



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Síntesis, Caracterización y Evaluación de la fluorescencia en técnicas citogenéticas de compuestos LQM 105, 108, 114, 120 y 122.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

CHRISTIAN FERNANDO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

ASESOR: DR. ENRIQUE R. ÁNGELES AGUIANO

COASESOR: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Síntesis, Caracterización y Evaluación de la fluorescencia en técnicas citogenéticas de compuestos LQM 105, 108, 114, 120 y 122

Que presenta el pasante: Christian Fernando Hernández Martínez
Con número de cuenta: 306080197 para obtener el Título de: Licenciado en Farmacia

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez	
1er. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do. SUPLENTE	M. en C. Víctor Hugo Vázquez Valadez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por haberme dado vida, salud y fuerza para seguir adelante.

A mis padres

Que siempre estuvieron en los momentos difíciles con migo y que siempre me apoyaron en las buenas y en las malas, enseñándome a trabajar duro sin agachar la cabeza. Gracias por haberme llevado de la mano por el buen camino e inculcado valores.

Todo lo que soy ahora es gracias a ustedes.

A mis hermanos

Eddy, Karen y Giovanni por haberme dado solidaridad, amistad, amor y cariño, los quiero mucho y sé que puede contar con ustedes. Gracias por haberme dado a esos sobrinitos que tanto quiero Matías, Ángel y Nicole que me llena de felicidad solo de pensar en ellos.

A mis abuelitas

A mi abuelita Zara a quien quiero y respeto mucho, a mi abuelita teresa que es alguien muy especial que me cuida desde el cielo y que siempre se preocupó por mi estará en mi corazón , que me conocía bien y me quería mucho

Te quiero abuelita.

A mis amigos

Surtido rico: que me hicieron pasar momentos llenos de alegría y me dieron ánimos en momentos difíciles y que se desvelaron muchas veces con migo para entregar tareas, lo que dio como resultados que hoy seamos unos excelentes farmacéuticos. Lere, Karla, Laura, Tania que son buenas amigas que me escucharon y me hicieron reír. Pablo y Moni por darme consejos y haberme ayudado a resolver problemas en el laboratorio.

A Marylu

El amor de mi vida que me ha enseñado muchas cosas y me hizo ver el mundo de otra manera, que siempre estuvo a mi lado en las buenas y en las malas tratando de apoyarme en todo lo que estuviera a su alcance sin importarle lo que fuera pasar.

Al Doc.

Por haberme permitido pertenecer a su equipo de trabajo y por asesorarme durante mi trabajo experimental

A la Dra. Sandra

Gracias por haberme permitido hacer uso de sus instalaciones y por proporcionarme todo el equipo y apoyo necesario al tiempo que realice la tesis.

A la UNAM,

En especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, por haberme permitido ser parte de la casa de estudios más importante de Latinoamérica

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIME PE202912 “Implementación de actividades teórico-prácticas para la obtención de competencias en genómica de las carreras BQD y Farmacia” y el proyecto PACIVE DOC-21.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
2.1.- Citogenética	3
2.2.- Técnicas citogenéticas.	4
2.2.1.-Preparaciones cromosómicas.....	4
2.2.2.-Técnica de micronúcleos	5
2.2.3.- Electroforesis en geles de agarosa.....	6
2.3.- Fluorescencia.....	7
2.3.1.- Microscopia de fluorescencia.....	12
2.4.- Sistemas pentagonales con dos heteroátomos: Isoxazoles.....	14
2.4.1.- Métodos de síntesis.....	16
2.5.- Espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.....	17
3.- OBJETIVOS.....	20
4.- MÉTODO	21
4.1.- Síntesis química	21
4.2.- Caracterización.....	22
4.3.- Evaluación: Micronúcleos, preparaciones cromosómicas de médula de ratón, electroforesis en gel de agarosa	23
5.- RESULTADOS.....	25
5.1.- Síntesis y caracterización	25
5.2.- Evaluación	32
6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
7.- CONCLUSIONES	41
8.- PROSPECTIVAS	42
9. - REFERENCIAS	43
10.- ANEXOS	47
10.1.- Espectros del LQM 102	47

10.2.- Espectros del LQM 105	49
10.3.- Espectros del LQM 108.....	51
10.4.- Espectros del LQM 114.....	53
10.5.- Espectro de infrarrojo del LQM 120.....	55
10.6.- Espectro de infrarrojo del LQM 122.....	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general del cromosoma humano y sus principales partes que lo conforman.....	4
Figura 2. Formación de micronúcleos. Las células presentaban micronúcleos. A) micronúcleos (MN) originados por fragmentos cromosómicos de tipo acéntrico derivados de roturas no reparadas. B) micronúcleos originados por cromosomas enteros derivados de una mala segregación durante la mitosis.	6
Figura 3. Separación de ADN por electroforesis en gel de agarosa. EL ADN migra de acuerdo a su carga y peso molecular, migra del polo negativo al polo positivo.	7
Figura 4. Cuando una radiación incidente de longitud de onda corta λ_1 excita un electrón en la nube electrónica que rodea al núcleo del átomo situado en el centro. La energía absorbida por el electrón lo excita hacia las capas periféricas de la nube, de donde volverá a caer por saltos cuánticos, emitiendo cada vez una radiación de fluorescencia de mayor longitud de onda λ_2 después λ_3	8
Figura 5. Espectros de absorción y emisión del antraceno. Obsérvese que los espectros son aproximadamente especulares.....	9
Figura 6. Estructura química del bromuro de etidio.	10
Figura 7. Estructura química del DAPI.	11
Figura 8. Estructura química del colorante de Hoechst.....	11
Figura 9. Estructura química del naranja de acridina.....	12
Figura 10. Partes fundamentales del microscopio de fluorescencia.....	14
Figura 11. Sistemas pentagonales con más de un heteroátomo.....	14
Figura 12. Orbitales moleculares del anillo de isoxazol.	15
Figura 13. Estructuras de resonancia del isoxazol.....	15
Figura 14. Reacción con hidroxilamina y compuesto 1,3 dicarbonílico.....	16
Figura 15. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar con óxidos de nitrilo.....	16
Figura 16. Espectro electromagnético.....	17
Figura 17. Las ondas electromagnéticas que se caracterizan por una longitud de onda, frecuencia y una amplitud.	17
Figura 18. Modos normales de vibración de una molécula.....	18
Figura 19. Reacción general para la formación de los isoxazoles 5 sustituidos, utilizando como materia prima de inicio hidroxilamina y 2,4 pentanodiona.....	22
Figura 20. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 102. En el espectro podemos observar las siguientes bandas que representan los principales grupos funcionales del compuesto LQM 102: C-sp ³ (2870 cm ⁻¹), C=C (1602.58 cm ⁻¹), NO ₂ (1500, 1359 cm ⁻¹).....	47
Figura 21. Espectro de ¹ H RMN del compuesto LQM 102. ¹ H RMN (CDCl ₃): δ (ppm) 2.816 (3H,s, CH ₃); 2.55 (3 H,s,CH ₃).....	47
Figura 22. Espectro de ¹³ C RMN del compuesto LQM 102. ¹³ C RMN (CDCl ₃): δ (ppm) 172.37 (C=O); 155.97 (C=N); 77.88 (C=NO ₂); 14.30 (CH ₃); 14.30 (CH ₃).....	48
Figura 23. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 105. C-aromático (2161.9-1680 cm ⁻¹), C=C (1621.2 cm ⁻¹), NO ₂ (1508,1378.5 cm ⁻¹), C-Br (824.5 cm ⁻¹).....	49
Figura 24. Espectro de ¹ H RMN del compuesto LQM 105. ¹ H RMN (DMSO): δ (ppm) 7.32-7.8 (4H,m,Ar.); 5.25 (1H,d,CH.); 5.04 (1H,d,CH.); 2.33 (3 H,s,CH ₃).....	49

Figura 25. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto LQM 105. ^{13}C RMN (DMSO): δ (ppm) 157.1 (C=N); 156.3 (C=O); 137.02 (C=C); 133.02 (=C-C-Ar); 132.2 (C-Ar.); 131.27 (C-Ar.); 130.94 (Br-C-Ar.); 130.3 (C=C.); 112.27 (C=NO ₂); 11.84 (CH ₃).	50
Figura 26. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 108. C-aromático (2000-1650 cm^{-1}), C=C (1601 cm^{-1}), NO ₂ (1557,1358.8 cm^{-1}), C-Cl (816.67 cm^{-1})	51
Figura 27. Espectro de ^1H RMN del compuesto LQM 108. ^1H RMN (DMSO): δ (ppm) 7--7.8 (4H,m,Ar.); 5.3 (1H,d,CH.); 5.1 (1H,d,CH.); 2.33 (3 H,s,CH ₃)	51
Figura 28. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto LQM 108. ^{13}C RMN (DMSO): δ (ppm) 167.08 (C=N); 157.06 (C=O); 136.45 (-C-Ar.); 134.67(C=C.); 134.05 (Cl-C-Ar.); 131.6(C-Ar.); 131.09 (C-Ar.); 124.12 (=C-C-Ar); 112.24 (C=NO ₂); 11.83 (CH ₃).	52
Figura 29. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 114. C-sp ³ (2919.3 cm^{-1}), C-aromático (2050-1650 cm^{-1}), C=C (1601 cm^{-1}), NO ₂ (1505,1374 cm^{-1})	53
Figura 30. Espectro de ^1H RMN del compuesto LQM 114. ^1H RMN (CDCl ₃): δ (ppm) 7.55-7.2 (4H,m,Ar.); 5.3 (1H,d,CH.); 5.1 (1H,d,CH.); 2.4 (3 H,s,CH ₃); 2.6 (3 H,s,CH ₃)	53
Figura 31. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto LQM 114. ^{13}C RMN (CDCl ₃): δ (ppm) 167.5 (C=N); 156.24 (C=O); 142.29 (-C-Ar.); 137.38(C-Ar.); 135.09 (C=C); 130.64 (C-Ar.); 129.8 (C-Ar); 127.84 (C=C); 110.47 (C=NO ₂); 11.86 (CH ₃); 21.45 (CH ₃).	54
Figura 32. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 120. OH (3671.9), C-sp ³ (2941.4 cm^{-1}), C-aromático (2522-1600 cm^{-1}), C=C (1612.2 cm^{-1}), NO ₂ (1569.2,1345.6 cm^{-1})	55
Figura 33. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 120. C-sp ³ (2946.5 cm^{-1}), C-aromático (2300-2600 cm^{-1}), C=C (1620.8 cm^{-1}), NO ₂ (1505.78,1360 cm^{-1})	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos generales de los compuestos obtenidos de la síntesis.....	25
Tabla 2. Solubilidad de los compuestos sintetizados en diferentes solventes.....	27
Tabla 3. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 102.....	28
Tabla 4. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 105.....	29
Tabla 5. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 108.....	29
Tabla 6. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 114.....	30
Tabla 7. Resultado del espectro de infrarrojo del compuesto LQM 120	30
Tabla 8. Resultado del espectro de infrarrojo del compuesto del compuesto LQM 122	31
Tabla 9. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel del compuesto LQM 105.....	32
Tabla 10. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel del compuesto LQM 108.....	33
Tabla 11. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel del compuesto LQM 114.....	33
Tabla 12. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel del compuesto LQM 120.....	34
Tabla 13. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel del compuesto LQM 122.....	34
Tabla 14. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel con naranja de acridina como control positivo.	35

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A-T	Adenina- Timina
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil sulfóxido
HCl	Ácido clorhídrico
IR	Infrarrojo
pH	Potencial de Hidrogeno
PHA	Fitohemaglutinina
Pka	Constante de acidez
MN	Micronúcleos
RMN¹³C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H

1.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años la citogenética ha ido adquiriendo mayor importancia y con ello el desarrollo de nuevas técnicas de fluorescencia. En la mayoría de las técnicas citogenéticas se utilizan diversos compuestos orgánicos entre ellos se encuentran los colorantes que sirven para teñir estructuras de interés. Los colorantes fluorescentes (fluorocromos) son muy utilizados para teñir regiones específicas del ADN; sin embargo el uso de estos, se ve disminuido debido a su toxicidad y alto costo. Esto ha generado que se sinteticen nuevas moléculas orgánicas con mejores características en comparación con los fluorocromos utilizados en la actualidad.

El sintetizar una nueva molécula, implica también desarrollar o adecuar un método que permita obtener resultados favorables. Los métodos de síntesis de compuestos de interés farmacéutico o con determinado interés químico, se obtienen mediante tiempos largos, condiciones hasta cierto punto drásticas y el rendimiento suele ser bajo. Durante la síntesis de un compuesto, no se trata solamente de unir átomos arbitrariamente, sino más bien se tiene que planificar y tener diversas estrategias, teniendo en cuenta la posición de los grupos funcionales que posee y su estereoquímica. Lo que se busca en la síntesis química es: tener rendimientos de reacción mayores con producción mínima de subproductos, tiempos cortos de reacción, empleo de materia prima asequibles, empleo de reactivos y disolventes no tóxicos, minimización del número de etapas, condiciones de reacción que no sean severas (presión y temperatura), entre otras. Por lo tanto la planificación de una estrategia de síntesis requiere conocer a profundidad la reactividad y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos orgánicos, para poder establecer las condiciones óptimas para que la o las reacciones se lleven a cabo. Y esto con lleva a que se debe tener una buena base orgánica para saber qué es lo que se va hacer y que va a suceder.

En el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se han sintetizado diversos compuestos con posible actividad biológica como lo son antiparasitarios, anticancerígenos, antihipertensivos entre otros, dentro de estos compuestos existe una serie denominada LQM 100 que pertenecen al grupo de los isoxazoles. Los isoxazoles son heterociclos de cinco miembros con dos heteroátomos (nitrógeno-oxígeno), tienen diversas aplicaciones y han demostrado ser muy versátiles como bloques de construcción en síntesis orgánica. Además de los usos antes mencionados se ha observado en el laboratorio que presentan propiedades fluorescentes cuando se observan bajo luz

ultravioleta; por ello se ha decidido evaluar a los compuestos de la serie LQM 100 para saber si pudiesen ser utilizados como posibles colorantes en técnicas de identificación citogenética. Esto es de gran importancia porque la citogenética es una herramienta útil para la medicina, ya que permite que exista un apoyo en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades relacionadas con los cromosomas.

Actualmente en el mercado existen diversas opciones de colorantes que pueden emplearse para técnicas citogenéticas, sin embargo, la mayoría de ellos posee alguna desventaja en particular, por lo que con la evaluación de la serie LQM 100 se pretende obtener nuevos compuestos que presenten mejores ventajas como colorantes fluorescentes: ser específicos, bajo costo de fabricación y bajo nivel tóxico.

En el presente trabajo se realizó la síntesis, caracterización y evaluación de compuestos isoxazoles 5-sustituidos (serie LQM 100). La síntesis se realizó mediante la reacción de condensación-ciclización, de la 2,4 pentanodiona e hidroxilamina, y posteriormente se nitro. EL isoxazol obtenido (3,5-dimetilisoxazol), fue sustituido con una serie de aldehídos para así obtener los diversos compuestos de la serie LQM 100. Estos compuestos se caracterizaron por las siguientes técnicas espectroscópicas: IR, RMN¹³C y RMN¹H, y fueron evaluados por medio de técnicas citogenéticas como: micronúcleos, preparaciones cromosómicas de medula ósea de ratón y corrimiento de ADN por electroforesis en geles de agarosa.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Citogenética

La citogenética es la parte de la genética que se encarga del estudio microscópico de los cromosomas, tanto en número como en su estructura y las enfermedades que se pueden relacionar con ellos. La citogenética es una herramienta de gran importancia que permite realizar el diagnóstico cromosómico de pacientes con indicación clínica de alguna cromosopatía (Tamar, 2008). Además de que proporciona información que permite saber cuál es el o los mecanismos implicados en su patogenia.

La citogenética clásica permite un enfoque general del genoma y la identificación de reordenamientos y anomalías cuantitativas de los cromosomas. La citogenética molecular permite la localización de secuencias específicas del ADN en una región cromosómica, de esta manera los estudios microscópicos convergen con los estudios moleculares y se complementan mutuamente.(Morton y Miron, 2001)

La citogenética tuvo sus inicios a finales del siglo XIX con la publicación de ilustraciones del cromosoma humano que observó Flemming en 1882 al microscopio. Pero fue hasta el año de 1956 cuando la citogenética tuvo un gran desarrollo con la determinación del número exacto de cromosomas humanos en un cariotipo realizada por Tjio y Levan, y confirmada el mismo año por Ford y Hamerton. La palabra cromosoma deriva del griego Chromo= color y soma= cuerpo. Por tanto, son cuerpos coloreados nucleares en forma de bastoncitos visibles al microscopio óptico en fase de división celular (mitosis o meiosis). Están formados de cromatina asociada a proteínas tipo histonas y en ellos se encuentran los genes (Contreras, et. al., 2009).

El cromosoma humano tiene una estructura compleja (figura 1), compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Una sola hélice de ADN está unida a ambos extremos por una estructura que se denomina telómero. Cada cromosoma humano normal posee un centrómero, en este sitio se forma el cinetocoro para la fijación del huso mitótico necesario para la segregación apropiada del cromosoma durante la división celular. El centrómero representa algún punto válido para la identificación de un cromosoma en particular. En el extremo de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22), se observan satélites, estructuras de tamaño variable compuestas por

heterocromatina. Los de constricciones secundarias conocidas con el nombre de pedículo del satélite. Estos pedículos de unión contienen los genes para el ARN ribosómico 18S;5,8S Y 28S. en el extremo de cada brazo cromosómico, hay un telómero, una estructura compuesta por secuencias breves de nucleótidos repetidas en tándem, (Morton y Miron, 2001).

