

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Estudio químico, computacional y farmacológico de Ibuprofeno

Disertación previa a la obtención del título

Licenciado en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica

SEBASTIÁN ADOLFO CUESTA HOYOS

Quito, 2014

CERTIFICADO

Yo, Dra. Lorena Meneses Olmedo Directora de la Disertación, CERTIFICO: Que el señor Sebastián Adolfo Cuesta Hoyos ha realizado la investigación sobre el tema “Estudio químico, computacional y farmacológico de Ibuprofeno” de acuerdo a las normas y técnicas establecidas. Una vez concluido y revisado el trabajo, conforme con las disposiciones reglamentarias, autorizo la presentación del informe respectivo.

Fechas: Quito, 01 de Abril del 2014

Dra. Lorena Meneses Olmedo

DIRECTORA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mi hermano, porque gracias a ellos y a su apoyo en cada decisión que he tomado, he podido desarrollarme como persona y cumplir todo lo que me he propuesto.

A mi directora de tesis, Dra. Lorena Meneses, por permitirme trabajar con ella durante estos 2 años; por su disponibilidad, capacidad y eficiencia para guiarme en este proyecto. Gracias por la confianza, la amistad y la apertura que me ha dado durante todo este tiempo.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por su valiosa ayuda en la entrega de recursos, materiales y equipos para la exitosa realización de esta investigación.

A todos mis profesores y entrenadores, ya que cada uno ha aportado en mi formación como persona y como profesional, siendo fundamental para culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis amigos, porque sé que siempre puedo contar con ellos para lo que sea. Gracias por su apoyo incondicional.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA	I
CERTIFICACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDOS	V
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE ANEXOS	XVII
RESUMEN.....	XVIII
ABSTRACT	XX
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. PROCESO INFLAMATORIO.....	4

1.1.1. ETAPAS DEL PROCESO INFLAMATORIO	5
1.1.2. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN	6
1.2. FIEBRE	6
1.3. PROSTAGLANDINAS	7
1.4. AINEs (ANTI INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS).....	9
1.4.1. INTRODUCCIÓN	9
1.4.2. CLASIFICACIÓN	9
1.4.3. FUNCIÓN	11
1.4.4. CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS	11
1.4.5. NUEVOS AINEs	12
1.5. IBUPROFENO	12
1.5.1. NOMENCLATURA.....	13
1.5.2. NOMBRES COMERCIALES.....	13
1.5.3. IMPORTANCIA	14
1.5.4. CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS ADVERSOS.....	14
1.5.5. POSOLOGÍA.....	15
1.5.6. ESTEREOQUÍMICA	16
1.5.7. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.....	17
1.5.8. FARMACOCINÉTICA	18
1.5.9. FUNCIÓN	19
1.5.10. MECANISMO DE ACCIÓN	19
1.6. ENZIMAS	19
1.6.1. CICLOOXIGENASA (COX).....	21
1.6.2. COFACTORES	21

1.6.3. ISOENZIMAS	22
1.6.4. SITIO ACTIVO	23
1.6.5. INHIBICIÓN	24
1.7. CITOCROMO P450 (CYP).....	25
1.7.1. CLASIFICACIÓN.....	26
1.7.2. ACCIÓN.....	26
1.7.3. CYP 2C9.....	27
1.8. MODELAMIENTO MOLECULAR.....	29
1.8.1. QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	29
1.8.2. PRINCIPIO.....	30
1.8.3. APROXIMACIONES	30
1.8.4. MÉTODO AB INITIO	31
1.8.5. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD.....	31
1.8.6. FUNCIONES DE BASE	32
1.8.7. ENERGÍA SINGLE POINT.....	32
1.8.8. OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA	32
1.8.9. FRECUENCIAS VIBRACIONALES.....	33
1.8.10. APLICACIONES.....	33
1.9. DISEÑO DE FÁRMACOS	34
1.9.1. PRIMEROS PASOS.....	34
1.9.2. NUEVOS MÉTODOS.....	34
CAPÍTULO II.....	36

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.1. TOMA DE MUESTRA	36
2.2. EXTRACCIÓN CON SOLVENTE	37
2.2.1. EQUIPO.....	38
2.2.2. MATERIALES.....	38
2.2.3. REACTIVOS.....	39
2.2.4. PROCEDIMIENTO.....	39
2.3. SÍNTESIS DE IBUPROFENO.....	39
2.3.1. EQUIPOS	40
2.3.2. MATERIALES.....	40
2.3.3. REACTIVOS.....	41
2.3.4. PROCEDIMIENTO.....	41
2.4. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO.....	45
2.4.1. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA/VISIBLE (UV/VIS)	46
2.4.1.1. EQUIPO.....	47
2.4.1.2. MATERIALES	47
2.4.1.3. REACTIVOS.....	48
2.4.1.4. PROCEDIMIENTO.....	48
2.4.2. ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJOS (IR).....	48
2.4.2.1. EQUIPOS.....	50
2.4.2.2. MATERIALES	50
2.4.2.3. REACTIVOS.....	50
2.4.2.4. PROCEDIMIENTO.....	51
2.4.3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	51

2.4.3.1. PRINCIPIO	52
2.4.3.2. TIPOS DE ESPECTROSCOPIA RMN.....	54
2.4.3.3. DISOLVENTES	55
2.4.3.4. DETERMINACIÓN	55
2.5. ESTUDIO COMPUTACIONAL	58
2.5.1. GAUSSIAN 03	59
2.5.2. AUTODOCK.....	59
2.5.3. OTROS	60
2.5.4. PROCEDIMIENTO.....	61
CAPÍTULO III	62
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.1. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE IBUPROFENO DE PRODUCTOS TERMINADOS	62
3.2. SÍNTESIS DE IBUPROFENO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	71
3.3. ESTUDIO COMPUTACIONAL	86
3.3.1. ESTUDIO TERMODINÁMICO.....	88
3.3.2. ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO	92
3.3.2.1. ESPECTRO IR.....	92
3.3.2.2. ESPECTRO UV/VIS	103
3.3.2.3. ESPECTRO RMN	106
3.3.3. ESTUDIO BIOQUÍMICO.....	114
CAPÍTULO IV	127

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	127
4.1. CONCLUSIONES.....	127
4.2. RECOMENDACIONES	128
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXOS	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico	8
Figura 1.2. Estructura del ibuprofeno	13
Figura 1.3. Posología del ibuprofeno.....	16
Figura 1.4. Estructuras del R y S ibuprofeno	17
Figura 1.5. Mecanismo de acción de una enzima	20
Figura 1.6. Estructura de la Prostaglandina H2 sintasa	21
Figura 1.7. Comparación del volumen accesible de la Ciclooxygenasa-1 y Ciclooxygenasa-2	23
Figura 1.8. Selectividad de los antiinflamatorios no esteroideos	24
Figura 1.9. Abundancia Citocromo P450 en el hígado humano.....	26
Figura 1.10. Metabolismo de un medicamento por parte del Citocromo P450	27
Figura 1.11. Fases del metabolismo de un xenobiótico por el Citocromo P450	28
Figura 1.12. Mecanismo de eliminación del ibuprofeno	29
Figura 2.1. Muestras de ibuprofeno.....	36
Figura 2.2. Síntesis experimental de ibuprofeno	40
Figura 2.3. Equipo de reflujo.....	42
Figura 2. 4. Espectrofotómetro Ultravioleta/Visible Agilent Technologies Cary 60.....	47
Figura 2.5. Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformadas de Fourier Perkin Elmer BX	50
Figura 2.6. Energía de los estados de spin al aplicar un campo magnético	54

Figura 2.7. Desplazamiento químico de varios protones	57
Figura 2.8. Síntesis BHC de ibuprofeno.....	58
Figura 3.1. Muestras de ibuprofeno para la extracción	63
Figura 3.2. Formación de dos fases (hexano-agua)	64
Figura 3.3. Extracción líquido-líquido de ibuprofeno	65
Figura 3. 4. Cristales de ibuprofeno obtenidos de la extracción.....	66
Figura 3.5. Análisis Ultravioleta/Visible de la extracción.....	70
Figura 3.6. Reacción de acetilación del isobutilbenceno.....	72
Figura 3.7. Productos de la reacción de acetilación	73
Figura 3.8. Métodos de decoloración del producto de la acetilación	74
Figura 3.9. Espectro infrarrojo 4-isobutilacetofenona.....	74
Figura 3.10. Producto de la reducción de la 4-isobutilacetofenona.....	76
Figura 3.11. Espectros infrarrojos de los productos de la segunda parte	77
Figura 3.12. Reacción de Grignard.....	78
Figura 3. 13. Workup del ibuprofeno	80
Figura 3.14. Espectro infrarrojo del ibuprofeno sintetizado.....	80
Figura 3.15. Comparación de espectros infrarrojos de ibuprofeno	82
Figura 3.16. Espectro Ultravioleta/Visible del producto sintetizado.....	83
Figura 3.17. Posibles impurezas producidas en la síntesis de ibuprofeno.....	84
Figura 3.18. Formación del dímero en la reacción de Grignard.....	86
Figura 3. 19. Estructuras computacionales en estudio.....	87
Figura 3.20. Espectros infrarrojo computacionales	93
Figura 3.21. Tabla de frecuencias 4-isobutilacetofenona	94

Figura 3.22. Espectros Ultravioleta/Visible computacionales de las estructuras principales de la síntesis.....	103
Figura 3.23. Espectros Ultravioleta/Visible experimentales de los reactivos principales de la síntesis	104
Figura 3.24. Espectros computacionales ^1H de Resonancia Magnética Nuclear	107
Figura 3.25. Espectros computacionales ^{13}C y ^{17}O de Resonancia Magnética Nuclear del ibuprofeno.....	110
Figura 3.26. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del ibuprofeno	111
Figura 3.27. Espectro del S ibuprofeno con los hidrógenos marcados.....	112
Figura 3.28. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear teórico del ibuprofeno	113
Figura 3.29. Espectro experimental del ibuprofeno (imagen cedida por el Dr. Richard Kjonaas, Indiana State University)	114
Figura 3.30. Enzimas estudiadas	115
Figura 3.31. Área de análisis para el acoplamiento	116
Figura 3.32. Información completa de las conformaciones.....	117
Figura 3.33. Posición espacial de las conformaciones	118
Figura 3.34. Estructura experimental de unión ibuprofeno Ciclooxygenasa-1	119
Figura 3. 35. Comparación d conformaciones con el resultado experimental	119
Figura 3.36. Conformaciones obtenidas con Autodock VINA	121
Figura 3.37. Acoplamiento molecular teórico Ibuprofeno - Ciclooxygenasa-1	122
Figura 3.38. Comparación conformaciones ibuprofeno con celecocib	123
Figura 3.39. Acoplamiento molecular teórico ibuprofeno - Ciclooxygenasa-2	124
Figura 3.40. Comparación conformación 1	125
Figura 3.41. Acoplamiento molecular teórico ibuprofeno – Citocromo P450 2C9	125

Figura A. 1 Gráfico de correlación para valores de desplazamientos químicos de protón146

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos	10
Tabla 1.2. Propiedades físicas y químicas del ibuprofeno	18
Tabla 2.1 Listado de marcas y casas comerciales de las muestras de ibuprofeno.....	37
Tabla 2.2. Números cuánticos de núcleos comunes	52
Tabla 2.3. Núcleos más estudiados en Resonancia Magnética Nuclear	56
Tabla 2.4. Softwares computacionales	60
Tabla 3.1. Análisis infrarrojo de la extracción	66
Tabla 3.2. Comparación del espectro del producto sintetizado	81
Tabla 3.3. Rendimiento de la reacción de Síntesis	85
Tabla 3.4. Input para cálculos de frecuencia, energía y optimización de estructuras	88
Tabla 3.5. Energías de las especies químicas estudiadas	89
Tabla 3.6. Entalpía estándar de reacción	91
Tabla 3.7. Bandas de absorción de radiación infrarroja del R y S ibuprofeno.....	95
Tabla 3.8. Comparación de espectros del Isobutilbenceno	97
Tabla 3.9. Comparación de espectros de la 4-isobutilacetofenona.....	98
Tabla 3.10. Comparación de espectros del 1-(4-isobutilfenil)etanol.....	99
Tabla 3.11. Comparación de espectros del 1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno	100
Tabla 3.12. Comparación de espectros del ibuprofeno	101
Tabla 3.13. Análisis computacional Ultravioleta/Visible de ibuprofeno con diferentes métodos	105
Tabla 3.14. Conformaciones acoplamiento ibuprofeno – Ciclooxygenasa-1 con Autodock 4	116

Tabla 3.15. Resultados ibuprofeno - Ciclooxigenasa-1 utilizando Autodock VINA.....	120
Tabla 3.16. Resultados ibuprofeno - Ciclooxigenasa-2 utilizando Autodock VINA.....	122
Tabla 3.17. Resultados ibuprofeno – Citocromo P450 2C9 utilizando Autodock VINA	124
Tabla A.1. Características de compuestos representativos de la reacción.....	143
Tabla A.2. Cantidad de reactivo reaccionado.....	143
Tabla A.3. Cantidad de producto obtenido de las reacciones.....	143
Tabla A.4. Tabla de frecuencias de absorción infrarroja	145

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. ESPECTROS DEL IBUPROFENO OBTENIDOS DE LA EXTRACCIÓN	137
ANEXO 2. ESPECTROS IR DE LA SÍNTESIS EXPERIMENTAL.....	140
ANEXO 3. RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS	142
ANEXO 4. TABLAS DE CORRELACIÓN.....	144
ANEXO 5. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE REACTIVOS	147

RESUMEN

En esta investigación, se presenta un estudio teórico y experimental de la reacción de síntesis del ibuprofeno. El objetivo de esta disertación fue aplicar los conceptos espectroscópicos y termodinámicos dentro del marco de la Teoría del Funcional de la Densidad y compararlos con los datos experimentales. La investigación consta de tres etapas. La primera abarca el trabajo de laboratorio, el cual, incluye la síntesis experimental, la extracción del principio activo del producto comercial, y el análisis por espectroscopia de infrarrojos y ultravioleta/visible de los productos obtenidos. En la segunda, se utilizó el programa de modelamiento electrónico estructural GAUSSIAN 03, donde se obtuvo una optimización molecular de todas las estructuras que intervienen en la reacción, las energías y las propiedades espectroscópicas (espectro IR, espectro UV/VIS y espectro RMN). La tercera comprende una modelación de la interacción de la molécula de ibuprofeno con las enzimas Ciclooxygenasa 1, Ciclooxygenasa 2 y Citocromo P450 2C9 por medio de métodos de dinámica molecular. Para esto, se utilizó el programa Autodock 4 y Autodock VINA.

En la síntesis experimental se obtuvo un rendimiento de la reacción de 1,37%. Se aislaron todos los productos intermedios y se obtuvieron los espectros que fueron comparados con los espectros computacionales. El producto final tuvo una correlación del 92% en comparación al estándar, lo que demuestra que se trata de ibuprofeno impuro. La extracción de muestras comerciales fue un éxito obteniéndose una correlación de espectros mayor al 98%, lo que indica que el principio activo es efectivamente ibuprofeno. En el estudio termodinámico se

obtuvieron entalpías estándar de reacción negativas para cada paso de la reacción de síntesis, lo que demuestra que la síntesis de ibuprofeno es un proceso exotérmico. Los espectros computacionales fueron comparados con los obtenidos experimentalmente y los de la literatura, obteniéndose una excelente correlación. En el modelamiento molecular, los mejores resultados se lograron con Autodock VINA, por lo que éstos fueron comparados con resultados experimentales obtenidos mediante cristalografía de rayos X.

Los métodos computacionales, tanto el acoplamiento molecular como el modelamiento electrónico estructural, son totalmente comparables con resultados obtenidos experimentalmente demostrando ser bastante exactos. Esto comprueba la aplicabilidad de estos métodos en el proceso de síntesis y diseño de nuevos fármacos.

Palabras claves: Ibuprofeno, síntesis, espectroscopia, Gaussian 03, Ciclooxigenasa, Citocromo P450, Autodock, índice de correlación.

ABSTRACT

In this investigation, we present a theoretical and experimental study of the synthesis reaction of ibuprofen. The objective of this dissertation was to apply spectroscopic and thermodynamic concepts within the Density Functional Theory framework and compared them with experimental data. This research has three stages. The first stage involves the laboratory work, which includes the experimental synthesis, extraction of the active ingredient of the commercial product and the analysis of the products by infrared and ultraviolet/visible spectroscopy. In the second stage, the structural electronic modeling program GAUSSIAN 03 was used. With it, all molecular structures involved in the synthesis were optimized, and their energies and spectroscopic properties (IR, UV/VIS and NMR spectrum) were obtained. The third stage includes a modeling of the interaction between Ibuprofen and Cyclooxygenase 1, Cyclooxygenase 2, and Cytochrome P450 2C9 enzymes using molecular dynamic methods. AutoDock 4 and AutoDock VINA were used for this study.

In the experimental synthesis, the yield of the reaction was 1,37%. All intermediate products were isolated and their respective spectra obtained, then they were compared with the computational spectra. The final product had a correlation index of 92% compared to the standard of ibuprofen which shows that the ibuprofen synthesized is not pure. The extraction of ibuprofen from commercial drugs was successful. Analysis show a correlation index greater than 98% in all samples which indicates that the active ingredient is indeed ibuprofen. The thermodynamic study shows negative standard enthalpies of reaction for each step of the

synthesis, demonstrating that ibuprofen synthesis is an exothermic process. The computational spectra were compared with experimental and bibliographical ones, resulting in an excellent correlation between them. In the molecular modeling study, Autodock VINA displays better results, so those results were used to compare with experimental data obtained by X-ray crystallography.

Computational methods, both molecular electronic coupling and structural modeling, are fully comparable with results obtained experimentally proving to be quite accurate. This proves the applicability of these methods in the synthesis and design of new drugs.

Keywords: Ibuprofen, spectroscopy, synthesis, Gaussian 03, cyclooxygenase , cytochrome P450, Autodock , correlation index .

INTRODUCCIÓN

Gracias a los avances de la tecnología y a métodos como la cristalografía de rayos X, hoy se puede saber la estructura tridimensional de diferentes moléculas como las enzimas y cómo ciertos medicamentos se acoplan a ellas. En países en vías de desarrollo como el nuestro, esta tecnología aún no está disponible por lo que realizar estudios en esta rama se vuelve muy complicado. El conocimiento de propiedades físicas, químicas y farmacológicas de principios activos es de mucha utilidad industrial ya que permiten conocer su comportamiento químico en el cuerpo y su mecanismo de acción. Con un estudio computacional completo de estas sustancias, se pueden crear procesos de síntesis más eficientes, menos costosos o más sencillos; y además se pueden sintetizar nuevos fármacos de acción rápida y que produzcan menos efectos secundarios. Esto repercute en el costo de los medicamentos, los que disminuyen notablemente, pudiendo llegar a personas de escasos recursos. Los productos farmacéuticos representan entre el 15% y el 30% de los gastos sanitarios en los países con economías en transición, y entre el 25% y el 66% en los países en desarrollo. Para las familias pobres de algunos países en desarrollo, los medicamentos suponen el principal gasto sanitario [1].

Existen programas computacionales especializados, que al introducir información estructural en ellos, se pueden crear modelos computacionales de enzimas muy similares a la realidad, donde se la puede girar, realizar acercamientos en partes específicas, analizar sus propiedades físicas, y hasta dividirlos o cambiar ciertas partes. Con este tipo de programas, se pueden usar estructuras computarizadas como una referencia, para determinar el tipo de moléculas que podrían bloquear

cierto tipo de enzima. Estas moléculas pueden ser obtenidas de un banco de moléculas, o modeladas en la computadora y luego sintetizadas en laboratorio. Este método de diseño de medicamentos acorta el tiempo de invención de medicamentos y ahorran millones de dólares a las compañías, en comparación al desarrollo tradicional de fármacos.

En esta investigación se propone un estudio teórico y experimental de la reacción de síntesis del ibuprofeno, un antiinflamatorio de uso común. Este estudio permitirá caracterizar el comportamiento químico, termodinámico y el mecanismo de acción biológica del mismo, para entender la acción farmacológica. Para esto, se realizó la síntesis experimental, se compararon las estructuras del producto obtenido en el laboratorio con el producto comercial y con el producto teórico. Se utilizaron herramientas computacionales que permiten analizar la espectroscopia, la termodinámica y el mecanismo de acoplamiento del ibuprofeno con enzimas. Con los resultados obtenidos se pretende tener un mejor entendimiento del comportamiento químico, biológico, de la acción farmacológica y la razón de los efectos secundarios causados por el mismo. También se propone ver la aplicabilidad de estas técnicas en el desarrollo de nuevos fármacos. Esta investigación está relacionada con los estudios teóricos de reactividad, termodinámica y cinética de algunas reacciones orgánicas de interés que se llevan a cabo en el grupo de investigación de química teórica y computacional de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

A continuación, se muestra el contenido de esta investigación para un mejor entendimiento de la misma:

En el Capítulo I se encuentra una breve descripción del proceso inflamatorio y sus causas, cómo los antiinflamatorios ayudan a contrarrestar este efecto. También hay información sobre los antiinflamatorios no esteroideos, el ibuprofeno y las enzimas que actúan tanto en la acción del fármaco como en su excreción. Finalmente, se muestra una breve reseña de lo que es el modelamiento computacional y el diseño de fármacos.

En el Capítulo II, se especifica el fundamento de las técnicas usadas, además de los equipos, reactivos, materiales y procedimientos empleados en la investigación

El Capítulo III muestra todos los resultados obtenidos en la investigación, además de una discusión de cada uno de los resultados para su mejor entendimiento.

Por último, el Capítulo IV presenta las conclusiones y recomendaciones obtenidas en la investigación.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

El cuerpo humano es una máquina perfecta que, a medida que ha evolucionado, ha creado mecanismos de defensa, como la inflamación y la fiebre, para sobrevivir al ataque de agentes invasores. Aunque todos los animales poseen este mecanismo, en el ser humano es un proceso muy complejo llevado a cabo por una amplia serie de reacciones químicas.

1.1. PROCESO INFLAMATORIO

El proceso inflamatorio es la respuesta a un estímulo nocivo causado por infecciones, anticuerpos o lesiones físicas [2]. Está constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares. La habilidad de tener una respuesta inflamatoria es esencial para sobrevivir al ataque de agentes dañinos, aunque algunas veces ésta puede ser exagerada, sin ningún beneficio aparente y con severas consecuencias [3]. Como resultado del proceso inflamatorio, el umbral del dolor se reduce y el área afectada se hace más sensible al dolor. Este proceso hace que exista menor contacto y, por ende, menor movimiento del área afectada promoviendo la sanación [4].

El ser humano siempre ha buscado alivio para el dolor. El uso de sustancias medicinales para tratar el dolor y la fiebre data de las antiguas civilizaciones griegas y egipcias, donde las hojas de mirto seco, o extractos amargos de la corteza de los árboles de álamo, se utilizaban para tratar

dolores abdominales y de espalda [5]. Hoy en día, el impacto del dolor en la sociedad es todavía grande, siendo la principal razón para buscar ayuda médica.

1.1.1. ETAPAS DEL PROCESO INFLAMATORIO

El proceso inflamatorio posee varias etapas [6]:

Tumefacción: Se forma un edema por aumento del líquido intersticial.

Rubor: Enrojecimiento de la zona afectada causada por la vasodilatación.

Calor: Aumenta la temperatura en la zona inflamada debido a los procesos de vasodilatación y consumo de oxígeno.

Dolor: Se da como consecuencia de la liberación de mediadores que provocan la activación de los nociceptores.

Pérdida o disminución de la función: Debido a los cuatro procesos antes mencionados, la zona afectada reduce o pierde su funcionalidad.

Analizando la inflamación desde un punto de vista microscópico, el daño celular causado por una lesión se traduce en la liberación o activación de mediadores químicos que conducen cambios en la microcirculación y el tejido conectivo. Se inicia así un proceso inflamatorio. La liberación de mediadores causa una alteración vascular la cual permite la llegada, al foco inflamatorio, de moléculas inmunes por medio del torrente sanguíneo. Al mismo tiempo, se liberan mediadores contrarios a los anteriores, los cuales tienden a finalizar o equilibrar el proceso. Se genera un exudado con las células para eliminar el agente y el tejido dañado por medio de fagocitosis. Finalmente, llegan fibroblastos que sintetizan colágeno, proliferan células

epiteliales y vasos dentro de la herida reparando, así, los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria [6].

1.1.2. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

Entre los mediadores pro-inflamatorios, el más importante es el ácido araquidónico. Éste es liberado por las fosfolipasas celulares a partir de cualquier célula estresada o a punto de morir por necrosis. El ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados C₂₀ dan lugar a los llamados eicosanoides, compuestos fisiológicamente y farmacológicamente activos. Los ácidos grasos esenciales, partiendo del ácido eicosanoico, son usados para dar origen a las prostaglandinas. Las prostaglandinas median en la inflamación, producen dolor, regulan la coagulación sanguínea, e inducen sueño, así como intervienen en otros mecanismos de defensa como la fiebre [7].

1.2. FIEBRE

La temperatura corporal depende del balance entre la producción y disipación del calor. En circunstancias normales, el calor se produce internamente durante procesos metabólicos o cuando la temperatura del ambiente excede la corporal. La pérdida de calor se da principalmente por la piel, vía evaporación, y los pulmones. Alteraciones en este proceso causan una elevación de la temperatura sobre el nivel normal, proceso conocido como fiebre [8].

Así como el dolor y la hinchazón, la fiebre juega un rol vital en la defensa del cuerpo en contra de la infección. Muchas bacterias se reproducen con mayor efectividad a la temperatura del

cuerpo. Por eso, al elevar la temperatura corporal, la velocidad de división bacteriana se reduce. La fiebre tiene una respuesta contraria en las células inmunes, las cuales se dividen más rápido. Aunque la fiebre ayuda a combatir infecciones, temperaturas sobre los 40,5 °C pueden amenazar la vida del ser humano, afectando proteínas vitales que provocan estrés celular, infarto, necrosis de tejidos, entre otros [8].

En una infección, las citoquinas aumentan la síntesis de Prostaglandina E2 (PGE2) en los órganos circumventriculares adyacentes al hipotálamo. La PGE2 aumenta la cantidad de adenosín monofosfato cíclico, el que causa que el hipotálamo, que funciona como termostato, eleve la temperatura corporal, promoviendo la producción de calor y reduciendo la disipación del mismo [3].

1.3. PROSTAGLANDINAS

Los eicosanoides son una familia de potentes moléculas biológicas de señalización que actúan como mensajeros de corto alcance. Son hormonas paracrinas, sustancias que funcionan en células cerca del punto donde fueron sintetizadas. Como se muestra en la Figura 1.1, se forman a partir del ácido araquidónico. Están involucrados en funciones reproductivas, inflamación, fiebre y dolor [9]. Existen cuatro clases de eicosanoides: tromboxanos (TX), prostaglandinas (PG), lipoxinas (LP) y leucotrienos (LT).

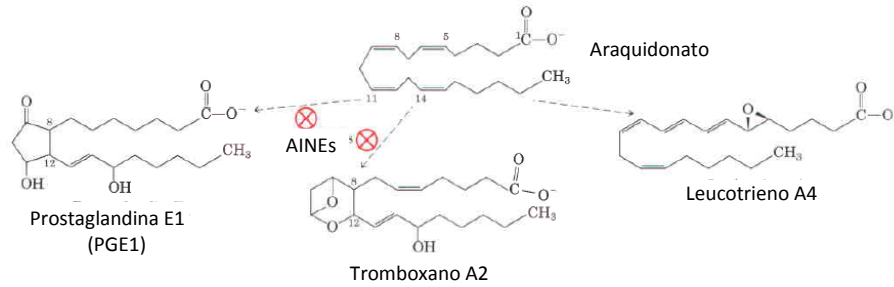


Figura 1.1. Síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico [9]

Las prostaglandinas son un grupo de lípidos de 20 carbonos que contienen un anillo de 5 miembros con dos cadenas laterales largas. Fueron aisladas por primera vez en 1930 de la glándula prostática de la oveja (de ahí su nombre). Son hormonas locales, presentes en pequeñas cantidades en todos los tejidos y fluidos del cuerpo, que se sintetizan rápidamente cuando se lo requiere. Estas hormonas son biosintetizadas en la naturaleza a partir de los ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico [7]. Las prostaglandinas juegan un rol importante en la inflamación causando vasodilatación y aumentando la permeabilidad vascular, y en el dolor, sensibilizan las terminaciones del nervio sensorial [10]. La transformación del ácido araquidónico en prostaglandina es catalizada por la enzima ciclooxigenasa [11].

Las prostaglandinas E1 y E2 son las más conocidas, aunque existen varias docenas de ellas que desarrollan un alto rango de funciones biológicas como disminución de la presión sanguínea, afectación a la agregación plaquetaria, disminución la secreción gástrica y control de la inflamación. Algunas prostaglandinas estimulan la contracción del músculo liso del útero durante la menstruación y labor de parto [9].

La PGE2 es la más importante en el proceso inflamatorio al producir vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C5a (fragmento de proteína) y el Leucotrieno B4 (LTB4) aumenta la permeabilidad vascular. El Tromboxano A2 (TxA2), el mayor producto de la Ciclooxygenasa 1 (COX-1) en plaquetas, induce la agregación plaquetaria [3]. Los antiinflamatorios no esteroideos son medicamentos que impiden la formación de prostaglandinas, reduciendo, así, la inflamación.

1.4. AINEs (ANTI INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS)

1.4.1. INTRODUCCIÓN

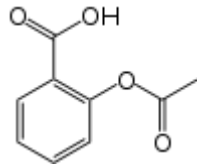
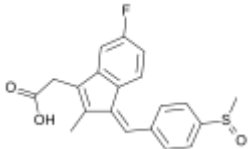
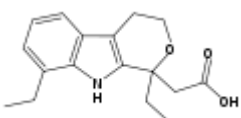
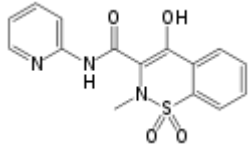
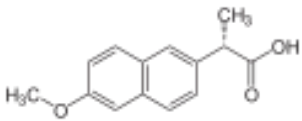
Cualquiera que sea la causa, codo de tenista, esguince de tobillo, o tendinitis, el dolor y la inflamación parecen ir de la mano. Aunque son diferentes en su origen y pueden ser tratados con poderosos medicamentos disponibles en las farmacias como son la codeína (como analgésico) y la cortisona (como antiinflamatorio), existe un tipo de medicamentos que pueden tratar ambos problemas al mismo tiempo, los Anti Inflamatorios No Esteroides (AINEs). Cada día, más de 30 millones de personas toman medicamentos pertenecientes a los AINEs para el alivio del dolor, inflamación y artritis [11]. Estos medicamentos difieren de los esteroideos en su estructura y en la menor cantidad de efectos secundarios que producen [3].

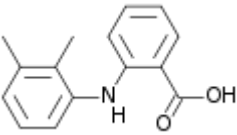
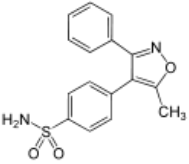
1.4.2. CLASIFICACIÓN

Los AINEs son un grupo amplio y heterogéneo de compuestos químicos que tienen propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias en el organismo. Se clasifican según su estructura química, como se observa en la Tabla 1.1. Así, el grupo de los salicilatos comprenden todos los antiinflamatorios derivados del ácido salicílico, los fenamatos derivados del ácido antranílico,

etc. En el grupo “otros” se agrupan estructuras como *para*-aminofenoles, amino-azúcares, sulfamidas, medicamentos selectivos de la ciclooxigenasa 2 como los coxibes, entre otros. Esta es la clasificación más utilizada debido a que los medicamentos dentro de un mismo grupo van a actuar de manera similar en el cuerpo teniendo una biodisponibilidad, vida media, efectos secundarios, excreción, unión proteica y efectividad comparable.

Tabla 1.1. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos

<i>Grupo</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Estructura</i>
<i>Salicilatos</i>	<u>Ácido acetilsalicílico</u> Salicilamida Ácido salicílico Clonixinato de lisina	
<i>Derivados indol-acéticos</i>	<u>Sulindac</u> Indometacina Oxametacina Acemetacina	
<i>Derivados arilo-acéticos</i>	<u>Etodolaco</u> Bufexamaco Aceclofenaco Diclofenaco	
<i>Ácidos enólicos</i>	<u>Piroxicam</u> Meloxicam Fenilbutazon Metamizol	
<i>Derivados Arilpropiónicos</i>	<u>Naproxeno</u> Ibuprofeno Ketoprofeno Fenoprofeno	

<i>Fenamatos</i>	<u>Ácido mefenámico</u> Ácido flufenámico Ácido tolfenámico Ácido niflúmico	
<i>Otros</i>	<u>Valdecoxib</u> Sulfato de Glucosamina Etoricoxib Nimesulida Paracetamol (acetaminofén)	

1.4.3. FUNCIÓN

Los AINEs son particularmente efectivos cuando la inflamación ha causado sensibilización de los receptores del dolor y daño tisular [3]. Aunque su eficacia es mucho menor que la de los opioides, al no producir depresión respiratoria ni dependencia, se los considera una mejor opción. Todos los antiinflamatorios, incluyendo los selectivos, tienen las funciones antes mencionadas con la excepción del paracetamol, el cual carece de actividad antiinflamatoria [2].

1.4.4. CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

En los últimos 20 años, 18 AINEs han sido retirados del mercado por presentar toxicidad [12]. Generalmente, Los AINEs no son recomendados en pacientes con enfermedades hepáticas y renales avanzadas debido a sus efectos farmacodinámicos adversos [3]. Su combinación con alcohol puede resultar en efectos sinérgicos dañando la mucosa gástrica y causando daño hepático [14].

1.4.5. NUEVOS AINEs

En la actualidad, los químicos han desarrollado un cierto número de medicamentos que actúan como inhibidores selectivos de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), reduciendo, así, algunos de los efectos secundarios de los AINEs. Celecoxib (celebrex) introducido por la Monsanto y rofecoxib (vioxx) introducida por Merck son algunos ejemplos [11].

El uso de AINEs continúa expandiéndose, por lo que se sigue en la búsqueda de compuestos más eficaces y más tolerables, dando nuevos impulsos en el estudio de inhibidores selectivos de la COX-2, AINEs liberadores de ácido nítrico, inhibidores de peroxidasa, enantiómeros de AINEs conocidos, AINEs asociados con fósforo zwitterión, entre otros [12]. Aunque AINEs comunes como el ibuprofeno, siguen siendo la primera opción de los pacientes.

1.5. IBUPROFENO

El ibuprofeno (Figura 1.2) es uno de los antiinflamatorios no esteroideos más usados en la actualidad. Fue creado por el grupo de científicos de la compañía Boots en 1960 [13], demostrando ser más efectivo que sus predecesores y, que a su vez, causa menos efectos secundarios. El ibuprofeno pertenece a la familia de los derivados del ácido propiónico. Esta familia de AINES se caracteriza por tener una eficacia moderada. Posee acción analgésica, antipirética y antiinflamatoria. Su principal diferencia con respecto a otros derivados del ácido propiónico radica en sus características farmacocinéticas.

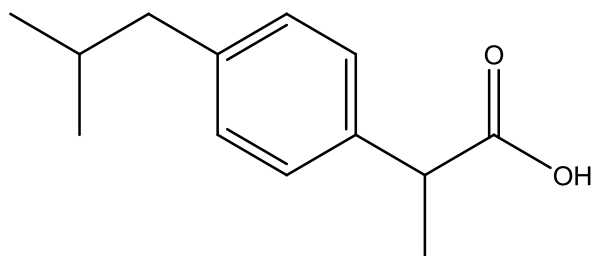


Figura 1.2. Estructura del ibuprofeno

1.5.1. NOMENCLATURA

En química, dependiendo de la nomenclatura, existen varias formas de nombrar al ibuprofeno.

- Ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propiónico
- Ácido (±)-2-p-isobutilfenilpropiónico
- Ácido (±)-p-isobutilhidratrópico
- Ácido (±)-2-[4-(2-metilpropil)fenil] propiónico
- Ácido (±)bencenoacético, αmetil-4-(2-metilpropil)

1.5.2. NOMBRES COMERCIALES

En el mercado, ibuprofeno puede ser encontrado con una infinidad de nombres dependiendo del país y la casa farmacéutica fabricante del medicamento. Algunos de los más importantes son: Advil, Dolofen, Motrin, Paxofen, Prontalgin, Nurofen, Alivium, Nuprin, Rapidol, Ibumax, Ibuleve, i-profen, Neobrufen, Probinex, Speedpain NANO, Ibupain, Ampifen, Anadvil, Brufen, Buprex, etc.

1.5.3. IMPORTANCIA

Ibuprofeno, fenbrufeno y naproxeno son conocidos como fármacos de primera elección porque es menos probable que causen irritación gástrica y ulceración, un efecto secundario común en los AINEs [1]. Por eso, desde la aprobación del ibuprofeno por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), el ibuprofeno es considerado la primera opción al adquirir un medicamento antiinflamatorio para tratar dolor leve y moderado [9], siendo el más usado en los Estados Unidos.

El ibuprofeno es uno de los medicamentos antiinflamatorios catalogados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como esenciales. Se consideran esenciales los medicamentos que sirven para tratar afecciones prioritarias de la población. Los medicamentos esenciales son vitales para prevenir y tratar enfermedades que afectan a millones de personas en el mundo entero. Los medicamentos esenciales salvan vidas y mejoran la salud. En 1998 la OMS creó el Departamento de Medicamentos Esenciales (EDM por sus siglas en inglés), para promover la calidad, seguridad, eficacia e información precisa para todos los medicamentos. EDM trabaja con países y organizaciones no gubernamentales (ONG) para asegurar que, en cualquier lugar, la gente tenga acceso a los medicamentos esenciales que necesite, siendo baratos, seguros, eficaces y de calidad [1].

1.5.4. CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS ADVERSOS

Se ha postulado que los efectos secundarios ocurren debido a la interacción de los AINEs con la capa de fosfolípidos que cubren la mucosa gastrointestinal [15]. Se cree que el ibuprofeno es más tolerable que la aspirina y la indometracina por lo que se ha usado en pacientes con una historia

de intolerancia gastrointestinal a otros AINEs. Sin embargo, 5-15% de los pacientes experimentan efectos secundarios gastrointestinales, siendo los más frecuentes. Los efectos adversos en el sistema nervioso son dolor de cabeza y mareo [12]. El ibuprofeno puede ser usado en ocasiones por mujeres embarazadas, sin embargo es desaconsejado durante los primeros 5 meses y contraindicado a partir del sexto [3]. El hígado puede ser dañado como parte de una reacción de hipersensibilización [12]. El ibuprofeno interfiere con la acción de agentes diuréticos y antihipertensivos, aumenta el riesgo de sangrado con la warfarina e incrementa el riesgo de supresión de la médula ósea con metotrexato. También interfiere con el efecto antiplaquetario de la aspirina [3]. Puede provocar reacciones alérgicas, dolor gástrico, úlcera gástrica, hemorragia, insuficiencia renal. No administrar en niños menores de 3 meses, en caso de alergia a los AINEs, úlcera gastroduodenal, insuficiencia cardíaca, hepática o renal severa, malnutrición severa, deshidratación o infección grave [1]. Los efectos tóxicos son poco probables en dosis inferiores a 100 mg/kg pero pueden ser graves por encima de los 400 mg/kg, (alrededor de 150 comprimidos de 200 mg para un hombre normal).

1.5.5. POSOLOGÍA

Ibuprofeno se vende como tabletas de 200-800 mg; solo las tabletas de 200 mg se pueden conseguir sin prescripción médica. En la Figura 1.3 se muestra la posología del ibuprofeno dependiendo la edad, peso y forma farmacéutica. Para tratar dolores y fiebre debe administrarse 30 mg/kg/día dividido en 3 tomas en niños mayores de 3 meses. Para adultos, la dosis es de 1200 a 1800 mg/día dividido en 3 o 4 tomas. Dosis hasta 800 mg cuatro veces al día (3200 mg) pueden usarse en el tratamiento de artritis reumatoide y osteoartritis. Para dolores musculares o

dismenorrea, la dosis usual es de 400 mg cada 4-6 horas por el tiempo necesario. En postoperatorio, la administración debe ser sistemática, cada 8 horas por un máximo de 8 días [1].

EDAD	0	3 meses	6 años	15 años	
PESO		5 kg	20 kg	35 kg	ADULTO
Susp. Oral 100 mg/5ml		No administrar	Utilizar la pipeta graduada en kg de la suspensión oral	-	-
Comprimidos de 200 mg				1 a 2 cp x 3	2 cp x 3 o 4
Comprimidos de 400 mg				-	1 cp x 3 o 4

Figura 1.3. Posología del ibuprofeno

En el mercado, el ibuprofeno puede ser encontrado en diferentes presentaciones de administración oral, las cuales van desde cápsulas, comprimidos recubiertos, no recubiertos y de liberación controlada, softgels hasta suspensiones orales. Estos se venden como mezcla racémica de los estereoisómeros R y S.

1.5.6. ESTEREOQUÍMICA

En contraste con los medicamentos de origen natural, los fármacos sintéticos son aquirales, y si son quirales, se venden como mezcla racémica. Al ser un derivado del ácido aril propiónico, el ibuprofeno presenta un carbono quiral en la posición α (alfa-) del propionato, el cual hace que existan dos enantiómeros como se muestra en la Figura 1.4, el R y el S ibuprofeno. Solo el enantiómero S es activo como agente analgésico y antiinflamatorio. El isómero R no tiene acción antiinflamatoria y se convierte en el S lentamente en el cuerpo [11]. En la actualidad, la industria

farmacéutica está muy interesada en la producción de medicamentos quirales, esto significa, medicamentos que contengan un solo enantiómero y no la mezcla racémica [16]. Una formulación basada en solo el isómero S, sería más efectivo que la mezcla racémica [17].

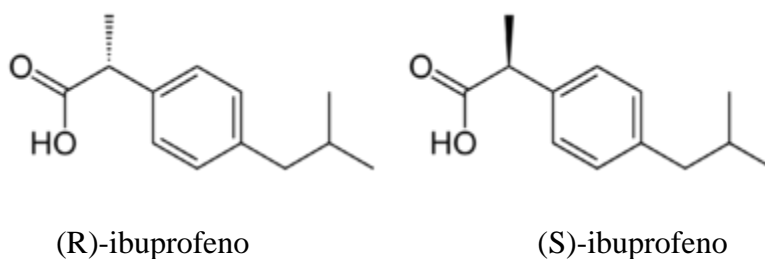


Figura 1.4. Estructuras del R y S ibuprofeno

Para una molécula quiral con 4 sustituyentes diferentes unidos a un carbón tetraédrico, se empieza asignando prioridad a los sustituyentes. Para nombrar como R o S a una conformación en particular, se mira la estructura de tal manera que el sustituyente con menor prioridad se encuentre hacia atrás. Después se ve los otros tres sustituyentes. Si al ver desde el sustituyente con mayor prioridad a los siguientes, la mirada va en forma de las manecillas del reloj, se dice que es la conformación R; pero si traza en dirección contraria de las manecillas del reloj, es el enantiómero S [18].

1.5.7. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Las propiedades físicas y químicas de los fármacos condicionan muchos de los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción, por lo que son de gran importancia en cuanto a la biodisponibilidad del fármaco. Así, por ejemplo, de la solubilidad del medicamento en agua y lípidos dependerá el grado de absorción a través de las membranas, la

acumulación en depósitos grasos (distribución) o la velocidad de eliminación. Además, en los fármacos ionizables (ácidos o bases, que constituyen la inmensa mayoría de los fármacos conocidos) hay que tener en cuenta el grado de ionización para cuantificar la absorción a través de membranas [19]. En la Tabla 1.2 se muestran las principales propiedades físicas y químicas del ibuprofeno.

Tabla 1.2. Propiedades físicas y químicas del ibuprofeno

<i>Fórmula molecular</i>	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
<i>Peso molecular</i>	206,281 g/mol
<i>Estado de Agregación</i>	Sólido
<i>Color</i>	Blanco
<i>Olor</i>	Inodoro
<i>Sabor</i>	Insípido
<i>Punto de fusión</i>	76 °C
<i>Cristalización</i>	Cristales incoloros
<i>Solubilidad</i>	Insoluble en agua(< 1 mg/ml) Soluble en solventes orgánicos (etanol, hexano)
<i>pKa</i>	4,40

1.5.8. FARMACOCINÉTICA

El ibuprofeno se absorbe de forma bastante completa y rápida por vía oral. Esta es la ruta más usada para la disposición del medicamento. La absorción depende de un número de factores, como el vacío gástrico, movilidad intestinal, el área de superficie de la mucosa, degradación del fármaco en el estómago, etc. La absorción varía desde el estómago hasta los intestinos [20]. La absorción por vía rectal es lenta e irregular. Los alimentos reducen la velocidad de absorción, pero no la cantidad absorbida. Su combinación con L-arginina acelera la velocidad de absorción. Se une intensamente a la albúmina (alrededor del 99%). Tiene una biodisponibilidad del 49-73%.

Sigue un metabolismo hepático (Citocromo P450 2C9) donde el 90% es metabolizado en derivados hidroxilados y carboxilados, mientras que el 10% permanece intacto. Su excreción es renal [9]. Su vida media es de alrededor de 2 horas.

1.5.9. FUNCIÓN

El ibuprofeno se utiliza para el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artritis gotosa, tendinitis, dismenorrea primaria [3], alivio sintomático de cefaleas, dolor dental, mialgia, dolor neurológico de carácter leve y dolor postquirúrgico.

1.5.10. MECANISMO DE ACCIÓN

El ibuprofeno es un inhibidor no selectivo de la COX con efectos benéficos y secundarios similares a otros AINEs [3]. Su eficacia radica en la inhibición de las enzimas Ciclooxygenasa 1 y 2 por competencia entre el medicamento y los derivados del ácido araquidónico [7].

1.6. ENZIMAS

Un catalizador es una sustancia que modifica la velocidad de una reacción química sin sufrir ella misma un cambio permanente en el proceso. Los catalizadores son muy comunes, casi todas las reacciones que ocurren en el organismo, la atmosfera, los océanos son afectadas por catalizadores [21]. Las enzimas son polímeros biológicos que catalizan reacciones químicas haciendo posible la vida que conocemos. Al igual que otros catalizadores, las enzimas no se consumen en su participación en la reacción [7]. Con excepción de un pequeño grupo de RNA catalítico, todas las enzimas son proteínas [9]. Las enzimas son necesarias para que todas las

reacciones biológicas tengan velocidades apropiadas. Son macromoléculas cuyo peso molecular varía desde 10000 a un millón de UMA (Unidad de Masa Atómica) [21]. Las enzimas se caracterizan por su selectividad en cuanto a la reacción que catalizan, y algunas son absolutamente específicas, pues funcionan para una sustancia en una sola reacción [7]. Aunque la enzima es muy grande, la reacción se cataliza en un lugar muy específico llamado sitio activo. El número de recambio de reacciones catalizadas que se lleva a cabo en un sitio activo es de 10^3 a 10^7 reacciones por segundo, correspondiente a las bajas energías de activación. El modelo llave cerradura, el cual se muestra en la Figura 1.5, es la forma más sencilla de explicar la especificidad de las enzimas. El sustrato se ajusta perfectamente al sitio activo formando un complejo enzima-sustrato [21].

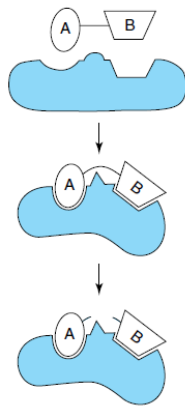


Figura 1.5. Mecanismo de acción de una enzima [9]

La actividad de una enzima se destruye si alguna molécula consigue unirse fuertemente al sitio activo y bloquea la entrada del sustrato. Esas sustancias se conocen como inhibidores de enzimas. Así, los AINEs son inhibidores de la enzima ciclooxigenasa.

1.6.1. CICLOOXIGENASA (COX)

También llamada Prostaglandina H2 sintasa, la Ciclooxygenasa es una enzima que, en el proceso inflamatorio, produce prostaglandinas. Esta enzima posee dos diferentes sitios activos. Como se puede observar en la Figura 1.6, posee un sitio activo ciclooxigenasa en la parte inferior de la enzima y un sitio activo peroxidasa en la parte superior. La enzima completa es un dímero de subunidades idénticas, por lo que juntas, existen dos sitios activos ciclooxigenasa y dos peroxidasa.

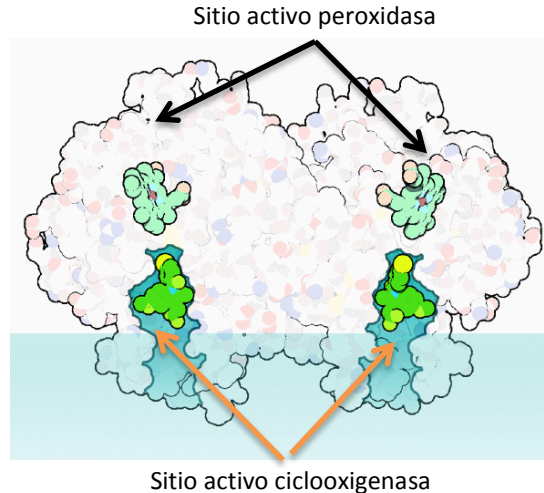


Figura 1.6. Estructura de la Prostaglandina H2 sintasa [22]

1.6.2. COFACTORES

Algunas enzimas no requieren grupos químicos para su actividad más que sus propios residuos de aminoácidos. Otras requieren componentes químicos adicionales llamados cofactores como Fe, Mn, Zn [9]. Los cofactores son moléculas pequeñas que se unen a la enzima, para que sea un catalizador efectivo [23]. En la COX, el sitio activo contiene un átomo de hierro que forma parte

de un grupo hemo, el cual constituye un cofactor indispensable para el funcionamiento de la enzima [5].

1.6.3. ISOENZIMAS

Las isoenzimas son formas moleculares diferentes de la misma enzima que se encuentran en el mismo organismo [24]. Los mamíferos tienen dos isoformas de la prostaglandina H2 sintasa, la Ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la Ciclooxigenasa 2 (COX-2). Ambas poseen en su estructura más de 600 aminoácidos y, aunque tienen similar secuencia de aminoácidos (60 a 65% similares), poseen diferentes funciones [9].

La COX-1 lleva a cabo la producción fisiológica normal de prostaglandinas. Es constitutiva en todos los tejidos, especialmente en el riñón y el tubo gastrointestinal. Participa en la producción de prostaglandinas que intervienen en procesos fisiológicos tales como protección del epitelio gástrico, mantenimiento del flujo renal, agregación plaquetaria, migración de neutrófilos, entre otros. Su actividad tiene que ver con la participación de las prostaglandinas y los tromboxanos en el control de funciones fisiológicas [5].

La COX-2 produce prostaglandinas adicionales que intervienen y causan los efectos en un proceso inflamatorio. Su función es mediar en los procesos de inflamación. Es parte fundamental en el sistema nervioso central (SNC) y el riñón. No es constitutiva en todos los tejidos, pero puede ser inducida en el sitio de inflamación, manteniendo los mecanismos inflamatorios y amplificando las señales dolorosas [5].

1.6.4. SITIO ACTIVO

Los sitios activos de la COX-1 y COX-2 (Figura 1.7) son muy similares, pero se diferencian en la presencia de una cámara lateral en la COX-2 localizada por encima de la constricción Arginina120/Tirosina-355/Ácido Glutámico-524. La cámara lateral bordeada por Valina-523 (isoleucina en COX-1) y contiene una Arginina-513 (Histidina-513 en la mayoría de COX-1) en la base de la cámara. Esto hace el sitio activo más grande (17%) [25].

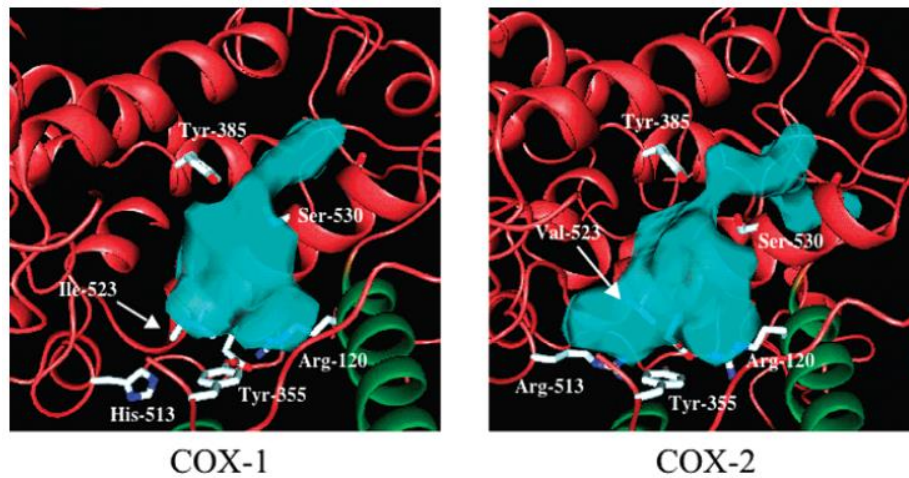


Figura 1.7. Comparación del volumen accesible de la Ciclooxygenasa-1 y Ciclooxygenasa-2
[26]

Para explicar la selectividad de los AINEs, parece crítica la presencia de un aminoácido clave en la posición 523 de estas enzimas, concretamente la isoleucina para COX-1 y la valina para COX-2, que deja una abertura en la cámara lateral en la COX-2 y aumenta su sitio activo en relación con COX-1. Esto permite a la isoenzima unirse a AINEs más voluminosos como sulfonas o sulfamidas (estructuras selectivas de la COX-2) [5]. Si nos fijamos bien, resulta que ambos aminoácidos tienen una estructura y propiedades químicas muy parecidas. Sin embargo, como se

muestra en la Figura 1.8, la isoleucina tiene una cadena con un carbono más que la valina, produciendo el bloqueo del acceso al locus activo en el canal.

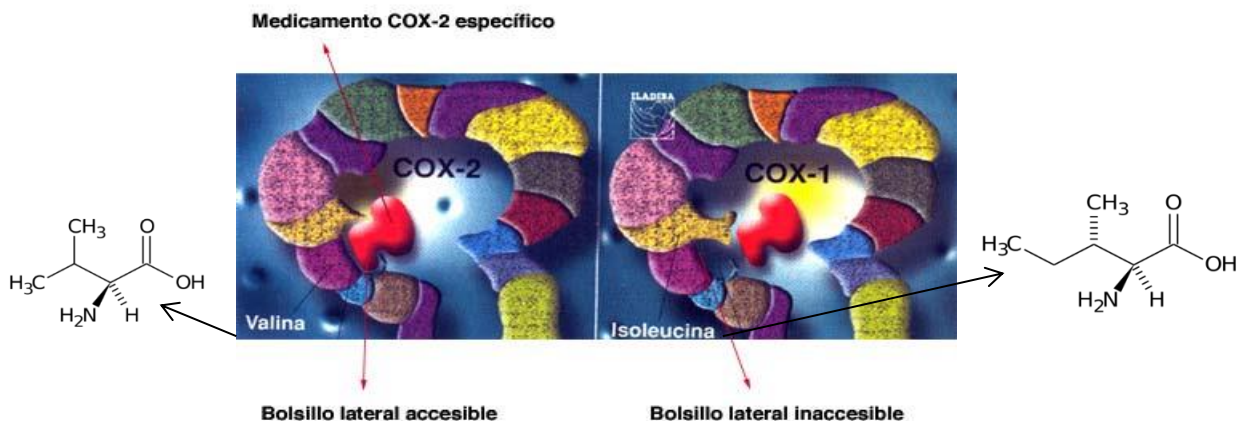


Figura 1.8. Selectividad de los antiinflamatorios no esteroideos [25]

Un segundo cambio esencial de aminoácidos que resulta en la sensibilidad de la COX-2 es el cambio de la Histidina-513 en la COX-1 por la Arginina en la COX-2 [26].

1.6.5. INHIBICIÓN

Nuestro entendimiento de la inhibición de las enzimas COX por AINEs se ha expandido en los últimos 15 años, por una combinación de investigaciones estructurales, funcionales y cinéticas. La diversidad de mecanismos de enlace de la COX-1 y COX-2 demostrados para diferentes compuestos es impresionante. La habilidad de la enzima de acomodarse estructuralmente a diferentes inhibidores es notable, ya que no existe evidencia de cambios considerables en la conformación de las proteínas en la interacción con AINEs [25]. El ibuprofeno bloquea la unión entre el ácido araquidónico con un sitio activo de la ciclooxigenasa. El mensaje normal no es

entregado por lo que no sentimos dolor y no se lanza la respuesta inflamatoria. Desafortunadamente, ambas isoenzimas son bloqueadas interrumpiendo no solo la respuesta inflamatoria sino otras funciones protectoras como la producción de ácido en el estómago [11]. Esta inhibición se da por competencia. La inhibición competitiva se da cuando una molécula, que se asemeja al sustrato, puede ocupar el sitio catalítico debido a su similitud en estructura, siendo parcial o completamente inactivo. Al ocupar el sitio activo, esta molécula actúa como un inhibidor competitivo, previniendo que el sustrato normal sea examinado y catalizado. Operacionalmente, inhibidores competitivos se unen reversiblemente al sitio activo. La inhibición puede ser revertida al diluir el inhibidor o aumentando la cantidad de sustrato [23]. Luego de ejercer su función de inhibir la enzima, los AINEs pasan al hígado para ser metabolizados por la enzima citocromo P450 monooxigenasa.

1.7. CITOCROMO P450 (CYP)

Entre los mayores sistemas enzimáticos que afectan el metabolismo de las drogas, las citocromo P450 monooxigenasas son dominantes. El nombre de citocromo P450 se deriva de la absorción electromagnética inusual a 450nm producida por el complejo formado entre la enzima, el medicamento y monóxido de carbono [27]. Las enzimas citocromo P450 son una familia prominente de enzimas biotransformadoras involucradas en el metabolismo de xenobioticos, así como en el metabolismo de varios compuestos endógenos.

1.7.1. CLASIFICACIÓN

En los humanos, existen 12 familias de genes de proteínas funcionalmente relacionadas que comprenden este grupo de enzimas. Se han identificado más de 30 isoformas de CYP en humanos. Para nombrarlos, se los agrupa de la siguiente manera: Raíz (CYP), Familia (CYP2), Subfamilia (CYP2D), Gen individual (CYP2D6). En la Figura 1.9 se muestran la abundancia de las varias isoformas de la enzima en el hígado humano.

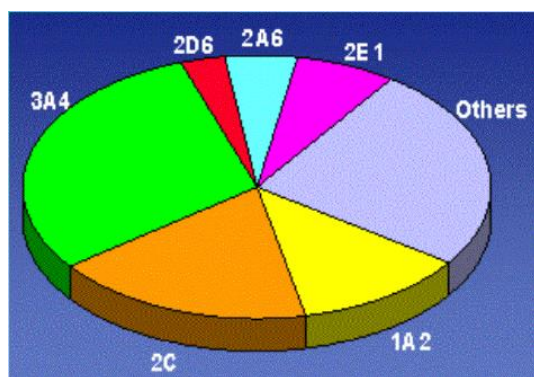
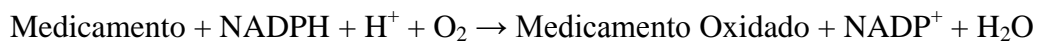


Figura 1.9. Abundancia Citocromo P450 en el hígado humano

1.7.2. ACCIÓN

Las enzimas del citocromo P450 catalizan la oxidación de medicamentos y compuestos endógenos en el hígado, riñones, tracto gastrointestinal, piel y pulmones. Químicamente, el proceso de oxidación, descrito en la Figura 1.10, se puede escribir de la siguiente manera:



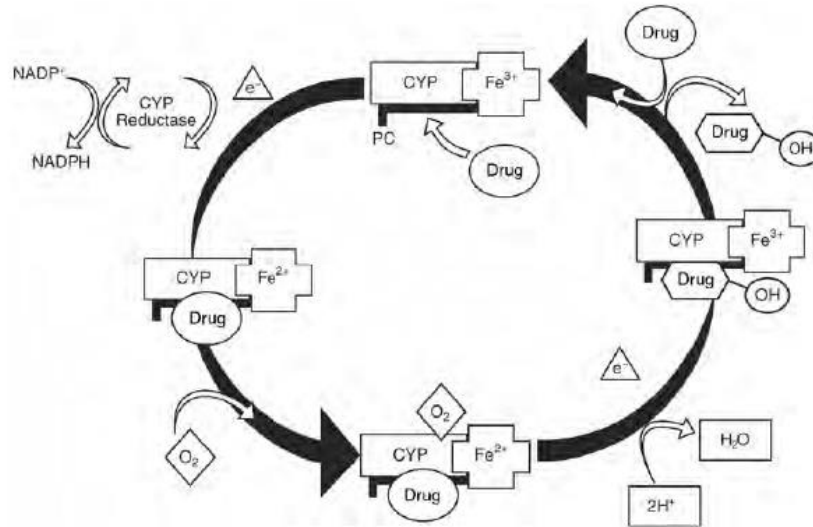


Figura 1.10. Metabolismo de un medicamento por parte del Citocromo P450 [27]

El metabolismo de medicamentos por el CYP microsomal juega un rol importante en los efectos farmacológicos y toxicológicos, así como en las interacciones entre drogas en los humanos [28].

La mayoría de los medicamentos son compuestos orgánicos relativamente pequeños con masas moleculares inferiores a los 500 Da (Dalton). La acción de varias isoformas de la CYP es predecible en cuanto hay elementos orgánicos estructurales que son el objetivo principal para transformaciones metabólicas [27].

1.7.3. CYP 2C9

El citocromo P450 2C9 es una proteína humana microsomal anclada a la membrana. Está involucrada en el metabolismo de medicamentos en el hígado [28]. Alrededor del 30% de los CYP hepáticos pertenecen a esta isoforma. El CYP2C9 ha sido muy estudiado en términos de su estructura y funcionamiento. Ha evolucionado para procesar moléculas relativamente pequeñas,

ácidas y lipofílicas que aceptan enlaces de hidrógeno. Se cree que la estructura del área del canal de acceso, podría ser responsable de la preferencia de la enzima por moléculas ácidas. Hay una amplia gama de sustratos para esta CYP en los que se incluye tolbutamida, dapsona, fenitoin y warfarina [29].

El ibuprofeno se elimina principalmente por el CYP2C9, mientras que el CYP2C8 juega un rol menor [29]. Ambos enantiómeros del ibuprofeno son rápidamente metabolizados a través de la fase I y fase II como se explica en la Figura 1.11.

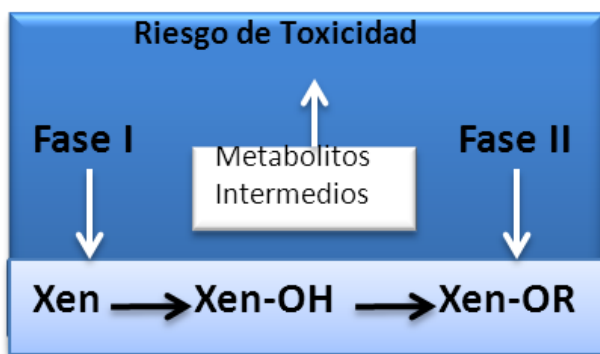


Figura 1.11. Fases del metabolismo de un xenobiótico por el Citocromo P450 [27]

En el hígado de los humanos y las ratas, el citocromo P450 2C9 y 2C8 contribuyen en la mayor parte de la fase I. En esta fase se da una hidroxilación alifática. La hidroxilación ocurre en el carbón alifático, frecuentemente en sitios secundarios o terciarios antes que en carbón primario [30] como muestra la Figura 1.12.



Figura 1.12. Mecanismo de eliminación del ibuprofeno [27]

Todas estas interacciones entre sustratos y enzimas pueden ser entendidas con mayor profundidad usando técnicas de modelamiento molecular.

1.8. MODELAMIENTO MOLECULAR

El modelamiento molecular trata de imitar el comportamiento de cualquier molécula o sistemas de moléculas con simulación computacional [28].

1.8.1. QUÍMICA COMPUTACIONAL

La química computacional es un capítulo de la química que hace uso de modelos matemáticos, para simular las interacciones entre los átomos de las sustancias [31]. Pocos aspectos de la química pueden ser computados exactamente [32]. El desafío de la química computacional radica en simplificar la ecuación de energía de Schrödinger lo suficiente para poderla resolver, pero precisa para predecir propiedades.

1.8.2. PRINCIPIO

La mecánica cuántica da una descripción matemática del comportamiento de los electrones. La mecánica cuántica se desarrolló para explicar las inconsistencias encontradas entre el resultado de las medidas y las predicciones de la física clásica. La característica central que distingue la mecánica cuántica con la clásica es la dualidad onda-partícula [33]. La mecánica cuántica puede predecir cualquier propiedad de un átomo individual o una molécula determinada. Sin embargo, las ecuaciones cuantomecánicas nunca han podido ser resueltas exactamente para ningún otro sistema que no sea el del átomo de hidrógeno. Por eso, toda el área de la química computacional está construida en soluciones aproximadas [32].

1.8.3. APROXIMACIONES

Para realizar mecánica cuántica práctica, es necesario hacer tres aproximaciones a la ecuación multinuclear, multielectrón de Schrödinger:

- Aproximación de Born Oppenheimer: El núcleo se mueve muy lentamente en comparación a los electrones, por lo que se asume que el núcleo es estacionario.
- Aproximación Hartree-Fock: Asume que los electrones se mueven independientemente uno del otro.
- Aproximación de Combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO por sus siglas en inglés): Se espera que la solución de un electrón en una molécula de varios electrones va a ser similar a la función de onda del electrón del átomo de hidrógeno [33].

1.8.4. MÉTODO *AB INITIO*

El término *ab initio* viene del latín desde el principio. Este nombre se dio a los cálculos computacionales que se derivan directamente de principios teóricos sin incluir datos experimentales. Es un cálculo aproximado de la ecuación cuanto mecánica [32].

Este método puede predecir geometría de moléculas, momentos dipolares, energía de reacción, altura de la barrera de reacción, frecuencias vibracionales, espectro IR, espectro RMN, energía, etc. El tipo más común de cálculos *ab initio* es Hartree-Fock (HF). El método HF es una técnica de aproximación a un solo electrón usado en sistemas multielectrón. Debido a esta aproximación, las energías obtenidas son siempre mayores a las reales [32].

1.8.5. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD

La teoría del funcional de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) divide la energía electrónica en diferentes componentes que son calculados por separado: energía cinética, interacción electrón-núcleo, repulsión de coulomb, e interacción electrón-electrón. La premisa detrás de este método es que la energía de una molécula puede ser determinada por la densidad de un electrón en vez de por una función de onda. La DFT se ha convertido, en los últimos años, en un método muy popular. Esta teoría es más reciente que los métodos *ab initio* [32].

La precisión de los resultados de los cálculos con DFT pueden ir de pobres a bastante buenos dependiendo de la base que se escoja y el funcional de la densidad. El funcional híbrido B3LYP es el más usado en cálculos moleculares. Esto se da por la precisión de los resultados obtenidos en gran variedad de compuestos, particularmente moléculas orgánicas [32].

1.8.6. FUNCIONES DE BASE

El conjunto de bases es una descripción matemática de los orbitales de un sistema, que se usa para aproximar cálculos teóricos y modelaciones [34]. Bases más grandes pueden incrementar drásticamente el costo computacional de un cálculo, y ocasionalmente, introducir nuevos desafíos numéricos. La base más grande siempre es la más lenta, pero a la vez, más precisa, aumentando el costo computacional de cálculos de energía, optimización, etc.

1.8.7. ENERGÍA SINGLE POINT

Es una predicción de la energía y propiedades relacionadas de una molécula con una estructura geométrica específica. El cálculo se lo realiza en un solo punto de la superficie de energía potencial de la molécula. Este cálculo se realiza para obtener información de la molécula, así como para conocer la geometría molecular [35].

1.8.8. OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA

Consiste en la modificación sistemática de las coordenadas atómicas de un modelo, dando como resultado una geometría donde las fuerzas netas en la estructura son iguales a cero. En una disposición 3D de los átomos, representa un mínimo de energía local (se encontrará una geometría molecular estable sin necesidad de cruzar una barrera de energía conformacional) [35].

1.8.9. FRECUENCIAS VIBRACIONALES

Se utiliza para predecir el espectro IR y Raman de una molécula. Las frecuencias vibracionales dependen de la segunda derivada de la energía con respecto a la posición nuclear. Así, se pueden obtener espectros tanto de moléculas en estado basal, como de estados de transición. Además, se puede predecir la dirección y magnitud del desplazamiento nuclear que ocurre cuando el sistema absorbe un cuanto de energía [35].

1.8.10. APLICACIONES

El propósito de la química computacional es la determinación de propiedades químicas de interés, así como el desarrollo de compuestos novedosos y el mejoramiento de procesos de síntesis. La química computacional elimina en gran medida costos de experimentación y tiempo [34]. Con modelos computacionales, se puede modelar un sistema molecular antes de sintetizar una molécula en el laboratorio; y, aunque no son perfectos, son bastante buenos para descartar 90% de posibles compuestos que son inadecuados para su uso. Esto es bastante útil ya que la síntesis de un solo compuesto puede tomar meses, mucha materia prima y generar desechos tóxicos [32]. Las técnicas de modelamiento molecular son ampliamente usadas en industrias químicas, farmacéuticas y agroquímicas. En ningún caso, la aplicación de la química computacional sustituye la experimentación en el laboratorio, sino que sirven como una herramienta versátil para estudiar el funcionamiento de la materia.

Existe un interés comercial muy grande en predecir la actividad de un compuesto en un sistema biológico. Esto incluye tanto propiedades deseables como actividad, así como propiedades indeseables como toxicidad [32].

1.9. DISEÑO DE FÁRMACOS

1.9.1. PRIMEROS PASOS

En la antigüedad, los nuevos fármacos eran encontrados por experimentación y al cometer errores [36]. El descubrimiento de nuevos fármacos era un proceso muy costoso y que consumía gran cantidad de tiempo. Se estima que el tiempo promedio para poner un medicamento en el mercado era de 12 a 15 años con un costo aproximado de 600-800 millones de dólares.

De cada 10000 compuestos que se evaluaban en ensayo a animales, 10 pasarían a ser parte en pruebas en humanos para obtener 1 compuesto en el mercado. Tomó 16 años para que el ibuprofeno pase de ser solo una idea a estar disponible en mercados [37].

