

54  
2 ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

DESARROLLO DE REACTIVOS FLUORESCENTES  
ALTERNOS AL *isotiocianato de fluoresceína (ITCF)*  
PARA TECNICAS DE INMUNODIAGNOSTICO.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A  
**IBETH OVIEDO CHAVEZ**

DIRECTORES DE TESIS: DR. J. ABEL CIPRIAN CARRASCO  
DR. RENE MIRANDA RUVALCABA

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

260666



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA F.E.S.-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



AT'N: Ing. Jaime de Anda Montañez  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S.-C

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Desarrollo de reactivos fluorescentes alternos al isotiocianato de  
fluoresceína ( ITCF ) para técnicas de inmunodiagnóstico.

que presenta la pasante: Ibeth Oviedo Chávez  
con número de cuenta: 9156095 - 1 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, a 10 de febrero de 1998.

- PRESIDENTE Dr. René Miranda Ruvalcaba
- VOCAL Dr. Marco A. Vega López
- SECRETARIO M. en C. Guillermo Penieres Carrillo
- RIMER SUPLENTE M. en C. Víctor M. Zendejas Buitrón
- SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Andrés Romero Rojas

El trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Química Orgánica L-122 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo asesoría del cDr. René Miranda Ruvalcaba, en colaboración con el Dr. J. Abel Ciprián Carrasco de la Unidad de Estudios de Posgrado de esta Facultad. Asimismo, en el Laboratorio 4 de la Unidad de Investigación en Plantas Medicinales del Instituto de Química, Ciudad Universitaria, bajo responsabilidad del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Este trabajo pertenece a los proyectos de investigación de las cátedras de Microbiología de las Afecciones Respiratorias del cerdo y a los proyectos de Investigación en Química Orgánica.

Parte del trabajo de tesis fue presentado en "*The Sixteenth International Congress of Heterocyclic Chemistry*", realizado en la Universidad del Estado de Montana, Estados Unidos, en agosto de 1997, bajo el nombre: *A mass spectrometric study and synthesis of phthalimide isothiocyanates analogous*. Y otra parte más, en el "*XXX Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas*", realizado en Cancún, Quintana Roo, México, en noviembre de 1997, intitulado: *Síntesis y determinación de parámetros fisicoquímicos del isotiocianato de ftalimida; propuesta para ensayos inmunológicos*.

Se agradece al *Programa Becas Tesis-UNAM UNA-2907227Y5* por su apoyo económico parcial.

## AGRADECIMIENTOS.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por acogerme en su recinto y conducirme en mi superación profesional.

Al **cDr. René Miranda Ruvalcaba** por ser el brazo fuerte en esta investigación, además por brindarme su confianza y apoyo incondicional.

Al **Dr. Mariano Martínez Vázquez** por su constante impulso y motivación, así como su valiosísima ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en especial al **Dr. Abel Ciprián Carrasco** y al **cDr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez** por la idea original de este trabajo y por creer en los resultados que apoya esta tesis, así también a la **Dra. Susana E. Mendoza** por las facilidades recibidas.

Al **jurado** asignado por sus acertadas atribuciones en el mejoramiento de la presente investigación.

A todos los **profesores de esta Facultad** por la formación profesional.

A todas aquellas personas que colaboraron conmigo y por su disposición para ayudarme a lograr mi mayor anhelo.

## DEDICATORIA.

A **Dios**, por representar mi más grande ser de benevolencia, por ser la luz que alumbra mi camino y el alimento que nutre mi espíritu.

A mi padre **Francisco Oviedo**, por sus desvelos y sacrificios y por ser mi gran ejemplo de vida y superación.

A mi madre **Guillermina Chávez**, por su inmenso cariño y dedicación.

A mis hermanos **Iram, Javier, Aldo y Vianney** por ser guía en mi camino y parte esencial en mi vida.

A **mamita y Miriam**, por su especial cariño.

A **Gloria** y a mi **sobrino(a)** que esta en proceso de formación.

A mis amigas **Bety, Julia, Lupita, Claudia, Nelly y Nereyda**, gracias por mostrarme una amistad sincera.

A mis **compañeros de escuela**.

A **todas aquellas personas** que me han demostrado su cariño y estimación y con quienes he compartido momentos agradables.

A une personne très special, **JEG**, je t'aime.

**"A la vida por mostrarme que existen sitios increíbles y maravillosos de triunfo y consolidación, y que se llega a ellos a través de senderos abruptos y a base de constancia y perseverancia"**

*Ibeth Oviedo Chávez.*

# ÍNDICE.

	pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. RESUMEN .....	1
<b>II. INMUNOMARCADORES</b> .....	<b>4</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	4
2. ELECCIÓN DEL MARCADOR .....	5
2.1. Características del marcador fluorescente .....	5
2.2. Sensibilidad y especificidad de los reactivos fluorescentes .....	6
2.3. Proporción ligando-marcador .....	8
3. TRANSICIONES CONFORMACIONALES EN LOS SITIOS DE UNIÓN DEL ANTICUERPO .....	8
<b>III. MARCADORES AMINOREACTIVOS</b> .....	<b>9</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. APLICACIONES DE LOS MARCADORES AMINOREACTIVOS .....	10
2.1. Marcado de biomoléculas .....	10
2.2. Preparación del bioconjugado óptimo .....	10
3. REACTIVIDAD DE LOS GRUPOS AMINO .....	13
<b>IV. FLUORESCÉINA</b> .....	<b>15</b>
1. LAS PROPIEDADES ESPECTRALES DE LA FLUORESCÉINA .....	15
2. EL ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA .....	15

<b>V. SUSTITUTOS DE LA FLUORESCÉINA .....</b>	<b>17</b>
1. SUSTITUTOS DE LA FLUORESCÉINA .....	17
1.1. Alexa 488. El mejor sustituto de fluoresceína .....	18
1.2. Verde oregon 488 .....	19
1.3. Colorantes verde rodol y verde rodamina .....	19
<b>VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>21</b>
JUSTIFICACIÓN .....	21
OBJETIVOS .....	22
HIPOTESIS .....	22
<b>VII. METODOLOGÍA .....</b>	<b>23</b>
1. DIAGRAMA DE FLUJO .....	23
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	24
2.1. Reducción del grupo nitro .....	24
2.2. Obtención del isotiocianato de ftalimida .....	25
<b>VIII. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
1. Espectroscopía de IR, EM, RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C. ....	27
2. Densidad de carga total de las moléculas obtenidas, propuesta por MINDOO/3 HYPER CHEM. ....	43
3. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de las moléculas obtenidas, propuestos por MINDOO/3 HYPER CHEM. ....	45
4. Patrón de fragmentación de las moléculas obtenidas. ....	49
5. Asignación de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C. ....	50
6. Cuadros de datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>13</sup> C y	

	pág.
EM. ....	51
<b>IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
A) ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS. ....	53
B) RELACIÓN ENTRE LA RMN <sup>13</sup> C Y LA DENSIDAD DE CARGA TOTAL. ....	55
C) MAPAS DE ENERGÍA POTENCIAL PARA LOS ORBITALES MOLECULARES HOMO Y LUMO. ....	56
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	pág.
Fig. 1. Síntesis del isotiocianato de ftalimida. ....	2
Fig. 2. Moléculas fluorescentes aminoreactivas. ....	11
Fig. 3. Otros fluorocromos usados en inmunoensayos. ....	12
Fig. 4. Reacción de una amina primaria con un isotiocianato. ....	15
Fig. 5. Fluorescencia relativa de algunos fluorocromos. ....	16
Fig. 6. Espectro de IR de 3-aminoftalimida. ....	27
Fig. 7. Espectro de EM de 3-aminoftalimida. ....	28
Fig. 8. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-aminoftalimida. ....	29
Fig. 9. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 3-aminoftalimida. ....	30
Fig. 10. Espectro de IR de 4-aminoftalimida. ....	31
Fig. 11. Espectro de EM de 4-aminoftalimida. ....	32
Fig. 12. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 4-aminoftalimida. ....	33
Fig. 13. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 4-aminoftalimida. ....	34
Fig. 14. Espectro de IR de 3-isotiocianato de ftalimida. ....	35
Fig. 15. Espectro de EM de 3-isotiocianato de ftalimida. ....	36
Fig. 16. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-isotiocianato de ftalimida. ....	37
Fig. 17. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 3-isotiocianato de ftalimida. ....	38
Fig. 18. Espectro de IR de 4-isotiocianato de ftalimida. ....	39
Fig. 19. Espectro de EM de 4-isotiocianato de ftalimida. ....	40
Fig. 20. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 4-isotiocianato de ftalimida. ....	41
Fig. 21. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 4-isotiocianato de ftalimida. ....	42
Fig. 22. Densidad de carga total de 3-aminoftalimida y 4-aminoftalimida, propuesta por MINDOO/3 HYPER CHEM. ....	43
Fig. 23. Densidad de carga total de 3-isotiocianato de ftalimida y 4-isotiocianato de ftalimida, propuesta por MINDOO/3 HYPER CHEM. ....	44
Fig. 24. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 3-aminoftalimida, propuesto por MINDOO/3 HYPER CHEM. ....	45
Fig. 25. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 4-aminoftalimida, propuesto por MINDOO/3 HYPER CHEM. ....	46
Fig. 26. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 3-isotiocianato de ftalimida, propuesto por MINDOO/3 HYPER CHEM. ....	47

Fig. 27. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 4-isotiocianato de ftalimida, propuesto por MINDOO/3 HYPER CHEM.	48
Fig. 28. Patrón de fragmentación de las moléculas <u>3</u> y <u>4</u> .	49
Fig. 29. Asignación de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ RMN para las ftalimidias <u>3</u> y <u>4</u> .	50

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Marcadores más utilizados en técnicas de diagnóstico inmunológico.	4
Cuadro 2. Propiedades espectrales de los fluoroforos aminoreactivos.	9
Cuadro 3. Propiedades de algunas sustancias fluorescentes usadas en inmunoensayos.	13
Cuadro 4. La fluoresceína y sus sustitutos.	17
Cuadro 5. RMN $^1\text{H}$ de las ftalimidias <u>3</u> y <u>4</u> .	51
Cuadro 6. RMN $^{13}\text{C}$ de las ftalimidias <u>3</u> y <u>4</u> .	51
Cuadro 7. Abundancia relativa (ar, % pico base) de los principales iones en el espectro de masas* 70 eV de las ftalimidias <u>3</u> y <u>4</u> .	52

## ABREVIATURAS.

<i>A-10235</i>	Kit de marcado proteínico Alexa 488	<i>DAC</i>	disolución amortiguadora de carbonatos
<i>Ab</i>	anticuerpo	<i>DANS</i>	cloruro de sulfonilo de 1dimetilaminonaftaleno o cloruro de dansilo
<i>AbF</i>	anticuerpos fluorescentes	<i>dd</i>	señal doble de doble
<i>AcOEt</i>	acetato de etilo	<i>DD</i>	deseccación requerida
<i>AcOH</i>	ácido acético	<i>DMF</i>	dimetilformamida
<i>Ac<sub>2</sub>O</i>	anhídrido acético	<i>DMSO</i>	dimetilsulfóxido
<i>Ag</i>	antígeno	<i>DMSO-d<sub>6</sub></i>	dimetilsulfóxido deuterado
<i>AN</i>	naranja de acridina	<i>EM</i>	espectrometría de masas
<i>ANS</i>	ácido anilinaftalensulfónico	<i>EMIE</i>	espectrometría de masas por impacto electrónico
<i>ar</i>	absorbancia relativa	<i>EMAR</i>	espectrometría de masas de alta resolución
<i>ASC</i>	cloruro de sulfonilo de antraceno	<i>eV</i>	electron volts
<i>atm</i>	atmósfera	<i>F</i>	almacenamiento recomendado a -20 °C
<i>BEEN-EK</i>	nombre de un conjugado fluorescente	<i>F-143</i>	5-isotiocianato de fluoresceína
<i>C</i>	carbono	<i>F-144</i>	6-isotiocianato de fluoresceína
<i>°C</i>	grados celsius	<i>F-1163</i>	diacetato del 5-isotiocianato de fluoresceína
<i>CA</i>	condiciones de almacenamiento	<i>3-FC</i>	3-fenilcumarina
<i>Ca</i>	California	<i>fig</i>	figura
<i>cc</i>	cromatografía en columna	<i>FSC</i>	sulfonilcloruro de fluoresceína
<i>CDCl<sub>3</sub></i>	cloroformo deuterado	<i>g</i>	gramos
<i>CEM</i>	coeficiente de extinción molar	<i>H<sub>2</sub></i>	hidrógeno molecular
<i>CeSO<sub>4</sub></i>	sulfato cérico	<i>HCl</i>	ácido clorhídrico
<i>CHCl<sub>3</sub></i>	cloroformo	<i>HNO<sub>3</sub></i>	ácido nítrico
<i>CSCl<sub>2</sub></i>	tiofosgeno	<i>HOMO</i>	orbital molecular ocupado de mayor energía
<i>cm</i>	centímetros		
<i>d</i>	señal doble		
<i>D</i>	deseccación recomendada		
<i>Da</i>	dalton		

$H_2O$	agua	<i>n-Hex</i>	hexano
Hz	hertz	<i>nm</i>	nanómetros
<i>IET</i>	inmunoelctrotransferencia	$NO_2$	sustituyente nitro
<i>IgG</i>	inmunoglobulina tipo G	<i>No. Cat.</i>	número de catálogo
<i>IR</i>	espectrofotometría de absorción en el infrarrojo	<i>ns</i>	nanosegundos
<i>ITCF</i>	isotiocianato de fluoresceína	<i>O-6080</i>	isotiocianato de verde oregon 488
<i>3-ITFA</i>	3-isotiocianato de ftalimida	<i>OH</i>	grupo hidroxilo
<i>4-ITFA</i>	4-isotiocianato de ftalimida	<i>pb</i>	pico base
<i>J</i>	Joules	<i>Pd/C</i>	paladio soportado sobre carbono
<i>KBr</i>	bromuro de potasio	<i>p.ej.</i>	por ejemplo
<i>l</i>	levógiro	<i>p.f.</i>	punto de fusión
<i>LL</i>	proteger de la luz, especialmente en disolución	<i>pKa</i>	constante de ionización
<i>LUMO</i>	orbital molecular desocupado de menor energía	<i>PM</i>	peso molecular
<i>M</i>	molaridad	<i>ppm</i>	partes por millón
$M^+$	ión molecular	<i>QY</i>	campo cuántico de fluorescencia
<i>MDFP</i>	2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)-furona	<i>R-6111</i>	éster de succinimido de rodol verde
<i>MeOH</i>	metanol	<i>R-6150</i>	5(6)-clorhidrato del ácido carboxílico de rodamina verde
<i>mg</i>	miligramos	<i>RBIC</i>	isocianato de rodamina B
<i>MHz</i>	megahertz	<i>RBITC</i>	isotiocianato de rodamina B
<i>mL</i>	mililitros	<i>RBSC</i>	cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B
<i>mmol</i>	milimoles	<i>RMN <sup>1</sup>H</i>	resonancia magnética nuclear protónica
<i>1-MP</i>	1-maleimidopireno	<i>RMN <sup>13</sup>C</i>	resonancia magnética nuclear de carbono 13
<i>m/z</i>	relación masa/carga	<i>s</i>	señal simple
<i>N</i>	nitrógeno	<i>seg</i>	segundos
<i>NaCl</i>	cloruro de sodio	<i>T.A.</i>	temperatura ambiente
$NaHCO_3$	bicarbonato de sodio	<i>THF</i>	tetrahidrofurano
$Na_2SO_4$	sulfato de sodio	<i>TMRITC</i>	isotiocianato de tetrametil-rodamina
<i>NCS</i>	sustituyente isotiocianato	<i>TMS</i>	tetrametilsulfóxido
<i>3-NF</i>	3-aminoftalimida		
<i>4-NF</i>	4-aminoftalimida		
$NH_2$	sustituyente amino		
$NH_4OH$	hidróxido de amonio		

<i>USA</i>	Estados Unidos
<i>UV</i>	ultravioleta
$\alpha$	alfa
$\epsilon$	epsilon
$\delta$	delta
$\Delta$	calor
$\sigma$	desplazamiento químico
$\lambda_{abs}$	longitud de onda de absorción
$\lambda_{em}$	longitud de onda de emisión

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. RESUMEN.

En la actualidad se emplean ampliamente las técnicas fluorescentes, sobre todo en Biología y Química. La *inmunofluorescencia* o método de *Anticuerpos Fluorescentes (AbF)*, se fundamenta en la reacción *antígeno-anticuerpo*, *Ag-Ab*, en la cual, el anticuerpo se conjuga químicamente a un fluorocromo, sin alterar su especificidad inmunológica y, al contacto con el antígeno homólogo, se produce la reacción inmunológica. En el microscopio de luz *UV*, el complejo emite un color fluorescente, que dependerá del fluorocromo empleado (1).

La atención se enfocó a un grupo de compuestos fluorescentes de bases bien fundamentadas, aplicados principalmente como marcadores inmunológicos en pruebas de diagnóstico *in vitro*.

Para distinguir los anticuerpos marcados, era necesario contar con un fluorocromo cuya  $\lambda_{em}$  fuera diferente de la que exhiben por autofluorescencia los tejidos animales y vegetales en las preparaciones. En la elección de los fluorocromos desarrollados se contemplaron las siguientes aseveraciones: A) la fluorescencia verde-amarillenta no es común en tejidos mamíferos, B) la retina humana es extremadamente sensible a la longitud de onda en estudio (370-600 nm) (2).

El isotiocianato de fluoresceína (ITCF) ha sido el reactivo de excelencia en pruebas de inmunofluorescencia, por: emitir fluorescencia bajo luz *UV* a la longitud de onda óptima de 488 nm, formar complejos con inmunomoléculas (anticuerpos, antígenos, factores del complemento), y conservar su estabilidad durante y después del ensayo (3). Basándose en la naturaleza física y química de este compuesto, se idearon moléculas afines que cubrieran los requisitos necesarios para ser fluorocromos competitivos. Se analizaron los fluorocromos, en particular, el ITCF y los propuestos: *3-aminofthalimida* (3-NF), *4-aminofthalimida* (4-NF), *3-isotiocianato de ftalimida* (3-ITFA) y *4-isotiocianato de ftalimida* (4-ITFA). Hasta el momento, los fluorocromos señalados no se han utilizado en la preparación de bioconjugados, no obstante, son moléculas muy prometedoras por su naturaleza fluorescente, con una  $\lambda_{em}$  de 365 nm, además, por la presencia del grupo sustituyente, amino e isotiocianato (que participan, directa o indirectamente, en la unión al grupo  $\epsilon$ -amino de lisina del anticuerpo) (4, 5, 6, 7).

Estos compuestos fluorescentes pertenecen a la familia de las ftalimidas, similares a las hidrazinas, característicamente fluorescentes (6). Su síntesis se planeó en analogía a la de 5-aminoftalhidrazina, o luminol (8), y a la de ITCF (9).

El primero inicia a partir de la reacción del ácido 3-nitroftálico con la hidrazina para formar la 5-aminoftalhidrazina; enseguida se transforma al amino correspondiente a través de una reducción, así se comporta como ion dipolar en disolución, en tanto que, en medio alcalino se convierte en su dianión, que al ser oxidado por oxígeno molecular da un intermediario quimioluminiscente (8,10). En el caso del ITCF, el ácido 4-nitroftálico se calienta con resorcina produciéndose la nitrofluoresceína; el producto crudo es reflujaado en anhídrido acético y, los diacetatos de nitrofluoresceína resultantes, son disociados por cristalización fraccional; la reducción catalítica produce la respectiva aminofluoresceína, y finalmente se obtiene el isotiocianato en un sistema con tiofosgeno (9, 11).

De esta manera se ideó la síntesis del *isotiocianato de ftalimida* (fig. 1) donde el anhídrido ftálico (**1**) en calentamiento con ácido nítrico originaron los isómeros 3- y 4- del ácido nitroftálico, los cuales se separaron por cristalización (12, 13). Luego, en anhídrido acético se formaron los respectivos diacetatos (12, 14). Enseguida se produjo la nitroftalimida (**2**) por imidación (15), y se sometió a hidrogenación (8, 16, 17), promoviendo la aminoftalimida (**3**). Después, al reaccionar con tiofosgeno (11, 18) se obtuvieron los derivados del *isotiocianato de ftalimida* (ITFA) (**4**). Asimismo, se realizó un análisis electrónico molecular por medio del método de cómputo MINDOO3 Hyper Chem, para conocer la reactividad de las moléculas y fundamentar su posible éxito en la formación de inmunocombinados fluorescentes.