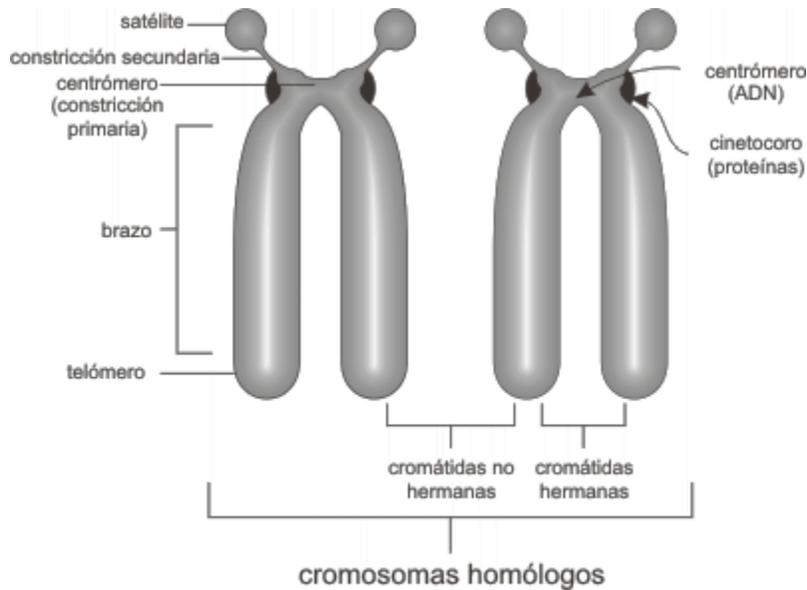


Figura 1. Estructura general del cromosoma humano y sus principales partes que lo conforman

El estudio de los cromosomas nos proporciona información valiosa acerca de la constitución genética de cada persona, porque cada cromosoma tiene una morfología y un tamaño constante, además de que posee una morfología muy específica que refleja la constitución del cromosoma a partir de una molécula específica de ADN (Solari, 2004).

2.2.- Técnicas citogenéticas.

2.2.1.-Preparaciones cromosómicas

Los cromosomas condensados de una célula humana en división pueden analizarse en metafase o en prometafase. En estas etapas, los cromosomas son visibles al microscopio en una extensión cromosómica y se puede observar que cada cromosoma se compone de sus cromátidas hermanas unidas por el

centrómero, a pesar de que en la mayor parte de las preparaciones cromosómicas las dos cromátidas están unidas entre sí tan estrechamente que no es fácil de observarlas como entidades diferenciadas (Nussbaum, 2008).

El análisis cromosómico requiere de células en metafase para una mejor clasificación y evaluación de los cromosomas. La obtención de células en esta fase requiere de un tejido con gran número de células en división como: linfocitos de sangre periférica, médula ósea, fibroblastos, células del líquido amniótico y células de algunos tumores, las cuales deben ser cultivadas bajo ciertas condiciones *in vitro* para obtener un número considerable de ellas.

Los leucocitos son las células más utilizadas debido a que crecen y se dividen rápidamente en un cultivo celular, estos requieren estimulantes mitóticos como fitohemaglutinina (PHA), cuyo efecto es transformar a los linfocitos periféricos en células parecidas a blastos capaces de reiniciar el ciclo mitótico, ya que normalmente ellos se dividen una vez (Contreras, et. al., 2009). Cuando son obtenidas las células en proliferación activa, es posible detenerlas en metafase al inhibir la formación del huso acromático mediante la colchicina, ésta sustancia ayuda a la contracción de los cromosomas hecho que permite una mejor delineación, un extendido más eficiente y un mejor análisis. Las células son expuestas posteriormente a solución salina hipotónica con el fin de asegurar la dispersión adecuada y la observación de los cromosomas dentro de la membrana celular, mediante la extensión en un portaobjetos para, posteriormente, ser teñidas y analizados al microscopio (Contreras, et. al., 2009).

2.2.2.-Técnica de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos es una prueba que se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, que permite evaluar la capacidad de un compuesto para inducir alteraciones cromosómicas, tanto de tipo estructural como numérico (Bello, 2001). Es una prueba importante utilizada como bioensayo para evaluar genotoxicidad de sustancias, exposiciones agudas y crónicas, además de que es una de las más usadas para identificar agentes cancerígenos (Murli, 2003).

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y con las mismas características morfológicas que el núcleo celular. Estos se forman a partir del material cromosómico que ha quedado rezagado durante la fase mitótica de disyunción anafásica, en el cual se separan las dos cromátidas hermanas hacia uno de los dos polos anafásicos para, posteriormente, dar lugar a las dos células hijas, genéticamente idénticas, resultantes de la división celular. Ese material genético que no llega a ninguno de los dos polos debido a alteraciones cromosómicas, no queda incluido en ninguno

de los dos núcleos que van a constituir las dos células hijas, y estos pequeños fragmentos pueden formar un núcleo de tamaño muy pequeño denominado micronúcleo, perfectamente visible al microscopio óptico. Los micronúcleos están constituidos principalmente por fragmentos acéntricos, pero también algunos cromosomas pueden formar parte de ellos (Bello, 2001).

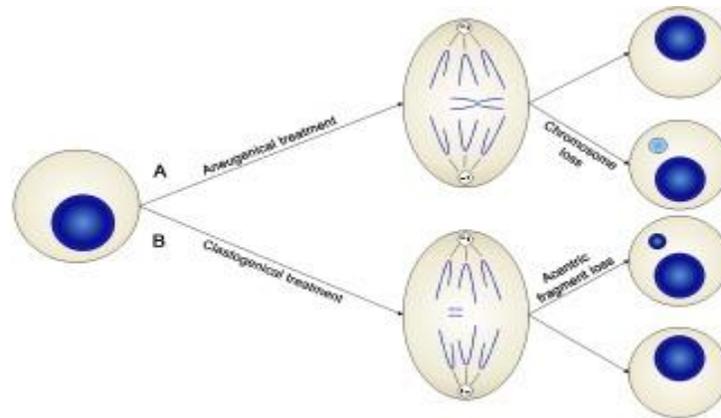


Figura 2. Formación de micronúcleos. Las células presentaban micronúcleos. A) micronúcleos (MN) originados por fragmentos cromosómicos de tipo acéntrico derivados de roturas no reparadas. B) micronúcleos originados por cromosomas enteros derivados de una mala segregación durante la mitosis.

2.2.3.- Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas por medio de la aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga-masa (Lodish, 2005).

La electroforesis en geles de agarosa es utilizada para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Es una técnica simple y rápida de realizar, es capaz de resolver fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente por otros métodos, tales como centrifugación en un gradiente de densidad. En la electroforesis en geles de agarosa se pueden separar fragmentos de ADN desde 200kb hasta aproximadamente 500kb de longitud.

La agarosa es un polímero lineal, extraído de algas marinas, en el cual las moléculas del ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 de sus tamaños moleculares. El ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfatos de la molécula, por lo tanto la

migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo hacia el polo positivo como se observa en la figura 3. Una vez que la electroforesis ha terminado el ADN separado puede determinarse directamente mediante tinciones con fluorocromos (Puerta, 2005).

Los factores que pueden afectar la migración del ADN en el gel de agarosa son:

- Tamaño del fragmento
- -Concentración de la agarosa
- -Conformación del ADN
- -Voltaje aplicado
- -Buffer utilizado

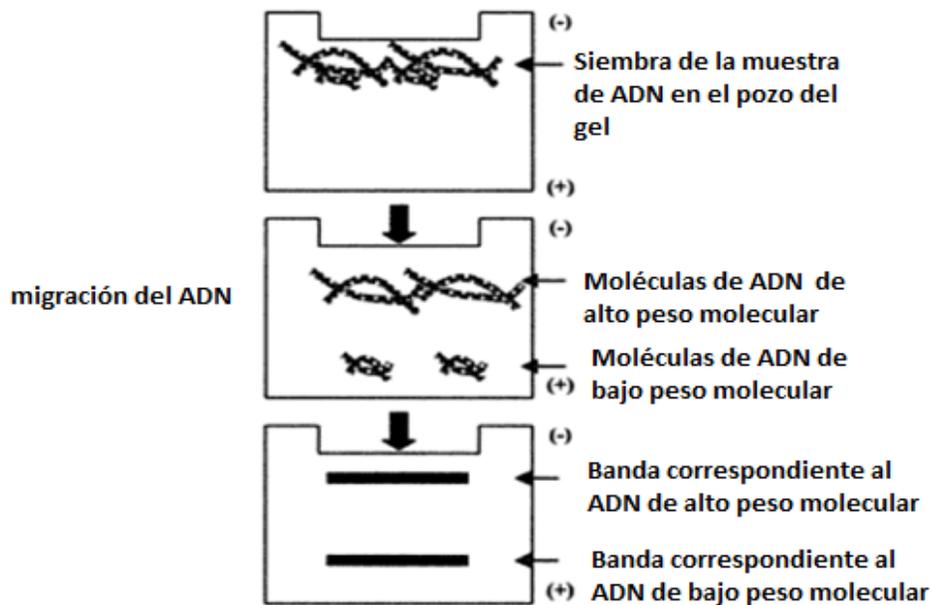


Figura 3. Separación de ADN por electroforesis en gel de agarosa. EL ADN migra de acuerdo a su carga y peso molecular, migra del polo negativo al polo positivo.

2.3.- Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno de luminiscencia de vida corta que se produce cuando las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética, es decir, la fluorescencia se genera cuando una sustancia absorbe luz a una longitud de onda determinada y luego emite a una longitud de onda mayor, el tiempo entre la absorción y la emisión suele ser relativamente

breve, a menudo del orden de 10^{-9} a 10^{-8} segundos (Crawford, 2007). Explicando más a fondo las moléculas tienen diferentes estados o niveles de energía, en general, las moléculas tendrán un estado basal (un estado de baja energía S_0) y un estado electrónico excitado de mayor energía (S_1), con varios niveles de vibración en cada uno de ellos. Entonces la fluorescencia se produce cuando los electrones de una molécula son excitados a estados vibracionales y rotacionales más altos, esta energía de vibración se disipa rápidamente por colisiones y la molécula desciende hasta el nivel de vibración inferior del estado electrónico S_1 (Freifelder, 2003). El posterior retorno de la molécula a su estado fundamental se produce emitiendo luz (fluorescencia). En la siguiente figura se muestra cómo se lleva a cabo el fenómeno de fluorescencia:

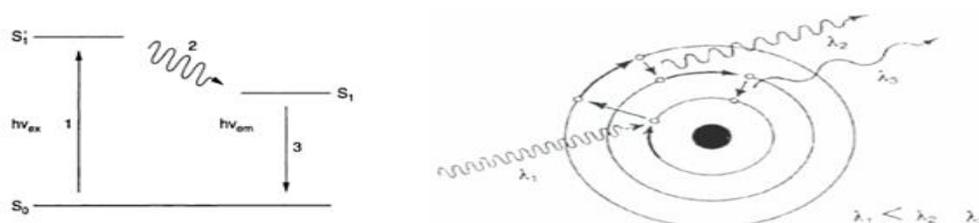


Figura 4. Cuando una radiación incidente de longitud de onda corta λ_1 excita un electrón en la nube electrónica que rodea al núcleo del átomo situado en el centro. La energía absorbida por el electrón lo excita hacia las capas periféricas de la nube, de donde volverá a caer por saltos cuánticos, emitiendo cada vez una radiación de fluorescencia de mayor longitud de onda λ_2 después λ_3 .

El tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. Dado que las diferencias de energía entre los estados vibracionales son aproximadamente iguales tanto en los estados excitados como en el estado fundamental, el espectro de absorción, o de excitación, de un compuesto con frecuencia se parecen como si uno fuera aproximadamente la imagen en un espejo del otro (Skoog, 2008). Este efecto se puede apreciar en los espectros del antraceno (figura 5).

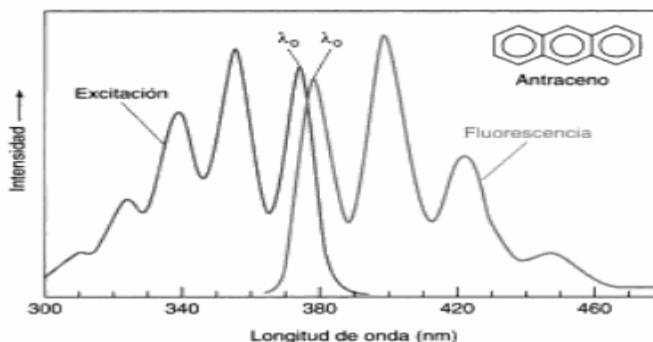


Figura 5. Espectros de absorción y emisión del antraceno. Obsérvese que los espectros son aproximadamente especulares.

La fluorescencia es una de los posibles mecanismos por los que una molécula vuelve al estado fundamental, después de haber sido excitada por absorción de radiación. Tomando en cuenta esto, se podría decir que todas las moléculas absorbentes son potencialmente fluorescentes, pero sin embargo, no lo son porque su estructura permite caminos no radiantes por los que puede dar lugar a la relajación de forma más rápida que la emisión fluorescente. (Skoog, 2008).

El rendimiento cuántico o eficiencia cuántica de la fluorescencia molecular es simplemente el cociente entre el número de moléculas que presentan fluorescencia y el número total de moléculas excitadas (o el cociente de fotones emitidos a fotones absorbidos), las moléculas muy fluorescentes, como la fluoresceína, tienen eficiencias cuánticas que se aproximan a la unidad en algunas condiciones. Mientras que las especies que no fluorescen tienen una eficiencia prácticamente de cero.

La fluorescencia está íntimamente relacionada con la estructura química, por ejemplo los compuestos que contienen anillos aromáticos son los que proporcionan una emisión de fluorescencia más intensa debido a la resonancia que existe en la molécula. También los compuestos carbonílicos alifáticos presentan fluorescencia, pero presentan un número más pequeño en comparación con el número de compuestos fluorescentes que contienen sistemas aromáticos. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos presentan fluorescencia en disolución, con una eficiencia cuántica que aumenta con el número de anillos y su grado de condensación. Los heterociclos más simples, como la piridina, furano, tiofeno y pirrol, no presentan fluorescencia molecular, pero estructuras que contienen estos anillos condensados a menudo sí son fluorescentes (Skoog, 2008).

Otro factor importante a considerar de la molécula es la rigidez estructural, ya que se ha demostrado experimentalmente que la fluorescencia está favorecida en las moléculas rígidas (Stockert, et al. 2004). Además, frecuentemente se presenta un

aumento de emisión cuando los colorantes fluorescentes se absorben sobre una superficie sólida. La influencia de la rigidez se ha aducido también para explicar el aumento de la fluorescencia en ciertos agentes quelantes orgánicos, cuando se complejan con un ion metálico. Por ejemplo, la intensidad de fluorescencia de la 8-hidroxiquinoleína es mucho menor que la del complejo con zinc.

Entendido que es la fluorescencia podemos definir a un fluorocromo como una molécula química capaz de absorber luz a una longitud de onda determinada y emitir a otra longitud de onda diferente, y se caracteriza por un espectro de excitación y un espectro de emisión. Los fluorocromos son empleados como colorantes, se aplican de la misma manera que en las tinciones histológicas y hematológicas, pero dependiendo de su composición química y de las características de la tinción. Actualmente son muy utilizados debido a que son colorantes específicos y crean contraste en zonas determinadas, además algunas estructuras biológicas no fluorescen por sí mismas.

Los fluorocromos más utilizados en técnicas de citogenética son: bromuro de etidio, DAPI, colorante de Hoechst, naranja de acridina, quinacrina, fluoresceína y rodamina.

A continuación se presentan las características de algunos fluorocromos.

Bromuro de etidio

Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridonio. Es una molécula hidrófoba que tiene casi el mismo tamaño que una base de ADN o ARN (Rodak, 2004). Es una molécula plana, que se puede deslizar entre pares de bases de la doble hélice y desenrollarla ligeramente entre pares de bases adyacentes. Por eso es usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en técnicas de biología molecular. Este fluorocromo es un agente mutagénico de efecto acumulativo, y se asocia con mutaciones por inserción. Se utiliza a concentraciones pequeñas (0.1.- 0.5 mg/mL)

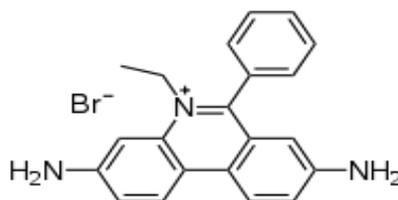


Figura 6. Estructura química del bromuro de etidio.

DAPI

El diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) es un colorante fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes de indol. DAPI se usa para la tinción de ADN, para tinción nuclear, para la tinción de células vivas y para la contratinción en tinciones inmunofluorescentes de material humano y botánico.

Se sabe que el colorante DAPI forma un complejo con el ADN doble cadena, mostrando una especificidad por los clusters de bases ricos en A-T. Cuando el DAPI se une al ADN, su fluorescencia se ve fuertemente incrementada, lo que se interpreta como una interacción energéticamente alta, gracias a la intercalación del colorante entre las bases del ADN. El colorante DAPI también se puede unir al surco menor de la hebra de ADN formando puentes de Hidrógeno con los pares de bases AT (Banerjee, 2008).