1.9.2. NUEVOS MÉTODOS

El diseño racional de medicamentos es el proceso de encontrar nuevos medicamentos basado en el conocimiento del objetivo biológico [38]. Un fármaco es comúnmente una molécula orgánica pequeña que activa o inhibe el funcionamiento de una biomolécula, resultando en un beneficio terapéutico para el paciente. Utilizando una amplia gama de software y estructuras computarizadas de referencia, se puede determinar el tipo de moléculas que podrían bloquear cierto tipo de enzima. Estas moléculas pueden ser obtenidas de un banco de moléculas, o modeladas en la computadora y luego sintetizadas en laboratorio. Durante el proceso de desarrollo normal, aproximadamente el 40-60% de los compuestos son rechazados debido a sus propiedades ADMET (absorción correlativa, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) no favorables. La mayor parte de los esfuerzos en modelamiento molecular se los realiza en predecir las propiedades ADMET, ya que es una manera económica y de alto rendimiento de

evaluar estas propiedades antes de la síntesis y las pruebas biológicas. Tal enfoque puede reducir el trabajo experimental considerablemente. Predicciones ADMET pueden lograr el rechazo de un prototipo por su baja biodisponibilidad oral recién iniciado el proceso [39]. Este método de diseño de fármacos acorta el tiempo de invención de un medicamento y ahorra millones de dólares a las compañías, en comparación al desarrollo tradicional de fármacos. Hoy en día, toma menos de 8 años poner 3 medicamentos contra el VIH en el mercado, cuando normalmente tomaba el doble y a costos excesivos [40].

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.TOMA DE MUESTRA

En el mercado se puede encontrar ibuprofeno en diferentes presentaciones de un sin número de casas farmacéuticas. Para esta investigación, se obtuvo 6 muestras diferentes de ibuprofeno (Figura 2.1), adquiridas en farmacias Fybeca y Pharmacys de la ciudad de Quito.



Figura 2.1. Muestras de ibuprofeno

En la Tabla 2.1 se encuentra un listado de las muestras de ibuprofeno con su marca y la casa comercial fabricante.

Tabla 2.1 Listado de marcas y casas comerciales de las muestras de ibuprofeno

Muestra	Marca	Casa comercial
1	Buprex Fem	LIFE
2	Advil	Pfizer
3	Ibuprofeno	Genamérica
4	Provinex	LIFE
5	Buprex Suspensión	LIFE
6	Buprex Flash	LIFE

2.2. EXTRACCIÓN CON SOLVENTE

Extracción significa la transferencia de un soluto de una fase líquida a otra. El grado en el que los solutos, tanto inorgánicos como orgánicos, se distribuyen entre dos líquidos no miscibles difiere enormemente, y estas diferencias se han usado desde hace décadas para efectuar separaciones de especies químicas. Al mezclar una solución acuosa del analito con un disolvente orgánico inmiscible como el hexano o el cloroformo, se produce la transferencia del analito hacia la capa orgánica [41]. El éter dietílico, el benceno y otros hidrocarburos son solventes comunes menos densos que el agua, y forman una fase que se sitúa por encima de la fase acuosa. El cloroformo, diclorometano y tetracloruro de carbono son solventes comunes inmiscibles en el agua y más densos que ella [42].

El reparto de un soluto entre dos fases no miscibles es un fenómeno de equilibrio que se rige por la ley de distribución. Si se permite que el soluto A se distribuya por si misma entre el agua y la fase orgánica (ecuación 2.1), el equilibrio resultante se puede escribir como [41]



En esta investigación se usó una extracción líquido-líquido para poder separar el ibuprofeno de los excipientes. Se utilizó agua para la fase polar y hexano como solvente orgánico. El ibuprofeno, al ser soluble en solventes orgánicos, queda atrapado en la fase orgánica, mientras que, los excipientes se van a quedar en la fase acuosa. Al extraer la fase orgánica y evaporarla, se forman cristales puros de ibuprofeno.

2.2.1. EQUIPO

- ✓ Baño térmico GEMMYCO YCW-010E

2.2.2. MATERIALES

- ✓ Embudos de separación
- ✓ Mortero y pistilo
- ✓ Cápsulas de porcelana
- ✓ Jeringa

2.2.3. REACTIVOS

- ✓ n-hexano
- ✓ Agua destilada

2.2.4. PROCEDIMIENTO

- ✓ Moler de 2 a 4 pastillas de ibuprofeno y colocarlas en el embudo de separación. En el caso de los softgels, agregar el contenido de dos cápsulas. Para la suspensión, agregar 10 mL de suspensión en el embudo.
- ✓ Agregar 50 mL de agua destilada en el embudo y agitar.
- ✓ Realizar 2 extracciones con 15 mL de hexano.
- ✓ Extraer el hexano con una jeringa y colocarlo en la cápsula de porcelana.
- ✓ Colocar las cápsulas en un baño térmico a 55 °C y dejar evaporar todo el solvente.
- ✓ Recoger los cristales formados.

2.3. SÍNTESIS DE IBUPROFENO

La síntesis orgánica es la construcción planificada de moléculas orgánicas mediante reacciones químicas. Más de 10 millones de compuestos orgánicos han sido sintetizados a partir de compuestos más simples. La síntesis de compuestos es una de las partes más importantes de la química orgánica. La habilidad de planear una secuencia sintética viable demanda de conocimiento de la gran variedad de reacciones orgánicas [11]. Para la síntesis experimental del ibuprofeno, se realizó una acilación de Friedel-Crafts del isobutilbenceno. Luego, el producto obtenido, se redujo con borohidruro de sodio y se

halogenó con ácido clorhídrico concentrado. Una vez formado el cloruro, se procedió a la formación del reactivo de Grignard mediante la reacción con magnesio metálico. Finalmente, se trató este producto con dióxido de carbono y ácido clorhídrico concentrado para la formación del fármaco [43]. La reacción se muestra en la Figura 2.2.

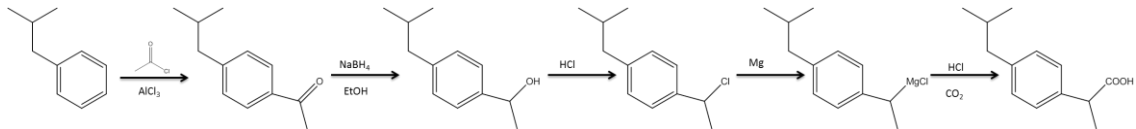


Figura 2.2. Síntesis experimental de ibuprofeno

2.3.1. EQUIPOS

- ✓ Equipo de reflujo micro y semi-micro (balón de base redonda, refrigerante, tubo en Y, embudo de separación)
- ✓ Rotavapor Yamato RE200
- ✓ Campana de extracción
- ✓ Reverbero
- ✓ Balanza Mettler Tolero AB204

2.3.2. MATERIALES

- | | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| ✓ Pipeta serológica de 10 mL | ✓ Núcleos de ebullición |
| ✓ Probetas de 50 y 100 mL | ✓ Embudos de separación |
| ✓ Espátula de metal | ✓ Balón base redonda para rotavapor |
| ✓ Agitador magnético | ✓ Juego de vasos de precipitación |

✓ Tubos de secado

✓ Mangueras

✓ Tapón de caucho

✓ Balones aforados de 50 y 100 mL

2.3.3. REACTIVOS

✓ Isobutilbenceno

✓ Diclorometano

✓ Cloruro de aluminio

✓ Anhídrido acético

✓ Hielo

✓ Ácido clorhídrico

✓ Agua destilada

✓ Hidróxido de sodio

✓ Cloruro de sodio

✓ Sulfato de sodio anhidro

✓ Etanol

✓ Borohidruro de sodio

✓ Éter etílico

✓ Virutas de magnesio

✓ Tetrahidrofurano

✓ Yodo sublimado

✓ Dióxido de carbono

✓ Éter de petróleo

2.3.4. PROCEDIMIENTO

➤ PARTE 1

- Armar el equipo de reflujo como muestra la Figura 2.3.

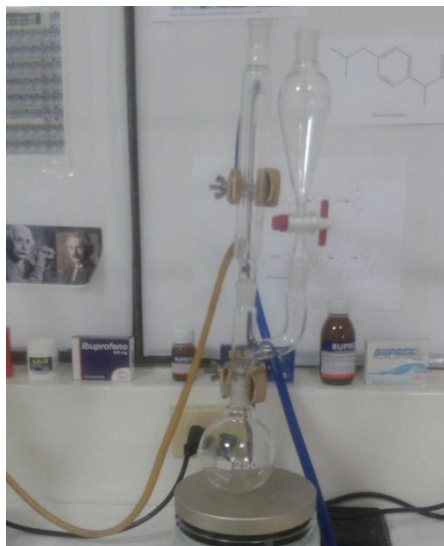


Figura 2.3. Equipo de reflujo

- Agregar 10 mL de Isobutilbenceno y 30 mL de diclorometano en el balón.
- Pesar 9,35 g de cloruro de aluminio anhidro y colocarlo en el balón.
- Colocar un agitador magnético y un núcleo de ebullición.
- Añadir 7 mL de anhídrido acético en el embudo de adición.
- Comenzar la agitación y abrir la llave de agua del refrigerante.
- Agregar lentamente el anhídrido acético para mantener un reflujo constante evitando que la reacción, la cual es agresiva y exotérmica, se vuelva muy vigorosa.
- Después de adicionar todo el anhídrido acético, calentar la solución por 30 minutos. Mantener un goteo constante del reflujo de 1 gota cada dos segundos.
- Trasvasar la solución caliente a un vaso que contenga 30 mL de hielo y 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Agitar y transferir a un embudo de separación.
- Si las fases están emulsionadas agregar una pequeña cantidad de agua destilada.

- Lavar la fase orgánica con 20 mL de ácido clorhídrico 6 M.
- Separar las fases y lavar la fase orgánica con 3 porciones de 15 mL de hidróxido de sodio 6 M.
- Finalmente lavar con 20 mL de una solución saturada de cloruro de sodio.
- Secar la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro.
- Transferir a un balón redondo previamente tarado y remover el diclorometano en un rotavapor.
- Obtener el peso del producto obtenido.

➤ PARTE 2

- Disolver 1 mL de *p*-isobutilacetofenona (producto obtenido de la parte 1) en 3 mL de etanol (colocarlos en un embudo de separación).
- Pesar 0,25 g de borohidruro de sodio y agregarlo rápidamente al embudo de separación (dejar reposar por 10 minutos).
- Trabajando en una campana de extracción, agregar 10 mL de ácido clorhídrico 10%.
- Extraer el producto de la mezcla usando 3 lavados de 5 mL de éter de petróleo.
- Remover el solvente en el rotavapor usando un balón de base redonda de 50 mL previamente tarado.
- En una campana de extracción y usando una pipeta, transferir el 1-(4-isobutilfenil) etanol obtenido a un embudo de separación.
- Usar 2 lavados de 5 mL de ácido clorhídrico 12M para ayudar a transferir lo que pueda quedar en la pipeta y el balón.
- Agitar por dos minutos.

- Extraer el producto con 3 lavados de 5 mL de éter de petróleo y secarlo con sulfato de sodio anhidro.
- Remover el solvente por rotaevaporación en un balón previamente pesado.
- Obtener el peso del producto.

➤ PARTE 3

- En un balón de 250 mL secado en estufa, agregar 2 g de magnesio, 1 mL de 1-cloro-1-(4-isobutilfenil) etano (obtenido de la parte 2), 40 mL de Tetahidrofurano, y un cristal de yodo.
- Armar el equipo de reflujo con tubo de secado.
- Comenzar a calentar bajo reflujo.
- Continuar el reflujo por media hora (30 minutos).
- Enfriar la mezcla en un baño de agua.
- Trabajando en una campana de extracción, burbujear alrededor de un litro de dióxido de carbono en la mezcla.
- Decantar la solución en un embudo de separación.
- Usar 5 mL de éter etílico para lavar el interior del balón, luego decantar en el embudo.
- Agregar 30 mL de ácido clorhídrico 10% y mezclar.
- Remover la fase orgánica y colocarla a un lado.
- Extraer la fase acuosa con 2 lavados de 20 mL de éter etílico.
- Combinar la fase orgánica y extraerla con 2 lavados de 15 mL de hidróxido de sodio 5%.

- Acidificar la fase acuosa con 20 mL de ácido clorhídrico 10%. Usar papel indicador para asegurarse que esté ácido.
- Extraer el ibuprofeno de la fase acuosa con 2 lavados de 20 mL de éter etílico y secarlo con sulfato de sodio y sulfato de cobre.
- Remover el solvente en el rotavapor usando un balón previamente tarado.
- Pesar el balón para determinar el rendimiento.

2.4. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

Cuando una radiación continua pasa por un material transparente, una porción de la radiación puede ser absorbida. Si esto ocurre, la radiación residual, cuando pasa por un prisma, muestra un espectro con brechas en ella, llamado espectro de absorción. Como resultado de la energía absorbida, átomos y moléculas pasan de un estado de menor energía (estado basal) a un estado de mayor energía (estado excitado). Utilizando una radiación monocromática sobre una muestra, se pueden realizar análisis cualitativos y cuantitativos de compuestos químicos [44].

Las bandas de absorción en el ultravioleta, infrarrojo y visible resultan de la absorción de radiación electromagnética por electrones o enlaces específicos. La energía a la cual absorben así como la intensidad que absorben está determinada por el ambiente químico de la molécula [45].

2.4.1. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA/VISIBLE (UV/VIS)

La absorción de radiación por moléculas orgánicas en la región de longitud de onda entre 180 y 780nm resulta de la interacción de los fotones y electrones que participan de manera directa en la formación de enlaces. Así, en el caso de la espectroscopia UV/VIS, la transición que se da son entre niveles electrónicos. Cuando una molécula absorbe energía, un electrón es excitado y pasa de un orbital ocupado a uno no ocupado de mayor energía potencial [46].

La longitud de onda que absorbe una molécula orgánica depende de la fuerza de los enlaces. Los enlaces compartidos en los enlaces simples carbono-carbono o carbono-hidrógeno están sujetos con tal firmeza, que su excitación requiere energías que corresponden a la longitud de onda de la región ultravioleta de vacío (inferior a 180 nm). Los electrones de enlace doble y triple de moléculas orgánicas se sujetan con menor fuerza y por tanto, se excitan mediante radiación con más facilidad [41].

La Figura 2.4 muestra el espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 usado en esta investigación.



Figura 2. 4. Espectrofotómetro Ultravioleta/Visible Agilent Technologies Cary 60

Entre las ventajas de la técnica se encuentran: la sensibilidad, con límites de detección de 10^{-4} y 10^{-5} M; selectividad, ya que se puede identificar longitudes de onda únicas para un analito determinado [41]; y aplicabilidad, ya que gran cantidad de especies químicas absorben en esta región.

2.4.1.1. EQUIPO

- ✓ Espectrofotómetro UV/VIS Agilent Technologies Cary 60

2.4.1.2. MATERIALES

- ✓ Celda de cuarzo
- ✓ Vasos de precipitación
- ✓ Balones aforados de 100 mL

2.4.1.3. REACTIVOS

- ✓ Hidróxido de sodio 0,1 N
- ✓ Estándar de ibuprofeno
- ✓ Muestras de ibuprofeno obtenidas de la extracción
- ✓ Muestra de ibuprofeno obtenido de la reacción de síntesis
- ✓ Isobutilbenceno
- ✓ Producto obtenido de la parte 1 de la síntesis de ibuprofeno (*p*-isobutilacetofenona)

2.4.1.4. PROCEDIMIENTO

- ✓ Hacer soluciones de aproximadamente 250 µg/mL de ibuprofeno en hidróxido de sodio 0,1 N.
- ✓ Diluir 1 mL de isobutilbenceno en 50 mL de etanol.
- ✓ Diluir 1 mL del *p*-isobutilacetofenona (obtenido de la parte 1) en 50 mL de etanol.
- ✓ Colocar las soluciones del analito en las celdas de cuarzo.
- ✓ Determinar los espectros de absorción de las muestras en el equipo utilizando el modo scan (de 200 a 700 nm).

2.4.2. ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJOS (IR)

Casi todos los compuestos que tengan enlaces covalentes absorben varias frecuencias de radiación electromagnética en la región del infrarrojo. Para propósitos químicos, estamos interesados en la porción vibracional de la región infrarroja llamada infrarrojo medio o fundamental. Esto incluye longitudes de onda entre 2,5 µm hasta 25 µm. La radiación de esta

energía corresponde al rango de frecuencias que causan estiramientos y doblamientos vibracionales de los enlaces covalentes de las moléculas. La energía absorbida aumenta la amplitud del movimiento vibracional de los enlaces de la molécula [46]. La energía de vibración depende de los átomos que intervienen en el enlace, tipo de enlace y la molécula en sí.

La espectroscopia IR se usa principalmente para identificar compuestos y determinar su información estructural [46]. El espectro de la absorción IR es la prueba más concluyente de identidad que puede ser obtenida de una sola prueba [47]. Esto se debe a que dos moléculas de diferentes estructuras no pueden tener el mismo patrón de absorción. Enlaces simétricos no absorben radiación infrarroja [48].

Los primeros equipos IR fueron equipos de dispersión, similares al espectrofotómetro UV/VIS. Los equipos de dispersión fueron sustituidos rápidamente por los espectrofotómetros de transformadas de Fourier (FTIR). Los FTIR ofrecen ventajas de sensibilidad, resolución y rapidez. Los FTIR no contienen elementos de dispersión, sino un interferómetro de Michelson. La señal se registra en forma de un interferograma (intensidad vs frecuencia). La decodificación del interferograma se realiza utilizando una transformada de Fourier [41], produciendo un espectro idéntico al que se obtendría con un espectrómetro de dispersión. La Figura 2.5 muestra el FTIR Perkin Elmer BX usado en esta investigación.



**Figura 2.5. Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformadas de Fourier Perkin Elmer
BX**

2.4.2.1.EQUIPOS

- ✓ Espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer BX
- ✓ Accesorio de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) MIRacle™

2.4.2.2. MATERIALES

- ✓ Espátula
- ✓ Papel absorbente

2.4.2.3.REACTIVOS

- ✓ Acetona
- ✓ Estándar de ibuprofeno

- ✓ Muestras de ibuprofeno obtenido de la extracción
- ✓ Muestra de ibuprofeno obtenida de la reacción de síntesis
- ✓ Isobutilbenceno
- ✓ Producto obtenido de la parte 1 de la síntesis de ibuprofeno (*p*-isobutilacetofenona)
- ✓ Productos obtenidos de la parte 2 de la síntesis de ibuprofeno (1-(4-isobutilfenil) etanol y 1-cloro-1-(4-isobutilfenil) etano.

2.4.2.4. PROCEDIMIENTO

- ✓ Limpiar el ATR con acetona y papel absorbente.
- ✓ Colocar en el ATR una mínima cantidad de muestra, sea sólida o líquida, con una espátula.
- ✓ Cerrar el ATR.
- ✓ Obtener el espectro IR en el espectrofotómetro.
- ✓ Abrir el ATR y limpiarlo con acetona y papel absorbente.
- ✓ Repetir el procedimiento para todas las muestras.

2.4.3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La espectroscopia RMN se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 900 MHz. En contraste con la absorción ultravioleta, visible e infrarroja, en el proceso de absorción están implicados núcleos de los átomos en vez de los electrones exteriores [49]. La espectroscopia RMN es la prueba energéticamente más baja para examinar la estructura de las moléculas.

La espectroscopia RMN es una de las principales técnicas empleadas para obtener información física, química, electrónica y estructural sobre moléculas. Es una poderosa serie de metodologías que proveen información sobre la topología, dinámica y estructura tridimensional de moléculas en solución y en estado sólido. La RMN da información sobre el número de átomos magnéticamente distintos de la muestra estudiada. Se puede determinar el número de cada uno de los distintos tipos de núcleos de hidrógeno así como obtener información sobre la naturaleza del ambiente químico de cada tipo [49].

2.4.3.1. PRINCIPIO

Muchos núcleos atómicos tienen una propiedad llamada spin. El núcleo se comporta como si estuviera girando. De hecho, cualquier núcleo atómico que tenga, ya sea masa impar, número atómico impar, o las dos, posee un momento angular cuantizado de spin y un momento magnético [46]. En la Tabla 2.2 se muestran los principales núcleos que poseen esta propiedad.

Tabla 2.2. Números cuánticos de núcleos comunes

<i>Elemento</i>	${}^1_1\text{H}$	${}^2_1\text{H}$	${}^{12}_6\text{C}$	${}^{13}_6\text{C}$	${}^{14}_7\text{N}$	${}^{16}_8\text{O}$	${}^{17}_8\text{O}$	${}^{19}_9\text{F}$	${}^{31}_{15}\text{P}$	${}^{35}_{17}\text{Cl}$
<i>Spin nuclear o número cuántico</i>	1/2	1	0	1/2	1	0	5/2	1/2	1/2	3/2
<i>Número de estados de spin</i>	2	3	0	2	3	0	6	2	2	4

En la ausencia de un campo magnético, todos los estados de spin de un núcleo determinado son de igual energía, y en una colección de átomos, todos los estados de spin deben estar igual de poblados, con el mismo número de átomos teniendo cada uno de los estados permitidos de spin [46].

Cuando se aplica un campo magnético (B_0), los estados de spin no son energéticamente equivalentes, ya que el núcleo es una partícula cargada, y de cualquier carga en movimiento, va a generar un campo magnético por sí solo. Por consiguiente, el núcleo tiene un momento magnético, μ , generado por su carga y spin. Un núcleo de hidrógeno tiene un spin hacia la derecha ($+1/2$) y hacia la izquierda ($-1/2$) y el momento magnético nuclear (μ) en los dos casos es el mismo, pero apuntando en direcciones opuestas. Cuando se aplica un campo magnético, todos los protones tienen su propio momento magnético que está, o alineado con el campo u opuesto al mismo. El estado de spin $1/2$ es menor en energía porque está alineado al campo mientras que $-1/2$ es de alta energía ya que está opuesto al campo [46]. La diferencia de energía entre los dos estados de spin depende de la fuerza del campo magnético externo (B_x), del momento magnético nuclear (μ) y del spin (I) como se observa en la Figura 2.6.

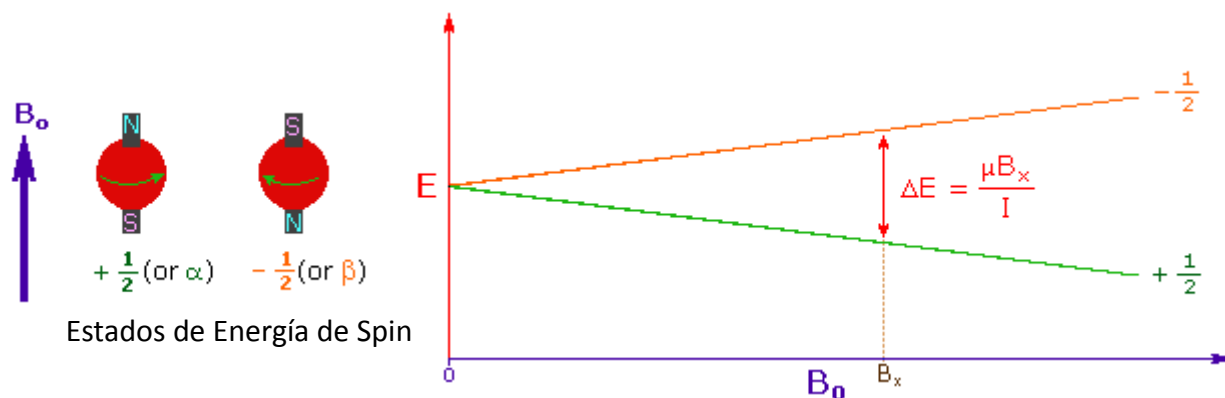


Figura 2.6. Energía de los estados de spin al aplicar un campo magnético [46]

El fenómeno de resonancia magnética nuclear ocurre cuando un núcleo alineado con el campo magnético aplicado es inducido a absorber energía y cambiar su orientación de spin con respecto al campo aplicado. Esto se da cuando la frecuencia del componente del campo eléctrico oscilante de la radiación entrante es igual a la frecuencia del campo eléctrico generado por el núcleo, los dos campos se emparejan y la energía puede ser transferida de la radiación entrante al núcleo, causando el cambio de spin. No todos los protones en una molécula tienen resonancia a la misma frecuencia, porque están rodeados de diferentes ambientes electrónicos [46].

2.4.3.2. TIPOS DE ESPECTROSCOPIA RMN

La resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) es la más usada y sensible. En primer lugar, porque el protón presenta el mayor núcleo magnético, y porque casi el 100% de la abundancia isotópica natural del hidrógeno es ^1H . El siguiente núcleo de RMN más medido es el de ^{13}C . No obstante es menos sensible y la abundancia natural de este isotopo es solo del

1,1%. Por estas razones, un buen espectro requiere muestras enriquecidas de ^{13}C , muestras más concentradas o bien tiempos de recogida de datos más largos. Sin embargo, su práctica es bastante útil [46].

2.4.3.3. DISOLVENTES

En RMN- ^1H se utiliza generalmente disolventes que no contienen hidrógeno (por ejemplo CCl_4) o disolventes deuterados (D_2O). Esto se debe a que la absorción de RMN de protón del disolvente podría superponerse a la de la muestra. La señal del disolvente se podría suprimir pero se perdería información [50].

2.4.3.4. DETERMINACIÓN

Los espectros de energías de radiofrecuencia se miden y se representan como picos estrechos que surgen de la línea base. La frecuencia a la que tiene lugar la absorción de energía en un experimento de RMN depende de dos factores:

- 1) La identidad del núcleo
- 2) La fuerza del campo magnético

La relación se escribe algebraicamente como:

$$V_{\text{resonancia}} = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot H \quad (2.2)$$

En la ecuación 2.2 $V_{\text{resonancia}}$ es la frecuencia de resonancia y H es la fuerza del campo magnético en el núcleo, γ es una constante cuyo valor depende de la identidad del núcleo. Se denomina relación giromagnética [50]. La Tabla 2.3 muestra la información de los núcleos más usados en RMN.

Tabla 2.3. Núcleos más estudiados en Resonancia Magnética Nuclear

<i>Isótopo</i>	<i>% Abundancia Natural</i>	<i>Spin (I)</i>	<i>Momento magnético (μ)</i>	<i>Relación giromagnética (γ)</i>
^1H	99.9844	1/2	2.7927	26.753
^2H	0.0156	1	0.8574	4,107
^{11}B	81.17	3/2	2.6880	--
^{13}C	1.108	1/2	0.7022	6,728
^{17}O	0.037	5/2	-1.8930	-3,628
^{19}F	100.0	1/2	2.6273	25,179
^{29}Si	4.700	1/2	-0.5555	-5,319
^{31}P	100.0	1/2	1.1305	10,840

A diferencia de la espectroscopia infrarroja y UV-VIS, donde los picos de absorción están localizados únicamente por una frecuencia o longitud de onda, la localización de los diferentes signos resonantes dependen tanto del campo magnético externo, como de la frecuencia. Ya que dos magnetos nunca van a tener exactamente el mismo campo, las frecuencias de resonancia van a variar. Para solucionar este problema se usa un material de referencia como el Tetra Metil Silano (TMS). El TMS fue escogido inicialmente porque los protones de su grupo metilo son más protegidos que los de la mayoría de compuestos conocidos [46], y

porque la frecuencia de resonancia que da la señal de su único protón proveniente de los cuatro grupos metilos idénticos, es menor que la mayoría de los compuestos [15].

Para una frecuencia fija, el campo en resonancia varía en función del entorno químico del núcleo. Este efecto se llama desplazamiento químico [50]. El desplazamiento químico en unidades δ expresa la cantidad en la cual la resonancia del protón se desplaza del TMS, en ppm, de la frecuencia de operación del espectrómetro. En la Figura 2.7 se muestra el desplazamiento químico de varios protones de moléculas diferentes utilizando campos magnéticos (B_0) distintos.

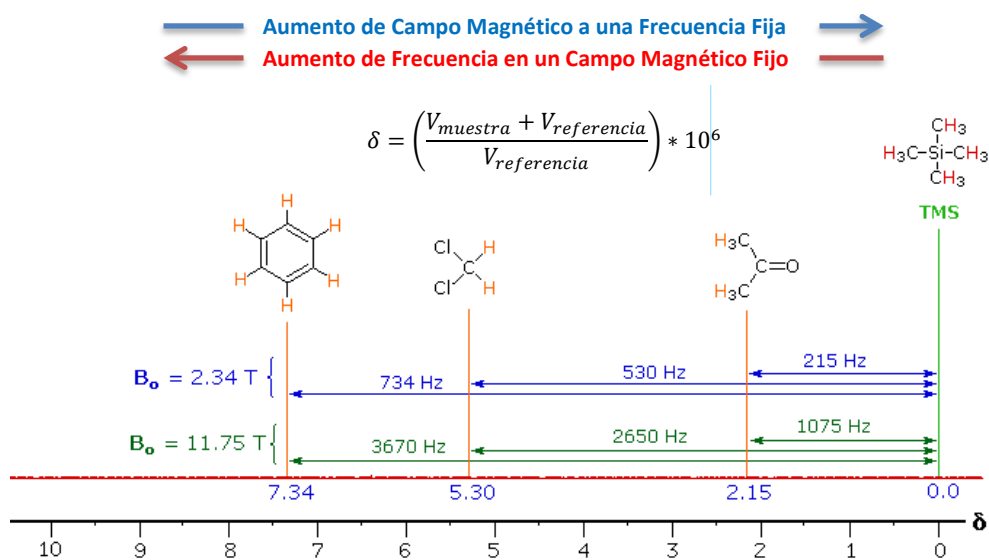


Figura 2.7. Desplazamiento químico de varios protones [50]

En este estudio, el análisis de RMN será solo teórico ya que no se cuenta con un equipo de RMN en la universidad. Los espectros obtenidos teóricamente serán comparados con espectros experimentales obtenidos de la bibliografía consultada. El procedimiento de obtención de los espectros teóricos se encuentra en la sección 2.5.4.

2.5. ESTUDIO COMPUTACIONAL

El estudio computacional del ibuprofeno comprende dos fases. En la primera fase se desarrolla un estudio termodinámico y espectroscópico tanto de la reacción experimental (Figura 2.2) como de la reacción BHC que se muestra en la Figura 2.8. Aquí, se obtienen las estructuras optimizadas, energías y los espectros infrarrojo y UV-VIS de ambos isómeros del ibuprofeno y de todos los compuestos precursores de cada reacción. Esta primera fase se lleva a cabo con la ayuda de los softwares Gauss View 4.1.2 y Gaussian 03 [51].

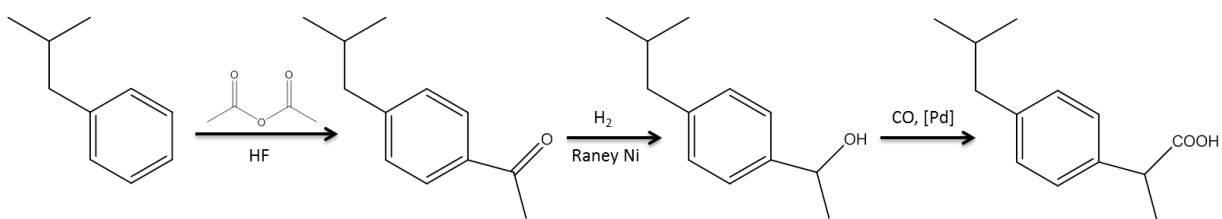


Figura 2.8. Síntesis BHC de ibuprofeno

La segunda fase comprende modelar computacionalmente la interacción del ibuprofeno con los sitios activos de las enzimas COX-1, COX- 2 y Citocromo P450 2C9 por medio de

métodos de acoplamiento molecular. Esta fase se desarrolla con la ayuda de los software Autodock 4 y Autodock VINA [52].

2.5.1. GAUSSIAN 03

Gaussian 03 es la versión 2004 de la serie de programas de estructuras electrónicas Gaussian. Es un software usado por químicos, bioquímicos, físicos, y otros científicos en el mundo. Basándose en las leyes fundamentales de la mecánica cuántica, Gaussian 03 puede predecir energías, estructuras moleculares, frecuencias vibracionales y propiedades moleculares de moléculas y reacciones en una variedad de ambientes químicos. Sus modelos se aplican a especies estables y compuestos difíciles de observar experimentalmente (estados de transición, intermedios y de vidas cortas) [51].

2.5.2. AUTODOCK

Autodock está diseñado como una herramienta de acoplamiento molecular. En el acoplamiento molecular, se trata de predecir la estructura o estructuras de los complejos intermoleculares formados entre dos o más moléculas. Docking, como también se lo llama, es ampliamente usado para sugerir enlaces e inhibir proteínas [27]. Así, con este software, se pueden predecir cómo moléculas pequeñas, cómo sustratos y candidatos de fármacos, se unen a estructuras tridimensionales conocidas. AutoDock puede ser aplicado en diseños de fármacos, optimización de compuestos líder, estudios en mecanismos químicos, cristalografía de rayos X, entre otros. El software AutoDock consiste en 2 generaciones de programas para computadora: AutoDock 4 y AutoDock Vina [52].

2.5.3. OTROS

Otros software son necesarios para poder completar el estudio computacional en este trabajo. Entre estos programas se encuentran básicamente programas de visualización. Con estos software computacionales, se puede visualizar la estructura tridimensional de las enzimas, se logra determinar los sitios activos, cómo se acopla el medicamento a ellos, espectros IR UV/VIS y RMN, mecanismos de reacción, entre otros. La Tabla 2.4 muestra cuales son y sus principales características.

Tabla 2.4. Softwares computacionales

<i>Software</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Función</i>
ChemOffice	Cambridgesoft	Edición y Visualización de moléculas
Gauss View 4.1.2	Gaussian Inc.	Edición de moléculas, visualización de moléculas espectros y mecanismos de reacción.
Autodock Tools 1.5.4	The Scripps Research Institute	Visualizador de moléculas, interacciones y acoplamiento
Chimera 1.7	UCSF	Visualización interactiva, análisis molecular de estructuras.
PyMol	DeLano Scientific LLC	Editor gráfico y visualizador molecular 3D

2.5.4. PROCEDIMIENTO

➤ FASE 1

- Dibujar todas las estructuras que van a ser estudiadas utilizando el programa Gauss View 4.1.
- Optimizar las estructuras con método híbrido funcional derivado de la DFT: B3LYP, y la base 6-311G(d,p). Agregar el keyword `FREQ` para la obtención del espectro IR.
- Calcular la energía (single point) de las estructuras optimizadas con el método Hartree-Fock (HF) y el conjunto de bases 6-31G(d).
- Obtener los espectros de RMN usando el keyword `GIAO`, método B3LYP y el conjunto de base 6-311G (d,p): `# NMR=GIAO B3LYP/6-311g(d,p)`.
- Obtener los espectros UV usando el keyword `TD`, método B3LYP y el conjunto de base 6-311G (d,p): `# TD B3LYP/6-311g(d,p)`.