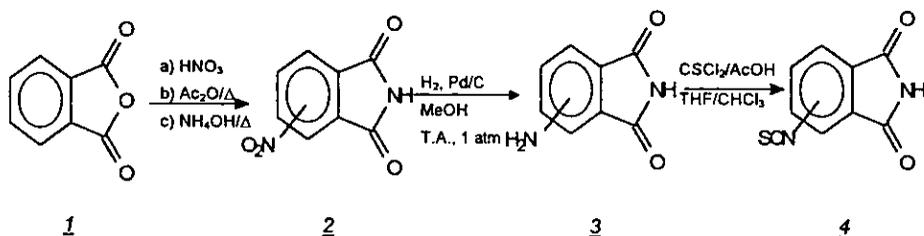


Fig. 1. Síntesis del isotiocianato de ftalimida. Los isómeros del ITFA se obtienen a través de una serie de reacciones a partir del anhídrido ftálico, reactivo inicial para la síntesis de luminol e isotiocianato de fluoresceína (12-18).

De este modo, se adquirieron moléculas fluorescentes, que se aplicarán en un futuro próximo, en la preparación de conjugados para el diagnóstico de neumonía enzoótica, enfermedad infecciosa del tracto respiratorio del cerdo, cuyo agente causal es el *Mycoplasma hyopneumoniae*. Recientemente en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México, se elaboró el primer conjugado fluorescente para evaluar tal enfermedad. El reactivo, conocido como BEEN-EK, consiste básicamente en una inmunoglobulina IgG de cerdo anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* unida a ITCF. Desde entonces, se dispone de un inmunoconjugado específico, de calidad extraordinaria y de fácil aplicación, que brinda resultados auténticos (19).

## II. INMUNOMARCADORES

**1. INTRODUCCIÓN.**

Los métodos inmunológicos se destinan a la determinación cualitativa y/o cuantitativa de biomoléculas de interés, se reconocen por su especificidad, sensibilidad, practicabilidad y amplia aplicación. Fundamentalmente se basan en la reacción inmunológica antígeno (Ag) -anticuerpo (Ab), que permite descubrir antígenos *in situ*, sin previo aislamiento. Para ello, el anticuerpo producido *in vivo*, se vincula a un trazador (cuadro 1) (2, 20).

**Cuadro 1.** Marcadores más utilizados en técnicas de diagnóstico inmunológico (20).

<b>Marcador</b>	<b>Método de detección</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Aplicaciones recomendadas</b>
<b>Yodo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Contador gamma</li> <li>* Película de rayos X</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Fácil de cuantificar</li> <li>* Fácil para el marcado directo</li> <li>* Sensibilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Vida media corta</li> <li>* Peligro para la salud</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inmunoensayos cuantitativos y cualitativos</li> <li>* Inmuno-electrotransferencia (IET)</li> </ul>
<b>Enzima</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sustratos cromogénicos detectados visualmente o por absorbancia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Larga vida de anaquel</li> <li>* Sensibilidad</li> <li>* Visualización directa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Varios pasos peligrosos</li> <li>* Enzimas endógenas</li> <li>* Poca resolución en citoquímica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inmunohistoquímica</li> <li>* Inmunoensayos cuantitativos y cualitativos</li> <li>* IET</li> </ul>
<b>Fluorocromo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Excitación UV y emisión visible</li> <li>* Microscopía de fluorescencia o fluorímetro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Larga vida de anaquel</li> <li>* Buena resolución en inmunocitoquímica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Autofluorescencia</li> <li>* Atenuación</li> <li>* Pasos múltiples</li> <li>* Baja sensibilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inmunocitoquímica</li> <li>* Distribución celular</li> </ul>
<b>Compuestos biosintéticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Película</li> <li>* Contador de centelleo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Facilidad</li> <li>* No daña el anticuerpo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Baja sensibilidad</li> <li>* Corta vida de anaquel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inmunoensayos</li> <li>* IET</li> </ul>

## 2. ELECCIÓN DEL MARCADOR.

Como se observa en el cuadro 1, muchos inmunoensayos involucran el uso de reactivos marcadores. Un marcador es una sustancia que se une a una molécula inmunológica y produce una señal tangible y/o medible, para la identificación y cuantificación del evento inmunológico, el cual es imperceptible en ausencia de él. Los marcadores pueden ser simples compuestos inorgánicos, elementos iguales al analito, complejos orgánicos o sustancias bioquímicas (3).

El presente trabajo se enfoca al estudio de marcadores fluorescentes.

### 2.1. Características del marcador fluorescente.

Los marcadores fluorescentes permiten detectar componentes particulares dentro de un complejo biomolecular, incluyendo células vivas, con exquisita sensibilidad y selectividad. Un marcador fluorescente es un fluoroforo destinado a localizar un espécimen biológico en una región específica, o para responder a un estímulo especial. Químicamente son hidrocarburos poliaromáticos o heterocíclicos, de configuración plana, cuyos sustituyentes al anillo aromático central son de carácter auxocrómico (21, 22).

Una consideración importante es la dimensión física de la molécula trazadora. En tamaño, los marcadores fluorescentes van desde moléculas pequeñas de aproximadamente 1 nm de diámetro, hasta las microesferas de poliestireno con un diámetro de 15 nm (23).

La cantidad de fluorescencia de un colorante determinado depende de la eficiencia con la que absorben y emiten fotones, y su capacidad para experimentar ciclos repetidos de absorción/emisión. La eficiencia en la absorción y la emisión son cuantificados en términos del coeficiente de extinción molar (CEM o epsilon) para la absorción y el campo cuántico (QY) para la fluorescencia. Ambos son constantes bajo ciertas condiciones ambientales. El valor de epsilon es especificado en una sola longitud de onda ( $\lambda$ ) (usualmente el máximo de absorción), mientras QY es una medida de la emisión total de fotones sobre el perfil espectral de fluorescencia. El rango de estos parámetros para los fluoroforos de importancia, oscila entre 5000 a 200000  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$  para epsilon y 0.05-1.0 para QY (22).

Para ser un efectivo trazador de la morfología celular, el marcador fluorescente o cualquier molécula detectable debe ser capaz de introducirse en la entidad estructural de interés y retenerse permanentemente en esa estructura. Si se usa en células vivas, el trazador también debe ser biológicamente inerte y no tóxico (23).

## **2.2. Sensibilidad y especificidad de los reactivos fluorescentes.**

La sensibilidad de las moléculas fluorescentes se ve afectada por diferentes circunstancias, a continuación se mencionan cada una de ellas.

Al acoplar una molécula de fluoresceína con una proteína se reduce el QY de fluorescencia en un 60%, pero sólo disminuye el epsilon en un 10%, la causa principal se atribuye al fenómeno de atenuación, proceso bimolecular que reduce el campo cuántico de fluorescencia, sin modificar el espectro de emisión, y resulta de interacciones pasajeras en el estado excitado o de la formación de especies no fluorescentes (22).

Bajo condiciones de alta iluminación, la destrucción irreversible o fotoblanqueo del fluoroforo excitado puede afectar la detectabilidad de la fluorescencia. El fotoblanqueo en la fluoresceína es producto de múltiples reacciones fotoquímicas, siendo las más comunes las reacciones entre las moléculas fluorescentes adyacentes (22).

Otros factores que pueden afectar la fluorescencia, y en consecuencia la sensibilidad de un fluoroforo son (22):

1. La polaridad del disolvente: Cuando las moléculas del soluto interactúan con las del disolvente, se origina una transferencia electrónica intermolecular en el fluoroforo y varía finalmente el campo cuántico y el espectro de emisión de fluorescencia (21).
2. La concentración y la proximidad de especies atenuantes: Muchos fluoroforos pueden ser atenuados por las proteínas debido a las interacciones y la transferencia electrónica entre los aminoácidos aromáticos (2).

3. El pH del medio en disolución: La fluoresceína es un fluoroforo dependiente del pH. Estructuralmente, su sensibilidad al pH se debe a la reconfiguración en el sistema electrónico durante la protonación (2).

En general, la gran sensibilidad del fluorocromo está dada por (3),

1. Una excelente especificidad del marcador.
2. Un amplio campo, y el mínimo grado de error del instrumento de medición.
3. La conservación de la especificidad del marcador (ningún indicio de señales inespecíficas significantes).
4. La señal de detección no debe ser sujeto de interferencias.
5. Nulo o mínimo índice de atenuación y fotoblanqueo del fluoroforo.

La sensibilidad de un fluoroforo puede modificarse por alteraciones estructurales hasta obtener la especificidad deseada. Así, en la fluoresceína, la conversión de los grupos 3' y 6'-OH a ésteres de acetato, produce el diacetato de fluoresceína, molécula neutra permeable a la membrana. Este proceso hace que la fluoresceína adopte la configuración de lactona no fluorescente, que prevalece a pH bajo; y la unión de los acetatos a las esterasas de la membrana libera la fluoresceína aniónica fluorescente, en condiciones de pH apropiadas (22).

El proceso de marcado puede destruir los sitios de unión de las moléculas reactantes, pero quizá no modifiquen significativamente su especificidad inmunológica. En principio, el marcador debe ser altamente específico (en relación al número de eventos observables / unidad de tiempo / unidad de masa), sin embargo la especificidad se ve afectada por (3):

1. La diferencia en el tamaño del marcador y la molécula marcada.
2. El puente molecular que conecta a las dos moléculas, puede interferir en el reconocimiento inmunológico.
3. El conjugado fluorescente puede contener moléculas de fluorocromo libres.
4. Las moléculas del fluorocromo pueden bloquear los sitios de vinculación del anticuerpo con el antígeno.
5. La presencia de otras proteínas marcadas, debido a la unión del fluorocromo con componentes de la preparación a analizar, o a su ineficiente eliminación (2, 24).

### 1.3. Proporción ligando-marcador.

La proporción *ligando-marcador* se refiere a la relación molecular, con base al peso molecular (PM) de cada reactante. En el caso de reactivos cuyo peso molecular difiere grandemente, la proporción ligando-marcador no es la misma. La formación del complejo inmunológico depende del tamaño, de la afinidad immunoquímica, la reactividad, y las constantes de difusión de sus constituyentes. Cuando el trazador asemeja el comportamiento del analito, el cociente ligando-marcador se mantiene en el mínimo, o sea, uno.

En ensayos con anticuerpos marcados se desea obtener una señal en el menor límite de detección. De ahí, se ha intentado aumentar la relación marcador-anticuerpo, pero suelen presentarse problemas de impedimento estérico o inespecificidad del conjugado. Muchos investigadores coinciden en una proporción óptima 1:1 (3).

### 3. TRANSICIONES CONFORMACIONALES EN LOS SITIOS DE UNIÓN DEL ANTICUERPO.

La reacción *Ag-Ab*, deriva de la complementariedad, que por su naturaleza, crea especificidad macromolecular y determina el grado de afinidad intrínseca. La transición conformacional en la *unidad complementaria* (porción de vinculación entre un anticuerpo y su antígeno homólogo) resulta de los arreglos en los sitios de conjugación del anticuerpo, y requiere de cierta energía o de una fuente de calor, aunque no son necesarios los cambios conformacionales en el complejo inmunológico.

La fluoresceína es un hapteno que se ajusta en el contorno del epítipo completo. Se cree que el comportamiento es totalmente epitópico, involucrando sólo zonas de alta afinidad del anticuerpo hacia su antígeno específico (3).

### III. MARCADORES AMINOREACTIVOS

## 1. INTRODUCCIÓN.

Los fluoroforos marcadores de interés pertenecen al grupo de sustancias aminoreactivas (cuadro 2), pues se vinculan a un grupo amino de la molécula en estudio, siendo su más amplia y fructífera aplicación biológica como colorantes para el marcado de biomoléculas y la derivación de compuestos de bajo peso molecular. Se aplican en biología celular, bioquímica, biofísica, microbiología, biología molecular, citoquímica, entre otras (7).

Cuadro 2. Propiedades espectrales de los fluoroforos aminoreactivos (25).

<i>Fluoroforo</i>	$\lambda_{abs}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	<i>Notas</i>
<i>Alexa 488</i>	491	515	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sustituto de fluoresceína brillante y fotoestable.</li> <li>* Tiene una sola <math>\lambda_{em}</math>.</li> <li>* Insensible al pH 4-10.</li> <li>* Ideal para la excitación en la línea espectral de absorción laser del ión argón a 488 nm.</li> <li>* No. Cat. A-10235</li> </ul>
<i>Fluoresceína</i>	494	519	<ul style="list-style-type: none"> <li>* fluorocromo verde más ampliamente usado.</li> <li>* Absorción en la línea de absorción laser de argón a 488 nm.</li> <li>* Susceptible al fotoblanqueo.</li> <li>* Sensible al pH 5-8.</li> <li>* El ester succinimidílico de 5-fluoresceína (F-6130) es el reactivo óptimo para la conjugación con proteínas.</li> <li>* No. Cat. F-143, F-144, F-1906, F-1907, F-1919, F-6130</li> </ul>
<i>Oregon verde 488</i>	496	524	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sustituto fotoestable de fluoresceína.</li> <li>* Insensible a pH mayor a 6.</li> <li>* No. Cat. O-6080</li> </ul>
<i>Rodamina verde</i>	502	527	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sustituto fotoestable de fluoresceína.</li> <li>* Insensible al pH.</li> <li>* No. Cat. R-6107, R-6112, R-6113, R-6150</li> </ul>
<i>Rodal verde</i>	499	525	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sustituto fotoestable de fluoresceína</li> <li>* Sensible a pH 4.5-6.5.</li> <li>* No. Cat. R-6108, R-6111</li> </ul>

*No. Cat.*, número de catálogo para un producto particular, organizado por orden alfabético seguido del orden numérico del catálogo.

## 2. APLICACIONES DE LOS MARCADORES AMINOREACTIVOS.

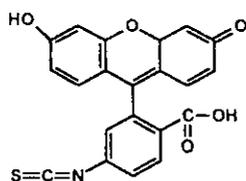
### 2.1. Marcado de biomoléculas.

Los marcadores aminoreactivos son usados para el análisis de proteínas, péptidos, ligandos, oligonucleótidos sintéticos y otras biomoléculas. También se usan en la preparación de bioconjugados celulares para inmunquímica, y para marcar receptores. En estas aplicaciones la estabilidad del enlace químico entre el colorante y la biomolécula es muy importante, pues el conjugado se usa repetidamente y se debe conservar por un largo tiempo, además está sujeto a hibridización y procesos de lavado durante el ensayo (7).

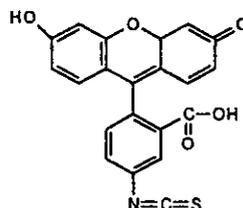
### 2.2. Preparación del bioconjugado óptimo.

El bioconjugado fluorescente apropiado debe disfrutar de un excelente campo de fluorescencia, y conservar los parámetros característicos del colorante libre. Frecuentemente, los conjugados que tienen el mayor grado de sustitución precipitan o se unen inespecíficamente, por lo que es necesario que el campo de fluorescencia sea ligeramente menor que el máximo para preservar su funcionalidad y especificidad. Aunque la conjugación de los colorantes a las biomoléculas es relativamente fácil, la preparación de conjugado requiere de una extensa experimentación (7).

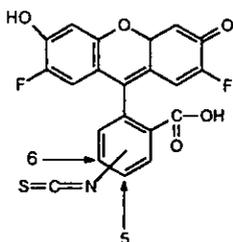
Ciertos métodos de conjugación involucran previamente la conversión del fluorocromo a un isocianato, isotiocianato o cloruro de sulfonilo. El isocianato de fluoresceína fue el reactivo original de Coons, adoptado en estudios de *AbF*. Actualmente existen sustancias de mayor estabilidad (cuadro 2) que han desplazado al reactivo fluorescente inicial (27). En la figura 2 se muestran las estructuras químicas de las moléculas aminoreactivas.



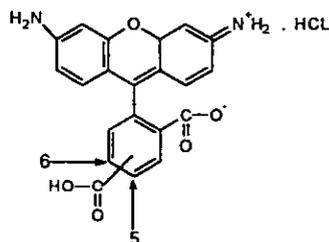
6-isotiocianato de fluoresceína



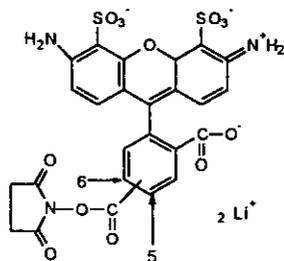
5-isotiocianato de fluoresceína



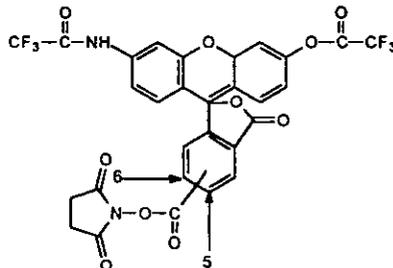
isotiocianato de verde oregon 488



clorhidrato de rodamina verde



ester de succinimidilo de Alexa 488



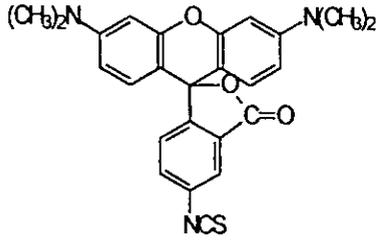
ester de succinimidilo de verde rodol

Fig. 2. Moléculas fluorescentes aminoreactivas (26).

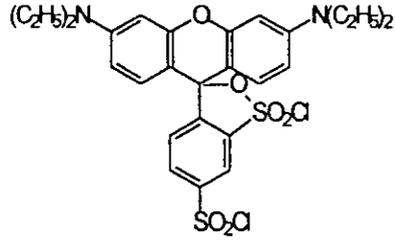
También se han usado las siguientes moléculas fluorescentes: isocianato de rodamina B (RBIC), isotiocianato de rodamina B (RBITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TMRITC), cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B (RBSC), cloruro de sulfonilo de 1-dimetilaminonaftaleno o cloruro de dansilo (DANS), ácido anilinaftalensulfónico (ANS), cloruro de sulfonilo de fluoresceína (FSC), cloruro de sulfonilo de antraceno (ASC), 2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)-furarona (MDFP), 3-fenilcumarina (3-FC), 7-hidroxicumarina o umbeliferona, 1-

III. MARCADORES AMINOREACTIVOS

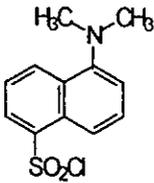
maleimidopireno (1-MP), naranja de acridina (AN) y fluorescamina (9, 27). A continuación se presentan algunas estructuras químicas y sus características principales.



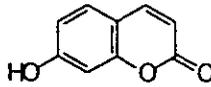
TMRITC



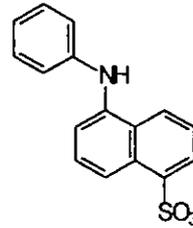
RBSC



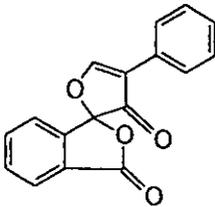
DANS



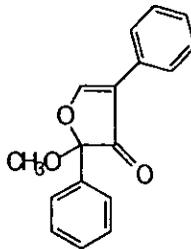
UMBELIFERONA



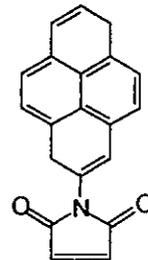
ANS



FLUORESCAMINA



MDPF



1-MP

Fig. 3. Otros fluorocromos usados en inmunoensayos (27).

Cuadro 3. Propiedades de algunas sustancias fluorescentes usadas en inmunoensayos (1).