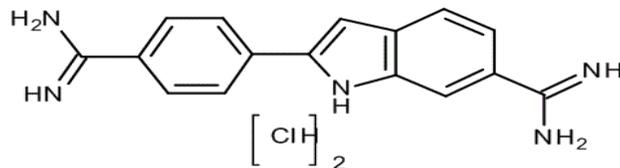


Figura 7. Estructura química del DAPI.

Colorante de Hoechst

La 2-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol, es una bisbenzimidazol útil para tinción de ADN, cromosomas y núcleos celulares. Esta molécula ha demostrado que se une al surco menor del ADN intercalándose con adenina-timina. Es capaz de teñir células vivas o fijas y tejidos, además de que puede ser utilizado en combinación con 5-bromo-2-desoxiuridina lo que permite distinguir la cromatina compacta de los núcleos apoptóticos o con yoduro de propidio para citometría de flujo entre otras.

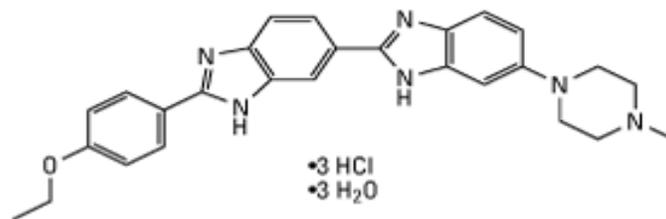


Figura 8. Estructura química del colorante de Hoechst

Naranja de acridina

La 3,6-Bis(dimetilamino)acridina es un colorante catiónico que contiene en su estructura una amina terciaria capaz de protonarse. La naranja de acridina es selectiva para los ácidos nucleicos y útil para realizar determinaciones sobre el ciclo celular. Interacciona con el ADN y el ARN. Esta molécula es un mutágeno que ejerce su efecto a través de la intercalación entre las bases del ADN distorsionando su estructura o por atracción electrostática (Oliva, et. al., 2004).

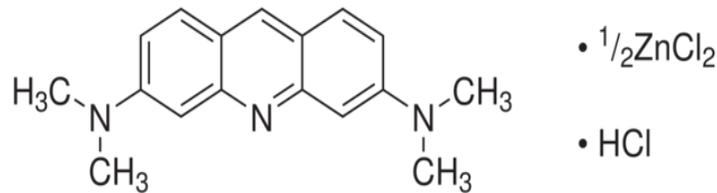


Figura 9. Estructura química del naranja de acridina.

La unión de los fluorocromos a ADN puede ser por distintas vías:

Por unión a surco menor o mayor por medio de puentes de hidrógeno

Intercalamiento: se basa en la extensión local de la doble hélice del ADN y en la introducción (intercalación de una molécula plana en el espacio que queda comprendido entre dos pares de bases consecutivas. (Stockert et. al., 1981).

Por puentes de hidrógeno o fuerzas electrostáticas: Por unión fuertemente a las regiones de las bases nitrogenadas (A-T) para formar un complejo.

2.3.1.- Microscopia de fluorescencia

La microscopia de fluorescencia es una herramienta muy utilizada actualmente en diferentes áreas como biología molecular, citogenética, inmunología, entre otras. En el transcurso de la última década, la microscopía de fluorescencia convencional aprovechó el aumento de la memoria y la velocidad de procesamiento de las computadoras. Esto, junto al desarrollo de sistemas de registro digital de imágenes de alta calidad, de fuentes de iluminación láser potentes y estables de sistemas ópticos corregidos y de nuevas moléculas fluorescentes capaces de marcar procesos celulares específicos, ha dado lugar a

novedosas técnicas como la Microscopía Láser Confocal y la Microscopía de Excitación Bifotónica (M-2F). Estos nuevos procedimientos permiten obtener imágenes tridimensionales de procesos y de la distribución de moléculas específicas en células vivas por medio de la utilización de técnicas no invasivas (Cardoza, 2005).

La microscopía de fluorescencia se basa en los mismos principios de la microscopía común, con diferencias en el manejo y el diseño relacionadas con la generación y transmisión de longitudes de onda adecuadas para excitar a los fluorocromos que se quieren visualizar, ya sean propios de la muestra o de la coloración utilizada. El microscopio de fluorescencia es una modificación del microscopio común, donde se utiliza luz monocromática para excitar los estados electrónicos de ciertas especies moleculares de la muestra (Montoya, 2008). Otra diferencia que existe con la microscopía normal, es que la luz de iluminación que se utiliza en la de fluorescencia (excitación), no está involucrada en la formación de la imagen mientras que en la microscopía normal la imagen es formada por la luz de iluminación.

Equipo para microscopio de fluorescencia:

Fuente de luz: Generalmente se usa una fuente de mercurio a alta presión, que emita la suficiente radiación de aquellas longitudes de onda requeridas para propósitos de excitación del o los fluorocromos.

Objetivos: suelen ser de cuarzo ya que el vidrio absorbe la radiación ultravioleta.

Filtros: se encargan de retener la radiación ultravioleta, peligrosa para el ojo humano, dejando solo pasar la radiación visible. Los filtros utilizados en las aplicaciones de la microscopía de fluorescencia tienen características espectrales específicas que están indicadas sobre los filtros. Básicamente hay tres categorías de filtros: de excitación, de barrera y espejos dicróicos. El primero se encuentra ubicado entre la fuente de luz y el preparado, este filtro permite el paso de ondas de luz de la longitud de onda incidente.

El filtro barrera está ubicado antes del ocular. Están diseñados para suprimir o bloquear las longitudes de onda de excitación permitiendo el paso de luz emitida, es decir selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. Y los espejos dicróicos que se posicionan en el camino óptico después del filtro de excitación pero antes del de emisión, a un ángulo de 45 grados, son filtros especializados para reflejar las longitudes de onda de excitación y dejar pasar las de emisión eficientemente.

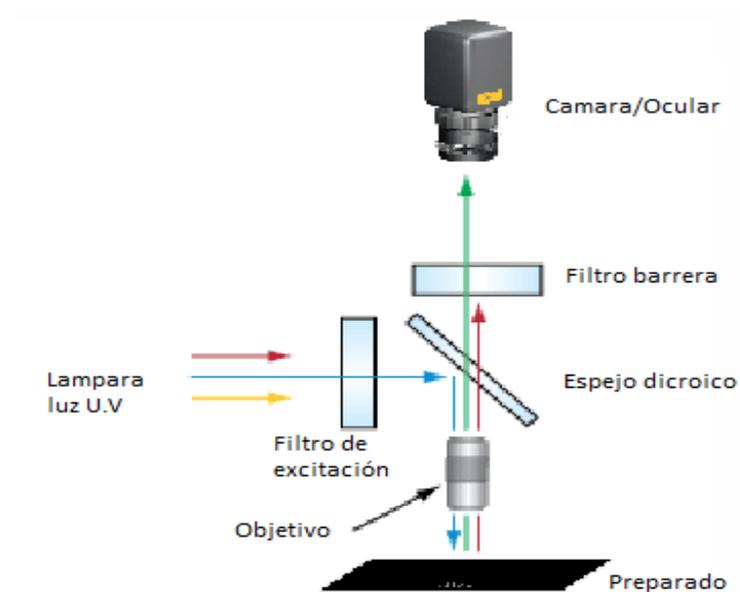


Figura 10. Partes fundamentales del microscopio de fluorescencia

2.4.- Sistemas pentagonales con dos heteroátomos: Isoxazoles

Un heterociclo es un compuesto cíclico que contiene átomos de dos o más elementos en su anillos, por lo regular carbono junto con nitrógeno, oxígeno o azufre (McMurry, 2008). Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los azoles, compuestos cíclicos de 5 átomos, derivados formalmente del furano, pirrol y tiofeno por sustitución de uno de los grupo $-CH$ por un átomo de nitrógeno. Cuando esta sustitución se efectúa en la posición tres, se puede generar oxazol, imidazol o tiazol, mientras que si la inserción del átomo se efectúa en dos se puede generar isoxazol, pirazol e isotiazol (Figura 11).

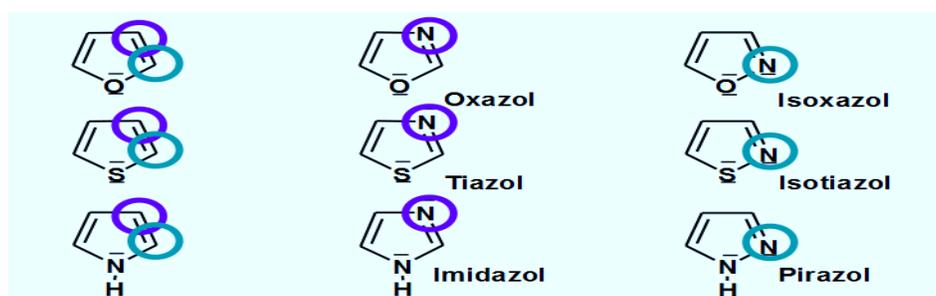


Figura 11. Sistemas pentagonales con más de un heteroátomo.

Las propiedades de los heterociclos pueden predecirse por sus analogías y diferencias respecto a compuestos análogos alifáticos o aromáticos (Espinosa, 2001), este grupo de compuestos tienen propiedades y reacciones similares a los compuestos aromáticos. Los sistemas de anillos azólicos son más estables y por tanto menos reactivos que el furano, pirrol y tiofeno. Pero no obstante, en algunas ocasiones existe gran diversidad de reactividad, por ejemplo el isotiazol es estable a la oxidación con permanganato mientras que el tiazol no lo es, o tal es el caso de los oxazoles que son generalmente estables a las bases y otros nucleófilos mientras que el anillo de los isoxazoles se rompe en presencia de estos.

Los isoxazoles tienen la característica de poseer propiedades de un sistema aromático, esto es debido a que cada uno de los tres carbonos del anillo aporta un electrón 1p_z al orbital molecular, mientras que el nitrógeno del azol dona uno, y el oxígeno dona 2 electrones para completar el sexteto aromático. Además de que este arreglo electrónico produce una capa estable de 6 electrones π deslocalizados, en la figura 12 se representa la estructura del isoxazol y se puede observar que el átomo de nitrógeno posee un par adicional de electrones que se localizan en sentido ortogonal a la nube π molecular (Paquette, 2011).

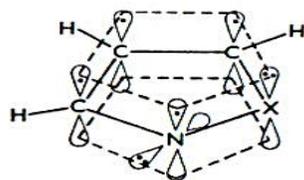


Figura 12. Orbitales moleculares del anillo de isoxazol.

Así mismo los isoxazoles tienen la capacidad de formar intermediarios de resonancia por las propiedades antes mencionadas.

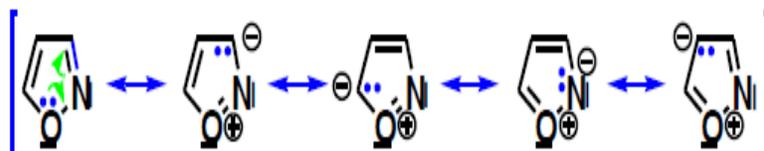


Figura 13. Estructuras de resonancia del isoxazol

2.4.1.- Métodos de síntesis

La construcción del anillo isoxazol puede lograrse por distintas rutas sintéticas, se basan en la adición de una especie que contenga el enlace O-N con una molécula de aceptor del nivel de oxidación deseado. Las dos rutas mayormente empleadas son: utilizando hidroxilamina con un componente de tres átomos de carbono, como las 1,3-dicetonas o una cetona α,β -insaturados, o mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de alquenos y alquinos con óxidos de nitrilo (Pinho, 2005).

El primer método utilizado con frecuencia consiste en la adición de hidroxilamina con un compuesto 1,3 dicarbonílico o a un precursor de dicha especie. La reacción se lleva a cabo mediante un intermediario de cetoxima que posteriormente experimenta la ciclización.

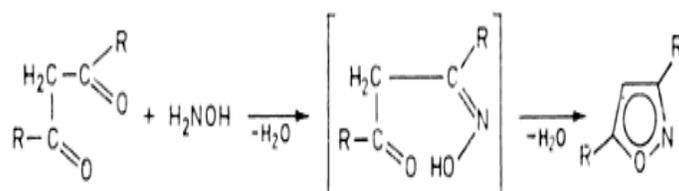


Figura 14. Reacción con hidroxilamina y compuesto 1,3 dicarbonílico.

El segundo método de síntesis generalmente se produce in situ mediante deshidrogenación del cloruro de ácido correspondiente. Este tipo de condensación se lleva a cabo porque los óxidos de nitrilo y los diazoalcanos se consideran como compuestos ambivalentes que tienen reactividad electrofílica y nucleofílica en las posiciones 1 y 3 (Paquette, 2011).

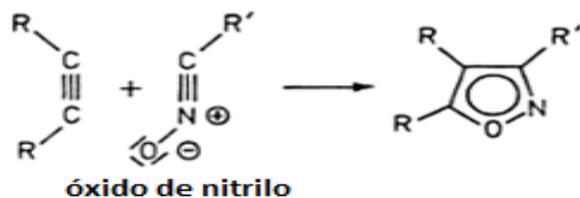


Figura 15. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar con óxidos de nitrilo

Aparte de estos métodos, los isoxazoles, también se pueden obtener por condensación de hidroxilamina con un compuesto α,β -acetilénico o con un compuesto carbonílico α,β -olefínico que tenga en el carbono α o en el β un grupo fácilmente desplazable.

2.5.- Espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear

La luz visible, los rayos X, las microondas, las ondas de radio, y así sucesivamente, son todos los tipos diferentes de radiación electromagnética, colectivamente constituyen el espectro electromagnético, el cual se divide en regiones como se observa en la figura 16, con la región visible representada únicamente por una pequeña porción, de 3.8×10^{-7} m a 7.8×10^{-7} m en longitud de onda. La región visible está flanqueada por las regiones infrarroja y ultravioleta.

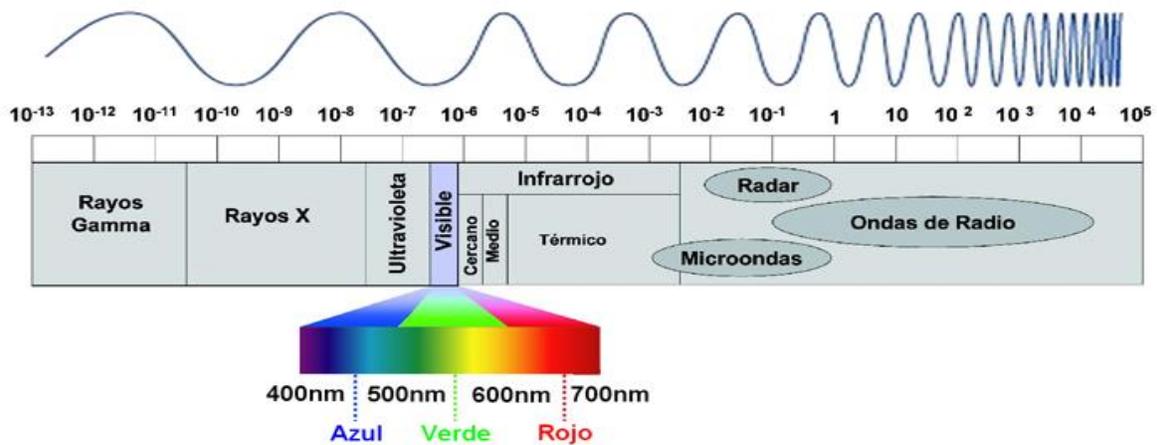


Figura 16. Espectro electromagnético

La radiación electromagnética se caracteriza por una longitud de onda, una frecuencia y una amplitud (figura 17). La longitud de onda λ , es la distancia de un máximo de onda al siguiente. La frecuencia ν , es el número de ondas que pasa por un punto fijo por unidad de tiempo, dado por lo regular en segundos recíprocos, o Hertz. La amplitud es la altura de la onda, medida desde el punto medio al pico. La intensidad de energía radiante, sea un respirador débil o una luz cegadora, es proporcional a la raíz de la amplitud de onda.

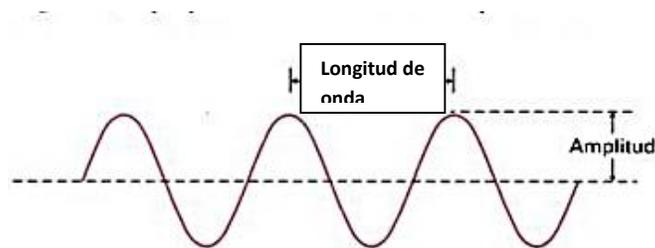


Figura 17. Las ondas electromagnéticas que se caracterizan por una longitud de onda, frecuencia y una amplitud.

Espectroscopia de infrarrojo

Todas las moléculas tienen una cierta cantidad de energía, están en movimiento constante. Sus enlaces se estiran y se contraen, los átomos se mueven hacia atrás y hacia adelante ocurren otras vibraciones moleculares. Una molécula únicamente puede estirarse y doblarse a frecuencias específicas que corresponden a niveles de energía específicos.

