorción de luz. Fosforescencia es una emisión a partir del estado triplete T_1 después del cruce entre sistemas S_1 .

Una vez que una molécula es excitada por la absorción de un fotón, puede volver al estado basal con emisión de fluorescencia, fosforescencia o por distintas vías las cuales se muestran en la figura 3.²

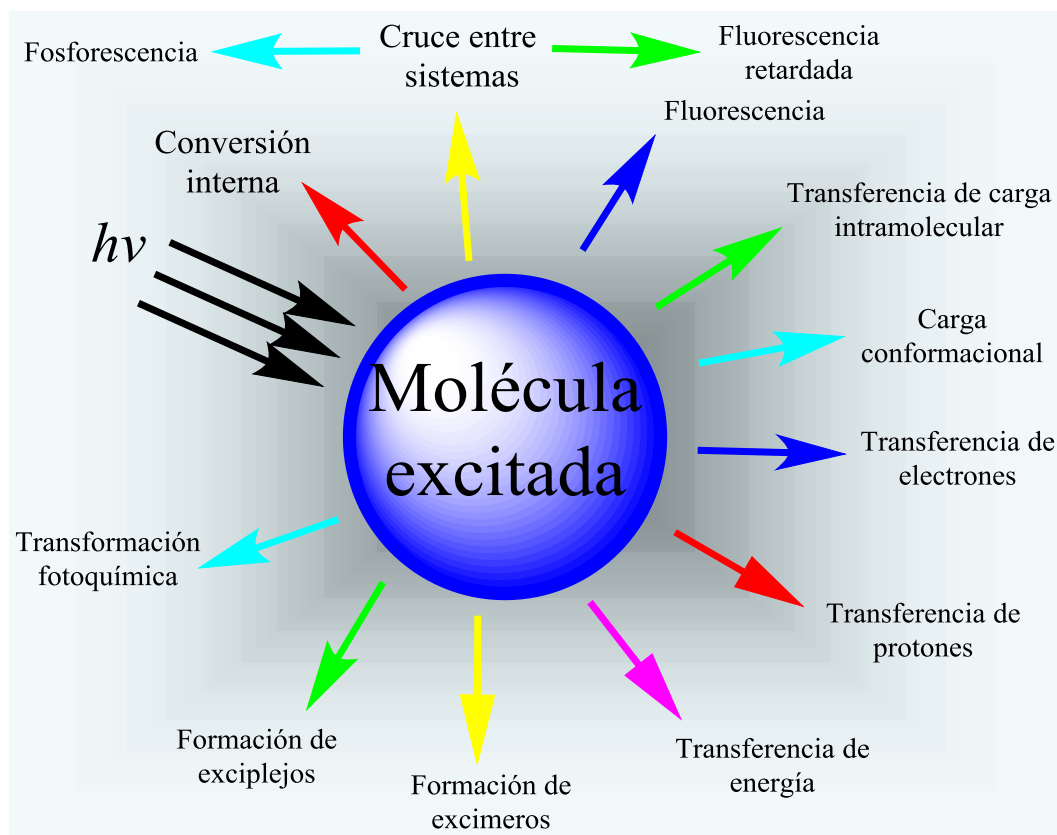


Figura 3. Posibles vías de desactivación de moléculas excitadas.

El éxito de la fluorescencia como herramienta de investigación para estudiar la estructura y dinámica de la materia o los sistemas vivos surge de la alta sensibilidad de las técnicas fluorométricas, la especificidad de las características de fluorescencia debido al microambiente de la molécula emisora, usualmente llamada fluoróforo y la capacidad de este para proporcionar información espacial y temporal. La figura 4 muestra los parámetros locales, físicos y químicos que caracterizan el microambiente y, por lo tanto que pueden afectar las características de fluorescencia de una molécula, esto demuestra la gran cantidad de aplicaciones de esta propiedad molecular.²

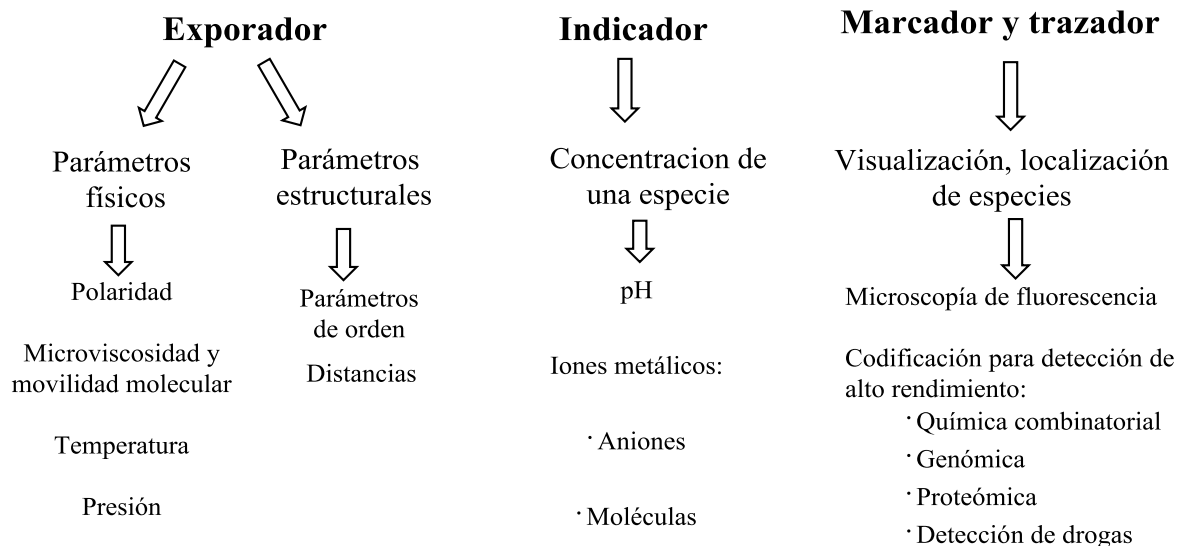


Figura 4. Información provista por exploradores, indicadores, marcadores y trazadores fluorescentes.

Los parámetros fotofísicos, tales como la vida útil de los excitones, la velocidad de decaimiento y la eficiencia de la luminiscencia, se miden o se determinan generalmente en soluciones muy diluidas, en las que las moléculas luminofóricas pueden ser aproximadas como especies aisladas sin ser perturbadas en gran medida por interacciones cromóforas. Los datos de dilución de la solución no se pueden extender comúnmente a las soluciones concentradas, ya que muchos luminóforos orgánicos muestran conductas emisoras de luz muy diferentes en soluciones diluidas y concentradas.

En este sentido, en 2001 Luo y Col.³ encontraron que diversos compuestos no eran emisivos en soluciones diluidas pero se volvían altamente luminiscentes cuando sus moléculas se agregaban en soluciones concentradas o se moldeaban en películas sólidas. Se denominó “emisión inducida por agregación” (AIE) al proceso en el que la emisión de luz es inducida por la formación de agregados.

Los luminógenos AIE generalmente son moléculas no planares que no son emisivas en solución. Por lo tanto, es probable que se eliminen en la primera etapa de un proceso de selección, ya que las evaluaciones de propiedades fotofísicas se realizan generalmente en soluciones diluidas. El efecto AIE es precisamente opuesto al notorio efecto ACQ referido como "extinción causado por agregación" por Forster y Kasper.⁴

Hexafenilsilol (HPS) es uno de los primeros derivados de siloles estudiados, en los cuales se descubrió el fenómeno de AIE. El análisis estructural del HPS revela que a diferencia de los luminóforos convencionales tales como el perileno (plano en forma de disco), el HPS es una molécula no planar en forma de propela (Figura 5). La diferencia en la estructura molecular es responsable de diferencia en el comportamiento de las emisiones. En una solución diluida, seis rotores de fenilo en una molécula de HPS experimentan rotaciones dinámicas intramoleculares contra su silaciclopentadieno o estator de silol, el cual aniquila no radiativamente su estado excitado y hace que molécula no sea luminiscente. En los agregados, las moléculas de HPS no se pueden empaquetar a través de un proceso de apilamiento π - π debido a su forma de hélice, y que las rotaciones intramoleculares de sus rotores de arilo son muy restringidas debido a la restricción física. Esta restricción de las rotaciones intramoleculares (RIR) bloquea la vía no radiativa y abre el canal radiativo. Como resultado, las moléculas HPS se vuelven emisivas en el estado agregado.⁵

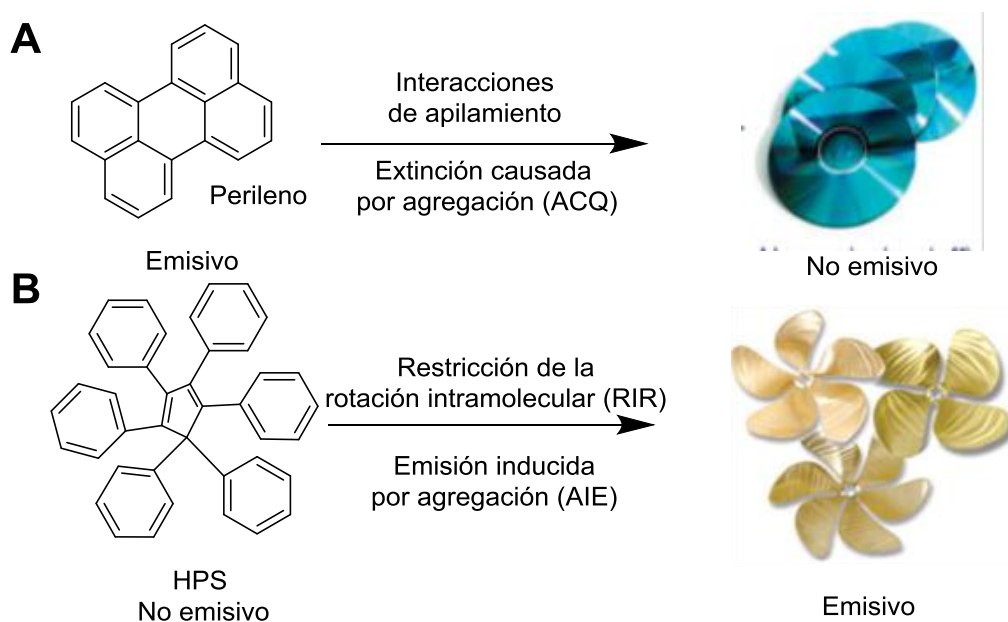


Figura 5 (A) Las moléculas luminofóricas planares, tales como el perileno, tienden a agregarse a medida que los discos se acumulan, debido a las fuertes interacciones de apilamiento π - π entre los anillos aromáticos, que comúnmente convierten la emisión de luz "apagada o no emisiva". (B) Las moléculas luminogénicas no planas como el hexafenilsilol (HPS) se comportan de manera opuesta, con sus emisiones de luz activadas por formación de agregados, debido a la restricción de la rotación intramolecular (RIR) de los múltiples rotores de fenilo contra el estator de silol en el estado agregado.

Este nuevo fenómeno AIE tiene grandes aplicaciones prácticas en análisis por fluorescencia y presenta alta sensibilidad y selectividad. Algunos ejemplos de su uso son como biosensores de carbohidratos,⁶ lípidos,⁷ aminoácidos,⁸ proteínas,⁹ enzimas¹⁰ y ácidos nucleicos,¹¹ ya que permite el empleo de soluciones de tinte a cualquier concentración para bioensayos aprovechando la ventaja de la agregación luminogénica, así como en el área de materiales como sensores luminiscentes¹² y dispositivos emisores de luz (LED).¹³ La función de "encendido" de los biosensores AIE ofrece una mayor sensibilidad y una mayor precisión que las contrapartes de ACQ.

Los luminogénos disfrutan de una gran diversidad de estructuras, desde hidrocarburos puros, complejos organometálicos, moléculas pequeñas, polímeros grandes, sistemas con conjugaciones π - extendidas hasta aquellos incluso sin cromóforos típicos.

Atraídos por las fascinantes estructuras, muchos grupos han trabajado en el diseño y síntesis de nuevos luminogénos, preparación y modulación de sus morfologías agregadas y en solución, así como la investigación y manipulación de sus comportamientos luminescentes. Como resultado de esfuerzos entusiastas de investigación, se han desarrollado una variedad de nuevos sistemas, y se ha reunido una gran cantidad de información mecanística y se han explorado varias aplicaciones prácticas.

Debido a la variedad de aplicaciones de la fluorescencia y considerando que la química de esteroides ha sido poco explorada en esta área, el presente proyecto consistió en el diseño y síntesis de compuestos esteroideos con propiedades fluorescentes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas contienen en su estructura el núcleo ciclopentano perhidrofenantreno. Estos compuestos llevan a cabo funciones reguladoras importantes, además de participar en varios procesos fisiológicos claves en el organismo humano.¹⁴ Dependiendo de la acción biológica y la cantidad de átomos de carbonos en la molécula están divididos en cuatro grupos fundamentales (Figura 6):

- a) Estrógenos: estradiol, estrona, estriol.
- b) Gestágenos: progesterona.
- c) Andrógenos: testosterona, androstenediona.
- d) Corticosteroides: cortisol, corticosterona, aldosterona.¹⁵

Una de las hormonas con mayor impacto en la síntesis de esteroides, por su afinidad a ER, son los estrógenos, a continuación se describe la importancia de estos esteroides.

2.1.1 Estrógenos

Los estrógenos pueden ser de dos tipos: naturales y sintéticos. Los estrógenos naturales son una clase de hormonas sexuales esteroideas producidas por los ovarios, y en glándulas suprarrenales¹⁶ que regulan varios eventos fisiológicos, como la maternidad, la función cardiovascular, la formación y remodelación del hueso, las funciones inmunológicas e inflamatorias.

Los estrógenos se difunden fácilmente a través de la membrana celular¹⁷ y son transportados a través de la sangre (unidos a proteínas de transporte de esteroides) y de la membrana celular que al unirse al receptor de estrógenos (ER) en el citoplasma, finalmente son transportados al núcleo de la célula.¹⁸ Dentro de la célula, los estrógenos regulan los eventos celulares por medio de interacciones específicas con receptores intracelulares que funcionan como factores de transcripción inducidos por el ligando.¹⁹

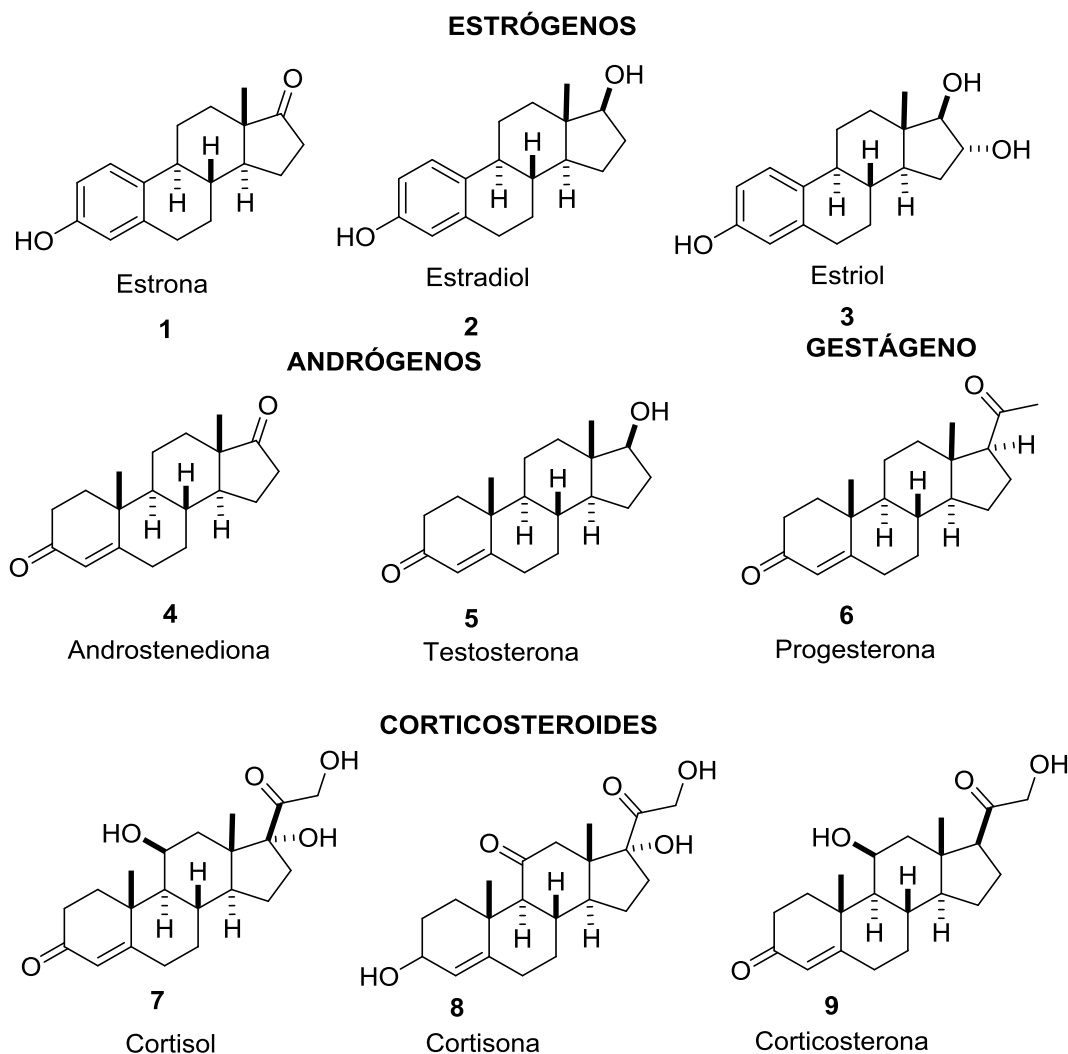


Figura 6. Hormonas esteroidales.

Los receptores de estrógeno (ER) están involucrados en la regulación de diversos procesos que van desde el mantenimiento del crecimiento del tejido hasta la reproducción. Existen dos subtipos del receptor de estrógenos: $ER\alpha$ y $ER\beta$, los cuales presentan patrones de distribución celular y de tejido diferentes. En los seres humanos, ambos subtipos de receptores se expresan en muchas células y tejidos, y controlan funciones fisiológicas clave. El $ER\alpha$ se expresa principalmente en órganos reproductores femenino y masculino, próstata (estroma), el hígado y el tejido adiposo. Ambos subtipos están marcadamente expresados en el sistema nervioso central y cardiovascular.²⁰

Un mediador intracelular dependiente de estrógenos transmembranal de transducción de señales, es el receptor acoplado a proteína G (GPR30) fue identificado en el retículo endoplasmático.²¹ Este receptor tiene una alta afinidad para el estrógeno y regula la respuesta celular rápidamente, como la movilización de calcio y la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.²²

El receptor de estrógeno es un objetivo biológico que ha atraído considerable atención en los últimos años. Se expresa en varios tipos de cáncer: de mama (60-70%), útero (70-73%), así como de ovario (61%). En conjunto, representan el 40% de todos los cánceres diagnosticados en las mujeres que muestran una tasa de mortalidad del 25%.²³

Los receptores de estrógenos (ER) controlan la proliferación y diferenciación de los tejidos diana, y la sobreexpresión ER se asocia a menudo con carcinomas de mama, endometrio y ovario.²⁴

Los tumores malignos que sobreexpresan los receptores de estrógeno (ER) tienen un gran impacto en la salud y el bienestar humano, independientemente de los avances en su detección y tratamiento tempranos.²⁵

Por otra parte, el estradiol (E2) es el estrógeno fisiológico principal en mamíferos. Las estructuras cristalinas de E2 en el receptor de estrógeno (ER) confirman la importancia del anillo A en la estabilización de E2 en el ER. El estradiol (E2), es el esteroide circulante con mayor afinidad para el receptor de estrógenos a ER α y ER β .²⁶

Según el modelo 3D basado en la estructura de rayos X de 17 β estradiol unido al receptor de estrógeno, el grupo OH en la posición 3 de todos los compuestos forman tres enlaces de hidrógeno con las proteínas, ARG 394 y GLU 353 y el otro con un segundo grupo hidroxilo del resto de estradiol (etiquetas rojas en Figura 7).²³

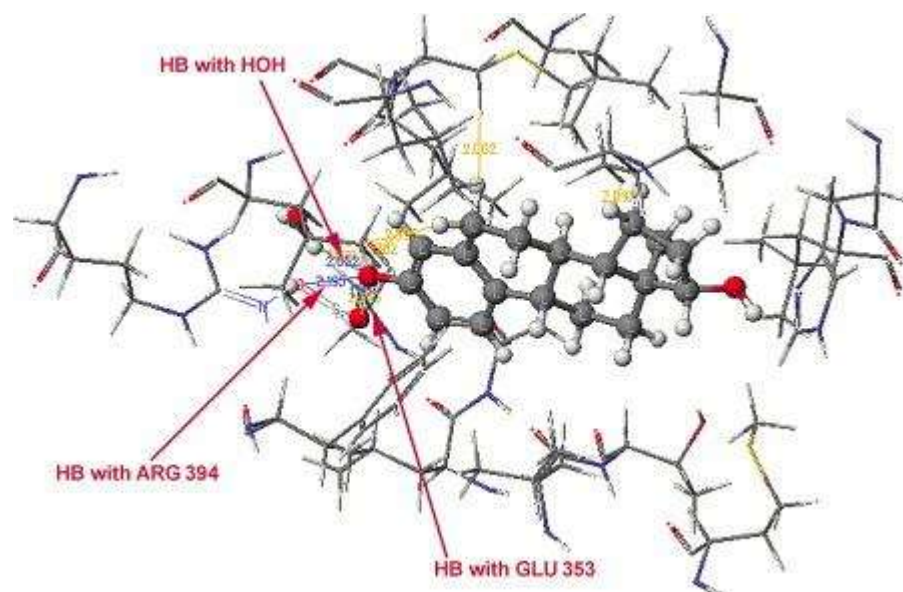


Figura 7. El 17 β -Estradiol dentro del sitio activo del ER. Las principales interacciones se producen en el anillo A del núcleo esteroidal, hay tres enlaces de hidrógeno (HB).

Para que una molécula portadora pueda tener una buena afinidad por ER, debe tener al menos tres anillos de seis miembros que se mantengan en un marco relativamente rígido, así como los hidroxilos libres en las posiciones similares al C-3 fenólico y en C-17 β en el estradiol. En el caso de estradiol, específicamente, es posible la unión de un sustituyente pequeño en 7 α o 11 β , así como uno más voluminoso en 16 α , β , que tenga una cadena larga insaturada mientras que, en el 17 α , se necesita un espaciador rígido, preferiblemente etinilo aunque un residuo voluminoso también es posible. Es decir, cuando se enlaza un esteroide a una biomolécula, se requiere que tengan longitudes de cadena óptimas para evitar interacciones estéricas entre la biomolécula y el ADN.²²

El 17 α -etinilestradiol (EE2) es una hormona sintética, que es un derivado de la hormona natural, estradiol (E2). EE2 es un estrógeno bioactivo, y es uno de los medicamentos más utilizados para los seres humanos, así como en la actividad ganadera y acuícola. Numerosos estudios han informado sobre la mayor afinidad a ER en comparación con el estradiol natural.²⁷

Cuando se demostró que la concentración de receptores de estrógeno (ER) es 60-70% más alta en carcinomas dependientes de estrógenos y adenocarcinomas (por ejemplo, los de mama, ovario, próstata y endometrio) que en el tejido normal, varios estrógenos fueron investigados

como vectores potenciales. La unión del fármaco a los estrógenos debe apuntar el ER α/β y, en última instancia, el núcleo de la célula tumoral mamaria sensible a estrógeno.²²

La administración celular de fármacos dirigida a tejidos específicos es un objetivo importante en la química biomédica. El logro de esto requiere el aprovechamiento y la aplicación de los eventos de reconocimiento específicos al tipo de tejido deseado a nivel molecular.

Los tejidos ricos en receptores de estrógenos (ER), que incluyen muchos tipos de cáncer de mama, acumulan moléculas que tienen altas afinidades de unión para estos receptores. Por lo tanto, las moléculas con gran afinidad a los ER ya sea que (i) se unen a la ER, (ii) tienen propiedades de transporte celular favorables o (iii) contienen una segunda funcionalidad, pueden usarse para la formación de imágenes de diagnóstico o terapia médica²² por lo que ha habido un gran interés en la síntesis de derivados de estradiol con una mayor afinidad de unión para el receptor de estrógenos.²⁸

2.1.2 Modificaciones químicas de los estrógenos

La falta de selectividad de varios agentes antitumorales, así como su toxicidad aguda hacia los tejidos que rápidamente proliferan, constituyen los principales inconvenientes en su uso para el tratamiento del cáncer humano. Con el fin de eludir este problema, un enfoque consiste en acoplar estos agentes a compuestos que han demostrado selectividad hacia los tumores, o los tejidos de los que se derivan los tumores. Esto podría permitir la entrega selectiva del agente citotóxico a las células o tejidos con alta concentración del portador en los sitios de unión. En este contexto, un estrógeno se puede utilizar para tratar el cáncer de mama, ya que está bien establecido que la mayoría de este tipo de cáncer presenta niveles detectables de receptor de estrógeno (ER) (rango estimado= 5,000 a 50 000 moléculas de receptores/célula). Por lo tanto, los estrógenos están equipados para servir como portadores eficaces de agentes citotóxicos dirigidos al ADN en los núcleos de células ricas en ER, debido a que las hormonas esteroidales se unen a un complejo ADN-dímero del receptor en el núcleo, que posteriormente altera la tasa de transcripción por un mecanismo desconocido.

Hallazgos previos basados en el número de receptores por célula y la posible concentración de fármaco han sugerido que el valor relativo de afinidad de unión (RBA) debe ser al menos 1% en comparación con estradiol (100%).²⁹

En la actualidad, varios agentes citotóxicos de estrógeno han sido preparados mediante la vinculación esteroidal o no esteroidal con restos a un fragmento con actividad citotóxica conocida. Para que este enfoque sea exitoso, los conjugados deben exhibir actividad antitumoral, y también poseer suficiente afinidad de unión al ER, lo que permitiría su acumulación selectiva en las células ricas en ER. A continuación se discuten algunas investigaciones sobre el tema.

La Elipticina (**10**) es un alcaloide indólico de origen natural que exhibe citotoxicidad, debido tanto a la inhibición de la topoisomerasa II como a la intercalación en el ADN. Tres conjugados de elipticina-estradiol fueron sintetizados por Devraj y Col.³⁰ con cadenas adicionales en la posición 17 α del estradiol; esto con el interés de orientar la citotoxicidad de la elipticina a células positivas del receptor de estrógeno. Los conjugados se evaluaron por su capacidad para unirse a receptores de estrógeno, para inhibir la topoisomerasa II, y la citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano. El compuesto **12** (Figura 8) fue el mejor inhibidor de la topoisomerasa II, mientras que los otros fueron inactivos. Ninguno de los compuestos mostró selectividad para líneas de células positivas del receptor de estrógeno, lo cual es atribuido posiblemente a la débil afinidad para receptores de estrógeno.³⁰

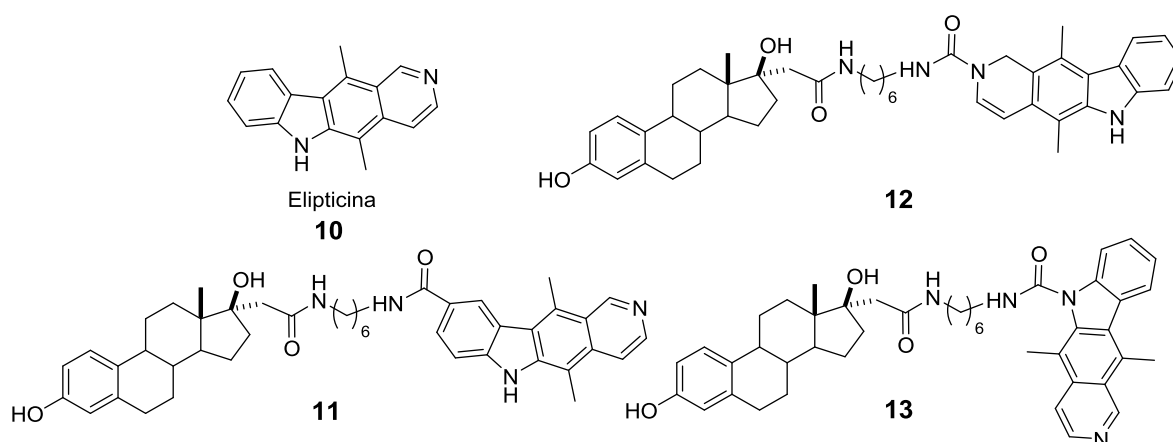


Figura 8. Conjugados de elipticina-estradiol preparados por Devraj y Col.³⁰

La Geldanamicina (GDM), aislada por primera vez de *Streptomyces hygroscopicus*,³¹ e identificada originalmente como un potente inhibidor de las células transformadas por el oncogén v-Src.³² La GDM ejerce sus efectos biológicos mediante la unión al N terminal del ATP de la chaperona molecular Hsp90 por lo que la GDM detiene el crecimiento y la posterior apoptosis de las células cancerosas. Sin embargo, el amplio espectro de actividad de GDM contra múltiples proteínas reguladoras importantes, está restringida por su significativa toxicidad.

En este sentido Kuduk y Col.³³ sintetizaron un híbrido (**14**) formado entre estradiol (E2) y GDM (Figura 9), el cual mostró la degradación selectiva del receptor de estrógenos (ER) y HER2 quinasa en células de cáncer de mama MCF-7.

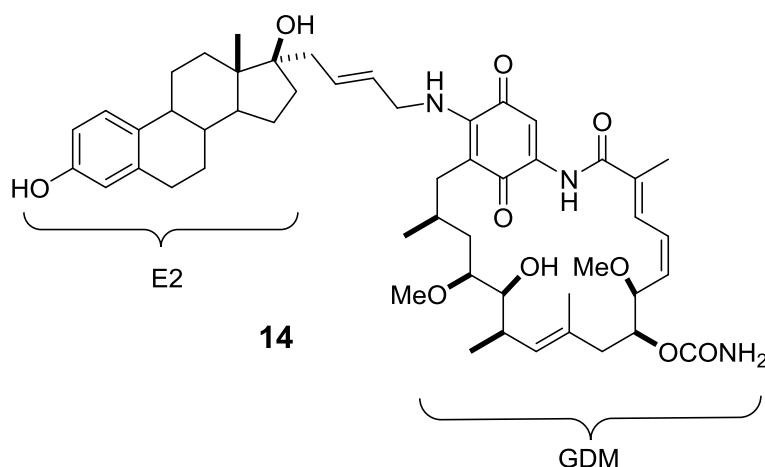


Figura 9. Híbrido formado entre estradiol (E2) y GDM, sintetizado por Kuduk y Col.³³

La daunorrubicina (**15**), pertenece a los antibióticos de la familia de antraciclina y comúnmente es utilizado como agente antitumoral de amplio espectro para el tratamiento de varios tipos de cáncer avanzados, ya sea como agente único o en combinación con quimioterapia. A pesar de su cardiotoxicidad (asociado con su capacidad para formar radicales libres), la daunorrubicina es uno de los tratamientos preferidos para los cánceres de mama metastásicos progresivos. Kasiotis y colaboradores²⁹ prepararon el conjugado daunorrubicina-estradiol **16** (Figura 10) con una cadena larga enlazante 17α , lo que potencialmente localiza a la molécula citotóxica lejos del grupo 17β -OH, crítico para la unión a los ER. Este conjugado, mostró afinidad de unión débil de 0.079 RBA para el receptor de estrógeno. Sin embargo, manifestó cierta selectividad a las líneas celulares.

Las enediinas son usadas como agentes antitumorales y han suscitado gran interés debido a su excepcional citotoxicidad, consecuencia de su capacidad para generar radicales diilo en la cicloaromatización del núcleo de enediina. El supuesto objetivo de estos radicales diilo es el ADN, dando como resultado lesiones en la cadena sencilla y doble. Sin embargo, también se han identificado blancos proteicos para enediinas específicas, dando como resultado proteólisis, aglomeración y dimerización de proteínas. A nivel molecular se ha demostrado que se generan radicales amino acilo cuando los aminoácidos están expuestos a radicales diilo.

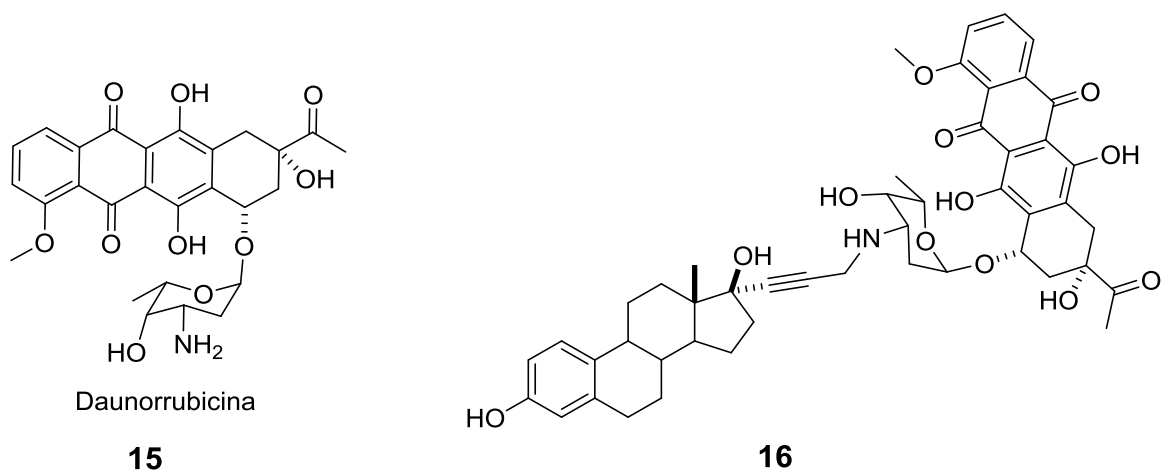


Figura 10. Conjugado daunorubicina-estradiol.

Las Enediinas y eneine-alenos son activados térmicamente para producir radicales diilo mediante procesos denominados ciclización de Bergman o Myers-Saito, respectivamente (Figura 11). Estas especies de alta energía son capaces de extraer átomos de hidrógeno del ADN y de proteínas (que conducen a degradación y/o aglomeración). Se ha llevado a cabo la síntesis convergente de un conjugados enediinas-estrógeno (17) fotoactivadas. Los ligandos se unen al dominio de unión del receptor de estrógeno humano con una afinidad nM baja, lo más importante, se someten eficientemente a una foto-cicloaromatización Bergman.¹⁹

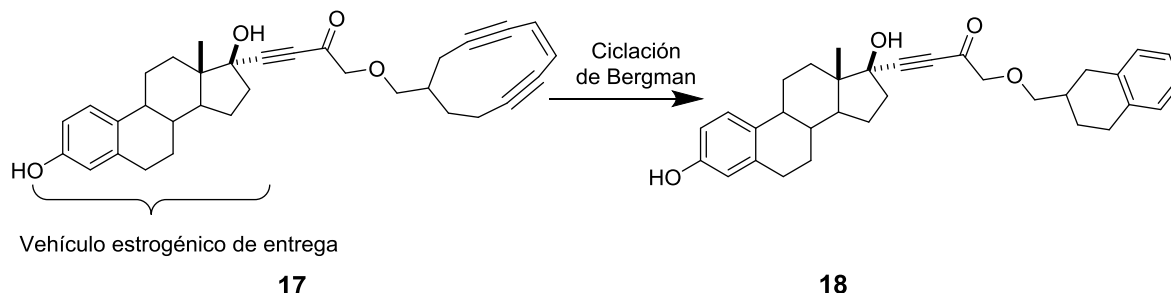


Figura 11. Conjugado de Enediina-estradiol y ciclación de Bergman para producir radicales diilo.