➤ FASE 2

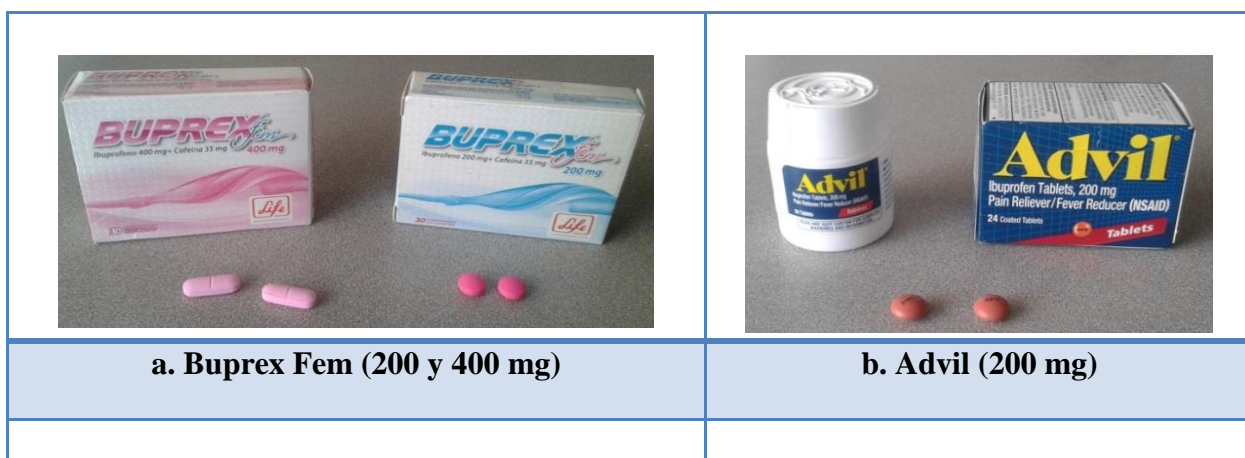
- Obtener las enzimas de un banco de datos de proteínas en formato PDB.
- Utilizando Chimera 1.7, determinar todos los residuos que no pertenecen a la proteína.
- Abrir Autodock Tools, escoger la enzima como macromolécula y limpiarla (agregar hidrógenos Polar only).
- Escoger como ligando al ibuprofeno.
- Establecer los parámetros del acoplamiento.
- Realizar el cálculo de acoplamiento molecular utilizando Autodock 4.
- Con los datos obtenidos en Autodock Tools, crear un input para Autodock VINA.
- Realizar el cálculo usando Autodock VINA.
- Visualizar los resultados utilizando PyMol.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE IBUPROFENO DE PRODUCTOS TERMINADOS

Se extrajo el ibuprofeno de 6 medicamentos diferentes (Figura 3.1). Para obtener una buena cantidad del fármaco, se trabajó con cantidades de ibuprofeno entre 500 mg a 1200 mg, por lo que, dependiendo de la concentración del fármaco en los distintos medicamentos, se molieron 2 pastillas, en el caso de la suspensión se colocó 10 mL.



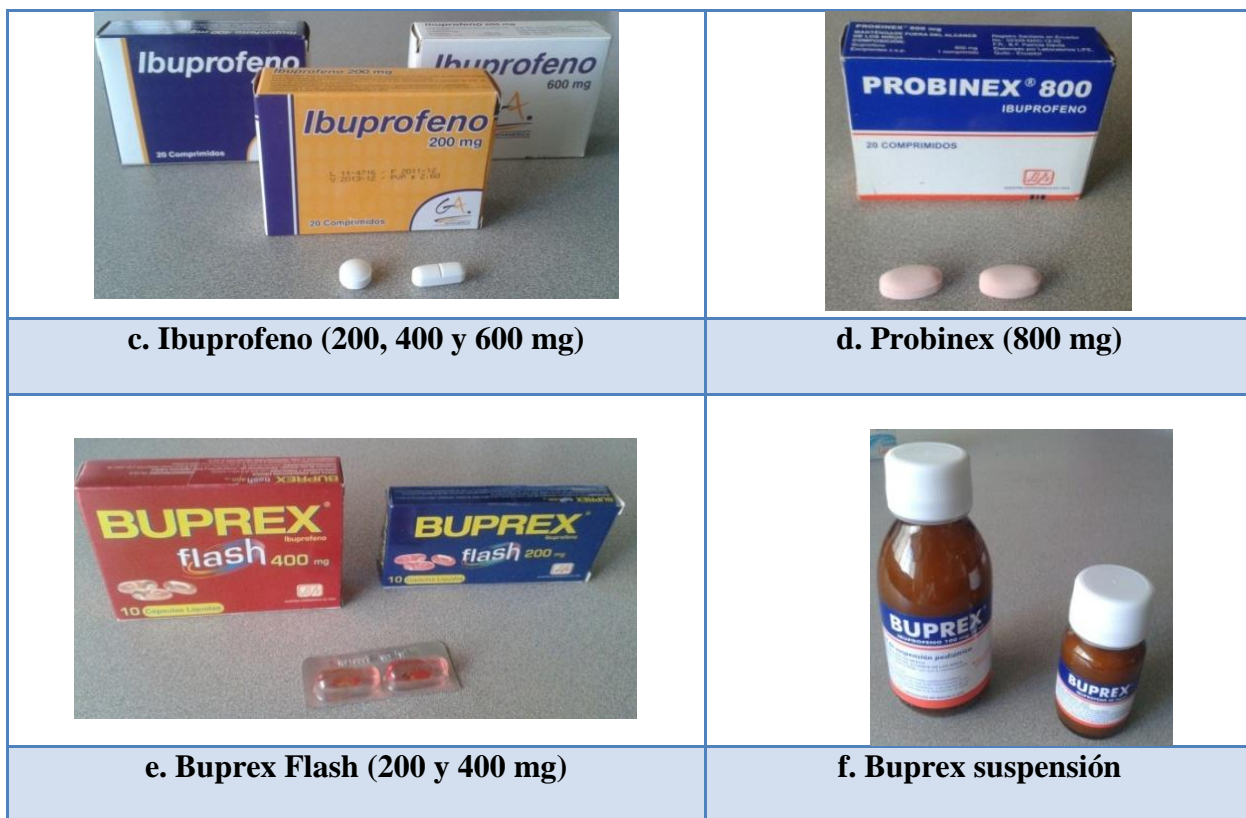


Figura 3.1. Muestras de ibuprofeno para la extracción

La extracción fue realizada utilizando como solvente polar el agua y como no polar el hexano. El hexano, al ser menos denso que el agua (0,6548 g/mL), va a formar la fase superior y el agua la inferior como se observa en la Figura 3.2. Esto hizo que la recolección de la fase orgánica sea más fácil, ya que por la cantidad de pastilla agregada, bastante sólido se decantó en el fondo. Se escogió hexano debido a la alta solubilidad del ibuprofeno en este solvente, a su punto de ebullición medio (68 °C a nivel del mar) y su baja toxicidad en comparación con otros solventes orgánicos.

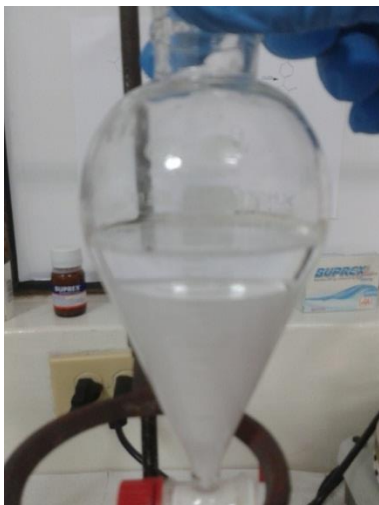


Figura 3.2. Formación de dos fases (hexano-agua)

La extracción del principio activo del Buprex Flash[®] y del Buprex Suspensión[®] tuvo problemas ya que se formó una sola fase emulsionada entre el agua, el hexano y el medicamento, cosa que no sucedió con las pastillas (Figura 3.3). La emulsión se produjo a causa de los ingredientes inactivos que se encuentran tanto en suspensiones como en las cápsulas blandas. Surfactantes son añadidos en suspensiones como agentes humectantes, los que disminuyen la tensión superficial y aumentan el contacto entre las partículas suspendidas y el vehículo líquido [53]. Estos surfactantes, más agentes dispersantes usados como la lecitina, causan que se forme una emulsión con el hexano. En el caso de las cápsulas blandas, estas poseen en su formulación polietilenglicoles, surfactantes no iónicos, aceites vegetales, entre otros, que al igual que en la suspensión, hacen que se forme una sola fase al añadir el solvente orgánico. Se extrajo el ibuprofeno en menor cantidad de la esperada, y con varias impurezas.



a. Formación de dos fases en la extracción del ibuprofeno de Buprex fem



b. Fases emulsionadas en la extracción de ibuprofeno del Buprex Suspensión

Figura 3.3. Extracción líquido-líquido de ibuprofeno

La extracción se realizó de una manera exitosa para todas las pastillas obteniéndose gran cantidad de cristales. El tamaño de los cristales es pequeño debido a la velocidad de evaporación del solvente. Los cristales presentan una forma acicular, la cual se debe a que fueron recristalizados utilizando hexano como solvente (Figura 3.4). Aunque la forma cristalina no afecta sus propiedades físicas y químicas, si influye sobre las propiedades mecánicas de los polvos farmacéuticos. Para obtener una mejor resistencia mecánica y mejor fluidez durante el tableteado, se utilizan cristales prismáticos de ibuprofeno obtenidos de su recristalización en etanol y metanol [54].

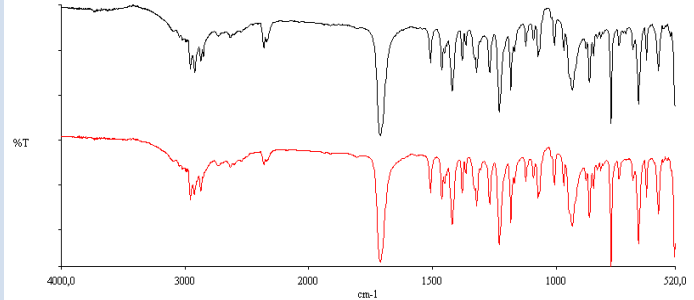
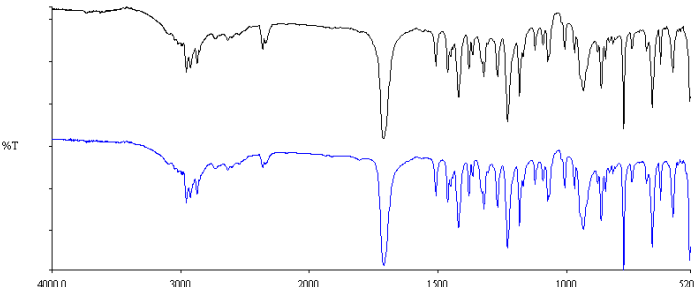
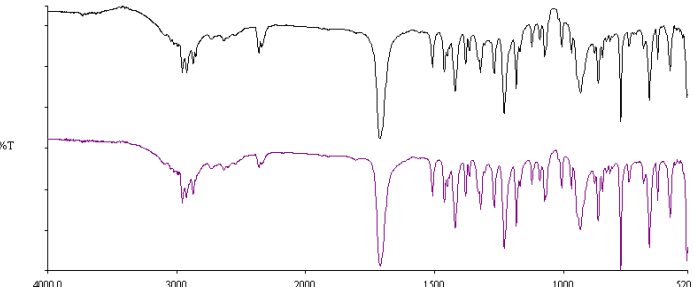
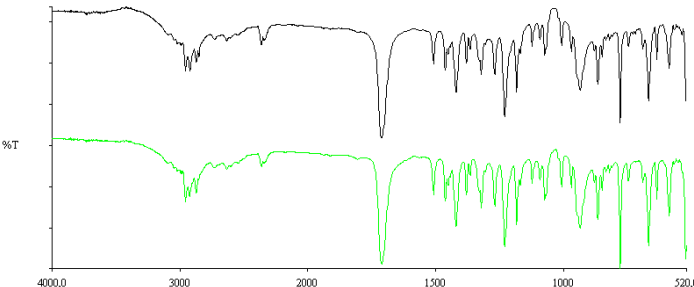


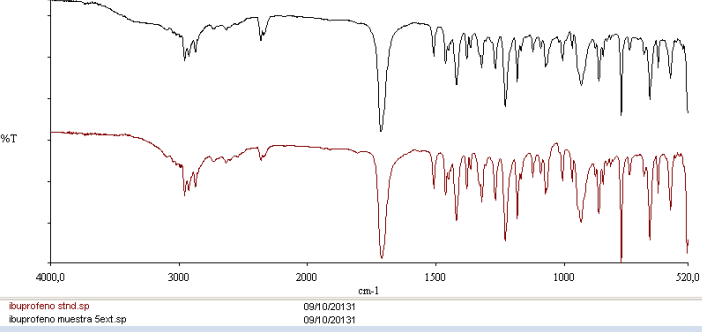
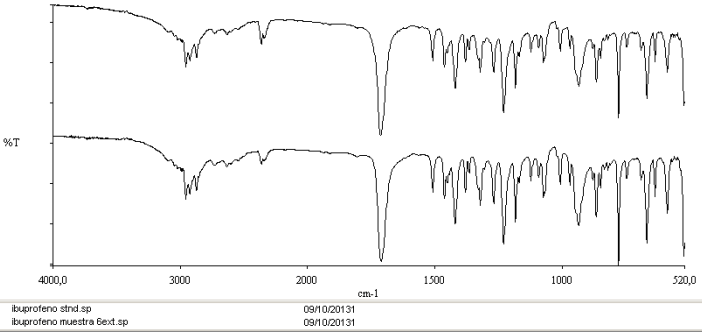
Figura 3. 4. Cristales de ibuprofeno obtenidos de la extracción

En la Tabla 3.1 se muestra los resultados obtenidos del análisis infrarrojo del ibuprofeno extraído de las pastillas. En los espectros comparativos, el espectro del estándar se encuentra en la parte superior y el de la muestra en la parte inferior.

Tabla 3.1. Análisis infrarrojo de la extracción

<i>Muestra</i>	<i>Correlación con estándar</i>	<i>Espectro</i>
Estándar Ibuprofeno	1,0000	

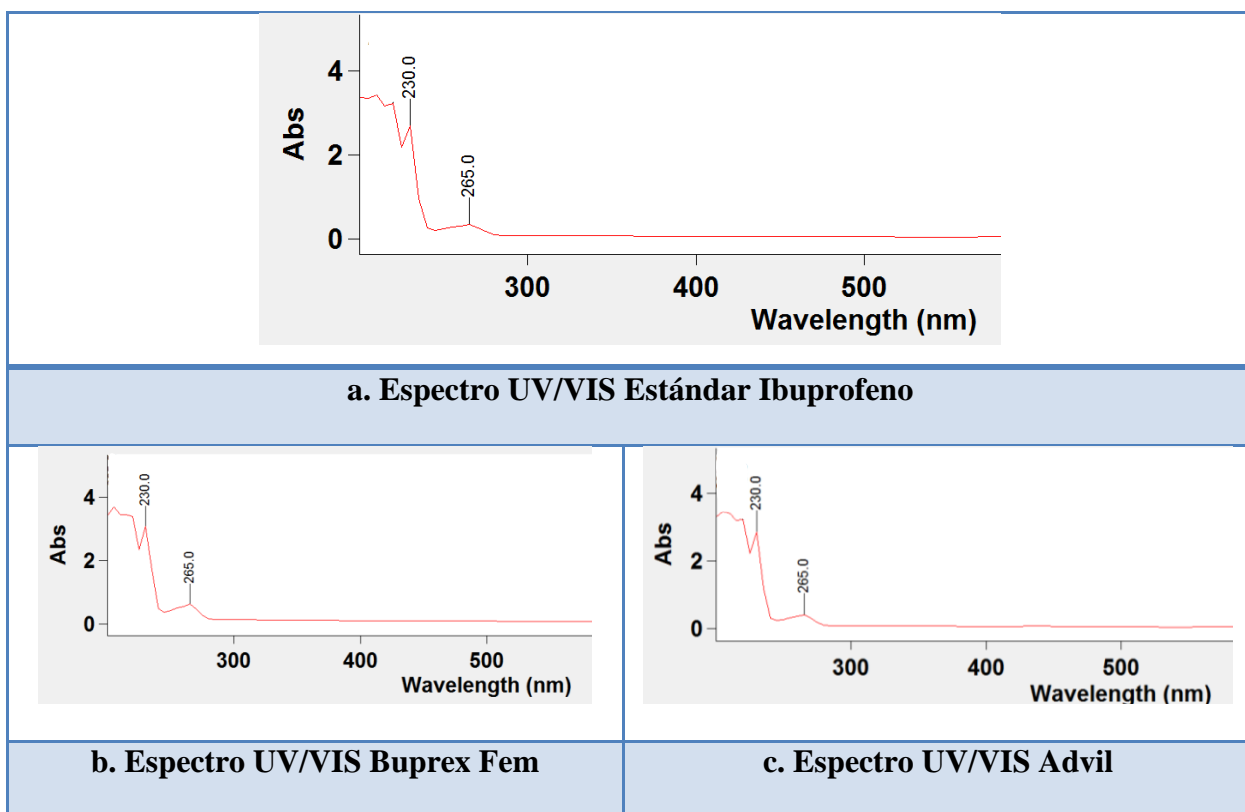
Buprex Fem	0,9913	 <p data-bbox="738 499 1409 531"> <i>ibuprofeno std.sp</i> 09/10/20131 <i>ibuprofeno muestra 1ext.sp</i> 09/10/20131 </p>
Advil	0,9955	 <p data-bbox="738 842 1409 873"> <i>ibuprofeno std.sp</i> 09/10/20131 <i>ibuprofeno muestra 2ext.sp</i> 09/10/20131 </p>
Ibuprofeno Genamérica	0,9901	 <p data-bbox="738 1199 1409 1230"> <i>ibuprofeno std.sp</i> 09/10/20131 <i>ibuprofeno muestra 3ext.sp</i> 09/10/20131 </p>
Provinex	0,9922	 <p data-bbox="738 1556 1409 1587"> <i>ibuprofeno std.sp</i> 09/10/20131 <i>ibuprofeno muestra 4ext.sp</i> 09/10/20131 </p>

Buprex suspensión	0,9836	
Buprex Flash	0,9891	

Las muestras fueron analizadas usando un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) MIRacle™ acoplado a un FTIR Perkin Elmer BX. La ventaja de usar este accesorio es que se analiza directamente el sólido o líquido de interés. La segunda ventaja es que la cantidad de muestra que se requiere para el análisis es mínima. La Farmacopea de los Estados Unidos (USP por sus siglas en inglés) permite el uso de un ATR para el análisis de ibuprofeno por espectroscopia de infrarrojos [55]. El equipo viene con el software Spectrum v5.0.1 el cual posee la capacidad de comparar dos o más espectros mostrando el índice de correlación entre ellos. Para determinar el índice de correlación, el equipo analiza la totalidad de las bandas producidas por cada espectro. En el análisis de materia prima en laboratorios de garantía de calidad de la industria farmacéutica, se acepta la materia prima cuando su espectro IR de identificación posee una similitud en comparación al estándar de mínimo 98%. Con esto se asegura que la materia prima sea el fármaco que dice ser y que sea puro. En la Tabla 3.1 se

observa que todos los espectros obtenidos poseen un coeficiente de correlación mayor al 98% por lo que queda comprobado que el principio activo en cada una de las muestras analizadas fue efectivamente ibuprofeno. En el Anexo 1 se pueden observar los espectros de cada muestra y su comparación con el estándar.

Otro método usado para la identificación de ibuprofeno es mediante la absorción ultravioleta. Utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Agilent Cary 60, se obtuvieron los espectros de las muestras de ibuprofeno solubilizadas en una solución 0,1 N de hidróxido de sodio (~250 µg/mL). Estos espectros fueron comparados con el estándar y los obtenidos computacionalmente. La Figura 3.5 muestra el análisis ultravioleta de las 6 muestras.



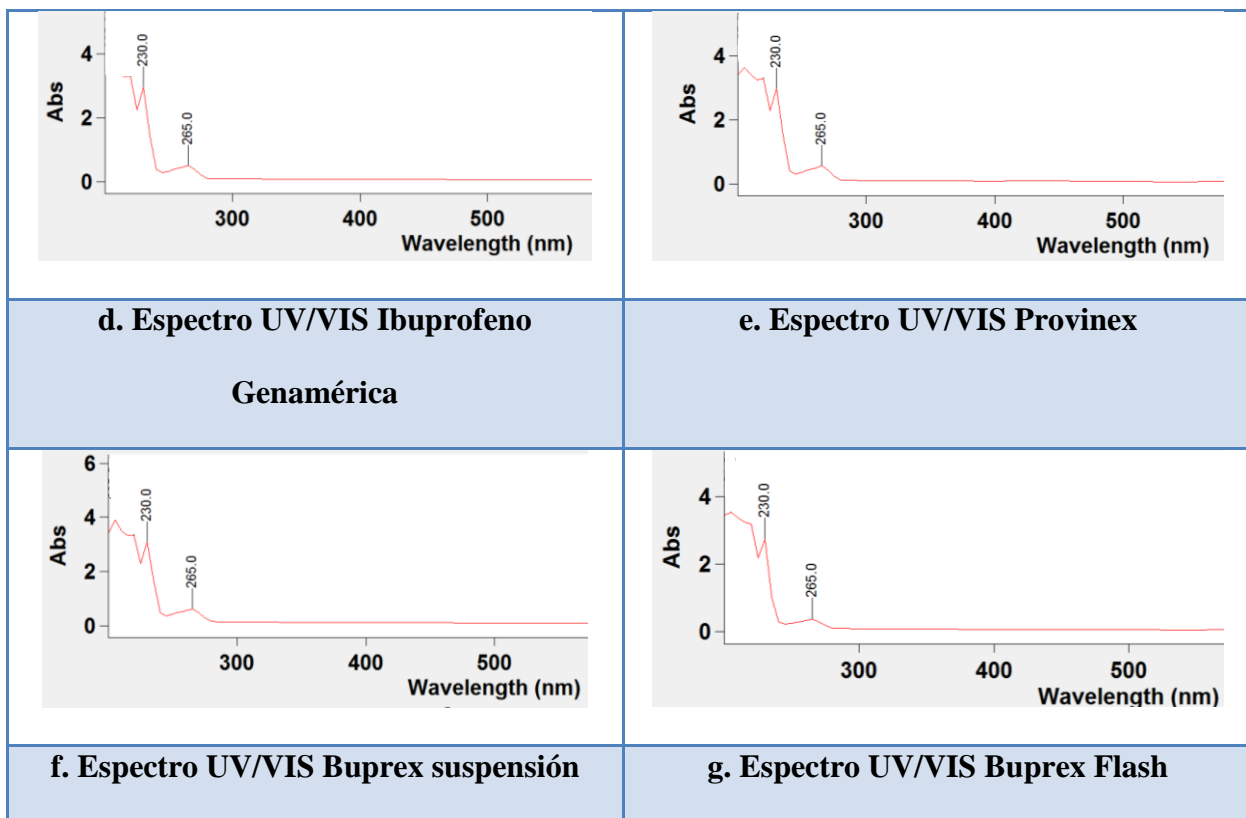


Figura 3.5. Análisis Ultravioleta/Visible de la extracción

Como se observa en la Figura 3.5, el espectro obtenido por el estándar es idéntico al obtenido con las 6 muestras teniendo una confirmación de que el compuesto es efectivamente ibuprofeno. En el espectro se identifican claramente dos picos, uno a 265 nm y el otro a 230 nm. En espectroscopia UV/VIS el anillo bencénico posee dos bandas de absorción, una a 203 nm y otra a 254 nm. Estas bandas se desplazan dependiendo del número, posición y tipo de sustituyente que tenga el anillo bencénico en la molécula. Así, debido al sustituyente ácido y al radical isobutilo en la posición *orto*, las bandas de absorción aparecen a 265 nm y 230 nm. Existen otros métodos para la identificación de ibuprofeno los cuales comprenden cromatografía líquida de alta eficiencia, punto de fusión y cromatografía de capa fina [56].

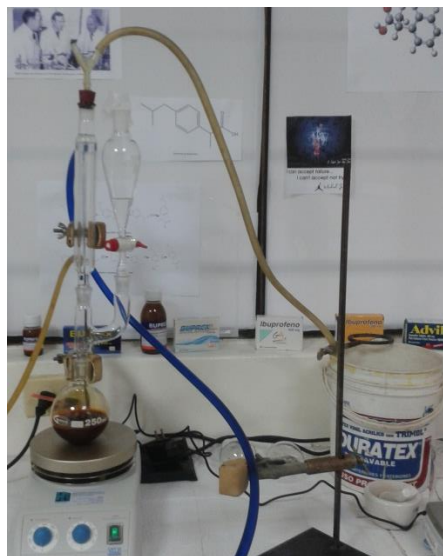
3.2. SÍNTESIS DE IBUPROFENO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

La síntesis BHC es la que se usa actualmente en las grandes compañías para la fabricación de ibuprofeno a nivel industrial. En este proyecto, no se pudo realizar experimentalmente esta síntesis debido al alto costo tecnológico y la peligrosidad de los reactivos que intervienen en las reacciones. Por eso, para sintetizar ibuprofeno, se optó por la síntesis que se muestra en la Figura 2.2. La reacción debió ser realizada tomando en cuenta todas las reglas de seguridad en el laboratorio: utilizar mandil, guantes, lentes de protección y zapatos cerrados en todo momento; Evitar la inhalación, ingestión o contacto alguno con los compuestos usados en esta reacción. Revisar las hojas de seguridad (MSDS por sus siglas en inglés) antes de utilizar cualquiera de los reactivos.

En la primera parte de la reacción, la acetilación del isobutilbenceno, aunque teóricamente no debería existir desprendimiento de HCl al ambiente, ésta se da debido a la reacción del cloruro de aluminio anhidro con la humedad del ambiente y con el medio de la reacción. Esto, además de causar vapores ácidos, baja el rendimiento de la reacción, ya que se reduce la cantidad de catalizador. Para que el ácido no afecte a las personas en el laboratorio, se planteó dos soluciones las cuales se muestran en la Figuras 3.6. La primera opción es usar una campana de extracción. La segunda opción es colocar un tapón conectado a una manguera, a un recipiente de agua para que todo HCl se disuelva en el agua. En un proceso industrial la segunda solución sería la adecuada debido a que de esta forma se obtiene ácido clorhídrico el cual puede ser comercializado obteniéndose un ingreso extra.



a. Reacción usando campana de extracción



b. Reacción usando agua para recoger el HCl

Figura 3.6. Reacción de acetilación del isobutilbenceno

La reacción es agresiva y exotérmica por lo que se debe agregar el anhídrido acético lentamente. Al terminar la reacción, se agrega HCl concentrado para regenerar el catalizador el cual queda adherido al vaso en forma de cristales blancos como se muestra en la Figura 3.7. Después de los varios lavados que tienen como finalidad extraer todos los demás subproductos, se obtiene un líquido viscoso de color pardo oscuro y de olor dulce que corresponde a 4-isobutilacetofenona.



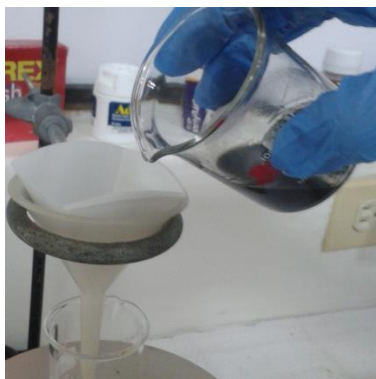
a. Cloruro de aluminio regenerado



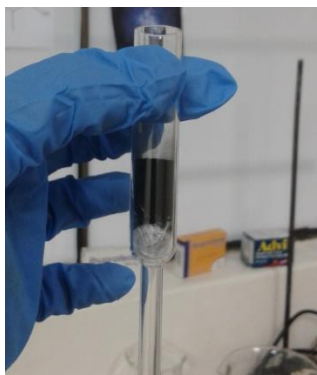
b. Producto de la acetilación

Figura 3.7. Productos de la reacción de acetilación

En la bibliografía, no existe una referencia que nos indique el color de la 4-isobutilacetofenona, pero se infiere que es incolora. Por esto, se trataron tres métodos de decoloración, dos con carbón activado y uno con sílica para decolorar el producto. En el primero se agitó la solución diluida en diclorometano con un gramo de carbón activado y se filtró la solución. En el segundo caso, se fabricó una columna de carbón activado y se hizo pasar la solución a través de ella. En el tercer caso, se fabricó una columna de sílica y se hizo pasar la solución a través de ella como se puede ver en la Figura 3.8. Ninguno de los tres métodos dio resultado por lo que se continuó la síntesis para observar si el color afectaba en el producto final.



**a. Agitación con carbón
activado**



**b. Columna de carbón
activado**



c. Columna de sílica

Figura 3.8. Métodos de decoloración del producto de la acetilación

Finalmente, se obtuvo el espectro infrarrojo. El primer espectro obtenido (Anexo 2) posee un pico negativo el cual en un primer momento se pensó que podría deberse a una interferencia causada por el compuesto que está dando color al producto. Luego se determinó que el pico negativo se debía a residuos del solvente que quedaron en el balón. Se dejó reposar el producto obtenido durante una semana y se volvió a obtener el espectro que se muestra en la Figura 3.9.

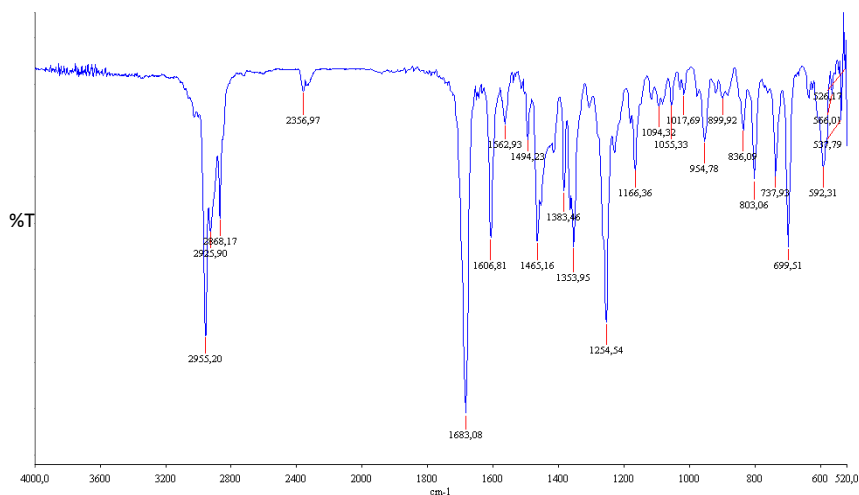


Figura 3.9. Espectro infrarrojo 4-isobutilacetofenona

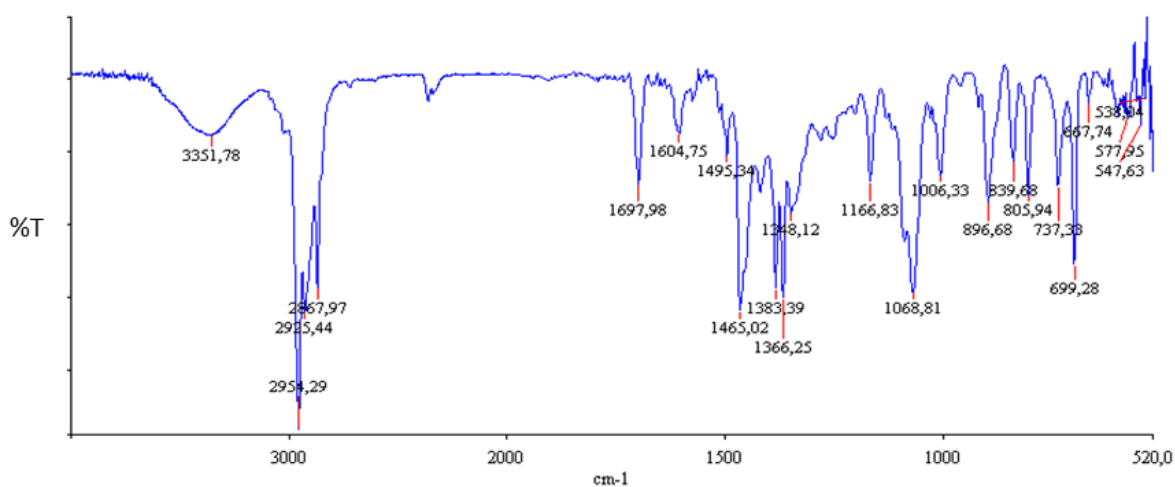
Una vez evaporado todo el solvente, se obtiene un espectro mucho más nítido, con picos más definidos y sin las interferencias causadas por el solvente. Este espectro fue luego comparado con el espectro que se obtuvo computacionalmente. En el espectro se puede observar un pico a los $1683,08\text{ cm}^{-1}$ el cual pertenece a la frecuencia de estiramiento del enlace C=O de la cetona. Dos picos en el espectro, uno a los $1606,81\text{ cm}^{-1}$ y el otro a los $2955,20\text{ cm}^{-1}$ pertenecen a frecuencias de estiramiento del anillo aromático siendo en el primer caso un estiramiento del enlace C=C y en el segundo C-H.

En la segunda parte de la síntesis se realiza la reducción de la 4-isobutilacetofenona, obtenida de la primera parte, agregando borohidruro de sodio como agente reductor y etanol para que ayude a la protonación. La reacción reduce la fenona a alcohol. Completa la reacción, se agregó HCl 10% para destruir todo el exceso de borohidruro de sodio. Esta reacción es exotérmica, desprende gran cantidad de hidrógeno y forma cloruro de sodio. La segunda parte de esta fase se da al reaccionar la fase orgánica extraída con ácido clorhídrico concentrado para obtener 1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno. El producto conserva el color pardo pero se vuelve mucho más oscuro como se muestra en la Figura 3.10.

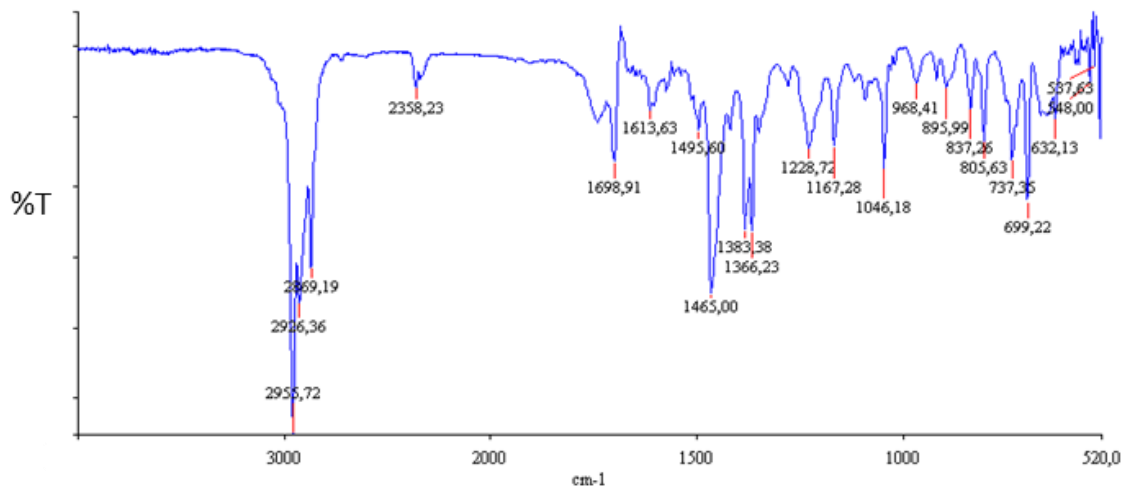


Figura 3.10. Producto de la reducción de la 4-isobutilacetofenona

Se obtuvieron los espectros de los dos productos de las reacciones, que al igual que sucedió anteriormente apareció un pico negativo (ver Anexo 2) por lo que se los dejó depositar una semana para que se elimine todo resto de solvente que pudo haber quedado. En la Figura 3.11 se muestran los espectros obtenidos de los productos.



a. Espectro 1-(4-isobutilfenil)etanol



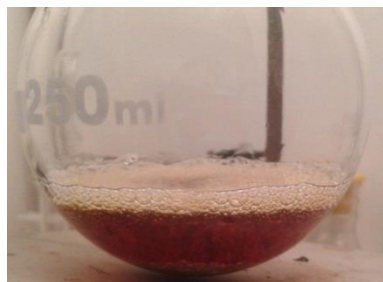
b. Espectro 1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno

Figura 3.11. Espectros infrarrojos de los productos de la segunda parte

En el primer espectro se puede observar que desapareció la frecuencia del grupo carbonilo y aparece una frecuencia a los $3351,78\text{ cm}^{-1}$ la cual pertenece a la vibración del grupo hidroxilo del alcohol. Se mantienen las frecuencias del grupo aromático que en este espectro aparecen a los $1604,75$ y $2954,29\text{ cm}^{-1}$. En el segundo espectro, el principal cambio es la desaparición de la vibración del grupo hidroxilo y la aparición de una vibración de intensidad alta a los $699,22\text{ cm}^{-1}$ perteneciente al enlace carbono-cloro. Este cambio demuestra la halogenación del compuesto (sustitución del grupo OH por un cloro).