Los átomos que constituyen a una molécula están unidos entre sí por fuerzas de origen electrostático, que semejan uniones elásticas y en consecuencia, sus movimientos son periódicos o cuasiperiódicos. Todos los movimientos relativos de los átomos en una molécula son en realidad la superposición de los llamados modos normales de vibración, en los cuales todos los átomos se encuentran vibrando con la misma fase y frecuencia normal. El número de modos normales de vibración define el espectro vibracional de cada molécula. Estos espectros también dependen de las masas de los átomos involucrados, su arreglo geométrico dentro de la molécula, y la “elasticidad” de los enlaces químicos.

Los fotones de la radiación infrarroja son absorbidos por los enlaces de una molécula pasando a niveles vibracionales superiores como se observa en la figura 18.

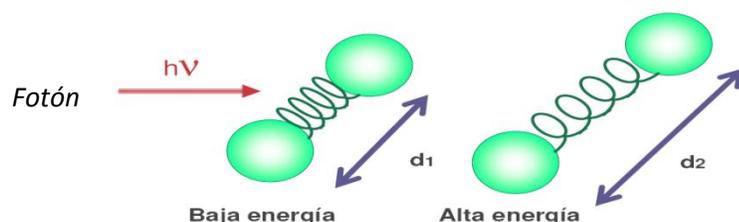


Figura 18. Modos normales de vibración de una molécula.

En la espectroscopia de infrarrojo se puede encontrar los tipos de movimientos que tiene una molécula midiendo su espectro en el IR y así, interpretando estos movimientos, podemos encontrar qué tipos de enlaces (grupos funcionales) están presentes en la molécula.

Resonancia magnética nuclear

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear se basa en el hecho de que ciertos núcleos giran alrededor de su eje, es decir, poseen espín nuclear (I). El movimiento de giro de estas especies cargadas, provoca que lleven asociados un

campo magnético débil (momento magnético), pudiendo considerarse como pequeños imanes. Si un núcleo con espín nuclear $1/2$ se sitúa en un campo magnético externo puede adoptar dos orientaciones diferentes, paralela o antiparalela respecto al campo aplicado, siendo la primera de menor energía. La presencia exclusiva de estas dos orientaciones se debe a que los niveles de energía implicados están cuantizados. De forma similar a la espectroscopia de infrarrojo, los núcleos pueden excitarse al nivel de energía superior suministrando la radiación electromagnética adecuada e inducir así la resonancia, fenómeno que supone simplemente invertir su orientación.

Cada isótopo activo en RMN absorbe radiación de frecuencia diferente en un campo magnético constante. Este hecho hace que se pueda estudiar cada uno de ellos de forma independiente. Además, la diferencia de energía entre estos dos niveles es principalmente, función del núcleo que se está irradiando y del campo magnético aplicado, siendo ésta mayor cuanto más intenso es el campo magnético externo. En química orgánica los núcleos más estudiados son los de ^1H y ^{13}C .

3.- OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Realizar la síntesis y caracterización fisicoquímica de isoxazoles 5-sustituidos (LQM 105, 108, 114, 120 y 122) y evaluar su posible uso como colorantes fluorescentes en técnicas citogenéticas.

Objetivos Particulares

- ✓ Sintetizar, purificar y caracterizar los compuestos LQM 105, 108, 114, 120 y 122 mediante las técnicas espectroscópicas: IR, RMN¹³C, y RMN¹H .
- ✓ Encontrar las condiciones óptimas de reacción para la síntesis de estos compuestos adaptándose a las características del Laboratorio de Química Medicinal.
- ✓ Evaluar la capacidad de tinción fluorescente de estos compuestos sobre ADN, núcleos celulares y cromosomas.

4.- MÉTODO

4.1.- Síntesis química

3,5-dimetilisoaxazol

Para formar la estructura base (3,5 dimetilisoaxazol) de los compuestos evaluados se llevó a cabo una reacción de condensación-ciclización utilizando 2,4 pentanodiona e hidroxilamina. Se utilizó ácido acético para mejorar el rendimiento del producto, y se colocó a reflujo (aproximadamente 45 -60 minutos) utilizando luz infrarroja como fuente de energía.

La cinética de formación del isoaxazol se realizó mediante cromatografía en capa fina. Una vez terminada la reacción se dejó enfriar, y se neutralizó la mezcla de reacción con hidróxido de sodio, formándose dos fases, las cuales se extrajeron con acetato de etilo realizando un total de tres extracciones. Los extractos orgánicos se reunieron y se eliminó el agua con sulfato de sodio anhidro para su posterior concentración. Se obtuvo un líquido de color ámbar de olor característico (3,5 Dimetilisoaxazol).

3,5 dimetil 4-nitroisoaxazol

Del concentrado anterior se pesó una muestra y se colocó en un baño de hielo con agitación. Posteriormente se adicionó gota a gota ácido sulfúrico, y al término de esto, se adicionó gota a gota ácido nítrico, esta mezcla se dejó agitando durante 30min para la posterior adición de ácido sulfúrico. Después de esta última adición se dejó agitando la mezcla de reacción 12hrs.

Transcurrido el tiempo de reposo, se agregó hielo a la mezcla de reacción, lo que provocó que se formara un precipitado blanco, éste se filtró a vacío, haciendo tres enjuagues con agua destilada, el precipitado se recristalizó con acetato de etilo. Los cristales se colocaron en el desecador.

Serie LQM 100

Para obtener los distintos compuestos de esta serie, se utilizó el 3,5 dimetil-4-nitroisoaxazol que se disolvió en etanol junto con un aldehído de elección. Para

favorecer la reacción de condensación que debe llevarse a cabo, se adiciona piperidina. La mezcla de reacción se pone a calentar a reflujo utilizando luz infrarroja; alrededor de 45min-1h, se observa un precipitado en el matraz. El precipitado se recupera filtrando a vacío enjuagando con etanol tres veces. Posteriormente se determina su pureza mediante cromatografía en capa fina, si no es así, se recristaliza con cloroformo o acetato de etilo, según sea el caso.

A continuación se esquematizan las reacciones generales para la obtención los isoxazoles 5-sustituidos:

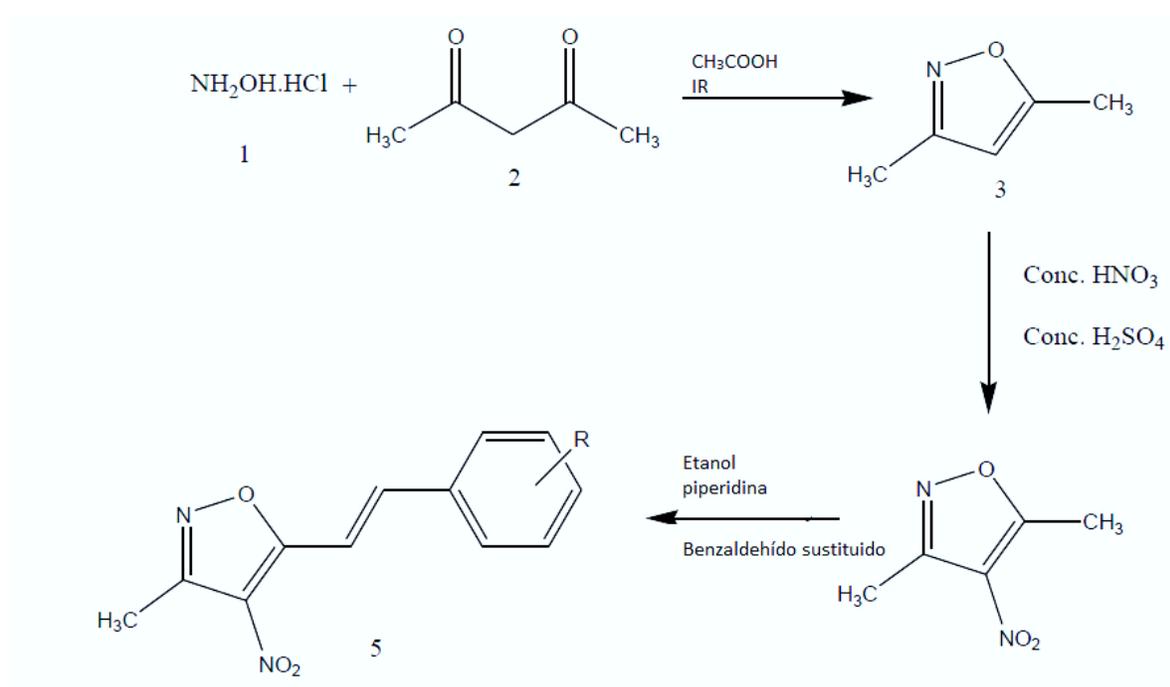


Figura 19. Reacción general para la formación de los isoxazoles 5 sustituidos, utilizando como materia prima de inicio hidroxilamina y 2,4 pentanodiona.

4.2.- Caracterización

A los compuestos sintetizados se les realizaron pruebas de solubilidad, punto de fusión y se analizaron los compuestos por medio de técnicas espectroscópicas: IR, RMN¹³C, RMN¹H. La determinación de los espectros de infrarrojo, se realizaron en equipo de la marca Thermo scientific con celda de diamante.

4.3.- Evaluación: Micronúcleos, preparaciones cromosómicas de médula de ratón, electroforesis en gel de agarosa

Micronúcleos

Para llevar a cabo esta técnica, se administró ifosfamida (60mg/kg de peso) a ratones jóvenes. A las 48hrs, se obtuvo sangre periférica del ratón, mediante un corte en la parte distal de la cola (con previa analgesia de la zona). Se realizaron frotis con la sangre obtenida. Los frotis se dejaron madurar 2 días para posteriormente fijarlos con metanol frío durante 10min.

Preparaciones cromosómicas de médula de ratón

A los mismos animales de la técnica de micronúcleos se le administró colchicina (7.5 µg/g de peso). Pasadas 2h después de la administración, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el fémur. Al fémur se le cortan los extremos (epífisis) y con una jeringa se enjuaga el interior del hueso con solución de cloruro de potasio a 37°C y se depositó en un tubo.

Una vez obtenida la médula, se incubo a 37°C durante media hora. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó solución fijadora metanol: ácido acético 3:1, se mezcla y se centrifuga a 3000 rpm. Este paso se repitió en dos ocasiones más, dejando aproximadamente 0.5 mL, después de la última centrifugación y se resuspende la médula.

La suspensión celular se gotea sobre un portaobjetos desde una altura aproximadamente de 50 cm. Las laminillas se fijan con calor y se dejan maduran por 48 horas.

Tinciones

Se prepararon soluciones de distintas concentraciones de los LQM 105, 108, 114, 120 y 122 en DMSO. Las laminillas de los frotis de micronúcleos y las de preparaciones cromosómicas se sumergieron en las soluciones de los diferentes compuestos, durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se observaron al

microscopio de fluorescencia de la marca Accuscope, contra un testigo de naranja de acridina.

Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1%. Se depositó en cada carril del gel 2 μ l de buffer de carga para ADN y 5 μ l de la muestra ADN. La cámara de electroforesis se llenó con buffer de corrimiento y después se metió el gel dentro de la cámara.

Se corrió el gel en una cámara de electroforesis, durante 45 min a 120v. Transcurrido el tiempo el gel se sacó de la cámara de electroforesis y se enjuago con DMSO, posteriormente se sumergió el gel en una solución al 1% del compuesto sintetizado y se dejó ahí durante 10 minutos. Por último se enjuago el gel con DMSO para quitar el exceso de la solución y se observó en el transiluminador.

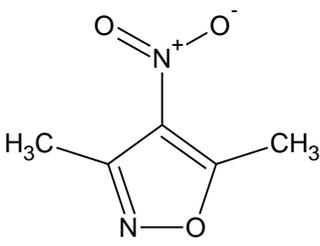
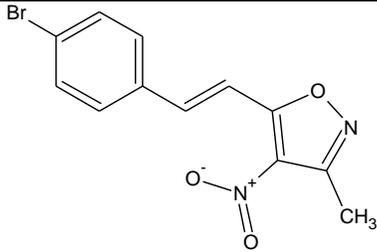
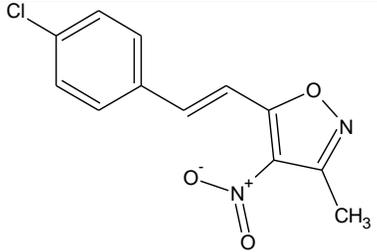
5.- RESULTADOS

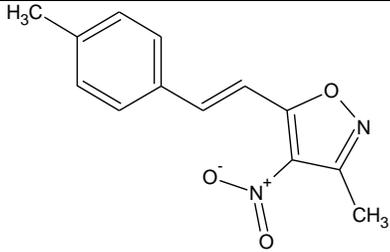
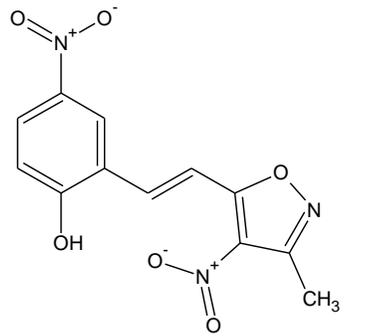
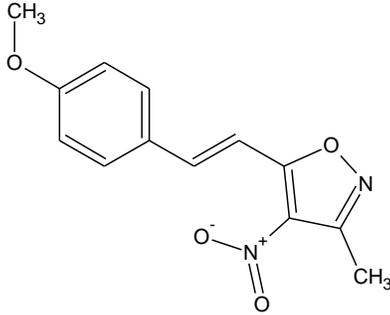
5.1.- Síntesis y caracterización

En la siguiente tabla se muestran los datos generales del 3,5 dimetil-4-nitroisoxazol y de los isoxazoles 5-sustituídos. Todos los compuestos sintetizados se obtuvieron en forma sólida con punto de fusión superior a los 100 ° centígrados excepción del LQM 102. Y el rendimiento fue mayor del 80% para toda la serie LQM 100-

La estructura de los compuestos LQM 105, 108, 114 y 122 son similares, la diferencia son los sustituyentes en posición para con respecto al benceno, en el caso del LQM 120 tiene 2 sustituyentes (grupo hidroxilo y grupo nitro).

Tabla 1. Datos generales de los compuestos obtenidos de la síntesis.

Compuesto Clave LQM	Estructura	Peso molecular g/mol	Punto de fusión °C	Rendimiento %	Características Físicas
102		142.11	85	92	Cristales blancos
105		246.22	186-188	89	Sólido color amarillo
108		264.66	177-178	86	Sólido color amarillo

Compuesto Clave LQM	Estructura	Peso molecular g/mol	Punto de fusión °C	Rendimiento %	Características Físicas
114		244.25	148- 151	87	Sólido color verde limón
120		291.22	188- 190	89	Sólido color rojo
122		260.25	178- 180	85	Sólido color amarillo

También se realizaron pruebas de solubilidad para toda la serie LQM 100, con el fin de encontrar el disolvente adecuado para realizar la evaluación en las técnicas de micronúcleos, preparaciones cromosómicas de médula ósea de ratón y electroforesis en geles de agarosa.

Los compuestos fueron insolubles en su mayoría en ácido clorhídrico, metanol y la mezcla de ácido acético metanol. Por otra parte con ácido acético glacial el LQM 108, 114 y 120; sin embargo como es un pH muy ácido y no son solubles todos los compuestos, no se utilizó como disolvente.

En DMSO los compuestos sintetizados mostraron una mejor solubilidad. Por lo que se decidió utilizar este disolvente para realizar la evaluación

Tabla 2. Solubilidad de los compuestos sintetizados en diferentes solventes.

Compuesto	Solubilidad					
	Agua/HCl	Metanol	Metanol/Ac cético 3:1	Ac. Acético	Acetonitrilo	DMSO
105	-	-	-	-	-	++
108	-	-	-	+++	+++	+++
114	-	-	+	+++	++	+++
120	-	++	+++	+++	++	+++
122	-	+	-	-	++	++

insoluble (-) ; poco soluble (+); medianamente soluble (++); muy soluble (+++)

Caracterización

En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos de las pruebas espectroscópicas que se realizaron: infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C para la caracterización de los compuestos sintetizados.

En la resonancia magnética de ^1H y ^{13}C se utilizó dimetil sulfoxido deuterado para los compuestos LQM 105, 108. El LQM 102 y 114 se disolvieron en cloroformo deuterado y en el caso del 120 Y 122 no se les realizó ninguna resonancia.

Los infrarrojos se obtuvieron de manera directa colocando la muestra sólida directamente en el equipo Thermo scientific con celda de diamante.

Tabla 3. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 102

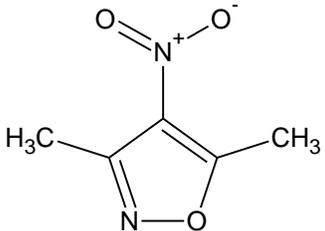
LQM 102	
	
IR	C-sp3 (2870 cm^{-1}), C=C (1602.58 cm^{-1}), NO2 (1500, 1359 cm^{-1})
^1H RMN (CDCl_3)	δ (ppm): 2.816 (3H,s, CH_3); 2.55 (3 H,s, CH_3)
^{13}C RMN (CDCl_3)	δ (ppm) 172.37 (C=O); 155.97 (C=N); 77.88 (C= NO_2); 14.30 (CH_3); 14.30 (CH_3).