Sustancia	$\lambda_{abs}$ (nm)	CEM ( $\times 10^4$ $cm^{-1} M^{-1}$ )	Tiempo de		Disolvente	Solubilidad	Campo cuántico (%)
			$\lambda_{em}$ (nm)	fluorescencia (ns)			
ITCF	492	7.0	520	4.5	DAC pH 8	pH > 5, DMF	0.85
RBITC	550	1.2	585	3.0	MeOH	MeOH, DMF	0.70
TMRITC	550	5.0	580	1.0	-	-	0.60
RBSC	530	-	595	-	-	-	-
	565						
AN	487	6.2	510	-	MeOH	H <sub>2</sub> O, EtOH	-
Umbeliferonas	380	2.0	450	-	-	-	-
DANS	340	0.34	480- 520	-	-	-	0.30
ANS	385	-	471	-	-	-	0.80
Fluorescamina	394	0.63	475	7.0	-	-	0.10
MDFP	390	0.64	480	-	-	-	0.10
Derivados de pireno	340	3.1	375, 392	-	MeOH	DMSO, DMF	-

pH, un pH especificado indica que el fluoroforo es soluble en una disolución amortiguadora a ese pH.

Una vez que se cuenta con el fluorocromo adecuado, la reacción de conjugación se completa en aproximadamente 10 h, a 0-3 °C y en pH 8-9.

Seguido a la conjugación es importante eliminar el colorante libre, potencialmente reactivo, usando técnicas como centrifugación y filtración por gel, diálisis continua, precipitación de proteínas con sulfato de amonio o con etanol. Para la preservación del conjugado, los reactivos sólidos (5% sobre el peso total de la proteína) se añaden directamente a la disolución proteínica al 1% en NaCl 0.15 M y disolución amortiguadora de carbonatos 0.5 M, pH 9.0 (27).

### 3. REACTIVIDAD DE LOS GRUPOS AMINO.

En general, los marcadores aminoreactivos son agentes acilantes que forman carboxamidas, sulfonamidas, ureas y tioureas al reaccionar con las aminas. La

cinética de reacción depende de la reactividad y de la concentración del agente acilante y del grupo amino.

La reactividad de las aminas está afectada por su clase y su basicidad. Virtualmente todas las proteínas tienen residuos de lisina, y muchas poseen un grupo amino libre en el residuo N-terminal (3). Las aminas alifáticas, como el grupo  $\epsilon$ -amino de lisina, son moderadamente alcalinas y reaccionan con diversos agentes acilantes. Sin embargo, la concentración de la base libre de la amina alifática es muy baja a pH menor a 8; así, la cinética de reacción de acilación de las aminas con los isotiocianatos depende del pH, siendo el pH óptimo entre 8.5 y 9.5. Por el contrario, el grupo  $\alpha$ -amino de una proteína N-terminal tiene un pKa de 7, y algunas veces puede reaccionar cerca del pH neutro.

Aunque la conjugación podría realizarse en un pH mayor a 8.5, los colorantes tienden a degradarse en presencia de agua, aumentando su descomposición conforme incrementa el pH. Los isotiocianatos requieren un pH mayor de 9 para conjugarse adecuadamente.

Las aminas aromáticas, poco comunes en las biomoléculas, son bases muy débiles y no están protonadas a pH 7, por lo que no reaccionan con los agentes acilantes.

En medio acuoso los agentes acilantes no reaccionan con: el grupo amido de los enlaces peptídicos, las amidas de glutamina y asparagina, el grupo guanidinio de arginina, y el grupo imidazolío de histidina (7).

## IV. FLUORESCEÍNA

## 1. LAS PROPIEDADES ESPECTRALES DE LA FLUORESCÉINA.

Los derivados de fluoresceína son los reactivos fluorescentes más utilizados en la conjugación a proteínas, uniéndose a través de enlaces covalentes; presentan un coeficiente de absorptividad muy alto, excelente campo de fluorescencia y buena solubilidad en agua. La fluoresceína (F-1300, máximo excitación/emisión 494/520 nm) muestra un máximo de excitación en 488 nm, se usa principalmente en la microscopía laser de barrido y en la citometría de flujo. Además, los conjugados proteínicos de fluoresceína no son susceptibles a fenómenos de precipitación. Sin embargo, la fluoresceína y sus conjugados tienen varias desventajas (28):

- \* Alto índice de fotoblanqueo.
- \* Fluorescencia sensible al pH (pKa 6.4), disminuye por debajo de pH 7.
- \* Por su amplio espectro de fluorescencia, se limita su uso en el diagnóstico multicolor.
- \* La fluorescencia de la fluoresceína es atenuada en más de un 50%, por su conjugación con biomoléculas. A mayor grado de conjugación, aumenta la atenuación.

## 2. EL ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA.

El isotiocianato de fluoresceína (ITCF) es uno de los reactivos fluorescentes más comunes. Los isotiocianatos son moderadamente reactivos y muy estables en agua y otros disolventes. Los isotiocianatos forman tioureas en su reacción con las aminas (Fig. 4).

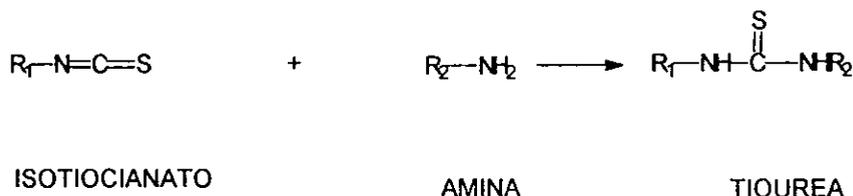


Fig. 4. Reacción de una amina primaria con un isotiocianato (29).

Aunque el producto tiourea es estable, se ha reportado que los conjugados deterioran con el tiempo (7).

La síntesis del ITCF produce una mezcla de isómeros en las posiciones 5- y 6- del anillo central. Los espectros de emisión, para ambos compuestos, son casi indistinguibles en intensidad y longitud de onda, pero difieren en la geometría de su unión a las proteínas, y en su comportamiento fisicoquímico. El isómero 5 o "isómero I" de ITCF (F-143) es el compuesto más usado, probablemente porque es fácil obtenerlo en forma pura. También se ofrece el isómero 6 o "isómero II" (F-144). Puesto que pueden descomponerse durante el almacenamiento, se recomienda adquirir el isómero 5 de ITCF empacado en viales individuales (F-1906, F-1907); este isómero también está disponible adsorbido en celita (F-1919), útil cuando se requieren cantidades muy pequeñas. Se ha reportado que la adsorción en celita proporciona una superficie hidrofóbica. El ITCF es soluble en disoluciones acuosas a pH mayor a 6. Los conjugados con ITCF son sensibles a la hidrólisis (28).

Un estudio sobre la proporción de conjugación del ITCF con una proteína o un residuo L-lisina, y la estabilidad del conjugado resultante concluyó que el conjugado de ITCF muestra una menor proporción biomolécula-fluorocromo (ligando-marcador), y produce el menor número de conjugados estables, sin embargo, es sencillo controlar su grado de sustitución (fig. 5) (28).

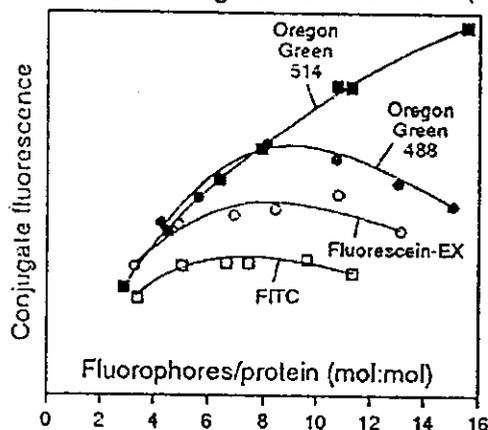


Fig. 5. Fluorescencia relativa de algunos fluorocromos. Comparación de la fluorescencia relativa en función del número de fluoróforos adheridos por proteína para los conjugados anti-IgG de ratón preparados con ester succinimidílico de verde oregon 514 (■), ester succinimidílico de verde oregon 488 (●), ester succinimidílico de 5-fluoresceína (○) e isotiocianato de fluoresceína (□) (30).

V. SUSTITUTOS DE LA  
FLUORESCEÍNA

## 1. LOS SUSTITUTOS DE LA FLUORESCÉINA.

Las limitaciones de la fluoresceína, sobre todo el fotoblanqueo y la sensibilidad al pH, fomentan el desarrollo de fluoroforos alternativos. Los sustitutos deben ajustarse al espectro de la fluoresceína, debido a la óptima longitud de onda de medición a 488 nm y la gran utilidad de los filtros ópticos destinados a la excitación y la detección de la señal suficiente de fluorescencia. Hasta el momento no existen nuevos colorantes que resuelvan completamente los problemas del fotoblanqueo de la fluoresceína, no obstante, se han desarrollado algunos fluorocromos semejantes a tal fluoroforo, todos ellos exhiben una longitud de onda muy aproximada a la de fluoresceína (absorción 490-500 nm) y presentan un eficiente campo cuántico de fluorescencia (31). En el cuadro 4 se resumen las principales características de la fluoresceína y sus sustitutos, cuyos nombres comerciales son avalados por Molecular Probes®.

Cuadro 4. La fluoresceína y sus sustitutos (32, 33).

No. Cat.	PM	CA	Solubili- dad	$\lambda_{abs}$ (nm)	CEM ( $cm^2M^{-1}$ )	$\lambda_{em}$ (nm)	Disol- vente	Precio*	Notas
A-10235	643.41	F,DD,LL	pH>6, DMF	491	65,000	515	pH 9	205.00 (1Kit)	---
F-143	389.38	F,DD,LL	pH>6, DMF	494	73,000	519	pH 9	103.00 (1g)	1,2,3
F-144	389.38	F,DD,LL	pH>6, DMF	494	80,000	519	pH 9	103.00 (1g)	1,2,3
F-1906	389.38	F,DD,LL	pH>6, DMF	494	73,000	519	pH 9	50.00 (10X10mg)	1,2,3
F-1907	389.38	F,DD,LL	pH>6, DMF	494	73,000	519	pH 9	131.00 (10x100mg)	1,2,3
F-1919	389.38	F,DD,LL	NA	494	73,000	519	pH 9	47.00 (1g)	1,2,3, 4
O-6080	425.36	F,DD,LL	DMF, DMSO	493	78,000	520	pH 9	100.00 (5mg)	2,5

V. SUSTITUTOS DE LA FLUORESCÉINA

No. Cat.	PM	CA	Solubilidad	$\lambda_{abs}$ (nm)	CEM ( $cm^{-1}M^{-1}$ )	$\lambda_{em}$ (nm)	Disolvente	Precio*	Notas
R-6107	507.89	F,D,LL	DMF, DMSO	504	78,000	532	MeOH	142.00 (5mg)	---
R-6108	472.41	F,D,LL	DMF, DMSO	496	63,000	523	pH 9	152.00 (5mg)	6
R-6111	664.43	F,DD,LL	DMF, DMSO	<300	---	ninguno	---	142.00 (5mg)	7
R-6112	663.44	F,DD,LL	DMF, DMSO	<300	---	ninguno	---	142.00 (5mg)	8
R-6113	621.05	F,D,LL	DMF, DMSO	503	74,000	528	MeOH	142.00 (5mg)	---
R-6150	410.81	LL	pH>6, DMF	502	89,000	524	MeOH	100.00 (5mg)	---
R-6152	411.80	DD,LL	pH>6, DMF	494	73,000	521	pH 9	79.00 (5mg)	6

No. Cat., número de catálogo organizado primero por orden alfabético seguido del orden numérico según el catálogo; *pH*, un pH especificado indica que el producto se ioniza en una disolución amortiguadora a ese pH; **1**, la absorción y la fluorescencia de derivados de la fluoresceína dependen del pH, disminuyendo el CEM y el QY a pH<7; **2**, los isotiocianatos son inestables en agua y no se deben conservar en disoluciones acuosas; **3**, el CEM del isotiocianato de fluoresceína disminuye un 10% en la conjugación proteínica, la vida media de fluorescencia es de  $3.8 \times 10^{-9}$  seg; **4**, no aplicable; **5**, la absorción y la fluorescencia de derivados del verde oregon 488 dependen del pH sólo en disoluciones moderadamente ácidas a pH<5; **6**, la absorción y la fluorescencia de los derivados del verde rodol son dependientes del pH, el CEM y el QY disminuyen a pH<6; **7**, el R-6111 es convertido a R-6108 por adición de grupos protectores trifluoroacetilos; **8**, el R-6112 es convertido a R-6107 por adición de grupos protectores trifluoroacetilos; \*, precio actualizado (16/2/98) en dolares americanos, en la adquisición de 1-4 unidades (34).

**1.1. Alexa 488: El mejor sustituto de fluoresceína.**

Este fluorocromo muestra las siguientes características únicas (31):

- \* Es casi idéntico a la fluoresceína, con un máximo excitación/emisión de 491/515 nm.

- \* Fuerte absorción de fotones, con un coeficiente de extinción mayor de  $65,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .
- \* Muy fotoestable, permite un mayor tiempo de observación y captura de imagen.
- \* La fluorescencia no depende del pH, entre pH 4-10.
- \* Soluble en agua, no requiere de disolventes orgánicos en la reacción de conjugación.
- \* Excelente fluorescencia por proteína conjugada.

### 1.2. Verde oregon 488.

El espectro de absorción y emisión del fluoroforo verde oregon 488 (2', 7'-difluorofluoresceína, D-6145) comprende un par de ondas mucho más perfectas que las de fluoresceína. Los bioconjugados preparados con este colorante poseen las siguientes cualidades (31):

- \* Mayor fotoestabilidad.
- \* Un pKa más bajo (pKa 4.7 contra 6.4 para la fluoresceína).
- \* Mayor fluorescencia y menor atenuación en grados comparables de conjugación con las proteínas.
- \* Excelente campo de fluorescencia.
- \* Mayor resistencia al fotoblanqueo.

### 1.3. Colorantes verde rodol y verde rodamina.

El verde rodol y el verde rodamina son los nombres comerciales para el carboxirodol y la carboxirodamina 110, respectivamente. Ofrecen características deseables, incluyendo buena fotoestabilidad, elevados coeficientes de extinción ( $\epsilon$  75,000  $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) y extraordinarios campos de fluorescencia. En general, estos fluorocromos son poco apropiados para la conjugación a proteínas.

Los reactivos verde rodol y verde rodamina, y sus conjugados, proporcionan una alta fotoestabilidad y una baja sensibilidad a pH fisiológico (el pKa del verde rodol es de 5.6).

El fluoroforo verde rodamina es más fotoestable que el verde rodol y el verde oregon 488, pero son equivalentes en fotoestabilidad al colorante verde oregon 514. La fluorescencia de sus conjugados no es sensible al pH entre 4 y 9. Tienden a atenuarse al formar el conjugado proteínico, el cual puede precipitar en disolución (31).

## VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## JUSTIFICACIÓN.

El isotiocianato fluoresceína (ITCF) ha sido el fluorocromo más utilizado en el marcado proteínico para el diagnóstico inmunológico. Este fluorocromo forma un bioconjugado estable, unido por enlaces covalentes, entre el grupo sustituyente isotiocianato (agente acilante) de ITCF y el grupo  $\epsilon$ -amino de lisina (residuo reactivo a pH 8.5-9.5, donde se forma el conjugado fluorescente). Asimismo presenta un coeficiente de absortividad alto ( $70,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), excelente campo de fluorescencia (0.85 %), buena solubilidad en agua y no es susceptible a la precipitación, y tiene su máximo de excitación en 488 nm, emitiendo una fluorescencia verde amarillenta (diferente de la fluorescencia intrínseca de los tejidos y células, y en cuya  $\lambda_{em}$  de 520 nm, la retina es extremadamente sensible).

Igualmente tiene una excelente proporción ligando-marcador, de 6-8 moles de fluorocromo por mol de proteína, pero se reduce el QY en un 60 % y disminuye el CEM en 10 %. También puede destruirse su fluorescencia (fenómeno de fotoblanqueo), es sensible al pH por debajo de 7.0, y está propenso a la hidrólisis, tendiendo a disminuir su tiempo de almacenaje y utilización, y con ello la viabilidad del reactivo. Se deben tener ciertos cuidados en su manejo, como mantenerlo en refrigeración a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , protegerlo de la luz e hidratar la cantidad mínima necesaria para el inmunoensayo. Existen algunas medidas de uso y control en el manejo del reactivo como buena ventilación, se recomienda la protección respiratoria, usar guantes, proteger los ojos y usar material adecuado al laboratorio. No se ha realizado un estudio completo sobre los peligros en el manejo de este reactivo, sin embargo, algunos compuestos similares son químicamente reactivos con proteínas y otras sustancias bioquímicas del organismo, por lo que se consideran como potencialmente peligrosos (37). En cuanto a costos, el isómero-I de 5-isotiocianato de fluoresceína (F-1907), reactivo exclusivo para la conjugación proteínica, se cotiza en \$131.00 dolares americanos, el paquete consta de 10 viales de 100 mg de reactivo (38).

El presente trabajo pretende encontrar reactivos alternativos al ITCF, que muestren cualidades similares, que sean más estables, de fácil manejo y presenten menos limitaciones, y cuya aplicación sea en la preparación de bioconjugados de interés. Aquí se realizó la síntesis y el análisis electrónico

molecular de derivados de ftalimidas, compuestos fluorescentes de buena estabilidad. Su síntesis se pensó en analogía a la síntesis de ITCF y del luminol, iniciando, al igual que ellos, con anhídrido ftálico, y siguiendo una serie de reacciones semejantes a las realizadas para el ITCF. A partir de ello se establecieron los siguientes objetivos:

### OBJETIVOS:

#### OBJETIVO GENERAL :

Desarrollo de reactivos fluorescentes alternos al *isòtiocianato de fluoresceína (ITCF)*, para su aplicación en técnicas de inmunodiagnóstico.

#### OBJETIVOS PARTICULARES :

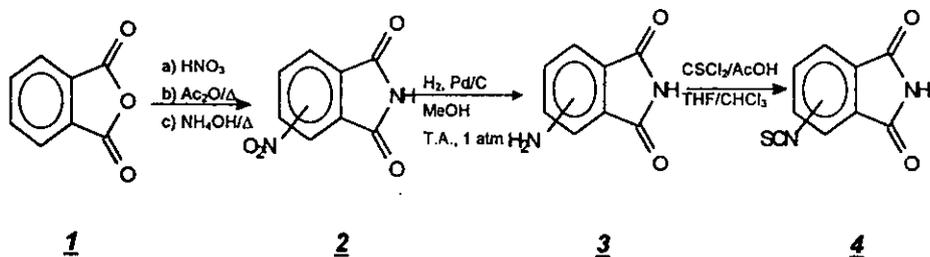
1. Desarrollo y síntesis orgánica de los reactivos fluorescentes: 3- y 4- *aminoftalimida* y 3- y 4- *isotiocianato de ftalimida*.
2. Caracterización química de cada producto de las reacciones de síntesis de los fluorocromos, en base a estudios espectroscópicos (IR, EM, RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C).

### HIPÓTESIS:

Los fluorocromos propuestos 3- y 4- *aminoftalimida* y 3- y 4- *isotiocianato de ftalimida* presentan características similares al isotiocianato de fluoresceína con una  $\lambda_{abs/em}$  de 494/520 nm y poseen los grupos reactivos para vincularse a un anticuerpo IgG. Por ello prometen ser fluorocromos alternativos, adecuados para su uso en pruebas inmunológicas.

## VII. METODOLOGÍA

## 1. DIAGRAMA DE FLUJO.



- 1    anhídrido ftálico  
2    3- y 4-nitroftalimida  
3    3- y 4-aminoftalimida  
4    3- y 4-isotiocianato de ftalimida

Los intermediarios de nitroftalimida 2 fueron obtenidos a través de procedimientos previamente reportados (12-18). Los intermediarios y los productos finales fueron caracterizados por datos espectroscópicos. Las determinaciones de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron efectuados en los disolventes indicados ( $\text{CDCl}_3$  y  $\text{DMSO-}d_6/\text{TMS}$ ) en un espectrofotómetro Varian HA-100 (Palo Alto, Ca, USA) Gemini (200 y 300 Mhz); en RMN  $^1\text{H}$  los desplazamientos químicos ( $\sigma$ ) están dados en ppm, entre paréntesis se escribe el tipo de señal, el hidrógeno correspondiente y las señales de acoplamiento (J) en Hz; en RMN  $^{13}\text{C}$  los desplazamientos químicos ( $\sigma$ ) están dados en ppm, y el carbono correspondiente se encuentra entre paréntesis. Los análisis de espectros de masas (EMIE, Linked Scan y EMAR) fueron realizados en espectrofotómetros de masas JEOL (Boston MC) JMS-SX 102A y JEOL JMS-AX 505 HA, los resultados se indican como sigue: ión molecular (% absorbancia relativa con respecto al pico base) [asignación del ión molecular]. La espectroscopía por IR fue registrada usando un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) 283B, los resultados se reportan con las bandas de absorción en  $\text{cm}^{-1}$  de un determinado grupo funcional, el número subrayado corresponde a la banda de absorción del grupo sustituyente de importancia (amino o isotiocianato).