En la tercera parte se forma el reactivo de Grignard, el cual, al tratarlo con dióxido de carbono, forma ibuprofeno. Esta parte requiere bastantes cuidados debido a las condiciones en que se debe realizar la reacción. Para conseguir una reacción exitosa, se debe trabajar en medio anhidro, esto significa que, tanto los reactivos como el material de vidrio deben estar completamente secos. La reacción es tan sensible al agua que la humedad del ambiente puede

afectar la reacción bajando notoriamente el rendimiento o evitando que se produzca la reacción. Por esta razón, todo el material fue secado en estufa y todos los reactivos usados fueron anhidros. Normalmente la reacción necesita de un iniciador el cual, en este caso fueron cristales de yodo. Éste reemplaza al cloro del cloruro facilitando la reacción. Al comienzo, la reacción forma espuma y se torna turbia al final de la misma. Inmediatamente, el anhídrido carbónico fue burbujado utilizando un globo y una pipeta Pasteur como se observa en la Figura 3.12.



a. Inicio de la reacción de Grignard



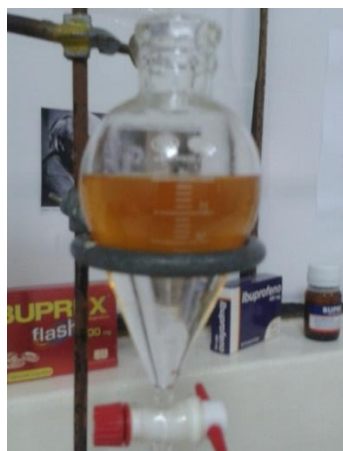
b. Final de la reacción de Grignard



c. Adición de anhídrido carbónico en la reacción

Figura 3.12. Reacción de Grignard

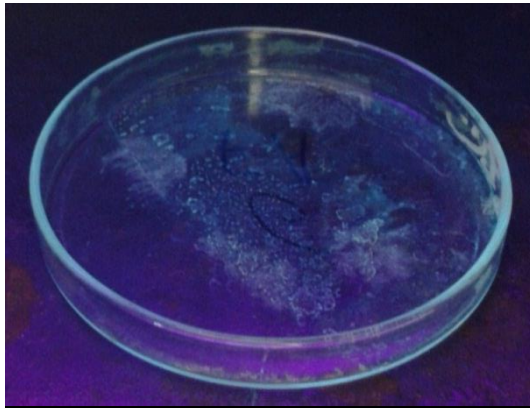
Luego se realizaron varias extracciones para aislar el ibuprofeno en un proceso conocido como “workup”. El lavado con hidróxido de sodio es clave en este proceso ya que separa el ibuprofeno del resto de compuestos orgánicos formados de reacciones secundarias. El ibuprofeno forma su sal al reaccionar con el hidróxido de sodio haciéndolo soluble en la fase acuosa, mientras que el resto de compuestos se mantienen en la fase orgánica. Al acidificar la fase acuosa se regenera el ibuprofeno (volviéndose turbia la mezcla). La fase acuosa tomó un color amarillo indicando la presencia de impurezas. Finalmente se extrajo el ibuprofeno con éter etílico. Debido a la poca cantidad de ibuprofeno que se produjo, se evaporó la mitad del solvente en el rotavapor y el resto se colocó en una caja Petri para su cristalización. Para poder visualizar bien los cristales formados se expuso la caja Petri a luz UV como muestra la Figura 3.13. El ibuprofeno, al absorber energía en esta parte del espectro electromagnético, brilla.



a. Extracción de ibuprofeno



b. Ibuprofeno en solución acuosa



c. Cristales de ibuprofeno bajo luz UV

Figura 3. 13. Workup del ibuprofeno

En la Figura 3.14 se muestra el espectro IR obtenido del producto sintetizado.

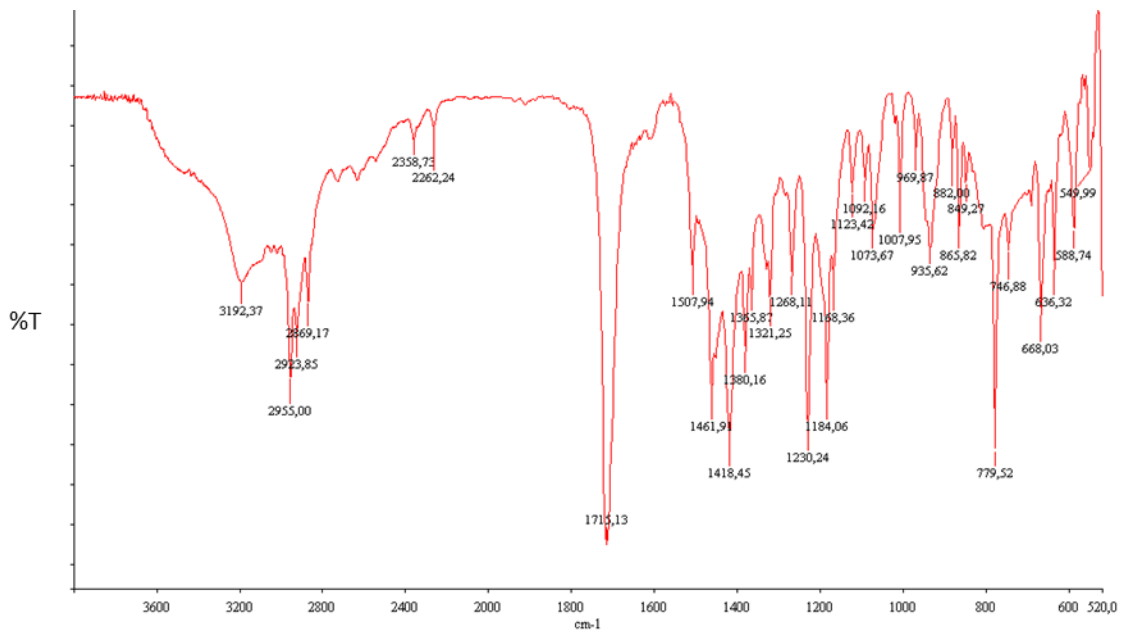


Figura 3.14. Espectro infrarrojo del ibuprofeno sintetizado

En el espectro del ibuprofeno sintetizado se puede notar una frecuencia en los $1715,13\text{ cm}^{-1}$ perteneciente al enlace C=O del grupo carboxilo. A los $2955,00\text{ cm}^{-1}$ y $2923,85\text{ cm}^{-1}$ aparecen las frecuencias del grupo aromático. El espectro fue comparado con los espectros obtenidos del estándar y de los productos comerciales. En la Tabla 3.2 se muestran la comparación del espectro del ibuprofeno sintetizado con los espectros de las muestras y el estándar. El espectro de ibuprofeno sintetizado tiene correlación de 1 indicando que es el espectro tomado como referencia para la comparación.

Tabla 3.2. Comparación del espectro del producto sintetizado

<i>Muestra</i>	<i>Correlación</i>
Ibuprofeno Sintetizado	1,0000
Buprex suspensión	0,9516
Buprex Flash	0,9466
Ibuprofeno Genamérica	0,9288
Probinex	0,9240
Advil	0,9228
Ibuprofeno estándar	0,9194
Buprex Fem	0,9169

La correlación con los espectros es baja lo que indica que la muestra no está pura. Esto era esperado ya que el polvo que se produjo no era blanco sino marrón. En la Figura 3.15 se muestra la comparación del espectro del ibuprofeno sintetizado (negro) con el de Buprex suspensión (rojo), el estándar de ibuprofeno (azul) y Buprex fem (morado).

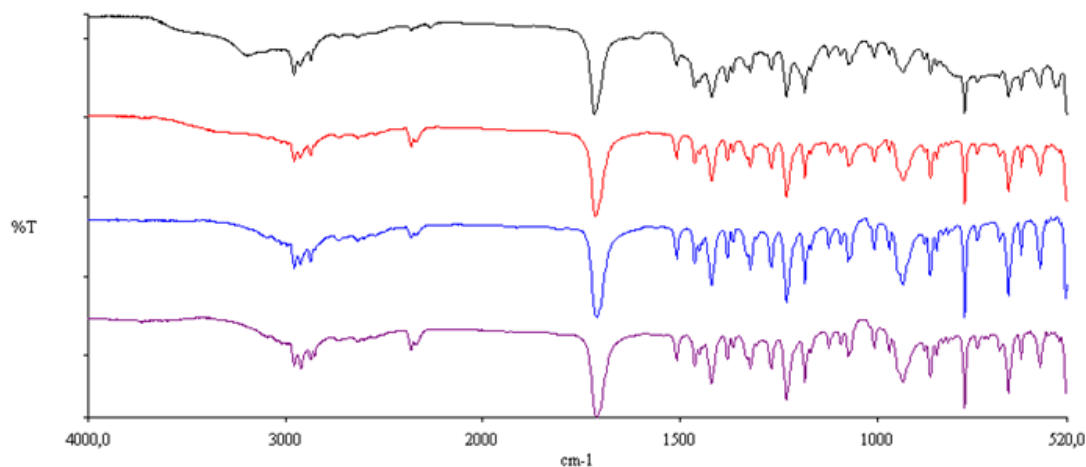


Figura 3.15. Comparación de espectros infrarrojos de ibuprofeno

Como se puede observar el espectro es muy similar por lo que se puede decir que efectivamente existe ibuprofeno en la muestra analizada. Las diferencias entre los espectros radican principalmente en un pico situado a los $3192,37 \text{ cm}^{-1}$ que pertenece a un enlace OH producido por la impureza. Los picos situados a $2358,73 \text{ cm}^{-1}$ y $2262,24 \text{ cm}^{-1}$ se ven reducidos en el ibuprofeno sintetizado. Estas diferencias causarían que el producto sintetizado sea rechazado como materia prima para la industria farmacéutica.

La confirmación se realizó determinando el espectro UV/VIS del producto obtenido. Al igual que con las muestras comerciales, el producto obtenido fue disuelto en una solución de hidróxido de sodio 0,1 N. El espectro obtenido se muestra en la Figura 3.16.

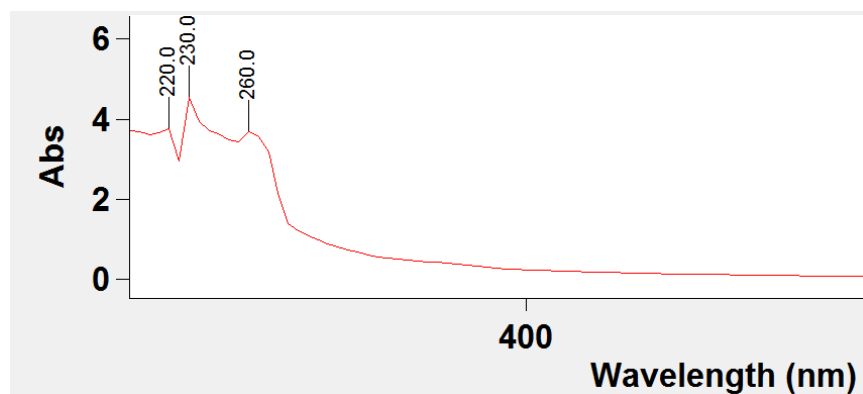


Figura 3.16. Espectro Ultravioleta/Visible del producto sintetizado

Como se puede ver en la figura, el pico a los 230 nm se mantiene pero el pico a 265 nm no se observa. Un pico a los 260 nm aparece y se sobrepone al de 265 nm ya que posee una absorbancia mayor. Este pico muestra que efectivamente existe una impureza en la muestra.

La impureza que está contaminando la muestra puede tratarse de un ácido orgánico, ya que al estar en contacto con el hidróxido de sodio formó el carboxilato que le permitió pasar de la fase orgánica a la fase acuosa. También pudo ser un alcohol ya que se sabe que en su estructura posee un enlace OH debido a que se presenta un pico a los $3192,37\text{ cm}^{-1}$ en el infrarrojo. Finalmente se sabe que el compuesto posee dobles enlaces conjugados, (específicamente un anillo bencénico) ya que presenta una banda de absorción en la zona UV/VIS. En la Figura 3.17 se muestran varias estructuras químicas derivadas del ibuprofeno, identificadas por la farmacopea europea, que pueden estar como impurezas en el polvo farmacéutico [57].

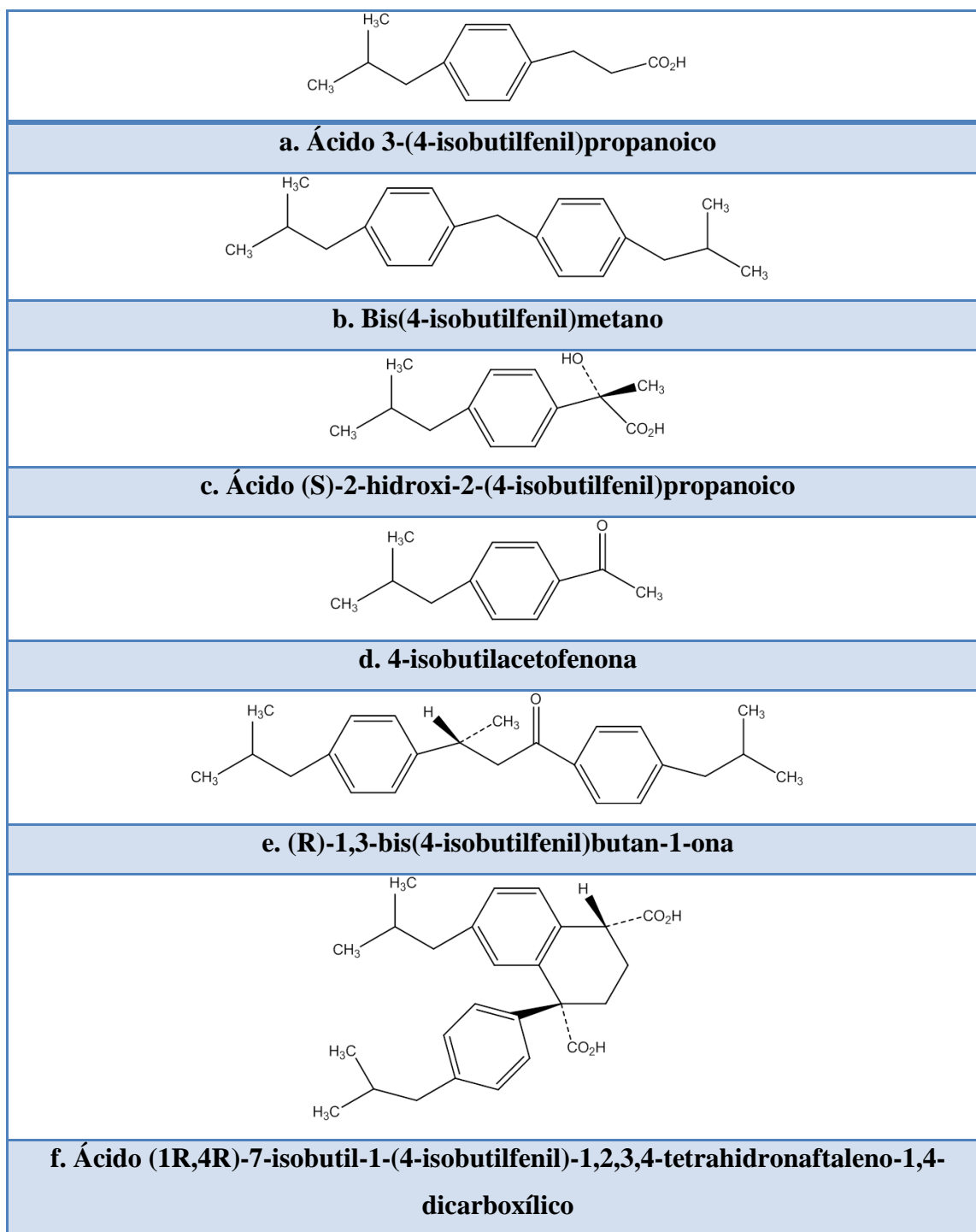


Figura 3.17. Posibles impurezas producidas en la síntesis de ibuprofeno

En la Tabla 3.3 se muestra el rendimiento de la reacción de la síntesis experimental. Para los rendimientos se tomó en cuenta la densidad y el peso molecular de las sustancias reaccionantes (Anexo 3).

Tabla 3.3. Rendimiento de la reacción de Síntesis

<i>Reacción</i>	<i>Parte 1</i>	<i>Parte 2</i>	<i>Parte 3</i>
<i>Moles teóricos</i>	0,0636 moles	0,0216 moles	0,0050 moles
<i>Moles Practicos</i>	0,0452 moles	0,0104 moles	0,0002 moles
<i>Rendimiento</i>	71,1%	48,2%	4,0%

El rendimiento total de la reacción es de 1,37% lo cual es un porcentaje extremadamente bajo para un proceso industrial, además que se produce una gran cantidad de desechos. El rendimiento de la reacción se ve afectado en primer lugar por reacciones secundarias que se producen en cada parte de la síntesis. Al no obtener 4-isobutilacetofenona pura, esto causa que en la siguiente parte se agregue menos moles del reactivo de interés y que se den, a más de reacciones secundarias entre los mismos reactivos, reacciones secundarias entre los reactivos y las impurezas coloreadas de la fenona. En el artículo *Synthesis of Ibuprofen in the Introductory Organic Laboratory* [43] se indica un rendimiento del 10 al 40% para la parte 3 de la reacción, mientras que en esta investigación se alcanzó un rendimiento del 4%. El bajo rendimiento de la reacción de Grignard puede deberse a la formación de un dímero que se muestra en la Figura 3.18 el cual reduce notablemente la cantidad de ibuprofeno formado [43].

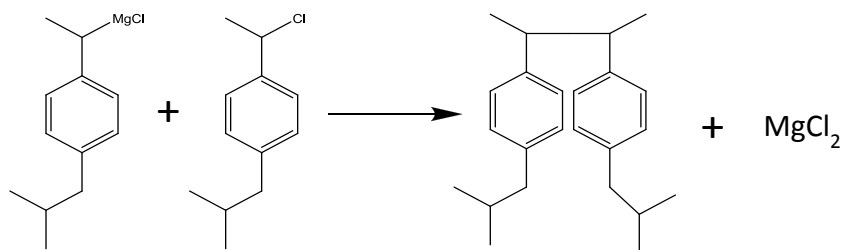
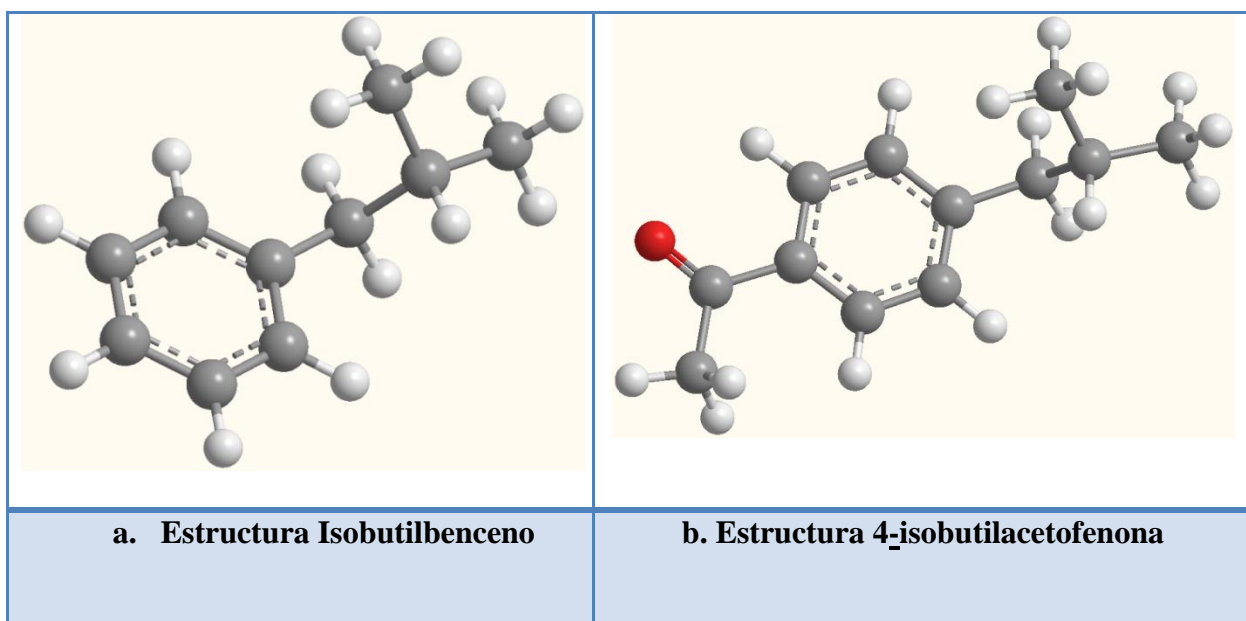


Figura 3.18. Formación del dímero en la reacción de Grignard

3.3. ESTUDIO COMPUTACIONAL

En la Figura 3.19 se muestran las estructuras del reactivo principal y de los productos de interés de las reacciones estudiadas.



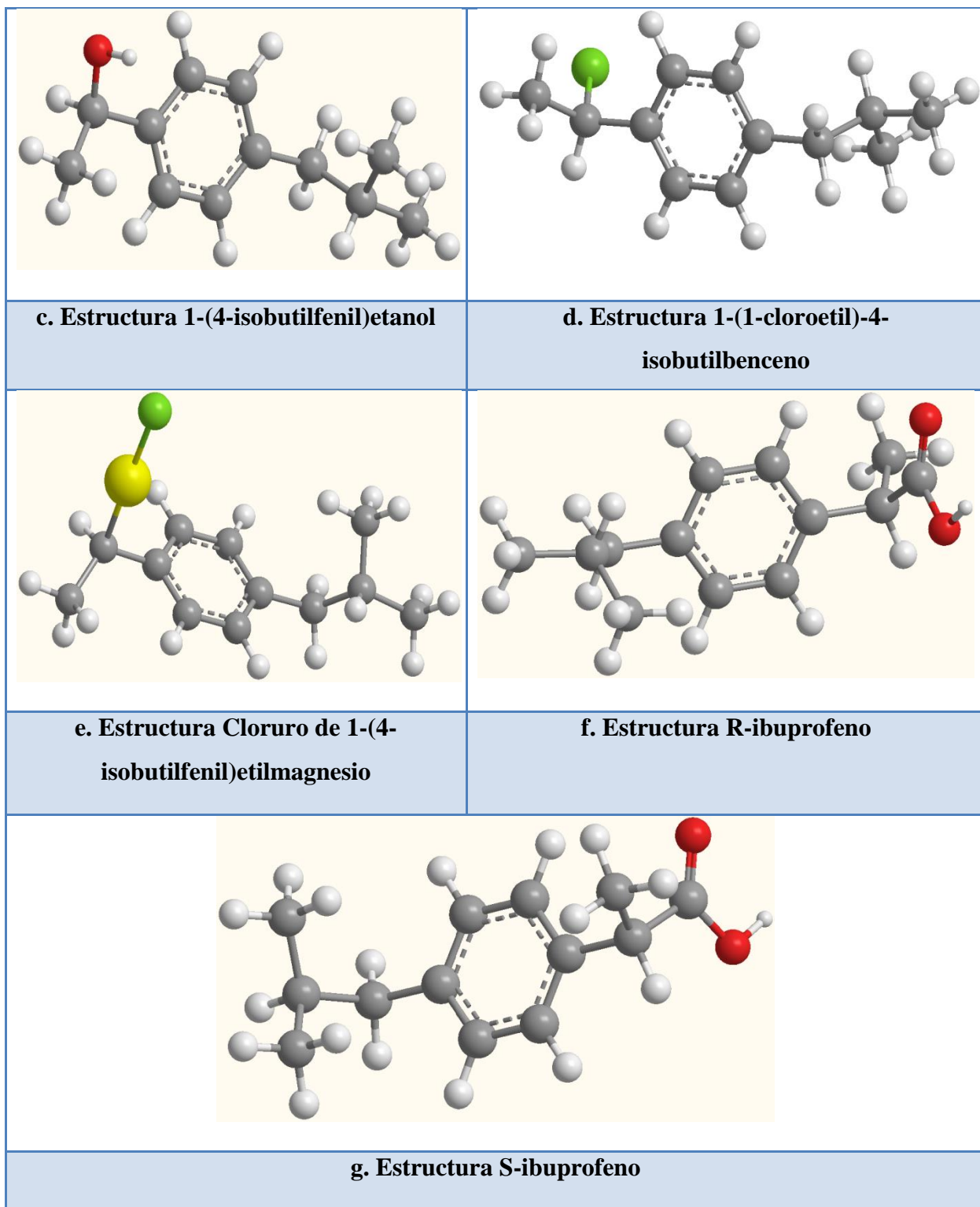


Figura 3. 19. Estructuras computacionales en estudio

En la figura anterior los átomos de carbono se muestran de color gris mientras los hidrógenos se muestran de color blanco. Los átomos de oxígeno se encuentran en color rojo, el átomo de magnesio en color amarillo y el átomo de cloro en color verde. Debido a la resonancia que existe dentro del anillo bencénico, éste se representa con un enlace sólido y un enlace entrecortado.

3.3.1. ESTUDIO TERMODINÁMICO

El estudio termodinámico consta de la optimización de estructuras y cálculo de energías potenciales. En la Tabla 3.4 se muestra las ordenes de entradas (input) dadas al programa para los cálculos antes mencionados.

Tabla 3.4. Input para cálculos de frecuencia, energía y optimización de estructuras

<i>Cálculo</i>	<i>Input</i>
Optimización / Frecuencia	# B3LYP/6-311G** Opt=(Maxcycle=100,Noeigentest) Nosymm Freq
Energía	# HF/6-31G*

Para los cálculos se usaron dos niveles distintos de teoría ya que el nivel B3LYP ofrece estructuras más precisas mientras que con el nivel de teoría HF se obtiene mejores valores de energía.

En la Tabla 3.5 se tabularon los valores de energía obtenidos del cálculo de *Single-point Energy* de los reactivos y productos optimizados de las dos reacciones estudiadas. La síntesis experimental es la efectuada en el laboratorio, mientras que la síntesis computacional es la

síntesis BHC, que no se pudo realizar en el laboratorio debido a su peligrosidad y alto costo tecnológico.

Tabla 3.5. Energías de las especies químicas estudiadas

<i>Síntesis Experimental</i>		<i>Síntesis Computacional</i>	
<i>Especie química</i>	<i>Energía (kJ/mol)</i>	<i>Especie química</i>	<i>Energía (kJ/mol)</i>
Isobutilbenceno	-1,0156*10 ⁶	Isobutilbenceno	-1,0156*10 ⁶
Anhídrido acético	-9,9656*10 ⁵	Anhídrido acético	-9,9656*10 ⁵
4-isobutilacetofenona	-1,4141*10 ⁶	4-isobutilacetofenona	-1,4141*10 ⁶
Ácido acético	-5,9810*10 ⁵	Ácido acético	-5,9810*10 ⁵
Borohidruro de sodio	-4,9417*10 ⁵	Hidrógeno	-2,9580*10 ³
Etanol	-4,0451*10 ⁵	1-(4-isobutilfenil)etanol	-1,4171*10 ⁶
Etanoato de sodio	-8,2792*10 ⁵	Monóxido de Carbono	-2,9599*10 ⁵
Borano	-6,9285*10 ⁴	S ibuprofeno	-1,7132*10 ⁶
1-(4-isobutilfenil)etanol	-1,4171*10 ⁶	R ibuprofeno	-1,7132*10 ⁶
Ácido clorhídrico	-1,2079*10 ⁶		
1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno	-2,4254*10 ⁶		
Agua	-1,9956*10 ⁵		
Magnesio	-5,2403*10 ⁵		
Cloruro de 1-(4-isobutilfenil)etil magnesio	-2,9496*10 ⁶		
Anhídrido carbónico	-4,9262*10 ⁵		
Cloruro de magnesio	-2,9372*10 ⁶		
S ibuprofeno	-1,7132*10 ⁶		
R ibuprofeno	-1.7132*10 ⁶		

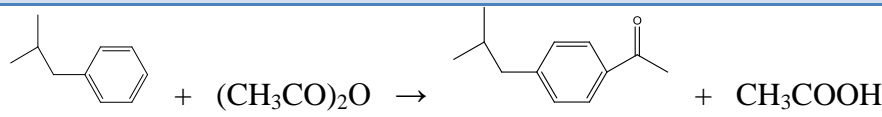
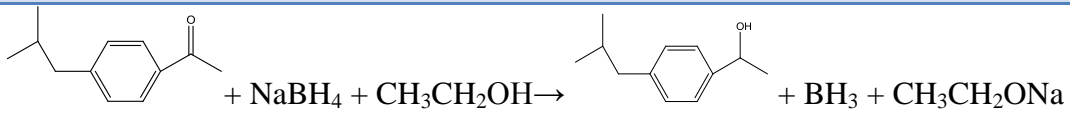
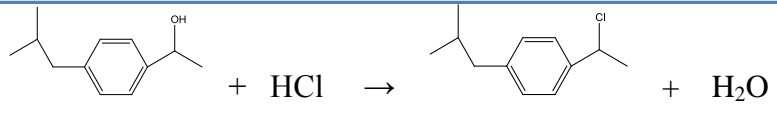
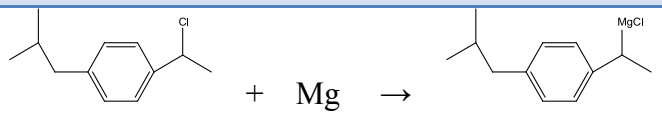
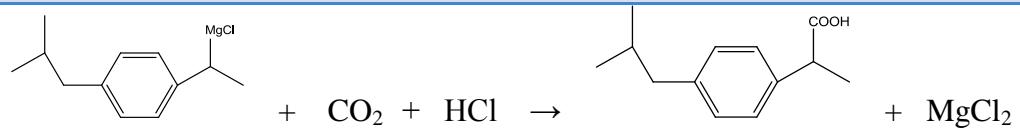
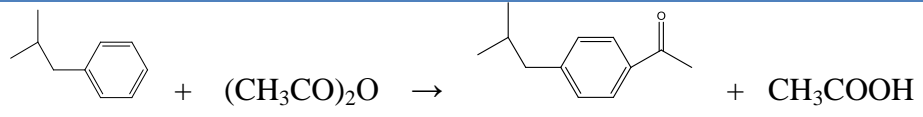
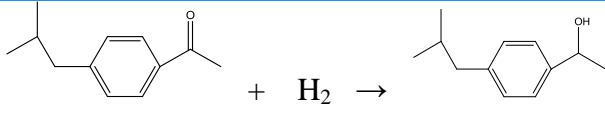
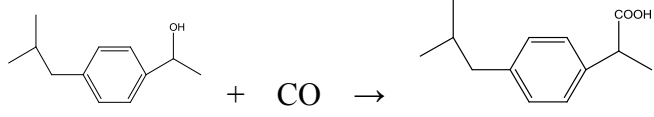
El cálculo de optimización busca la estructura en la cual la especie química va a tener la menor energía, o como se lo explicó en la sección 1.8.8, esté en un valle energético de la superficie de energía potencial de la molécula. Esto se traduce en estabilidad, por lo que el resultado del cálculo es la conformación estructural más estable, la cual es cómo se encuentra en la naturaleza.

Con estas energías se obtienen las entalpías estándar de reacción (ΔH_r) de todas las reacciones de las dos síntesis estudiadas. La entalpía normal de reacción se define como la variación de entalpía al transformarse los números estequiométricos de moles de los reactivos puros, separados y cada uno de ellos en sus estados estándar a temperatura T, en los números estequiométricos de moles de los productos puros, separados, cada uno de ellos en su estado estándar a la misma temperatura [58]. En forma simplificada, es la cantidad de energía o calor absorbido en una reacción química a presión constante y según las cantidad de reactivos y productos. Si energía es requerida, el ΔH_r es positivo, pero si energía es liberada, el ΔH_r es negativo. La ecuación 3.1 explica cómo se obtiene la entalpía estándar de reacción de cualquier reacción química:

$$\Delta H_r = \sum \Delta H (\text{productos}) - \sum \Delta H (\text{reactivos}) \quad (3.1)$$

La Tabla 3.6 muestra cada reacción estequiométricamente igualada y el valor de su entalpía estándar de reacción.

Tabla 3.6. Entalpía estándar de reacción

<i>Síntesis experimental</i>	
	$\Delta H_r = -9,2 \text{ kJ/mol}$
	$\Delta H_r = -1527,9 \text{ kJ/mol}$
	$\Delta H_r = -10,9 \text{ kJ/mol}$
	$\Delta H_r = -173,3 \text{ kJ/mol}$
	$\Delta H_r = -218,8 \text{ kJ/mol}$
<i>Síntesis Computacional</i>	
	$\Delta H_r = -9,2 \text{ kJ/mol}$
	$\Delta H_r = -51,0 \text{ kJ/mol}$
	$\Delta H_r = -69,5 \text{ kJ/mol}$

Todas las entalpías estándar de reacción son negativas lo que indica que el sistema está cediendo calor al ambiente. Esto se puede comprobar en la síntesis experimental ya que todas las reacciones llevadas a cabo son exotérmicas.

3.3.2. ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO

Dentro del estudio espectroscópico se analizaron 3 tipos de espectros:

- Espectro IR (Infrarrojo)
- Espectro UV/VIS (Ultravioleta Visible)
- Espectro RMN (Resonancia Magnética Nuclear)

3.3.2.1. ESPECTRO IR

Para obtener el espectro IR de las especies estudiadas se abre las estructuras optimizadas con el programa Gaussview. Se da click en Results y luego en Vibration. Mediante el cálculo, el software obtiene las frecuencias de vibración que son las necesarias para crear el espectro IR.

En la Figura 3.20 se muestra los espectros obtenidos computacionalmente.