Actualmente, las terapias a base de Platino (II) constituyen una metodología útil y eficaz para tratar varios tipos de cáncer. Algunos de ellos son el cisplatino (*cis* diamino dicloroplatino(II)), el carboplatino (diamino[1,1-ciclobutanodicarboxilato] O,O' Platino(II)), y más recientemente oxaliplatino, nedaplatino, iobaplatin, y heptaplatino (SK12053R).

En general, los fármacos a base de platino tienen dos desventajas principales: puede ocurrir la quimiorresistencia a los fármacos, y segundo que no son selectivos hacia las células cancerosas lo que conduce a efectos secundarios tóxicos graves, principalmente toxicidad renal y la neurotoxicidad. La actividad antitumoral de fármacos de platino es una consecuencia de su interacción con el ADN. El cisplatino se une fácilmente a la posición N7 de las bases de guanina de moléculas de ADN bloqueando de este modo la replicación y/o transcripción, y en última instancia la inducción de apoptosis.

Varios grupos de investigación, han trabajado la combinación de un complejo de platino con un fragmento estrogénico (Figura 12), con el fin de orientar al receptor estrogénico (ER) en las enfermedades dependientes de hormonas, particularmente cáncer de mama. Específicamente, el objetivo general es mejorar la selectividad y la eficacia de este tipo de medicamento y, más importante, minimizar los efectos tóxicos. A continuación se describen algunos ejemplos.^{36 y 22}

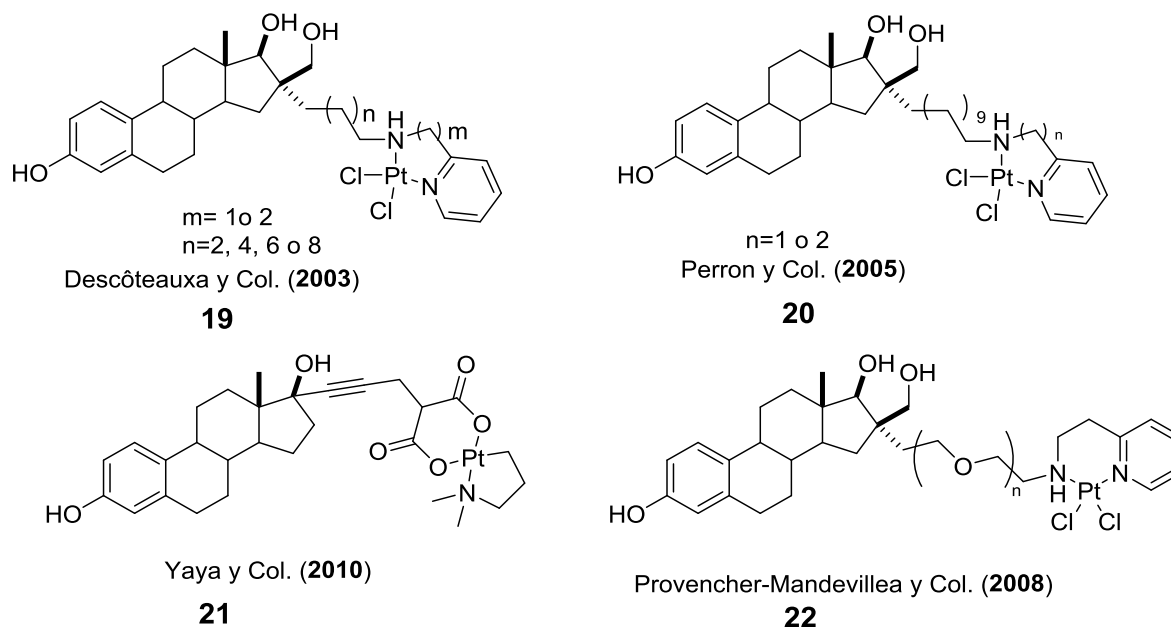


Figura 12. Complejos de platino-estradiol sintetizados por varios grupos de investigación.

El Taxol[®] fue aislado de la corteza del tejo del Pacífico por los Dres. Wall y Wani, el descubrimiento de su actividad anticancerosa se ha convertido en uno de los fármacos actuales más importantes para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y cáncer de ovario; su importancia en el tratamiento del cáncer de mama está bien documentado al igual que su química. Como casi todos los fármacos contra el cáncer, el taxol tiene algunos efectos secundarios tóxicos, tales como supresión de la médula ósea y neutropenia, y muchos tumores también muestran una resistencia significativa a la terapia con este compuesto.

Para mejorar su selectividad y eficacia se han sintetizado varios conjugados de taxol con una selectividad y solubilidad mejorada.

Changhui Liu y Col. en 2004 prepararon el conjugado estradiol-taxol (ETC) (Figura 13) como agente para dirigir el taxol al receptor de estrógeno (ER) de células de cáncer de mama positivos. Los conjugados estradiol-taxol (ETC) se sintetizaron a través de enlaces en la posición 16 del estradiol. Sin embargo, los resultados de citotoxicidad para la línea celular de cáncer de ovario A2870 de los conjugados, fueron menores que los obtenidos para el taxol. Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (ER α positivo) y MDA-MB 231 (ER α negativo) también se

utilizaron para evaluar la selectividad y la citotoxicidad de estos conjugados. Solo un conjugado mostró cierta selectividad por células ER positivos, pero menos potente que el taxol.³⁵

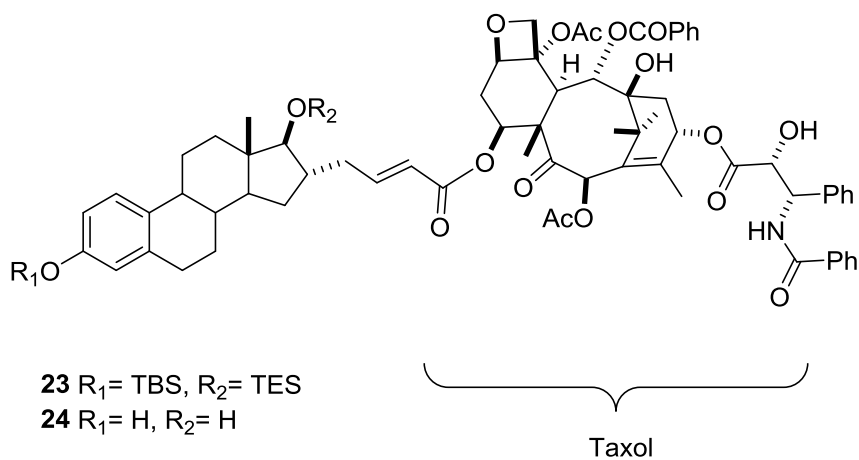


Figura 13. Conjugado estradiol-Taxol preparado por Changhui Liu y Col. en 2004.

Algunas porfirinas son propensas a ser retenidas de manera selectiva por el tumor en comparación con los tejidos normales. Adicionalmente, estas porfirinas pueden actuar como fotosensibilizadores cuando se activan con luz visible para producir localmente un radical de oxígeno singlete altamente reactivo contra células tumorales. Esta es la base de la terapia fotodinámica (PDT) del cáncer. PDT se ha aplicado en etapas tempranas, la terapia paliativa para la enfermedad en estadio tardío, y para la esterilización del lecho tumoral mediante la destrucción de las células tumorales residuales después de la cirugía o de cualquier metástasis en el área iluminada por la luz.

Sadler y Col.³⁶ reportaron un conjugado de etinilestradiol y piro-feoforbido (Figura 14) que atraviesa las células ER-positivas MCF-7, mientras que el piro-feoforbido no lo hace, lo que sugiere una absorción mediada por ER y la penetración del conjugado por ER nucleares en MCF-7.

En los conjugados de estradiol sintetizados se observó eliminación de células MCF-7 de cáncer de mama a ER-positivas pero no ER-negativas MDA-MB 231, significativamente mayor que las porfirinas no conjugadas.³⁶

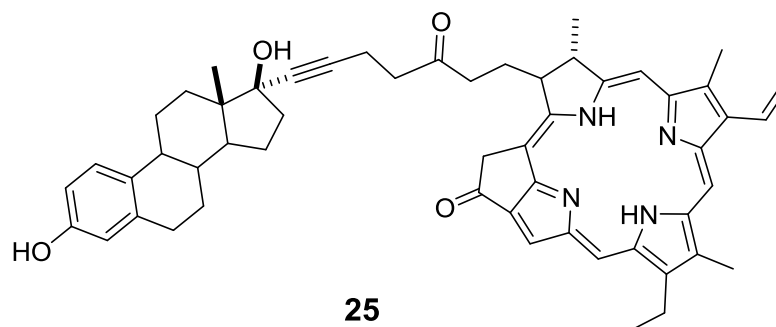


Figura 14. Conjugado estradiol-piro-feoforbido sintetizado por Sandler y Col.³⁶

Por otro lado, los lípidos catiónicos son ampliamente estudiados como vectores no virales para la entrega de cargas genéticas, incluyendo p-ADN y siRNA. Los restos hidrófobos de cadena larga de estas moléculas anfifílicas son generalmente una o dos cadenas de ácidos grasos, restos derivados de colesterol, entre otros. Los lípidos catiónicos se reconocen principalmente por sus potencialidades de suministro, pero a diferencia de otras moléculas pequeñas sus propiedades medicinales no son reconocidas. Los lípidos catiónicos se sabe que activan varias vías celulares como pro-apoptóticas y cascadas pro-inflamatorias, generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en los macrófagos o células B inmaduras, activa la liberación prolongada de calcio [Ca^{2+}] y liberación de los depósitos de calcio intracelular sensibles a tapsigargina. Los lípidos catiónicos también son conocidos por inducir la apoptosis, un evento bioquímico bien programado, en las células cancerosas.

Entre los conjugados de lípidos catiónicos recientemente desarrollados, el derivado **27** que contiene una cadena de diez carbonos exhibió 4-12 veces mejor actividad anticancerosa que el derivado previamente establecido **26** en diversas células cancerosas de diferentes orígenes (Figura 15). Además, la citotoxicidad de esta molécula no se observó en células no cancerosas. Notablemente, a pesar de llevar el resto estrogénico, **27** exhibió actividad anticancerosa independientemente del estado de expresión del receptor de estrógeno (ER). El compuesto **27** exhibió una detención sub-G0 prominente de células cancerosas con inducción concomitante de apoptosis y demostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en el modelo de melanoma de ratón. Colectivamente, **27** ejemplifica el desarrollo de un agente anticanceroso con una actividad más amplia contra las células cancerosas de diferentes orígenes.³⁷

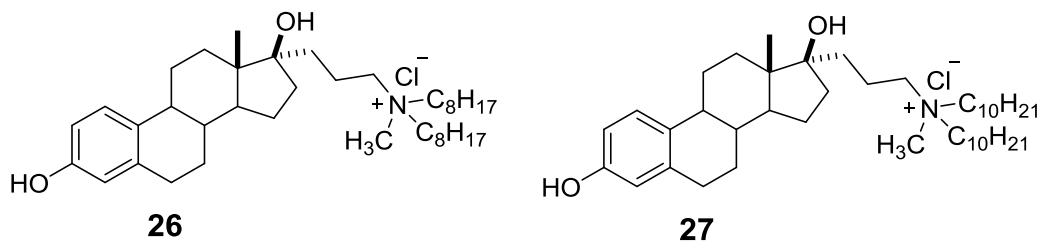


Figura 15. Conjugados de lípidos catiónicos desarrollados recientemente.

2.1.3 El estradiol en imágenes de diagnóstico

En los años cincuenta se tenía la idea de que solo la fluorescencia nativa de estrógenos podría ser excitada y de que otras hormonas esteroidales no mostraban fluorescencia medible. Esta noción se basa en los resultados obtenidos a partir de una lámpara utilizada como fuente de excitación de fluorescencia. La historia de esta cuestión se originó en 1957, cuando S. Undenfriend ^{38a} publicó el primer trabajo que demostró la fluorescencia natural de dos hormonas esteroideas: estradiol y estrona. La fluorescencia fue excitada con una lámpara de xenón de 150 W, la longitud de onda de activación fue de 285 nm. La fluorescencia máxima del estradiol y estrona fueron de 330 y 325 nm respectivamente. La fluorescencia del estradiol fue ocho veces más intensa que la de la estrona.

Estudios de la fluorescencia natural de hormonas esteroideas concerniente solo a estrógenos fueron desarrolladas por A. Weinreb y A. Werner quienes demostraron que el espectro de fluorescencia de la estrona tiene dos bandas: una de longitud de onda corta en 325 nm (principal) que es idéntica a la del estradiol, y otra banda de longitud de onda larga adicional en 430 nm. La banda adicional en el espectro de la estrona y la ausencia de esta en el espectro del estradiol se explica por la presencia del grupo carbonilo en la posición 17 en la molécula de la estrona y el grupo hidroxilo en esta posición en el estradiol.^{38b-d}

Posteriormente Fedorov y colaboradores determinaron la fluorescencia de todas las hormonas esteroidales y su relación estructural (Tabla 2).¹⁴

Tabla 2. Determinación de la fluorescencia de las hormonas esteroidales.			
Peculiaridad de la estructura química	Tipo de hormona esteroideal	Concentración estudiada (µg/ml)	$\lambda_{(em)}$ [nm] y sus relaciones.
Anillo fenólico A	Estradiol	25-100	305
	Estriol	25-100	307
Anillo fenólica A y el grupo carbonilo en la posición 17	Estrona	25-100	311, 426 24:1
Monocetona 17	Dehidroepiandrosterona	24-167	410
Monocetona 17 y grupo sulfo	Sulfato de dehidroepiandrosterona	24-150	378
Dicetona 3, 17	Androstenediona	24-111	410
Mocetona 3	Testosterona	24-70	325
	5 α - dihidrotestosterona	24-100	330
Dicetona 3, 20	Progesterona	20-180	380, 475 16:1
	17 α -hidroxiprogesterona		
	Cortisol		
	Corticosterona		
	Deoxicorticosterona		
Tricetona 3, 18, 20	Aldosterona	40-200	380, 475 16:1
Tricetona 3, 11, 20	Cortisona	38-190	405

El interés del estudio de la fluorescencia de las hormonas esteroidales tiene significancia teórica y un evidente aspecto aplicado, ya que pueden ser fácilmente difundidos en la membrana celular, por lo que esta propiedad los hacen factibles para diagnóstico en imagen de fluorescencia

in situ de receptores estrogénicos (ER)³⁹ en el cáncer humano, siendo una herramienta potencial para establecer la enfermedad, guiar los protocolos de tratamiento y el seguimiento del resultado del tratamiento.¹⁷

Existe un gran interés en el desarrollo de sondas de imágenes multimodales que cuentan con estructuras capaces de combinar imágenes ópticas y PET. Estas unidades incluyen marcadores radioactivos, radiofármacos, complejos organometálicos IR-activos, y fluoróforos orgánicos.⁴⁰ A continuación se describen algunos ejemplos.

Wust y colaboradores (Figura 16), prepararon complejos de estradiol encontrando que la posición 17 α es un sitio adecuado para la fijación de sustituyentes neutros y lipofílicos, incluso de tamaño considerable, estos nuevos sistemas quelantes de renio sugieren que tanto la longitud de cadena como el resto de quelato tienen un efecto sobre la afinidad de unión de estos complejos al receptor de estrógeno. Las afinidades de unión más altas se observaron en aquellos complejos que tenían un espaciador de cuatro y cinco carbonos que terminaba en el quelato.⁴¹

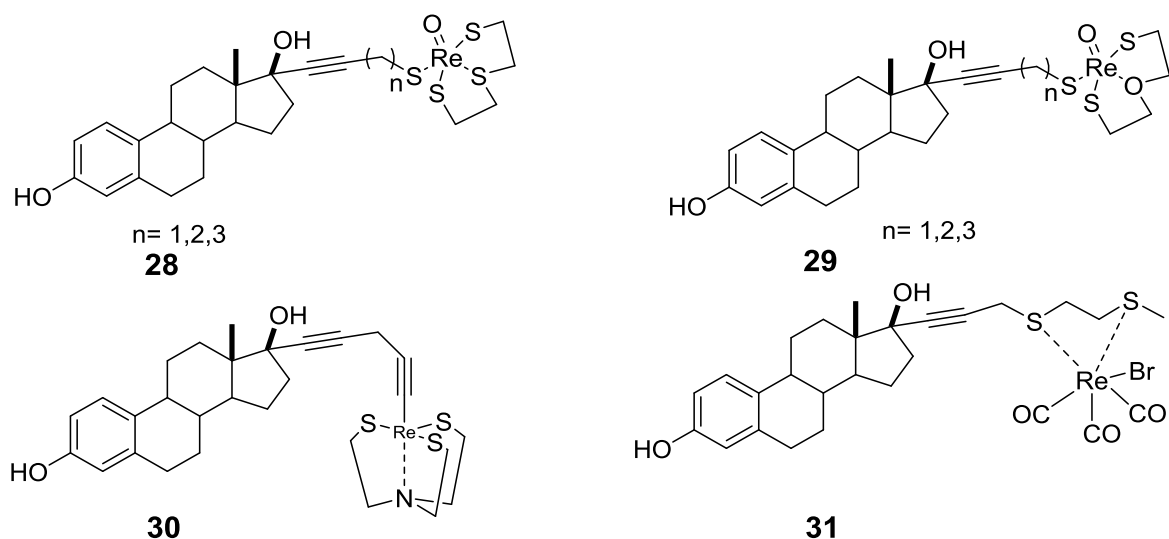


Figura 16. Complejos de estradiol conteniendo Renio preparados por Wust.⁴¹

Un año más tarde Skaddan y col.⁴² describieron por primera vez la síntesis de complejos de Renio en la posición 7 α del estradiol en el cual determinaron sus lipofilicidades y afinidades de unión para ER. El ligando de afinidad más alto en la serie compleja inorgánica es el complejo

34c, con un RBA del 45% (Figura 17). El ligando de afinidad más alto en la serie organometálica original (**33**) fue la amida **33b**, con un RBA del 24%. Las lipofilicidades de estos dos complejos resultaron ser demasiado altas para un perfil de biodistribución aceptable. Las amidas **35** y **37** de CpTR finales mostraron una buena afinidad de unión esencialmente sin cambios con respecto a la amida original **33b**. Una biodistribución favorable sugeriría la utilidad de estos compuestos como agentes de formación de imágenes eficaces para el cáncer de mama ER+.

Un año después prepararon este tipo de compuestos con el metal ^{99m}Tc los cuales mostraron notable estabilidad *in vitro*, los experimentos de distribución de tejidos *in vivo* mostraron poca captación de tejido diana.⁴³

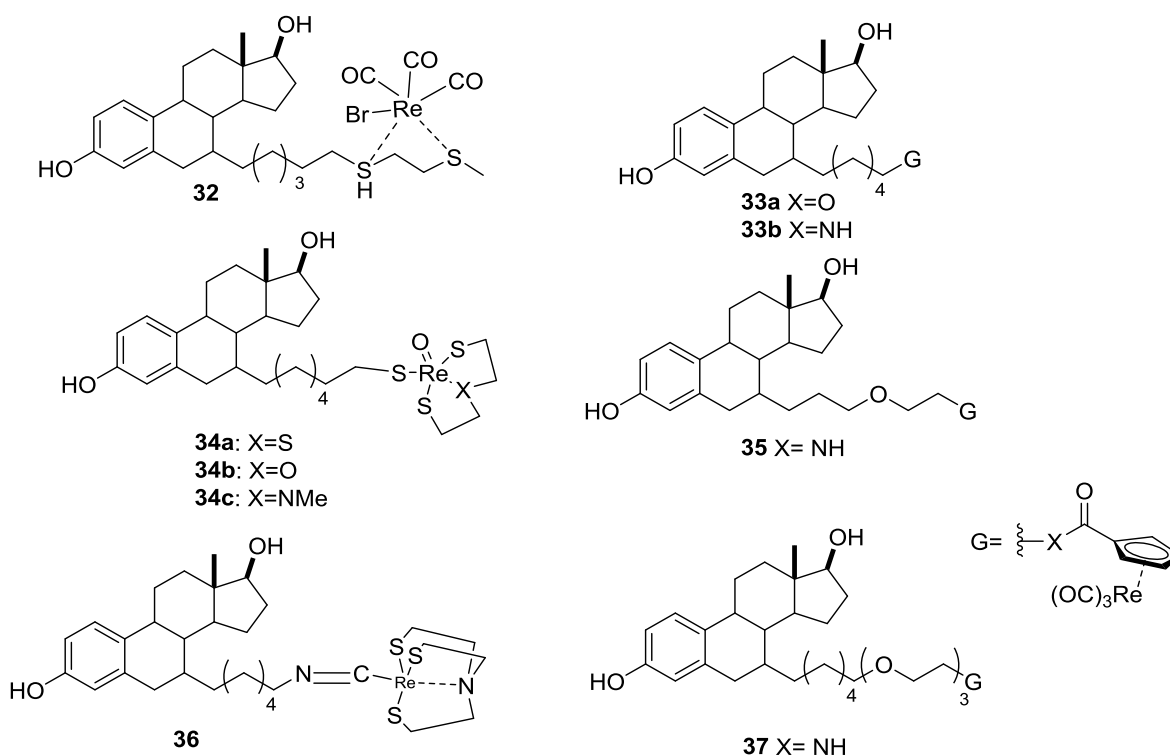


Figura 17. Complejos de estradiol-Renio.

Posteriormente Jackson y col. en 2001 demostraron que los esteroides estrogénicos son vectores de suministro eficaces que pueden usarse para mediar el transporte de una variedad de diferentes iones metálicos en las células. Al enlazar los dominios de unión a metal con el estrógeno a través de la posición 17R, se mantiene una fuerte afinidad por el receptor de

estrógenos. Todos los compuestos mostraron una unión eficaz al receptor de estrógenos y, lo que es más importante, se han suministrado a través de la membrana celular y en células MCF-7. El metal-estrógeno **44** de paladio (II) muestra el transporte y la posterior afinidad de unión que es del mismo orden que el propio estradiol (Figura 18).¹⁸

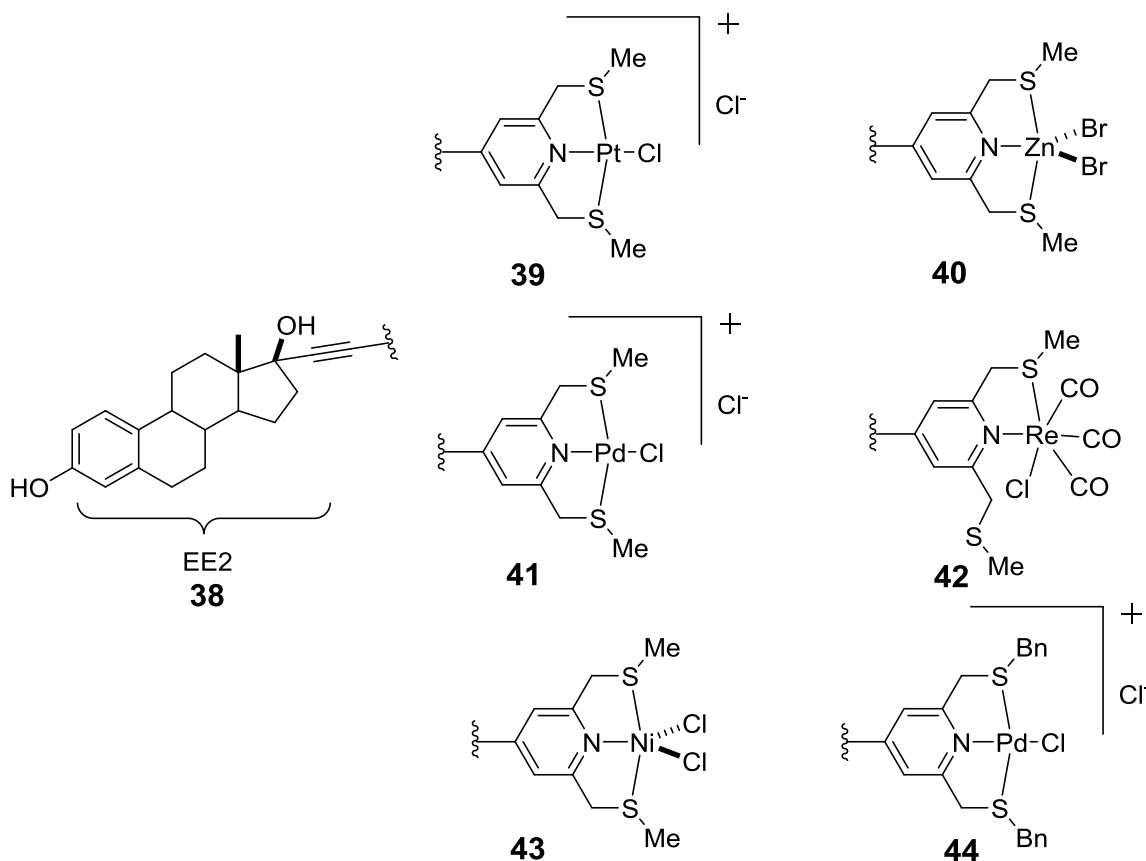


Figura 18. Síntesis de Complejos derivados de estradiol con diferentes metales.

En 2007 Gunanathan y colaboradores diseñaron y sintetizaron un nuevo conjugado estrógeno-piridina conteniendo Gd(III) y Eu(III) como agente de contraste (EPTA-Gd/Eu) los cuales fueron solubles en agua, estos compuestos mostraron selectividad y afinidad a los receptores de estrógenos que inducen la proliferación de células cancerígenas de seno. El EPTA-Gd no presentó daños letales y tampoco efectos adversos cuando se suministraba por vía intravenosa. El compuesto demostró ser un agente de contraste selectivo para localización de receptores de estrógenos por Resonancia Magnética de Imagen (MRI) (Figura 19).⁴⁴

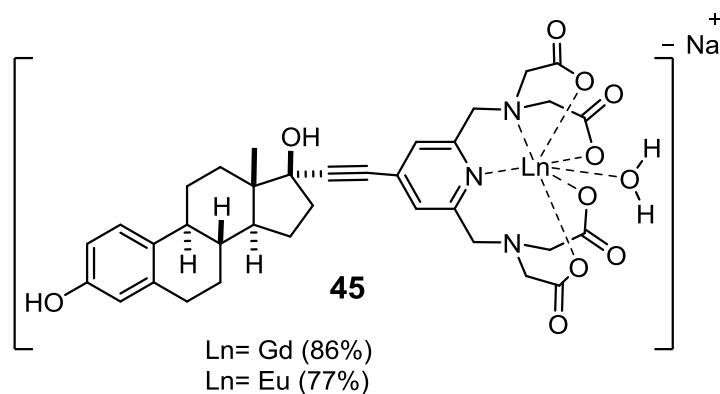


Figura 19. Conjugado estrógeno-piridina conteniendo Gd(III) y Eu(III).

En el 2008 se describió la síntesis de complejos de rutenio con etinilestradiol (EE2), siendo estos buenos candidatos para pruebas luminiscentes en imagen de células vivas ya que son compuestos fluorescentes y con baja citotoxicidad (Figura 20).⁴⁰

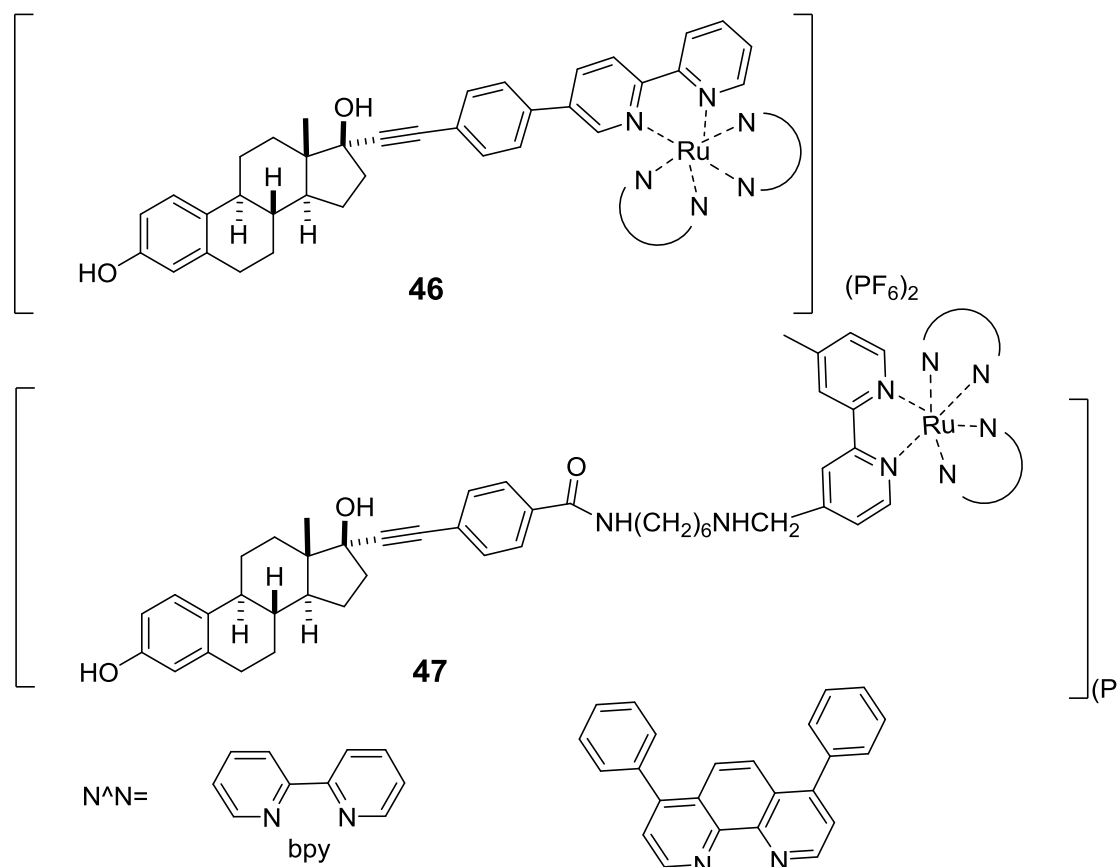


Figura 20. Estructuras de complejos de rutenio-estradiol.

Rickert y col. en 2010 sintetizaron derivados del etinilestradiol con grupos o colorantes fluorescentes como la carboxifluoresceína (**48**), el BODIPY (**49**) y el Alexa Fluor 546 (**50**) (Figura 21). Los conjugados se unieron al receptor de estrógenos *in vitro*, pero los tres conjugados, incluyendo uno que se consideró que era impermeable a las células, e inhibía la activación transcripcional inducida por estradiol. La microscopía de fluorescencia reveló la localización citoplasmática para los tres conjugados, sin embargo, la fluorescencia de los conjugados no se pudo detectar fácilmente a concentraciones nano molares por lo que se concluyó que un fragmento hidrófobo y planar de un conjugado puede complicar significativamente el uso de colorantes fluorescentes para dictar la localización subcelular.⁴⁵

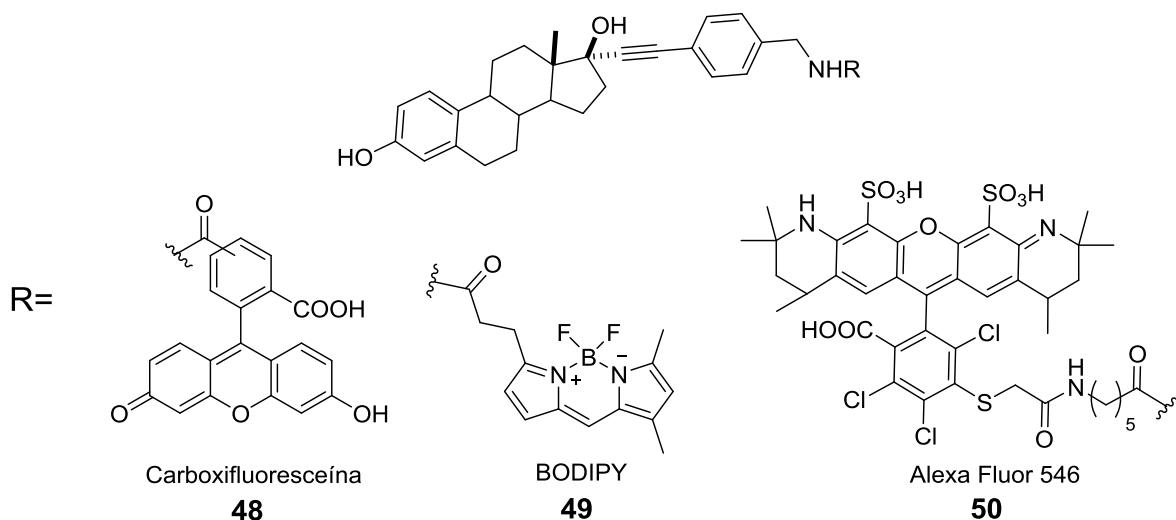


Figura 21. Derivados del etinilestradiol con carboxifluoresceína, el BODIPY y el Alexa Fluor 546.

Posteriormente en 2011 Céspedes-Wirao y colaboradores reportaron la síntesis de un nuevo derivado estrogénico a bajo costo y altamente fluorescente con la perilenebisimida (PBI) soluble en agua. Este compuesto tiñe fuertemente las células positivas para receptores estrogénicos, mientras que las negativas solo están presentes en una coloración muy débil (Figura 22).⁴⁶

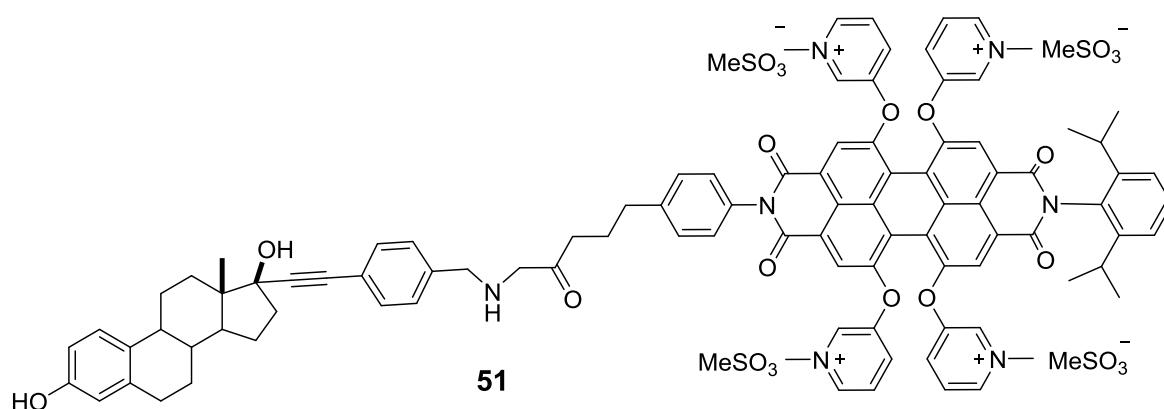


Figura 22. Conjugado PBI-estradiol.

De igual manera, se han estudiado varios derivados de estradiol radiomarcados se han estudiado. Entre ellos, los isómeros del 11β metoxi(17α , $20E/Z$) [^{123}I] iodovinilestradiol se han evaluado clínicamente, mostrando que el isómero $20Z$ da las mejores imágenes de tumores de mama humanos ER(+). En cuanto a PET de formación de imágenes, el radionúcleotido ^{18}F Flúor, producido por ciclotrón, ha sido el radio-halógeno más explorado para estudios de imagen de receptores de estrógenos *in vivo*. A la fecha, 16α [^{18}F] estradiol (18 FFES) ha sido el candidato más exitoso para la formación de imágenes de receptores de estrógenos positivos *in vivo* de tumores y se encuentra actualmente en fase II en un estudio para predecir la respuesta a la primera línea de terapia hormonal en mujeres con ER(+) de cáncer de mama metastásico. El 4-Fluoro- 11β -metoxi- 16α [^{18}F] fluoroestradiol (4FMFES) es un análogo de estradiol radiomarcado de nuevo desarrollo para formación de imágenes ER con PET (Figura 23).