El análisis electrónico de densidad de carga total y de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO fue realizada a través de un método de cómputo denominado MINDOO/3 HYPER CHEM. Hyper Chem usa para su desarrollo fuerzas de campo (*force fields*) y otros conceptos de dominio público, los cuales han sido explicados por Allinger y otros autores. Hyper Chem fue desarrollado bajo licencia de *Hypercube for Autodesk* (1992); Autodesk Sansalito, Ca, USA.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL.

### 2.1. Reducción del grupo nitro (8, 16, 17).

Una disolución de (3- o 4-) nitroftalimida (0.50 g) (**2**) en metanol (50 mL) se sometió a hidrogenación, a presión atmosférica, usando como catalizador Pd/C (0.05 g). El desarrollo de la reacción se definió mediante cromatografía en capa fina, terminándose para 4-nitroftalimida en 5 días, y para el 3-nitroftalimida en 1.5 días. Posteriormente la mezcla de reacción se filtró sobre celita para eliminar el catalizador; la disolución resultante se evaporó al vacío, obteniéndose en ambos casos un sólido **3**, que fue purificado por cromatografía en columna (cc) en un sistema *n*-hexano/AcOEt 2:1. A continuación se mencionan los datos físicos y espectroscópicos de las moléculas obtenidas.

*3-aminoftalimida, 3-NF*. (0.318 g) 63.6 %. Sólido; verde amarillo; PM 162 Da; p.f. 235 °C; IR (fig. 6)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3493, 3354, 3185, 2756, 1753, 1714, 1629, 1595, 1479, 1311, 1058, 746, 661; RMN  $^1\text{H}$  (fig. 8) (300 MHz)  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$   $\delta$  (ppm): 10.85 (s, 1H, NH), 7.41 (dd, 1H,  $J_{\text{orto}} = 12.6 \text{ Hz} / J_{\text{orto}} = 10.6 \text{ Hz}$ ), 6.94 (dd, 1H,  $J_{\text{orto}} = 10.6 \text{ Hz} / J_{\text{meta}} = 1.1 \text{ Hz}$ ), 6.89 (dd, 1H,  $J_{\text{orto}} = 10.6 \text{ Hz} / J_{\text{meta}} = 1.1 \text{ Hz}$ ), 6.35 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 9) (75 MHz)  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$   $\delta$  (ppm): 176.4 ( $\text{C}_2=\text{O}$ ), 176.2 ( $\text{C}_7=\text{O}$ ), 151.9 ( $\text{C}_8$  aromático), 140.3 ( $\text{C}_5$  H aromático), 139.5 ( $\text{C}_3$  aromático), 138.8 ( $\text{C}_9$  aromático), 126.2 ( $\text{C}_4$  H aromático), 115.5 ( $\text{C}_6$  H aromático); EMIE (fig. 7) (70 eV)  $m/z$  (% ar): 162 (100)  $\text{M}^+$ , 119 (9)  $[\text{M}-\text{CHON}]^+$ , 118 (12)  $[\text{M}-\text{CO}_2]^+$ , 91 (30)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{CO}]^+$ , 75 (1)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{CO}-\text{R}]^+$ , 63 (5)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{CO}-\text{CR}]^+$ , 41 (2)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{C}_5\text{H}_2\text{O}]^+$ .

**4-aminofalimida, 4-NF.** (0.265 g) 53.0 %. Sólido; amarillo; PM 162 Da; p.f. 248-251 °C; IR (fig. 10)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3444, 3362, 3242, 1762, 1714, 1616, 1506, 1390; RMN  $^1\text{H}$  (fig. 12) (300 MHz) DMSO- $d_6$ /TMS  $\delta$  (ppm): 10.72 (s, 1H, NH), 7.43 (d, 1H,  $J_{orto} = 12.2$  Hz), 6.86 (d, 1H,  $J_{meta} = 2.8$  Hz), 6.79 (dd, 1H,  $J_{orto} = 12.4$  Hz /  $J_{meta} = 3.0$  Hz), 6.40 (s, 2H, NH $_2$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 13) (75 MHz) DMSO- $d_6$ /TMS  $\delta$  (ppm): 169.7 (C $_7$ =O), 169.3 (C $_2$ =O), 154.8 (C $_8$  aromático), 135.5 (C $_9$  aromático), 124.6 (C $_6$  H aromático), 117.9 (C $_4$  aromático), 116.8 (C $_5$  H aromático), 106.6 (C $_3$  H aromático); EMIE (fig. 11) (70 eV)  $m/z$  (% ar): 162 (100) M $^+$ , 119 (29) [M-CHON] $^+$ , 118 (12) [M-CO $_2$ ] $^+$ , 91 (37) [M-CHON-CO] $^+$ , 75 (1) [M-CHON-CO-R] $^+$ , 63 (9) [M-CHON-CO-CR] $^+$ , 41 (10) [M-CHON-C $_5$ H $_2$ O] $^+$ .

## 2.2. Obtención del isotiocianato de ftalimida (**4**) (11, 18).

Se colocaron en agitación 0.1 g (0.6 mmol) de **3**, 2 mL de HCl al 10% y 10 mL de AcOH concentrado, y se adicionó lentamente una mezcla de tiofosgeno al 0.4 % en CHCl $_3$  (15 mL para el 3-NF y 5 mL para el 4-NF); posteriormente se sometió a calentamiento con un sistema de reflujo, monitoreando la reacción hasta la formación del producto deseable, el cual reveló al UV en onda larga (365 nm), y con CeSO $_4$  mostró una mancha oscura. La mezcla final de reacción se lavó con NaHCO $_3$  al 5 % para neutralizar el medio y eliminar el tiofosgeno remanente, luego se secó sobre Na $_2$ SO $_4$  y se llevó a sequedad. Finalmente se purificó por cc usando un sistema n-Hex/AcOEt 2:1. Enseguida se reportan los datos físicos y espectroscópicos de los productos obtenidos.

**3-isotiocianato de ftalimida, 3-ITFA.** (0.067 g) 67.0 %. Sólido; amarillo-blanco; PM 204 Da; p.f. 235 °C; IR (fig. 14)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3207, 3083, 2058, 2004, 1770, 1740, 1699, 1603, 1476, 1378, 1306, 1068, 820, 749; RMN  $^1\text{H}$  (fig. 16) (300 MHz) CDCl $_3$ /TMS  $\delta$  (ppm): 7.86 (dd, 1H,  $J_{orto} = 26.7$  Hz /  $J_{meta} = 13.2$  Hz), 7.73 (dd, 1H,  $J_{orto} = 26.7$  Hz /  $J_{meta} = 13.2$  Hz), 7.47 (dd, 1H,  $J_{orto} = 34.1$  Hz /  $J_{orto} = 34.1$  Hz), 7.26 (s, 1H, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 17) (75 MHz) CDCl $_3$  + DMSO- $d_6$ /TMS  $\delta$  (ppm): 167.5 (C $_2$ =O), 166.6 (C $_9$  aromático), 135.1 (C $_4$  H aromático), 135.1 (C $_5$  H aromático), 134.8 (C $_3$  aromático), 134.1 (NC $_{10}$ S), 130.8 (C $_8$  aromático), 124.0 (C $_6$  H aromático), 121.2 (C $_7$ =O); EMIE (fig. 15) (70 eV)  $m/z$  (% ar): 204 (100) M $^+$ , 161 (30) [M-CHON] $^+$ , 160 (16) [M-CO $_2$ ] $^+$ , 133 (31) [M-CHON-CO] $^+$ , 83 (2) [M-CHON-C $_5$ H $_2$ O] $^+$ , 75 (13) [M-CHON-CO-R] $^+$ , 63 (2) [M-CHON-CO-CR] $^+$ .

*4-isotiocianato de ftalimida, 4-ITFA*. (0.058 g) 58.0 %. Sólido; amarillo-naranja; PM 204 Da; p.f. 220 °C; IR (fig. 18)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3202, 3086, 2056, 1766, 1730, 1698, 1613, 1358, 1300; RMN  $^1\text{H}$  (fig. 20) (300 MHz) DMSO- $d_6$ /TMS  $\delta$  (ppm): 7.86 (d, 1H,  $J_{\text{orto}} = 12.0$  Hz), 7.67 (d, 1H,  $J_{\text{meta}} = 2.5$  Hz), 7.55 (dd, 1H,  $J_{\text{orto}} = 12.0$  Hz /  $J_{\text{meta}} = 2.6$  Hz), 7.26 (s, 1H, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 21) (75 MHz) DMSO- $d_6$ /TMS  $\delta$  (ppm): 168.4 ( $\text{C}_2=\text{O}$ ), 130.4 ( $\text{C}_9$  aromático), 125.3 ( $\text{C}_4$  H aromático), 123.2 ( $\text{C}_5$  H aromático), 123.1 ( $\text{NC}_{10}\text{S}$ ), 122.0 ( $\text{C}_8$  aromático), 121.0 ( $\text{C}_3$  aromático), 119.6 ( $\text{C}_6$  H aromático), 115.0 ( $\text{C}_7=\text{O}$ ); EMIE (fig. 19) (70 eV)  $m/z$  (% ar): 204 (100)  $\text{M}^+$ , 161 (22)  $[\text{M}-\text{CHON}]^+$ , 160 (10)  $[\text{M}-\text{CO}_2]^+$ , 133 (22)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{CO}]^+$ , 83 (5)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{C}_5\text{H}_2\text{O}]^+$ , 75 (5)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{CO}-\text{R}]^+$ , 63 (2)  $[\text{M}-\text{CHON}-\text{CO}-\text{CR}]^+$ .

En el siguiente apartado VIII. RESULTADOS se encuentran por orden de aparición:

1. La espectroscopía de IR, EM, RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ .
2. Densidad de carga total de las moléculas obtenidas, propuesta por MINDOO/3 HYPER CHEM.
3. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de las moléculas obtenidas, propuestos por MINDOO/3 HYPER CHEM.
4. Patrón de fragmentación de las moléculas obtenidas.
5. Asignación de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ .
6. Cuadros de datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y EM.

## VIII. RESULTADOS

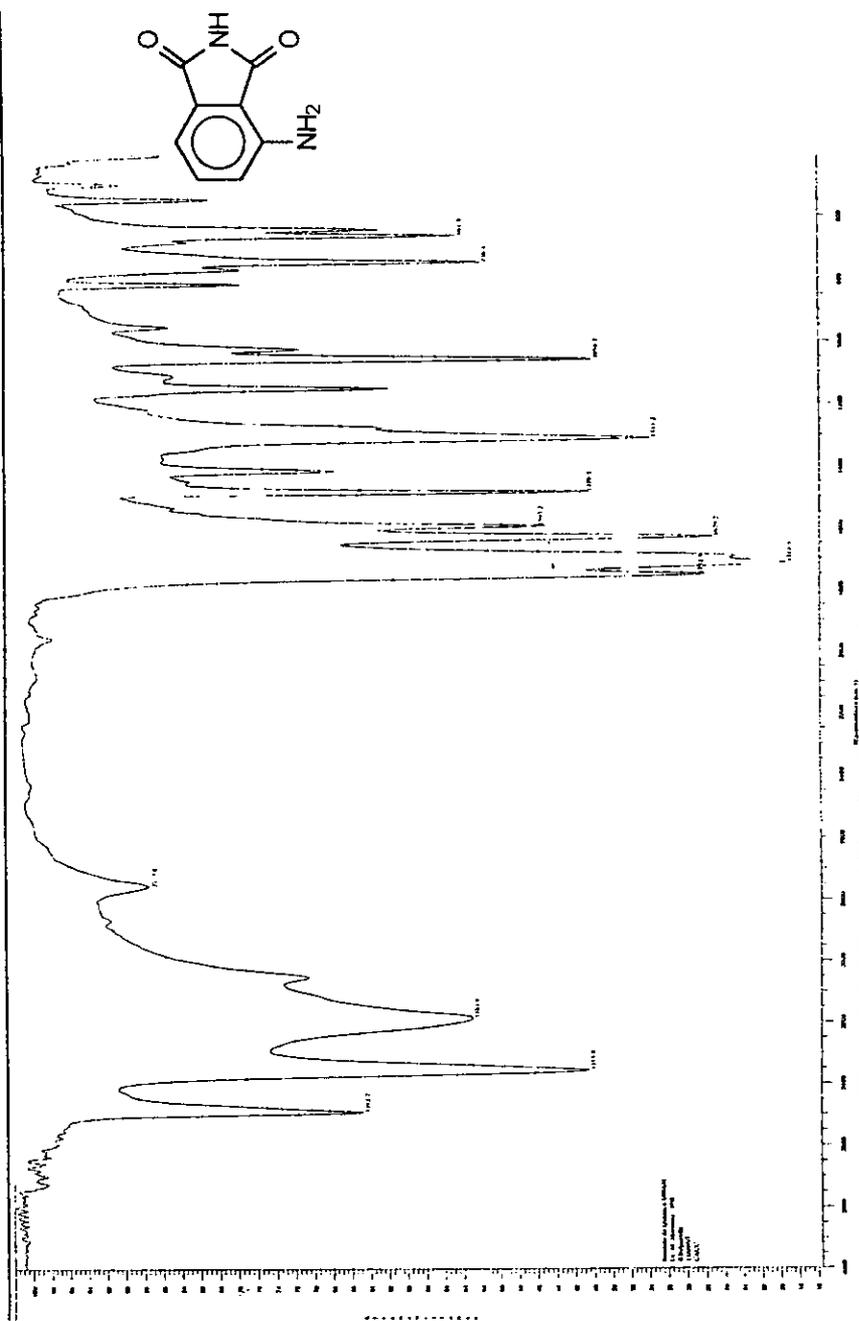


Fig. 6. Espectro de IR de 3-aminofthalimida. Se observa un compuesto aromático, con grupos carbonilo, y una banda de absorción en 1595 cm<sup>-1</sup> perteneciente al grupo amino.

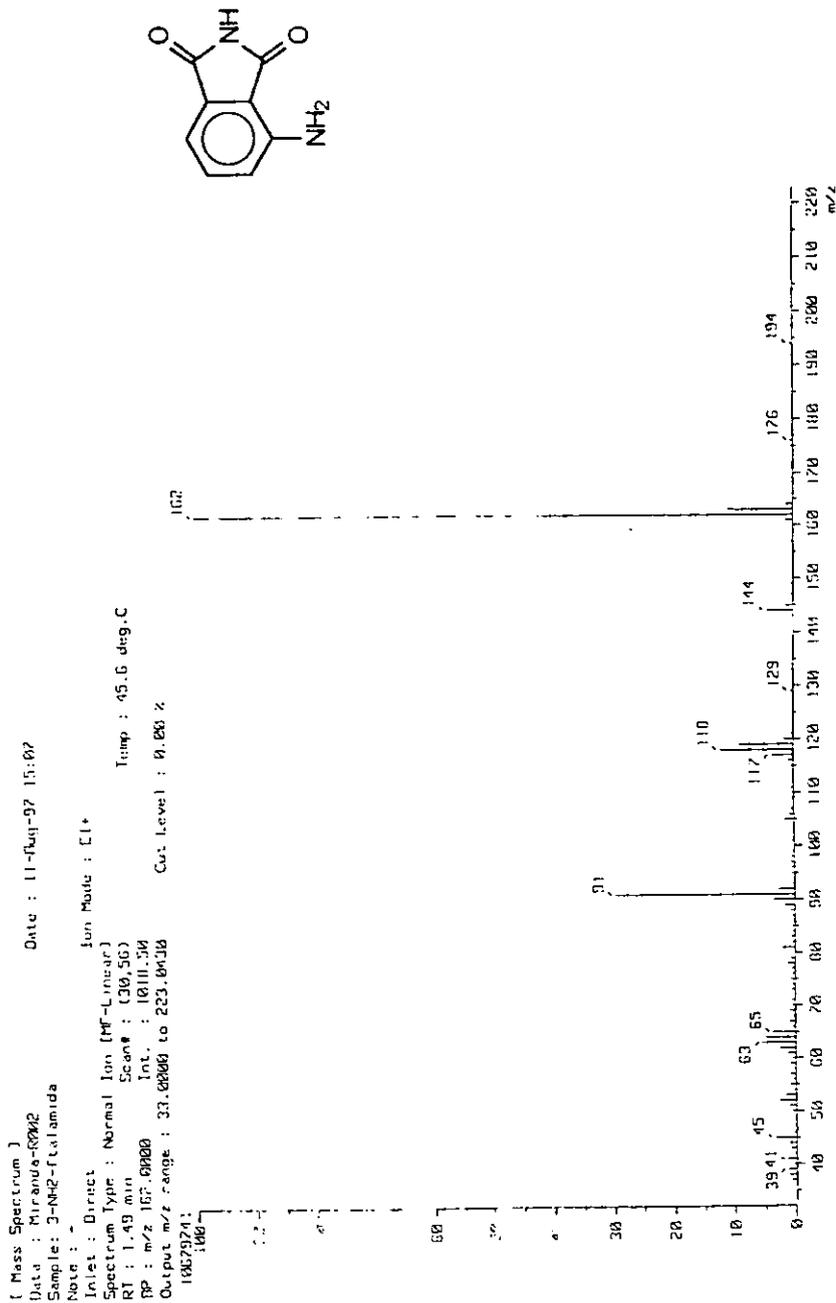


Fig. 7. Espectro de EM de 3-aminofalimida. Su PM de 162 Da relaciona con un compuesto de fórmula  $C_8H_6N_2O_2$ , perteneciente a una aminofalimida. El ion molecular m/z 162, fue también el pico base.

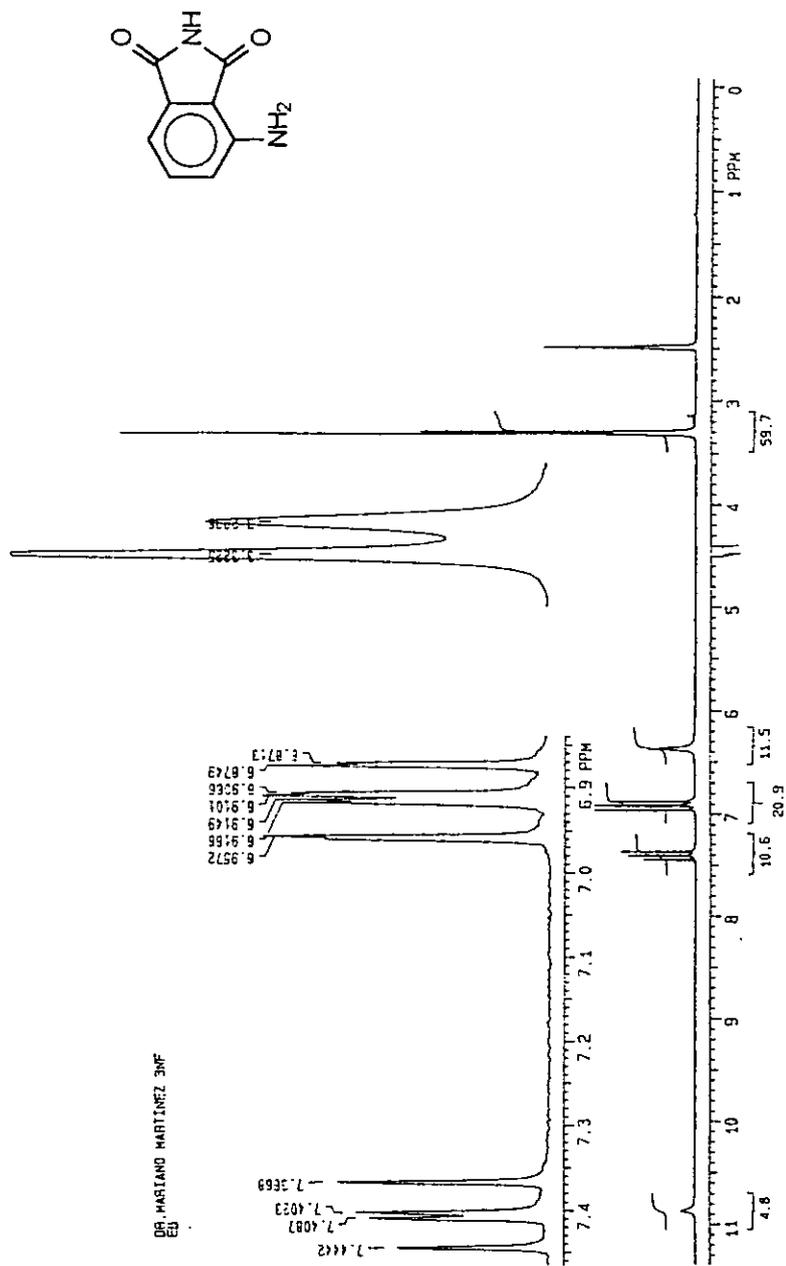


Fig. 8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3-aminofalimida. Se observan 3 señales doble de doble en 7.41, 6.94 y 6.89 ppm, correspondientes a los hidrógenos de los carbonos no sustituidos del anillo benzénico; y dos señales simples en 10.85 y 6.35 ppm correspondientes a los hidrógenos de NH y  $\text{NH}_2$ .