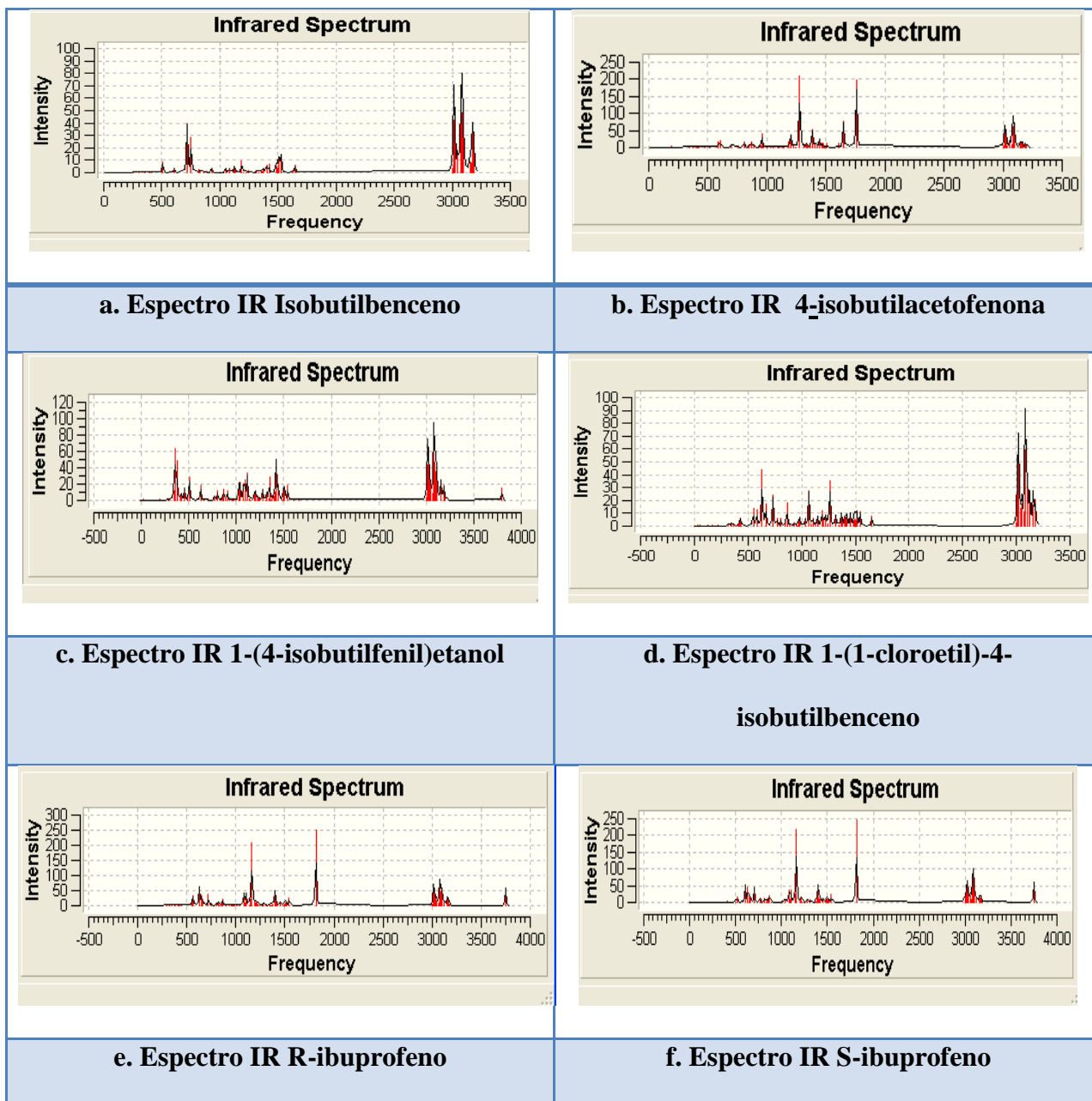
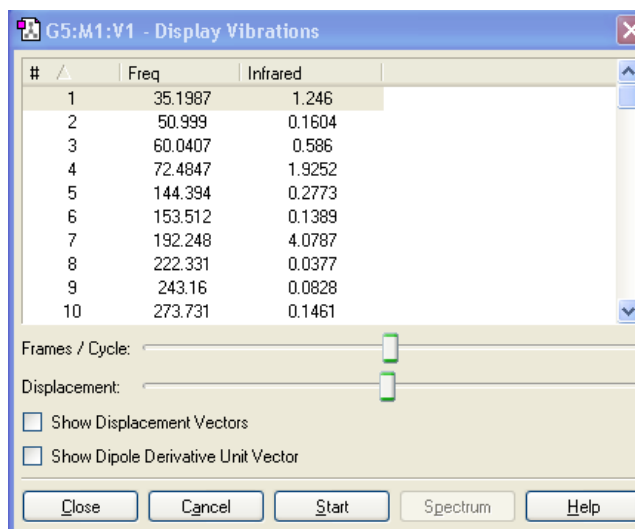


Figura 3.20. Espectros infrarrojo computacionales

A más del espectro, el programa muestra una tabla con todas las frecuencias en las que existen movimientos de estiramiento simétrico, tijeeteo, estiramiento asimétrico, entre otros. Al dar click en cada frecuencia el programa simula el movimiento que realizan las moléculas al

absorber radiación de esa longitud de onda. En la Figura 3.21 se muestra parte de la tabla de frecuencias para el 4-isobutilacetofenona.



#	Freq	Infrared
1	35.1987	1.246
2	50.999	0.1604
3	60.0407	0.586
4	72.4847	1.9252
5	144.394	0.2773
6	153.512	0.1389
7	192.248	4.0787
8	222.331	0.0377
9	243.16	0.0828
10	273.731	0.1461

Figura 3.21. Tabla de frecuencias 4-isobutilacetofenona

El espectro IR es único para cada compuesto químico con la excepción de los isómeros ópticos, los cuales poseen un espectro idéntico. Algunas veces, polimorfismos pueden ocasionar alteraciones en el espectro IR de un compuesto determinado en estado sólido. Frecuentemente, pequeñas diferencias en la estructura causan grandes cambios en el espectro [59]. Así, compuestos intermedios en la síntesis, los cuales difieren en un átomo o dos al otro, llegaron a una similitud máxima que no pasa del 92%. La mayor similitud que se encontró entre dos compuestos diferentes en esta investigación fue entre el 1-(4-isobutilfenil)etanol y el 1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno, con un factor de 0,9152. Como se indicó anteriormente, el factor es muy bajo para la mínima diferencia estructural que existe entre ellos (sustitución de un grupo hidroxilo por un cloro).

En la Tabla 3.7 se muestra la comparación entre las frecuencias de absorción infrarroja de los dos isómeros del ibuprofeno para ver la similitud de sus espectros.

Tabla 3.7. Bandas de absorción de radiación infrarroja del R y S ibuprofeno

<i>Frecuencia</i>	<i>R ibuprofeno</i>	<i>S ibuprofeno</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>R ibuprofeno</i>	<i>S ibuprofeno</i>
1	28,51	24,13	48	1189,05	1197,15
2	36,36	38,45	49	1206,38	1206,86
3	48,37	53,14	50	1216,36	1216,92
4	53,75	58,38	51	1228,05	1227,53
5	66,08	84,23	52	1245,90	1242,24
6	116,64	103,07	53	1280,46	1280,62
7	148,79	168,30	54	1308,95	1307,33
8	207,85	209,12	55	1317,65	1309,25
9	222,44	220,70	56	1343,93	1344,22
10	226,39	234,11	57	1358,65	1360,41
11	244,97	240,63	58	1368,98	1371,75
12	250,67	261,64	59	1375,40	1383,50
13	287,83	277,75	60	1397,04	1397,25
14	319,32	336,31	61	1402,96	1404,97
15	349,73	353,17	62	1412,46	1412,64
16	381,30	387,49	63	1422,39	1423,90
17	410,02	401,84	64	1453,28	1454,03
18	418,67	413,54	65	1485,29	1488,36
19	424,18	423,09	66	1491,18	1489,62
20	446,42	502,51	67	1493,17	1492,62
21	552,06	514,74	68	1498,70	1498,85
22	565,06	605,30	69	1501,65	1499,95
23	627,40	632,83	70	1506,22	1509,05
24	645,88	644,43	71	1512,25	1514,01
25	664,68	663,87	72	1542,63	1543,48
26	719,86	704,63	73	1612,10	1611,28
27	750,36	763,80	74	1653,61	1653,11
28	803,25	774,87	75	1816,07	1815,89
29	821,02	814,96	76	3001,24	2997,09

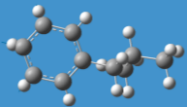
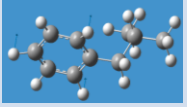
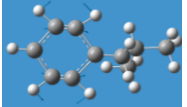
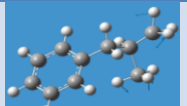
30	832,58	835,38	77	3011,87	3018,63
31	853,18	847,86	78	3014,04	3020,08
32	854,48	856,76	79	3020,51	3025,89
33	868,76	869,98	80	3039,10	3038,63
34	893,75	893,15	81	3049,58	3056,20
35	932,95	938,51	82	3068,87	3069,77
36	952,23	958,26	83	3073,11	3079,31
37	967,14	969,24	84	3079,88	3082,19
38	969,61	973,77	85	3084,94	3086,45
39	985,86	989,38	86	3097,45	3091,81
40	1009,14	1008,87	87	3104,25	3103,88
41	1038,37	1039,19	88	3125,09	3124,66
42	1081,59	1080,27	89	3152,94	5154,90
43	1095,26	1092,88	90	3154,47	3161,33
44	1104,36	1100,20	91	3170,10	3172,18
45	1134,08	1106,75	92	3179,24	3181,48
46	1145,60	1143,50	93	3750,01	3749,80
47	1163,57	1163,06			


Para el caso del S y R ibuprofeno, se puede observar que casi no existen diferencias en las bandas de absorción de radiación infrarroja (ambos poseen 93 bandas de absorción). Al observar sus espectros IR, se puede notar claramente que los espectros si no son idénticos, son bastante similares. Con esto se comprueba lo anteriormente dicho y se determina que la espectroscopia de infrarrojos no es un método idóneo para la determinación de isómeros ópticos, pero sí muy útil para dilucidación estructural.

En las Tablas 3.8 a 3.12 se muestra la comparación de frecuencias entre la tabla de frecuencias de absorción infrarroja (Anexo 4), el espectro computacional y el espectro experimental en el caso de los productos de la síntesis y del estándar en el caso del ibuprofeno. En éstas, el espectro computacional se muestra en la parte superior y el espectro producido por el

espectrofotómetro IR en la parte inferior. También se muestra la intensidad de cada frecuencia (a = alta, m = media) y los vectores de desplazamiento que se dan a esa frecuencia.

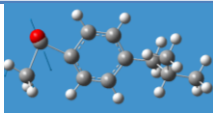
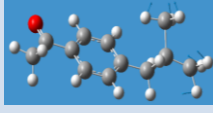
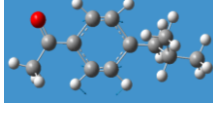
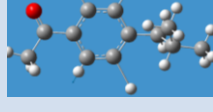
Tabla 3.8. Comparación de espectros del Isobutilbenceno

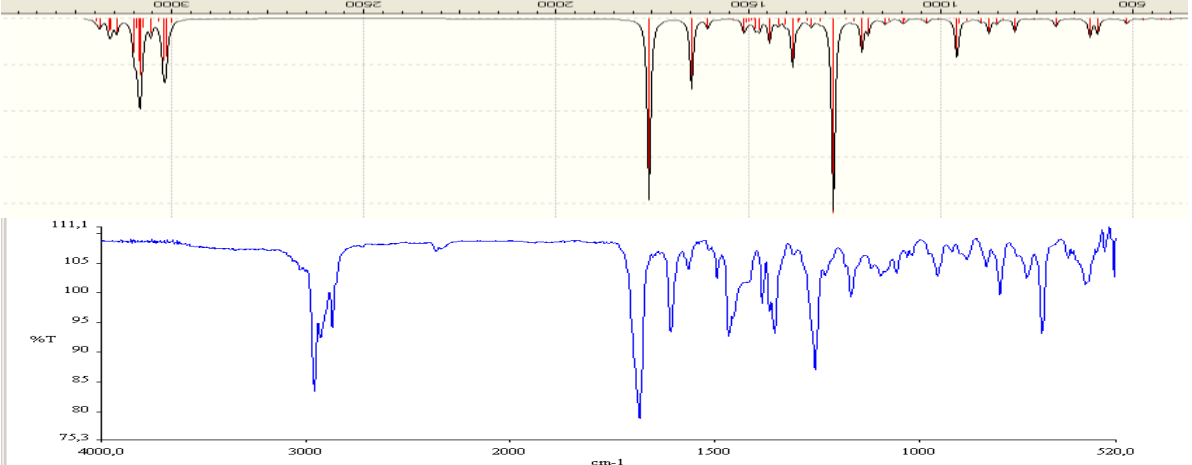
<i>Tipo de vibración</i>	<i>Freq teórica (cm⁻¹)</i>	<i>Freq computacional (cm⁻¹)</i>	<i>Freq experimental (cm⁻¹)</i>	<i>Intensidad</i>	<i>Vectores</i>
<i>C-H (aromático estiramiento)</i>	3150-3050	3187,17	2954,71	a	
<i>C-H (aromático flexión)</i>	900-690	717,28	697,72	a	
<i>C=C (aromático)</i>	1600-1475	1646,80	1604,95	m	
<i>-CH₃</i>	1450-1375	1402,69	1366,26	m	



En la Tabla 3.8 se observan cuatro bandas principales del espectro del isobutilbenceno. Estas corresponden al enlace CH₃, el enlace C=C del anillo y al estiramiento y flexión del enlace carbono-hidrógeno del anillo aromático. Las intensidades y posiciones de las frecuencias coinciden entre el espectro computacional y el experimental produciendo espectros similares.

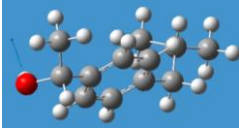
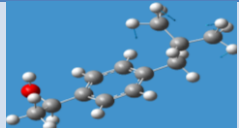
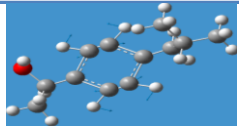
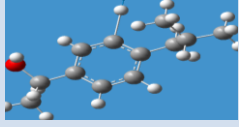
Tabla 3.9. Comparación de espectros de la 4-isobutilacetofenona


<i>Tipo de vibración</i>	<i>Freq teórica (cm⁻¹)</i>	<i>Freq computacional (cm⁻¹)</i>	<i>Freq experimental (cm⁻¹)</i>	<i>Intensidad</i>	<i>Vectores</i>
<i>C=O (cetona)</i>	1725-1705	1758,20	1683,08	a	
<i>-CH₃</i>	1450-1375	1403,19	1353,95	m	
<i>C=C (aromático)</i>	1600-1475	1647,64	1606,81	m	
<i>C-H (aromático estiramiento)</i>	3150-3050	3157,88	2955,20	m	



En la Tabla 3.9 se observan cuatro bandas principales del espectro de la 4-isobutilacetofenona. Estas corresponden al enlace CH₃, el enlace C=C del anillo, el enlace C=O del grupo carbonilo y al estiramiento del enlace carbono-hidrógeno del anillo aromático. Las intensidades y posiciones de las frecuencias coinciden entre el espectro computacional y el experimental siendo comparables.

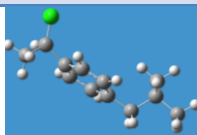
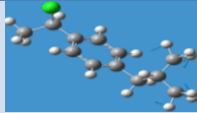
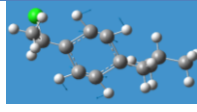
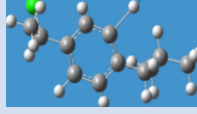
Tabla 3.10. Comparación de espectros del 1-(4-isobutilfenil)etanol


<i>Tipo de vibración</i>	<i>Freq teórica (cm⁻¹)</i>	<i>Freq computacional (cm⁻¹)</i>	<i>Freq experimental (cm⁻¹)</i>	<i>Intensidad</i>	<i>Vectores</i>
<i>O-H</i>	3650-3600	3798,54	3351,78	m	
<i>-CH₃</i>	1450-1375	1420,33	1383,39	m	
<i>C=C (aromático)</i>	1600-1475	1654,88	1604,75	m	
<i>C-H (aromático)</i>	3150-3050	3157,18	2954,29	m	



En la Tabla 3.10 se observan cuatro bandas principales del espectro del 1-(4-isobutilfenil)etanol. Estas corresponden al enlace CH₃, el enlace C=C del anillo, el enlace O-H del grupo hidroxilo y al estiramiento del enlace carbono-hidrógeno del anillo aromático. Las intensidades y posiciones de las frecuencias entre el espectro computacional y el experimental coinciden.

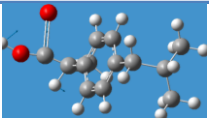
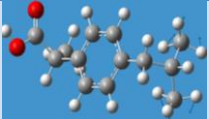
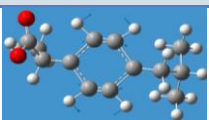
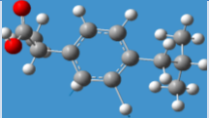
Tabla 3.11. Comparación de espectros del 1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno

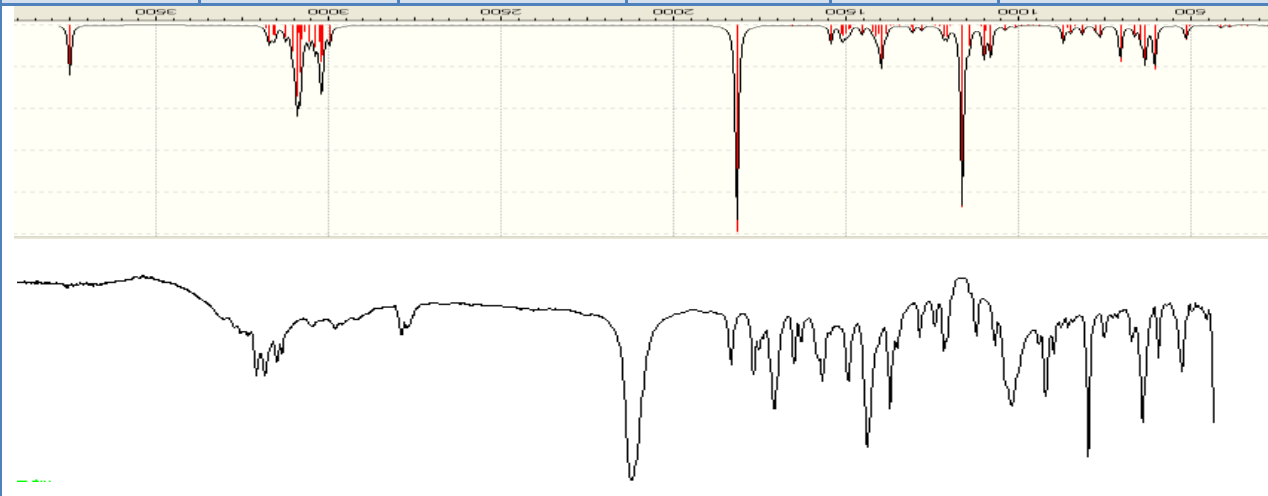
<i>Tipo de vibración</i>	<i>Freq teórica (cm⁻¹)</i>	<i>Freq computacional (cm⁻¹)</i>	<i>Freq experimental (cm⁻¹)</i>	<i>Intensidad</i>	<i>Vectores</i>
<i>C-Cl</i>	800-600	631,77	699,22	a	
<i>-CH₃</i>	1450-1375	1422,11	1383,38	m	
<i>C=C (aromático)</i>	1600-1475	1654,67	1613,63	m	
<i>C-H (aromático)</i>	3150-3050	3156,42	2955,72	m	



En la Tabla 3.11 se observan cuatro bandas principales del espectro del 1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno. Estas corresponden al enlace CH₃, el enlace C=C del anillo, el enlace C-Cl y al estiramiento del enlace carbono-hidrógeno del anillo aromático. Las intensidades y posiciones de las frecuencias entre el espectro computacional y el experimental son similares.

Tabla 3.12. Comparación de espectros del ibuprofeno

Tipo de vibración	Freq teórica (cm ⁻¹)	Freq computacional (cm ⁻¹)	Freq experimental (cm ⁻¹)	Intensidad	Vectores
C=O (Ac. Carboxílico)	1725-1700	1815,89	1709,74	a	
-CH ₃	1450-1375	1423,90	1384,12	m	
C-H (flexion)	650-1000	1163,06	935,93	a	
C-H (aromático)	3150-3050	3154,90	2955,42	m	



En la Tabla 3.12 se observan cuatro bandas principales del espectro del ibuprofeno. Estas corresponden al enlace CH₃, el enlace C=O del grupo ácido y al estiramiento y flexión del enlace carbono-hidrógeno del anillo aromático. Las intensidades y posiciones de las frecuencias entre el espectro computacional y el experimental concuerdan.

Para esta comparación no se pudo obtener un factor de correlación. Sin embargo, la comparación se llevó a cabo visualmente y tomando en cuenta los picos de las frecuencias vibracionales más representativas. Visualmente, se puede determinar que ambos espectros son bastante similares lo que comprueba que los compuestos intermedios obtenidos de la reacción experimental son los que se buscaban, denotando el éxito en cada paso de la reacción. Al comparar picos específicos, se puede observar que las intensidades de los picos estudiados que se muestran tanto en la tabla de frecuencias de absorción infrarroja, el espectro computacional y el espectro experimental son los mismos. Con relación al número de onda en el que aparecen, se puede observar que para todos los casos, el pico experimental aparece a menor número de onda que el computacional. En la mayoría de casos esta diferencia es de 50 cm⁻¹ llegando en casos hasta 100 cm⁻¹. Esta diferencia radica en que el cálculo del espectro computacional es realizado en fase gaseosa mientras que los experimentales son realizados en estado sólido y líquido. La diferencia también se debe a la vibración computacional tomada ya que en los espectros computacionales un pico puede estar formado por varios tipos de vibraciones de la molécula. Al compararlo con la tabla de correlación, para la mayoría de casos, las frecuencias vibracionales se encuentra dentro de los rangos mencionados en la tabla de correlación para el tipo de vibración específica.

3.3.2.2. ESPECTRO UV/VIS

En el caso del espectro computacional UV/VIS, se realizó el estudio con las estructuras que son más representativas en la reacción experimental de síntesis. En la Figura 3.22 se muestran los espectros UV/VIS obtenidos computacionalmente. Los espectros fueron comparados con los espectros obtenidos en el laboratorio los cuales se muestran en la Figura 3.23.

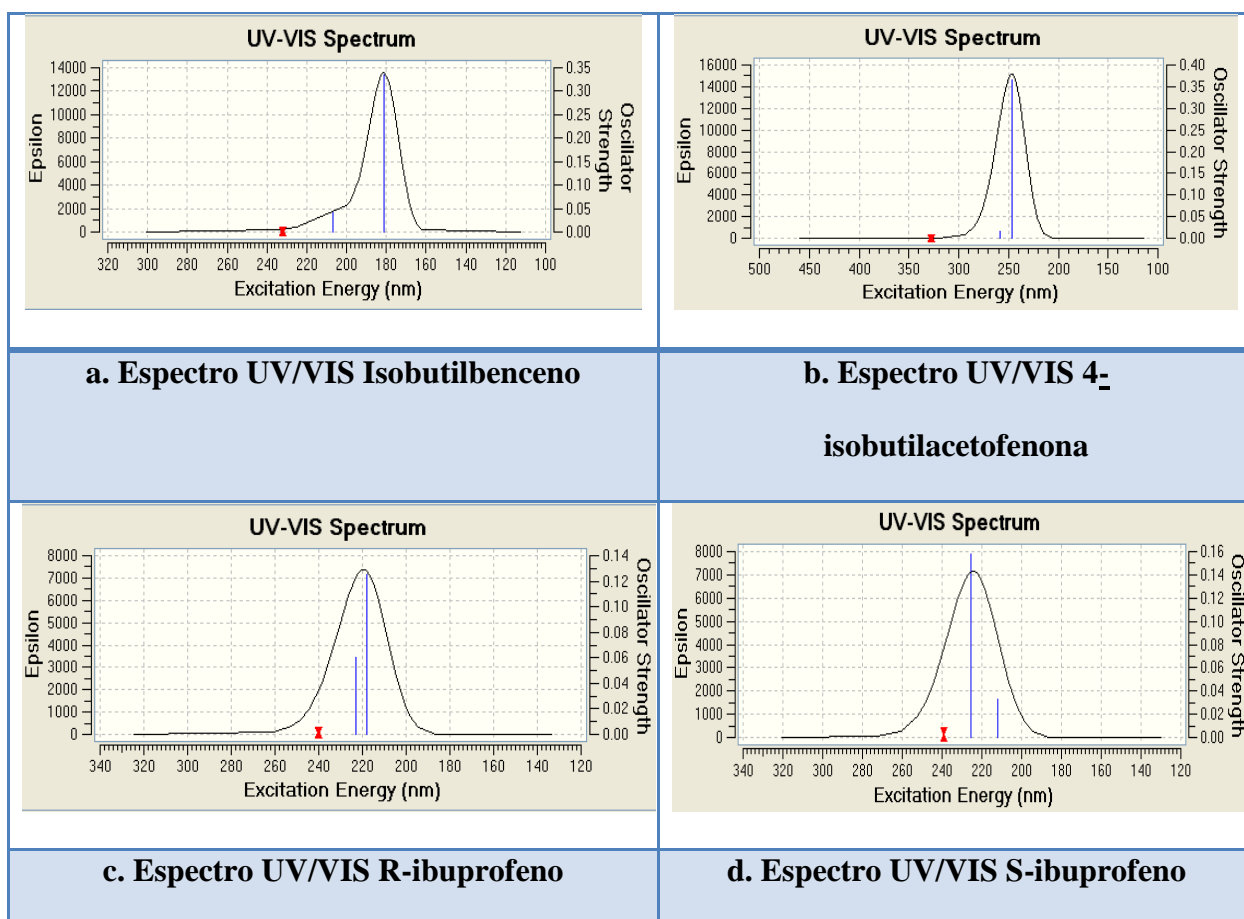
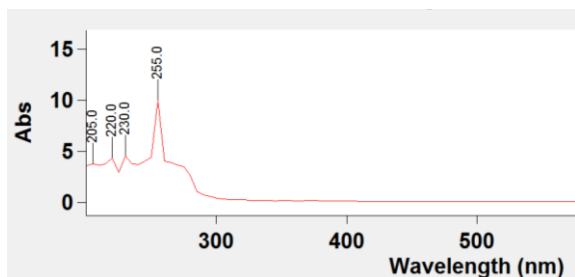
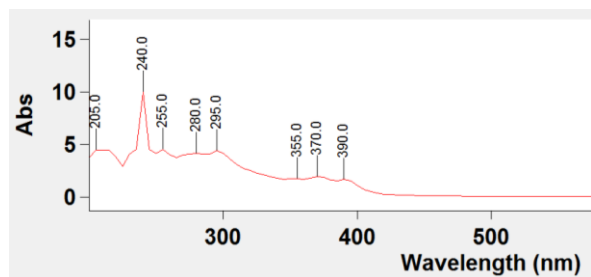


Figura 3.22. Espectros Ultravioleta/Visible computacionales de las estructuras principales de la síntesis



**a. Espectro UV/VIS experimental del
Isobutilbenceno**



**b. Espectro UV/VIS experimental del 4-
isobutilacetofenona**

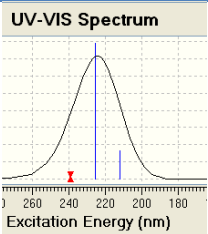
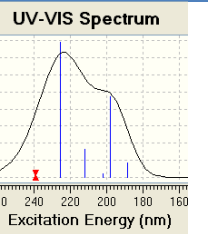
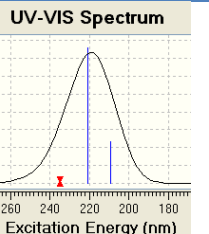
Figura 3.23. Espectros Ultravioleta/Visible experimentales de los reactivos principales de la síntesis

Como se puede observar en las Figuras 3.22 y 3.23, la frecuencia de mayor absorbancia para el isobutilbenceno se encuentra en los 255,0 nm mientras que computacionalmente la mayor absorbancia se encuentra a los 181,26 nm. En el caso de la 4-isobutilacetofenona el pico en el espectro experimental se encuentra a los 240 nm mientras que en el computacional a los 246,43 nm. En el espectro experimental se encuentran que la muestra absorbe a los 355, 370 y 390 nm lo cual se debe a las impurezas coloreadas del producto obtenido. Debido a su color pardo oscuro, la muestra va a absorber la radiación del azul el cual efectivamente se encuentra alrededor de los 370 nm. Con el ibuprofeno también existe diferencia entre el pico experimental, el cual aparece a los 230 nm y 265 nm (Figura 3.5), mientras el computacional aparece a los 225,6 nm y 236,36 nm para ambos isómeros.

A excepción del isobutilbenceno, los resultados obtenidos no difieren en gran medida a los obtenidos computacionalmente. Se probó cambiar el método y las funciones de base para

determinar si con un método diferente se obtienen mejores resultados. La teoría muestra que los mejores resultados han sido obtenidos con funcionales que usan la aproximación de gradiente generalizado como BLYP y PBE. B3LYP es el funcional más usado no solo para estados basales sino también para cálculos de estado excitado (TD-DFT) [60]. Estudios sugieren que el funcional híbrido PBE0 provee resultados muy precisos. Las energías de excitación, son en promedio, más exactas que las que se obtienen con B3LYP. Resultados usando TD-PBE0 resultaron estar en concordancia con resultados experimentales obtenidos para varias clases de compuestos orgánicos [60]. Siendo así, se realizó el cálculo usando el método PBE0. La base, aunque fue cambiada, no afecta en el cálculo ya que una de las ventajas de usar el método TD-DFT es que no existe una dependencia dramática en el tamaño de la función de base usada [60]. Otro método usado fue aumentar el número de estados excitados a 6, para así observar si se obtiene el pico deseado a 265 nm. En la Tabla 3.13 se muestran los resultados obtenidos por los diferentes métodos.

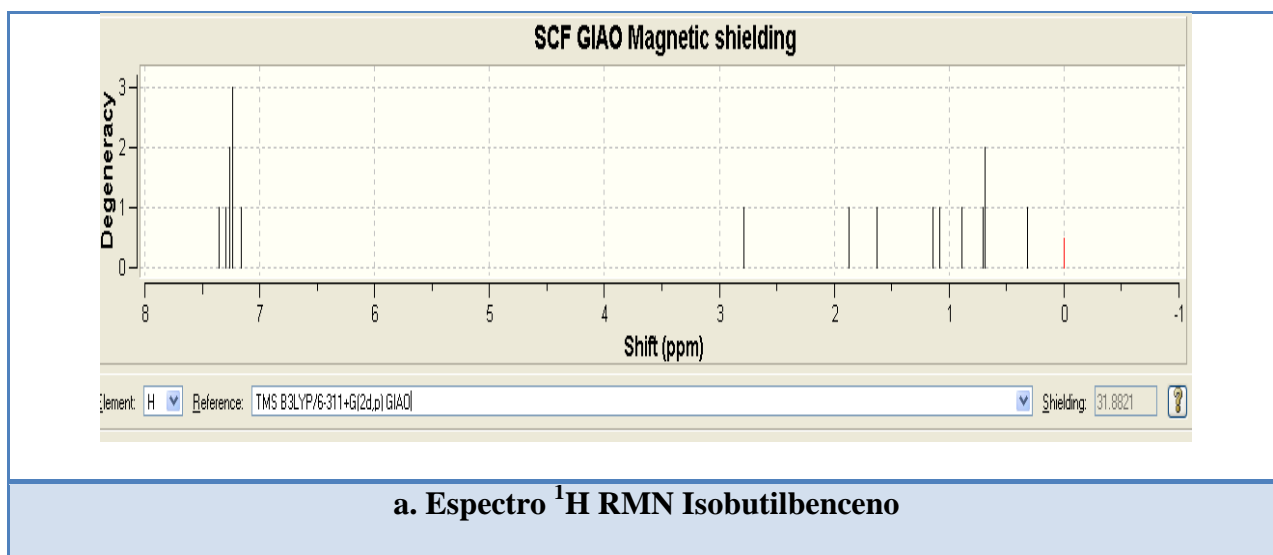
Tabla 3.13. Análisis computacional Ultravioleta/Visible de ibuprofeno con diferentes métodos

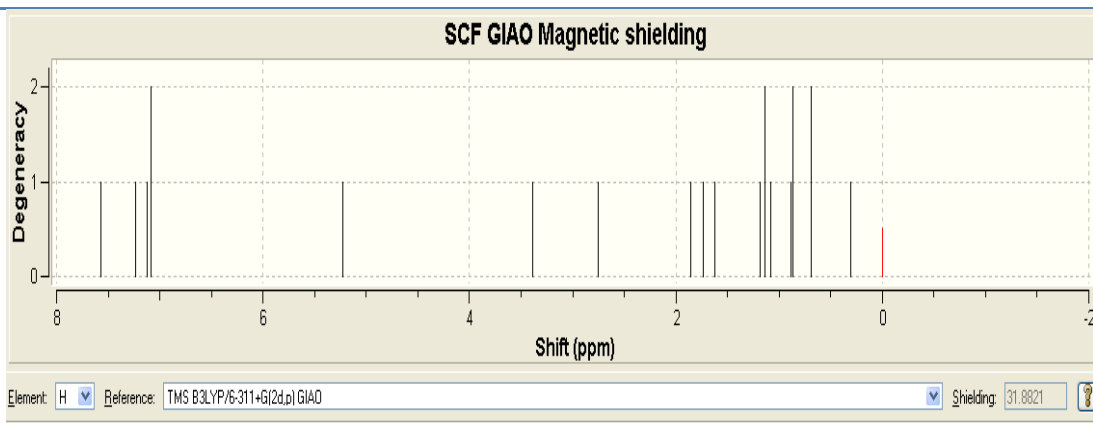
Método	TD B3LYP/6-311G(d,p)	TD=(nstates=6) B3LYP/6-311G(d,p)	# TD PBE1PBE/ 631+G(d,p)
Absorbancia máxima	225,60nm	225,60nm	224,53nm
Espectro			

Como se puede observar, con tres métodos diferentes no se logra obtener diferencias significativas en el pico de absorbancia máxima por lo que el problema no se encuentra en el método sino en la diferencia de los estados de agregación de los análisis. Mientras el análisis experimental se lo realiza en solución, el análisis computacional es calculado en fase gaseosa lo que causa que las energías de excitación disminuyan, fenómeno que ocurre en todos los espectros comparados.

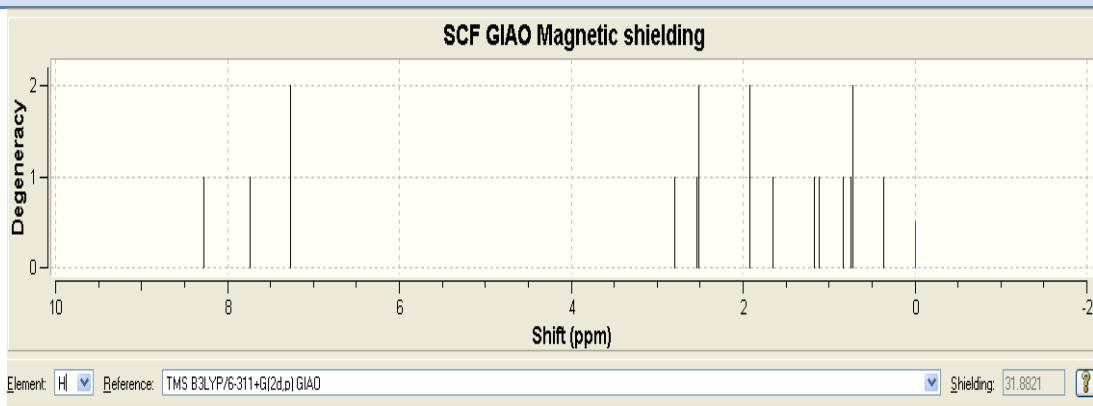
3.3.2.3. ESPECTRO RMN

Para la obtención de los espectros RMN, al igual que en los espectros UV, sólo se realizó los cálculos para las cuatro especies químicas (Figura 3.24).