Tabla 4. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 105

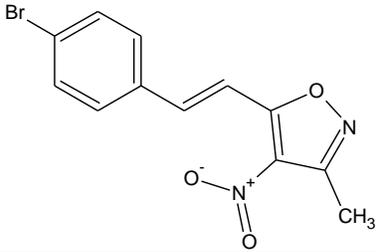
LQM 105	
	
IR	C-aromático (2161.9-1680 cm^{-1}), C=C (1621.2 cm^{-1}), NO ₂ (1508, 1378.5 cm^{-1}), C-Br (824.5 cm^{-1})
^1H RMN (DMSO)	δ (ppm): 7.32-7.8 (4H,m,Ar.); 5.25 (1H,d,CH.); 5.04 (1H,d,CH.); 2.33 (3H,s,CH ₃)
^{13}C RMN (DMSO)	δ (ppm) 157.1 (C=N); 156.3 (C=O); 137.02 (C=C); 133.02 (=C-C-Ar); 132.2 (C-Ar.); 131.27 (C-Ar.); 130.94 (Br-C-Ar.); 130.3 (C=C.); 112.27 (C=NO ₂); 11.84 (CH ₃).

Tabla 5. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 108

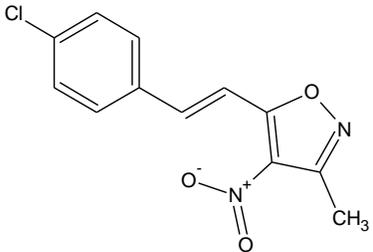
LQM 108	
	
IR	C-aromático (2000-1650 cm^{-1}), C=C (1601 cm^{-1}), NO ₂ (1557, 1358.8 cm^{-1}), C-Cl (816.67 cm^{-1})
^1H RMN (DMSO)	δ (ppm): 7--7.8 (4H,m,Ar.); 5.3 (1H,d,CH.); 5.1 (1H,d,CH.); 2.33 (3H,s,CH ₃)
^{13}C RMN (DMSO)	δ (ppm) 167.08 (C=N); 157.06 (C=O); 136.45 (-C-Ar.); 134.67 (C=C.); 134.05 (Cl-C-Ar.); 131.6 (C-Ar.); 131.09 (C-Ar.); 124.12 (=C-C-Ar); 112.24 (C=NO ₂); 11.83 (CH ₃).

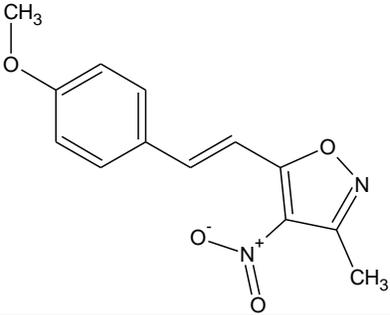
Tabla 6. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto LQM 114

LQM 114	
IR	C-sp3 (2919.3 cm^{-1}), C-aromático (2050-1650 cm^{-1}), C=C (1601 cm^{-1}), NO2 (1505,1374 cm^{-1})
^1H RMN (CDCl_3)	δ (ppm):7.55-7.2(4H,m,Ar.); 5.3(1H,d,CH.); 5.1 (1H,d,CH.); 2.4 (3 H,s,CH3); 2.6 (3 H,s,CH3)
^{13}C RMN (CDCl_3)	δ (ppm) 167.5 (C=N); 156.24 (C=O); 142.29 (-C-Ar.); 137.38(C-Ar.); 135.09 (C=C); 130.64 (C-Ar.) ; 129.8 (C-Ar); 127.84 (C=C); 110.47 (C=NO2); 11.86 (CH3) ; 21.45 (CH3).

Tabla 7. Resultado del espectro de infrarrojo del compuesto LQM 120

LQM 120	
IR	OH (3671.9), C-sp3 (2941.4 cm^{-1}), C-aromático (2522-1600 cm^{-1}), C=C (1612.2 cm^{-1}), NO2 (1569.2 ,1345.6 cm^{-1})

Tabla 8. Resultado del espectro de infrarrojo del compuesto del compuesto LQM 122

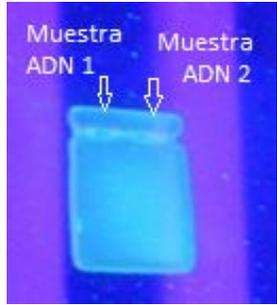
LQM 122	
	
IR	C-sp3 (2946.5 cm ⁻¹), C-aromático (2300-2600 cm ⁻¹), C=C (1620.8cm ⁻¹), NO2 (1505.78, 1360 cm ⁻¹)

5.2.- Evaluación

Para la evaluación de los compuestos sintetizados se realizaron las pruebas de micronúcleos, preparaciones cromosómicas de médula ósea de ratón y electroforesis en gel de agarosa. Para este último se utilizaron dos muestras de ADN proporcionadas por la doctora Sandra Díaz Barriga Arceo.

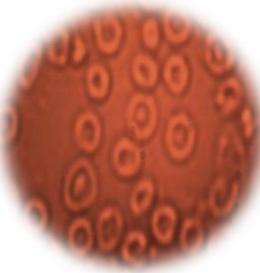
En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos del compuesto LQM 105, donde se observa que este compuesto no tiene afinidad por el ADN (no se observa fluorescencia). En la electroforesis si hay fluorescencia debido a que el compuesto precipito en el gel.

Tabla 9. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel, utilizando el compuesto LQM 105 para la tinción.

Compuesto Clave LQM	Prueba de micronúcleos	Preparaciones cromosómicas	Electroforesis en gel de agarosa.
105	<p>Celulas sanguineas extraidas de sangre periferica de ratón observadas en un microsocopio de fluorescencia</p> 	<p>Cromosomas obtenidas de médula ósea de ratón observados en un microsocopio de fluorescencia.</p> 	<p>Gel de agarosa observado en el transiluminador después de haber permanecido 35min. en la cámara de electroforesis a 120V</p> 

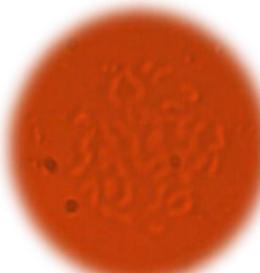
El compuesto LQM 108 no presenta afinidad por el ADN, no presenta fluorescencia en ninguna de las tres pruebas realizadas.

Tabla 10. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel, utilizando el compuesto LQM 108 para la tinción.

Compuesto Clave LQM	Prueba de micronúcleos	Preparaciones cromosómicas	Electroforesis en gel de agarosa.
108	<p>Celulas sanguineas extraidas de sangre periferica de ratón observadas en un microscopio de fluorescencia</p> 	<p>Cromosomas obtenidas de médula ósea de ratón observados en un microscopio de fluorescencia.</p> 	<p>Gel de agarosa observado en el transiluminador después de haber permanecido 35min. en la cámara de electroforesis a 120V</p> 

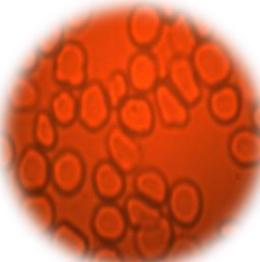
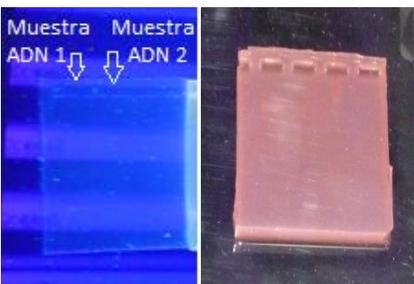
El compuesto LQM 114 no presenta afinidad por el ADN. En el gel de agarosa se puede observar fluorescencia del compuesto precipitado.

Tabla 11. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel, utilizando el compuesto LQM 114 para la tinción.

Compuesto Clave LQM	Prueba de micronúcleos	Preparaciones cromosómicas	Electroforesis en gel de agarosa.
114	<p>Celulas sanguineas extraidas de sangre periferica de ratón observadas en un microscopio de fluorescencia</p> 	<p>Cromosomas obtenidas de médula ósea de ratón observados en un microscopio de fluorescencia.</p> 	<p>Gel de agarosa observado en el transiluminador después de haber permanecido 35min. en la cámara de electroforesis a 120V</p> 

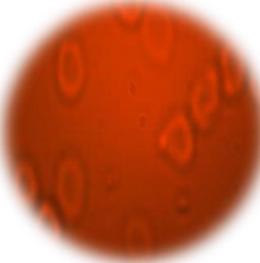
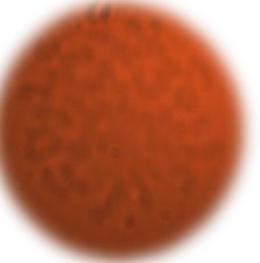
El compuesto LQM 120 no presenta afinidad por el ADN. El gel de agarosa se tiñó completamente sin presentar fluorescencia.

Tabla 12. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel, utilizando el compuesto LQM 120 para la tinción.

Compuesto Clave LQM	Prueba de micronúcleos	de Preparaciones cromosómicas	Electroforesis en gel de agarosa.
120	Celulas sanguineas extraidas de sangre periferica de ratón observadas en un microscopio de fluorescencia 	Cromosomas obtenidas de médula ósea de ratón observados en un microscopio de fluorescencia. 	Gel de agarosa observado en el transiluminador después de haber permanecido 35min. en la cámara de electroforesis a 120V 

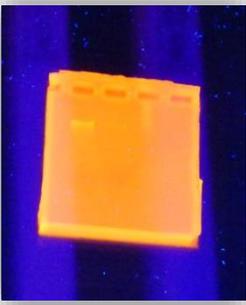
El compuesto LQM 122 no presenta afinidad por el ADN. En el gel de agarosa se puede observar fluorescencia por el compuesto precipitado

Tabla 13. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel, utilizando el compuesto LQM 122 para la tinción.

Compuesto Clave LQM	Prueba de micronúcleos	de Preparaciones cromosómicas	Electroforesis en gel de agarosa.
122	Celulas sanguineas extraidas de sangre periferica de ratón observadas en un microscopio de fluorescencia 	Cromosomas obtenidas de médula ósea de ratón observados en un microscopio de fluorescencia. 	Gel de agarosa observado en el transiluminador después de haber permanecido 35min. en la cámara de electroforesis a 120V 

Se realizó un control positivo para cada una de las pruebas. Se tiñó con naranja de acridina para las pruebas de micronúcleos y cromosomas de médula ósea de ratón observándose fluorescencia y se utilizó bromuro de etidio para la electroforesis fluoresciendo de igual forma.

Tabla 14. Resultados de la prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas utilizando naranja de acridina para la tinción. La electroforesis en gel de agarosa se utilizó bromuro de etidio para la tinción.

Prueba de micronúcleos	Preparaciones cromosómicas	Electroforesis en gel de agarosa.
 <p data-bbox="188 1003 573 1150">Celulas sanguineas extraidas de sangre periferica de ratón observadas en un microscopio de fluorescencia, teñidas con naranja de acridina</p>	 <p data-bbox="607 989 1083 1108">Cromosomas obtenidas de médula ósea de ratón observados en un microscopio de fluorescencia, teñidas con naranja de acridina</p>	 <p data-bbox="1122 1003 1435 1213">Gel de agarosa observado en el transiluminador después de haber permanecido 35min. en la cámara de electroforesis a 120V, teñido con bromuro de etidio.</p>

6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Síntesis química

Los productos sintetizados de la serie LQM 100 se obtuvieron en forma sólida a excepción del 3,5-dimetilisoxazol que es un líquido color ámbar con olor característico, este compuesto después de ser nitrado (3,5 dimetil-4-nitroisoxazol) fue utilizado como base para la síntesis de los compuestos isoxazoles 5-sustituidos. Existen diversas técnicas de síntesis para la obtención del compuesto denominado con la clave LQM 102, a las cuales se les realizaron diversas modificaciones con el fin de optimizar la síntesis. La primera modificación que se realizó a la reacción fue la adición de ácido acético como catalizador y así aumentar el rendimiento (Ávila, 2009), y la segunda modificación fue la utilización de luz infrarroja como fuente de energía. De acuerdo con las modificaciones realizadas se obtuvo el 3,5-dimetil isoxazol con un mayor rendimiento y además el tiempo de reacción se disminuyó considerablemente en comparación con lo reportado en la literatura (Adamo, Suresh, 2009).

Así mismo se obtuvieron buenos resultados en la síntesis de los compuestos LQM 105, 108, 114, 120 y 122, en comparación con experimentos realizados anteriormente, donde se había demostrado que la reacción entre el nitroisoxazol y un aldehído aromático catalizados por piperidina eran menores al 15% (Adamo, Suresh, 2009), mientras que nuestro método se lograron obtener hasta rendimientos de 89 % comparado con las metodologías anteriores, y además se disminuyó el tiempo de reacción de 24 horas reportado a 2:30 horas aproximadamente.

Caracterización

Los espectros de IR nos permitieron identificar los grupos funcionales presentes en los compuestos sintetizados. Para el compuesto LQM 102 en el espectro de IR se observa una banda en 2870 cm^{-1} que corresponde al carbono sp^3 enlazado a hidrogeno, la banda en 1602.5 cm^{-1} es asignada a un enlace carbono unido a carbono por medio de un doble enlace ($\text{C}=\text{C}$), y por último se observan dos banda para el grupo nitro en 1359 y 1500 cm^{-1} .

Para el compuesto LQM 105 se observa una serie de bandas en $2161.9 - 1680\text{ cm}^{-1}$, las cuales corresponden al compuesto aromático presente en la molécula. En 1621.2 cm^{-1} se observa la banda asignada para el enlace $\text{C}=\text{C}$ (alqueno), después se observa las dos bandas correspondientes al grupo nitro en 1508.6 y 1378.5 cm^{-1} , y por último en 824.5 cm^{-1} se observa la banda asignada para el enlace entre carbono con bromo.

Para los demás compuestos los espectros de IR son similares debido a que los compuestos tienen la misma estructura química, la diferencia que presentan estos es la sustitución que presentan en la posición 4 con respecto al benceno, y a diferencia del compuesto LQM 120 tiene un grupo hidroxilo que en el infrarrojo está representado por la banda en 3671.9 cm^{-1} .

El espectro de ^1H RMN del LQM 102 se observan dos señales, las dos son singuletes uno en 2.5 ppm que integra para 3 hidrógenos correspondiente al metilo en posición 5 del anillo, y la otra señal en 2.8 ppm corresponde de igual forma a un metilo solo que en la posición 3 con respecto al anillo del isoxazol.

Para el espectro de ^{13}C RMN, hay 5 señales, en 172.37 ppm que corresponde al carbono saturado unido al oxígeno, la siguiente señal que se observa es en 155.97 ppm es para el carbono saturado unido al nitrógeno, la señal en 77.88 pertenece de igual forma al carbono saturado que tiene sustituido al grupo nitro, esta señal no se observa adecuadamente debido a que aparece en el intervalo de la señal del solvente utilizado (cloroformo deuterado); sin embargo se puede observar que en 77.88 ppm la señal es más intensa. Por último tenemos dos señales en 14.30 y 11.99 ppm, que corresponden a los dos metilos uno en posición 3 y el otro en 5.

Para el LQM 105 el espectro de ^1H RMN se puede observar un multiplete en 7.2-7.9 ppm que integra para 4 hidrógenos pertenecientes al anillo aromático, la señal en 5-5.4 ppm corresponde a los hidrógenos de los vinilos e integran para dos hidrógenos, por último la señal en 2.33 pertenece al metilo del anillo de isoxazol, también se pueden observar otras señales en 2.5 y 3.31 las cuales corresponden al solvente utilizado DMSO y al agua.

En el espectro de ^{13}C RMN, las señales son más complejas, 157.1 ppm pertenece al carbono unido al oxígeno y en 156.3 ppm corresponde al carbono unido al nitrógeno, mientras que la señal de 112.27 ppm pertenece al carbono que tiene sustituido al grupo nitro y esta señal está desplazada a campos más altos porque el grupo nitro es un grupo electroatrayente, la señal de 11.84 ppm que pertenece al metilo, estas 4 señales corresponden al anillo del isoxazol. Las señales 137.02 y 130.3 ppm pertenecen a los carbonos vinílicos que unen a los dos anillos. Y las señales que corresponden a los carbonos del benceno son 133.02 ppm (=C-C-Ar), 132.2 ppm (C-Ar.) 131.27 ppm (C-Ar.) y 130.94 ppm (Br-C-Ar.); 130.3.

Para el compuesto LQM 108, los espectros de ^1H RMN y de ^{13}C RMN son similares a los del LQM 105 debido a que en su estructura lo único que cambia es el Cl por un Br, en posición cuatro con respecto al anillo bencénico, a diferencia

del espectro anterior los de este compuesto tenían menos ruido por lo que se podían distinguir mejor las señales.

En el caso del compuesto LQM 114 el espectro de ^1H RMN tiene diferencia por que se realizó utilizando como solvente cloroformo deuterado, y las señales de los hidrógenos de los vinilos se encuentran en otra posición en 7.2 y 7.5 ppm, otra diferencia es que este compuesto tiene como sustituyente un grupo metilo en lugar de un halógeno en posición 4 con respecto al benceno, por lo tanto la señal en 2.6 ppm corresponde al metilo, y la de 2.4 es la del metilo que se encuentra sustituido en el anillo del isoxazol. Para el espectro de ^{13}C RMN, las señales son similares con la de los compuestos anteriores, solo en esta aparece una señal más en 21.46 ppm correspondiente al metilo del benceno.