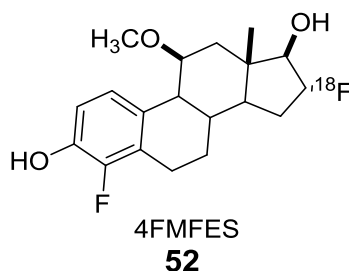


Figura 23. Derivado de estradiol radio-marcado.

En este contexto, Neto y colaboradores, sintetizaron una serie de 7α -alcoxi- 17α -(4'-iodofeniletinil)estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -dioles y 7α -alcoxi- 17α -(4'-fluorofeniletinil)-estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -dioles (Figura 24). En el cual los compuestos sustituidos con flúor mostraron una mayor afinidad de unión a ER que los derivados de yodo en los que se utilizó 7α -

metoxi y 17α -(4'-fluorofeniletinil)estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol (RBA = 80,9% y 78,9%, respectivamente), estos compuestos de halofeniletinilo son potenciales biomarcadores de PET para la obtención de imágenes de tumores que expresan ER.²⁵

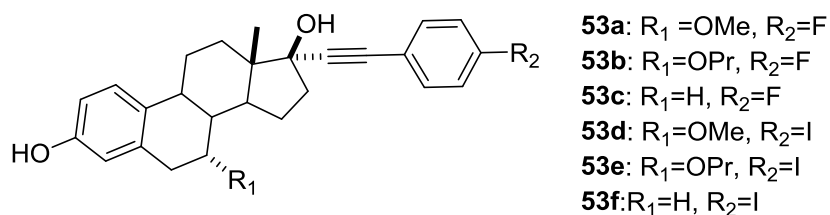
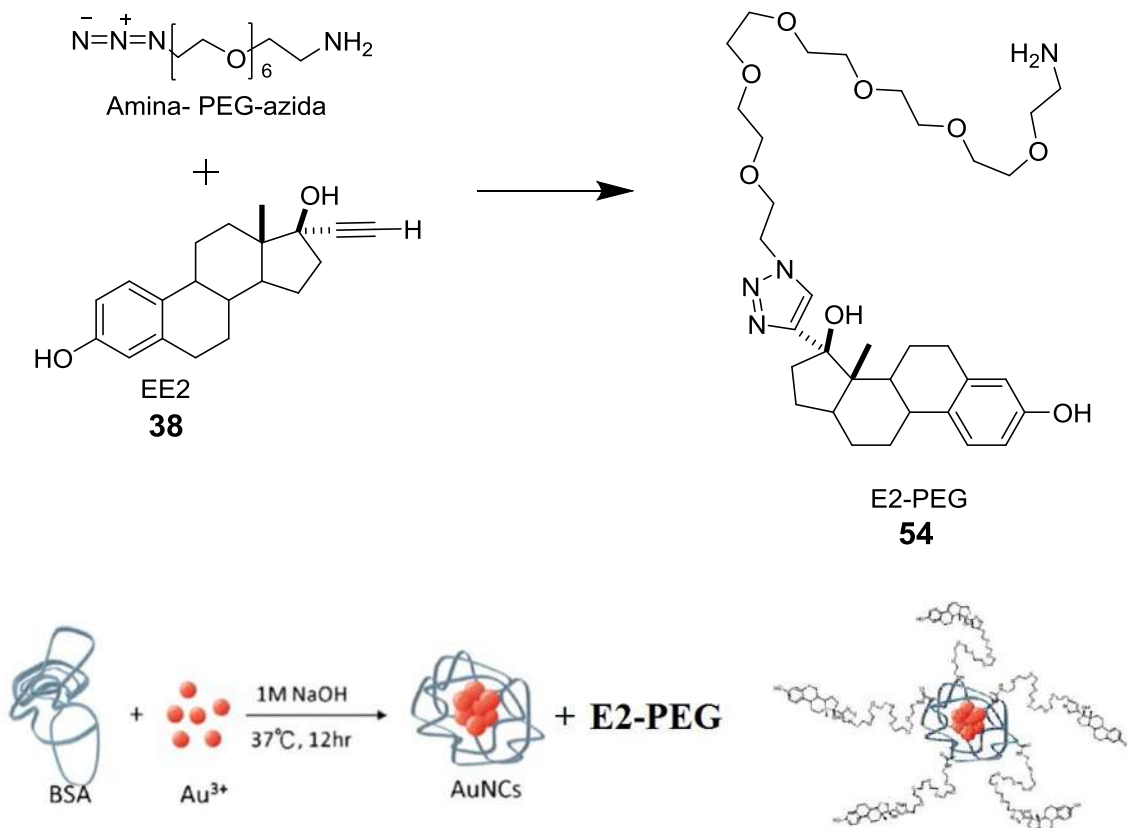


Figura 24. Compuestos de halofeniletinilo como potenciales biomarcadores de PET para la obtención de imágenes de tumores que expresan ER, preparados por Neto y Col.²⁵

Recientemente se describió un nuevo nanocluster de oro conjugado con etinilestradiol, el cual es altamente específico a receptores estrogénicos tumorales en células vivas, siendo un excelente candidato para ser utilizado en la detección de tejidos tumorales y una estrategia que puede ser aplicada para la fabricación de otras pruebas esteroidales (Esquema 1 y Figura 25).³⁹



Esquema 1. Formación de E2-PEG/BSA-AuNC como prueba fluorescente.

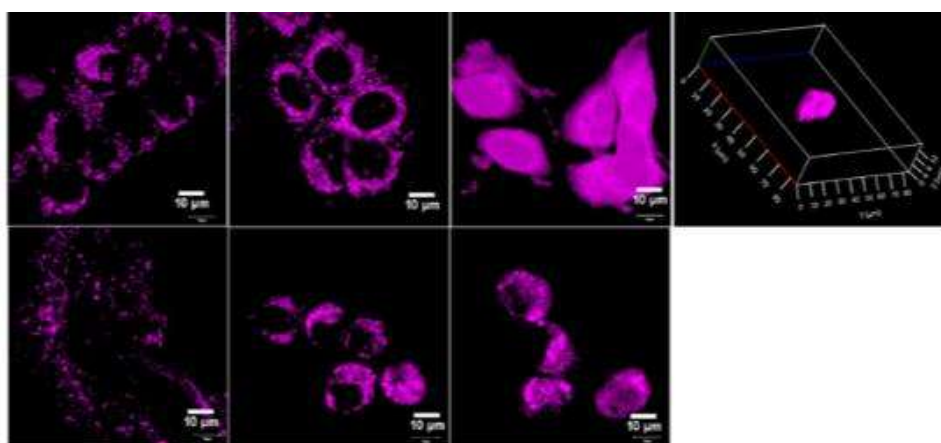


Figura 25. Focalización de células por análisis de E2-Cy3. Intensidad de imagen con intensidad de fluorescencia por microscopía confocal de células MCF-7 (arriba) y MDA-MB231 (abajo) incubados con E2-Cy3 por 30 min, 2h o 6h (de izquierda a derecha). La imagen 3D de células de MCF-7 con E2-Cy3 por 6 h en la parte de arriba a la derecha.

Debido a la tolerancia conocida de los receptores de estrógenos hacia sustituyentes en las posiciones 7α y 17α del esqueleto de estradiol, en el 2017 Osati y col.¹⁷ prepararon varios ligandos radio y fluorescentes que portaban diversas unidades en estas posiciones. En algunos casos se ha demostrado en particular que la sustitución 17α aumenta la afinidad de unión al receptor (RBA), potencia el estrógeno y reduce el metabolismo del anillo D, mejorando así la retención por los tejidos diana.

El conjugado EE2-BODIPY **57** (Figura 26) con una cadena espaciadora lineal de ocho carbonos obtuvo el RBA más alto para el ER α . Estos compuestos son prometedores para estudios de absorción celular y experimentos de formación de imágenes *in vivo*.¹⁷

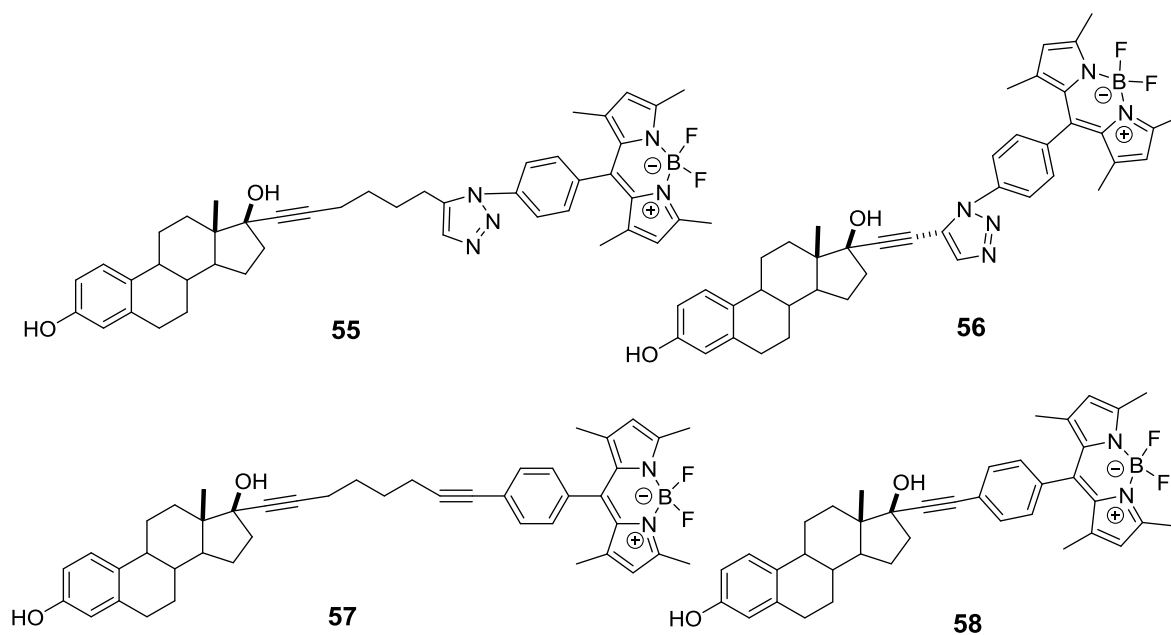


Figura 26. Conjugados EE2-BODIPYs preparados.

De lo anterior se deriva el gran interés en el estudio de la fluorescencia de los compuestos esteroidales con posible uso/aplicación como marcador tumoral, valiéndonos de que el derivado de estradiol (etinilestradiol) es el compuesto con mayor afinidad a los ER, y que grupos moderadamente voluminosos pueden ser soportados sobre el alquino terminal 17, se propone en el presente trabajo la obtención y caracterización estructural de nuevos derivados de etinilestradiol conteniendo sustituyentes en el alquino terminal 17.

3. JUSTIFICACIÓN

La fluorescencia es una propiedad que ha tenido un gran crecimiento y uso en diversas áreas, como la biotecnología, citometría de flujo, diagnóstico médico, secuenciación de ADN, forense así como en el área de materiales, específicamente en la fabricación de películas delgadas de diodos orgánicos de emisión de luz (OLEDs), sensores luminiscentes y dispositivos emisores de luz, entre otros.

Los primeros reportes de la fluorescencia de compuestos esteroidales datan de 1960,³⁸ donde se reportaron las fluorescencias de diversos estrógenos, y no fue sino hasta principios del año 2000⁴¹ cuando resurgió el interés de esta propiedad en compuestos esteroidales.

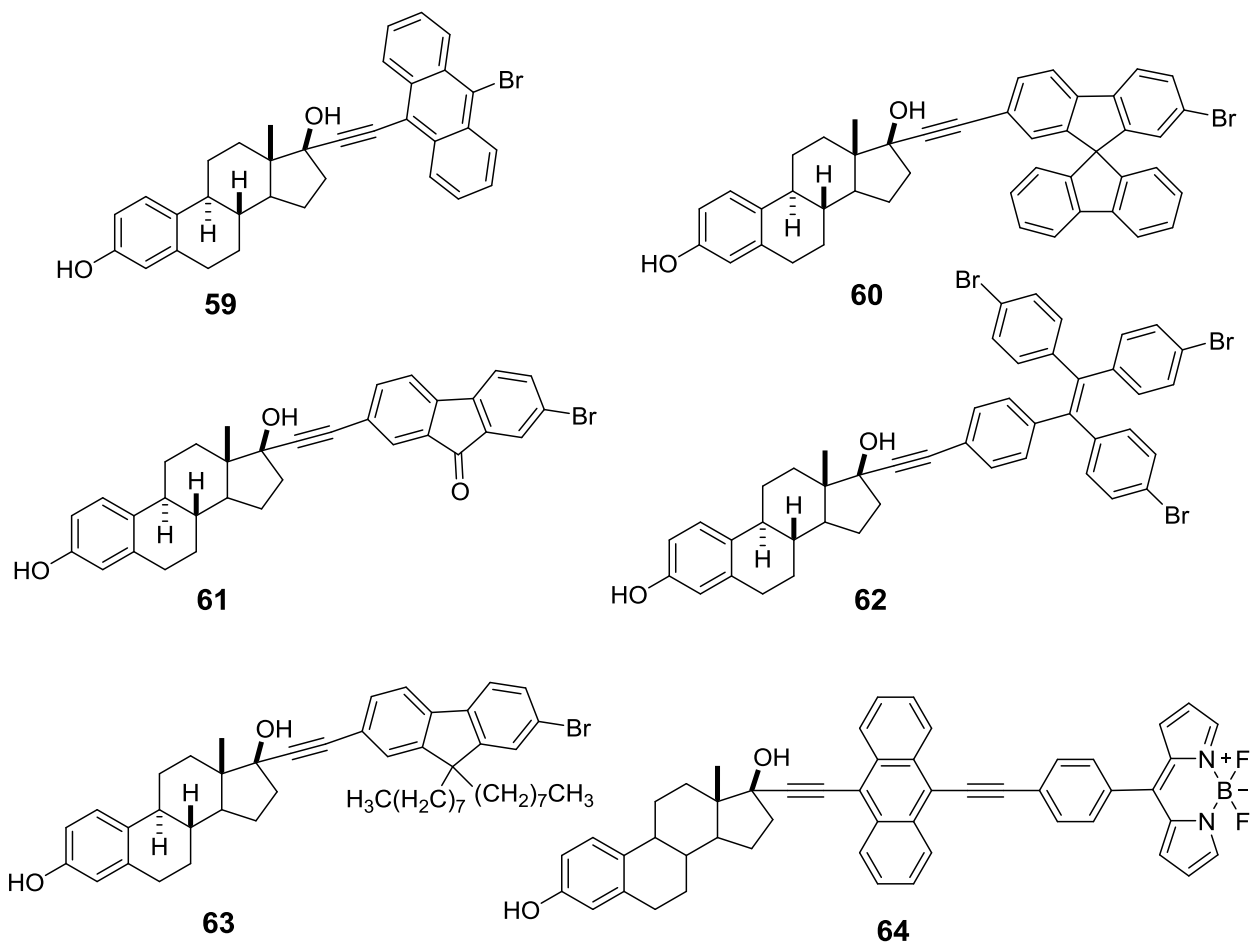
Por otra parte la afinidad de unión del estradiol a receptores estrogénicos (ERs) es una de las más altas comparadas con otros estrógenos, por lo cual diversos agentes terapéuticos y de diagnóstico han sido modificados con estradiol para estudiar la unión de estrógenos, desarrollo de fármacos específicos, así como marcadores fluorescentes.

Debido a lo anterior y considerando que los compuestos esteroidales llevan a cabo funciones reguladoras importantes, participan en varios procesos fisiológicos claves en el organismo humano, además de que la química de esteroides ha sido poco explorada en esta área, el presente proyecto consistió en el diseño y síntesis de compuestos esteroidales con potenciales propiedades luminiscentes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Sintetizar y determinar las propiedades fluorescentes de los compuestos **59-64**.



4.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar y purificar los derivados del etinilestradiol **59-64** mediante la reacción de acoplamiento de Sonogashira.
- Caracterizar los compuestos **59-64** mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar los espectros de absorción y fotoluminiscencia de los derivados **59-64**.

5. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

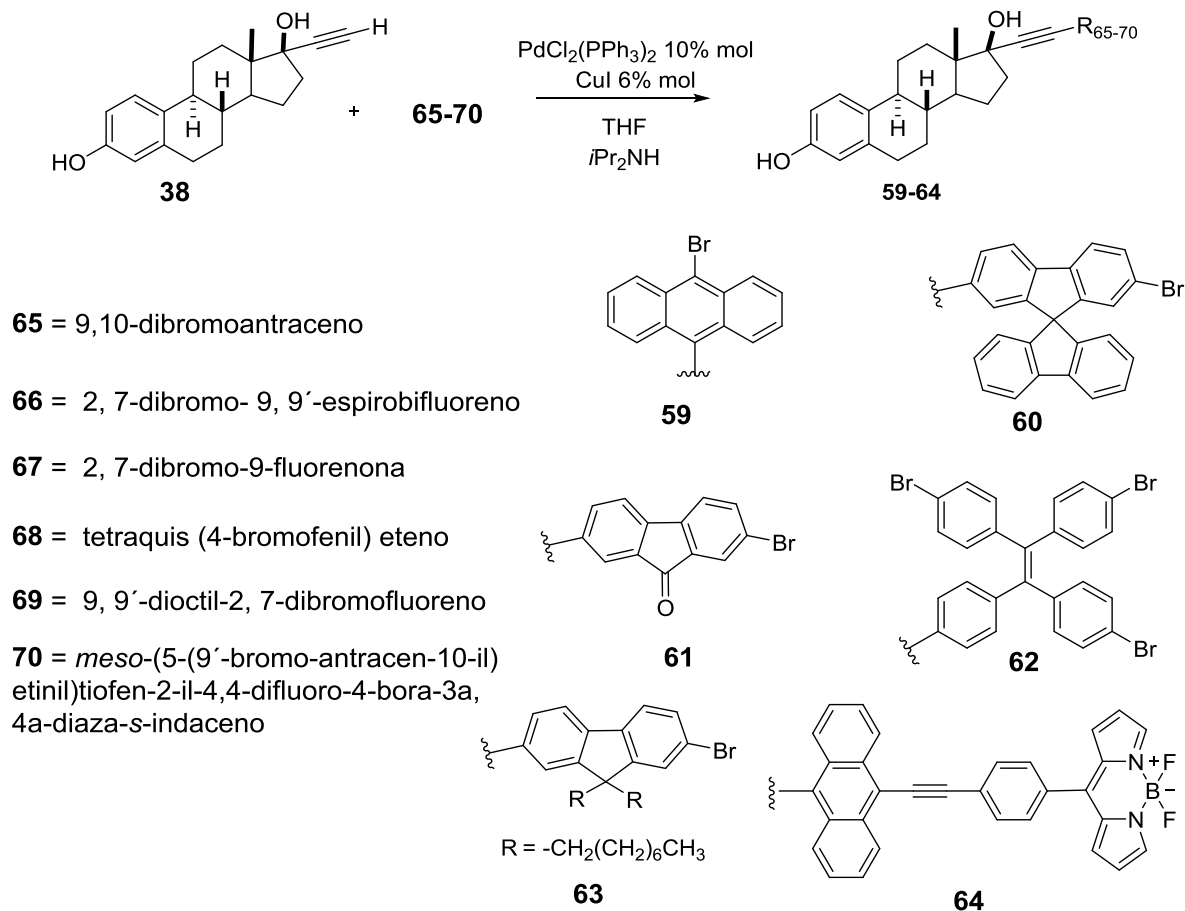
5.1 Obtención y caracterización espectroscópica de los compuestos 59-64

El etinilestradiol (**38**) es un estrógeno comercialmente disponible y ampliamente utilizado en la fabricación de anticonceptivos orales, siendo al menos 20 veces más potente que el estradiol mismo.⁴⁹

Por otra parte es conocida la tolerancia de sustituyentes voluminosos en las posiciones 7α y 17α del esqueleto del estradiol en los receptores de estrógeno, particularmente la sustitución en el carbono 17, y se ha demostrado que en ocasiones aumenta la afinidad de unión al receptor (RBA), mejora la potencia del estrógeno y reduce el metabolismo del anillo D, mejorando así la retención por tejidos diana.¹⁷

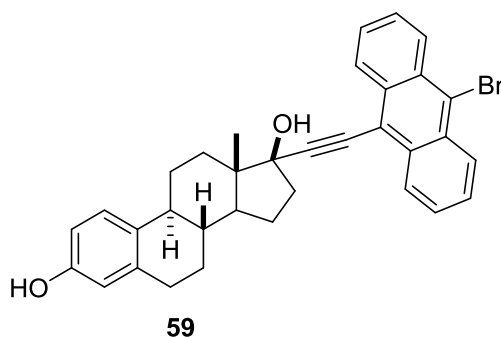
En este sentido y considerando que el etinilestradiol (**38**) presenta un alquino terminal en el carbono 17, se decidió realizar el acoplamiento de Sonogashira de este compuesto con los halogenuros de arilo, 9,10-dibromoantraceno (**65**), 2,7-dibromo- 9, 9'-espirobifluoreno (**66**), 2,7-dibromo-9-fluorenona (**67**), tetraquis(4-bromofenil)eteno (**68**), 9,9-dioctil-2,7-dibromofluoreno (**69**), meso-(5-(9'-bromo-antracen-10-il) etinil)tiofen-2-il-4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno (**70**) utilizando como catalizadores $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ y CuI(I) en presencia de $i\text{Pr}_2\text{NH}$ como base y THF en atmósfera de nitrógeno. Los compuestos se obtuvieron en rendimientos que van del 25 % al 74 %, (Esquema 2).

Los derivados esteroidales obtenidos después de su purificación mediante cromatografía en columna, se caracterizaron mediante RMN de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones. La asignación inequívoca se realizó mediante el uso combinado de los experimentos DEPT, COSY, HETCOR y HMBC, a continuación se describe la caracterización espectroscópica de los nuevos compuestos.



Esquema 2. Reacción general del acoplamiento de Sonogashira.

5.1.1 Caracterización del 17 α -(10'-bromoantraceniletinil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (59)



La obtención del compuesto **59** se realizó vía las condiciones de reacción previamente reportadas por el grupo de investigación.⁴⁸

La asignación estructural se realizó por comparación con los datos espectroscópicos previamente reportados por el grupo de trabajo. A manera de ejemplo en la Figura 27 se muestra

la comparación del espectro de hidrógeno de la materia prima **38** con el producto **59** donde se puede observar las señales características para el anillo aromático A del etinilestradiol en 7.10 ppm (1H, d, $J= 8.4$ Hz), 6.62 ppm (1H, dd, $J= 8.4$, $J= 2.7$ Hz) y 6.55 ppm (1H, d, $J= 2.7$ Hz) se asignaron a H-1, H-2 y H-4, respectivamente. La señal del hidroxilo etiquetado como 17 se observó en 4.90 ppm, mientras que la señal del metilo 18 apareció como señal simple en 1.03 ppm integrando para tres hidrógenos.

La presencia de dos señales múltiples una en 8.50 ppm que integró para cuatro hidrógenos asignada a H-1', H-4', H-5', H-8', y la otra en 7.55 ppm que integró para cuatro hidrógenos asignada a H-2', H-3', H-6' y H-7', se asignaron al fragmento aromático del antraceno además de la ausencia de la señal simple en 2.6 ppm aproximadamente que corresponde al protón del alquino terminal del etinilestradiol que confirmó que se llevó a cabo el acoplamiento.

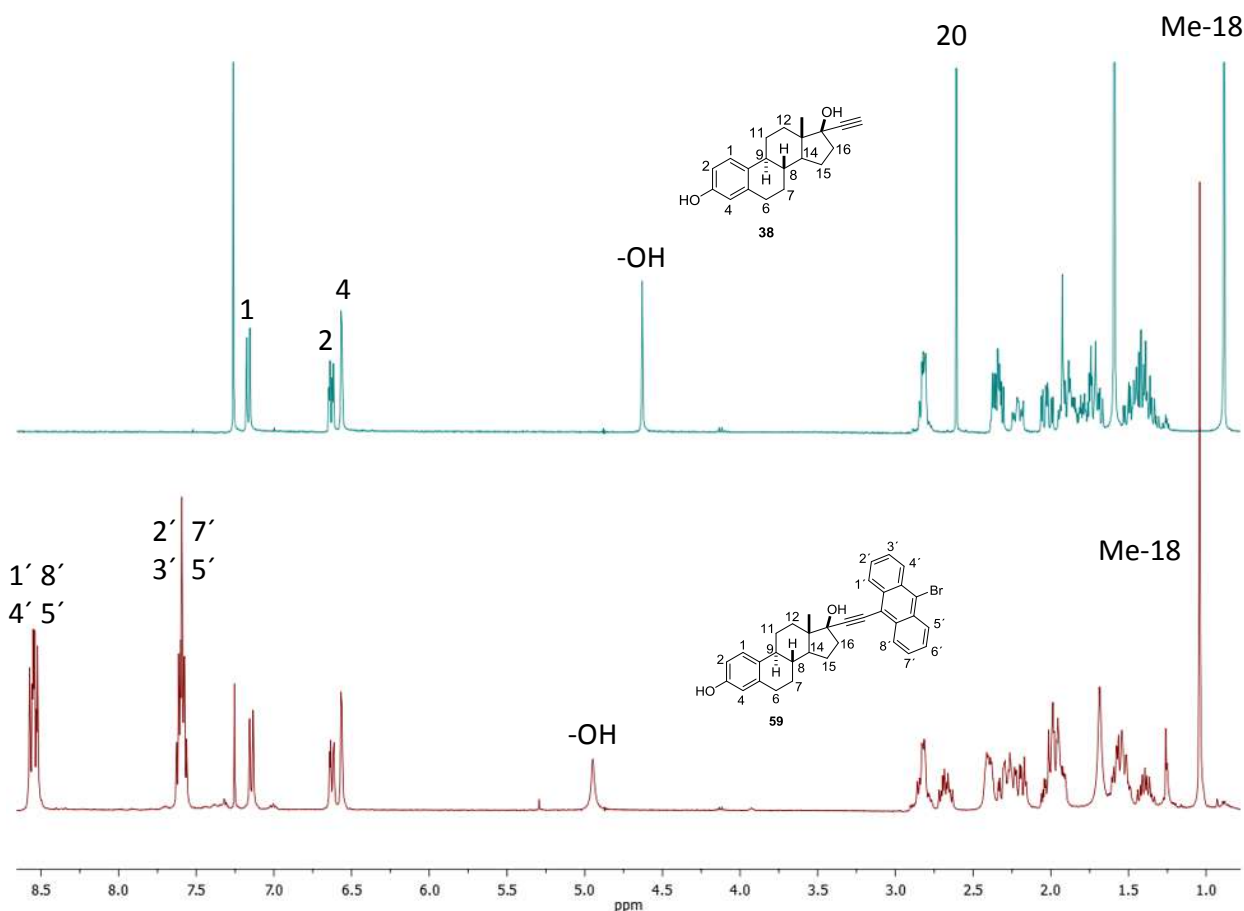
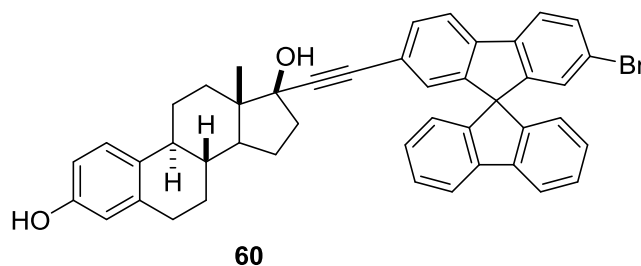


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del etinilestradiol **38** (espectro superior) y el compuesto **59** (espectro inferior) en CDCl_3 .

5.1.2 Caracterización del 17 α -(7'-bromo-9',9''-espirobifluoreniletinil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (**60**)



El compuesto **60** se obtuvo en 39% de rendimiento en forma de polvo color beige, con punto de fusión de 179-181°C, la espectroscopía de infrarrojo mostró una banda característica para el -OH en 3410 cm^{-1} , y tres bandas en 2972, 2929 y 2870 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos C-H, la espectrometría de masa de alta resolución mostró un ion $[\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{BrO}_2-\text{H}_2\text{O}]^+$ $m/z = 671.1944$.

El espectro de RMN de ^1H (Figura 28) del derivado **60** se asignó con ayuda del experimento COSY (Figura 29), se observa el patrón de desplazamiento del anillo aromático del etinilestradiol, para este caso la señal en 7.18 ppm (m, 1H) del H-1 se traslapa con los hidrógenos 16' y 11' del grupo espirobifluoreno, en 6.60 ppm (dd, $J = 8.4$, $J = 2.3$ Hz, 1H) y 6.54 ppm (s, 1H) se asignan a los H-2 y H-4. Para el fragmento del espirobifluoreno se observa una señal en 7.84 ppm (d, $J = 7.6$ Hz, 2H) que corresponde a los H-13' y H-14', en 7.74 ppm (d, $J = 8.0$ Hz, 1H) la del H-4', en 7.67 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 1H) se asigna la señal del H-5', en 7.47 ppm (dd, $J = 12.4$, 4.5 Hz, 2H) se asignaron los hidrógenos H-6' y H-3', mientras que las señales en 7.39 ppm (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.13 ppm (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 6.83 ppm (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 6.80 ppm (s, 1H) y 6.71 ppm (d, $J = 7.6$ Hz, 2H) se etiquetan a los H-15' y H-12', H-16' y H-11', H-8', H-1', y la de los H-17' y H-10', respectivamente.

Como ya se mencionó el experimento COSY (Figura 29) fue de gran importancia para la asignación de los hidrógenos del espirobifluoreno. Encontrando que la señal de los protones 13' y 14' en 7.84 ppm correlacionan con los hidrógenos vecinos 15' y 12' que se encuentran en 7.39 ppm, y estos a su vez correlacionaron con H-16' y H-11' que se hayan traslapados con la señal del H-1 en 7.13 ppm. Los H-17' y H-10' en 6.71 ppm muestran correlación con H-16' y H-11'; el H-6' en 7.47 ppm correlaciona con la señal en 7.67 ppm que corresponde al H-5', y la señal en 7.74 ppm del H-4' mostró correlación con el H-3' en 7.47 ppm, respectivamente.

El espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **60** (Figura 30) se asignó con ayuda de los experimentos HETCOR (Figura 31) y DEPT, las señales de los carbonos del fragmento etinilestradiol variaron ligeramente en cuanto a su desplazamiento. Para el carbono 9' del espirobifluoreno la señal en 131.8 ppm se asignó al C-3', la señal en 131.0 ppm se etiquetó al C-6', en 128.1 ppm se encuentran las señales de C-15' y 12', mientras que en 127.9 ppm se localizan los C-16' y C-11', la señal en 127.2 ppm corresponde al C-1' y la de 127.1 ppm al C-8', la señal en 124.0 ppm se asignó a C-17' y C-10'. Finalmente los desplazamientos en 121.5 ppm, 120.2 ppm, 119.8 ppm se etiquetaron para los C-5', C-13' y 14', y C-4', respectivamente.

La asignación de los carbonos se realizó con ayuda del experimento HETCOR (Figura 31). Encontrando que la señal de los H-13' y H-14' en 7.84 ppm correlaciona con la señal del carbono localizado en 120.2 ppm que corresponde a los C-13' y C-14', el H-4' en 7.74 ppm muestra correlación con C-4' en 119.8 ppm, el H-5' con el C-5' en 121.5 ppm, H-3' con C-3' en 131.8 ppm, el H-6' con C-6' en 131.0 ppm, los H-15' y 12' con la señal localizada en 128.1 ppm, H-16' y H-11' con la señal en 127.9 ppm de los C-16' y C-11' respectivamente; el H-8' correlacionó con C-8' en 127.1 ppm, H-1' con el C-1' en 127.2 ppm y los H-17' y H-10' con la señal en 124.0 ppm.

El experimento HMBC (Figura 32) fue de gran utilidad para la asignación de los carbonos cuaternarios de la parte del espirobifluoreno, el carbono C-5a' (139.8 ppm) correlacionó a tres enlaces de distancia con H-4' (7.74 ppm) y con H-8' (6.83 ppm); C-4a' (140.6 ppm) correlacionó con el H-5' (7.67 ppm) y con H-1' (6.80 ppm) a tres enlaces de distancia; los carbonos C-13a' y 14a' (141.6 ppm) correlacionaron con los hidrógenos H-13' y 14' (7.84 ppm) a dos enlaces de distancia, con los hidrógenos H-15' y 12' (7.39 ppm) y con los hidrógenos 17' y 10' (6.71 ppm) a tres enlaces de distancia, respectivamente; así mismo los carbonos C-10a' y 17a' (147.2 ppm) correlacionaron con H-13' y 14' (7.84 ppm), H-16' y 11' (7.13 ppm) a tres enlaces de distancia; de la misma manera el C-1a' (148.4 ppm) correlacionó con el H-4' a tres enlaces, así como el C-8a' (151.0 ppm) correlacionó con H-5' (7.67 ppm) a tres enlaces. Por otra parte, el experimento fue útil para diferenciar C-2' y C-7', ya que el C-7' (121.8 ppm) mostró una correlación a tres enlaces con H-5' en (7.67 ppm) y con el H-6' (7.47 ppm) a dos enlaces, el C-2' (122.4 ppm) correlacionó con H-4' (7.74 ppm) a tres enlaces, respectivamente.

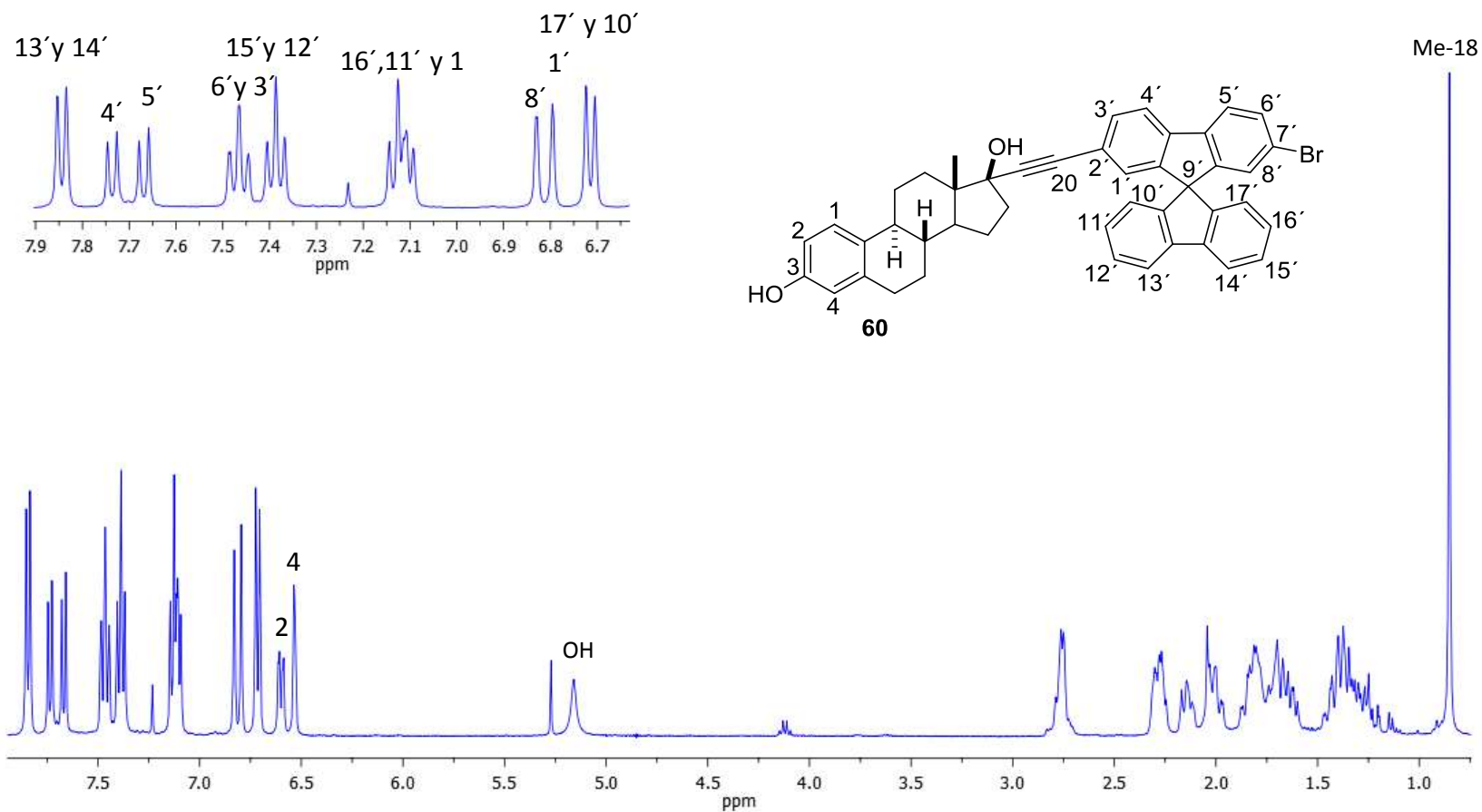


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **60**, en CDCl_3 .