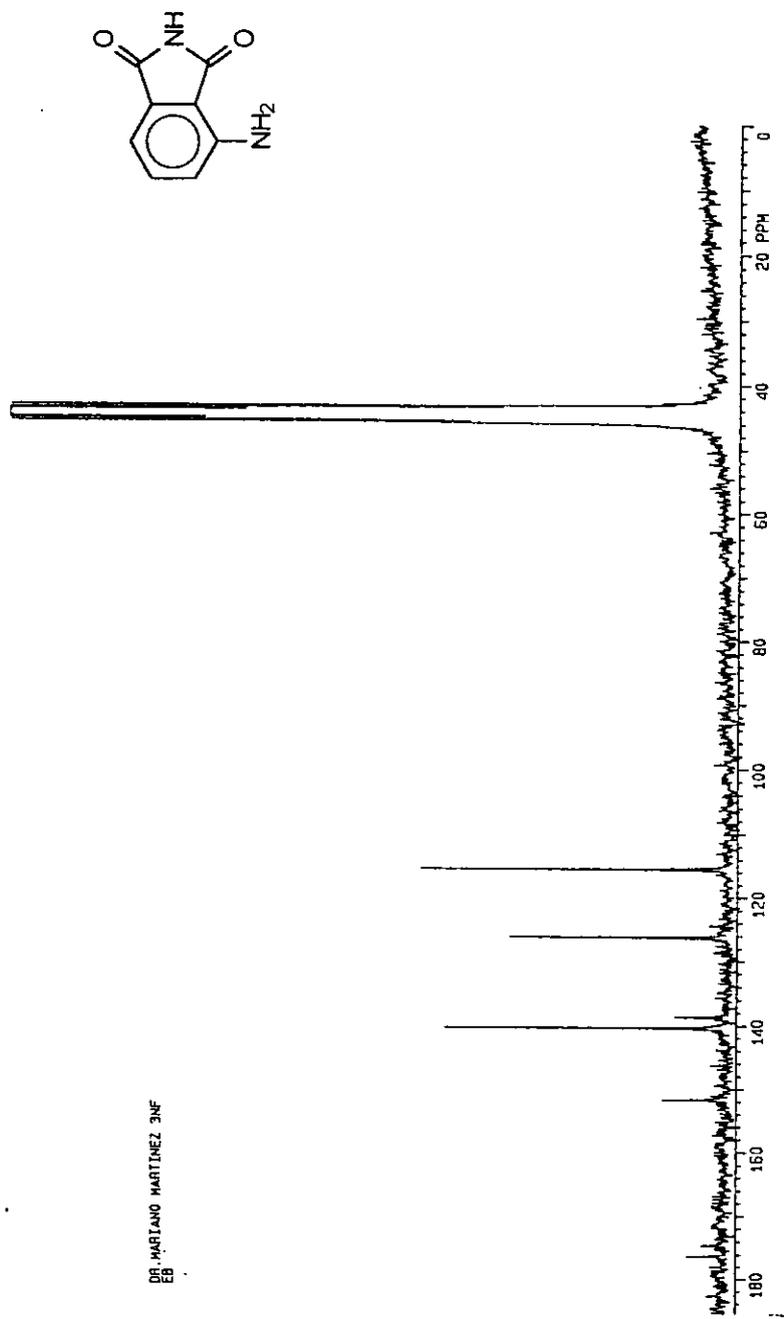


Fig. 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 3-aminofthalimida. Se observan las señales en 176.4 y 176.2 ppm para los carbonilos, las señales en 151.9, 139.5 y 138.5 ppm corresponden a los carbonos aromáticos sustituidos, y las señales en 140.3, 126.2 y 115.5 ppm pertenecen a los carbonos no sustituidos.



VIII. RESULTADOS

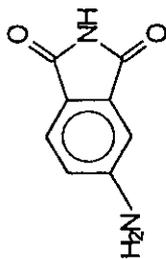
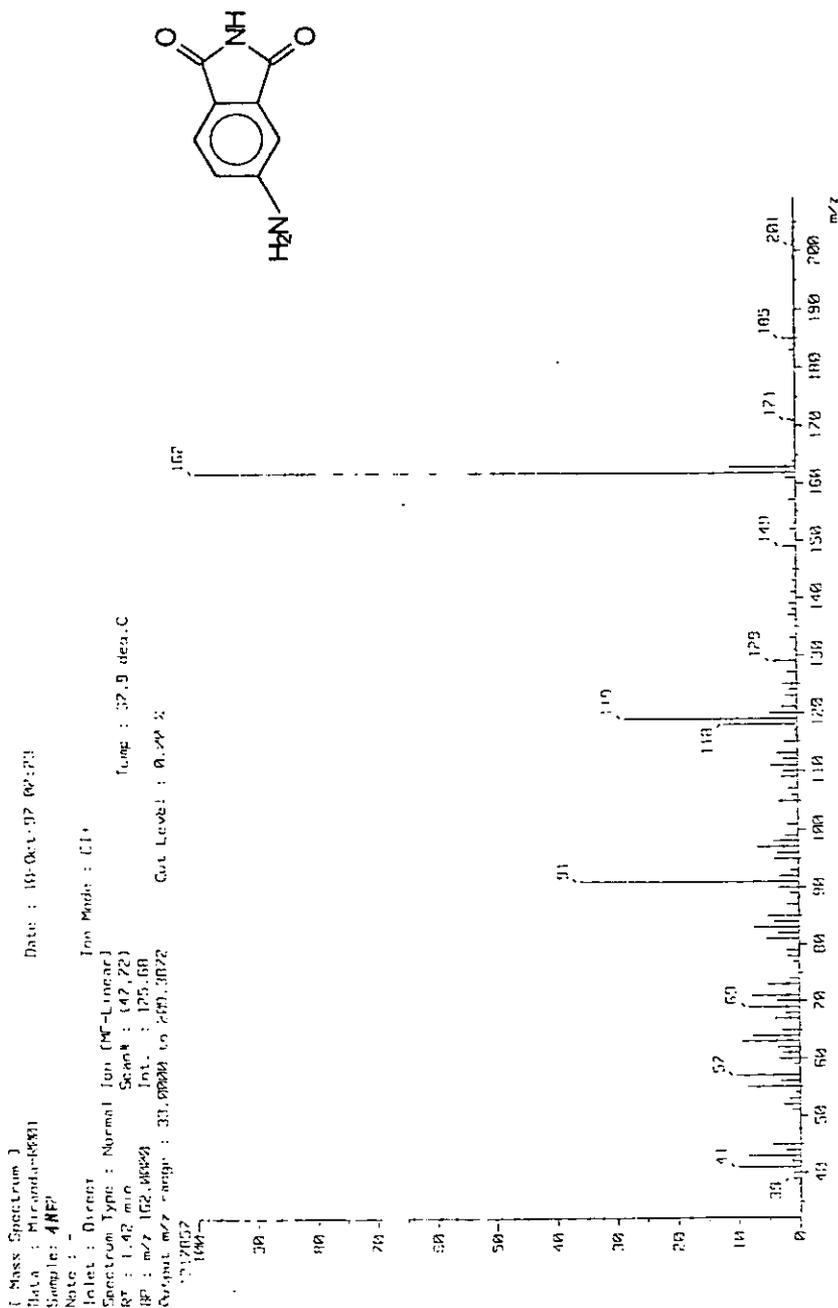


Fig. 11. Espectro de EM de 4-aminofalimida. Su PM de 162 Da se relaciona con un compuesto de fórmula C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, perteneciente a una aminofalimida. El ión molecular m/z 162, fue también el pico base.



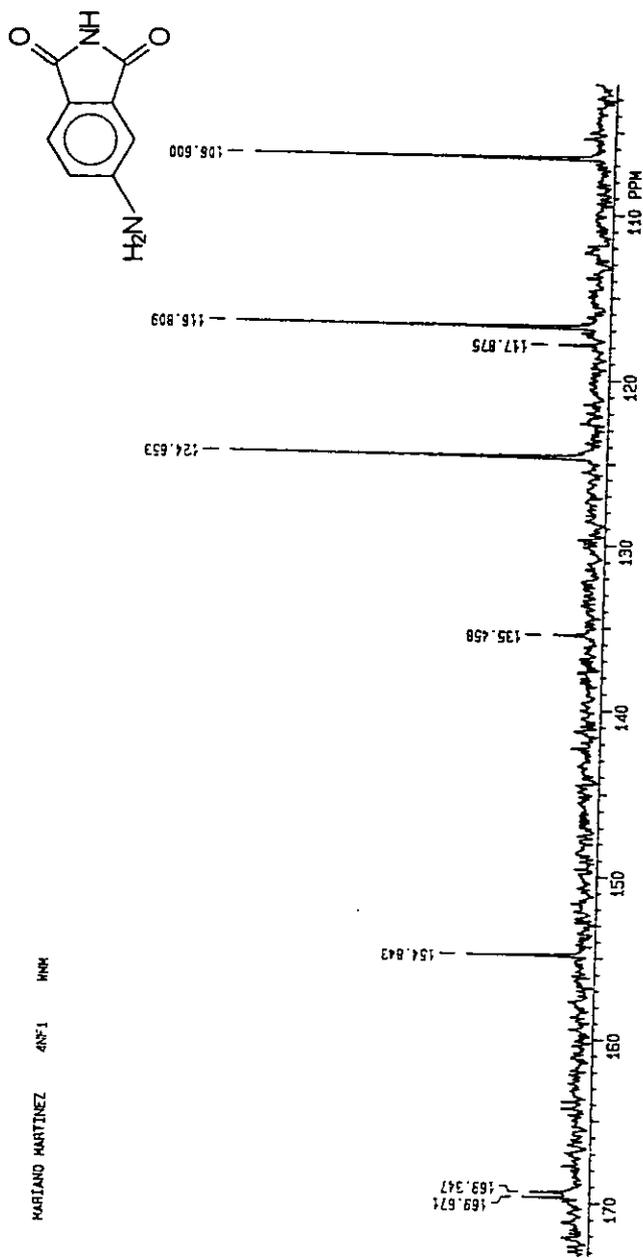


Fig. 13. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 4-aminofthalimida. Se observan las señales en 169.7 y 169.3 ppm para los carbonilos, las señales en 154.8, 135.5 y 117.9 ppm corresponden a los carbonos aromáticos sustituidos, y las señales en 124.6, 116.8 y 106.6 ppm pertenecen a los carbonos no sustituidos.

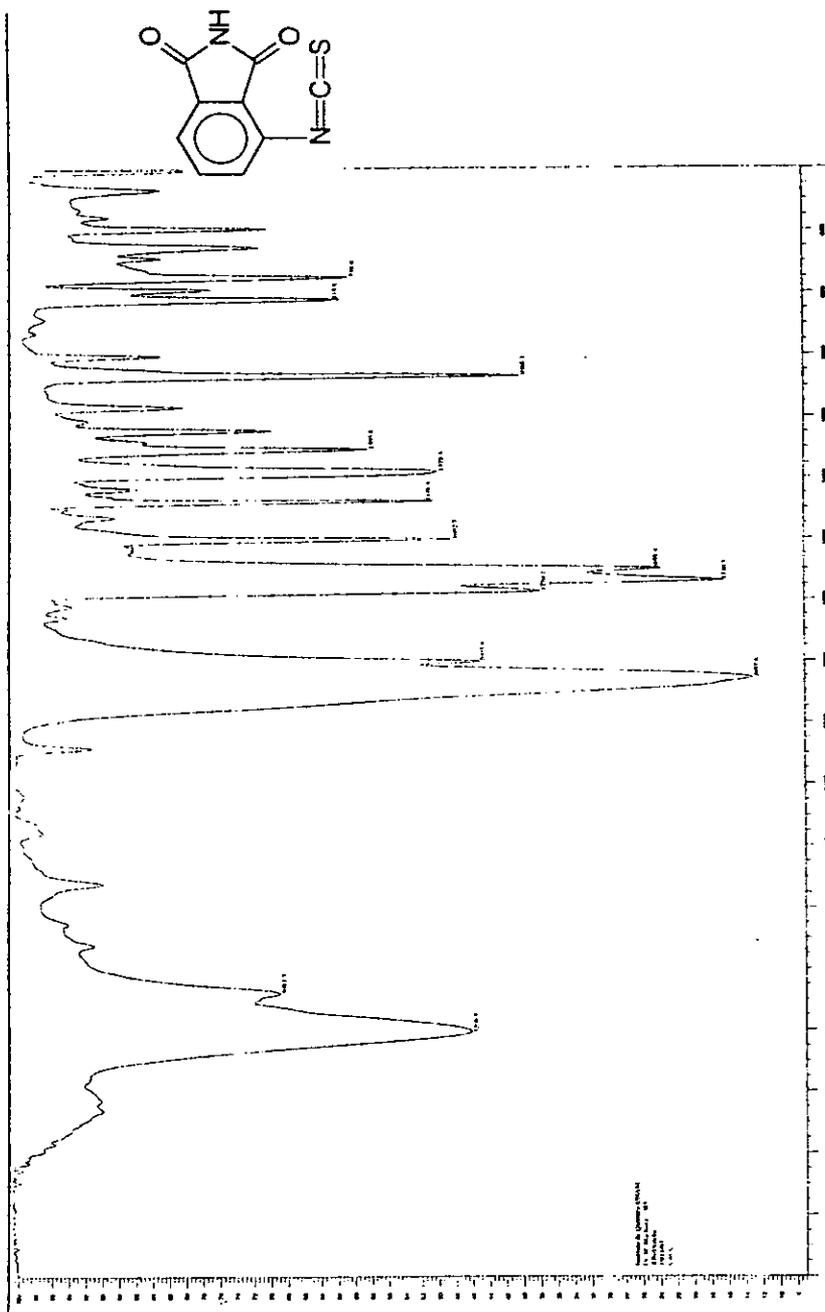


Fig. 14. Espectro de IR de 3-isotiocianato de fláimida. Se muestra un sistema aromático, carbonilos aromáticos y una banda muy particular, 2075  $\text{cm}^{-1}$ , referida al grupo isotiocianato.

VIII. RESULTADOS

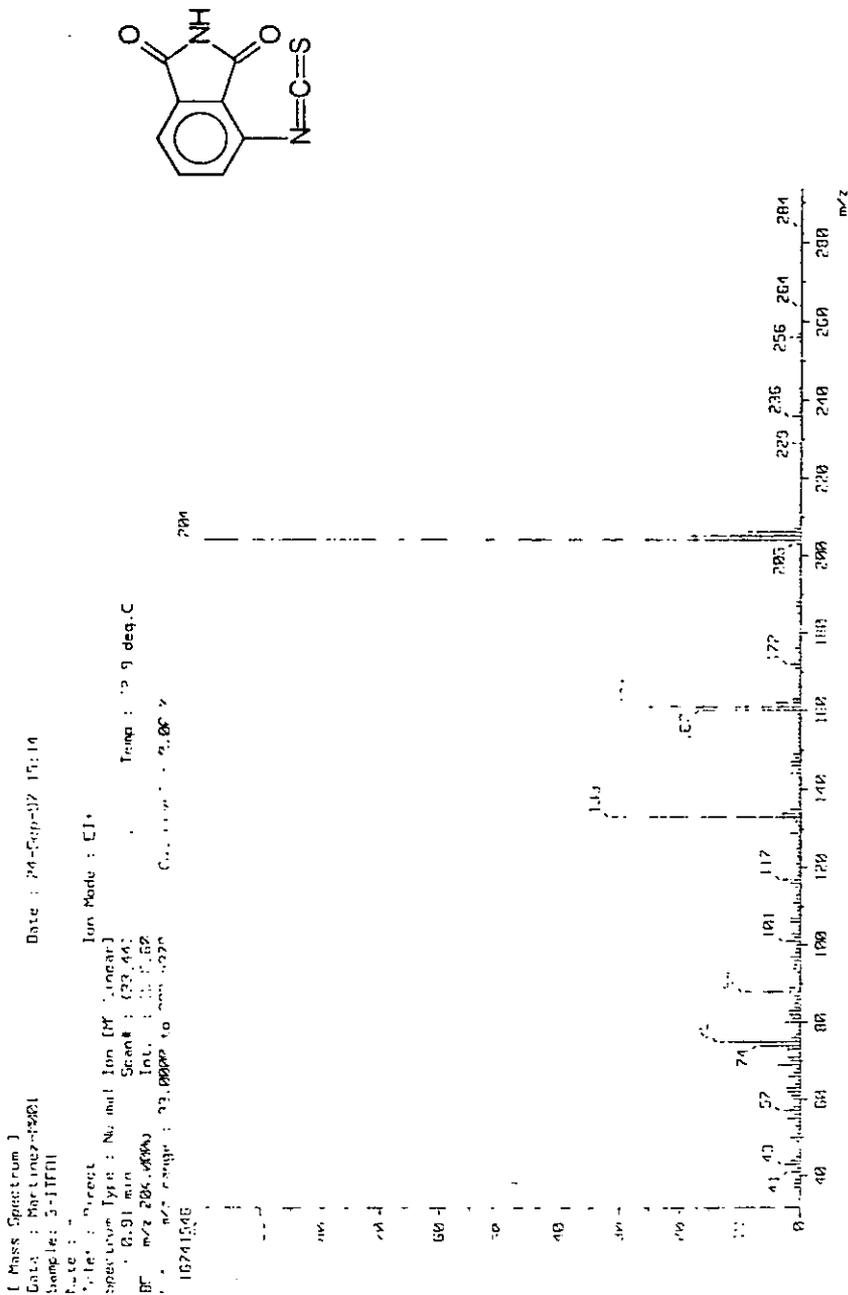


Fig. 15. Espectro de EM de 3-isotiocianato de ftalimida. Su PM de 204 Da se relaciona con un compuesto de fórmula  $C_9H_4N_2O_2S$ . El ion molecular  $m/z$  204, fue también el pico base.