Evaluación

La evaluación de los compuestos sintetizados en técnicas citogenéticas fue debido a que estos presentan fluorescencia cuando son observados bajo luz ultravioleta, nos dimos cuenta de este fenómeno cuando se realizaba cromatografía en capa fina para saber si los compuestos ya estaban puros y al momento de cambiar de longitud de onda de corta a larga, se observaba la fluorescencia de los compuestos es por eso que se decidió realizar pruebas para encontrar un posible uso como fluorocromos en las técnicas de micronúcleos preparaciones cromosómicas y separación de ADN por electroforesis en gel que son técnicas muy utilizadas en el laboratorio de citogenética.

De acuerdo a la estructura de los compuestos sintetizados, la fluorescencia es atribuible a los múltiples enlaces conjugados. Cuando los electrones se deslocalizan pueden absorber energía y excitarse, y posteriormente retornar a su posición habitual, liberando parte de esta energía como luz fluorescente. Las estructuras con dobles enlaces altamente conjugados también presentan fluorescencia. La eficiencia cuántica aumenta en relación con la cantidad de anillos y con su grado de condensación. Por otro lado, las estructuras de anillo condensado como los heterociclos de cinco miembros, por lo regular no son fluorescentes, sin embargo tienen un potente efecto de fluorescencia cuando se acoplan a un sistema aromático (Beriman, 1971; Reiser et al, 1972). La condensación de anillos bencénicos para dar núcleos heterocíclicos, da como resultado un aumento en la absorptividad molar de la banda de absorción. En estas estructuras el tiempo de vida del estado excitado es más corto, y la fluorescencia se presenta (Skoog, 2008). Por tanto la fluorescencia de los compuestos LQM 105, 108, 114, 120 Y 120 es explicada ya que todos presentan una molécula de benceno unido al anillo del isoxazol, y si los comparamos con el 3,5

dimetilisoxazol y el 3,5 dimetil 4-nitroisoxazol, se puede observar que estos no fluorescen bajo luz ultravioleta.

Antes de realizar las pruebas se analizaron las características químicas que presentaban los compuestos sintetizados, para saber cómo deben de ser manejados, por ejemplo sabemos que tienen carácter básico debido al par de electrones localizados en el nitrógeno del anillo que no participan en el sistema aromático (Paquette, 2011), con esto sabemos que puede ser átomo protonable y así obtener un valor de pK_a que nos permita saber a qué pH aproximado tenemos a los compuestos LQM 100 en su forma de sal (solubles en medio acuoso). Los pK_a s fueron calculados teóricamente con el software ACD/labs, y los resultados obtenidos fueron negativos para todos los compuestos, lo que nos hizo pensar en que la solubilidad en un medio acuoso era muy difícil, porque para formar la sal correspondiente de cada isoxazol se tiene que protonar el nitrógeno y esto sería a pH muy ácido. Por lo tanto las sales que se forman en condiciones ácidas suelen disociarse con facilidad (Paquette, 2011), esto sucedió cuando al adicionar ácido acético glacial a los compuestos, estos se disolvían, sin embargo cuando se adiciona agua los compuestos precipitan. De acuerdo a la tabla 2 de resultados se puede ver que todos los compuestos a excepción del LQM 120, son insolubles en agua, pero solubles en DMSO y algunos en acetonitrilo, por ello se decidió utilizar dimetil sulfoxido (DMSO) como disolvente para realizar las pruebas de evaluación como posibles colorantes fluorescentes.

Los resultados obtenidos de la prueba de micronúcleos y de preparaciones cromosómicas obtenidas de médula ósea de ratón fueron negativos ya que no se observó fluorescencia sobre estas. Esto puede ser debido a lo siguiente:

Un punto importante, que influyó en las técnicas utilizadas para la evaluación de los colorantes fue la solubilidad de los compuestos, porque el medio que se utiliza generalmente en las técnicas citogenéticas es acuoso, por ejemplo no fue posible utilizar soluciones amortiguadoras, porque al agregar éstas se precipita el compuesto y al observar al microscopio de fluorescencia se observan cristales de los compuestos precipitados sobre la laminilla.

Otro dato importante a analizar, es la estructura química de la molécula ya que nos proporciona datos muy importantes. Actualmente los fluorocromos comercializados se encuentran en su forma de sal. Las moléculas generalmente son catiónicas y su estructura es rígida, todo esto permite la unión del fluorocromo al ADN, además ya que el ADN tiene carga negativa los fluorocromos catiónicos van a tener mayor afinidad hacia este.

La última prueba que se realizó fue electroforesis en gel de agarosa, se hicieron diversas pruebas para saber cuál sería la vía más óptima para realizar la tinción:

Cargar la muestra de ADN junto con el colorante en el poso del gel: esto género que se precipitara el compuesto disuelto previamente en DMSO en el posillo, esto es debido a que tanto el buffer como el ADN están preparados en medio acuoso. Por lo tanto se decidió que la tinción se tendría que hacer utilizando como medio DMSO. El procedimiento fue el siguiente: después del corrimiento del gel con la muestra de ADN, este se enjuagó con DMSO para quitar el exceso de buffer utilizado para la electroforesis, posteriormente el gel se colocaba en un recipiente que contenía a la solución del compuesto LQM y se dejaba de 5 a 10 minutos, transcurrido el tiempo retirar el gel del recipiente para quitarle el exceso de solución y finalmente verlo en el transiluminador. Este procedimiento nos dio mejores resultados en cuanto a que se observaba fluorescencia y el compuesto se distribuía en todo el gel; sin embargo el compuesto volvió a precipitar debido a que el gel de agarosa es preparado con un buffer que es acuoso, en las imágenes de los geles se puede ver que algunos fluorescen pero esto es debido a las moléculas de los compuestos que están precipitadas dentro del gel.

Por último tenemos el caso del LQM 120 los resultados fueron diferentes en comparación con los otros 4 compuestos. Este compuesto es más soluble, porque éste no precipita cuando se adiciona agua, esto ayudó mucho a realizar la prueba de electroforesis porque se mantuvo disuelto. Se obtuvieron resultados favorables en la electroforesis utilizando las dos modificaciones.

Cuando se adicionó el colorante junto con la muestra de ADN se observó la marca del colorante sobre el gel, sin embargo este no se unió al ADN por que el buffer de corrimiento que sirve como referencia para saber hasta dónde corre el ADN se encontraba más alejado. Que no se une a ADN también se puede corroborar con las laminillas de cromosomas, las cuales no se tiñeron.

También se observó que el LQM 120 teñía todo el gel, y esto fue cuando se realizó la prueba enjuagando y tiñiendo el gel con DMSO. Por último otra característica que tiene este compuesto es que a diferentes pH's cambia de color, en medio ácido (ácido acético glacial) el color de la solución es amarilla, en medio básico (buffer de boratos pH=10) el color es rojo y en medio neutro (buffer de fosfatos pH= 7) el color es anaranjado. Además se observó que teñía los eritrocitos, pero no lo hacía diferencialmente. Todas las propiedades mencionadas anteriormente se deben al sustituyente hidroxilo que se encuentra en posición orto del benceno. El fenol como grupo funcional le confiere acidez al isoxazol, por eso la molécula tiene dos pka. Por lo tanto el compuesto LQM 120 es una fuente potencial para nuevos usos.

7.- CONCLUSIONES

Se sintetizaron los compuestos LQM 105, 108, 114, 120 y 122. Apartir de la condensación-ciclización de la hidroxilamina y la 2,4 pentadiona para posteriormente nitrarla y finalmente realizar la sustitución en posición 5 con diversos aldehídos aromáticos. Así mismo se optimizaron las condiciones de reacción empleando como catalizadores ácido acético glacial y piperidina que ayudaron a incrementar el rendimiento, en comparación con los métodos convencionales, y se utilizó como fuente de energía luz infrarroja que ayudo a disminuir el tiempo de reacción. Por lo tanto el método de síntesis empleado es económico, rápido y seguro.

Se caracterizaron los compuestos LQM 105,108 y 114 mediante técnicas espectroscópicas IR, RMN¹³C y RMN¹H

Se evaluaron los compuestos sintetizados en técnicas empleadas en citogenética, prueba de micronúcleos, preparaciones cromosómicas y electroforesis en gel, encontrando que los compuestos sintetizados no se unen a ADN. Sin embargo el LQM 120 puede ser utilizado como un indicador de pH, por sus diferentes coloraciones que presenta cuando es puesto en diferentes pH's.

8.- PROSPECTIVAS

El presente trabajo realizado servirá para poder seguir sintetizando nuevas moléculas.

A los compuestos de la serie LQM 100 se les pueden realizar cambios estructurales que permitan mejorar sus propiedades y su utilización como posibles fluorocromos.

Un cambio sugerido es la reducción al grupo nitro del anillo de isoxazol, lo que posiblemente genere cambios en sus propiedades químicas. Para el LQM 120 que tiene 2 grupos nitro, la estequiometría para la reducción sería 2:1. Con estas modificaciones se espera que mejore su solubilidad, y por tanto que se puedan utilizar en técnicas con medios acuosos, además de que el grupo amino puede permitir una mejor interacción con las moléculas de ADN formando puentes de hidrógeno.

Además se pueden realizar estudios *in silico* para saber que moléculas pueden interactuar con el ADN.

9. - REFERENCIAS

- Adamo F. A. and Suresh S. (2008). *Vinylogous nitroaldol (Henry) reaction using 3,5-diethyl-4-nitroisoxazole and carbonyl compounds*. Tetrahedron 65. pp.990-997. DOI: 10.1016/itet.2008.11.089
- Arencibia, D. F., Vidal, A. et. al. (2011). *Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina*. Vacca Monitor. 20(1). pp. 28-33
- Ávila Zarraga, G. et. al. (2009). *Química Orgánica: experimentos con un enfoque ecológico*. México: UNAM, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial
- Avendaño L. C. (2001). *Introducción a la Química Farmacéutica*. Madrid; Mc Graw Hill.
- Bansal K. (1999). *Heterocyclic Chemistry*. India:New Age International Publishers.
- Barbieri L. et. Al. (2001). *Endocrinología de la reproducción*. España: Medica Panamericana.
- Bello G. y López D.(2001). *Fundamentos de ciencia toxicológica*. Madrid: Díaz Santos.
- Blennow E. (2006). *Chromosome preparation*. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. DOI: 10.1038/npg.els.0005776
- Brown T. (2008). *Genomas*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Contreras B. N. y Mateus A. H. (2009). *Citogenética aplicada a la medicina*. Colombia ; Universidad del Rosario
- Crawford M. (2007). *Anthropological Genetic: Theory, Methods and Applications*. New York:Cambridge.
- Czepulkowski B. (2001). *Analyzing Chromosomes*. New York; The basics.
- Del Castillo P., et. al. (2009). *Binding of cationic dyes to DNA: distinguishing intercalation and groove binding mechanism using simple experiemetal and numerical models*. Biotechnic and histochemistry. 85(4). pp.247-256 DOI: 10.3109/10520290903149620
- Forbes, B. A. (2009). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico*. Madrid: Ed. Medico Panamericana

- Harris C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. España: Reverte.
- Krishna, K. S. R. y Subba, N. V. (1976). *Amides and Schiff Bases from 4-Amino Isoxazoles and their Physiological Activity*, 53, pp. 1047-1048.
- Krishna G. , Urda G. y Theiss J. (1994). *Comparative mouse micronucleus evaluation in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's Giemsa*. Elsevier Science. pp.11-20
- Lodish H., et. al. (2006). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Madhavi K., et. al. (2010). *Synthesis and evaluation of 3-methyl-4-nitro-5-(substitedstyryl) isoxazoles for antioxidant and anti-inflammatory activities*.1(4).pp. 1073-1082.
- Mcmurry J. (2008). *Química orgánica*. México: Cengage Learning.
- Montoya V. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Colombia: editorial Universidad de Antioquia
- Nussbaum R., et. al. (2008). *Genética en medicina*. España: Elsevier Masson.
- Pinho e Melo, T. M. V. D. (2005). *Recent advances on the synthesis and reactivity of isoxazoles*. *Current Organic Chemistry*, 9(10), pp. 925-958. DOI: 10.2174/1385272054368420
- Pradeep T. (1999). *Advances in Physical Chemistry*. New Delhi: Allied Publishers.
- Pretsch, E., Bühlmann, P. et. al. (2005). *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Barcelona: MASSON
- Puerta B. y Ureña P. (2005). *Prácticas de biología molecular*. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Reyes Pineda, M. S. (2011). *Manual de las técnicas más representativas del paquete terminal de citogenética que incluye la implementación de diagramas de flujo descriptivos y ecológicos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
- Rivera Mancía, S. Y. (2004). *Utilización de compuestos orgánicos fluorescentes en tinciones citogenéticas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México

Rodak F. (2004). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. Buenos Aires: Medica Panamericana.

Sánchez V. F. y Berros M. (2004). *Síntesis y espectroscopia de dimetoxi- y trimetoxifenil aminoisoxazoles con isomería estructural*. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químicas- Biológicas*. (7)001. pp.10-17

Skoog A., et. al. (2008). *Principios de análisis instrumental*. México: Cengage Learnig Editores.

Solari A. (2007). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Buenos Aires: Medica Panamericana.

Stockert J. C., Colman, O. et. al. (1981). *Citoquímica de la unión de colorantes y fluorocromos con DNA y cromatina*. *Medicina*. 41(Supl.). pp. 96-100.

Stockert J. C., et al. (2004). *Dna-binding fluorochromes: correlation between C-banding of mouse metaphase chromosomes and hydrogen bonding to adenine-thymine base pairs*. *Acta histochemica* 106 (2005). pp. 413-420. DOI: 10.1016/j.acthis.2004.09.001

Stockert J. C., et al. (1997). *New cationic from diaryloxazole scintillators: fluorescence of chromatin DNA induced by N-quaternary POPOP derivatives*. *Acta histochemica* 99. pp. 195-205

Tamar S. C., et. al. (2008). *Utilidad de la citogenética en la medicina actual*. *Educación y práctica de la Medicina*. 33(4). pp 309-316.

Verlag H. (1987). *Manual de química orgánica*. España: Reverte.

Web

<http://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/microscopia-optica-y-laser-confocal-2a-ed/tema-5.pdf> (citado 22/01/13)

<http://artigoo.com/tipos-de-microscopia-2-fundamentos-de-biologia-celular> (citado 22/01/13)

<http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf> (citado 16/12/12)

<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/2091/209116189013.pdf> (citado 15/12/12)

<http://morfoudec.blogspot.mx/2008/07/microscopa-de-fluorescencia.html> (citado 22/01/13)

<http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v33n4/v33n4a9.pdf> (citado 15/03/13)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012826> (citado 3/02/13)

<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/475/47540607.pdf> (citado 5/04/13)

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v18n2/pdf/a22v18n2.pdf> (citado 10/01/13)

10.- ANEXOS

Espectros de IR, ^1H RMN y ^{13}C RMN de los compuestos sintetizados.

10.1.- Espectros del LQM 102

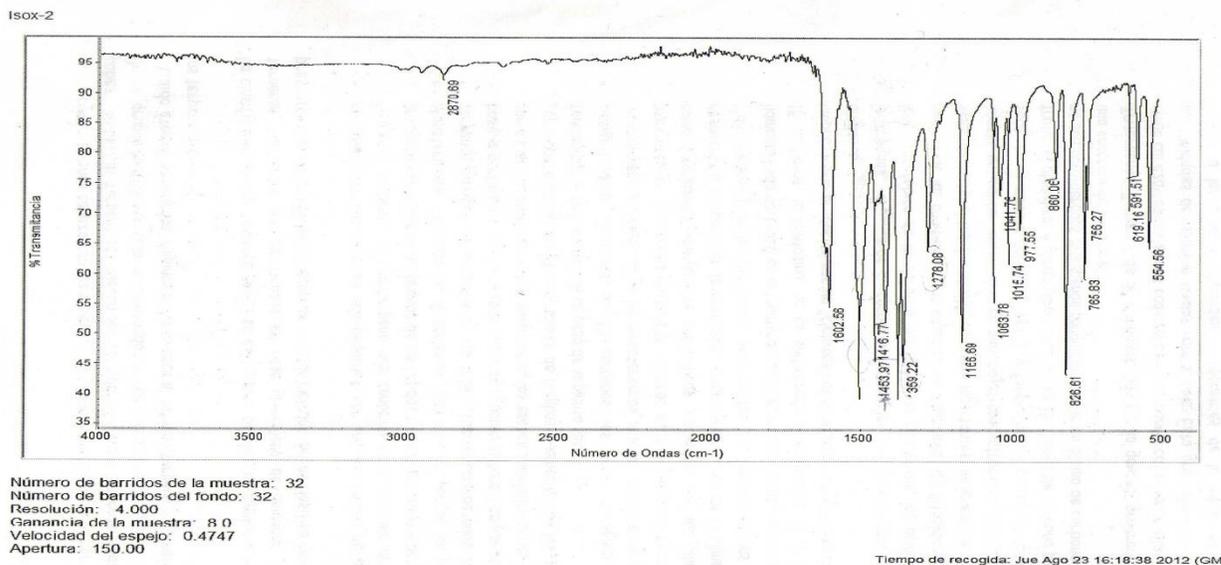


Figura 20. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 102. En el espectro podemos observar las siguientes bandas que representan los principales grupos funcionales del compuesto LQM 102: C-sp³ (2870 cm⁻¹), C=C (1602.58 cm⁻¹), NO₂ (1500, 1359 cm⁻¹)