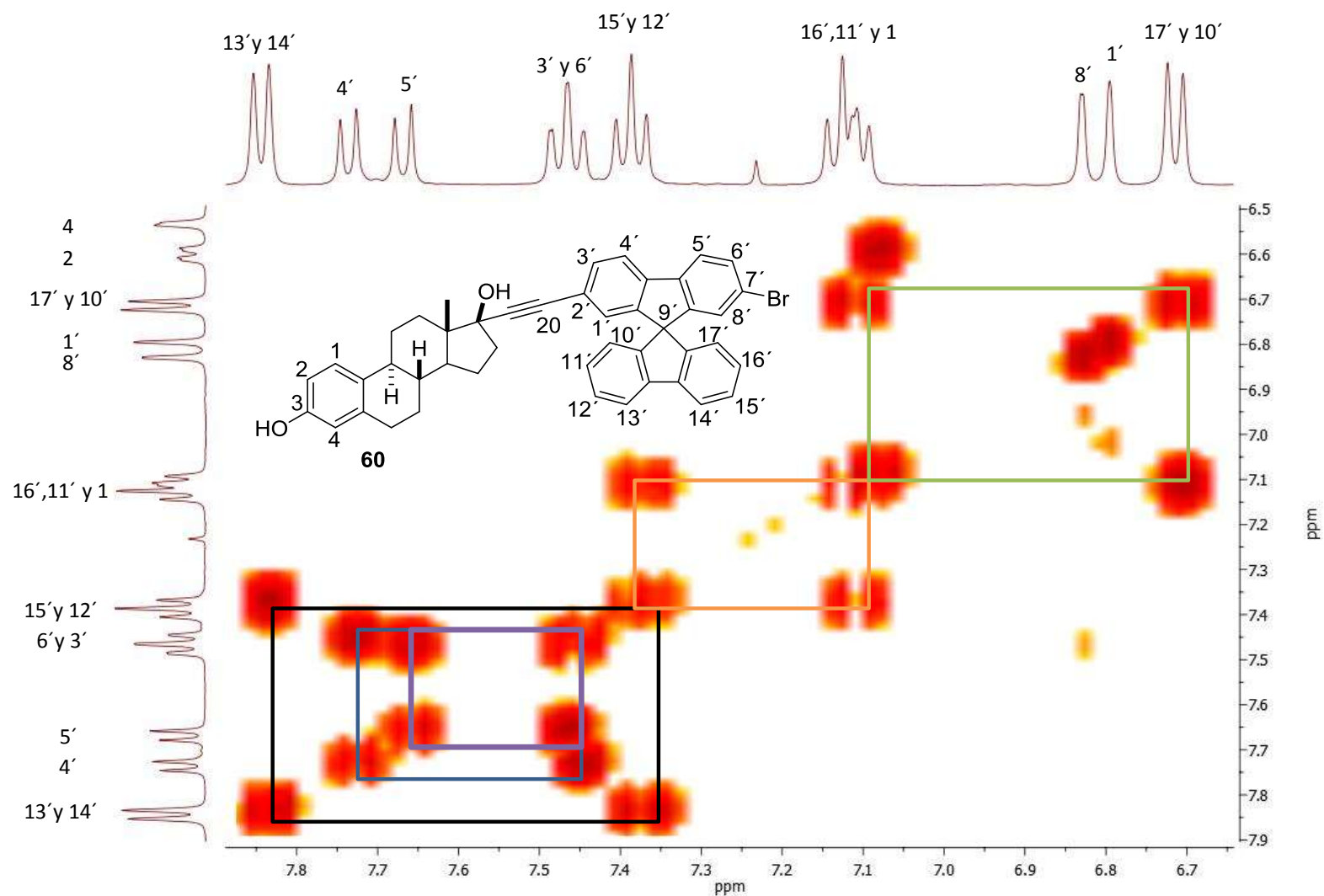


Figura 29. Experimento COSY de **60**, en CDCl_3 .

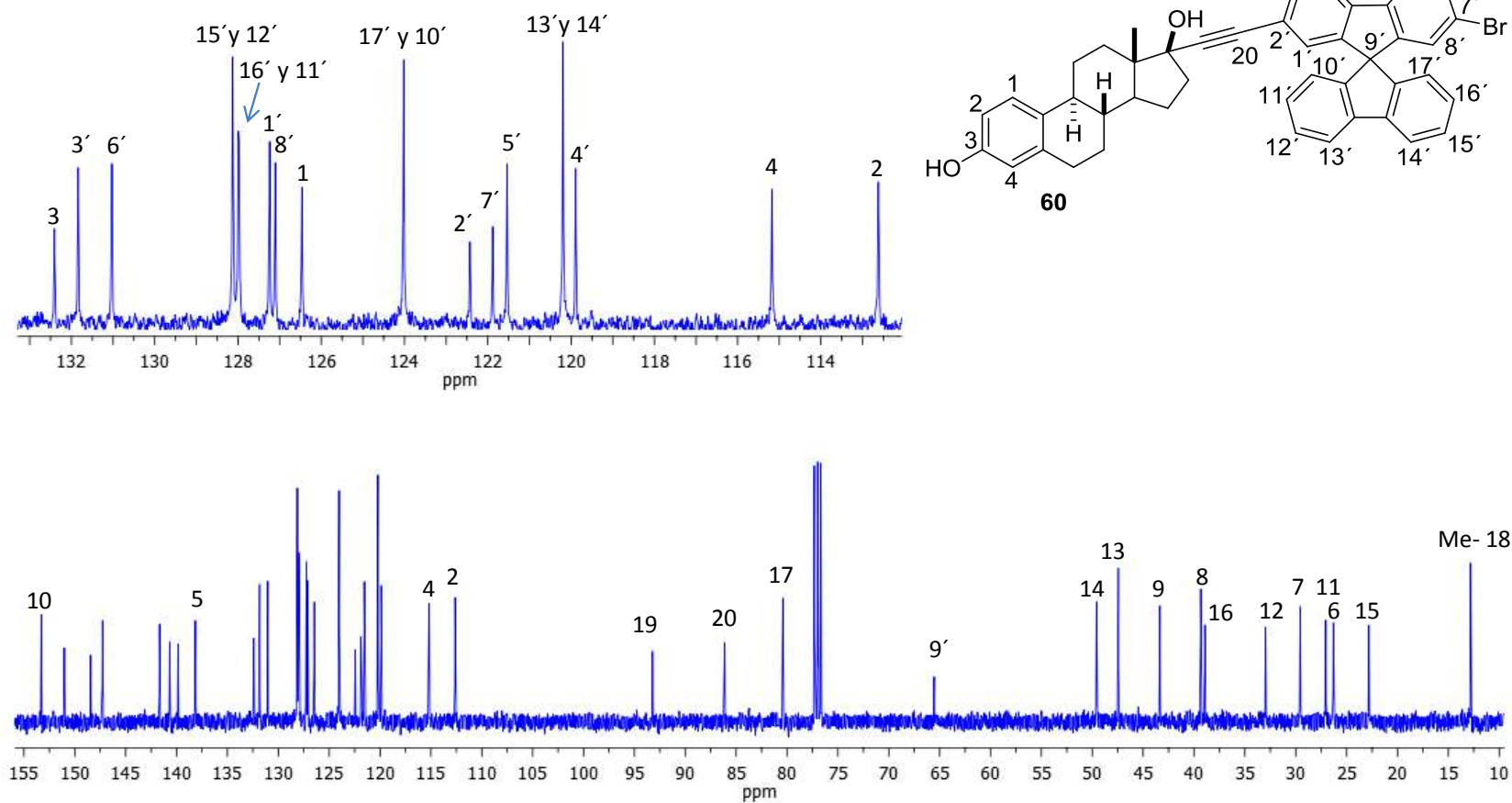


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **60**, en CDCl_3 .

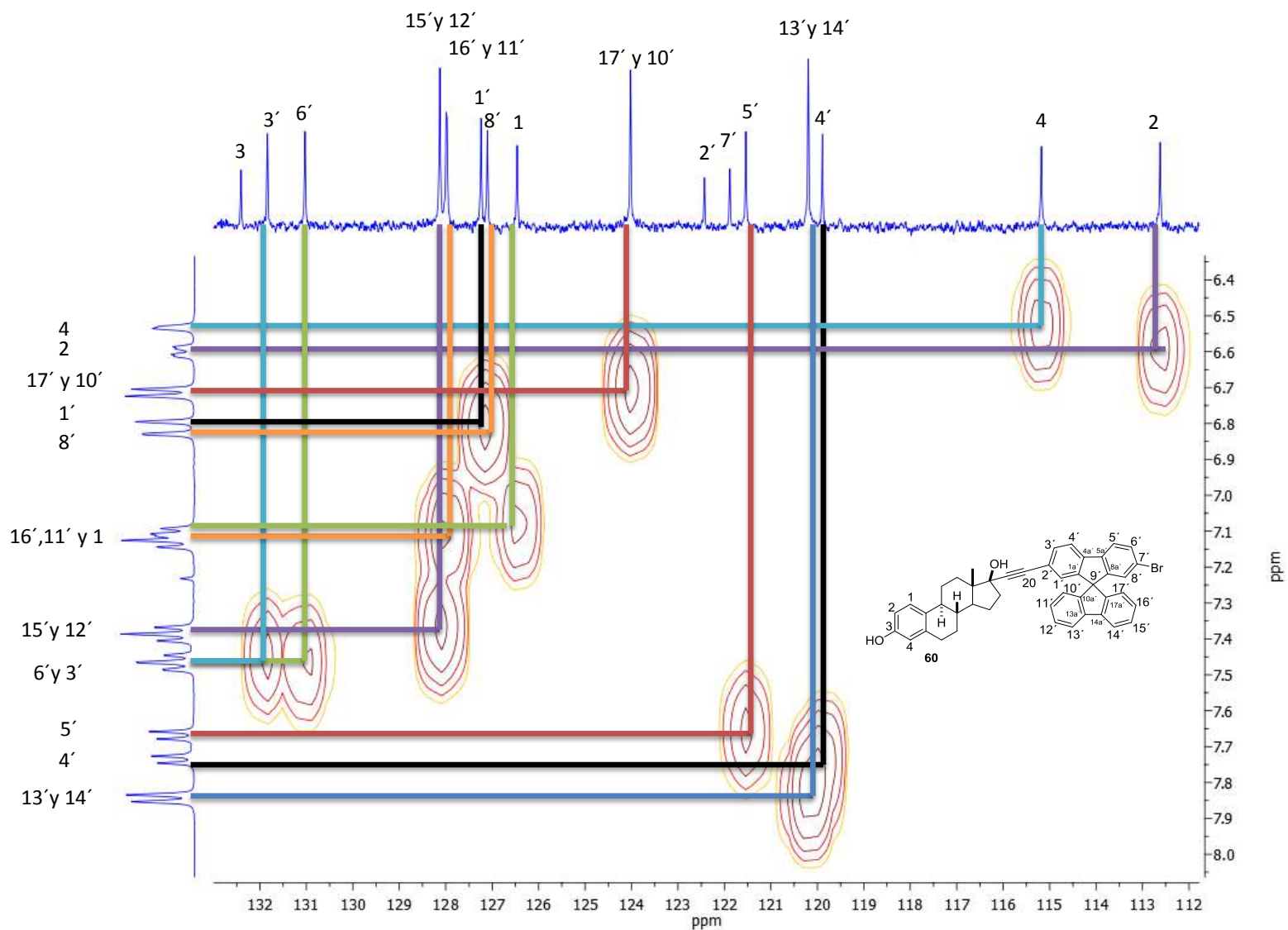


Figura 31. Experimento HETCOR de **60**, en CDCl_3 .

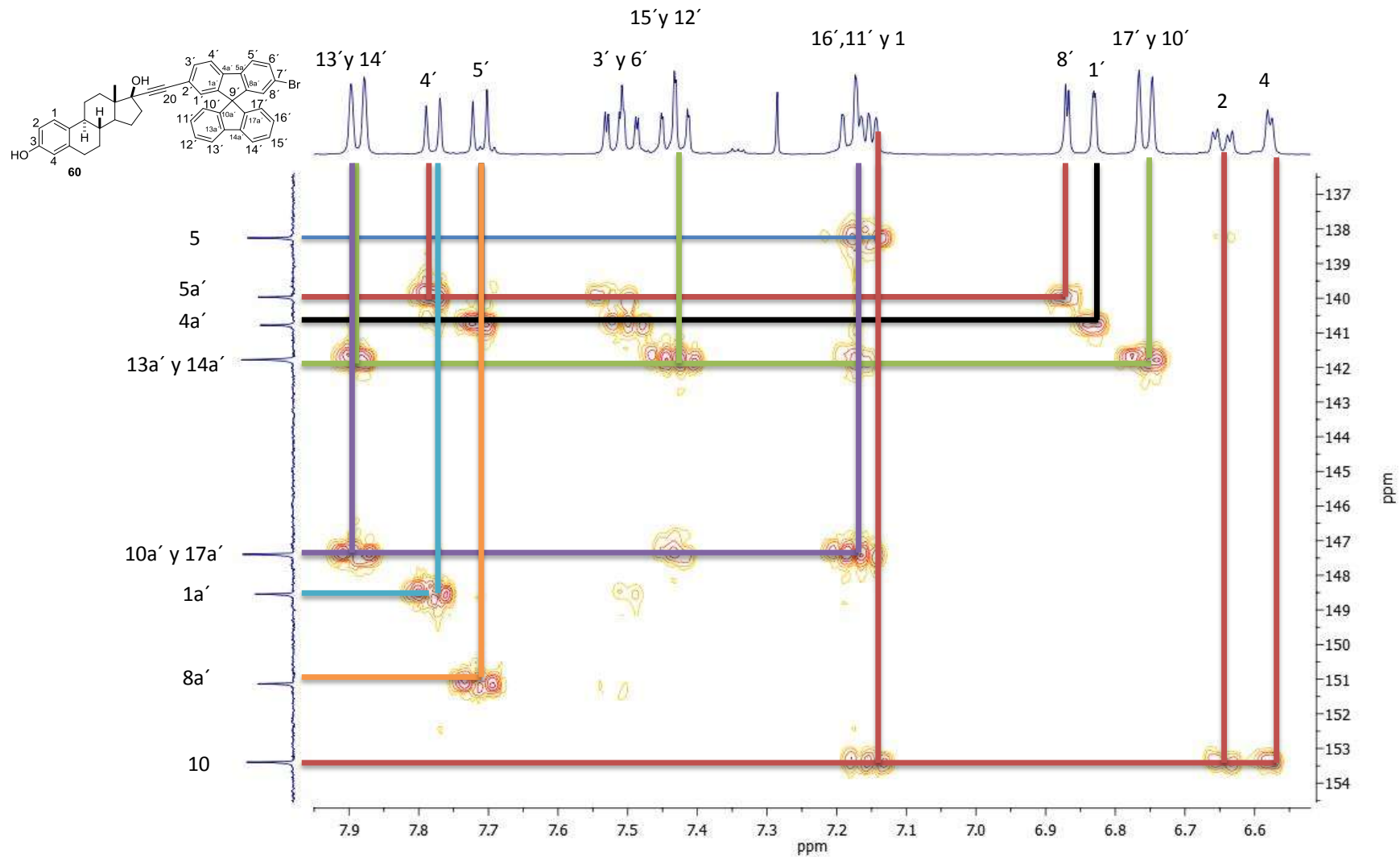
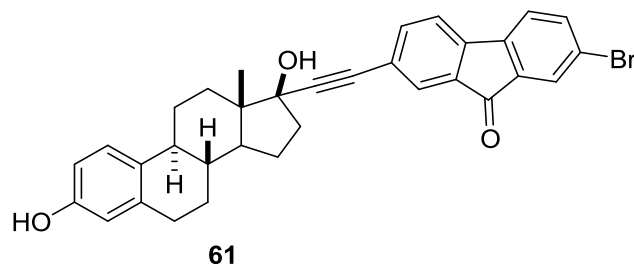


Figura 32. Espectro HMBC de **60**, en CDCl_3 .

5.1.3 Caracterización del 17 α -(7'-dibromo-9'-fluorenona etinil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (61)



El compuesto **61** se obtuvo en un 41% de rendimiento, como un polvo naranja intenso con punto de fusión de 155-158 °C, el IR mostró bandas de estiramiento características para -OH en 3370 cm⁻¹ y en 1613 cm⁻¹ para el C=O, la espectrometría de masa de alta resolución mostró un ion molecular de 535.1270 [C₃₃H₂₈BrO₂ -H₂O]⁺ *m/z*.

El espectro de RMN de ¹H (Figura 33) de **61** se asignó con ayuda del experimento COSY (Figura 34) y se observan las señales que corresponden al anillo aromático A del etinilestradiol. Para el fragmento de la fluorenona las señales en 7.77 ppm (m, 1H) se asignaron a H-1', en 7.71 ppm (dd, *J* = 1.5, 0.6 Hz, 1H) la del H-8', en 7.63 ppm (dd, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H) se asignó la del H-3', en 7.57 ppm (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H) la de H-6', en 7.46 ppm (dd, *J* = 7.7, 0.6 Hz, 1H) se etiquetó el H-5' y en 7.39 ppm (dd, *J* = 7.9, 0.4 Hz, 1H) el H-4'.

El experimento COSY (Figura 34) fue de gran ayuda principalmente para la asignación de los hidrógenos los del grupo fluorenona, en el espectro se observó una correlación en 7.63 ppm del H-3' con el H-4' en 7.39 ppm, y otra correlación del H-6' localizado en 7.57 ppm con el H-5' en 7.46 ppm.

El espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de **61** (Figura 35) se asignó con ayuda del experimento HETCOR (Figura 36) y DEPT, de tal forma que en 191.6 ppm se asignó la señal para el grupo -C=O, la señal en 153.3 ppm se etiquetó al C- 10 del etinilestradiol, las señales en 138.0 ppm, 137.3 ppm, 127.7 ppm, 127.6 ppm, 121.9 ppm, y 120.3 ppm, se etiquetaron a los C- 6', C-3', C-1', C-8', C-4', y C-5' del sustituyente fluorenona .

El experimento HETCOR (Figura 36) fue de gran utilidad para asignar algunos carbonos del grupo fluorenona con sus respectivos hidrógenos, por ejemplo se observó que los C-1' y C-8' que

se encuentran casi traslapados en 127.7 ppm y 127.6 ppm correlacionan con los H-1' y H-8', la señal de H-3' en 7.63 ppm correlacionó con la señal del C-3' en 137.3 ppm; H-6' en 7.57 ppm correlacionó con la señal en 138.0 ppm del C-6', H-5' en 7.46 ppm con C-5' en 120.3 ppm, y el H-4' en 7.39 ppm mostró correlación con el C-4' en 121.9 ppm, respectivamente.

Así mismo el experimento HMBC de **61** (Figura 37) resultó particularmente útil en la asignación de los carbonos cuaternarios cabeza de puente del fragmento de la fluorenona; por ejemplo: el carbono C-5a' (143.0 ppm) correlacionó a tres enlaces con H-8' (7.69 ppm) y a tres enlaces con H-6' (7.56 ppm) y H-4' (7.38 ppm); C-4a' (142.6 ppm) mostró correlaciones a tres enlaces con H-1' (7.76 ppm), con H-3' (7.61 ppm) y H-5' (7.44 ppm); el C-1a' (135.9 ppm) correlacionó a tres enlaces con H-4' (7.38 ppm); C-8a' (133.7 ppm) mostró correlación a tres enlaces con H-5' (7.44 ppm). Por otra parte el experimento HMBC fue útil para diferenciar C-2' y C-7', ya que el C-7' (124.3 ppm) mostró una correlación a tres enlaces con H-5' en (7.44 ppm) y el C-2' (123.4 ppm) correlacionó con H-4' (7.38 ppm) a tres enlaces y con el H-1' (7.76 ppm) a dos enlaces, respectivamente.

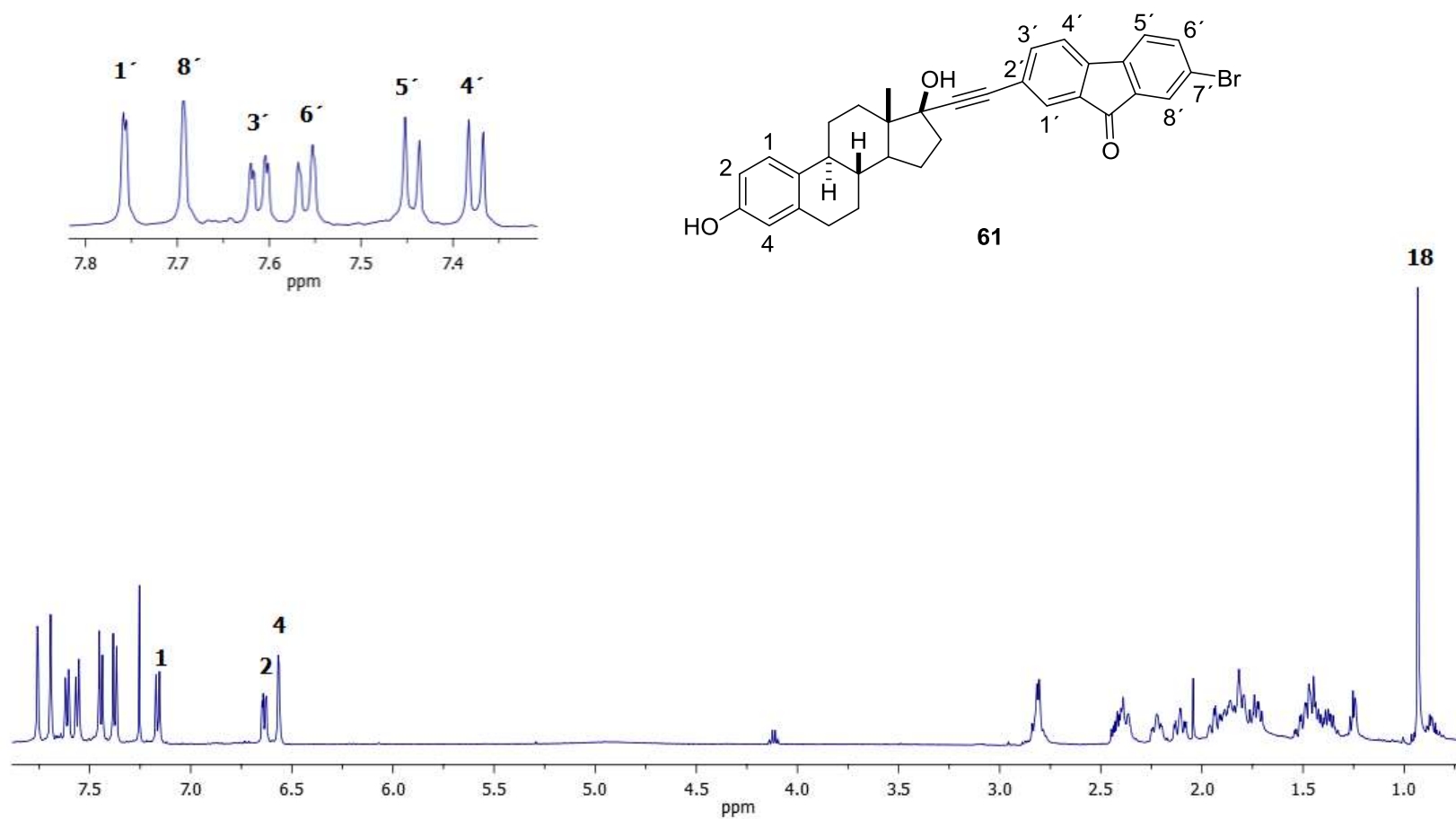


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **61**, en CDCl_3 .

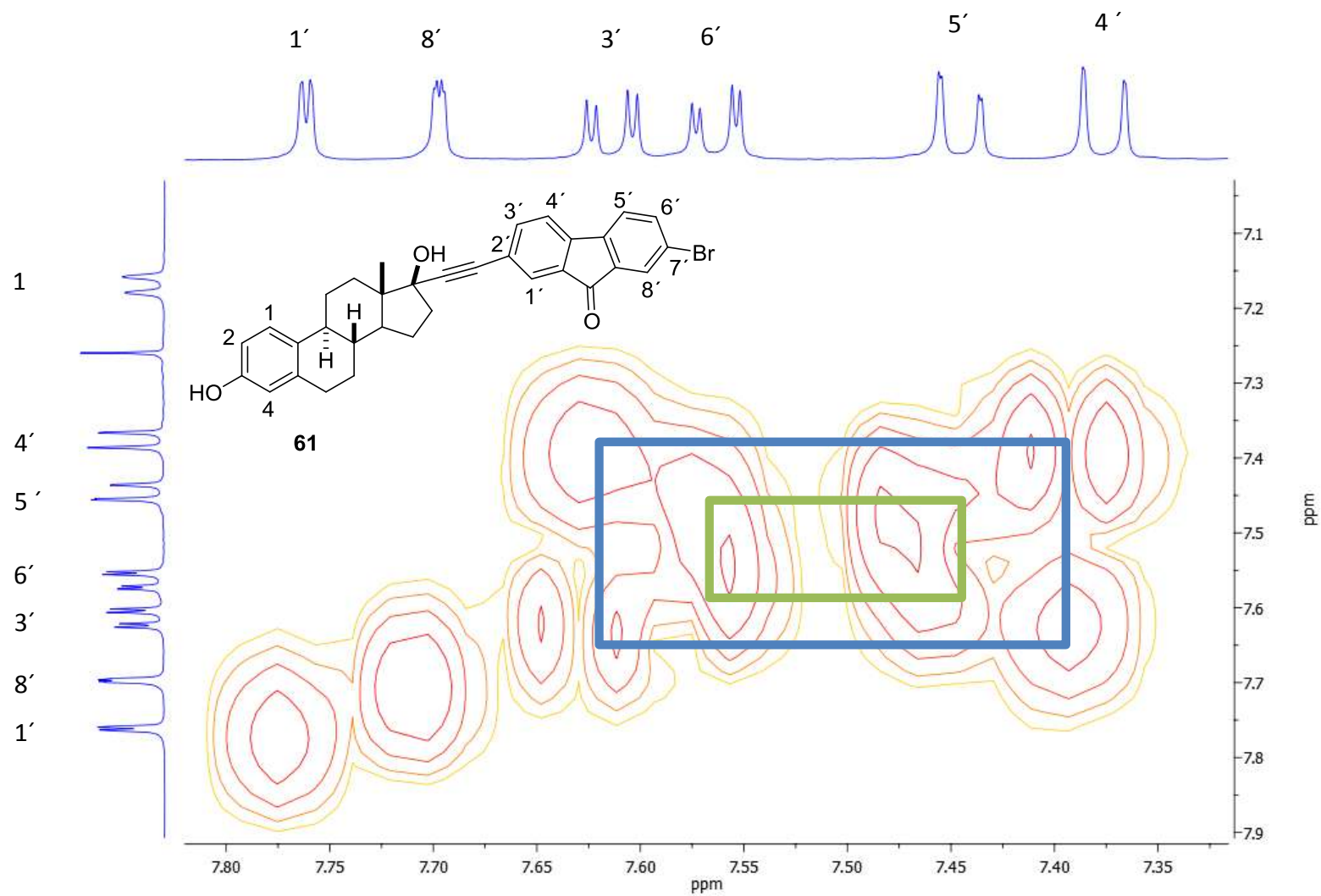


Figura 34. Experimento COSY de **61**, en CDCl_3 .

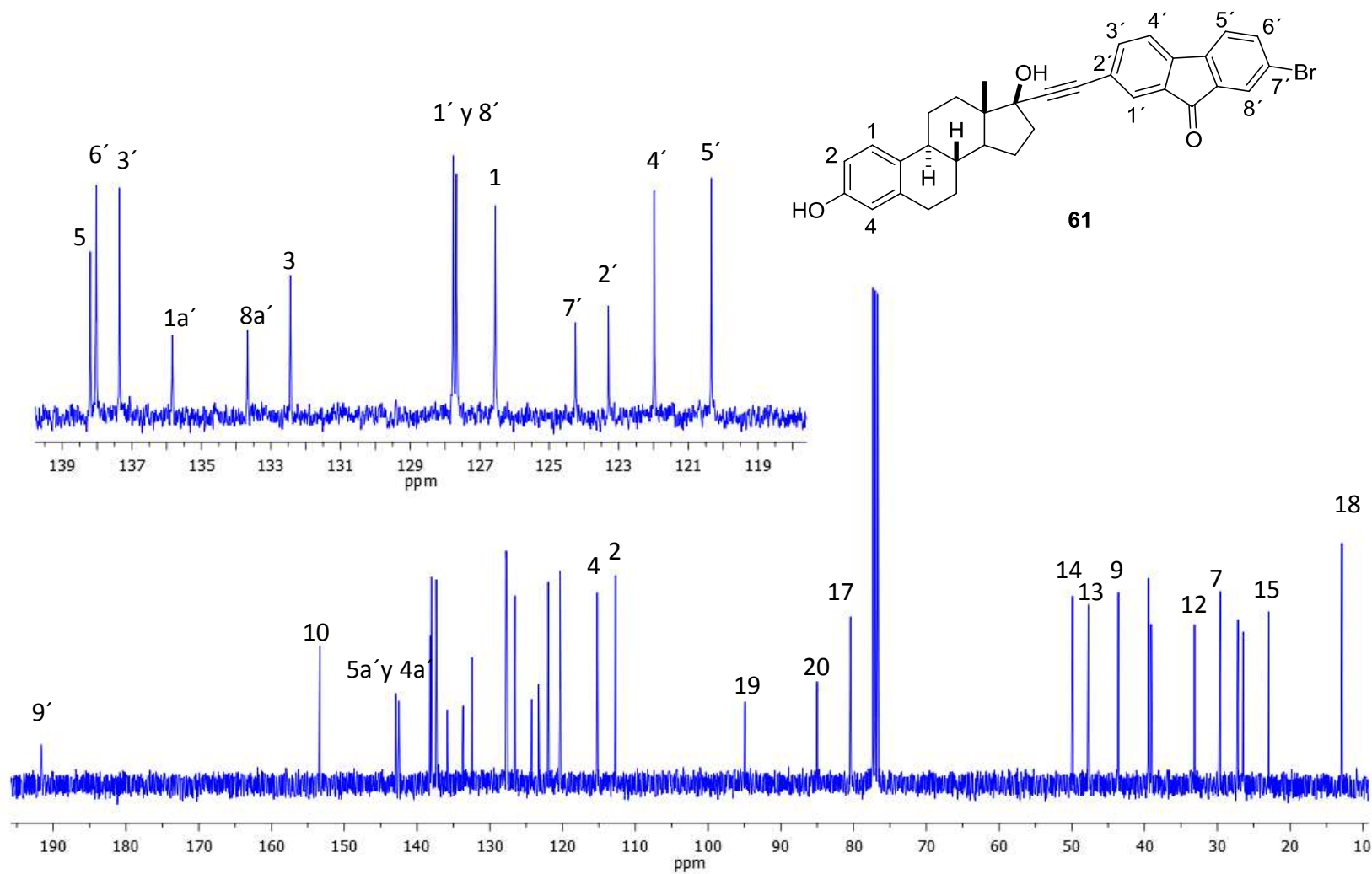


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **61**, en CDCl_3 .

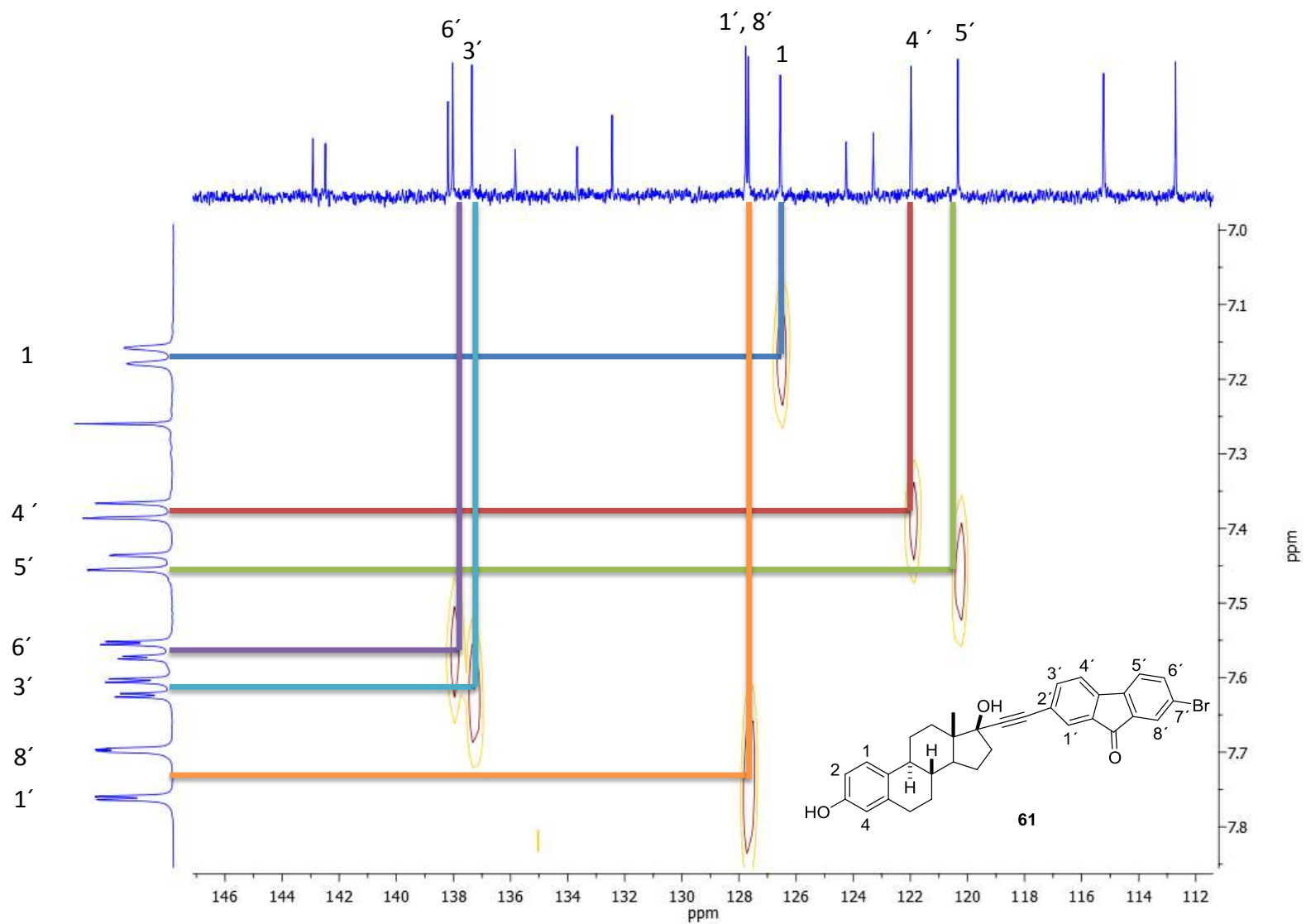


Figura 36. Experimento HETCOR de **61**, en CDCl_3 .