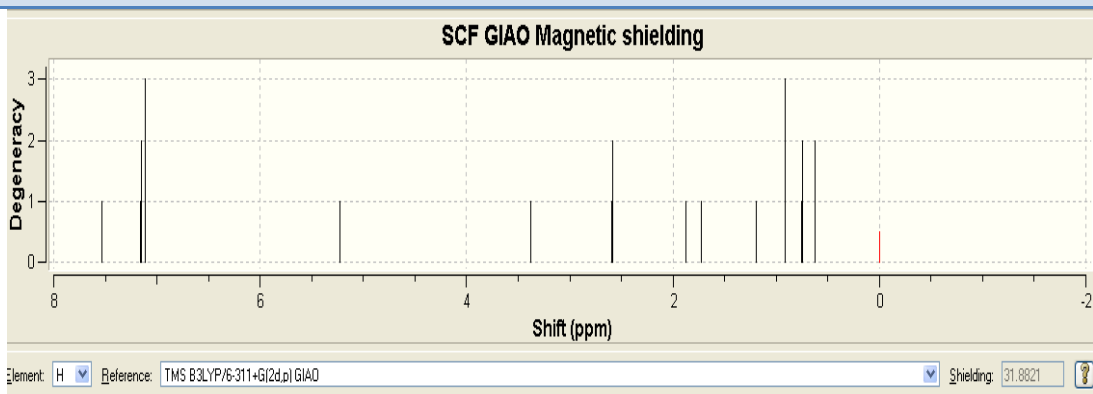




b. Espectro ^1H RMN R-ibuprofeno



c. Espectro ^1H RMN 4-isobutilacetofenona



d. Espectro ^1H RMN S-ibuprofeno

Figura 3.24. Espectros computacionales ^1H de Resonancia Magnética Nuclear

Como se puede observar, el espectro RMN es un gráfico que registra las señales de resonancia en forma de picos. Para la interpretación de un espectro RMN, se deben tomar en cuenta cuatro aspectos: El número, la posición, la multiplicidad y el área de las señales. El número de señales presentes en un espectro corresponden al número de tipos de hidrógeno distintos existentes en la molécula. Tipos de hidrógeno se refiere a los diferentes alrededores moleculares, electrónicos y estéricos, que puede percibir un hidrógeno por su situación concreta en una molécula [61]. En el caso del isobutilbenceno, éste posee 14 picos por lo que tiene igual número de tipos de hidrógenos. La 4-isobutilacetofenona tiene 15 picos en su espectro. A pesar de ser enantiómeros, el R-ibuprofeno tiene 17 picos mientras el S-ibuprofeno posee 15 picos. La posición de las señales hace referencia al valor de abscisa con que cada señal aparece en el espectro y que es función del campo magnético necesario para hacer resonar cada tipo de hidrógeno influenciado por alrededores electrónicos moleculares distintos [61]. Al igual que en la espectroscopia infrarroja, las posición de las bandas van ser específica para cada tipo de hidrógeno pudiendo así realizar una dilucidación de la estructura. En el Anexo 4, Figura A.1 se encuentra un gráfico de correlación para valores de desplazamientos químicos de protón donde se muestran los desplazamientos químicos para varios tipos de hidrógeno. Los más representativos en los cuatro espectros son las bandas entre 7 y 8 ppm que pertenecen a los hidrógenos del anillo aromático de las moléculas.

Como puede apreciarse, las señales que representan a los distintos tipos de hidrógeno son señales simples, o también llamadas singletes, es decir señales compuestas de un único pico. Los espectros producidos computacionalmente van a tener esta característica ya que cada pico representa a un tipo de hidrógeno. Sin embargo, en espectros experimentales, es muy frecuente

encontrar señales múltiples conteniendo varios picos, con una proporción definida, representando en conjunto a un sólo tipo de hidrógeno. La causa de esta multiplicidad es el efecto magnético que ejercen los núcleos de hidrógeno contiguos sobre el hidrógeno en resonancia, lo que se conoce como *acoplamiento spin-spin* [61]. El último parámetro a considerar es el área bajo las señales. La absorción de energía que se produce al entrar en resonancia un tipo de hidrógeno es directamente proporcional al número de hidrógenos que integran ese tipo, porque a más hidrógenos se requiere absorber más energía y se aprecia una mayor intensidad en la señal generada [61]. Así, en el caso del isobutilbenceno, podemos observar que existe un pico con el triple de área que la mayoría y dos con el doble de área. Esto nos indica que hay tres hidrógenos que están en un mismo ambiente y cuatro hidrógenos en dos ambientes distintos. En el caso de la 4-isobutilacetofenona hay cuatro picos con un área de 2. El R-ibuprofeno posee 4 picos de área 2 y el S-ibuprofeno cuatro picos de área 2 y dos picos de área 3.

El programa permite obtener, además, el espectro ^{13}C RMN de las estructuras analizadas. En el caso del ibuprofeno y de la 4-isobutilacetofenona, también se puede obtener el espectro ^{17}O RMN. En las Figuras 3.25 se presentan los espectros ^{13}C RMN y ^{17}O RMN de ambos isómeros del ibuprofeno. Estos espectros son analizados de la misma forma que los anteriores. Debido a la estructura del ibuprofeno, el espectro ^{17}O RMN nos ayuda a complementar la dilucidación estructural, mas no aporta a la diferenciación entre isómeros; mientras el espectro ^{13}C RMN es bastante útil para la identificación de la estructura de la molécula y puede servir para la identificación de cada isómero.

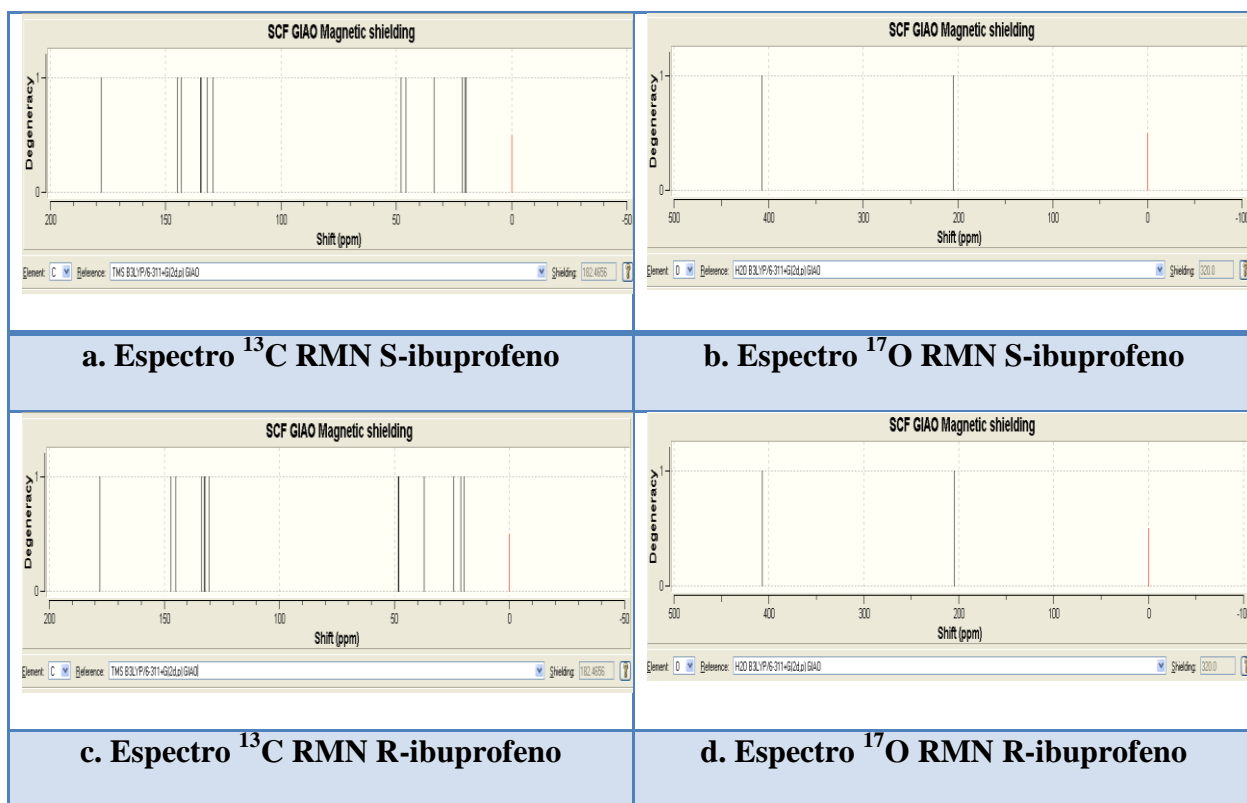


Figura 3.25. Espectros computacionales ^{13}C y ^{17}O de Resonancia Magnética Nuclear del ibuprofeno

A diferencia de la espectroscopia de infrarrojo, la resonancia magnética nuclear puede determinar la configuración absoluta de estereoisómeros sean estos *cis* y *trans* o R y S. Esto se debe a que al cambiar la conformación, cambia el ambiente químico, lo que permite determinar la posición exacta de cada núcleo. Así, al comparar el espectro de resonancia magnética del ibuprofeno obtenido en la computadora con uno obtenido experimentalmente con una síntesis similar a la usada en este proyecto (Figura 3.26), se puede notar diferencias debido a que el espectro del modelo computacional es de un solo isómero mientras que el experimental es de la mezcla racémica.

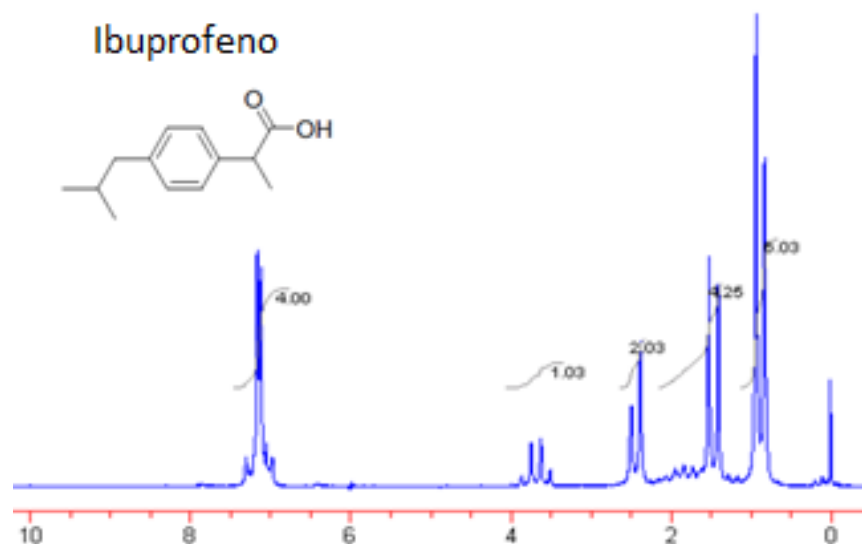


Figura 3.26. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del ibuprofeno [43]

A pesar de ser diferentes, el espectro experimental y computacional posee varias similitudes. Entre esas se puede observar que entre 0 a 4 ppm se encuentran la mayoría de los picos. Luego de los 4 a los 7 ppm no se encuentran picos y entre 7 y 8 ppm se encuentran los últimos picos. Alrededor de los 5 ppm aparece un pico tanto en el espectro computacional del S ibuprofeno como del R ibuprofeno el cual no aparece en el espectro experimental. Al investigar qué hidrógeno estaba produciendo la señal, se pudo comprobar que era el hidrógeno del hidroxilo como se puede observar en la Figura 3.27.

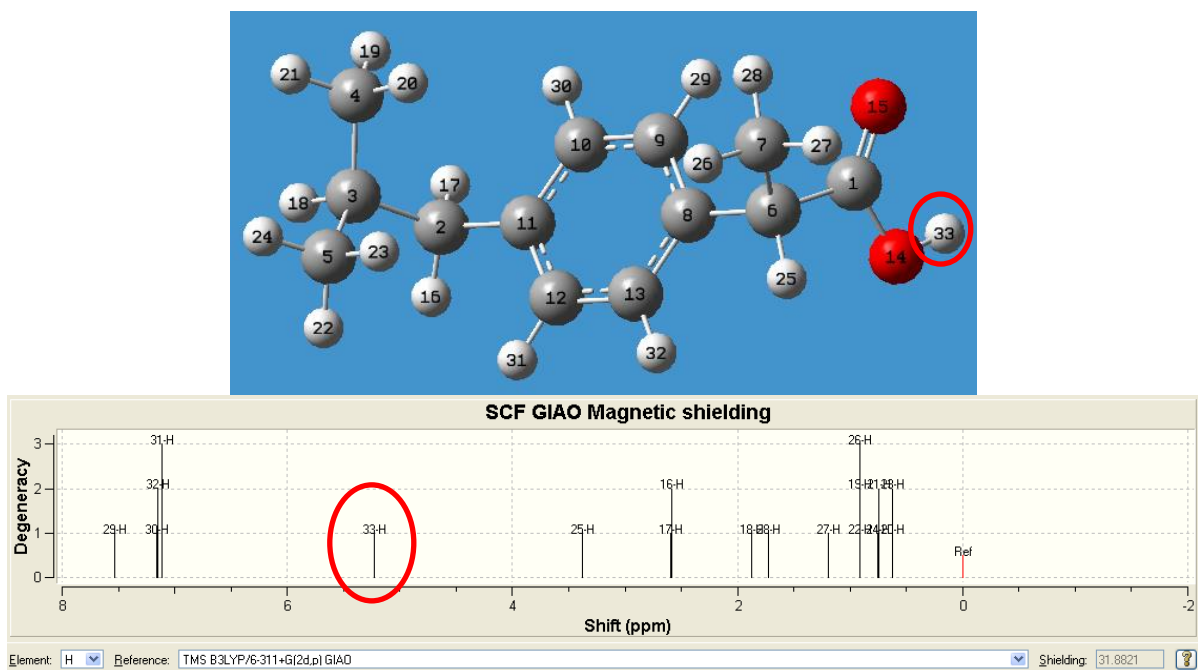


Figura 3.27. Espectro del S ibuprofeno con los hidrógenos marcados

En el Chemical Book [62] se encontró el espectro del ibuprofeno con su interpretación (Figura 3.28). Ahí se puede ver que el hidrógeno del hidroxilo no produce ningún pico. Esto se da porque los protones en grupos como alcoholes (R-OH), aminas (R-NH-), ácidos carboxílicos (RCOOH), tioles (R-SH) son clasificados como lábiles o protones fácilmente intercambiables. Los protones lábiles dan lugar a una amplia gama de resonancias en el espectro ^1H RMN y sus desplazamientos químicos dependen críticamente del solvente, la concentración y la temperatura. Los protones lábiles se intercambian rápidamente entre ellos y también con protones del agua o agua deuterada [63] desapareciendo la señal en el espectro.

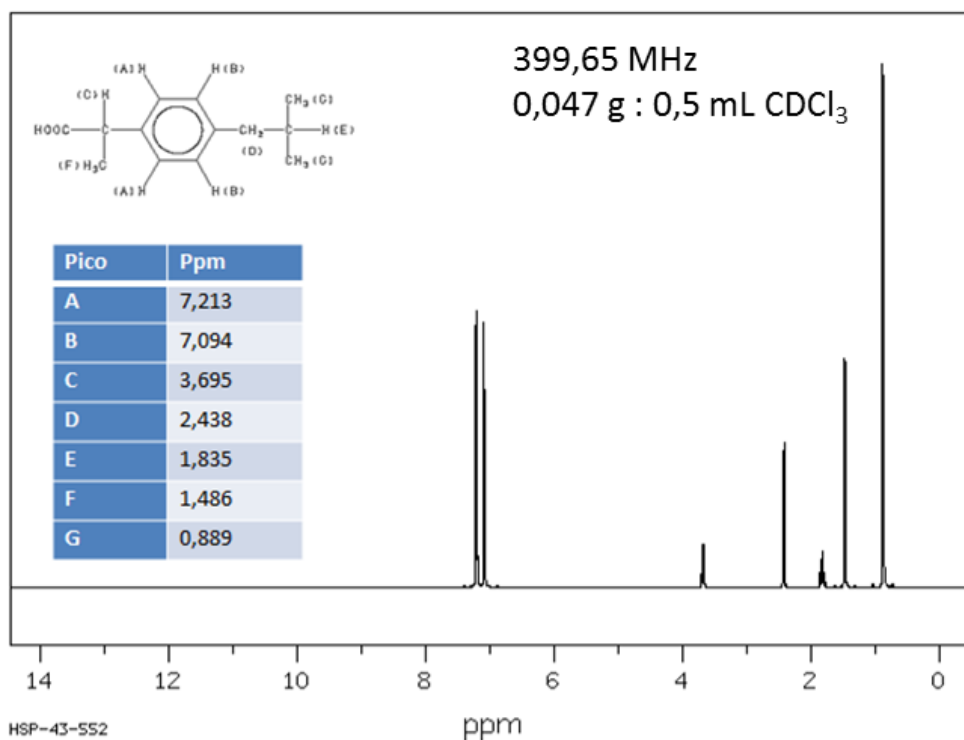


Figura 3.28. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear teórico del ibuprofeno [62]

En el espectro teórico se observan 7 bandas lo que ya marca una diferencia entre el espectro computacional y teórico. En el espectro experimental (Figura 3.29) se observan sólo 6 bandas debido a que las bandas A y B del espectro teórico se encuentran solapadas. Los picos que aparecen entre 6 y 8 pertenecen a los hidrógenos del anillo aromático. El pico en 3.7 pertenece al carbono α del propionato. Éste se muestra como un cuadruplete debido al acoplamiento spin-spin producido por el hidrógeno del grupo ácido y los 3 hidrógenos del carbono contiguo. Las señales entre 0 a 2,5 se encuentran muy juntas por lo que no se puede determinar la multiplicidad de cada señal. Al comparar con el espectro teórico se observa que en esa zona existen 4 picos pertenecientes a los hidrógenos del isobutilo y a los hidrógenos del carbono Beta del propionato.

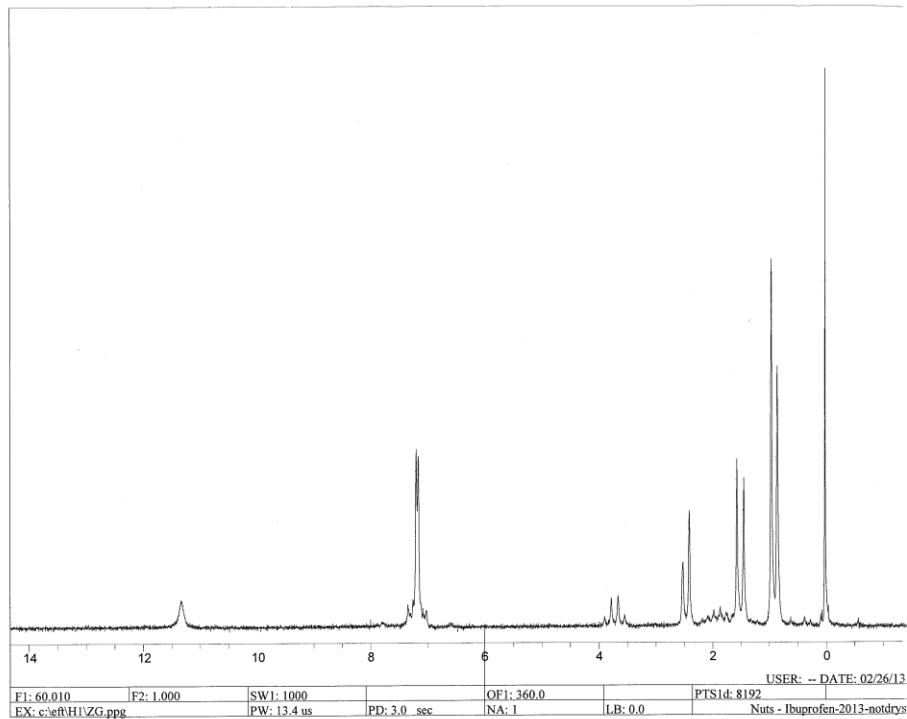
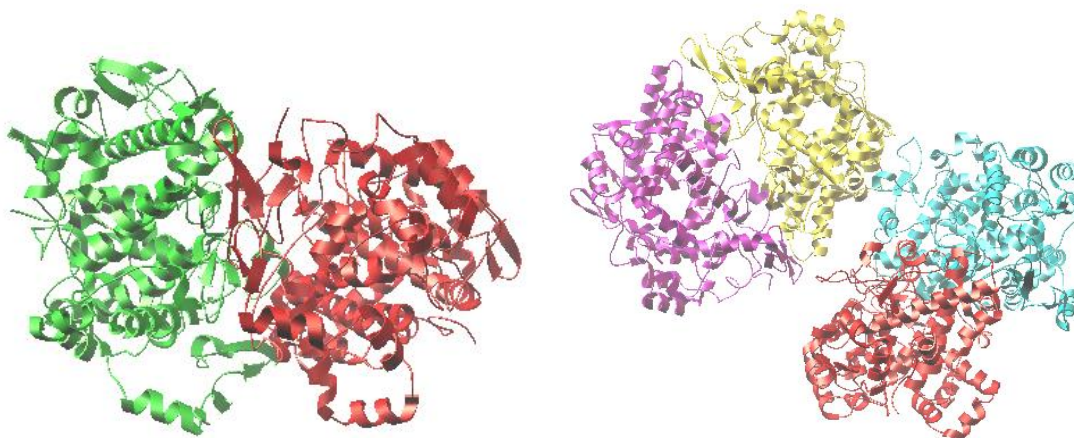


Figura 3.29. Espectro experimental del ibuprofeno (imagen cedida por el Dr. Richard Kjonaas, Indiana State University)

3.3.3. ESTUDIO BIOQUÍMICO

El estudio bioquímico comprendió la interacción del medicamento con el cuerpo humano para ejercer su función farmacológica. En el caso del ibuprofeno, éste une a las enzimas COX-1 y COX-2 para ejercer su acción y al CYP2C9 para su metabolización. En la Figura 3.30 se encuentran las estructuras tridimensionales de la COX-1, COX-2 y CYP2C9. Las enzimas son obtenidas experimentalmente mediante la técnica de rayos X y colocadas en un banco de proteínas (Protein Data Banks) de donde se las puede descargar.



a. Estructura COX 1

b. Estructura COX 2



c. Estructura CYP2C9

Figura 3.30. Enzimas estudiadas

El modelamiento consistió en hacer interaccionar al ligando (que en este caso es el medicamento) con la macromolécula (que en este caso es la enzima). Así se determinan los posibles sitios activos de la enzima que son los que tienen una menor energía (mayor afinidad). El programa Autodock da la posibilidad de seleccionar, para el cálculo de acoplamiento molecular, cualquier zona de la enzima. Esto sirve cuando se tiene una idea en qué zona de la enzima se encuentra el sitio activo. En este caso, se seleccionó toda la enzima como se muestra en la Figura 3.31.

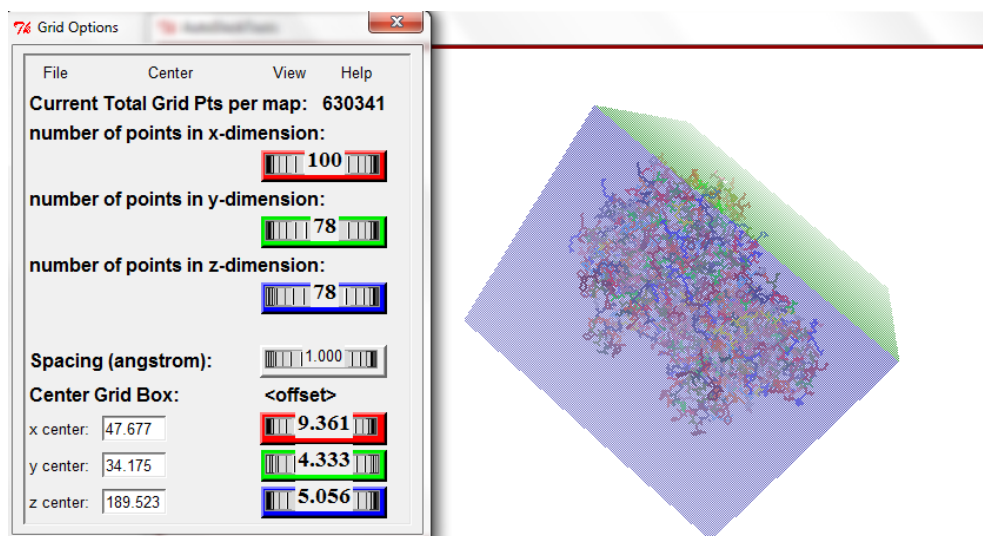


Figura 3.31. Área de análisis para el acoplamiento

Al realizar el cálculo, el programa Autodock 4 muestra 10 resultados diferentes. Cada resultado representa al ligando en una posición espacial diferente. En cada posición se obtiene la afinidad entre la macromolécula y el ligando. En la Tabla 3.14 se presentan las 10 conformaciones obtenidas del acoplamiento del ibuprofeno con la COX-1.

**Tabla 3.14. Conformaciones acoplamiento
ibuprofeno – Ciclooxigenasa-1 con Autodock 4**

# Conformación	Afinidad (kcal/mol)
1	-3,97
2	-3,68
3	-3,76
4	-4,78
5	-3,39

6	-5,09
7	-4,62
8	-3,86
9	-4,51
10	-3,87

Las conformaciones 4 y la 6 son las que tienen menor energía de enlace por lo que son las conformaciones más probables de la interacción. En la Figura 3.32 se muestran las tablas con toda la información sobre estas dos conformaciones obtenidas por el programa.

```

7% Conformation 4 Info
binding_energy=-4.78
ligand_efficiency=0.32
inhib_constant=313.22
inhib_constant_units=uM
intermol_energy=-6.27
vdw_hb_desolv_energy=-5.97
electrostatic_energy=-0.3
total_internal=-0.41
torsional_energy=1.49
unbound_energy=-0.41
/sebas/8avo semestre/tesis/ibuprofeno/Estudio docking/
cIRMS=28.559
refRMS=200.42
rseed1=None
rseed2=None
no hydrogen bonds formed

```

a. Información conformación 4

```

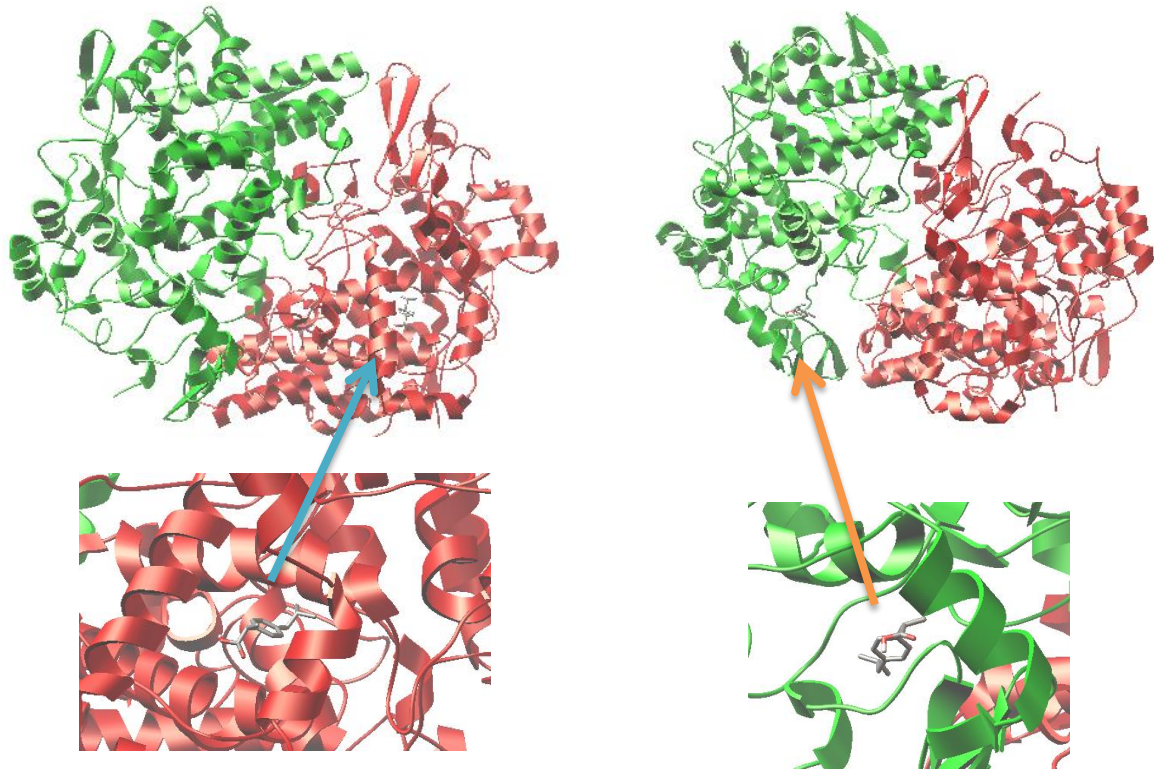
7% Conformation 6 Info
binding_energy=-5.09
ligand_efficiency=0.34
inhib_constant=185.03
inhib_constant_units=uM
intermol_energy=-6.58
vdw_hb_desolv_energy=-6.42
electrostatic_energy=-0.17
total_internal=-0.38
torsional_energy=1.49
unbound_energy=-0.38
/sebas/8avo semestre/tesis/ibuprofeno/Estudio docking/
cIRMS=45.735
refRMS=184.53
rseed1=None
rseed2=None
1 hydrogen bonds formed:
coxunosolito:A:GLN44:HN : sibuprofeno:d:****:O

```

b. Información conformación 6

Figura 3.32. Información completa de las conformaciones

En las Figura 3.33 se muestra la posición en el espacio de estas dos conformaciones dentro de la enzima.



a. Lugar espacial conformación 4

b. Lugar espacial conformación 6

Figura 3.33. Posición espacial de las conformaciones

Las dos conformaciones se encuentran en la parte inferior de la enzima y en dos lugares diferentes. Esto comprueba que la enzima posee dos sitios activos ciclooxigenasa donde el ibuprofeno se une tal como se menciona en el Capítulo I. Se comparó la estructura obtenida con la estructura experimental (obtenida de la oveja doméstica) que se muestra en la Figura 3.34. La enzima muestra los dos sitios activos donde se ubica el ibuprofeno, pero también muestra otras estructuras como glucósidos, agua y el grupo hemo (Protoporfirina IX) que funciona como cofactor de la enzima.

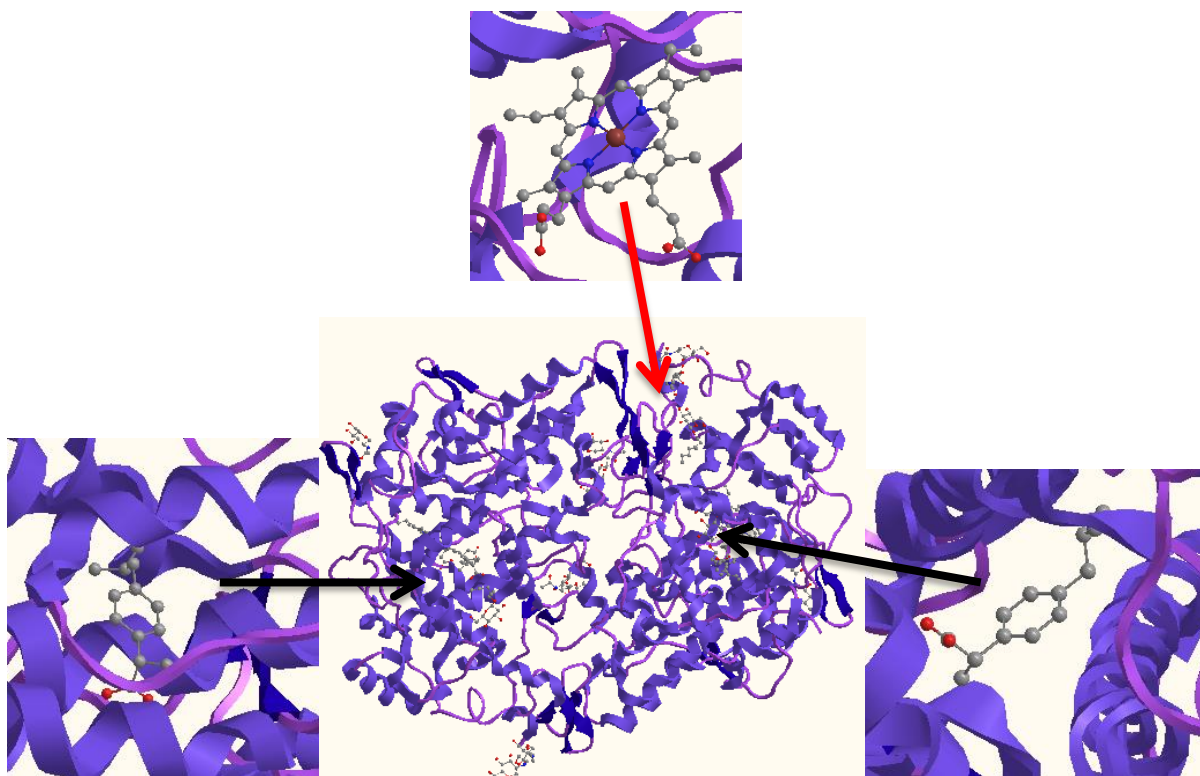


Figura 3.34. Estructura experimental de unión ibuprofeno Ciclooxygenasa-1 [64]

Con esta información se pudo comparar los resultados obtenidos con el dato experimental.



a. Comparación con conformación 4

b. Comparación con conformación 6

Figura 3. 35. Comparación d conformaciones con el resultado experimental

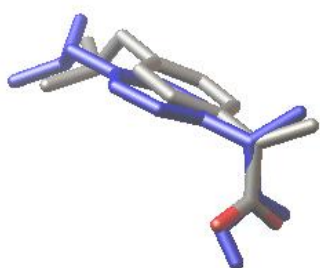
Como se muestra en la Figura 3.35 la molécula experimental se muestra en color gris, mientras que la molécula en azul representa la calculada computacionalmente. Se puede observar que en la conformación 4, ambas moléculas están casi superpuestas, variando ligeramente en la posición; mientras que en la conformación 6, las moléculas están separadas ligeramente. Esto nos demuestra que los resultados obtenidos con el programa Autodock 4 no son 100% iguales a los experimentales, pero si lo suficientemente cercanos demostrando la aplicabilidad de los métodos computacionales.

También se realizó el mismo cálculo utilizando Autodock VINA con el cual se obtuvieron mejores resultados ya que se obtuvieron menores energías, lo que se traduce en mayor afinidad como se observa en la Tabla 3.15.

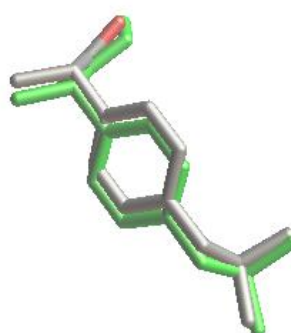
**Tabla 3.15. Resultados ibuprofeno -
Ciclooxigenasa-1 utilizando Autodock VINA**

<i>Conformación</i>	<i>Afinidad (kcal/mol)</i>
1	-7,6
2	-7,6
3	-7,4
4	-7,3
5	-7,3
6	-7,2
7	-7,1
8	-6,7
9	-6,7

Autodock VINA muestra las conformaciones ordenadas energéticamente de menor a mayor por lo que las conformaciones 1 y 2 son las de menor energía. Al comparar los resultados con los obtenidos en Autodock 4, se observa que se obtiene energías menores en casi 2 kcal/mol lo cual crea conformaciones mucho más exactas en comparación con los datos experimentales como se observa en la Figuras 3.36.



a. Comparación con conformación 1



b. Comparación con conformación 2

Figura 3.36. Conformaciones obtenidas con Autodock VINA

La conformación 1 se presenta en color azul mientras la conformación 2 se presenta en color verde. La molécula experimental se muestra de color gris. En este caso se observa que ambas estructuras están superpuestas casi perfectamente. Tanto la conformación 1 como la 2 poseen la misma afinidad lo que indica que tanto en el sitio activo de la derecha como en el de la izquierda, es igualmente probable que entre el ibuprofeno y ejerza su función. El acoplamiento molecular finaliza al acoplar las conformaciones obtenidas dentro de la enzima como se muestra en la Figura 3.37.