VIII. RESULTADOS

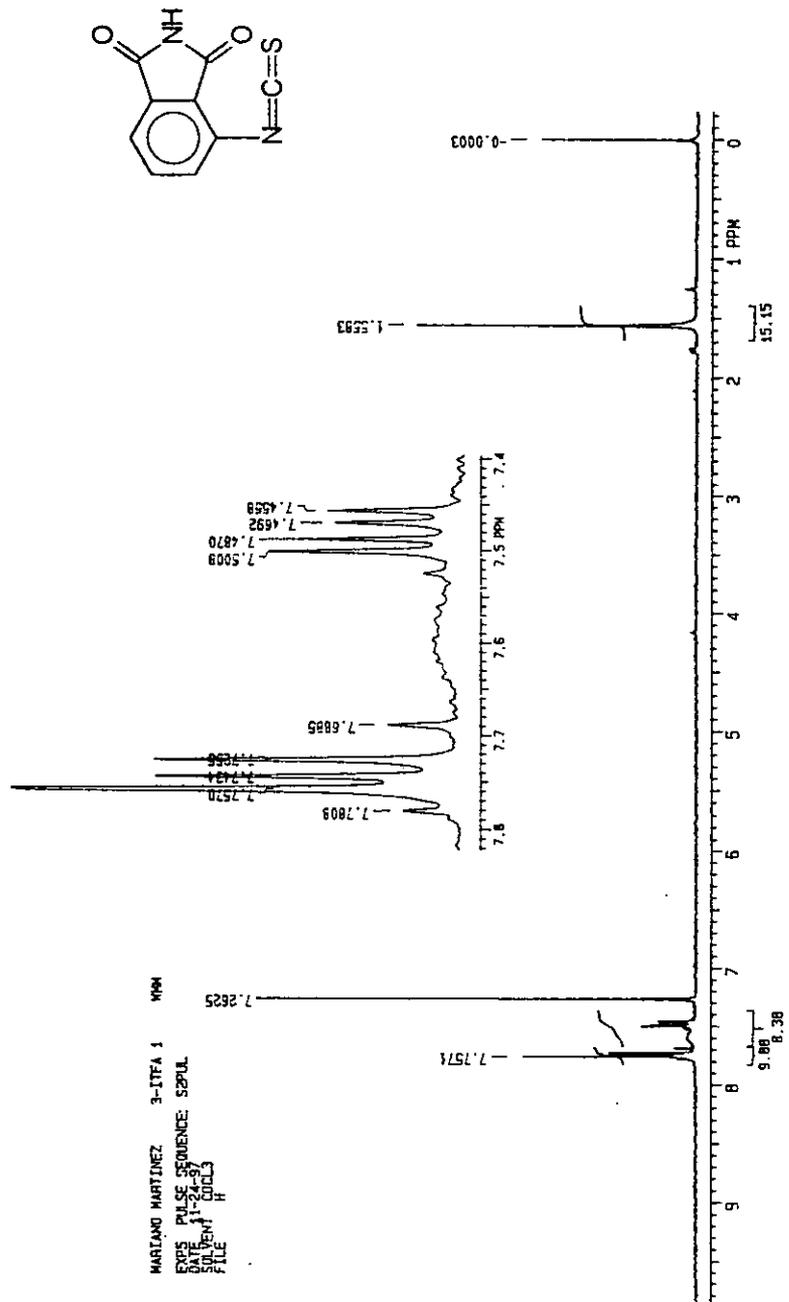


Fig. 16. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 3-isotiocianato de ftalimida. Se observan 3 señales doble de doble en 7.86, 7.73 y 7.47 ppm, correspondientes a los hidrógenos de los carbonos no sustituidos del anillo bencénico; y una señal simple en 7.26 ppm correspondiente al H de NH.

Dr. Mariano Méz. 3-ITFA. hr  
Disolvente:  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$

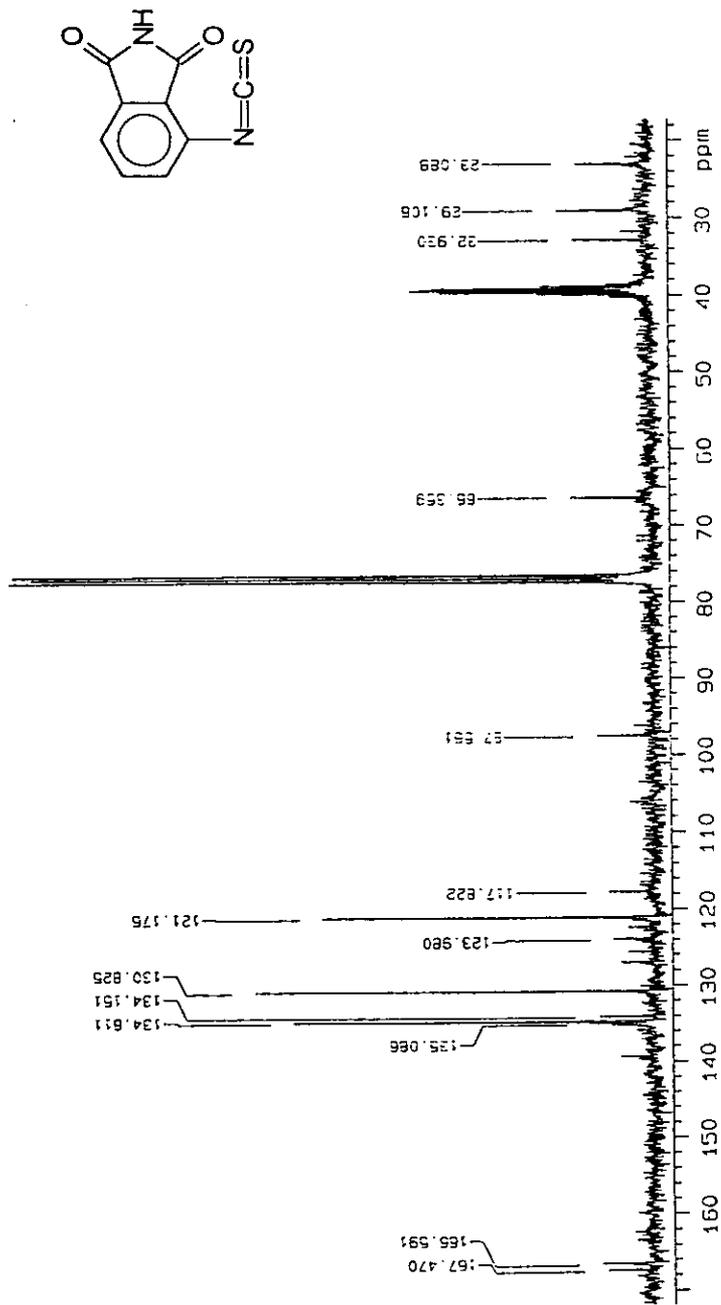


Fig. 17. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 3 - isotiocianato de *flaímida*. Se observan las señales en 167.5 y 121.2 ppm para los carbonilos, las señales en 166.6, 134.8 y 130.8 ppm corresponden a los carbonos aromáticos sustituidos, las señales en 135.1, 135.1 y 124.0 ppm pertenecen a los carbonos no sustituidos y la señal 134.1 para el carbono del grupo isotiocianato.



VIII. RESULTADOS

[ Mass Spectrum ]  
 Date : 24-Sep-17 11:06;  
 Data : Martinez-M083  
 Sample: 4-11FH  
 Note : -  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)  
 RT : 1.17 min. Scan : 138.50  
 IP : 2.2e-09 Torr Int. : 1337.06  
 Output m/z : 41 to 270.0303 G. Level : 0.00 %  
 14kV, 100uA

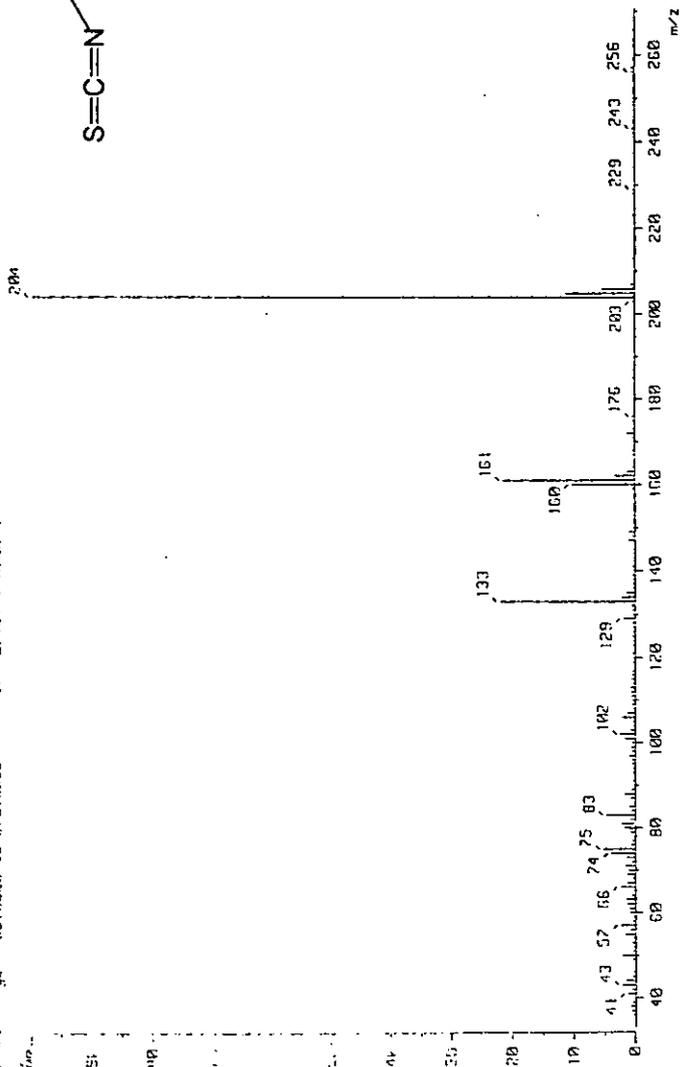
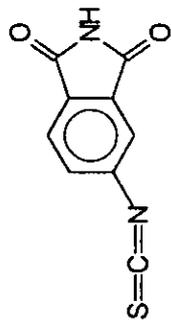


Fig. 19. Espectro de EM de 4-isotiocianato de ftalimida. Su PM de 204 Da se relaciona con un compuesto de fórmula  $C_9H_4N_2O_2S$ . El ion molecular m/z 204, fue también el pico base.

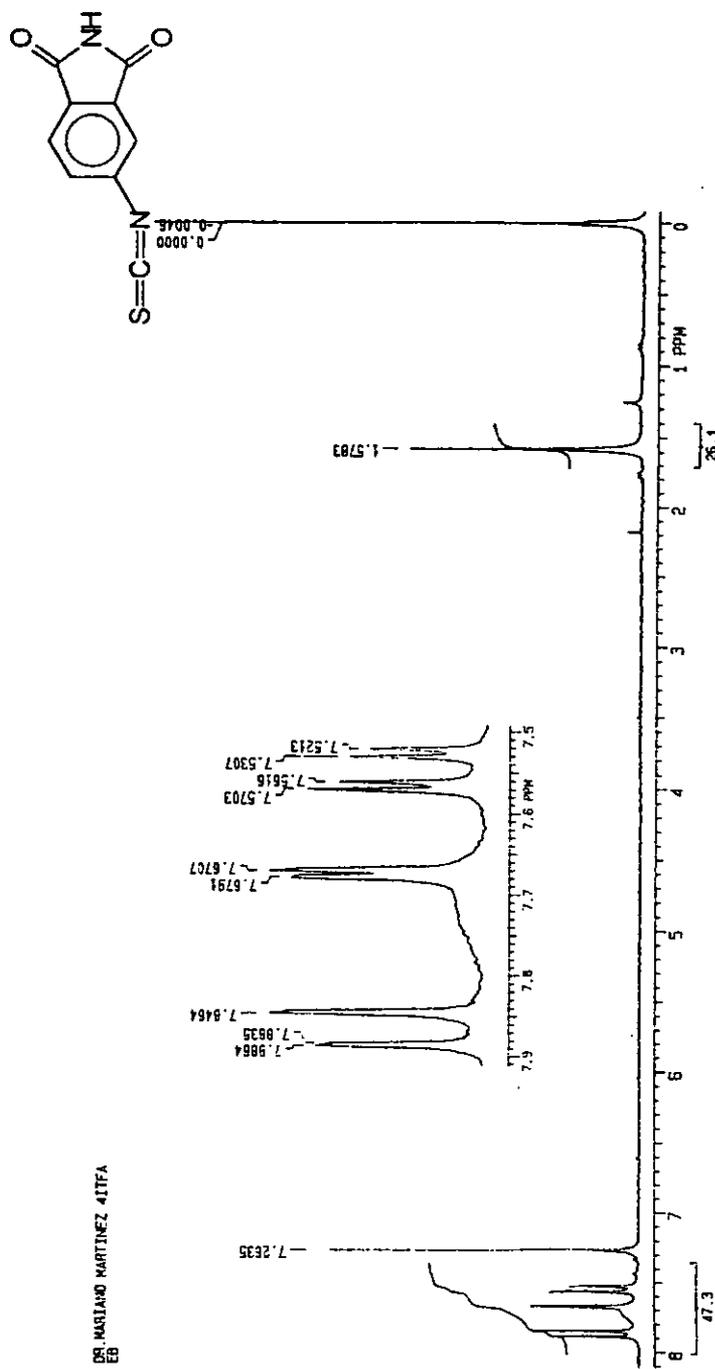


Fig. 20. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4-isotiocianato de ftalimida. Se observan 2 señales dobles en 7.86 y 7.67 ppm y una señal doble de doble en 7.55 ppm, correspondientes a los hidrógenos de los carbonos no sustituidos del anillo bencénico ; y una señal simple en 7.26 ppm correspondiente al H de NH.

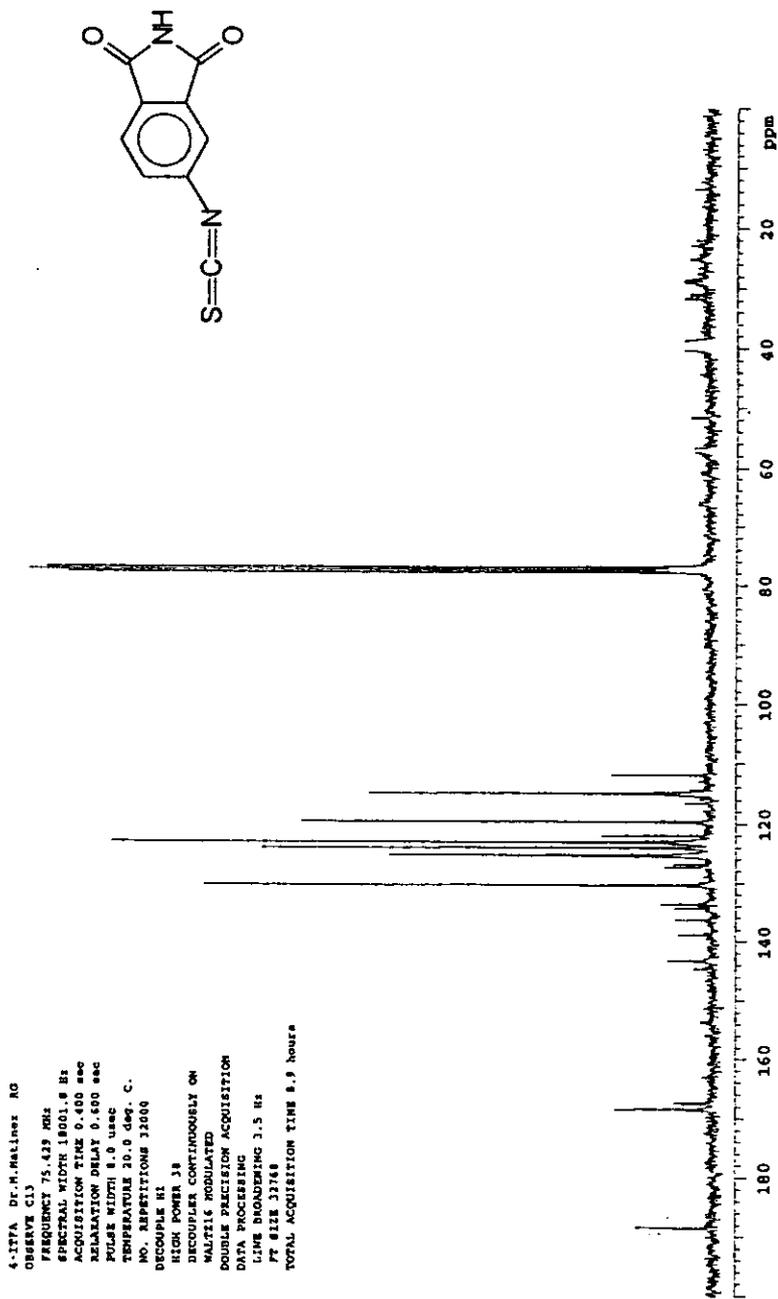
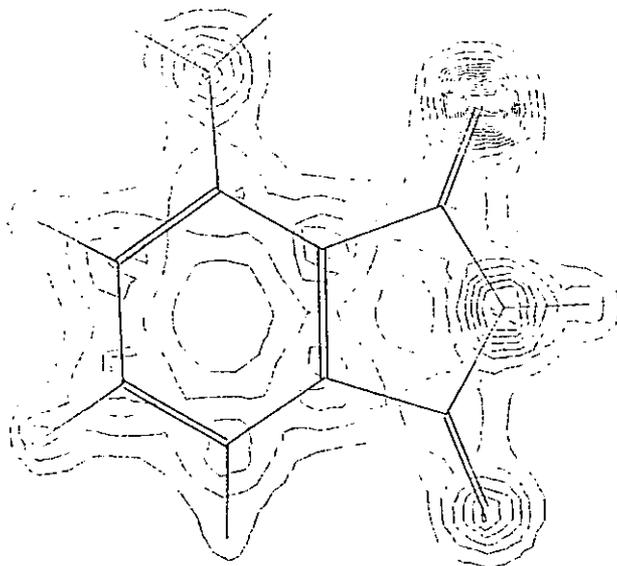


Fig. 21. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 4-isotiocianato de *ftalimida*. Se observan las señales en 168.4 y 115.0 ppm para los carbonilos, las señales en 130.4, 125.3 y 122.0 ppm corresponden a los carbonos aromáticos sustituidos, las señales en 123.2, 121.0 y 119.6 ppm pertenecen a los carbonos no sustituidos y la señal 123.1 para el carbono del grupo isotiocianato.

3-NF



4-NF

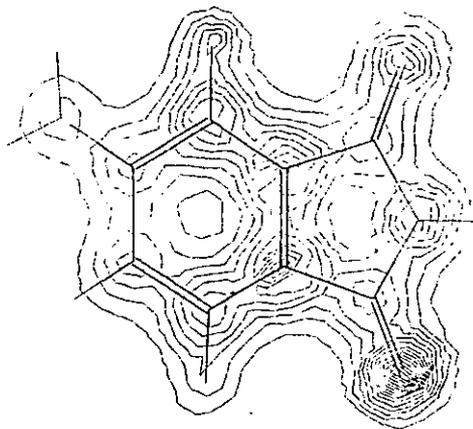


Fig. 22. Densidad de carga total de 3-aminofthalimida y 4-aminofthalimida, propuesta por MINDOO/3 HYPER CHEM. En 3-NF la mayor densidad de carga se concentra en el oxígeno del C<sub>2</sub>, mientras en 4-NF el oxígeno del C<sub>7</sub> es el más electronegativo. El 4-NF posee mayor intensidad de densidad electrónica.

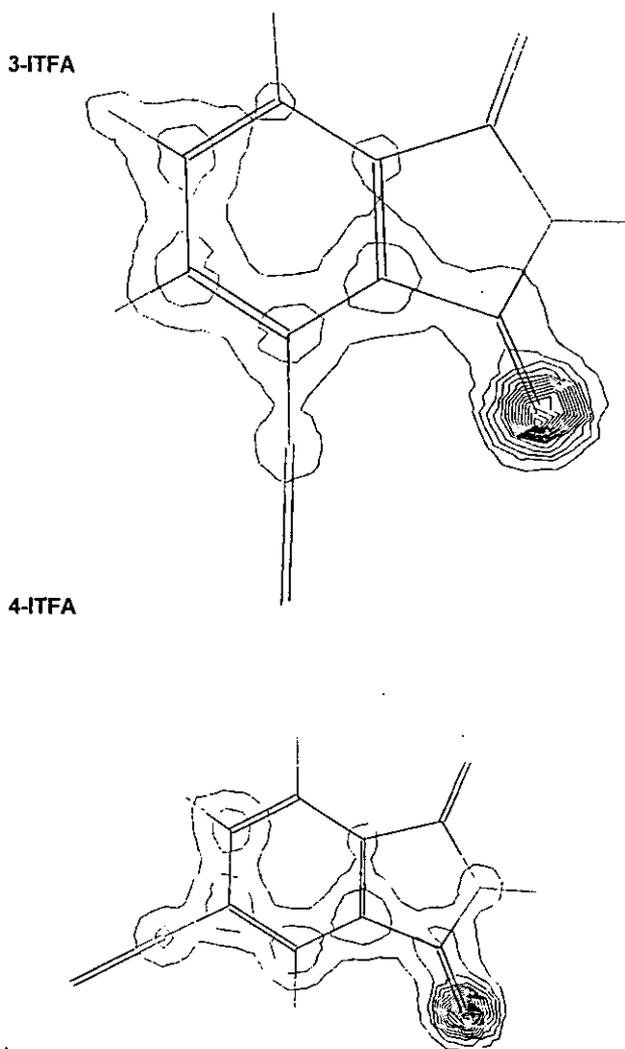


Fig. 23. Densidad de carga total de 3-isotiocianato de ftalimida y 4-isotiocianato de ftalimida, propuesta por MINDOO/3 HYPER CHEM. En las dos moléculas la mayor densidad de carga se concentra en el  $C_2$ .