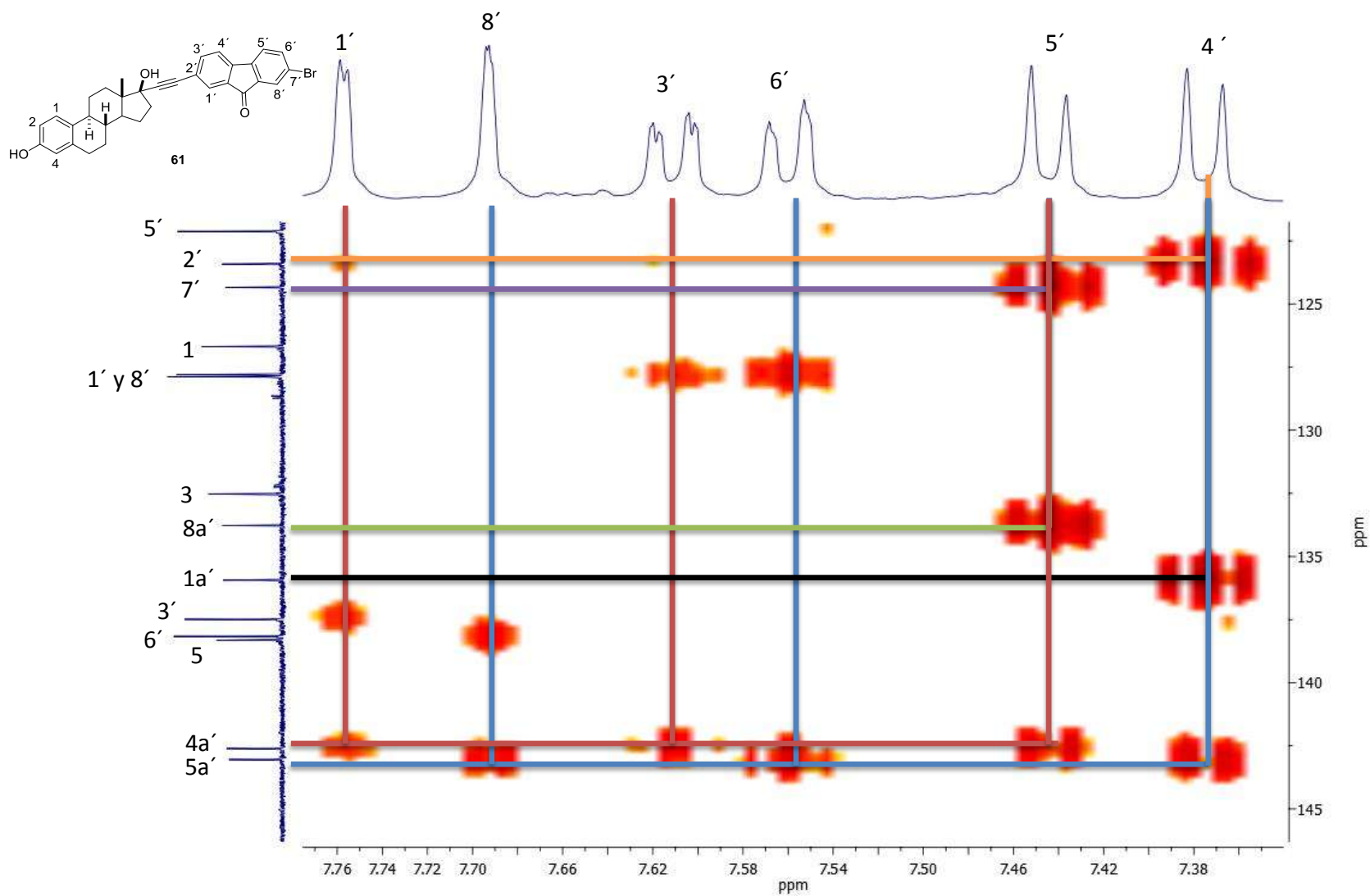
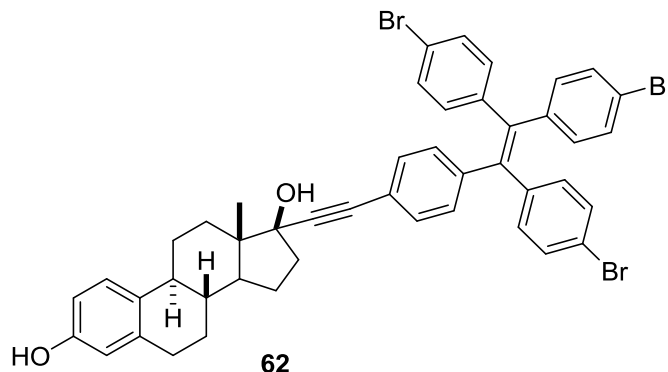
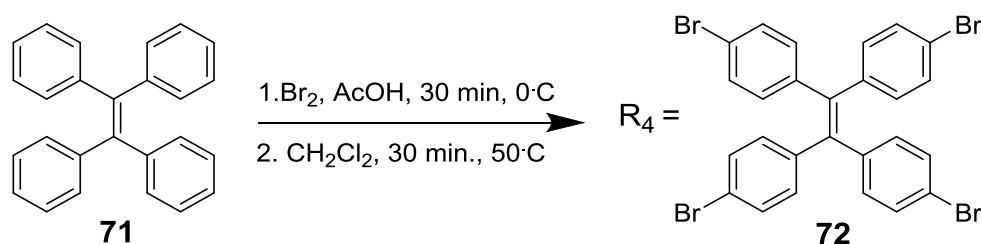


Figura 37. Espectro HMBC de **61**, en CDCl₃.

5.1.4 Caracterización del 17 α -[(5',6',6'-tris (10'-bromofenil)vinil)feniletinil] estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (62)



Para la obtención del compuesto **62** se procedió a preparar el derivado **72** en las condiciones de reacción mostradas en el esquema 3, el producto se obtuvo en 74% de rendimiento después de su purificación mediante filtración y lavados con H₂O/ MeOH.



Esquema 3. Obtención del compuesto **72**.

En la figura 38 se muestran los espectros de RMN de **71** y **72**, observando que a diferencia del producto **72** en la materia prima **71** hay dos señales múltiples en los rangos de 7.11 ppm a 7.06 ppm y otra de 7.05 ppm a 7.00 ppm. Para el derivado bromado **72** se observa un cambio significativo en el desplazamiento químico de las dos señales en comparación con la materia prima, además de observar otro cambio en la multiplicidad de las señales que aparecen en el rango de 7.28 ppm a 7.24 ppm y en 6.87 ppm a 6.82 ppm. Los espectros de ambos compuestos corresponden con los descritos en la literatura.⁵²

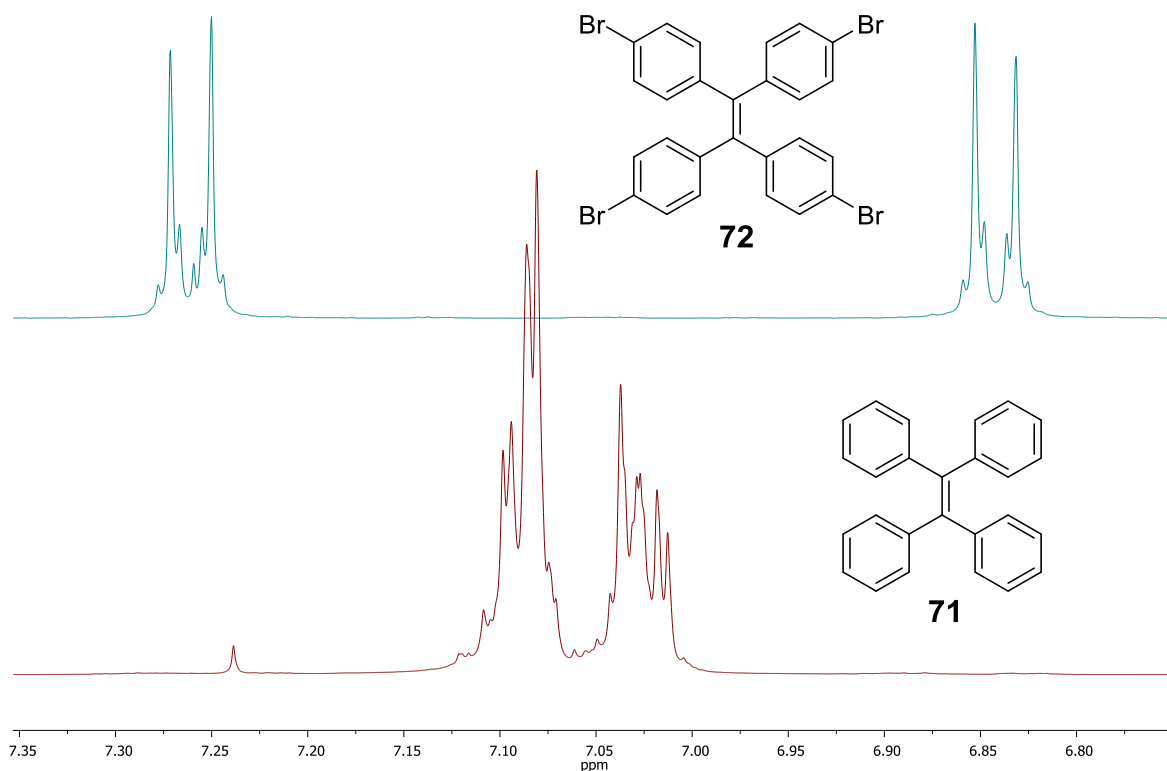


Figura 38. Comparación de los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) de **71** y **72** en CDCl_3 .

Posteriormente el derivado **72** se hizo reaccionar con **38** mediante la metodología previamente descrita; a reflujo durante 8 h., obteniéndose el compuesto **62** en 33% de rendimiento en forma de polvo amarillo, con punto de fusión de 154-158 °C, la espectroscopia de infrarrojo mostró la banda de estiramiento característica de -OH en 3415 cm^{-1} , así como tres bandas de estiramiento C-H en 2972 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} , la espectrometría de masa de alta resolución mostró un ion molecular $[\text{C}_{46}\text{H}_{39}\text{Br}_3\text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}]^+ m/z = 843.0471$.

En el espectro de RMN de ^1H de **62** (Figura 39) se observa el mismo patrón que en derivados anteriores para los desplazamientos de las señales del anillo aromático A del etinilestradiol. Para el fragmento tetrafenilo se observó una señal múltiple de 7.28 ppm a 7.18 ppm (m, 8H) que corresponde a los H-3' y H-8'; en 6.92 ppm (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 2H) y 6.84 ppm (m, 6H) se asignaron las señales de los hidrógenos H-2' y H-9' respectivamente.

El experimento COSY (Figura 40) se utilizó para la asignación inequívoca de los hidrógenos del fragmento tetrafenilo, por ejemplo, la señal múltiple localizada en el rango de 7.28 ppm a 7.18 ppm que integra para 8 hidrógenos correlaciona con la señal en 6.84 ppm que integra para 6

hidrógenos, asignándose a los H-8' y H-9' respectivamente; la señal localizada en 6.92 ppm correspondiente a los H-2' correlaciona con la señal traslapada en el rango de 7.28 ppm a 7.18 ppm del H-3'.

Con ayuda de los experimentos HETCOR (Figura 42) y DEPT se asignó el espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **62** (Figura 41), el fragmento etinilestradiol se determinó por comparación con los datos ya reportados en el grupo de investigación. Para el grupo tetrafenilo la señal en 132.7 ppm se asignó a los C-9', en 131.2 ppm se asignaron los C-3' y C-8', y la señal en 131.0 ppm corresponde a los C-2'.

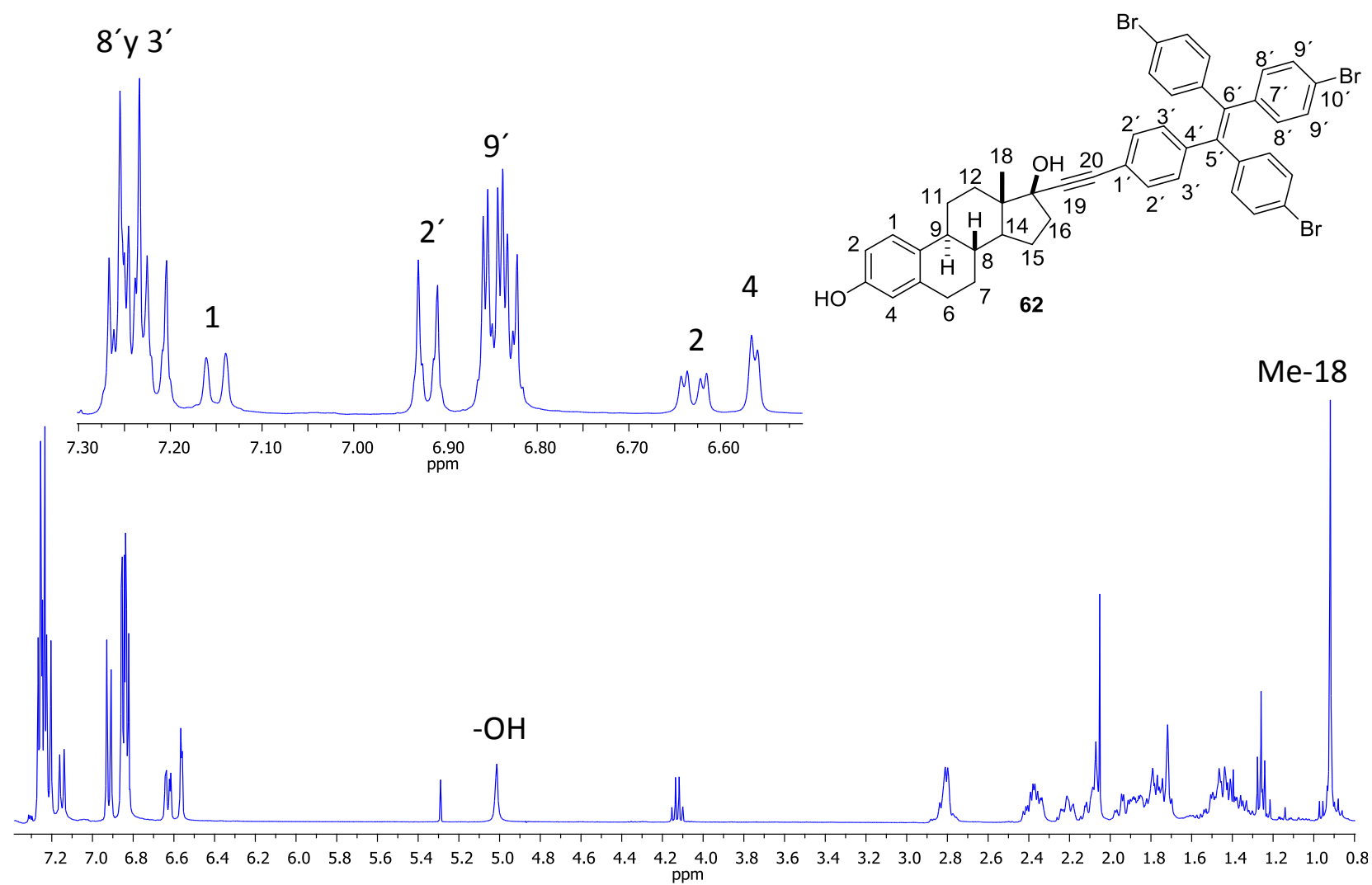


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **62**, en CDCl_3 .

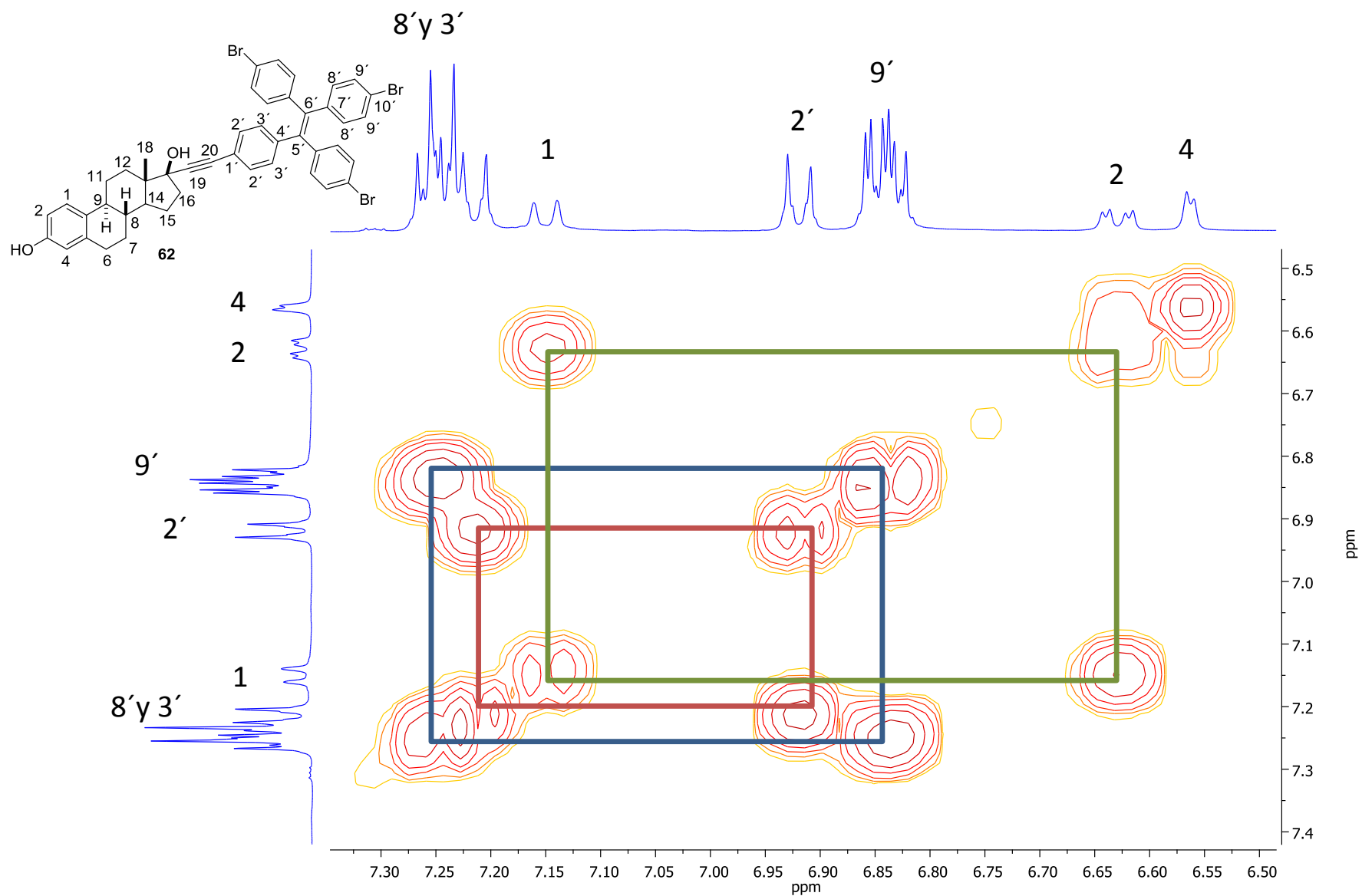


Figura 40. Experimento COSY de **62**, en CDCl_3 .

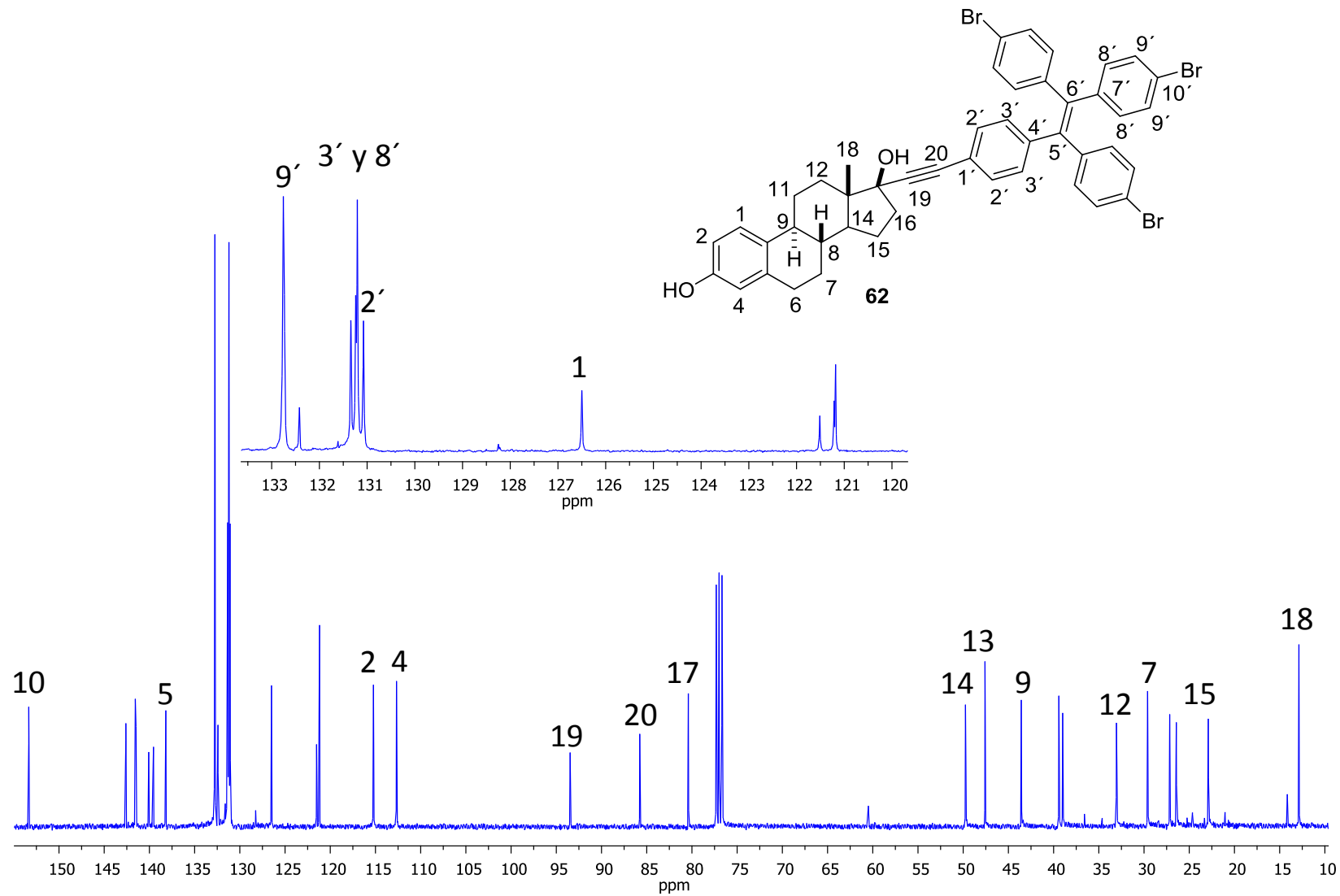


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **62**, en CDCl_3 .

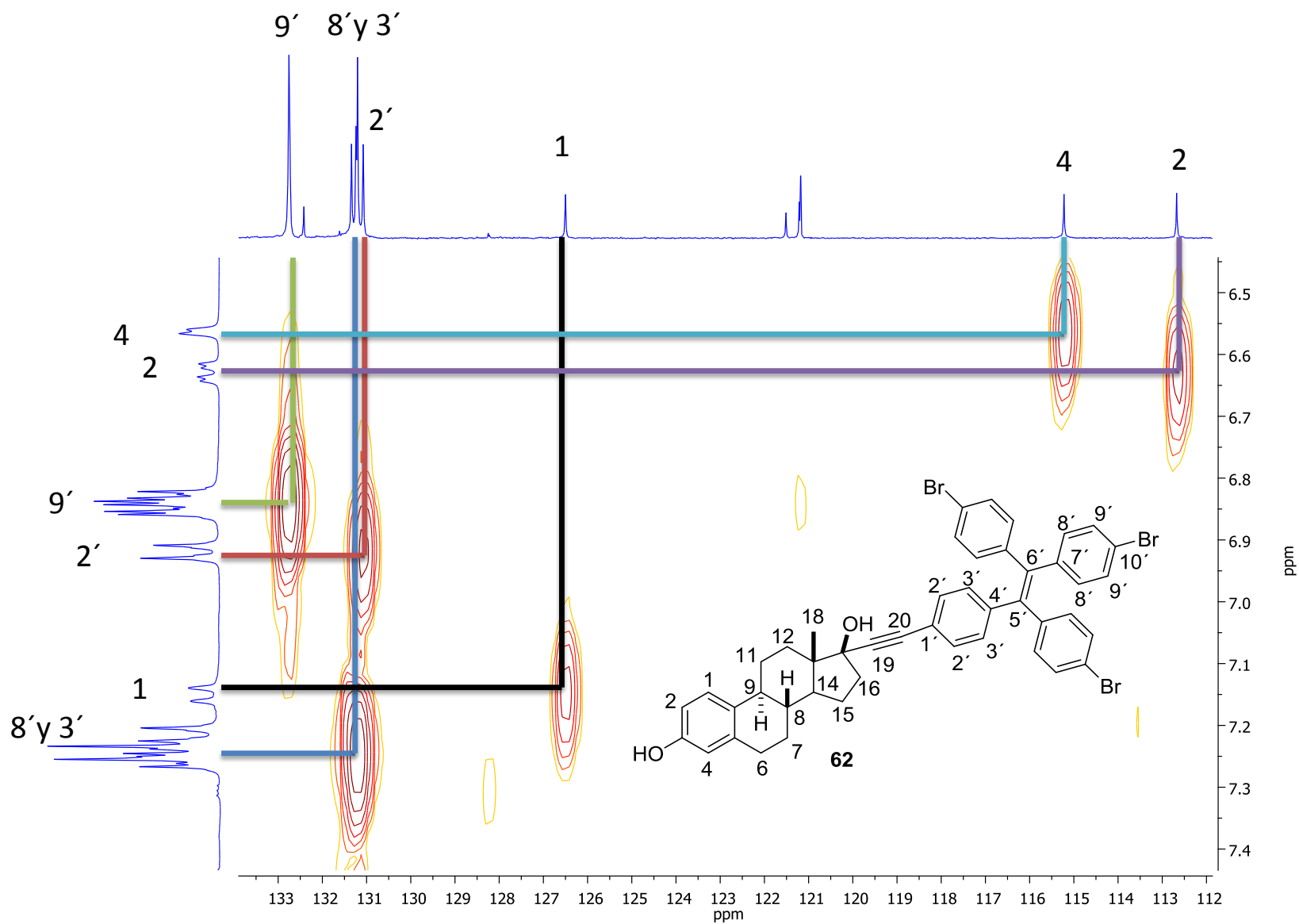
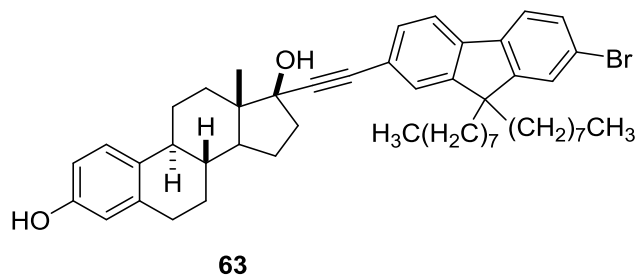


Figura 42. Experimento HETCOR de **62**, en CDCl_3 .

5.1.5 Caracterización del 17 α -(9',9'-dioctil,7'-dibromofluorenilfenil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (63)



El compuesto **63** se obtuvo en 48% de rendimiento mediante la metodología previamente desarrollada en el grupo de trabajo.⁴⁸ El producto se obtuvo en forma de polvo café claro, con un punto de fusión de 43-45 °C, la espectroscopia de infrarrojo mostró la banda de estiramiento en 3368 cm⁻¹ característica para -OH y dos bandas en 2925 y 2853 cm⁻¹ características de estiramiento C-H, la espectrometría de masa de alta resolución mostró un ion molecular de 745.3976 *m/z* [C₄₉H₆₂BrO -H₂O]⁺.

El espectro de RMN de ¹H (Figura 43) se asignó con ayuda del experimento COSY; el espectro muestra las señales características del anillo A aromático del etinilestradiol en 7.18 ppm (d, *J*= 8.4 Hz, 1H), 6.64 ppm (dd, *J*= 8.4, *J*= 2.75 Hz, 1H) y 6.57 ppm (d, *J*= 2.75 Hz, 1H) que se asignaron a H-1, H-2 y H-4, la sustitución del grupo dioctilfluoreno se confirmó por la aparición de las señales en: 7.59 ppm (d, *J*=7.8Hz, 1H) para H-4', 7.53 ppm (d, *J*= 8.5 Hz, 1H) del H-5', 7.44 ppm (m, 2H) de los H-6' y 8', 7.40 ppm (dd, *J*= 7.8, 1.4 Hz, 1H) para el H-3' y 7.38 ppm (d, *J*= 0.7 Hz, 1H) del el H-1'.

El experimento COSY (Figura 44) fue de gran ayuda principalmente para la asignación de los hidrógenos del grupo dioctilfluoreno, en el espectro se observó una correlación en 7.62 ppm del H-4' con el H-3' en 7.45 ppm, y otra correlación del H-5' localizado en 7.56 ppm con el H-6' en 7.49 ppm.

El espectro de RMN de ¹³C de **63** (Figura 45) se asignó con ayuda de los experimentos HETCOR (Figura 46) y DEPT. La asignación del fragmento etinilestradiol también se realizó por comparación con las señales de otros análogos previamente reportados en el grupo de investigación,⁵¹ observando ligeras variaciones en cuanto al desplazamiento químico del carbono para este fragmento. En relación al sustituyente 9',9' dioctilfluoreno, la señal del carbono 3' ese

asignó en 130.9 ppm, mientras que las señales en 130.0 ppm, 126.1 ppm, 125.8 ppm, 121.3 ppm y 119.5 ppm se asignaron a los C-8', C-6', C-1', C-5' y C-4', respectivamente. Para las cadenas alifáticas sustituidas en el carbono 9' del fluoreno se observaron señales de los metilenos en 40.1 ppm, 31.7 ppm, 29.8 ppm, 29.1 ppm, 23.6 ppm, y 22.5 ppm; en 14.0 ppm se observó la señal para los dos metilos terminales de este fragmento.

El experimento HMBC de **63** (Figura 47) fue de gran ayuda para la asignación de los carbonos cuaternarios cabeza de puente del fragmento del dioctilfluoreno; por ejemplo: el carbono C-5a' (139.3 ppm) correlacionó a tres enlaces con los H-8' (7.49 ppm) y con H-4' (7.62 ppm); C-4a' (140.2 ppm) mostró correlaciones a tres enlaces con H-1' (7.41 ppm), con H-5' (7.56 ppm); el C-1a' (150.4 ppm) correlacionó a tres enlaces con H-4' (7.62 ppm); C-8a' (153.2 ppm) mostró correlación a tres enlaces con H-5' (7.56 ppm). Por otra parte el experimento fue útil para diferenciar C-2' y C-7', ya que el C-7' (121.5 ppm) mostró una correlación a dos enlaces con H-6' en (7.49 ppm) y a tres enlaces con el H-5' (7.56 ppm) y el C-2' (121.6 ppm) correlacionó con H-4' (7.62 ppm) a tres enlaces, respectivamente.

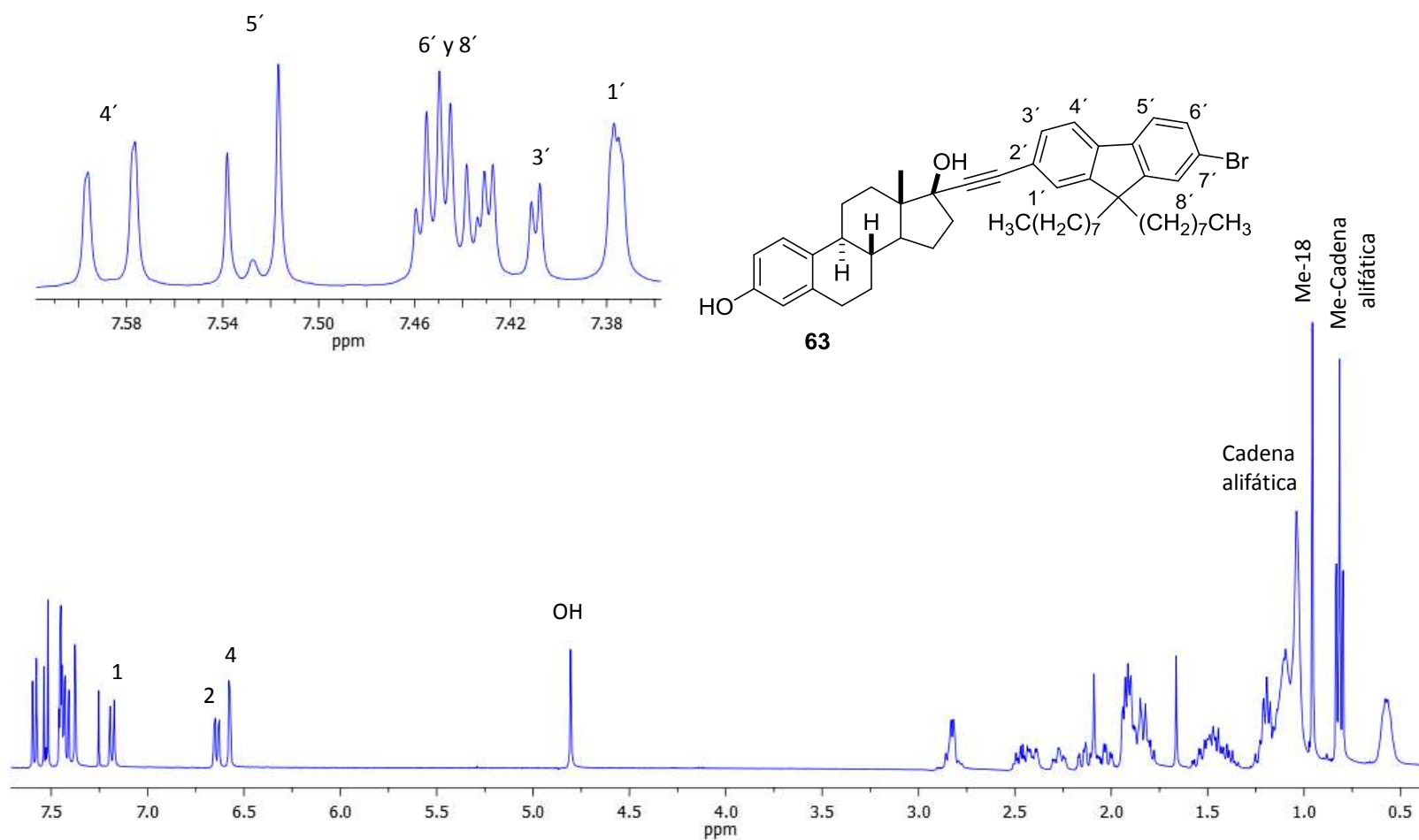


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **63**, en CDCl_3 .