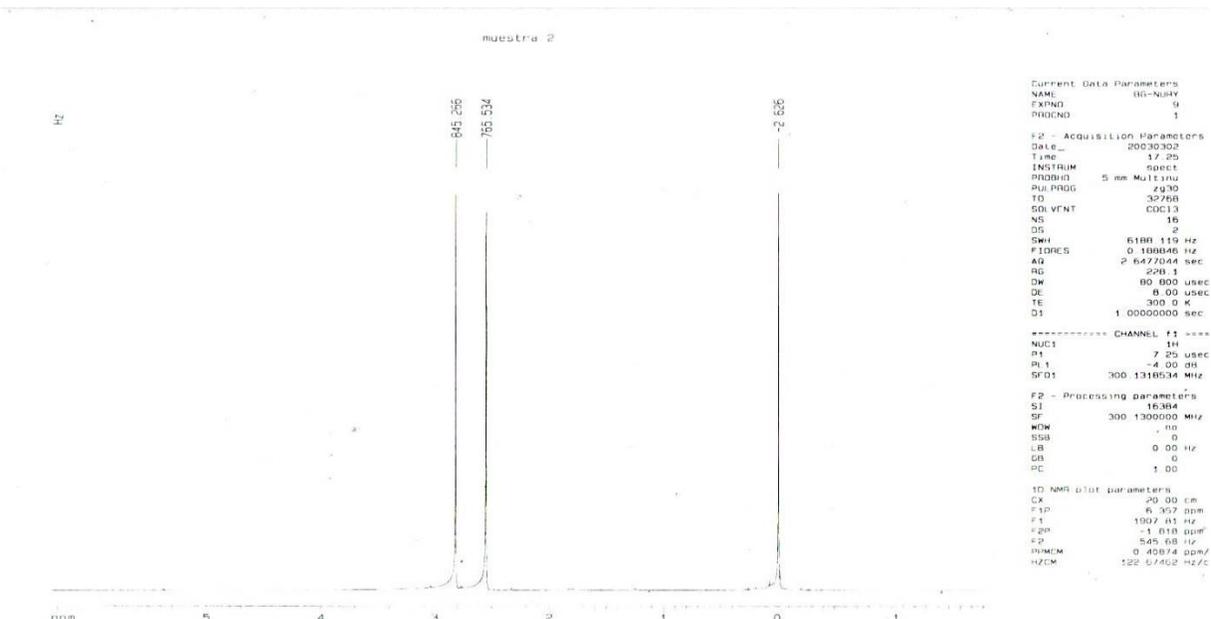


Figura 21. Espectro de ^1H RMN del compuesto LQM 102. ^1H RMN (CDCl_3): δ (ppm) 2.816 (3H,s, CH_3); 2.55 (3H,s, CH_3)

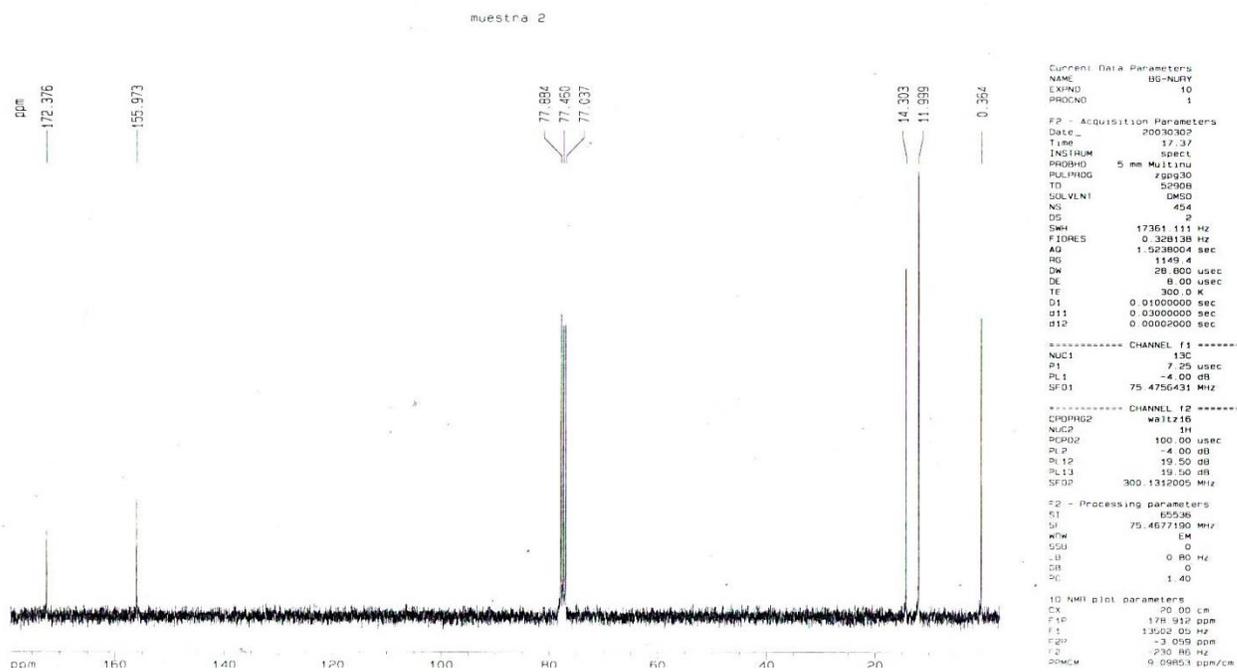


Figura 22. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto LQM 102. ^{13}C RMN (CDCl_3) : δ (ppm) 172.37 (C=O); 155.97 (C=N); 77.88 (C=NO₂); 14.30 (CH₃); 14.30 (CH₃).

10.2.- Espectros del LQM 105

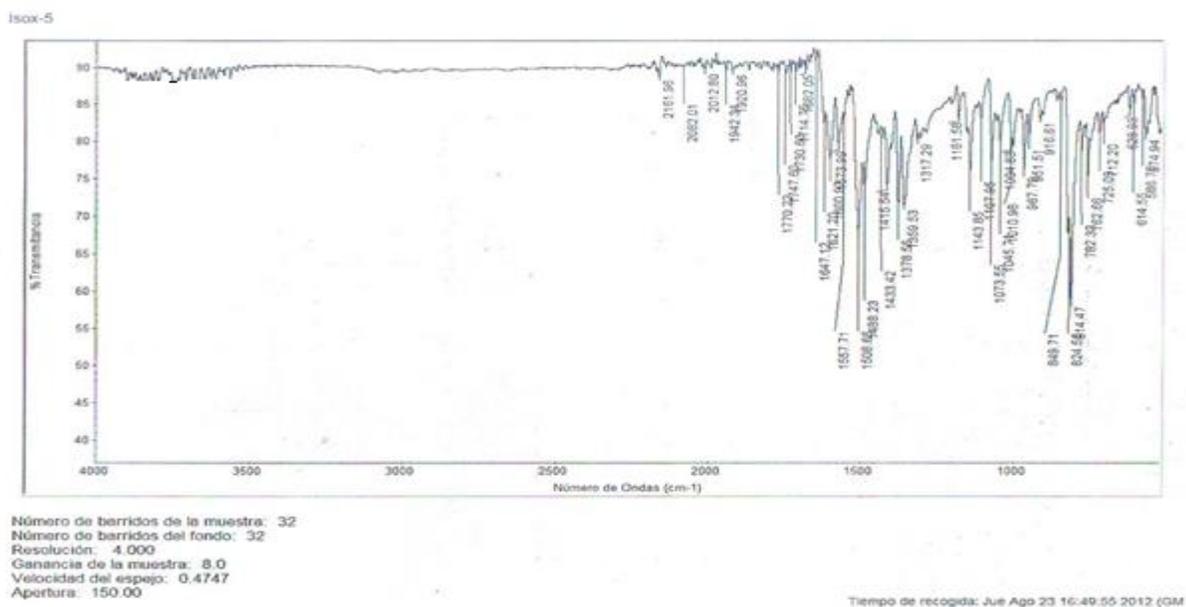


Figura 23. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 105. C-aromático ($2161.9-1680\text{ cm}^{-1}$), C=C (1621.2 cm^{-1}), NO₂ ($1508,1378.5\text{ cm}^{-1}$), C-Br (824.5 cm^{-1})

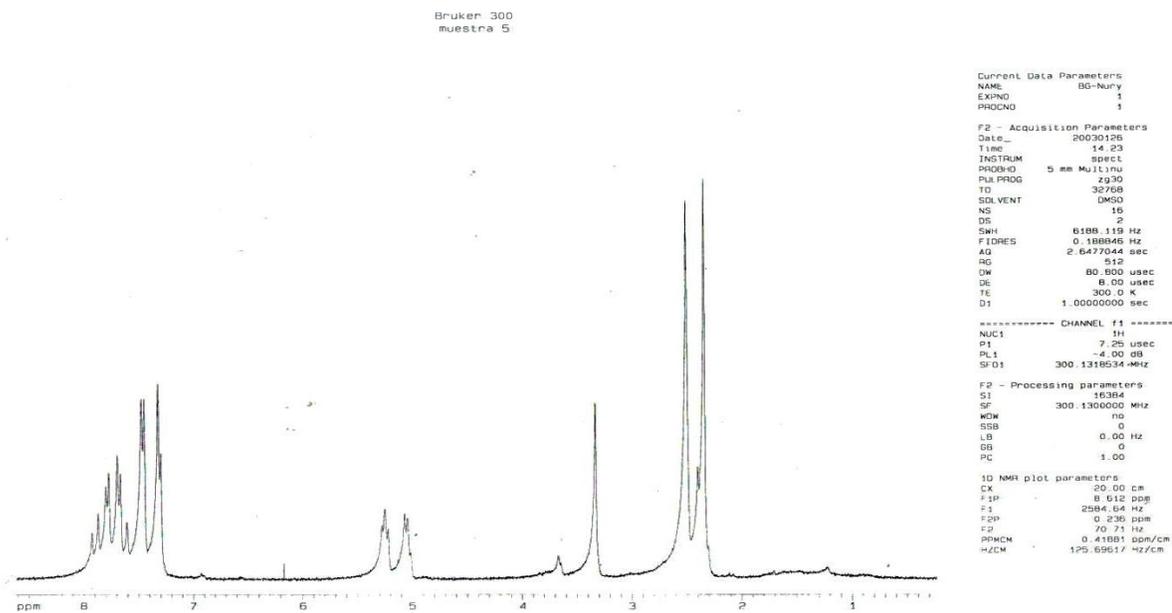


Figura 24. Espectro de ¹H RMN del compuesto LQM 105. ¹H RMN (DMSO): δ(ppm) 7.32-7.8 (4H,m,Ar.); 5.25 (1H,d,CH.); 5.04 (1H,d,CH.); 2.33 (3H,s,CH₃)

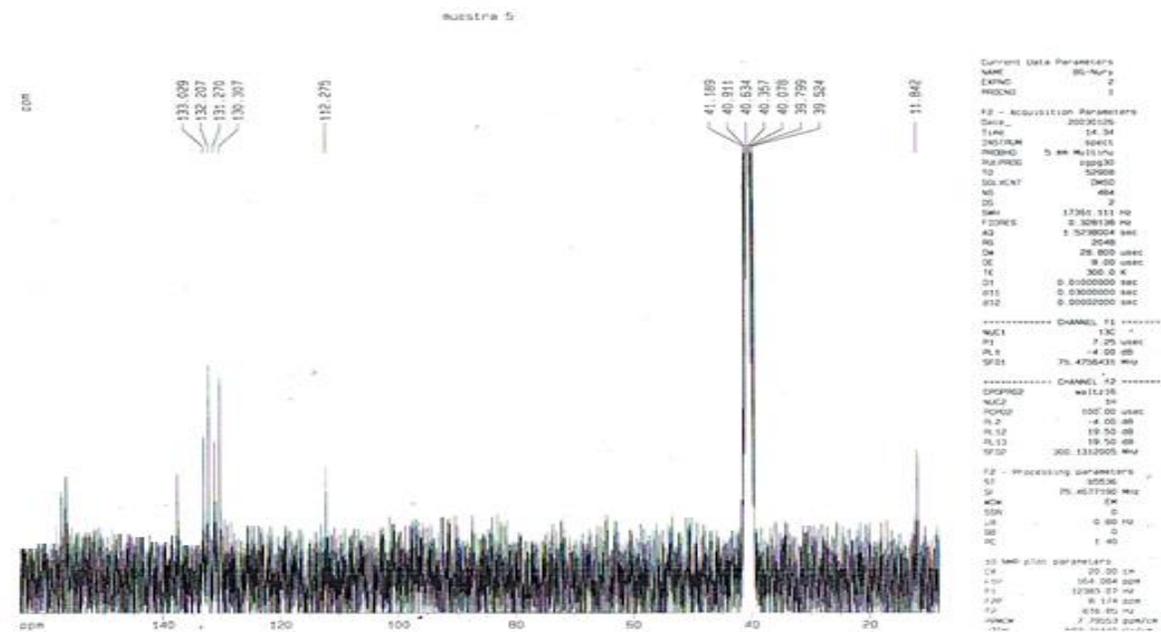


Figura 25. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto LQM 105. ^{13}C RMN (DMSO): δ (ppm) 157.1 (C=N); 156.3 (C=O); 137.02 (C=C); 133.02 (=C-C-Ar); 132.2 (C-Ar.); 131.27 (C-Ar.); 130.94 (Br-C-Ar.); 130.3 (C=C); 112.27 (C=NO₂); 11.84 (CH₃).

10.3.- Espectros del LQM 108

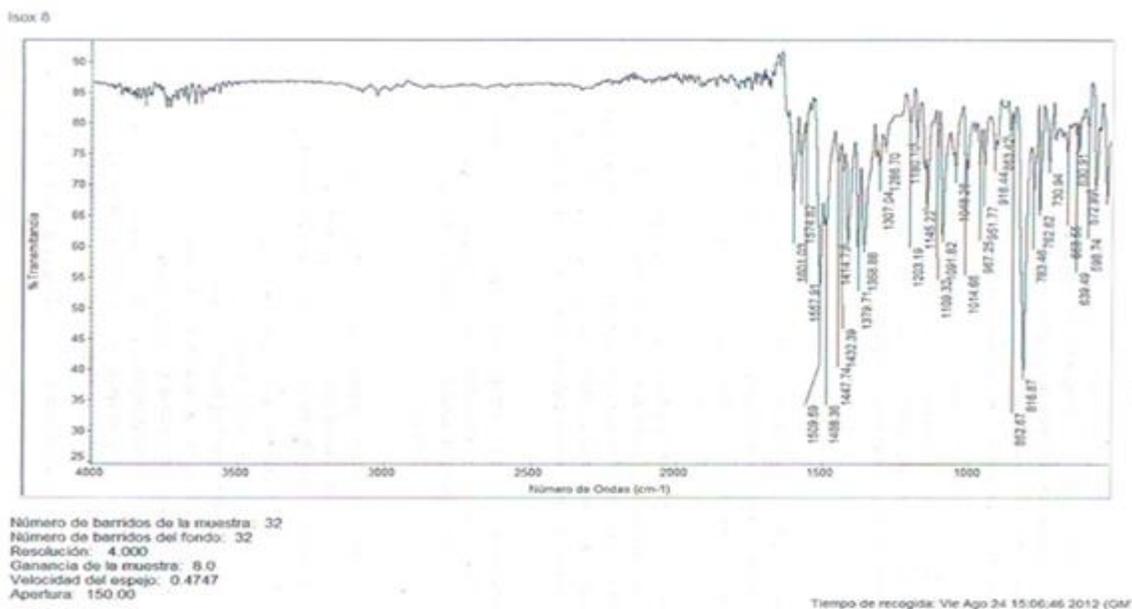


Figura 26. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 108. C-aromático (2000-1650 cm^{-1}), C=C (1601 cm^{-1}), NO₂ (1557,1358.8 cm^{-1}), C-Cl (816.67 cm^{-1})

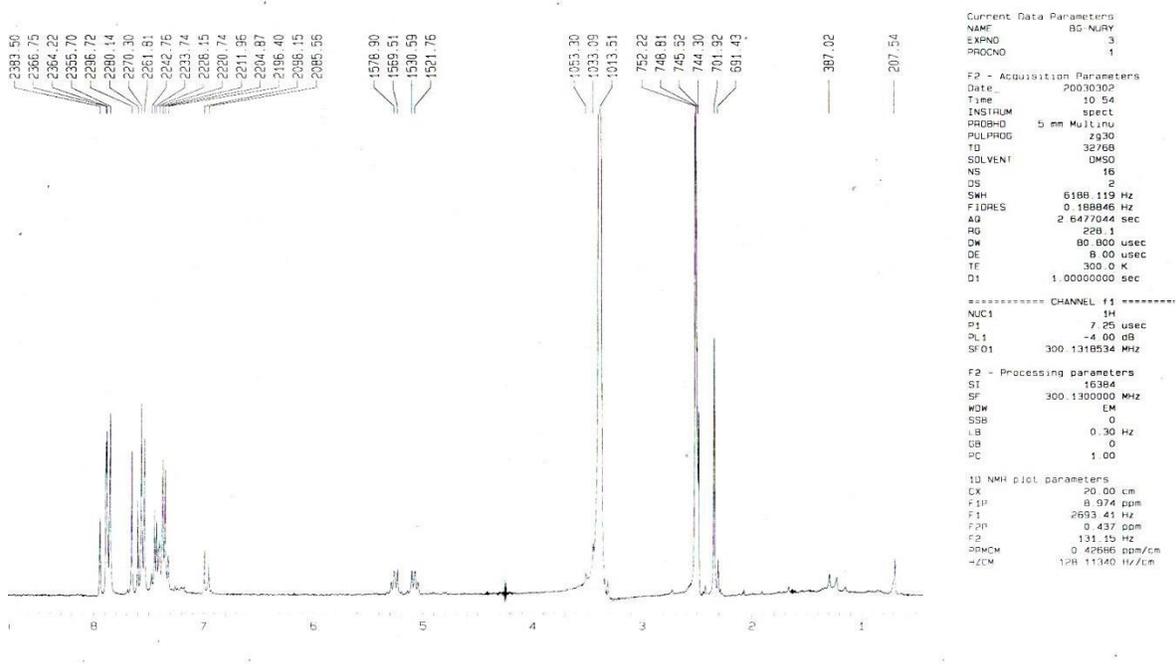


Figura 27. Espectro de ¹H RMN del compuesto LQM 108. ¹H RMN (DMSO): δ (ppm) 7--7.8 (4H,m,Ar.); 5.3 (1H,d,CH.); 2.33 (3H,s,CH₃)