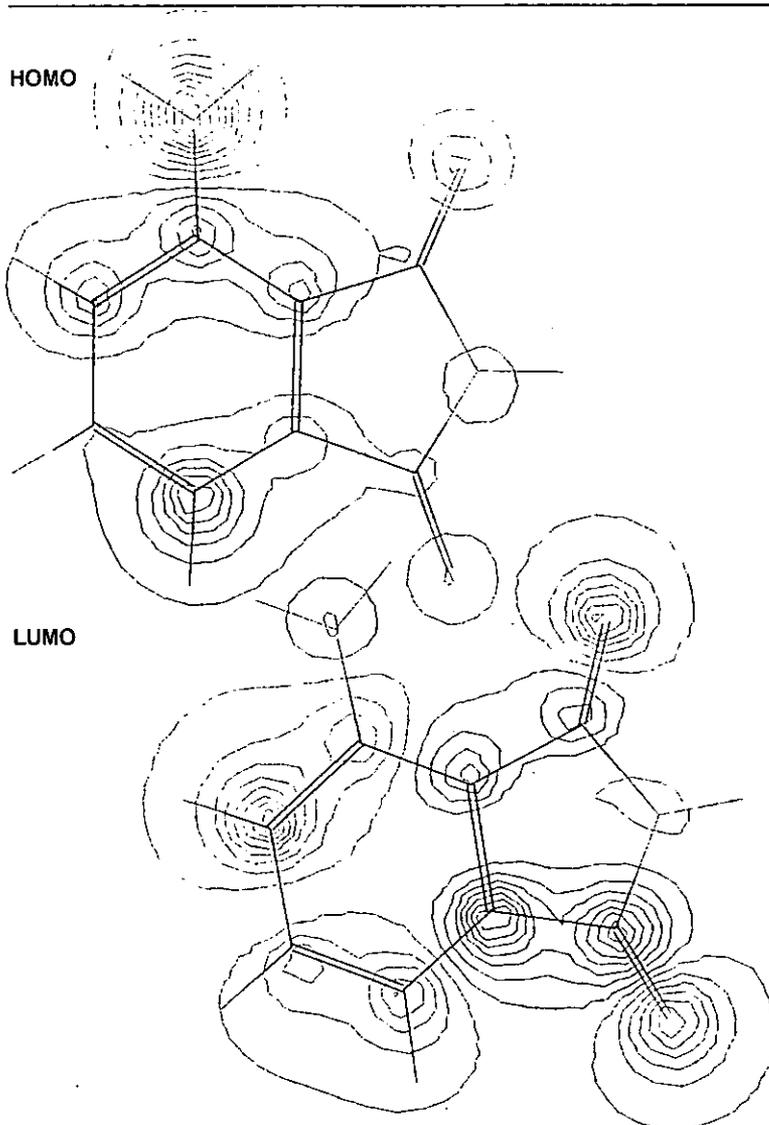
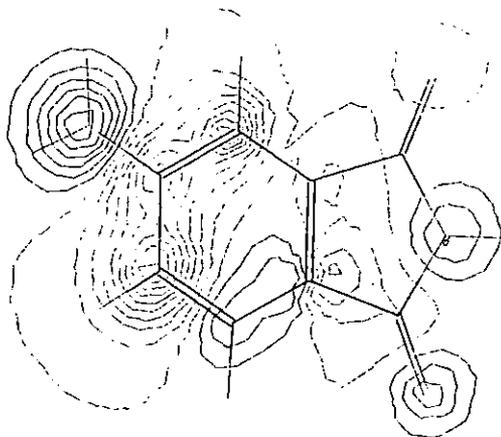


Fig. 24. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 3-amino-ftalimida, propuesto por MINDOO/3 HYPER CHEM. Estos mapas son diferentes en intensidad y fase de densidad electrónica. En el HOMO, el grupo amino posee mediana energía potencial.

HOMO



LUMO

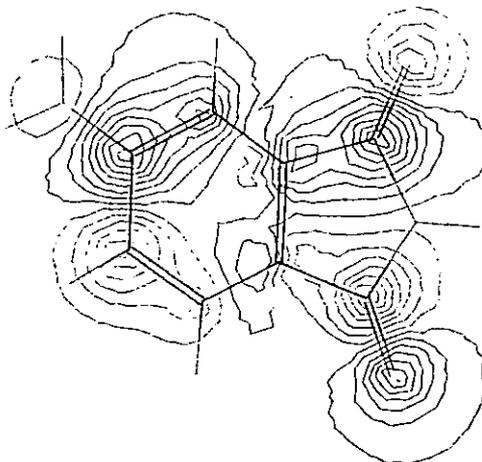


Fig. 25. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 4-amino-ftalimida, propuesto por MINDO0/3 HYPER CHEM. Los orbitales HOMO y LUMO son diferentes en intensidad y fase.

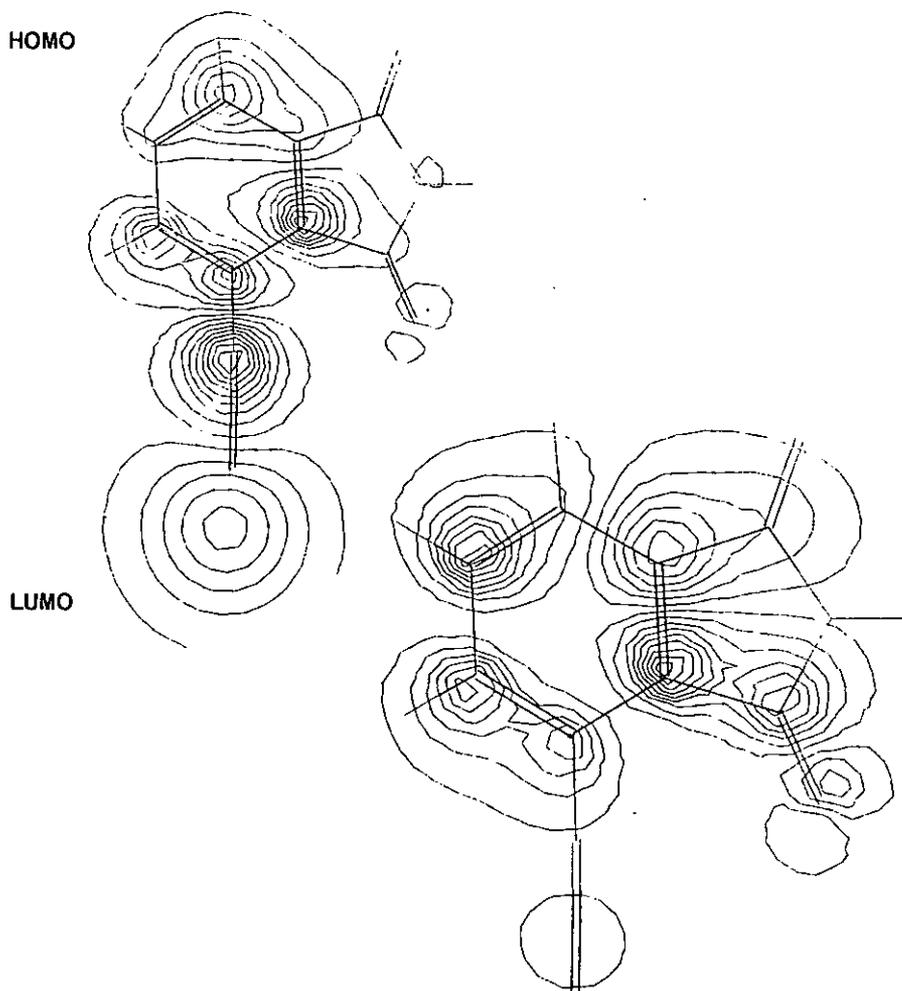
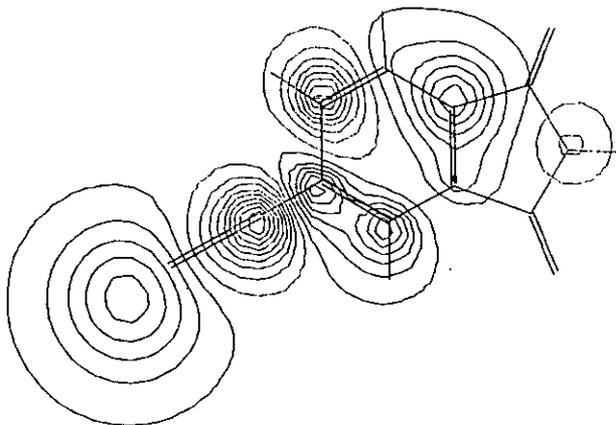


Fig. 26. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 3-isotiocianato de ftalimida, propuesto por MINDOO/3 HYPER CHEM. Se observan diferencias en la energía, sobre todo en los átomos de nitrógeno y azufre del grupo isotiocianato en el orbital HOMO, además se encuentran en fases dispares.

HOMO



LUMO

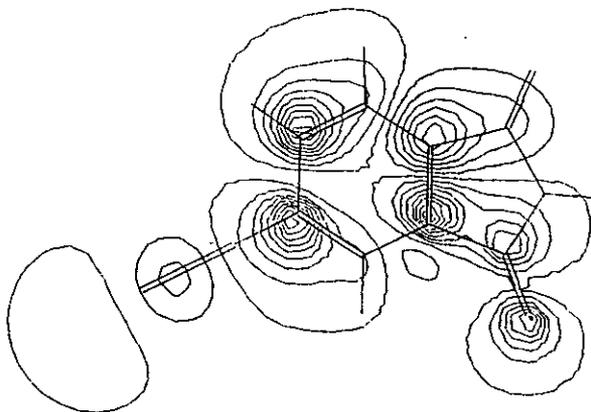


Fig. 27. Mapas de energía potencial para los orbitales HOMO y LUMO de 4-isotiocianato de ftalimida, propuesto por MINDOO/3 HYPER CHEM. Muestran diferencias en intensidad y fase de la densidad electrónica, en el orbital HOMO el átomo de azufre es muy intensa. El grupo carbonilo C<sub>7</sub> no posee energía.

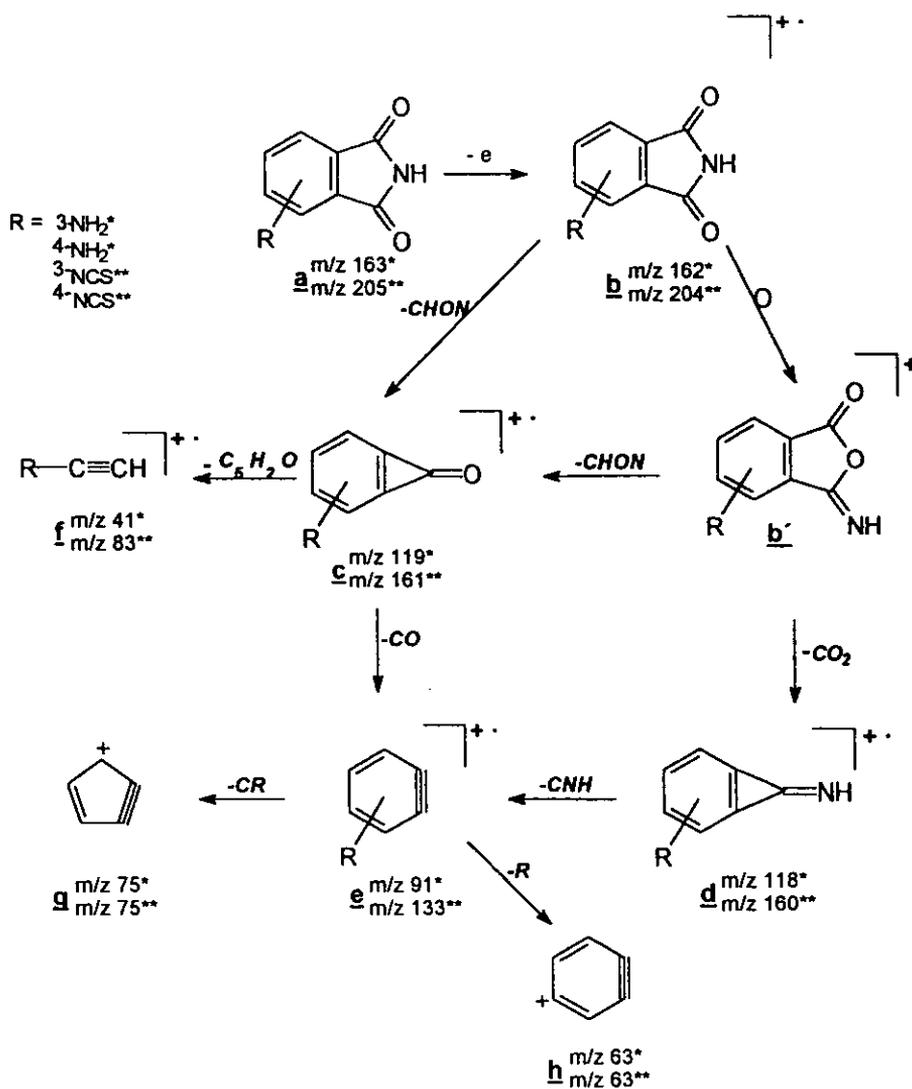
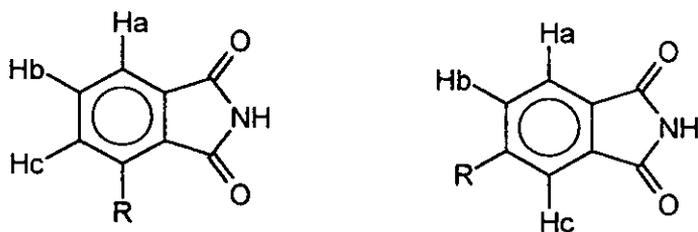
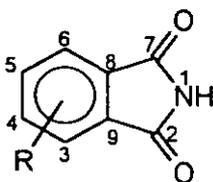


Fig. 28. Patrón de fragmentación de las moléculas 3 y 4; investigados y confirmados por técnicas de Linked Scan y Alta Resolución. Aquí se presentan los principales iones producto de la fragmentación de las moléculas (17, 35, 36).



donde R = NH<sub>2</sub>  
NCS



donde R = NH<sub>2</sub>  
NCS siendo C<sub>10</sub>

Fig. 29. Asignación de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN para las ftalimidas 3 y 4. Aquí se presenta la asignación del hidrógeno y del carbono para entender la espectroscopía y los cuadros de datos espectroscópicos.

CUADRO 5. RMN  $^1\text{H}$  de las ftalimidas 3 y 4 \*.

<i>H</i>	<i>3-NF</i>	<i>4-NF</i>	<i>3-ITFA</i>	<i>4-ITFA</i>
<i>H<sub>a</sub></i>	6.94	7.43	7.86	7.86
<i>H<sub>b</sub></i>	7.41	6.79	7.47	7.55
<i>H<sub>c</sub></i>	6.89	6.86	7.73	7.67
<i>NH</i>	10.85	10.72	7.26	7.26
<i>NH<sub>2</sub></i>	6.35	6.40	-	-

(\*) ver figuras 8, 12, 16 y 20.

(-) No presenta los hidrógenos del grupo sustituyente amino.

Nota: Los desplazamientos químicos ( $\sigma$ ) están dados en ppm. Para la asignación de H, ver fig. 30.CUADRO 6. RMN  $^{13}\text{C}$  de las ftalimidas 3 y 4 \*.

<i>C</i>	<i>3NF</i>	<i>4NF</i>	<i>3-ITFA</i>	<i>4-ITFA</i>
<i>C<sub>2</sub></i>	176.4	169.3	167.5	168.4
<i>C<sub>3</sub></i>	139.5	106.6	134.8	121.0
<i>C<sub>4</sub></i>	126.2	117.9	135.1	125.3
<i>C<sub>5</sub></i>	140.3	116.8	135.1	123.2
<i>C<sub>6</sub></i>	115.5	124.6	124.0	119.6
<i>C<sub>7</sub></i>	176.2	169.7	121.1	115.0
<i>C<sub>8</sub></i>	151.9	154.8	130.8	122.0

C	3NF	4NF	3-ITFA	4-ITFA
C <sub>9</sub>	138.8	135.5	166.6	130.4
C <sub>10</sub>	-	-	134.1	123.1

(-) No presenta el carbono 10.

Nota: Los desplazamientos químicos ( $\sigma$ ) están dados en ppm. Para la asignación de C, ver fig. 30.

**CUADRO 7.** Abundancia relativa aproximada (en relación al % pico base) de los principales iones en el espectro de masas\* 70 eV de las ftalimidias 3 y 4.

<i>Ion general</i>	<i>Asignación</i>	3-NF	4-NF	3-ITFA	4-ITFA
<b>a</b>	[M+1] <sup>+</sup>	163 (10)	163 (10)	205 (20)	205 (11)
<b>b</b>	[M] <sup>+</sup>	162 (100)	162 (100)	204 (100)	204 (100)
<b>c</b>	[M-CHON] <sup>+</sup>	119 (9)	119 (29)	161 (30)	161 (22)
<b>d</b>	[M-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	118 (12)	118 (12)	160 (16)	160 (10)
<b>e</b>	[M-CHON-CO] <sup>+</sup>	91(30)	91(37)	133 (31)	133 (22)
<b>f</b>	[M-CHON-C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	41(2)	41(10)	83(2)	83(5)
<b>g</b>	[M-CHON-CO-CR] <sup>+</sup>	75(1)	75(1)	75(13)	75(5)
<b>h</b>	[M-CHON-CO-R] <sup>+</sup>	63(5)	63(9)	63(2)	63(2)

\* Ver figuras 7, 11, 15, 19 y 29.

El número fuera del paréntesis corresponde a la relación m/z del ión asignado, y el número entre paréntesis pertenece su % de absorbancia relativa.

## IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

## DISCUSIÓN.

Los isómeros del intermediario nitroftalimida 2 fueron obtenidos a través de procedimientos previamente publicados (8-18). Los productos *3-aminoftalimida* (3-NF), *4-aminoftalimida* (4-NF), *3-isotiocianato de ftalimida* (3-ITFA) y *4-isotiocianato de ftalimida* (4-ITFA), no se han encontrado en la literatura, por lo que se consideran nuevos.

La fase experimental resultó relativamente fácil de realizar, no obstante, en este trabajo la estandarización metodológica implicó diversos inconvenientes, fundamentalmente en la hidrogenación catalítica y la reacción con el tiosfeno. La metodología fue bien detallada, estableciéndose la cantidad exacta de reactivos, las condiciones de reacción y la manera de obtener productos puros, con rendimientos moderados.

Desde el punto de vista económico, la elaboración de los fluorocromos fue relativamente costosa, sobre todo porque la fase experimental fue de carácter ensayo-error, habiendo de esta manera, malversión en reactivos y disolventes. Además, los estudios espectroscópicos y el análisis molecular por el programa MINDOO/3 Hyper Chem, se evalúan en precios elevados (como ejemplo, un estudio de espectroscopía de masas por impacto electrónico se cotiza actualmente en \$500.00 pesos) sin embargo, se contó con estos servicios sin gasto alguno.