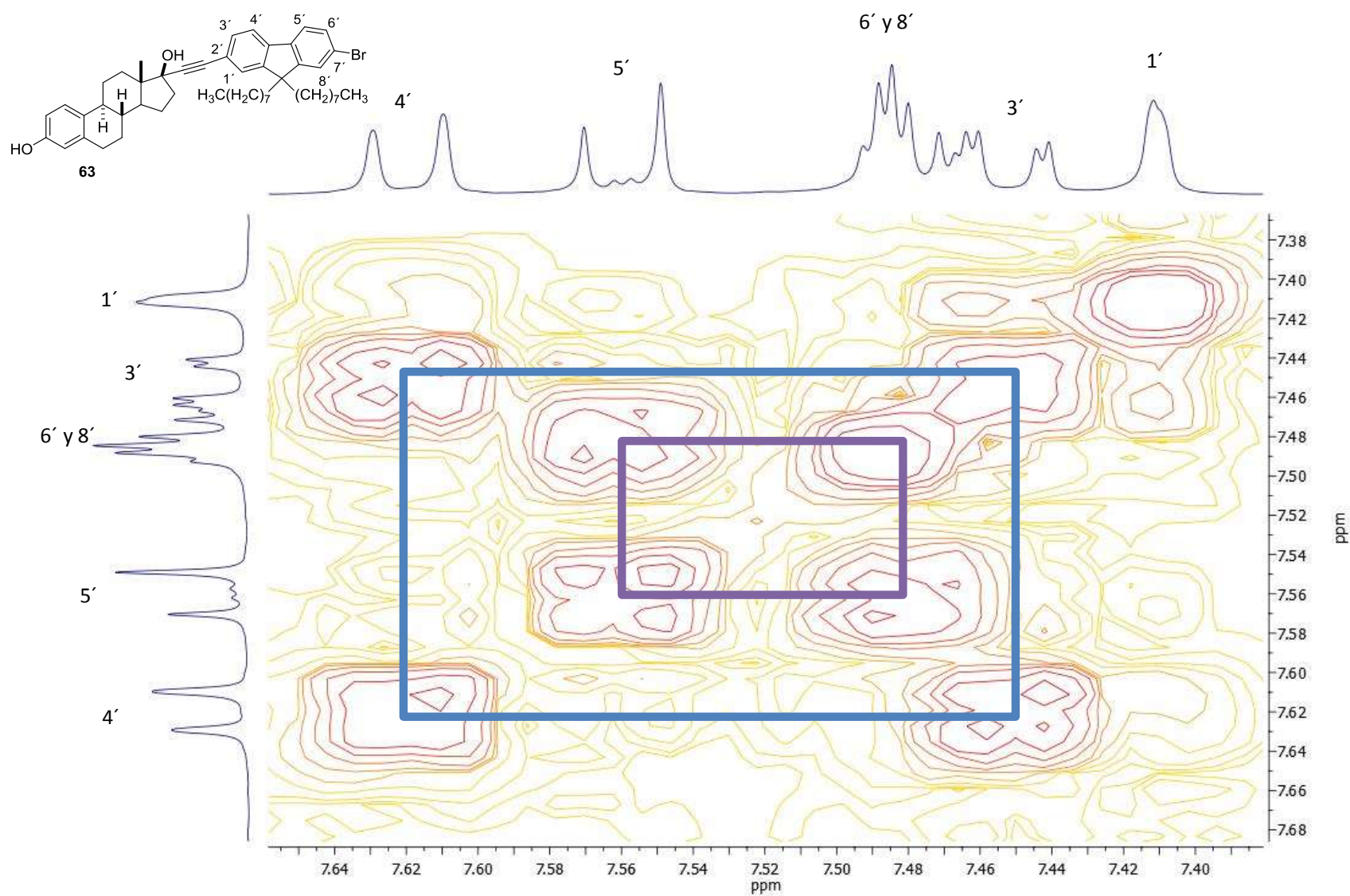


Figura 44. Experimento COSY de **63**, en CDCl_3 .

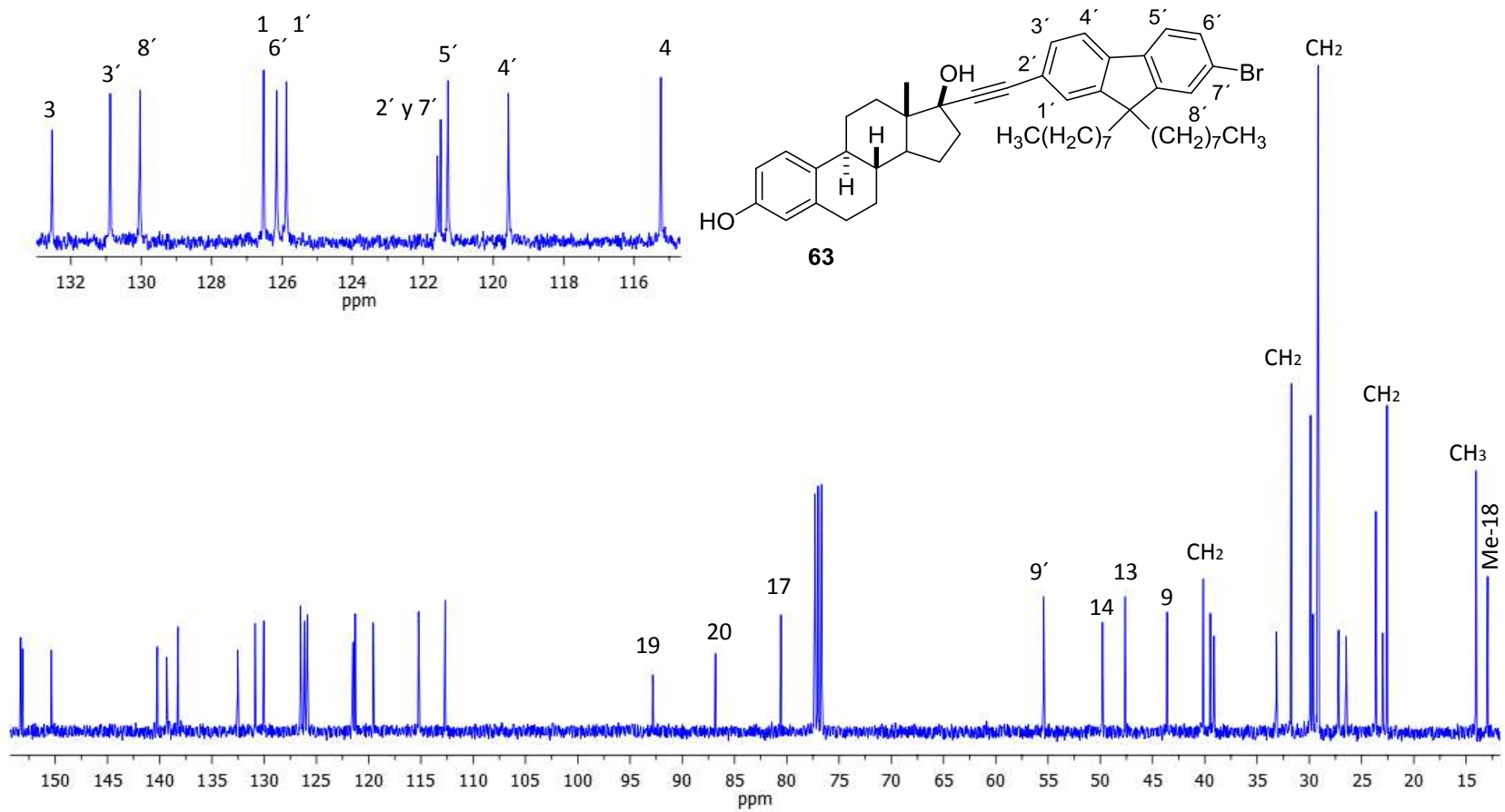


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **63**, en CDCl_3 .

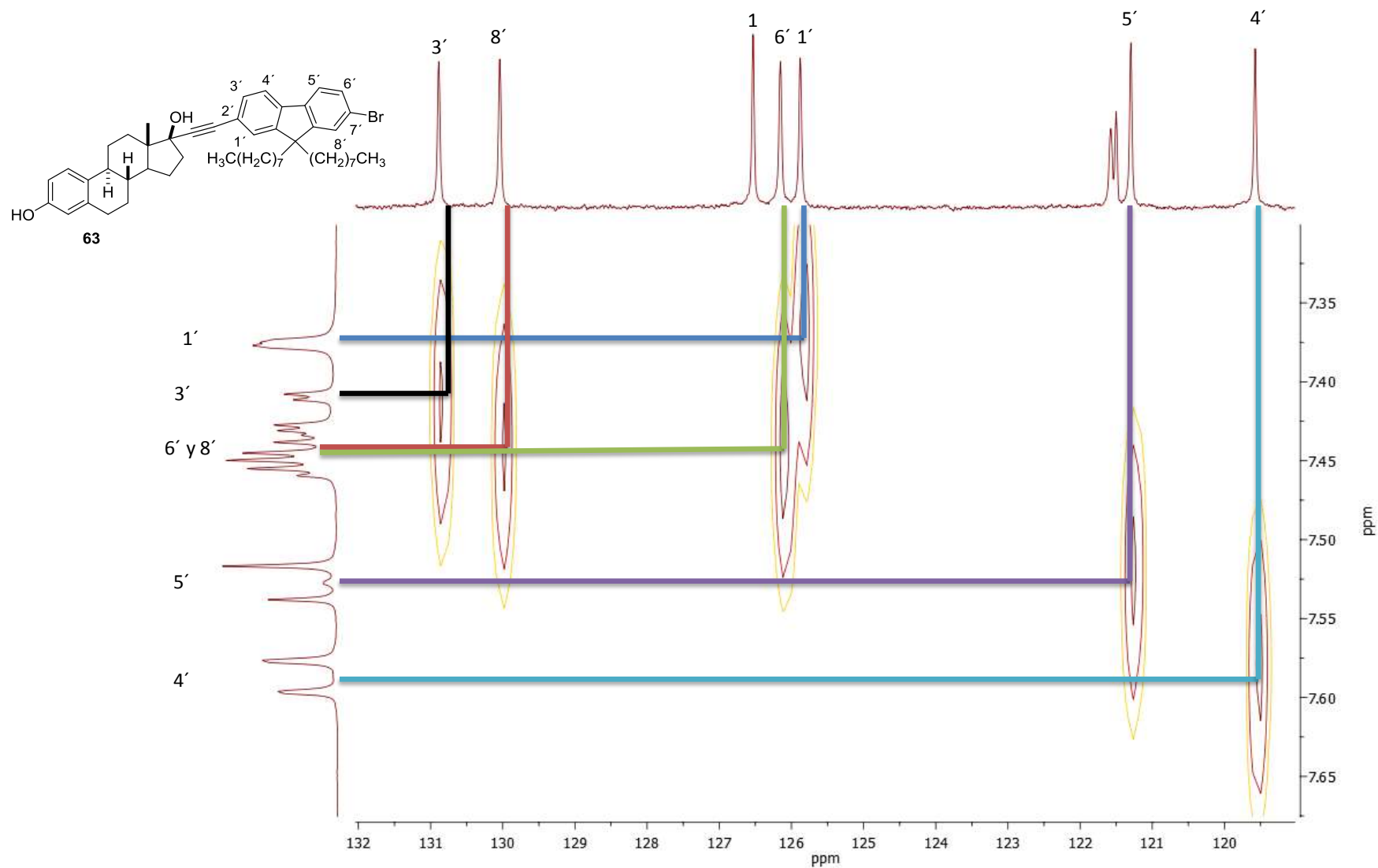


Figura 46. Experimento HETCOR de **63**, en $CDCl_3$.

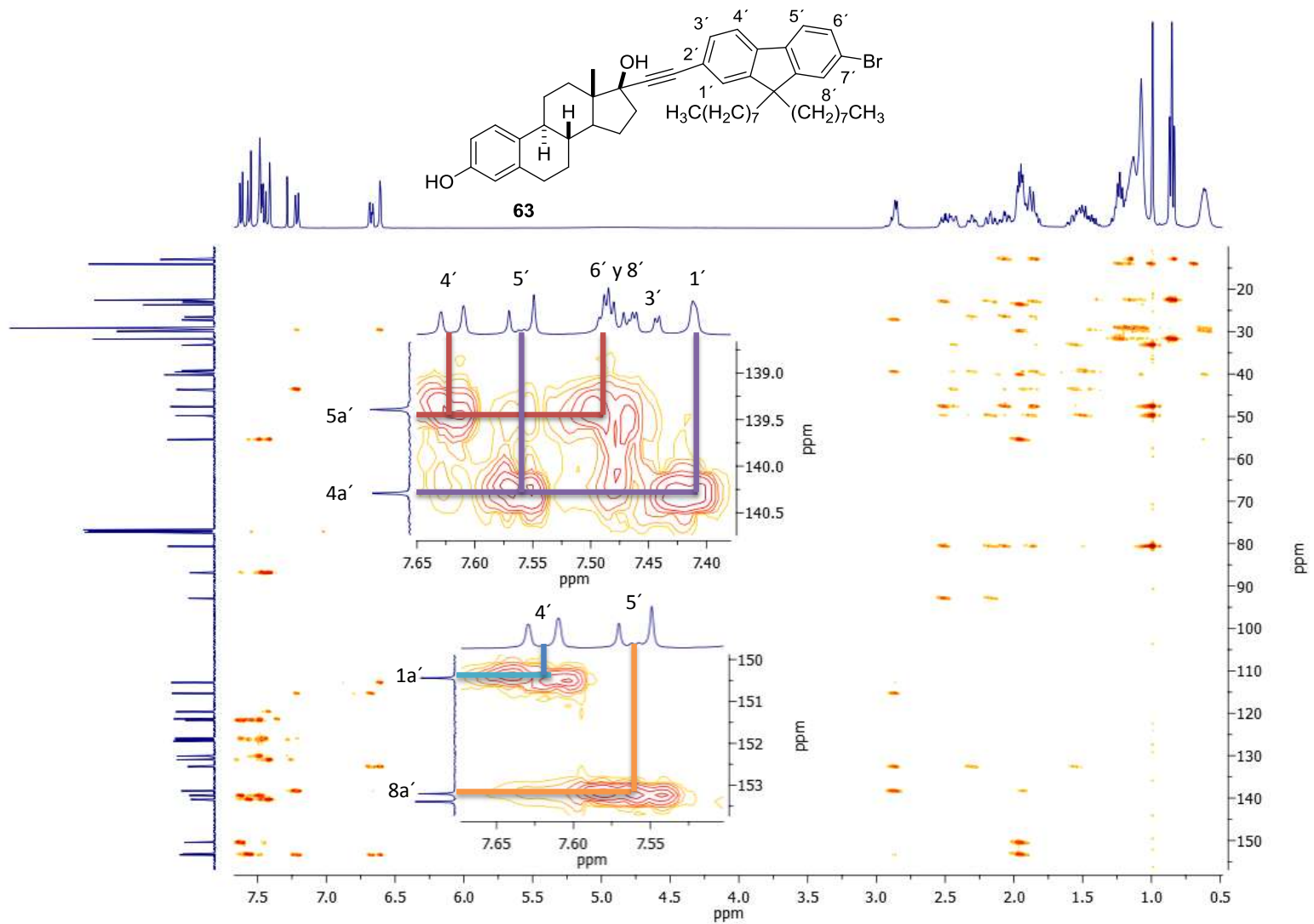
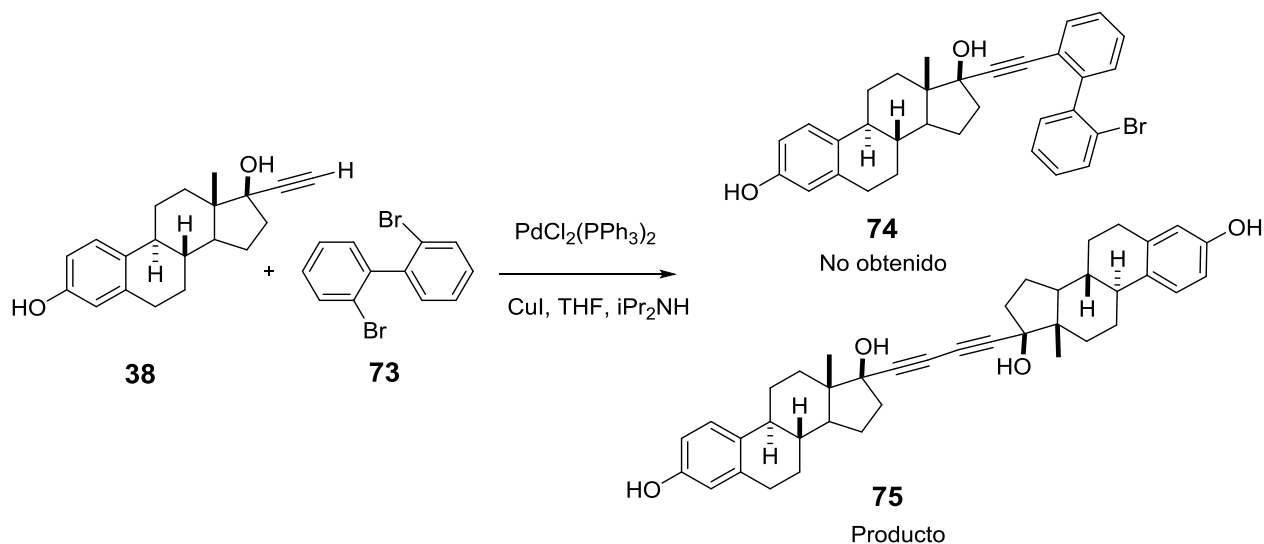


Figura 47. Espectro HMBC de **63**, en CDCl₃.

5.1.6 Reactividad de los sustratos 38 y 73 frente a las condiciones de acoplamiento de Sonogashira



Esquema 4. Reactividad de los sustratos **38** y **73** mediante las condiciones de acoplamiento de Sonogashira.

En nuestro interés por tratar de obtener el derivado esteroideal **74** vía las condiciones de Sonogashira mostradas en el esquema 4; se encontró que a diferencia de los acoplamientos anteriores, bajo estas condiciones no se favorece la obtención del producto **74**, sin embargo, se observó la formación del nuevo compuesto **75** en rendimientos del 52%, el cual después del análisis espectroscópico se identificó como el producto homoacoplado de **38**, estos resultados pueden atribuirse al posible impedimento estérico de los bromos del compuesto **73**. Sin embargo, la estructura del homoacoplado **75** también resulta de interés debido a su complejidad estructural.

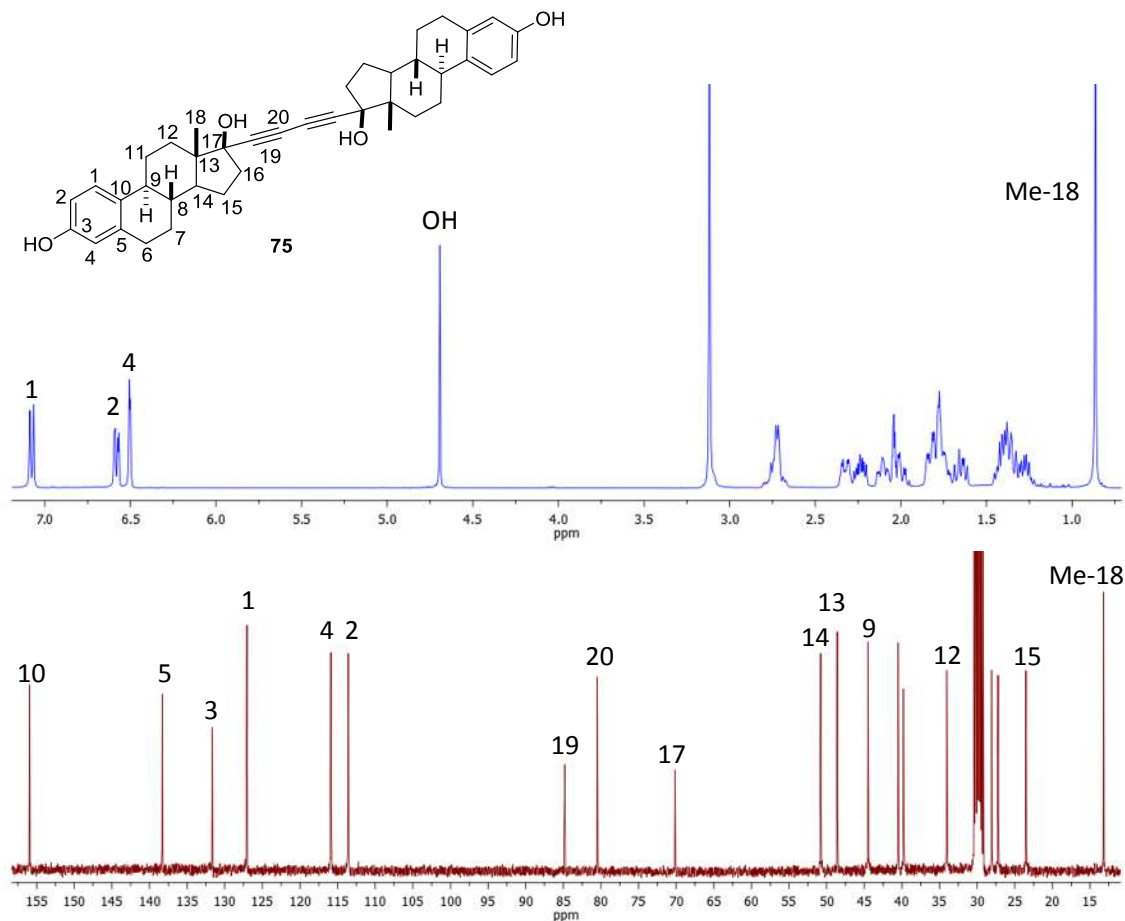
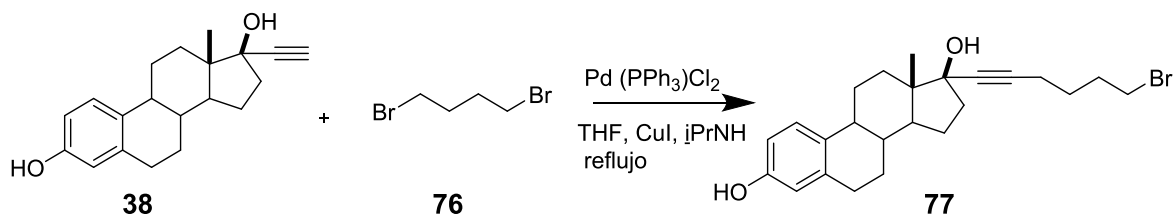


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C en acetona- d_6 de 75.

En el espectro de RMN de ^1H se observa la desaparición del protón del alquino terminal alrededor de 2.6 ppm, el resto de las señales características del etinilestradiol se conserva sin cambio aparente, así como en el de ^{13}C . En relación a su aspecto físico pasó de ser un polvo blanco a café claro, su solubilidad también es diferente a la del etinilestradiol; en disolventes como diclorometano y cloroformo es poco soluble y presenta un R_f diferente al de la materia prima 38.

5.1.7 Reactividad de los sustratos 38 y 76 en el acoplamiento de Sonogashira

De acuerdo a la literatura¹⁷ las afinidades al receptor estrogénico se ven incrementadas con la adición de una cadena alifática de 8 a 10 átomos de longitud entre el etinilestradiol y el grupo fluoróforo, por lo que se decidió explorar algunos ensayos adicionales con el interés de obtener un derivado del etinilestradiol conteniendo una cadena alifática sobre el alquino terminal (Esquema 5).



Esquema 5. Acoplamiento de Sonogashira de los compuestos 38 y 76.

Cuando se llevó a cabo el acoplamiento de Sonogashira entre los sustratos 38 y 76, a diferentes ensayos de reacción variando la temperatura, tiempo, reflujo y trampa de Dien stark, se observó únicamente la formación de un solo producto y la materia prima por TLC, sin embargo, después de la purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna y el análisis de la RMN de ¹H, la cual se comparó con el espectro de RMN de ¹H previamente mostrado en la Figura 48, se determinó que únicamente existía la formación del dímero 75 en 41% de rendimiento y recuperación de la materia prima.

5.1.8 Obtención y caracterización del compuesto 64

En la literatura^{17,49,50} se conoce que el Bodipy es un compuesto que presenta alta fluorescencia, y a menudo es utilizado como marcador de células tumorales, además de su gran aplicación en el área de materiales. En este sentido considerando que el compuesto 59 anteriormente preparado también presenta fluorescencia, se decidió intentar llevar a cabo la síntesis del compuesto 64 (Figura 49).

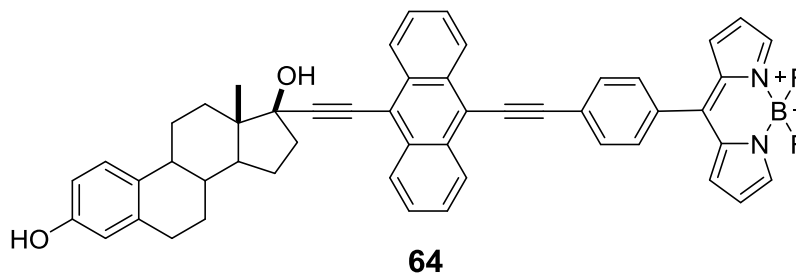


Figura 49. Derivado esteroidal del Bodipy **64**.

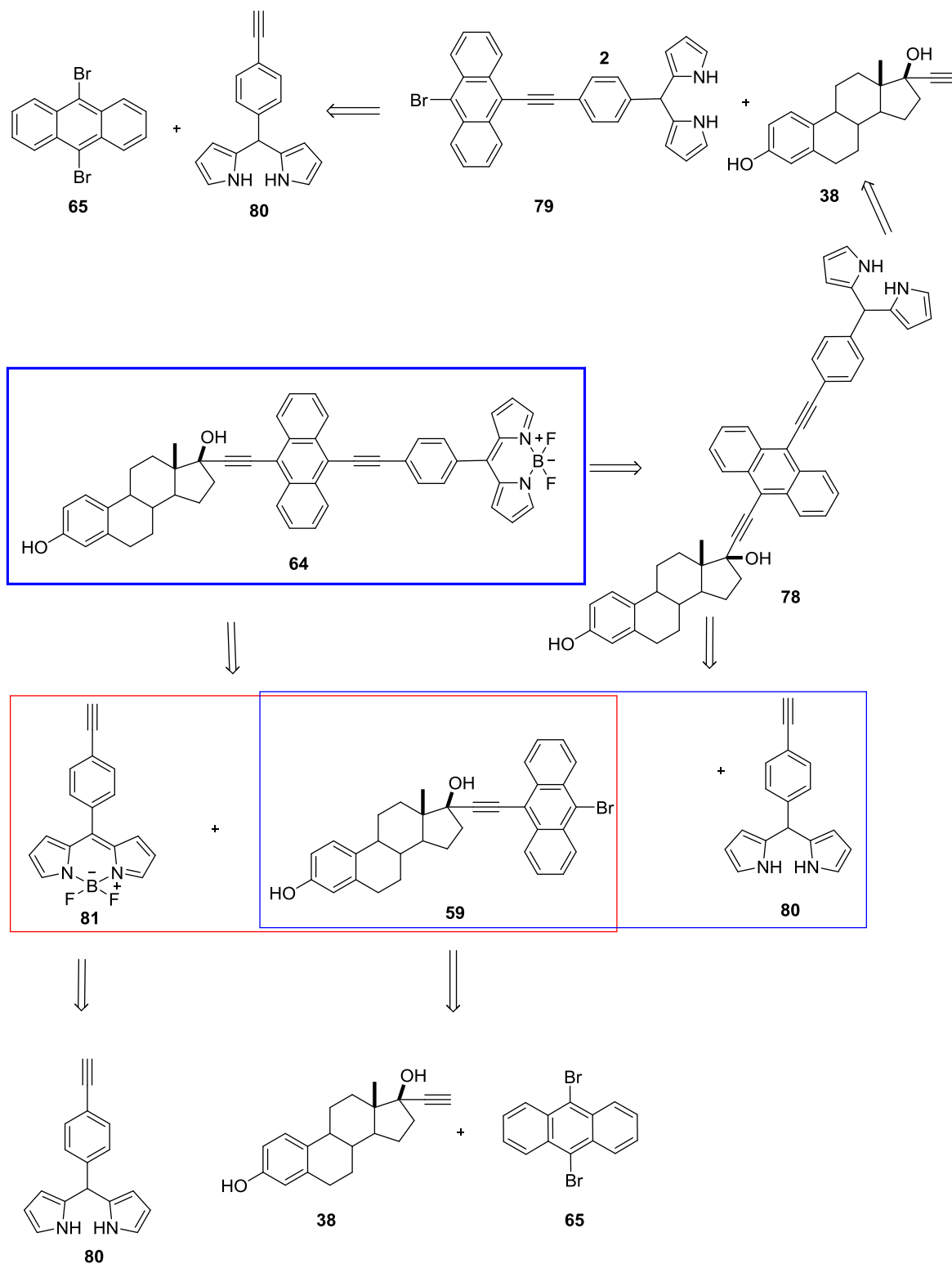
Para la síntesis del compuesto **64** se decidió iniciar con el acoplamiento de los compuestos **65** y **80** en condiciones de Sonogashira (Esquema 6). Sin embargo, únicamente se logró observar la formación de dos productos en poca cantidad y material de descomposición por TLC. La purificación del crudo de reacción permitió aislar el producto **64** en aproximadamente un 23 % de rendimiento y en mezcla con otras impurezas, lo cual se observó en la RMN de ^1H .

Considerando el resultado anterior se ensayó la síntesis vía el acoplamiento de **59** con el compuesto **80** (Esquema 6) y al igual que en el caso anterior, la formación del producto **64** se determinó en aproximadamente 20% de rendimiento y en mezcla con otras impurezas, lo cual se observó mediante RMN de ^1H después de la purificación en columna cromatográfica.

Debido a los resultados anteriores, se propuso obtener el Bodipy mediante las condiciones descritas en la literatura⁵⁰ para posteriormente acoplarlo con el derivado **59** (Esquema 6). Logrando obtener **81** en 47 % de rendimiento.

La formación del Bodipy (**81**) se confirmó mediante la comparación del espectro de RMN de hidrógeno con el de la materia prima **80** (Figura 50).

Una vez obtenido el compuesto **81**, se procedió a realizar el acoplamiento de este con **59** en las condiciones de Sonogashira, logrando aislar el producto puro en 25% de rendimiento, en la figura 51 se muestra la comparación de los espectros de RMN de **64** con los compuestos **81** y **59**.



Esquema 6. Análisis retrosintético para la síntesis de **64**.

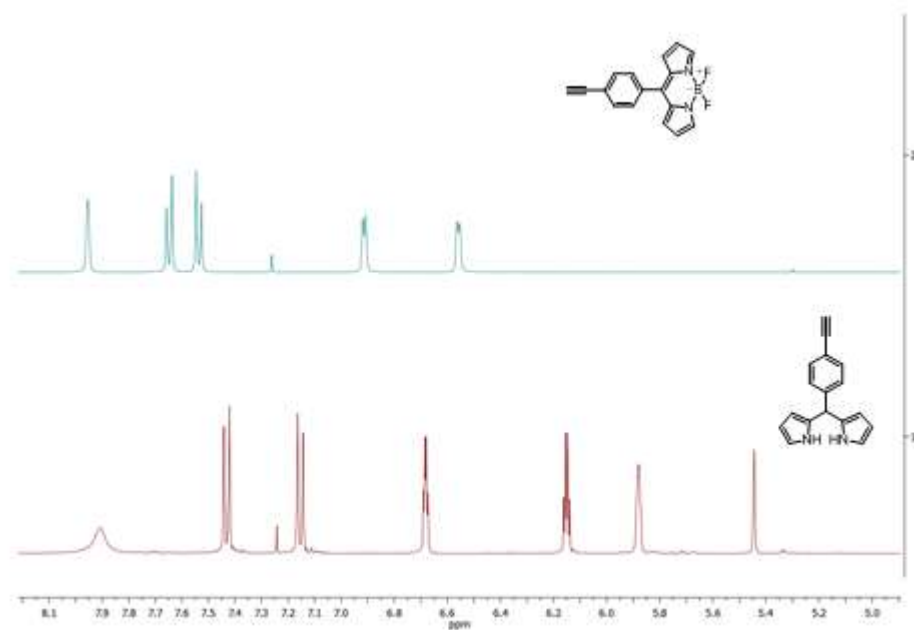


Figura 50. Espectros de RMN de ^1H del dipirrometano **80** y Bodipy **81** en CDCl_3 .

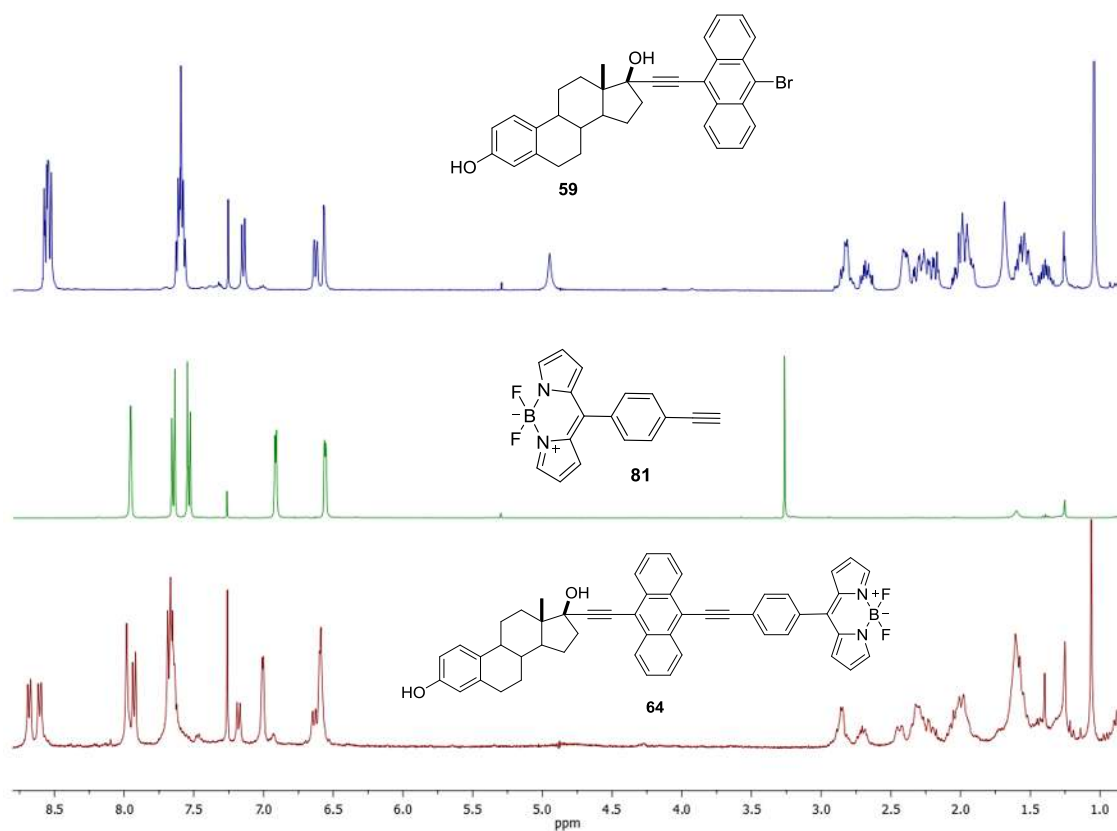


Figura 51. Comparación de los espectros de RMN de ^1H en CDCl_3 del compuesto **59** con los derivados **81** y **64**.

5.2 Mediciones de UV-Vis y fluorescencia de los compuestos 59-63

Se obtuvieron los espectros de absorción y emisión para los compuestos **59-63**, los resultados se muestran en la tabla 3. Los derivados **59** y **61** presentaron máximos de absorción a longitudes de onda mayores, para dichos compuestos los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en diclorometano, cabe mencionar que el compuesto **62** presenta fluorescencia en estado sólido (Figura 52).