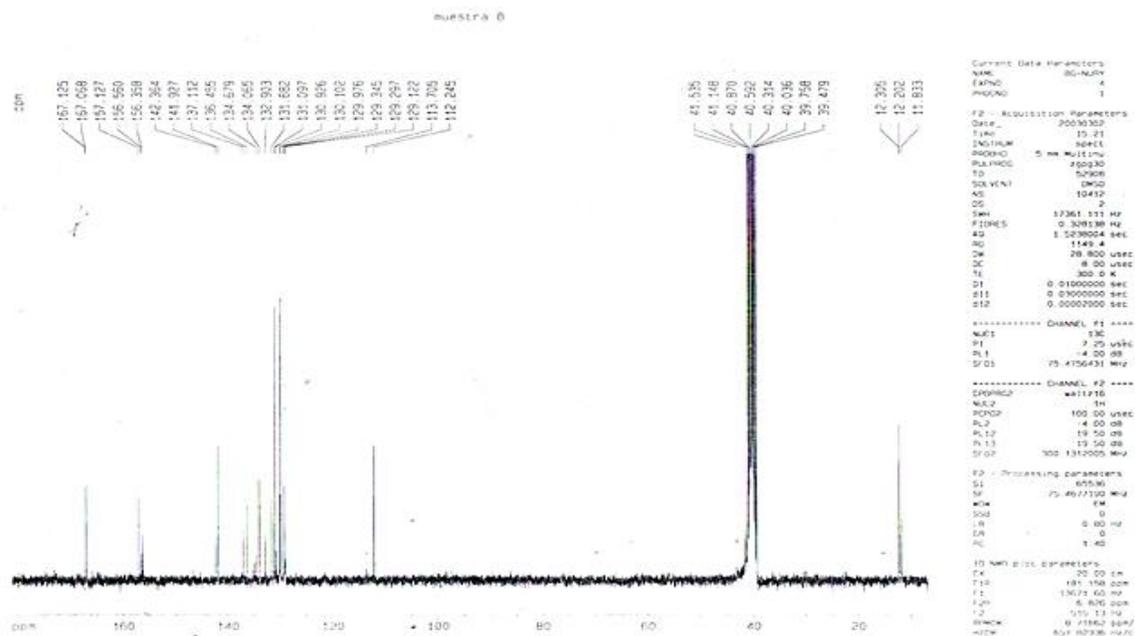


Figura 28. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto LQM 108. ^{13}C RMN (DMSO): δ (ppm) 167.06 (C=N); 157.06 (C=O); 136.45 (-C-Ar.); 134.67(C=C.); 134.05 (Cl-C-Ar.); 131.6(C-Ar.); 131.09 (C-Ar.) ; 124.12 (=C-C-Ar); 112.24 (C=NO₂); 11.83 (CH₃).

10.4.- Espectros del LQM 114

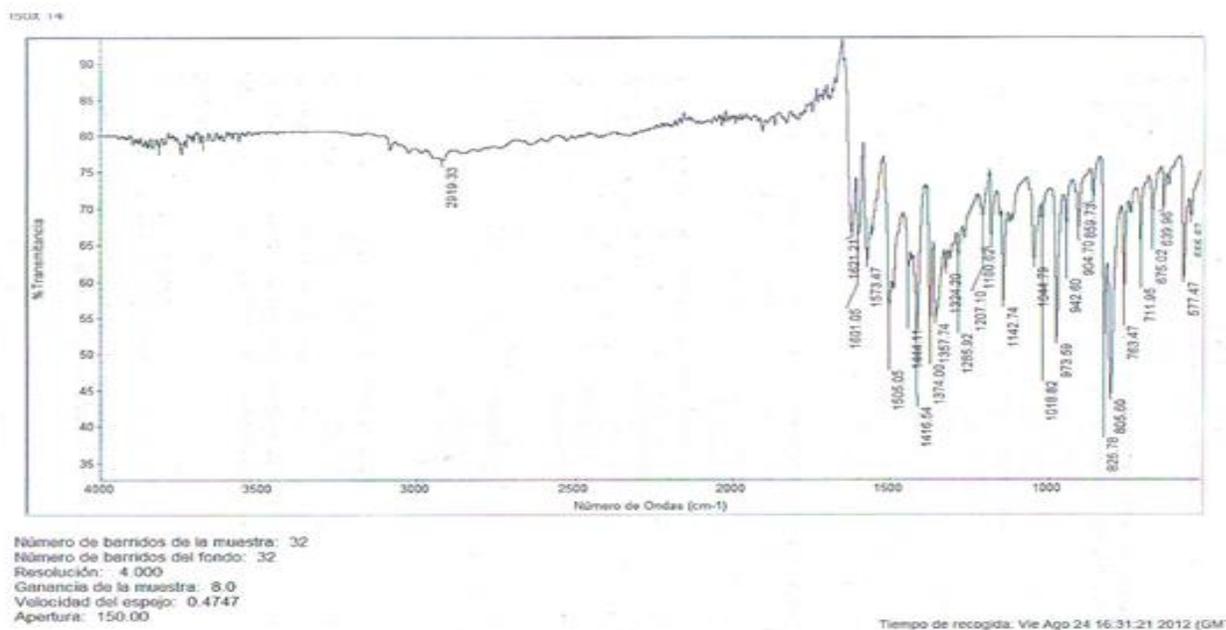


Figura 29. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 114. C-sp³ (2919.3 cm⁻¹), C-aromático (2050-1650 cm⁻¹), C=C (1601cm⁻¹), NO₂ (1505,1374 cm⁻¹)

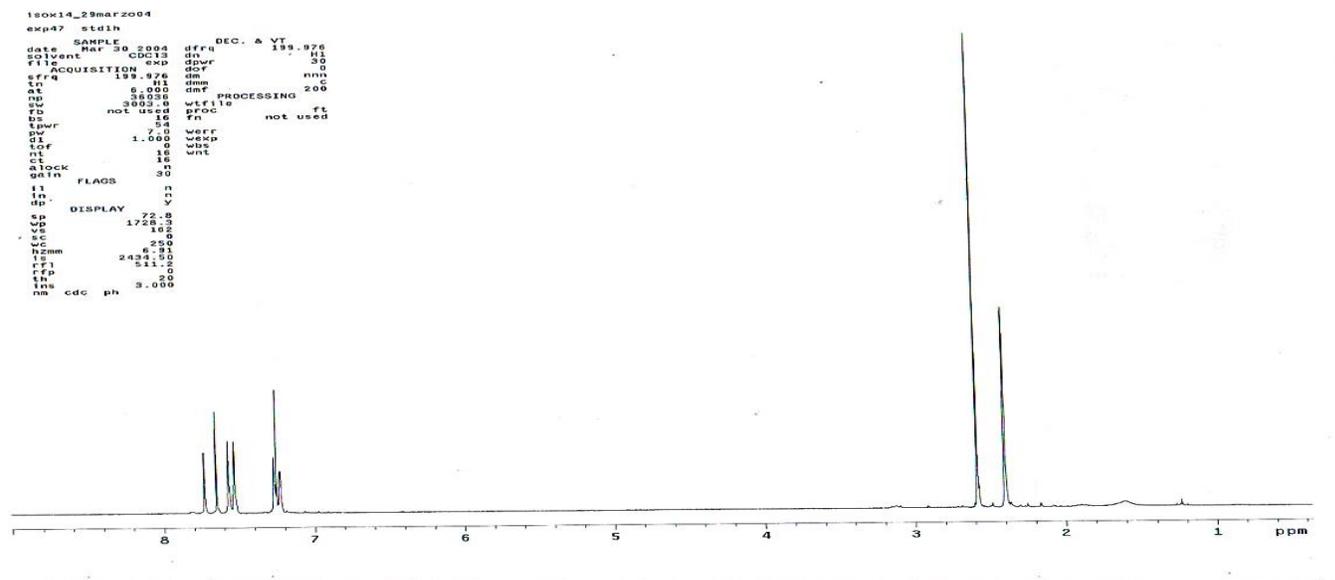


Figura 30. Espectro de ¹H RMN del compuesto LQM 114. ¹H RMN (CDCl₃): δ (ppm) 7.55-7.2 (4H,m,Ar.); 5.3 (1H,d,CH.); 5.1 (1H,d,CH.); 2.4 (3 H,s,CH₃); 2.6 (3 H,s,CH₃)

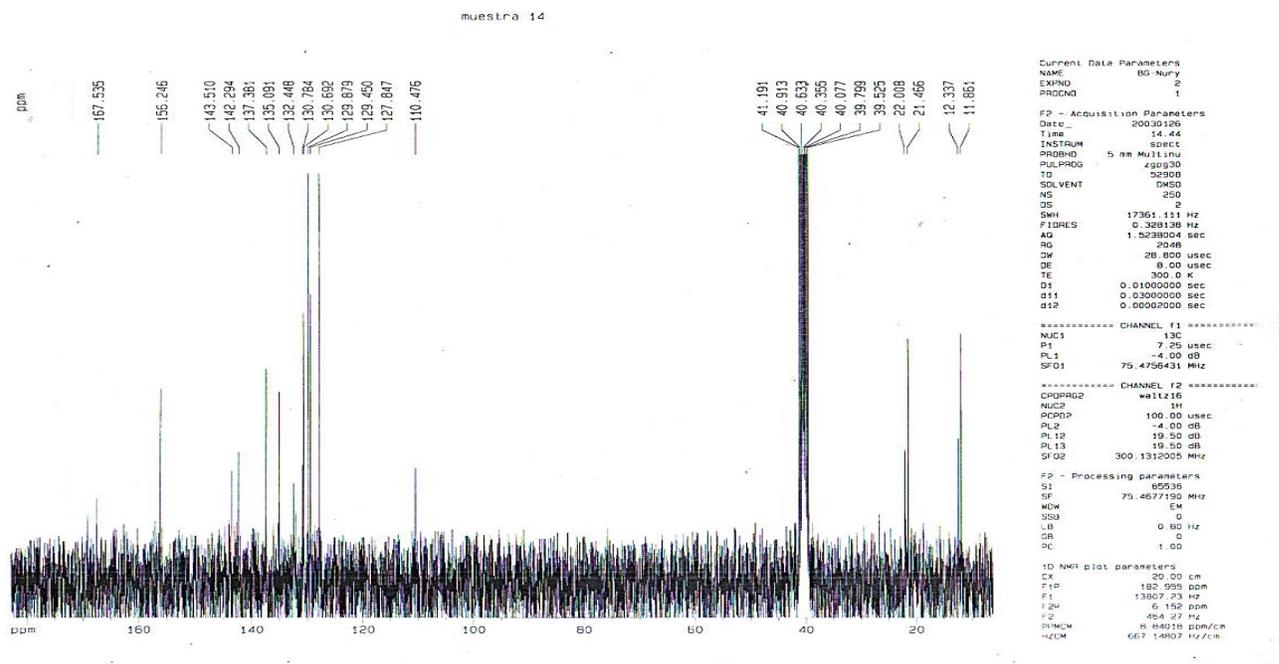


Figura 31. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto LQM 114. ^{13}C RMN (CDCl_3) : δ (ppm) 167.5 (C=N); 156.24 (C=O); 142.29 (-C-Ar.); 137.38(C-Ar.); 135.09 (C=C); 130.64 (C-Ar.) ; 129.8 (C-Ar); 127.84 (C=C); 110.47 (C=NO₂); 11.86 (CH₃) ; 21.45 (CH₃).

10.5.- Espectro de infrarrojo del LQM 120

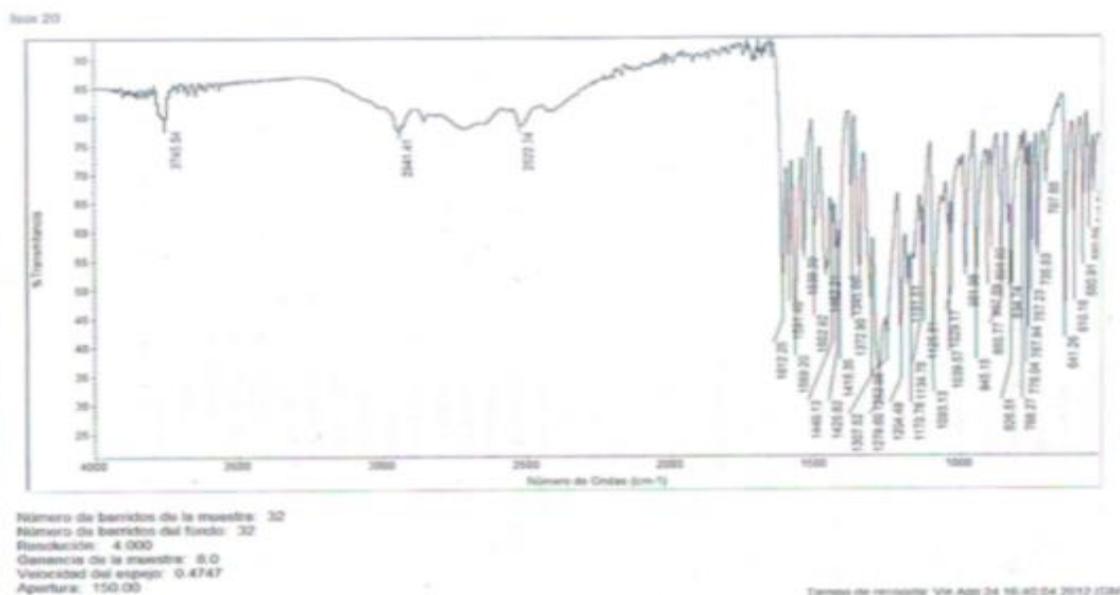


Figura 32. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 120. OH (3671.9), C-sp³ (2941.4cm⁻¹), C-aromático (2522-1600 cm⁻¹), C=C (1612.2cm⁻¹), NO₂ (1569.2, 1345.6 cm⁻¹)

10.6.- Espectro de infrarrojo del LQM 122

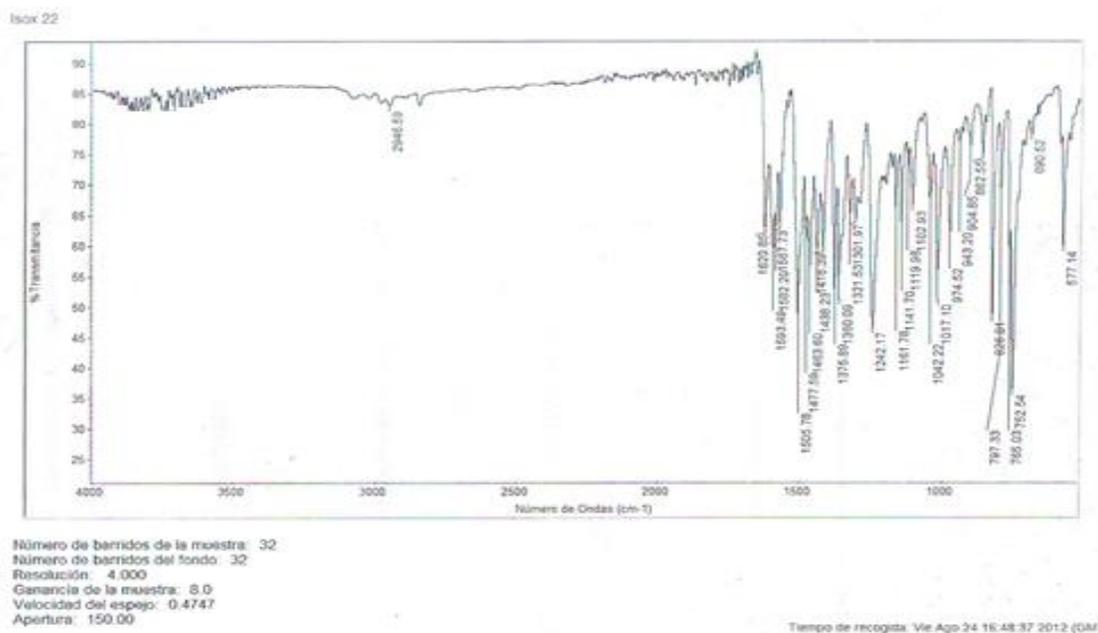


Figura 33. Espectro de infrarrojo del compuesto LQM 122. C-sp³ (2946.5 cm⁻¹), C-aromático (2300-2600 cm⁻¹), C=C (1620.8cm⁻¹), NO₂ (1505.78, 1360 cm⁻¹)