### A) ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS.

Los isómeros 3-NF y 4-NF fueron sintetizados por hidrogenación catalítica a partir del nitrocompuesto correspondiente, siendo diferente el tiempo de reacción (5 días para el isómero 4-NF y 1.5 días para el compuesto 3-NF), lo cual sugirió la importancia de la posición del grupo sustituyente en reacción. Los productos fueron purificados por cc.

El isómero 3-NF se obtuvo de las fracciones eluidas, con un sistema 1:1 *n*-hexano-AcOEt, de la cromatografía del extracto metanólico de la reacción, como un sólido verde amarillento con un p.f. de 235 °C y un rendimiento del 63.6%. El espectro de IR (fig. 6) reveló un compuesto aromático, con grupos carbonilo, y una banda de absorción en 1595 cm<sup>-1</sup> perteniente al grupo amino. Su peso

molecular, determinado por espectrometría de masas (EM) (fig. 7) se relaciona con un compuesto de fórmula molecular  $C_8H_6N_2O_2$ , perteneciente a una aminoftalimida. El ión molecular  $m/z$  162, fue también el pico base (pb), ión muy estable. Los siguientes picos refirieron el patrón de fragmentación característico (fig. 28) para este tipo de compuestos (35, 36): 119(9)  $[M-CHON]^+$ ; 118(12)  $[M-CO_2]^+$ ; 91(30)  $[M-CHON-CO]^+$ ; 75(1)  $[M-CHON-CO-NH_2]^+$ ; 63(5)  $[M-CHON-CO-CN H_2]^+$ ; 41(2)  $[M-CHON-C_5H_2O]^+$  (cuadro 7).

También se obtuvo otro compuesto con un rendimiento del 53.0%, de consistencia sólida, color amarillo, con un p.f. de 248-251 °C, al que denominamos *4-aminoftalimida*. El espectro de IR (fig. 10) enfocó hacia un compuesto aromático, con grupos carbonilo aromáticos, y un grupo amino (banda  $1506\text{ cm}^{-1}$ ). El EM (fig. 11) mostró un comportamiento similar al del isómero 3-NF, donde los picos correspondieron a los mismos fragmentos (fig. 26, cuadro 7), variando sólo la absorbancia relativa (% ar).

El 3-ITFA fué sintetizado por acción del tiofosgeno sobre la amina, la reacción requirió 3 volúmenes de tiofosgeno para preparar suficiente producto. Se obtuvieron cristales blanco amarillentos, con un rendimiento del 67.0% y un p.f. de 235 °C. El espectro de IR (fig. 14) mostró un sistema aromático, carbonilos aromáticos y una banda muy particular,  $2075\text{ cm}^{-1}$ , referida al grupo isotiocianato. El EM (fig. 15) señaló el compuesto previsto, el pb  $m/z$  204, fue también el ión molecular más estable, y los picos principales obedecieron al modelo de fragmentación: 161(30)  $[M-CHON]^+$ ; 160(16)  $[M-CO_2]^+$ ; 133(31)  $[M-CHON-CO]^+$ ; 83(2)  $[M-CHON-C_5H_2O]^+$ ; 75(13)  $[M-CHON-CO-NCS]^+$ ; 63(2)  $[M-CHON-CO-CNCS]^+$  (fig. 28, cuadro 7). Según el % ar, los fragmentos más pequeños fueron los más inestables.

El 4-ITFA derivó de la reacción entre el tiofosgeno y la amina correspondiente, en razón equimolar. La mezcla de reacción fue tratada hasta la obtención de un compuesto amarillo naranja, con un rendimiento del 58.0% y un p.f. de 220 °C. El espectro de IR (fig. 18) mostró la estructura básica, y el grupo isotiocianato en  $2050\text{ cm}^{-1}$ . El EM (fig. 19) fue similar al del isómero 3-ITFA, pero fué diferente el % ar para cada uno de los iones (fig. 28, cuadro 7).

Como se observó en RMN  $^1H$  (cuadro 5) para 3-NF (fig. 8) y 3-ITFA (fig. 16) las señales de los hidrógenos (para su asignación, ver la fig. 29) se desplazaron hacia zona alta en 3-ITFA (p.ej.  $H_a$  de 6.79 a 7.86), efecto debido a la presencia de los grupos sustituyentes (3-amino y 3-isotiocianato). El prototipo (cuadro 5) se repitió en 4-NF (fig. 12) y 4-ITFA (fig. 20). En tanto, el H de NH estuvo más

desplazado, o menos protegido, en 3-NF y 4-NF (10.85, 10.72) que en los isotiocianatos (7.26, 7.26). Los desplazamientos químicos (cuadro 5) de H en 3-NF y 4-NF, no siguieron un modelo propio, en H<sub>a</sub> para 4-NF (7.43) es mayor que para 3-NF (6.94), pero cambia en H<sub>b</sub>, donde en 3-NF (7.41) es mayor que en 4-NF (6.79), comprobando la disimilitud en la reactividad. El mismo comportamiento se observa en los compuestos isotiocianatos.

## B) RELACIÓN ENTRE LA RMN <sup>13</sup>C Y LA DENSIDAD DE CARGA TOTAL.

Se observó una correlación entre los desplazamientos de <sup>13</sup>C y la densidad de carga total calculada por métodos semi-empíricos (MINDOO/3, Hyper Chem) (fig. 22, fig. 23, cuadro 6), apreciándose un desplazamiento mayor en aquellos carbonos con mayor densidad de carga. La designación de los carbonos en la estructura química se encuentra en la fig. 29.

La fig. 22 muestra la densidad de carga total para la molécula 3-NF, donde la mayor densidad de carga se manifestó en el oxígeno del grupo carbonilo C<sub>2</sub>, el cual está cercano al grupo sustituyente amino, también se observó una diferencia notable en la densidad de carga entre los orígenes de los carbonilos en C<sub>2</sub> y C<sub>7</sub>. Esta diferencia de carga se puede apreciar en la RMN <sup>13</sup>C (fig. 9), donde el C<sub>2</sub> resuena a 176.4, mientras que el C<sub>7</sub> lo hace a 176.2 ppm (cuadro 6). Asimismo, la fig. 22 muestra que la densidad electrónica se distribuye de manera uniforme en el anillo bencénico. Aparentemente la presencia del grupo sustituyente amino en C<sub>3</sub> no ejerce algún efecto importante en la densidad de carga. Por otro lado se puede observar que los grupos nitrógeno de los sustituyentes poseen una apreciable densidad de carga.

La fig. 22 representa el mapa de densidad de carga total para el isómero 4-NF, donde la mayor densidad de carga se muestra en el oxígeno del carbono C<sub>7</sub> y no en C<sub>2</sub> como fué en 3-NF, este efecto se relaciona con la RMN <sup>13</sup>C (fig. 13, cuadro 6), donde el C<sub>7</sub> (169.7) se desplaza más hacia campo bajo que el C<sub>2</sub> (169.3). Asimismo, la densidad de carga se distribuye en el anillo bencénico, de tal forma que el carbono C<sub>8</sub> presenta la mayor densidad de carga, el cual resuena a 154.8 ppm en RMN <sup>13</sup>C.

Comparando las dos moléculas, 3-NF y 4-NF, la densidad de carga total es más intensa en el isómero 4-NF; así también la mayor densidad de carga recae

en el oxígeno de uno de los carbonilos, siendo para el 3-NF el C<sub>2</sub>, cercano al grupo amino, y para el 4-NF el C<sub>7</sub>.

La figura 23 representa la densidad de carga total para las moléculas 3-ITFA y 4-ITFA, la mayor densidad de carga total se observa en el oxígeno del C<sub>2</sub>, el cual está cerca del grupo sustituyente isotiocianato. En general, en las dos moléculas la densidad de carga total no se encuentra distribuida uniformemente, ni es tan tangible como en los compuestos de aminoftalimida, lo cual podría atribuirse a la presencia del grupo isotiocianato, que no muestra una considerable densidad electrónica.

En resumen, el isómero 4-NF (fig. 22) presenta su mayor densidad de carga en el oxígeno del C<sub>7</sub>, y es una molécula con intensa densidad electrónica.

### C) MAPAS DE ENERGÍA POTENCIAL PARA LOS ORBITALES MOLECULARES HOMO Y LUMO.

Los mapas de energía potencial para los orbitales moleculares HOMO y LUMO, desde el punto de vista cualitativo, reflejan la reactividad de la molécula de interés. La variedad en colores observada en estas figuras, se relaciona con las diferentes fases de densidad electrónica para cada uno de los orbitales moleculares.

En la mayoría de los casos las reacciones nucleofílicas se explican por la teoría de los orbitales moleculares, llevándose a cabo entre los orbitales HOMO y LUMO. En general, se espera que las reacciones se realicen en el orbital molecular LUMO, pero pueden existir excepciones.

La fig. 24 muestra los mapas de energía potencial para los orbitales moleculares HOMO y LUMO de la molécula 3-NF. Estos mapas son diferentes entre sí, el HOMO refleja una mediana intensidad en el grupo amino, con una fase igual a los orígenes de los grupos carbonilo, mientras que el esqueleto hidrocarbonado, incluyendo el nitrógeno en la posición uno, poseen una energía potencial de fase intensa. Asimismo, el LUMO muestra distribuciones impares, así el C<sub>6</sub> y C<sub>5</sub> tienen la misma fase e intensidad, lo mismo ocurre con los siguientes pares C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub> y C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>. Llamo la atención que los dos átomos de oxígeno en C<sub>2</sub> y C<sub>7</sub> presentan la misma fase.

En cuanto a la molécula 4-NF, según se aprecia en la fig. 25, los orbitales HOMO y LUMO son diferentes en intensidad y fase. El HOMO muestra una

mediana intensidad en el grupo amino, con una fase igual en el nitrógeno uno, el oxígeno del C<sub>7</sub> y del C<sub>6</sub>. Las fases de la densidad electrónica para los oxígenos de los carbonilos C<sub>2</sub> y C<sub>7</sub> son impares, siendo mayor su energía potencial en el orbital LUMO. Los orbitales HOMO y LUMO muestran diferentes fases electrónicas en el anillo aromático.

Comparando las dos moléculas, 3-NF y 4-NF, el compuesto 4-NF presenta mayor energía en los orbitales HOMO y LUMO, pero son heterogéneos en intensidad electrónica. También existe diferencia en las fases de densidad electrónica en los grupos amino sustituyentes, asimismo en el grupo carbonilo C<sub>7</sub> con respecto al C<sub>2</sub> del 4-NF, y en los carbonilos C<sub>2</sub> y C<sub>7</sub> del 3-NF.

La fig. 26 muestra los mapas de energía potencial para los orbitales moleculares HOMO y LUMO para el 3-ITFA, en ambos se observan diferencias en la energía, sobre todo en los átomos de nitrógeno y azufre del grupo isotiocianato en el orbital HOMO, además se encuentran en fases dispares. Los grupos carbonilo C<sub>2</sub> y C<sub>7</sub> no contribuyen con energía potencial.

La fig. 27 de los orbitales moleculares para 4-ITFA muestran diferencias en intensidad y fase de la densidad electrónica, en el orbital HOMO el átomo de azufre es muy intensa y presenta la misma fase en los C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>, y otra fase en el C<sub>5</sub> y el átomo de nitrógeno del sustituyente isotiocianato. El grupo carbonilo C<sub>7</sub> no posee energía. En el LUMO el C<sub>2</sub> muestra una mediana intensidad, compartiendo la misma fase excepto en los C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>.

Existe gran diferencia en la reactividad de las moléculas 3-ITFA y 4-ITFA, fundamentada en la intensidad y las fases impares de densidad electrónica. Las dos moléculas son sistemas aromáticos de alta energía potencial.

Comparando las 4 moléculas (figs. 24-27), el grupo sustituyente isotiocianato en los isómeros 3-ITFA y 4-ITFA, muestran mayor energía potencial, que el sustituyente amino en los aminocompuestos. Los grupos carbonilo C<sub>2</sub> y C<sub>7</sub> presentan cierta energía en los isómeros 3-NF y 4-NF. Las 4 moléculas muestran una mediana intensidad en la densidad, reflejando la aromaticidad y conjugación de cada molécula.

En resumen, los mapas de energía potencial para los orbitales moleculares HOMO y LUMO reflejaron la diferente reactividad de cada una de las moléculas. Lo interesante es que los grupos sustituyentes isotiocianato en 3-ITFA y 4-ITFA concentran una alta energía potencial, mientras que en los isómeros 3-NF y 4-NF los grupos carbonilo pueden ser esenciales en la reactividad de las moléculas. Se

proponen los siguientes sitios de vinculación al anticuerpo para formar el conjugado fluorescente:

1. En los compuestos 3-ITFA y 4-ITFA, el grupo isotiocianato se vincula al amino-terminal del aminoácido *L*-lisina del anticuerpo, formando un derivado de tiourea (7).
2. El grupo carbonilo más reactivo en los isómeros 3-NF y 4-NF son sitios de vinculación al amino-terminal del aminoácido *L*-lisina en el anticuerpo, formando un enlace peptídico estable.

## CONCLUSIONES.

- \* Se sintetizaron y caracterizaron espectroscópicamente cuatro moléculas fluorescentes: *3-aminofthalimida* , *4-aminofthalimida*, *3-isotiocianato de fthalimida* y *4-isotiocianato de fthalimida*, de conformación plana y dobles enlaces conjugados.
- \* El análisis molecular de los fluorocromos sintetizados por MINDOO/3 HYPER CHEM, demostró que el grupo carbonilo es el grupo funcional más reactivo en los isómeros 3-NF y 4-NF, pudiendo ser el sitio de vinculación al amino-terminal del aminoácido *L*-lisina en el anticuerpo. En los compuestos 3-ITFA y 4-ITFA, el grupo isotiocianato se vincula al amino-terminal del aminoácido *L*-lisina del anticuerpo, formando un derivado de tiourea unido por enlaces covalentes.
- \* Las moléculas 4-NF y 4-ITFA son más reactivas que los isómeros 3- NF y 3-ITFA, pero 4-NF es aún mucho más reactiva, pues el carbonilo en reacción, contrario al grupo sustituyente, le confiere mayor densidad de carga y reactividad a la molécula, evitando problemas de impedimento estérico al unirse al amino-terminal del aminoácido *L*-lisina en el anticuerpo. Se propone el compuesto 4-aminofthalimida, como el más recomendable en la elaboración del inmunoconjugado.
- \* Los fluorocromos propuestos 3- y 4-aminofthalimida y 3- y 4-isotiocianato de fthalimida presentan características similares al isotiocianato de fluoresceína con una  $\lambda_{abs/em}$  de 494/520 nm y poseen los grupos reactivos para vincularse a un anticuerpo IgG. Por ello prometen ser fluorocromos alternativos, adecuados para su uso en pruebas inmunológicas. Sin embargo aun se requieren investigaciones más profundas para definir todas las características fisicoquímicas y biológicas de estos reactivos y poderlos establecer como verdaderos sustitutos al isotiocianato de fluoresceína.

## X. REFERENCIAS

## REFERENCIAS POR ORDEN DE APARICIÓN.

1. Miroslav Ferencik, *Immunochemical methods, Handbook of Immunochemistry*, Chapman & Hall, 1993, Londres, 309-310, 363-371, 381-384.
2. Anthony Nowotny, *Conjugation of antibodies with fluorescein and rhodamine, Basic Exercises in Immunochemistry. A Laboratory Manual*, 2a. ed., Springer-Verlag, 1979, Berlin, 41-44, 275-277.
3. René Masseyeff, Winfried Albert and Norman Staines, *Principles of immunoassays, Methods of Immunological Analysis*, Vol. 1, VCH, 1993, Berlin, 66-77, 297-315.
4. Rajendra M. Srivastava, Roberto Antunes, Hildson Batista and Thomas George, (1997), *A posible bond formation between new phthalimide derivates and an enzyme resulting in analgesic activity, 16th International Congress of Heterocyclic Chemistry*, Montana State University-Bozeman, POII-251.
5. Derek Smyth, O.O. Blumenfeld and W. Konigsberg, (1964), *Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids*, *Biochem. J.*, **91** 589-595.
6. René Miranda y Ernesto Cortés, (1978), *Espectrometría de masas de N-cicloalquil, 3-amino, N'-cicloalquil ftalimidias*, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **22** 381-383.
7. <http://www.probes.com/handbook/ch01-1.html>
8. Donald L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, *Luminol, Introduction to organic laboratory techniques. A contemporary approach.*, 2a. ed., CBS Collection Publishing, 1982, Philadelphia, 371-378.
9. Albert H. Coons and Melvin H. Kaplan, (1950), *Localization of antigen in tissue cells*, *J. Exp. Med.*, **91** 1-13.
10. Emil H. White and David F. Roswell, (1970), *The chemiluminescence of organic hydrazides*, *Acc. Chem. Res.*, **3** 54-62.
11. Satyavan Sharma, (1978), *Thiophosgene in organic synthesis*, *Synth.*, **10** 803-819.
12. Juan A. Senosian, (1969), *Derivados en el nitrógeno del anhídrido 3-aminoftálico*, Tesis Químico, Facultad de Química, 1-24.
13. P. J. Culhane and G. E. Woodward, (1947), *3-nitrophthalic acid*, *Org. Synth. Coll.* **1** 408-410.
14. B. H. Nicolet and J. A. Bender, (1947), *3-nitrophthalic anhydride*, *Org. Synth. Coll.* **1** 410-411.

15. W. A. Noyes and P. K. Porter, (1947), *Phthalimide*, *Org. Synth. Coll.* **1** 457-459.
16. E. L. Eliel, (1955), *The methyl esters of 3-hidroxyphthalic acid. Selective reduction of monomethyl phthalates with lithium aluminum hydride*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **77** 5092-5095.
17. Joachim Demnitz, Bruno Monteiro, Mozart N. Ramos and Rajendra M. Srivastava, (1997), *Synthesis and mass spectral studies of N-aryolphthalimides*, *Het. Commun.*, **3**(2) 115-122.
18. G. Malcolm, (1947), *Thiophosgene*, *Org. Synth. Coll.*, **1** 506-511.
19. J. Abel Ciprián y Tonatiuh A. Cruz, (1994), *Neumonía Enzoótica en México, Nuestro Acontecer Porcino*, **2**(8) 22-32.
20. E. D. Harlow and David Lane, *Labeling antibodies, Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Sping Harbor Laboratory CSH, 1988, Brisbane, 321-323, 353-358, 409-411.
21. Norio Ichinose, George Schwedt, Frank M. Schnepal and Kioko Adachi, *Physical property of fluorescence, Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991, 5-18.
22. <http://www.probes.com/handbook/ch00-1.html>
23. <http://www.probes.com/handbook/ch15-1.html>
24. G. Griffiths, *Immunofluorescence analysis, Fine Structure Immunocytochemistry*, Springer-Verlag, 1993, Heidelberg, 237-278.
25. <http://www.probes.com/handbook/tables/tab01-1.html>
26. <http://www.probes.com/cgi-bin/struct.cgi?product>
27. R. F. Steiner and H. Edelhoch, (1962), *Fluorescent protein conjugates*, *Chem. Rev.*, **62** 457-483.
28. <http://www.probes.com/handbook/ch01-3.html>
29. <http://www.probes.com/handbook/figs/fig01-1.html>
30. <http://www.probes.com/handbook/figs/fig01-5.html>
31. <http://www.probes.com/handbook/ch01-4.html>
32. <http://www.probes.com/cgi-bin/table.cgi?...=Select+Region&code=G01.3&product>
33. <http://www.probes.com/cgi-bin/table.cgi?...=Select+Region&code=G01.4&product>
34. <http://www.probes.com/handbook/datatables.html>
35. Anders Kjær, M. Ohashi, J. M. Wilson and Carl Djerassi, (1963), *Mass spectra of isothiocyanates*, *Acta Chem. Scand.*, **17** 2143-2154.

- 
36. Erik Bach, Anders Kjær, R. H. Shapiro and Carl Djerassi, (1965), *Mass spectra of two deuterated isothiocyanates*, *Acta Chem. Scand.*, **19** 2438-2440.
  37. <http://www.probes.com/cgi-bin/msds.cgi?product=00143>
  38. <http://www.probes.com/cgi-bin/psearch.cgi>