Tabla 3. Datos de Absorción UV-Vis y emisión de los compuestos 59-63			
Compuesto	$\lambda_{\text{máx(Abs)}}[\text{nm}]$	$\epsilon_{\text{máx}}[\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$	$\lambda_{(\text{em})}[\text{nm}]$
EE2-antraceno (59)	420	20241	478
EE2-espirobifluoreno (60)	328	35770	-
EE2-fluorenona (61)	428	1174.2	537
EE2-tetrafenilo (62)	330	16609	-
EE2- Dioctilfluoreno (63)	324	46591	-

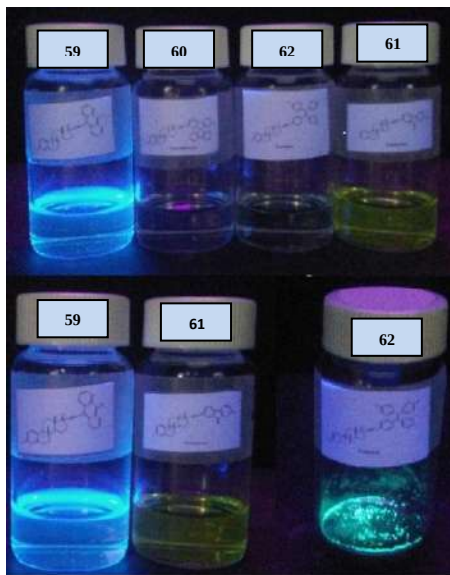


Figura 52. Compuestos en solución de CH_2Cl_2 y en sólido bajo la lámpara de UV a una longitud de onda de excitación de 365 nm.

5.2.1 Viscosidad contra sensibilidad en la emisión de fluorescencia.

Las sondas de fluorescencia son excelentes sensores para biomoléculas y otros objetivos biológicamente relevantes, son sensibles, responden rápidamente y son capaces de ofrecer una alta resolución espacial a través de imágenes microscópicas. Sirven como herramientas útiles para estudios funcionales en sistemas biológicos. La mayoría de los sensores actualmente disponibles señalizan la concentración de analito mediante un aumento o disminución de la intensidad de emisión.⁵¹

Por otra parte—la rotación intramolecular cambia las energías del estado basal y del estado excitado. La rotación intramolecular depende en gran medida de la polaridad del disolvente, la viscosidad del medio, la formación de enlaces de hidrógeno, la isomerización, la formación de excímeros y el impedimento estérico. Por esta razón, estructuras como los rotores moleculares han encontrado una amplia gama de aplicaciones como sensores fluorescentes de microviscosidad y volumen libre de solvente. Los ejemplos de aplicación incluyen la medición de la viscosidad a granel, la dinámica de sondeo de la formación de polímeros, la detección de proteínas y el sondeo de la agregación de proteínas, y la prueba de microviscosidad en células vivas.⁵⁰

Por otro lado, la detección de fluorescencia ratiométrica o también llamada λ -ratiométrica es un método muy valioso, al reducir los dispositivos y al minimizar la influencia de los factores extraños sobre la fluorescencia de un sensor y es particularmente útil para estudios celulares.

El efecto de las interacciones de disolvente sobre los espectros de absorción y emisión del compuesto **61** fue investigado en términos de la aproximación de Lippert-Mataga. Esta descripción está basada en el análisis de la relación lineal entre el parámetro de polaridad del disolvente (orientación de la polarizabilidad) y el desplazamiento experimental de Stokes, obtenido en MeOH/Glicerol. En particular la teoría de Lipper considera que la absorción y el desplazamiento de los espectros de emisión se deben a los efectos específicos del disolvente, donde el enlace de hidrogeno y las interacciones CT (transferencia de carga) ejercen una influencia importante. Sin embargo, varias interacciones específicas también pueden dar gráficas Lippert no lineales, tal como solvatación preferencial, efectos ácido-base y enlaces de hidrogeno

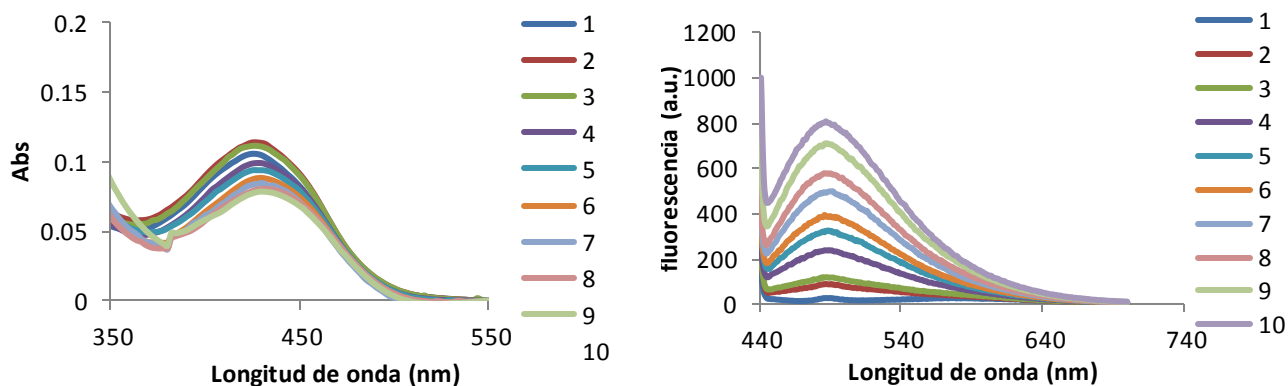
(disolvente-soluto). La ecuación de Lippert-Mataga se refiere al desplazamiento de Stokes y la polaridad del disolvente, de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta \bar{\nu} = \bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} (\Delta f) \frac{(\mu_e - \mu_g)^2}{a^3} + C \quad (1)$$

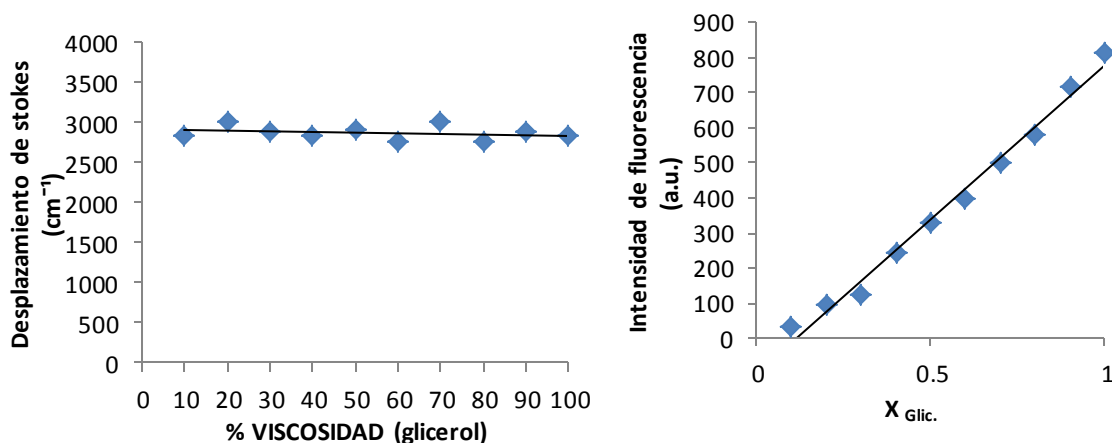
Donde $\bar{\nu}_A$ y $\bar{\nu}_F$ son los números de onda (en cm^{-1}) de la absorción y la emisión, respectivamente, h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, a es el radio de Onsanger, y $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$ es el momento dipolar, diferencia entre el estado basal y el excitado. La orientación de la polarizabilidad Δf se define en términos de la constante dieléctrica ϵ y el índice de refracción (n) del disolvente (ecuación 2). Cuando la gráfica de Lippert-Mataga exhibe un comportamiento lineal, los efectos generales del disolvente son dominantes en los desplazamientos del espectro.^{2,50}

$$\Delta f = f(\epsilon) - f(n^2) = \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \quad (2)$$

Cuando se observada un comportamiento no lineal, los efectos del disolvente específico gobiernan los desplazamientos espectrales, ofreciendo evidencia de interacciones soluto-disolvente. Se puede ver en las gráficas 1 y 2, que la banda de absorción no muestra cambios significativos debido a las variaciones de la polaridad del disolvente. Del mismo modo, no se observa un desplazamiento hacia el rojo en el espectro de fluorescencia cuando la polaridad incrementa, lo que sugiere que no hay cambio del momento dipolar entre los estados excitado y basal.



Gráficas 1 y 2. Espectros de UV-vis (izquierda) y de fluorescencia (derecha) del compuesto **61**. Mezcla MeOH:Glicerol, 1) 100:0, 2) 90:10, 3) 80:20, 4) 70:30, 5) 60:40, 6) 50:50, 7) 40:60, 8) 30:70, 9) 20:80, 10) 10:90 (v/v).

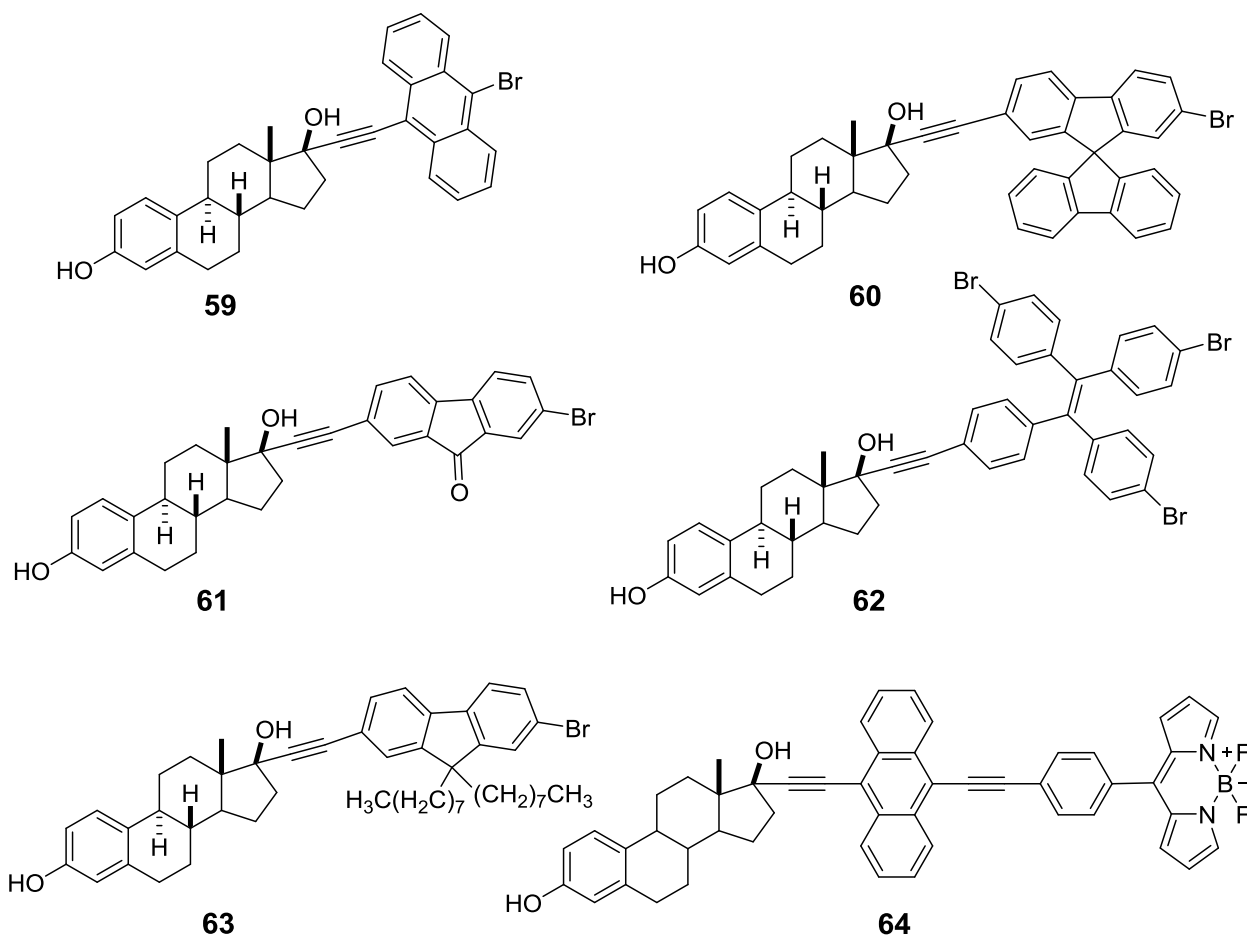


Gráficas 3 y 4. La banda de absorción no muestra cambios significativos debido a las variaciones de la polaridad del disolvente (izquierda). Conforme va aumentando la fracción molar de glicerol la intensidad de fluorescencia aumenta (derecha).

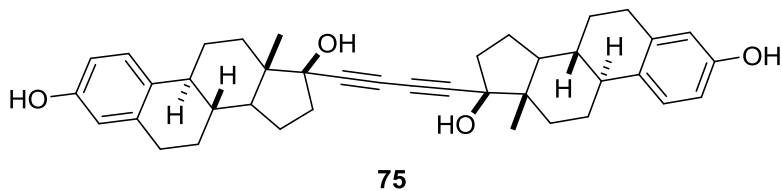
Estos resultados demuestran que el compuesto **61** es un sensor sensible a los cambios sutiles de microviscosidad que no muestra efectos por variación de la polaridad del disolvente, confirmando su potencial aplicación como prueba fluorescente para mapear la viscosidad local en medios heterogéneos.

6. CONCLUSIONES

Mediante el acoplamiento de Sonogashira se obtuvieron los nuevos compuestos esteroidales **59-64**.



El dímero **75** se identificó como producto principal durante los ensayos de acoplamiento de **38** con los compuestos **73** y **76**.



Se realizaron las mediciones de Uv-vis y de fluorescencia de los compuestos **59-63**, encontrando que los compuestos **59** y **61** presentan las longitudes de absorción máxima con respecto a los demás compuestos, así como, fluorescencia en solución, también se realizó un análisis de la fluorescencia vs viscosidad del compuesto **61**; los resultados de este ensayo demostraron que conforme aumenta la viscosidad se incrementa la fluorescencia independientemente de la polaridad del medio, indicando su potencial aplicación para ser medidos en medios heterogéneos.

La estructura de los nuevos compuestos **60-64** se asignaron mediante RMN de una y dos dimensiones y otros métodos espectroscópicos.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPO

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en los espectrómetros Thermo Scientific Nicolet iS10 usando reflectancia total atenuada ($\bar{\nu}$, cm^{-1}). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Scientific y Fisher-Johns, y no están corregidos. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C , DEPT, HETCOR, COSY y HMBC se determinaron en los espectrofotómetros Varian Mercury Plus 400 y Jeol ECA 500. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se describen en Hertz (Hz), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna para ^1H y ^{13}C . Todas las muestras fueron disueltas en CDCl_3 . Los espectros de masas fueron obtenidos a 70 eV en espectrómetro Hewlett Packard 5989B. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) fueron adquiridos en un espectrómetro Agilent Technologies, modelo 1100 acoplado a un cromatógrafo de gases TOF con una fuente ESI.

Los disolventes y reactivos fueron adquiridos en la casa comercial Aldrich. El esteroide Etinilestradiol fue donado por la compañía PROQUINA (Productos Químicos Naturales, México). El THF se secó utilizando Na° y bezofenona como indicador.

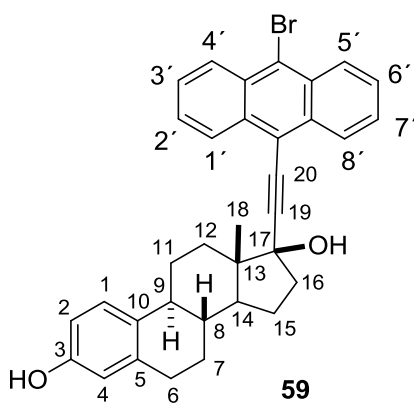
El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo por medio de cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatoplasas (4 cm x 2cm) de gel de sílice de 0.2 mm de espesor soportado en placas de aluminio, provistos además de un factor de revelado F254 usando como fase móvil Hexano/ AcOEt . El revelado de las cromatoplasas se realizó con una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm, también con una solución de H_2SO_4 /agua (30% V/V).

La separación de los productos obtenidos se realizó mediante cromatografía en columna, empacadas con gel de sílice (70-230 Mesh).

7.2 Procedimiento general para la obtención de los derivados acoplados con el etinilestradiol

En un matraz balón, se colocó el etinilestradiol **38** (1Eq.) y posteriormente se adicionó el halogenuro de arilo (**65-70**) (1Eq.), CuI(I) (6% mol), PdCl₂(PPh₃)₂ (10% mol), manteniendo el sistema cerrado y bajo atmósfera de nitrógeno, posteriormente se adicionó la *i*Pr₂NH destilada y el THF anhidro. La reacción se mantuvo a reflujo de 4 a 8 horas dependiendo del halogenuro de arilo utilizado. El crudo de reacción se vertió sobre una solución saturada de cloruro de amonio (25 mL). La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL) y se filtró sobre Na₂SO₄ anhidro, enseguida el disolvente se eliminó en rotavapor al vacío. Finalmente, el crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice 70-230 Mesh, utilizando en diferente proporción hexano-AcOEt, y hexano-CH₂Cl₂.

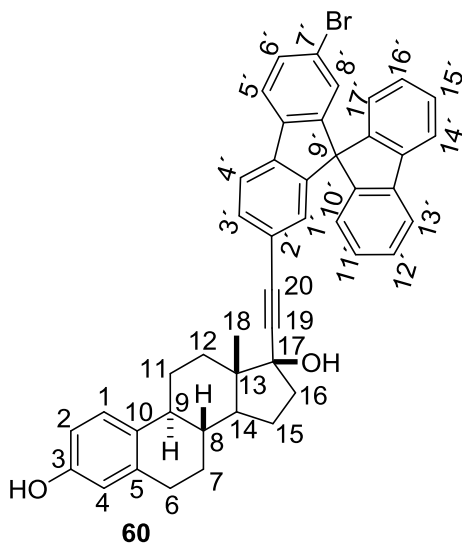
7.2.1 Obtención del 17 α -(10'-bromoantraceniletinil) estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (**59**)



Se colocó el etinilestradiol **38** (0.100 g, 0.33 mmol) y el 9,10-dibromoantraceno **65** (0.113 g, 0.33 mmol), CuI(I) (0.006 g, 0.033 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.014, 0.020 mmol), 1 mL de *i*Pr₂NH destilada y 6 mL de THF anhidro. La reacción se mantuvo a reflujo durante 8 horas. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando un sistema de elusión hexano-AcOEt (8:2) para obtener el compuesto 17 α -(10'-bromoantraceniletinil) estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (**59**) como un sólido naranja (0.109 g, 59%), p.f. 145-147°C. IR $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (ATR): 3328, 2921, 2866, 2324, 2202, 1809, 1705, 1610, 1447, 1341, 1254, 1146, 1020, 905, 872, 747, 656 cm⁻¹. HRMS (APCI-TOF): [C₃₄H₃₁ Br O₂-H₂O]⁺ *m/z*, calculado: 551.5240, encontrado: 533.1480. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.55-8.46 (4H, m H-1', H-8', H-4', H-5'), 7.59-7.51 (4H, m, H-2', H-7', H-3', H-6'), 7.10 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-1), 6.62 (1H, dd, *J* = 8.4, *J* = 2.7 Hz, H-2), 6.55 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-4), 5.24 (1H, s, OH-17), 1.03 (3H, s, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 153.3 (C-10), 138.1 (C-5), 132.9 (C-3), 132.3 (C-12', C-14'), 130.0 (C-11', C-13'), 128.2 (C-4', C-5'), 127.3 (C-2', C-7'), 127.0 (C-1', C-8'), 126.8 (C-3', C-6'), 126.5 (C-

1), 124.0 (C-9'), 117.7 (C-10'), 115.2 (C-4), 112.7 (C-2), 105.2 (C-19), 82.7 (C-20), 81.3 (C-17), 50.2 (C-14), 47.9 (C-13), 43.7 (C-9), 38.5 (C-8), 39.4 (C-16), 33.3 (C-12), 29.5 (C-6), 27.3 (C-7), 26.4 (C-11), 23.0 (C-15), 13.0 (C-18).

7.2.2 Obtención del 17 α -(7'-bromo-9',9''-espirobifluoreniletinil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (**60**)



El compuesto **38** (0.100 g, 0.33 mmol), 2,7-Dibromo-9,9'-espirobifluoreno **66** (0.160 g, 0.33 mmol), CuI(I) (0.006 g, 0.033 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.014, 0.020 mmol), *i*Pr₂NH (1 mL), THF (5 mL) se hicieron reaccionar como se describió en la metodología general. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando un sistema de elusión hexano-AcOEt (9:1) para obtener el compuesto 17 α -(7'-bromo-9',9''-espirobifluoreniletinil)estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (**60**). en forma de polvo beige (0.092 g, 39%), p.f. 179-181°C. IR $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (ATR): 2972, 2929, 2870 cm⁻¹.

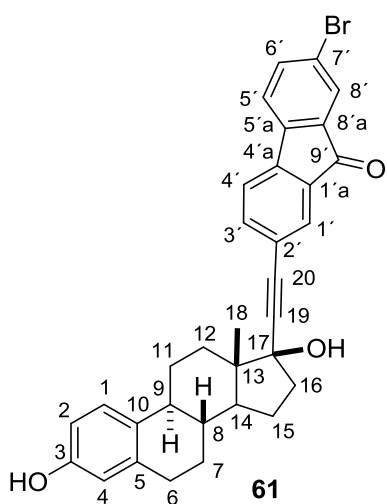
HRMS (APCI-TOF): [C₄₅H₃₇BrO₂ -H₂O]⁺ *m/z*, calculado: 671.1944, encontrado: 671.194403 con un error de -0018772..

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.84 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-13' y H-14'), 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4'), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.47 (dd, *J* = 12.4, 4.5 Hz, 2H, H-6' y H-3'), 7.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-15' y H-12'), 7.13 (m, 3H, H-16', H-11' y H-1), 6.83 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-8'), 6.80 (s, 1H, H-1'), 6.71 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-17' y H-10'), 6.60 (dd, *J* = 8.4, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-2), 6.54 (s, 1H, H-4).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 153.2 (C-10), 151.0 (C-8a'), 148.4 (C-1a'), 147.2 (C-10a' y C-17a'), 141.6 (C-13a' y C-14a'), 140.6 (C-4a'), 139.8 (C-5a'), 138.1 (C-5), 132.4 (C-3), 131.8 (C-3'), 131.0 (C-6'), 128.1 (C-15' y C-12'), 127.9 (C-16' y C-11'), 127.2 (C-1'), 127.1 (C-8'), 126.4 (C-1), 124.0 (C-17' y C-10'), 122.4 (C-2'), 121.8 (C-7'), 121.5 (C-5'), 120.2 (C-13 y C-14), 119.8 (C-4'), 115.1 (C-4), 112.6 (C-2), 93.2 (C-19), 86.1 (C-20), 80.4 (C-17), 65.5 (C-9'),

49.5 (C-14), 47.4 (C-13), 43.3 (C-9), 39.3 (C-8), 38.9 (C-16), 32.9 (C-12), 29.5 (C-7), 27.0 (C-11), 26.3 (C-6), 22.8 (C-15), 12.81 (Me-18).

7.2.3 Obtención del 17 α -(7'-bromo-fluore-9'-ona etinil) estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (**61**)

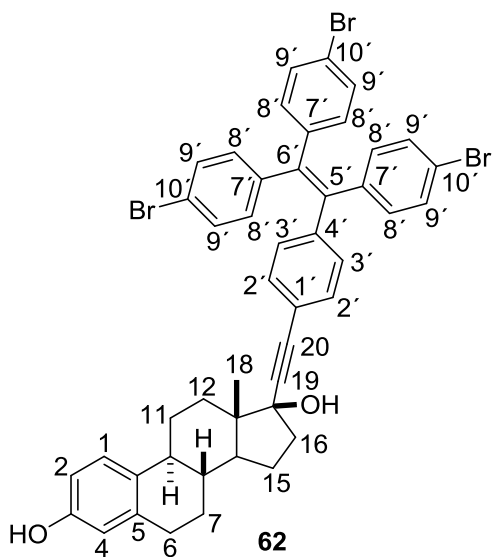


Se hizo reaccionar el compuesto **38** (0.100 g, 0.33 mmol) con 2,7-Dibromo-9-fluorenona **67** (0.114 g, 0.33 mmol), CuI(I) (0.006 g, 0.033 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.014, 0.020 mmol), *i*Pr₂NH (1 mL), THF (6 mL) como se describió en la metodología general. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando un sistema de elusión hexano-AcOEt (8:2) para obtener el compuesto 17 α -(7'-bromo-fluore-9'-ona etinil) estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (**61**) en forma de un sólido naranja (0.077 g, 41%), p.f. 155-158°C.

IR $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (ATR): 3370, 2972, 2929, 2865, 1613, 1498, 1447, 1342, 1255, 906 y 747 cm⁻¹. HRMS (APCI-TOF): [C₃₃H₂₈BrO₂ -H₂O]⁺ *m/z*, calculado: 535.1270, encontrado: 535.126717 con un error de 0.491621 ppm. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.77 (m, 1H, H-1'), 7.71 (dd, *J* = 1.5, 0.6 Hz, 1H, H-8'), 7.63 (dd, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H-3'), 7.57 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, H-6'), 7.46 (dd, *J* = 7.7, 0.6 Hz, 1H, H-5'), 7.39 (dd, *J* = 7.9, 0.4 Hz, 1H, H-4'), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1), 6.64 (dd, *J* = 8.4, 2.8 Hz, 1H, H-2), 6.57 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4), 0.94 (s, 3H, Me-18).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 191.6 (C-9'), 153.3 (C-10), 142.9 (C-5a'), 142.4 (C-4a'), 138.2 (C-5), 138.0 (C-6'), 137.3 (C-3'), 135.8 (C-1a'), 133.6 (C-8a'), 132.4 (C-3), 127.7 (C-1'), 127.6 (C-8'), 126.5 (C-1), 124.2 (C-7'), 123.3 (C-2'), 121.9 (C-4'), 120.3 (C-5'), 115.2 (C-4), 112.7 (C-2), 94.9 (C-19), 85.0 (C-20), 80.4 (C-17), 12.8 (Me-18).

7.2.4 Obtención del 17 α -[(5',6',6'-tris (10'-bromofenil)vinil)feniletinil] estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (**62**)

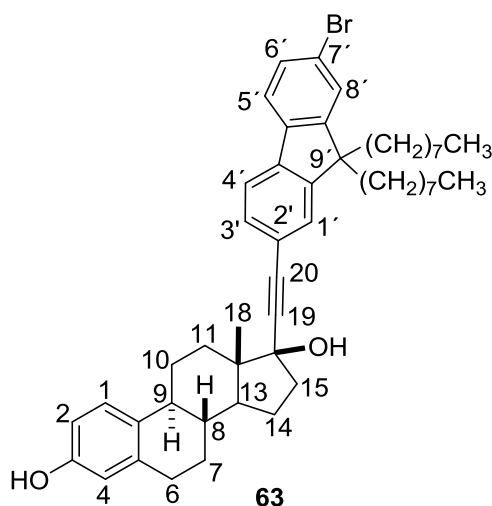


El compuesto **38** (0.050 g, 0.16 mmol) con 1, 1, 2, 2-tetraquis (4-bromofenil)etileno (**68**) (0.145 g, 0.16 mmol), CuI(I) (0.003 g, 0.016 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.007, 0.010 mmol), iPr₂NH (0.5 mL), THF (3 mL), se hicieron reaccionar durante 4 h. mediante la metodología general. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando un sistema de elusión hexano-AcOEt (9:1) para obtener el compuesto 17 α -[(5',6',6'-tris (10'-bromofenil)vinil)feniletinil] estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (**62**) en forma de un sólido amarillo claro (0.049 g, 33%), p.f. 154-158°C. IR $\bar{\nu}_{\text{máx}}$

cm⁻¹ (ATR): 2972, 2930, 2870 cm⁻¹. HRMS (APCI-TOF): [C₄₆H₃₉Br₃O₂ -H₂O]⁺ m/z, calculado: 843.0471, encontrado: 843.046725 con un error de 0.399882 ppm. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.25 (m, 8H, H-3' y H-8'), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-1), 6.92 (d, *J*=8.5 Hz, 2H, H-2'), 6.84 (m, 6H, H-9'), 6.63 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H, H-2), 6.56 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-4). 0.92 ppm (s, 3H, Me-18),

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 153.5 (C-10), 142.6, 141.6, 141.5, 140.1, 139.6, 138.2 (C-5), 132.8 (C-9'), 132.4 (C-3), 131.4 y 131.2 (C-3' y C-8'), 131.1 (C-2'), 126.5 (C-1), 121.6, 121.2, 115.3 (C-2), 112.7 (C-4), 93.5 (C-19), 85.8 (C-20), 80.4 (C-17), 49.8 (C-14), 47.6 (C-13), 43.6 (C-9), 39.5 (C-8), 39.0 (C-16), 33.1 (C-12), 29.6 (C-7), 27.2 (C-11), 26.5 (C-6), 22.9 (C-15), 12.9 (Me-18).

7.2.5 Obtención del 17 α -(9',9'-dioctil-7'-bromo-fluoreniletinil) estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (**63**)

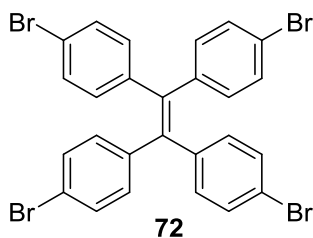


Se hizo reaccionar el compuesto **38** (0.100 g, 0.33 mmol) con 2,7-Dibromo-9,9 dioctilfluoreno **69** (0.185 g, 0.33 mmol), CuI(I) (0.006 g, 0.033 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.014, 0.020 mmol), iPr₂NH (1 mL), THF (6 mL) como se describió en la metodología general. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando un sistema de elusión hexano-AcOEt (9:1) para obtener el compuesto 17 α -(9',9'-dioctil-7'-bromo-fluoreniletinil) estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β -diol (**63**) en forma de un sólido café claro (0.068

g, 48%), p.f. 43-45 °C. IR $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (ATR): 3368, 2925, 2853, 1498, 1455, 813 cm⁻¹. HRMS (APCI-TOF): [C₄₉H₆₃BrO₂-H₂O]⁺ *m/z* calculado: 745.3976, encontrado: 745.397854 con un error de 0.39397 ppm. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5'), 7.44 (m, 2H, H-6' y H-8'), 7.40 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H-3'), 7.38 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, H-1'), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1), 6.64 (dd, *J* = 8.4, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-2), 6.57 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4), 0.96 (s, 3H, Me-18), 0.82 (t, 6H, 2CH₃).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 153.3 (C-10), 153.1 (C-8a'), 150.3 (C-1a'), 140.2 (C-4a'), 139.3 (C-5a'), 138.2 (C-5), 132.5 (C-3), 130.8 (C-3'), 130.0 (C-8'), 126.5 (C-1), 126.1 (C-6'), 125.8 (C-1'), 121.5 (C-2'), 121.5 (C-7'), 121.3 (C-5'), 119.5 (C-4'), 115.2 (C-4), 112.6 (C-2), 92.8 (C-19), 86.8 (C-20), 80.5 (C-17), 55.4 (C-9'), 40.1 (2CH₂), 31.7 (2CH₂), 29.1 (4CH₂), 23.6 (2CH₂), 22.5 (2CH₂), 14.0 (2CH₃), 12.9 (CH₃-18).

7.2.6 Obtención del 1,1,2,2-tetraquis (4-bromofenil)etileno (72)

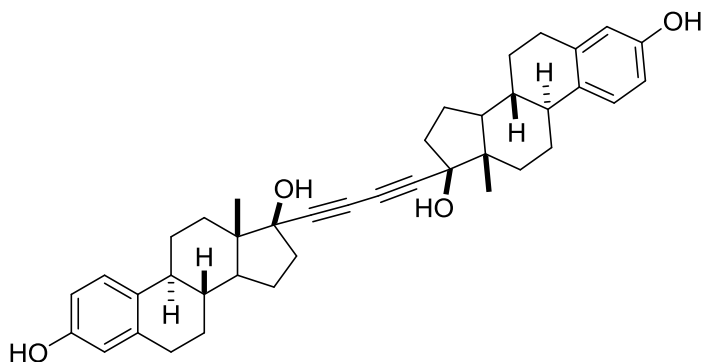


A una solución de **71** (0.5g, 1.5 mmol) en 2 mL de ácido acético glacial en baño de hielo se le adicionó 0.6 mL (11.7 mmol) de Br₂, posteriormente se agregó 2 mL de CH₂Cl₂ y se mantuvo a 50 °C por 30 min, a la mezcla de reacción se le agregó 13.5 mL de agua helada y el precipitado sólido se lavó varias veces con agua y metanol. Se obtuvo el compuesto 1,1,2,2-tetraquis(4-bromofenil)etileno (**72**) en forma de un sólido blanco (0.723 g, 74%).⁵²

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (m, 8H), 6.84 (m, 8H)

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 141.4, 139.5, 132.7, 131.2, 121.2.

7.2.7 Obtención del compuesto (75)

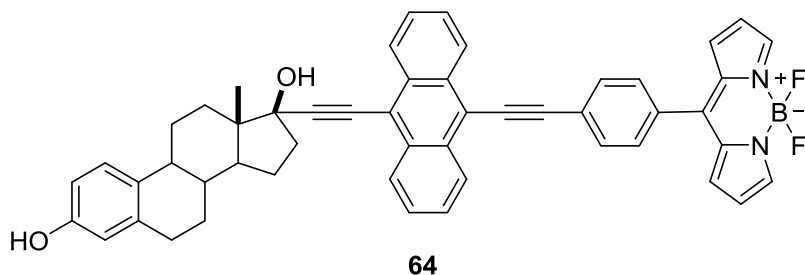


Se hizo reaccionar el compuesto **38** (0.100 g, 0.33 mmol) con 2,2'-Dibromobifenil **73** (0.102 g, 0.33 mmol), CuI(I) (0.006 g, 0.033 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.028, 0.040 mmol), *i*Pr₂NH (1 mL), THF (6 mL) como se describió en la metodología general. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando un sistema de elusión hexano-AcOEt (7:3) para obtener el compuesto (**75**) en forma de un sólido café claro (0.104 g, 52%), p.f. 210-212 °C.

RMN de ¹H (400 MHz, Acetona-d₆) δ: 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1), 6.58 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H-2), 6.50 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-4), 4.69 (s, -OH), 0.86 (Me-18).

RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona- d_6) δ : 155.9 (C-10), 138.3 (C-5), 131.65 (C-3), 127.0 (C-1), 115.8 (C-14), 113.5 (C-2), 84.8 (C-19), 80.4 (C-20), 70.1 (C-17), 50.7 (C-14), 48.5 (C-13), 44.5 (C-9), 40.4 (C-8), 39.7 (C-16), 34.0 (C-12), 30.2 (C-7), 28.0 (C-11), 27.2 (C-6), 23.5 (C-15), 13.2 (C-18).

7.2.8 Obtención del compuesto (64)



Se hizo reaccionar el compuesto **59** (0.094 g, 0.17 mmol) con Bodipy **81** (0.050 g, 0.17 mmol), CuI(I) (0.003 g, 0.017 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.007, 0.010 mmol), $i\text{Pr}_2\text{NH}$

(0.5 mL), THF (3 mL) como se describió en la metodología general, se obtuvo el compuesto (**64**) en forma de un sólido rojo (0.032 g, 25%), **HRMS** (APCI-TOF): calculado: 743.3238, encontrado: 743.323963 para $[\text{C}_{51}\text{H}_{41}\text{BN}_2\text{O}_2\text{F}-\text{F}]^+$ m/z con un error de -0.272971 ppm. **RMN de ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.68 (dd, $J = 7.1, 2.5$ Hz, 2H), 8.60 (dd, $J = 6.8, 2.1$ Hz, 2H), 7.98 (s, 2H), 7.93 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.65 (ddd, $J = 9.4, 8.6, 6.6$ Hz, 6H), 7.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 6.64 (dd, $J = 8.4, 2.7$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 153.4 (C-10), 146.2, 144.3, 138.2 (C-5), 134.7, 133.8, 132.3 (C-3), 132.1, 132.1, 131.6, 131.3, 130.7, 127.1, 127.06, 127.01, 126.9, 126.5 (C-1), 126.1, 118.9, 118.7, 117.5, 115.2 (C-4), 112.7 (C-2), 106.4, 101.0, 89.2 (C-19), 82.9 (C-20), 81.2 (C-17), 60.42, 50.3 (C-14), 47.9 (C-13), 43.8 (C-9), 39.6 (C-8), 39.5 (C-16), 33.4 (C-12), 29.6 (C-7), 27.3 (C-11), 26.5 (C-6), 23.1 (C-15), 21.0, 14.1, 13.0 (Me-18).

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Lakowicz J. R.; Principles of Fluorescence Spectroscopy, Ed. Springer, Third Edition, pp. 24-30, **2006**.
- 2.- Valeur B.; Berberan-Santos M. N.; Molecular Fluorescence, segunda edición, Ed. Wiley-Vch, **2011**.
- 3.- Luo J.; Xie Z.; Lam J. W. Y.; Cheng L.; Chen H.; Qiu C.; Kwok H. S.; Zhan X.; Liu Y.; Zhu D.; Tang B. Z.; *Chem. Commun.*, 1740, **2001**.
- 4.- Forster ; K. Kasper; *Z. Phys. Chem.*, 1, 275, **1954**.
- 5.- Hong Y.; Lamab J. W. Y.; Tang B. Z.; *Chem. Soc. Rev.*,40, 5361, **2011**.
- 6.-a) Hu F.; Huang Y.; Zhang G.; Zhao R.; Zhang D.; *Tetrahedron Lett.*, 55, 1471, **2014**., b) Kwok R. T. K.; Geng J.; Lam J. W. Y.; Zhao E.; Wang G.; Zhan R.; Liu B.; Tang Z.; *J. Mat. Chem. B*, 2, 4134, **2014**.
- 7.- Leung Ch. W. T.; Hong Y.; Hanske J.; Zhao E.; Chen S.; Pletneva E. V.; Tang B. Z.; *Anal. Chem.*, 86, 1263, **2014**.
- 8.-a) Chen S.; Hong Y.; Liu J.; Tseng N. W.; Liu Y.; Zhao E.; Lam J.W.Y.; Tang B. Z.; *J. Mat. Chem. B*, 2, 3919, **2014**. b) Mei J.; Tong J.; Wang J.; Qin A.; Sun J. Z.; Tang B. Z.; *J. Mat. Chem.*, 22, 17063, **2012**.
- 9.- a) Hong Y.; Meng L.; Chen S.; Leung Ch. W. T.; Da L. T.; Faisal M.; Silva D. A.; Liu J.; Lam J. W. Y.; Huang X.; Tang B. Z.; *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1680, **2012**.b) Sun Y.; Liang X.; Fan J.; Han Q.; *J. Lumin.*, 141, 93, **2013**. c) Peng L.; Wei R.; Li K.; Zhou Zh.; Song P.; Tong A.; *Analyst*, 138, 2068, **2013**.
- 10.- a) Shao A.; Guo Zh.; Zhu Sh.; Tian H.; Zhu W.; *Chem. Sci.*, 5, 1383, **2014**. b) Xu J. P.; Fang Y.; Song Zh. G.; Mei J.; Jia L.; Qin A. J.; Sun J. Zh.; Ji J.; Tang Zh.; *Analyst*, 136, 2315, **2011**.

- 11.- Hong Y.; Chen S.; Leung C. W. T.; Lam J. W. Y.; Tang B. Z.; *Chem. Asian J.*, 8, 1806, **2013**.
- 12.- Li Zh.; Dong Y.; Mi B.; Tang Y.; Haussler M.; Tong H.; Dong Y.; Lam J. W. Y.; Ren Y.; Sung H. H. Y.; Wong K. S.; Gao P.; Williams I. D.; Kwok H. S.; Tang B. Z.; *J. Phys. Chem. B*, 109, 10061, **2005**.
- 13.- Nie H.; Chen B.; Zeng J.; Xiong Y.; Zhao Z.; Tang Z.; *J. Mater. Chem. C*, 6, 3690, **2018**.
- 14.- Fedorov, V. I.; Cherkasova, O.P.; Samoilova, E.S.; *Optical Technologies in Biophysics and Medicine V.*, 80, 5474, **2004**.
- 15.- Samoilova, E. S.; Fedorov, V. I.; Cherkasova, O. P.; Meshalkin, Y. P.; *Optical Technologies in Biophysics and Medicine III*, 4707, **2002**.
- 16.- Pérez R. L.; Escandar G. M.; *Microchem. J.*, 118, 141, **2015**
- 17.- Osati S.; Ali H.; Marques F.; Paquette M.; Beaudoin S.; Guerin B. Leyton J.V.; van Lier J. E.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 443, **2017**.
- 18.- Jackson A.; Davis J.; Pither R. J.; Roger A.; Hannon M. J.; *Inorg. Chem.*, 40, 3964, **2001**.
- 19.- Jones G. B.; Hynd G.; Wright J. M.; Purohit A.; Plourde G. W.; Huber R. S.; Mathews J. E.; Li A.; Kilgore M. W.; Bubley G. J.; Yancisin M.; Brown M. A.; *J. Org. Chem.*, 66, 3688, **2001**.
- 20.- Farzaneh S.; Zarghi A.; *Sci. Pharm.*, 84, 409, **2016**.
- 21.- Revankar C. M.; Mitchell H. D.; Field A. S.; Burai R.; Corona C.; Ramesh C.; Sklar L. A.; Arterburn J. B.; Prossnitz E. R.; *ACS Chem. Biol.*, 2, 8, 536, **2007**.
- 22.- Yaya A. R.; Touaibia M.; Massarweh G.; Rochon F. D.; Breau L.; *Steroids*, 75, 7, 489, **2010**.
- 23.- a) Provencher-Mandeville J.; Descoteaux C.; Mandal S. K.; Leblanc V.; Asselin E.; Bérubé G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 7, 2282, **2008**. b) <http://www.rcsb.org/3d-view/1ERE?preset=ligandInteraction&sele=EST> consultado el 13 de enero de **2018**.

- 24.- Abendroth F.; Solleder M.; Mangoldt D.; Welker P.; Licha K.; Weber M.; Seitz O.; *Eur. J. Org. Chem.*, 2157, **2015**.
- 25.- Neto C.; Oliveira M. C.; Gano L.; Marques F.; Yasuda T.; Thiemann T.; Kniees T.; Santos I.; *Steroids*, 77, 11, 1123, **2012**.
- 26.- Baker M. E.; *Steroids*, 78, 337, **2013**.
- 27.- Aris A. Z.; Shamsuddin A. S.; Praveena S. M.; *Environ. Int.*, 69, 104, **2014**.
- 28.- Arterburn J. B.; Venkateswara K.; Perry M. C.; *Tetrahedron Lett.*, 41, 6, 839, **2000**.
- 29.- Kasiotis K. M.; Magiatis P.; Pratsinis H.; Skaltsounis A. L.; Abadji V.; Charalambous A.; Mostatsou P.; Haroutounian S. A.; *Steroids*, 66, 10, 785, **2001**.
- 30.- Devraj R.; Barrett J. F.; Fernandez J. A.; Katzenellenbogen J. A.; Cushman M.; *J. Med. Chem.*, 39, 17, 3367, **1996**.
- 31.- a) Uehara Y.; Hori M.; Takeuchi T.; Umezawa H.; *Jpn J. Cancer Res. GANN*, 76, 672, **1985**.
b) Sasaki K.; Rinehart K. L.; Slomp G.; Grostle M. F.; Olson E. C.; *J. Am. Soc.*, 92, 7591, **1970**.
- 32.-a) Miller P.; Diorio C.; Moyer C.; Schnur R. C.; Bru-skin A.; Cullen W.; Moyer J.; *Cancer Res.*, 54, 2724, **1994**. b) Miller P.; Schnur R. C.; Babacci E.; Moyer M. P.; Moyer J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210, 1313, **1994**.
- 33.- Kuduk S. D.; Harris C. R.; Zheng F. F.; Sepp-Lorenzino L.; Ouerfelli Q.; Rosen N.; Danishefsky S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 11, 1303, **2000**.
- 34.- a) Descoteaux C.; Provencher-Mandeville J.; Mathieu I.; Perron V.; Mandal S. K.; Asselin E.; Bérubé G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 22, 3927, **2003**. b) Gagnon V.; St-Germain M.E.; Descoteaux C.; Provencher-Mandeville J.; Parent S.; Mandal S.K.; Asselin E.; Bérubé G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 23, 5919, **2004**. c) Perron V.; Rabouin D.; Asselin E.; Parent S.; C.-Gaudreault R.; Bérubé G.; *Bioorg. Chem.*, 33, 1, 1, **2005**. d) Provencher-Mandeville J.; Descoteaux C.; Mandal S. K.; Leblanc V.; Asselin E.; Bérubé G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 7, 2282, **2008**.

- 35.-Liu C.; Strobl J. S.; Bane S.; Schilling J. K.; McCracken M.; Chatterjee S. K.; Rahim-Bata R.; Kingston D. G. I.; *J. Nat. Prod.*, 67, 2, 152, **2004**.
- 36.- Sadler S.; Persons K. S.; Jones G. B.; Ray R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 15, 4638, **2011**.
- 37.- Sudhakar G.; Bathula S. R.; Banerjee R.; *Eur. J. Med. Chem.*, 86, 653, **2014**.
- 38.- a) Duggan D. E.; Bowman R. L.; Brodie B. B.; Udenfriend S.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 68, 1, **1957**. b) Weinreb A.; Werner A.; *Chem. Phys. Lett.*, 3, 4, 231, **1969**. c) Weinreb A.; Werner A.; *Photochem. Photobiol.*, 20, 4, 313, **1974**. d) Weinreb A.; Werner A.; Kalman Z. H. ; *Photochem. Photobiol.*, 26, 567, **1977**.
- 39.-Tsai C.; Li C.; Li J.; Jang B.; Chen S.; *J. Fluoresc.*, 26, 4, 1239, **2016**.
- 40.- Lo K.K.; Lee T. K.; Lau J. S.; Poon W. L.; Cheng S.; *Inorg. Chem.*, 47, 200, **2008**.
- 41.- Wust F.; Carlson K. E.; Katzenellenbogen J. A.; Spies H.; Johannsen B.; *Steroids*, 63, 665, **1998**.
- 42.-Skaddan M. B; Wust F. R.; Katzenellenbogen J. A.; *J. Org. Chem.*, 64, 22, 8108, **1999** .
- 43.-Skaddan M. B.; Wust F. R.; Jonson S.; Syhre R.; Welch M. J.; Spies H.; Katzenellenbogen J. A.; *Nucl. Med. Biol.*, 27, 3, 269, **2000**.
- 44.- Gunanathan C.; Pais A.; Furman E.; Seger D.; Eyal E.; Mukhopadhyay S.; Ben-David Y.; Leitús G.; Cohen H.; Vilan A.; Degani H.; Milstein D.; *Bioconjugate Chem.*, 18, 5, **2007**.
- 45.- Rickert E. L.; Oriana S.; Hartman-Frey C.; Long X.; Webb T. T.; Nephew K. P.; Weatherman R. V.; *Bioconjugate Chem.*, 21, 5, 903, **2010**.
- 46.- Céspedes F. J.; Roperó A. B.; Font-Sanchis E.; Nadal A.; Fernández F.; Sastre A.; *Chem. Commun.*, 47, 8307, **2011**.
- 47.- Guguta C.; Eewijk I.; Smits J. M. M.; Gelder R.; *Cryst. Growth Des.*, 8, 3, **2008**.

- 48.- a) Tesis de Maestría de Andrés Aguilar Granda, UMSNH, **2014**. b) Ochoa M. E.; Aguilar-Granda A.; Ramirez-Montes P.I.; Barba V.; López Y.; Santillan R.; Farfán N.; *Cryst. Eng. Comm.*, 18, 6830, **2016**.
- 49.- Osati S.; Ali H.; Guerin B.; E. van Lier J.; *Steroids*, 123, 27, **2017**.
- 50.- Xochitiotzi-Flores E.; Jiménez-Sánchez A.; García-Ortega H.; Sánchez-Puig N.; Romero-Ávila M.; Santillan R.; Farfán N.; *New J. Chem.*, 40, 4500, **2016**.
- 51.- Komatsu K.; Urano Y.; Kojima H.; Nagano T.; *J. Am. Soc.*, 129, 13447, **2007**.
- 52.- Hailong W.; Bin L.; Hui W.; Tong-Liang H.; Zizhu Y.; Wei Z.; Shengchang X.; Banglin Ch.; *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 31, 9963, **2015**.

9. APÉNDICE

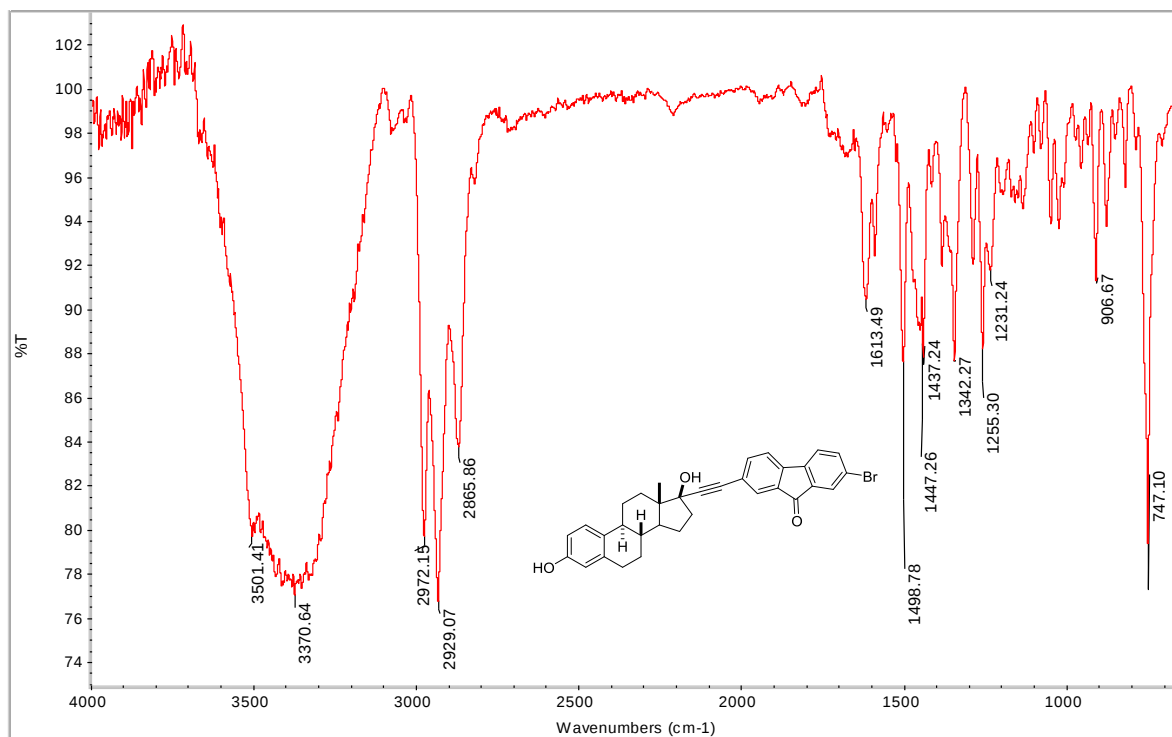


Figura 53. Espectro de IR del compuesto 61.

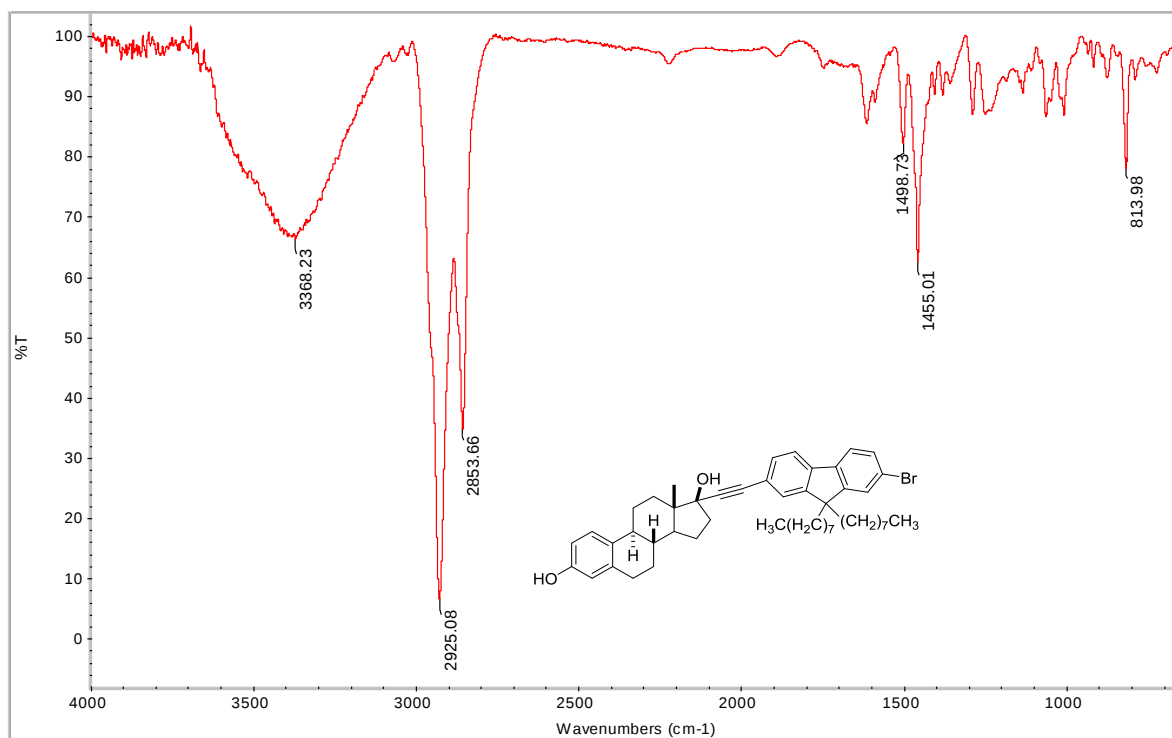


Figura 54. Espectro de IR de 63.

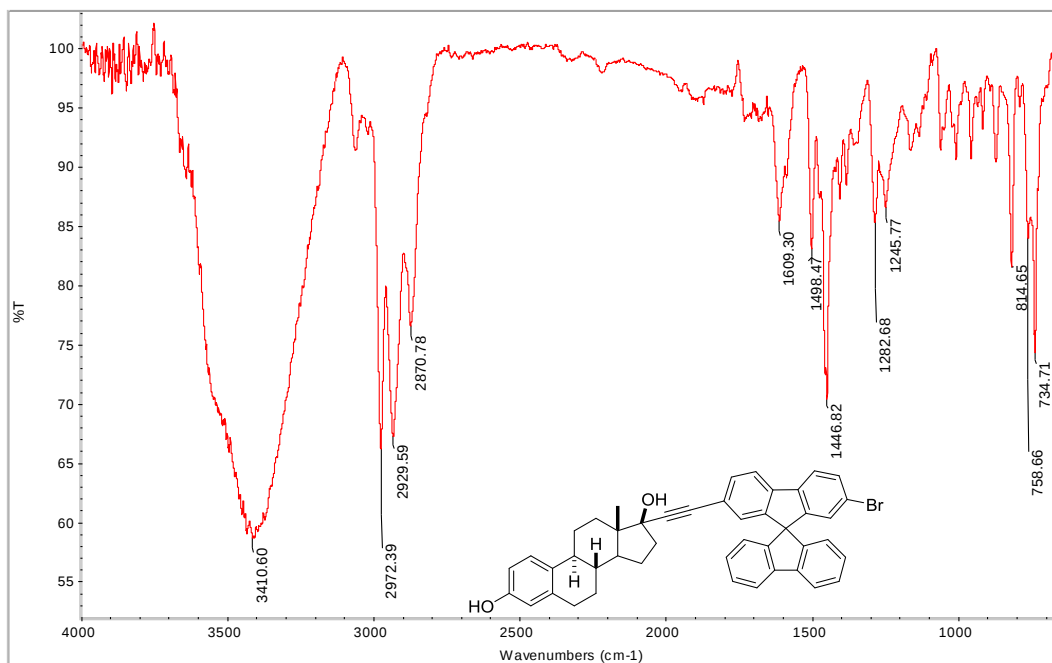


Figura 55. Espectro de IR de 60.

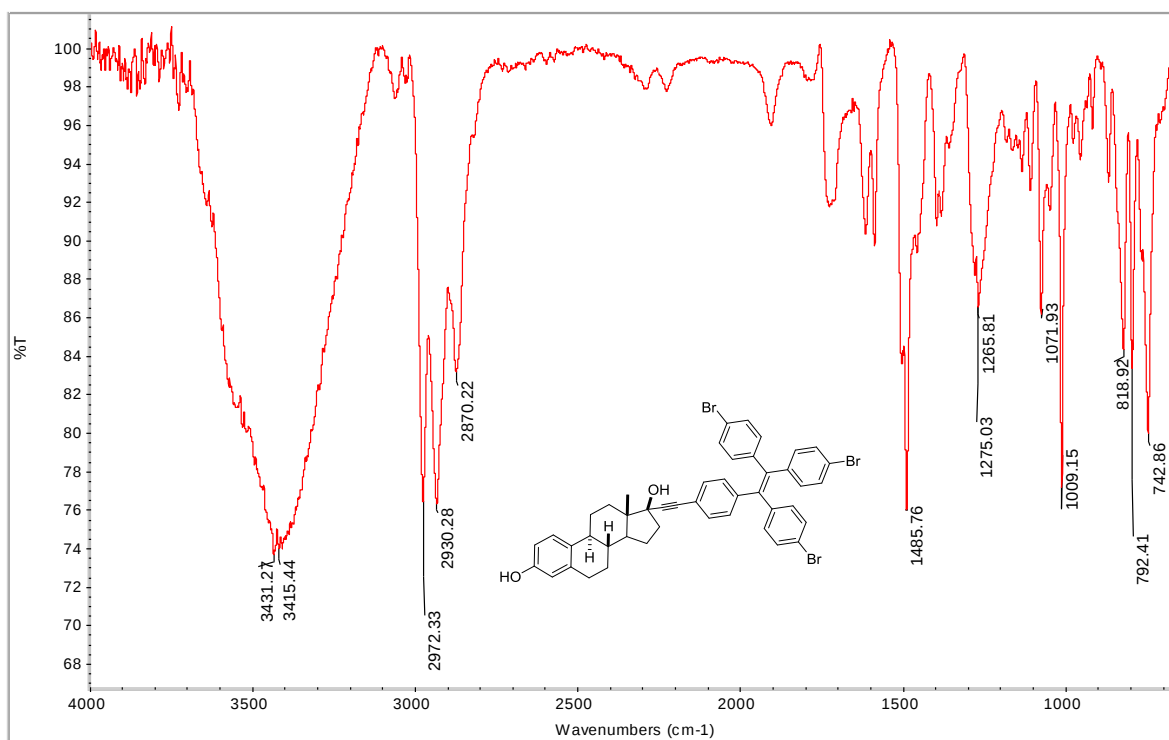
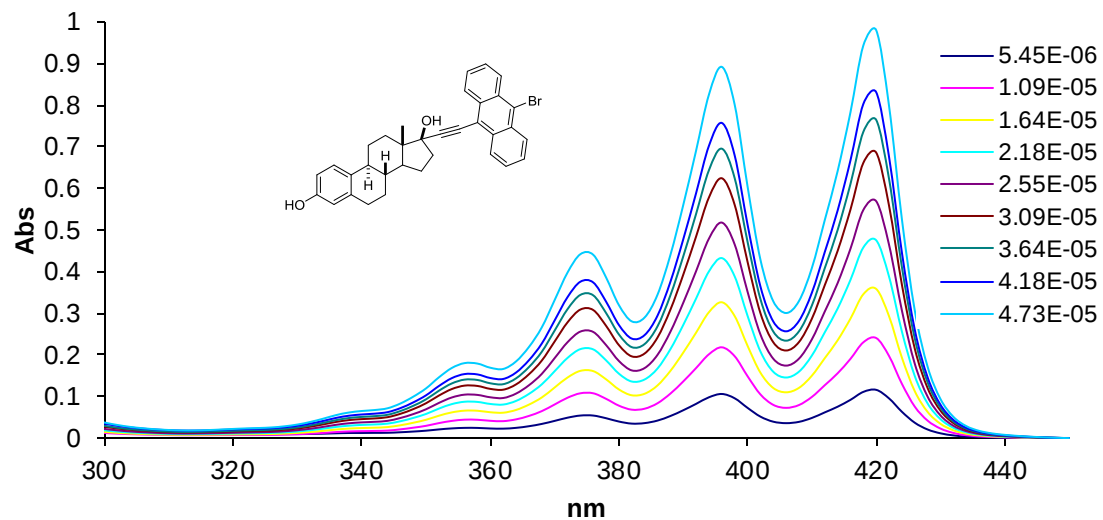
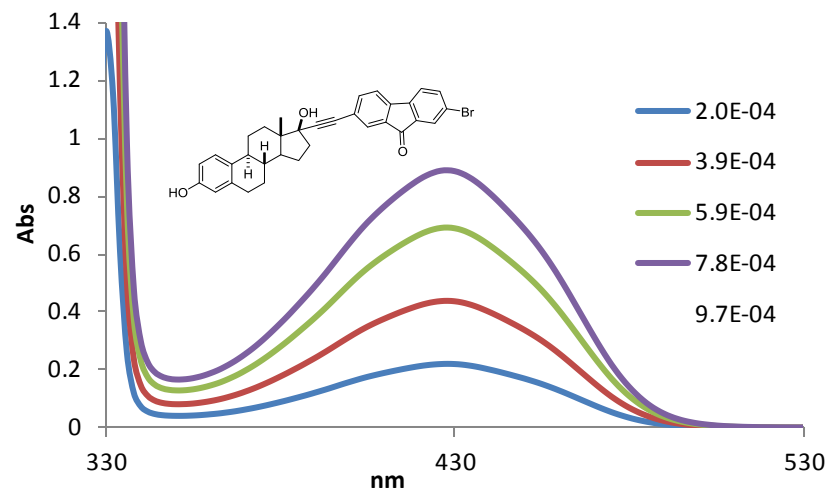


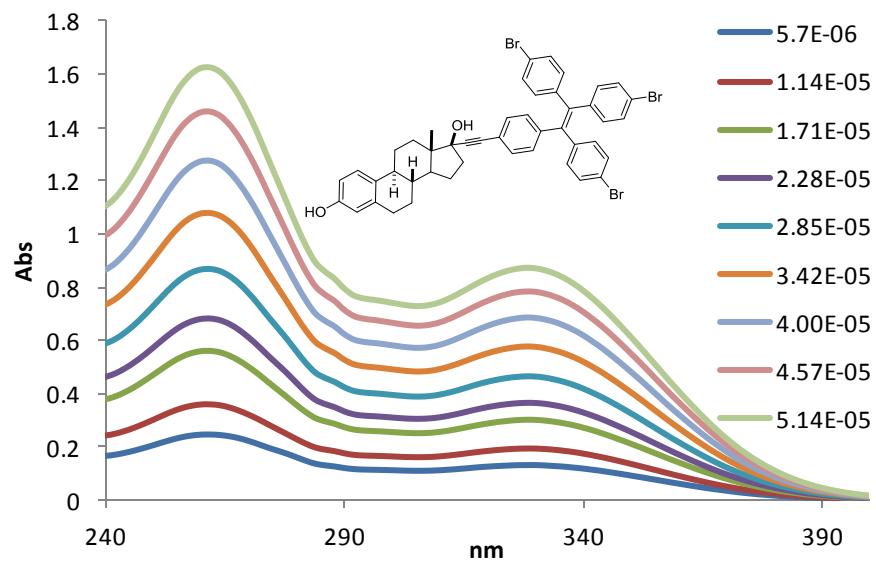
Figura 56. Espectro de IR de 62.



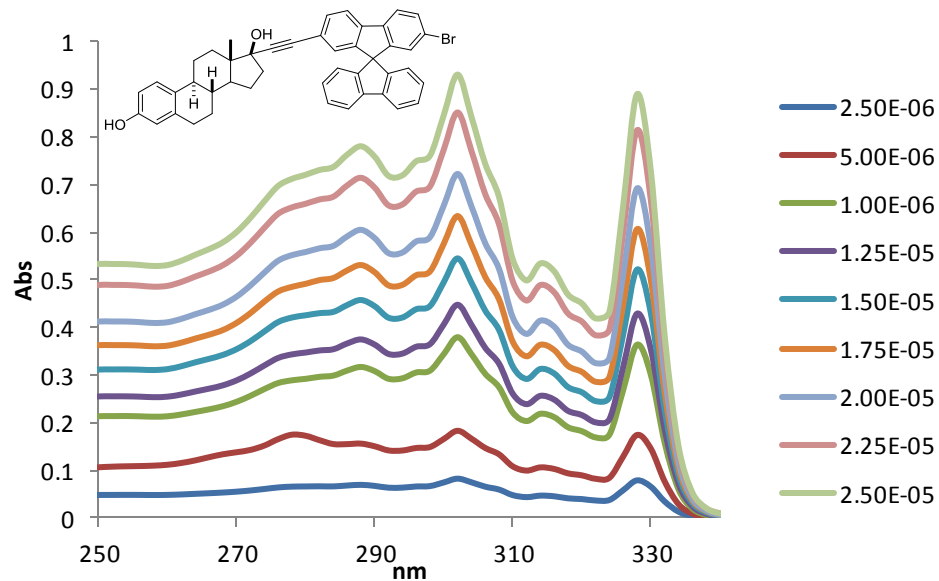
Gráfica 5. Mediciones de UV-Vis de 59.



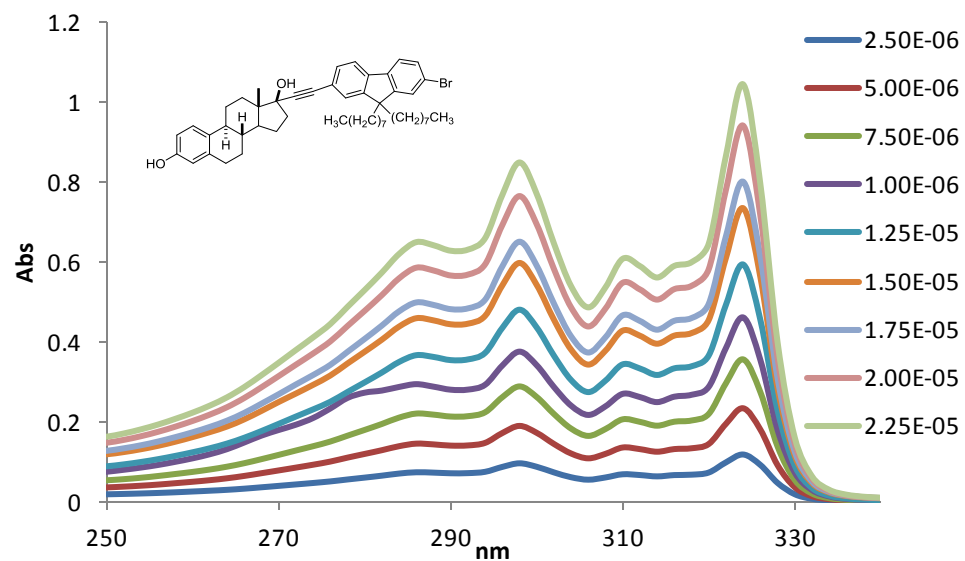
Gráfica 6. Mediciones de UV-Vis de 61



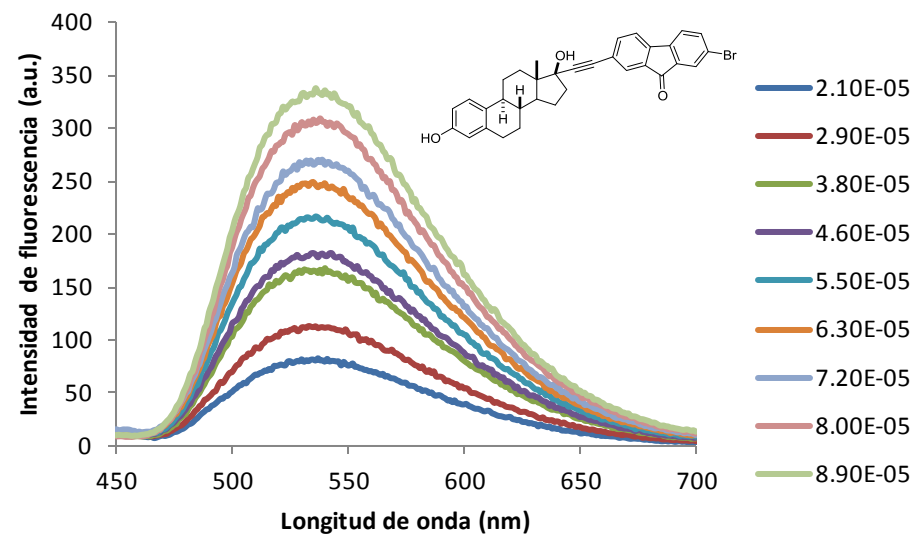
Gráfica 7. Mediciones de UV-Vis de 62



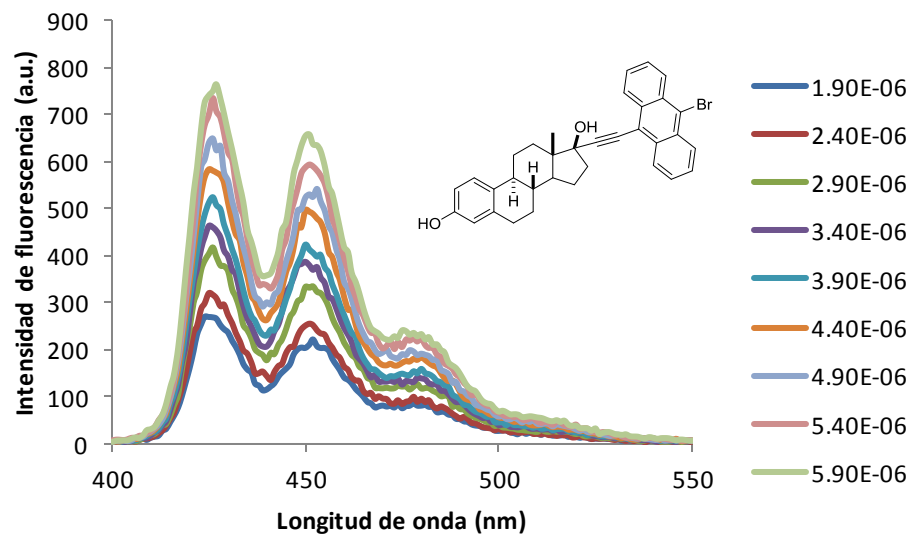
Gráfica 8. Mediciones de UV-Vis de 60



Gráfica 9. Mediciones de UV-Vis de 63.



Gráfica 10. Mediciones de Fluorescencia de 61 una $\lambda_{exc.}$ 428 nm.



Gráfica 11. Mediciones de Fluorescencia de 59 a una $\lambda_{exc.}$ 330 nm.