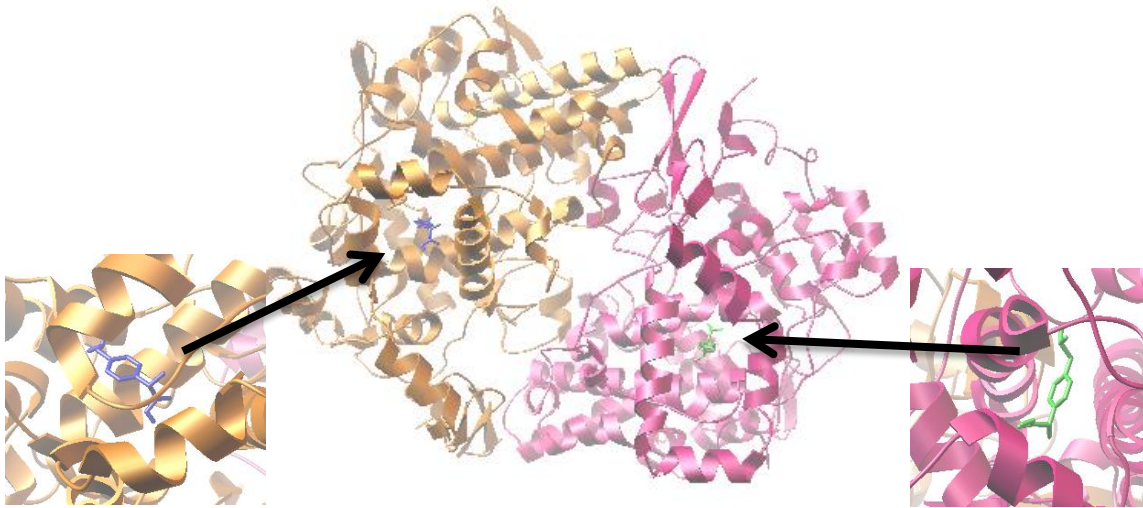


Figura 3.37. Acoplamiento molecular teórico Ibuprofeno - Ciclooxygenasa-1

Debido a que se obtuvieron mejores resultados con Autodock VINA, sólo se mostrarán en este trabajo los acoplamientos obtenidos con este programa. En la Tabla 3.16 se muestran las afinidades de las conformaciones obtenidas de la interacción del ibuprofeno con la COX-2.

**Tabla 3.16. Resultados ibuprofeno -
Ciclooxygenasa-2 utilizando Autodock VINA**

<i>Conformación</i>	<i>Afinidad (kcal/mol)</i>
1	-7,4
2	-7,4
3	-7,4
4	-7,3
5	-6,9
6	-6,9
7	-6,9
8	-6,9

Se tomaron las tres primeras conformaciones ya que son las de menor energía. Las dos primeras se encuentran en el mismo sitio activo de la enzima mientras la conformación 3 se encuentra en el otro sitio activo. A continuación se comparó las conformaciones obtenidas con un modelo experimental de la interacción entre la COX-2 del ratón común con el medicamento celecoxib (Figura 3.38). El celecoxib es un AINE selectivo de la COX-2 por lo que, aunque la forma de unirse a la enzima es diferente, el sitio activo donde se une es el mismo que del ibuprofeno.

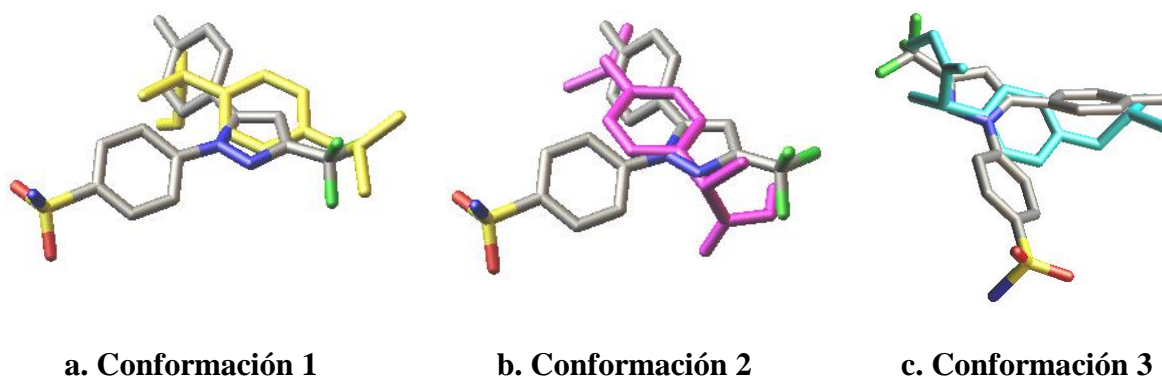


Figura 3.38. Comparación conformaciones ibuprofeno con celecoxib

En la conformación 1, el ibuprofeno se muestra de color amarillo, en la 2 color morado y en la conformación 3, celeste. Las 3 conformaciones se encuentran superpuestas a la molécula de celecoxib lo que indica que el sitio activo encontrado para la COX-2 es el correcto. Para presentar el resultado final (Figura 3.39) del acoplamiento, se tomó la conformación 1 y 3 que son las más probables para cada sitio activo.

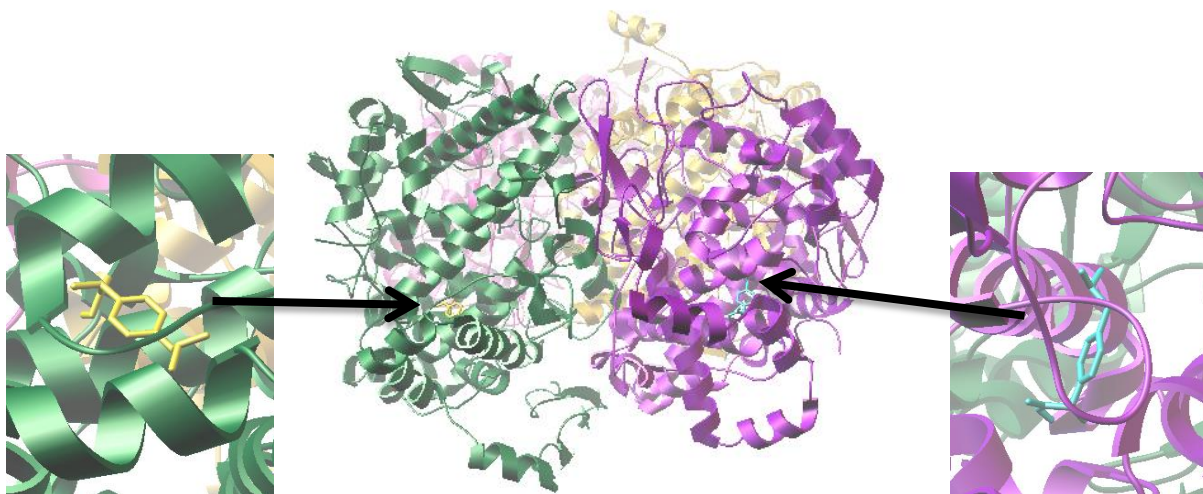


Figura 3.39. Acoplamiento molecular teórico ibuprofeno - Ciclooxygenasa-2

El último acoplamiento se realizó entre el citocromo P450 2C9 y el ibuprofeno. En la Tabla 3.17 se encuentran las conformaciones obtenidas y los valores de afinidad.

**Tabla 3.17. Resultados ibuprofeno –
Citocromo P450 2C9 utilizando
Autodock VINA**

<i>Conformación</i>	<i>Afinidad (kcal/mol)</i>
1	-7,6
2	-6,8
3	-6,8
4	-6,8
5	-6,7
6	-6,1
7	-6,0
8	-5,8

Se tomó la conformación con la mayor afinidad y se la comparó con un modelo experimental de la interacción entre la CYP2C9 de un humano con un AINE derivado del ácido propiónico, el flurbiprofeno (Figura 3.40).

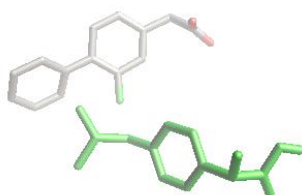


Figura 3.40. Comparación conformación 1

En este caso, las moléculas no se encuentran superpuestas aunque sí se encuentran cercanas una a otra, lo que indica que el sitio activo encontrado computacionalmente es el mismo que el encontrado experimentalmente. Así, en este sitio es donde se va a dar la hidroxilación del grupo isobutilo del ibuprofeno para proceder a la formación de otros metabolitos y su excreción renal. En la Figura 3.41 se muestra el resultado final del acoplamiento molecular.

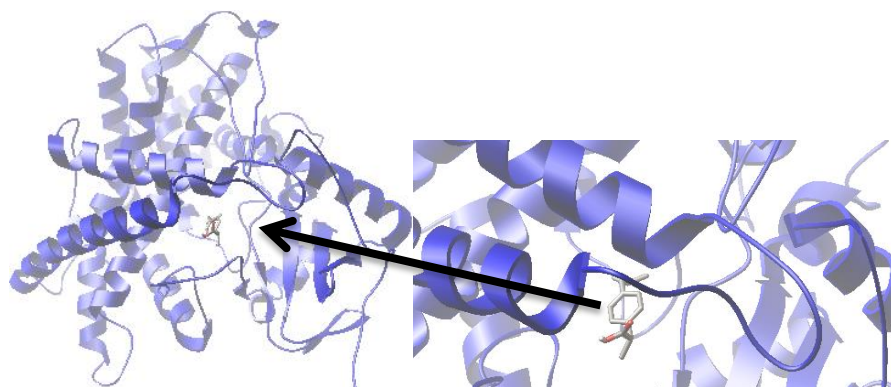


Figura 3.41. Acoplamiento molecular teórico ibuprofeno – Citocromo P450 2C9

Estas comparaciones son muy útiles para determinar la aplicabilidad y exactitud de los resultados obtenidos mediante software computacionales en la búsqueda de sitios activos y de enlaces enzima-sustrato de objetivos biológicos y enzimas de interés. Así, por medio de técnicas computacionales, podemos determinar que el ibuprofeno se une tanto a la ciclooxigenasa 1 y 2 para ejercer su función farmacológica, siendo un medicamento no selectivo, y que su metabolización se da a través de la CYP2C9 donde se hidroxila en el carbono terciario del isobutilo aumentando su solubilidad en agua para una excreción renal.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- ✓ Mediante métodos espectroscópicos se determinó que el producto obtenido de la reacción de síntesis fue ibuprofeno.
- ✓ La reacción experimental tuvo un rendimiento del 1,37% y se obtuvo un producto bastante puro para su identificación.
- ✓ Los espectros obtenidos de las extracciones poseen un coeficiente de correlación mayor del 98% lo que implica que el principio activo de los medicamentos analizados es ibuprofeno.
- ✓ Los espectros IR obtenidos computacionalmente son perfectamente comparables con los obtenidos de la síntesis lo que indica que en cada paso de la síntesis se obtuvo el producto esperado.
- ✓ Al finalizar el estudio de modelamiento molecular del ibuprofeno se concluye que este antiinflamatorio no esteroideo es efectivamente un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa al unirse a ambas isoformas; además posee un metabolismo hepático principalmente por la CYP 2C9.
- ✓ El estudio de modelamiento molecular también mostró que el ibuprofeno se une sólo al sitio activo de la ciclooxigenasa (parte inferior de la enzima) y no afecta la actividad peroxidasa.

- ✓ No existe una diferencia energética entre el R y S ibuprofeno, lo que indica que son igual de estables creándose un 50% de cada isómero durante la síntesis.
- ✓ Los métodos computacionales, tanto el acoplamiento molecular como el modelamiento electrónico estructural, son totalmente comparables con resultados obtenidos experimentalmente demostrando ser bastante precisos. Esto comprueba la aplicabilidad de estos métodos en el proceso de síntesis y diseño de nuevos fármacos.
- ✓ Los espectros experimentales (tanto UV, IR y RMN), al compararlos con los computacionales, poseen pequeñas diferencias causadas por el estado de agregación del cálculo computacional (fase gaseosa).

4.2. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda realizar experimentalmente la síntesis BHC para determinar su efectividad y aplicabilidad en la industria nacional.
- ✓ Se plantea ampliar este estudio y realizar la resolución del ibuprofeno y compararlo con espectros computacionales; además, determinar su velocidad de absorción y efecto en el cuerpo en comparación a la mezcla racémica.
- ✓ Se aconseja utilizar la metodología de este trabajo como base para la localización de sitios activos en diferentes proteínas y determinar la posición del ligando en el bolsillo de la enzima.
- ✓ Se recomienda continuar con la investigación para poder obtener el mecanismo de reacción de las reacciones estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] WHO Media centre, (2010). Medicamentos: Medicamentos esenciales, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs325/es/index.html>, 25/01/2013
- [2] Bruton, L. y Parker, K. (2008). *Manual of Pharmacology and Therapeutics*, McGraw-Hill, USA, pp 428- 432
- [3] Brunton, L. y Parker K. (2008). *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*, McGraw-Hill, USA, pp 421, 428, 429, 436, 451
- [4] DiPiro, J. y Talbert R. (2008). *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 7^{ma} edición, McGraw-Hill, USA, pp 989, 990
- [5] Hall, V., Murillo, N., Rocha, M. y Rodriguez E. (2001). *Antiinflamatorios No Esteroidales*, Centro Nacional de Información de Medicamentos, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, pp 7, 13,14
- [6] Bordés, R., Martínez, M., García, E. y Guisado, R. El Proceso Inflamatorio, <http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>, 04/09/2013
- [7] Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26^{va} edición, McGraw-Hill, USA, pp 49, 50, 190-194
- [8] Dalal, S. y Zhukovsky, D. (2006). Pathophysiology and Management of Fever, *The Journal of Supportive Oncology*, 4, 1, pp 9-16
- [9] Nelson, D. y Cox, M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5^{ta} edición, W.H Freeman and Company, New York, USA, pp 184, 358, 817, 1184

- [10] Thorp, C. (2008). *Pharmacology for the Health Care Professions*, Wiley-Backwell, New Jersey, USA, pp 117-118
- [11] McMurry, J. (2004). *Organic Chemistry*, 6^{ta} edición, Thomson, USA, pp 305, 519, 1034, 1035
- [12] Aronson, J.K. (2010). *Meyler's Side Effects of Analgesic and Anti-inflammatory Drugs*, Elsevier B.V, UK, pp 225-227, 313, 314
- [13] Lednicer, D. (2008). *The organic Chemistry of Drug Synthesis*, Wiley-Interscience, New Jersey, USA, pp 85-86
- [14] Therapeutic Research Center, (2008). Alcohol-related Drug Interactions, *Pharmacist's Letter / Prescriber's Letter*, 24, 240106, pp 1-11
- [15] Levin, C., Kundu, J., Janesko, B., Scuseria, G., Raphael, R. y Halas N. (2008). Interactions of Ibuprofen with Hybrid Lipid Bilayers Probed by Complementary Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopies, *Journal of Physical Chemistry B*, 112, pp 14168–14175
- [16] Solomon, G. y Fryhle, C. (1998). *Fundamentals of Organic Chemistry*, 5^{ta} edición, Wiley-Interscience, New Jersey, USA, pp 209
- [17] Solomon, G. (2011). *Organic Chemistry*, 4^{ta} edición, John Wiley & Sons, Inc., USA, pp 209
- [18] Carroll, F. (1998). *Perspectives on Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Company, USA, pp 75

- [19] Agulló, C. (2004). Química Farmacéutica Química Farmacéutica Tema 2: Propiedades físico-químicas y actividad farmacológica, <http://www.uv.es/agulloc/tema2.pdf>, 15/02/2014
- [20] Martin A. (1993). *Physical Pharmacy*, 4^{ta} edición, Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp 92, 530
- [21] Brown T. (1998). *Química la Ciencia Central*, 7^{ma} edición, Pearson Education, México, pp 521, 524, 526, 527
- [22] RCSB Protein Data Bank, (2001). Ciclooxigenase, <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=17>, 28/08/2013
- [23] Tinoco, Jr., Sauer, K. y Wang J. (1978). *Physical Chemistry Principles and Applications in Biological Sciences*, 3^{era} edición, Prentice Hall, USA, pp 418, 435
- [24] Holme, D. y Peck, H., (1998). *Analytical Biochemistry*, 3^{era} edición, Addison Wesley Longman Limited, London, UK, pp 272
- [25] Blobaum, A. y Marnett, L. (2007). Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition, *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 7, pp 1425-1441
- [26] DeWitt, D. (1999). Cox-2-Selective Inhibitors: The New Super Aspirins, *Molecular Pharmacology*, 55, pp 625–631
- [27] Atkinson, A. y Abernethy, D., (2007). *Principles of Clinical Pharmacology*, 2^{da} edición, Elsevier Inc., UK, pp 146, 149
- [28] Leach, A. (1999). *Molecular Modeling Principles and Applications*, Longman, England, pp 1, 543

- [29] Berka, K., Hendrychova, T., Anzenbacher, P. y Otyepka, M. (2011). Membrane Position of Ibuprofen Agrees with Suggested Access Path Entrance to Cytochrome P450 2C9 Active Site, *Journal of Physical Chemistry A*, 115, pp 11248–11255
- [30] Coleman, M. (2010). *Human Drug Metabolism*, 2^{da} edición, John Wiley & Sons, USA, pp 38, 167
- [31] Leiva, E. y Estrín, D. (2011). Química Computacional: Simulaciones Matemáticas del Comportamiento de Átomos y Moléculas, *Ciencia de Hoy*, 21, 124
- [32] Young, D. (2001). *Computational Chemistry A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*, John Wiley & Sons Inc., USA, pp 1, 3, 19, 86, 113
- [33] Engel, T. (2006). *Quantum Chemistry & Spectroscopy*, Pearson Education Inc., USA, pp 2, 329
- [34] Ramachandran, K. (2008). *Computational Chemistry and Molecular Modeling Principles and Applications*, Springer-Verlag, UK, pp 2, 115
- [35] Foresman, J. (1996). *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 2^{da} edición, Gaussian Inc., USA, pp 13, 61
- [36] Lee, C., Huang, H. y Juan, H. (2011). Reviewing Ligand-Based Rational Drug Design: The Search for an ATP Synthase Inhibitor, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, pp 5304-5318
- [37] Lambert, V. (2007). Dr Stewart Adams: 'I tested ibuprofen on my hangover', <http://www.telegraph.co.uk/health/3351540/Dr-Stewart-Adams-I-tested-ibuprofen-on-my-hangover.html>, 15/09/2013

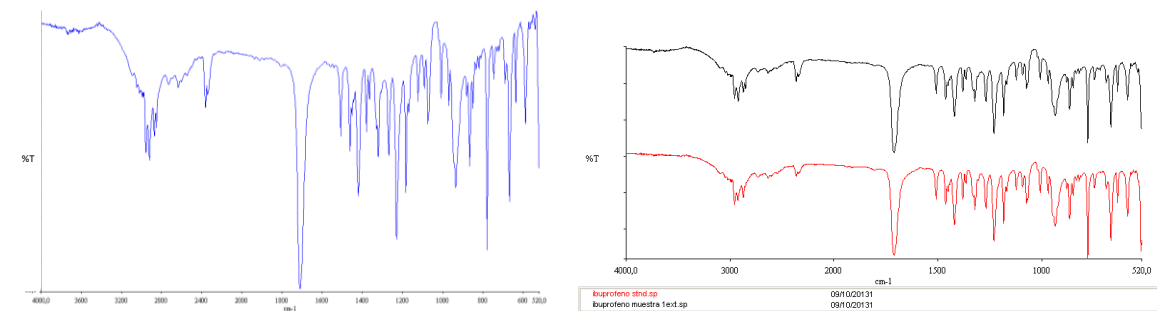
- [38] Mandal, S. y Moudgil, M. (2009). Rational Drug Design, *European Journal of Pharmacology*, 625, pp 90–100
- [39] Rahman, A., Caldwell, G., Choudhary, M. y Yan Z. (2009). *Frontiers in Drug Design and Discovery*, Bentham Science, USA, pp 333, 334
- [40] National Institute of General Medical Sciences, (2011). Structure-Based Drug Design: From the Computer to the Clinic,
<http://publications.nigms.nih.gov/structlife/chapter4.html>, 25/01/2013
- [41] Skoog, D. (2005). *Fundamentos en Química Analítica*, 8^{ava} edición, Thomson, México, pp 796, 800, 821, 824, 922
- [42] Harris, D. (1992). *Análisis Químico Cuantitativo*, Grupo Editorial Iberoamerica, México, pp 604, 605
- [43] Kjonaas, R., Williams, P., Counce, D. y Crawley, L. (2011). Synthesis of Ibuprofen in the Introductory Organic Laboratory, *Journal of Chemical Education*, 88, pp 825–828
- [44] Harris, D. (2005). *Exploring Chemical Analysis*, 3^{era} edición, W.H. Freeman and Company, New York, USA, pp 399, 1480
- [45] Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L. (2012). *Biochemistry*, 7^{ma} edición, W.H. Freeman and Company, New York, pp 402
- [46] Pavia, D., Lampman, G. y Kris, G. (2001). *Introduction to Spectroscopy*, 3^{era} edición, Thomson Learning Inc., USA, pp 14, 15, 23, 102, 103, 110, 353
- [47] Swarbrick, (2006). *Spectroscopy of Pharmaceutical Solids*, Taylor & Francis Group, USA, pp 246

- [48] Harvey, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, USA, pp 403
- [49] Skoog, D. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, 5^{ta} edición, McGraw-Hill, Madrid, España, pp 346, 481
- [50] Rubbinson, K. y Rubbinson J. (2001). *Análisis Instrumental*, Pearson Education, Madrid, España, pp 484-486
- [51] Gaussian Inc. (2013). Gaussian 09: Expanding the limits of computational chemistry, http://www.gaussian.com/g_prod/g09b.htm, 24/09/2013
- [52] The Scripps Research Institute, (2013). Autodock, <http://autodock.scripps.edu/>, 24/09/2013
- [53] Swarbrick, J. (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3^{era} edición, Informa Healthcare, New York, USA, pp 421, 3605
- [54] Gil, J., Vargas, L., Florez, O. y Tobónz G. (2009). Efecto del Solvente de Recristalización y del Tamaño de Partícula sobre la Humectabilidad del Ibuprofeno, *Vitae*, 16, 1, pp 49-54
- [55] The United States Pharmacopeia Convention, (2010). USP 34-NF 29, First Supplement, Chemical Tests / [197] Spectrophotometric Identification Tests, pp 1
- [56] The United States Pharmacopeia Convention, (2008). USP 32-NF 27, Official Monographs, Monograph list 3, pp 1-6
- [57] Council of Europe, (2007). *European Pharmacopoeia: supplement 6.1*. 6^{ta} edición, Strasbourg, pp 3479-3481
- [58] Levine, I. (2004). *Fisicoquímica*, 5^{ta} edición, McGraw-Hill, Madrid, España, pp 169
- [59] The United States Pharmacopeial Convention, (2012). USP 36-NF 31, Physical Tests / [851] Spectrophotometry and Light-Scattering, pp 1-6

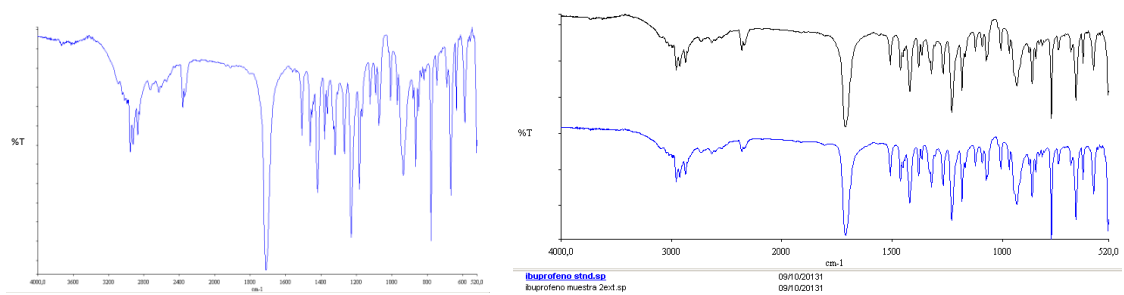
- [60] Barone, V. (2012). Computational Strategies for Spectroscopy From Small Molecules to Nano Systems, John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, pp 53-55
- [61] Palop, J. (s/a). Tutorial para la interpretación de espectros de resonancia magnética nuclear de protón, www.unav.es/ocw/avanzada_q/TUTOR_RMN.pdf, 27/02/2014
- [62] Chemical book INC. (2008), Ibuprofen (15687-27-1) ¹HNMR, http://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_15687-27-1_1HNMR.htm, 09/11/2014
- [63] Field, L., Sternhell, S. y Kalman J. (2013). Organic Structures from Spectra, 5^{ta} edición, John Wiley & Sons Ltd, London, pp 52, 53
- [64] The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (2013). The 2.6 angstrom model of ovine cox-1 complexed with ibuprofen, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EQG>, 02/03/2013
- [65] Department of Chemistry of the University of Wisconsin-Madison, (2013). Simplified Infrared Correlation Chart, <https://www.chem.wisc.edu/deptfiles/OrgLab/handouts/Simplified%20IR%20Correlation%20Chart.pdf>, 15/05/2013

ANEXOS

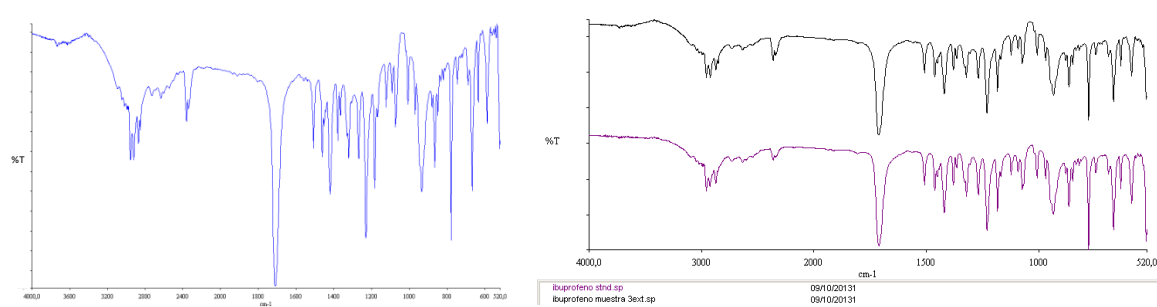
ANEXO 1. ESPECTROS DEL IBUPROFENO OBTENIDOS DE LA EXTRACCIÓN



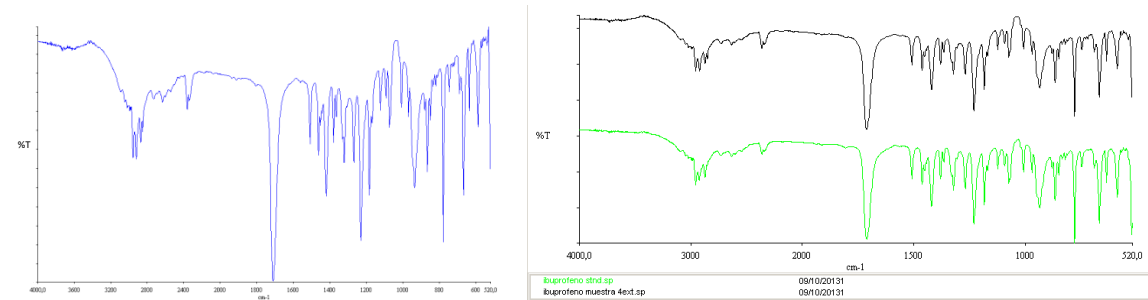
a. Espectro IR Buprex Fem y su comparación con el estándar



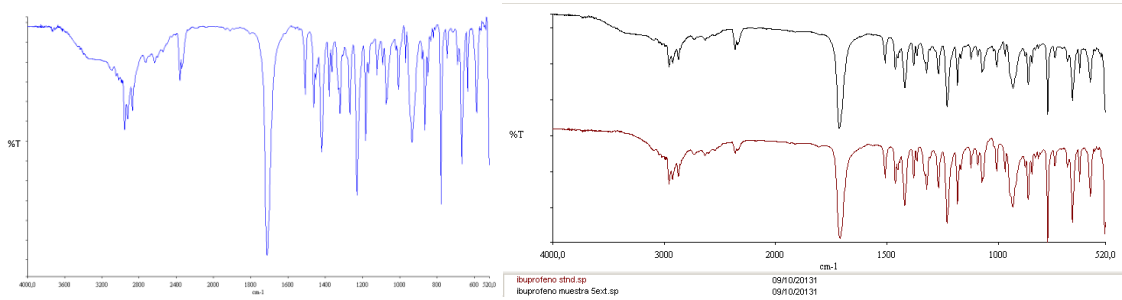
b. Espectro IR Advil y su comparación con el estándar



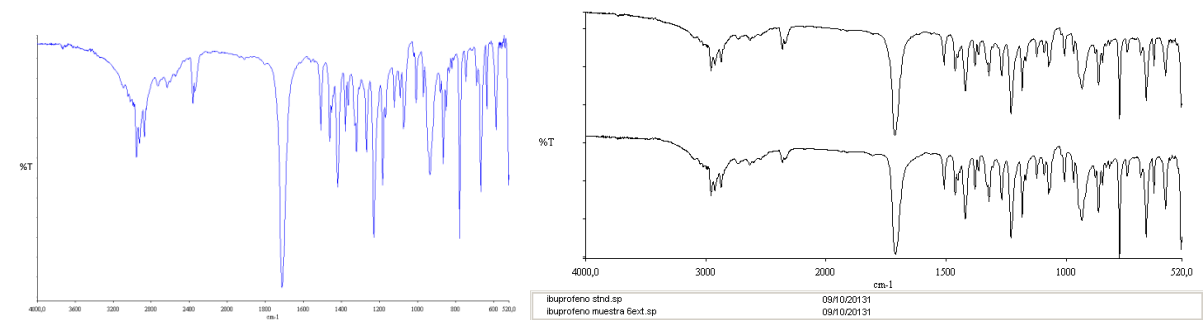
c. Espectro IR Ibuprofeno Genamérica y su comparación con el estándar



d. Espectro IR Provinex y su comparación con el estándar

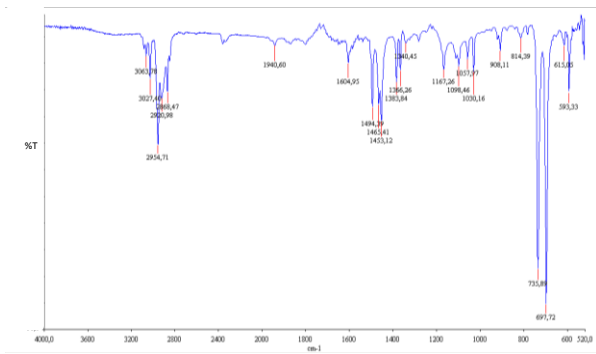


e. Espectro IR Buprex suspensión y su comparación con el estándar

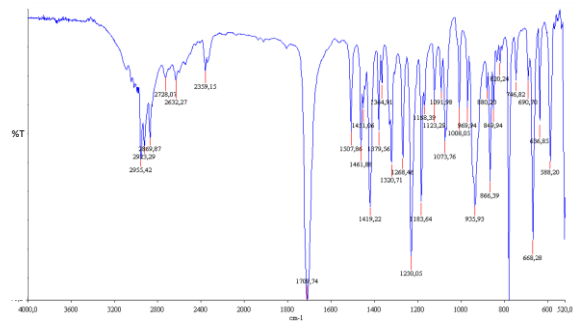


f. Espectro IR Buprex Flash y su comparación con el estándar

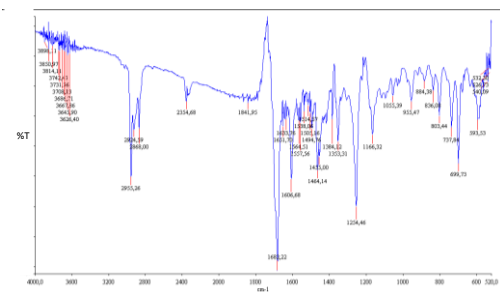
ANEXO 2. ESPECTROS IR DE LA SÍNTESIS EXPERIMENTAL



a. Espectro IR del Isobutilbenzeno



b. Espectro IR del estándar Ibuprofeno



ANEXO 3. RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS

Tabla A.1. Características de compuestos representativos de la reacción

<i>Compuesto</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Peso molecular</i> (g/mol)	<i>Densidad</i> (g/cm ³)
<i>Isobutilbenceno</i>	<i>C₁₀H₁₄</i>	134.22	0.853
<i>Anhídrido acético</i>	<i>C₄H₆O₃</i>	102,10	1,08
<i>4-isobutilacetofenona</i>	<i>C₁₂H₁₆O</i>	176,26	0,952
<i>1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno</i>	<i>C₁₂H₁₇Cl</i>	196.72	0.980
<i>Ibuprofeno</i>	<i>C₁₃H₁₈O₂</i>	206.29	<i>Sólido</i>

Tabla A.2. Cantidad de reactivo reaccionado

<i>Reacción</i>	<i>Reactivo limitante</i>	<i>Volumen</i>	<i>Peso</i>	<i>Moles</i>
<i>Parte 1</i>	Isobutil benceno	10 mL	8,530 g	0,0636 moles
<i>Parte 2</i>	4-isobutilacetofenona	4 mL	3,808 g	0,0216 moles
<i>Parte 3</i>	1-(1-cloroetil)-4-isobutilbenceno	1 mL	0,980 g	0,0050 moles

Tabla A.3. Cantidad de producto obtenido de las reacciones

<i>Reacción</i>	<i>Balón vacío</i>	<i>Balón con muestra</i>	<i>Muestra</i>	<i>Moles</i>
<i>Parte 1</i>	63,6036 g	71,5715 g	7,9679 g	0,0452 moles
<i>Parte 2</i>	64,2988 g	66,3388 g	2,0400 g	0,0104 moles
<i>Parte 3</i>	63,6042 g	63,6369 g	0,0327 g	0,0002 moles

ANEXO 4. TABLAS DE CORRELACIÓN

Tabla A.4. Tabla de frecuencias de absorción infrarroja [65]

<i>Tipo de vibración</i>		<i>Frecuencia (cm⁻¹)</i>	<i>Intensidad</i>
C-H	Alcanos (estiramiento)	3000-2850	a
	-CH ₃ (flexión)	1450 and 1375	m
	-CH ₂ - (flexión)	1465	m
	Alquenos (estiramiento)	3100-3000	m
	(flexión fuera del plano)	1000-650	a
	Aromáticos (estiramiento)	3150-3050	a
	(flexión fuera del plano)	900-690	a
	Alquinos (estiramiento)	~3300	a
	Aldehído	2900-2800	d
		2800-2700	d
C-C	Alcano No se usa para interpretación		
C=C	Alqueno	1680-1600	m-d
	Aromatico	1600 and 1475	m-d
C≡C	Alquino	2250-2100	m-d
C=O	Aldehído	1740-1720	a
	Cetona	1725-1705	a
	Ácido carboxílico	1725-1700	a
	Éster	1750-1730	a
	Amida	1670-1640	a
	Anhídrido	1810 and 1760	a
	Cloruro de ácido	1800	a
C-O	Alcoholes, Eteres, Esteres, Ácidos carboxylicos, Anhídridos	1300-1000	a
O-H	Alcoholes, Fenoles		
	Libre	3650-3600	m
	Unido a H	3500-3200	m
	Ácido carboxílico	3400-2400	m
N-H	Aminas y Amidas primarias y secundarias (estiramiento)	3500-3100	m
	(flexión)	1640-1550	m-a
C-N	Aminas	1350-1000	m-a
C=N	Iminas and Oximas	1690-1640	d-a
C≡N	Nitrilos	2260-2240	m
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 and 1350	a
C-X	Fluoruro	1400-1000	a
	Chloruro	800-600	a
	Bromuro, Ioduro	< 667	a

*d=débil; m=media, a=alta

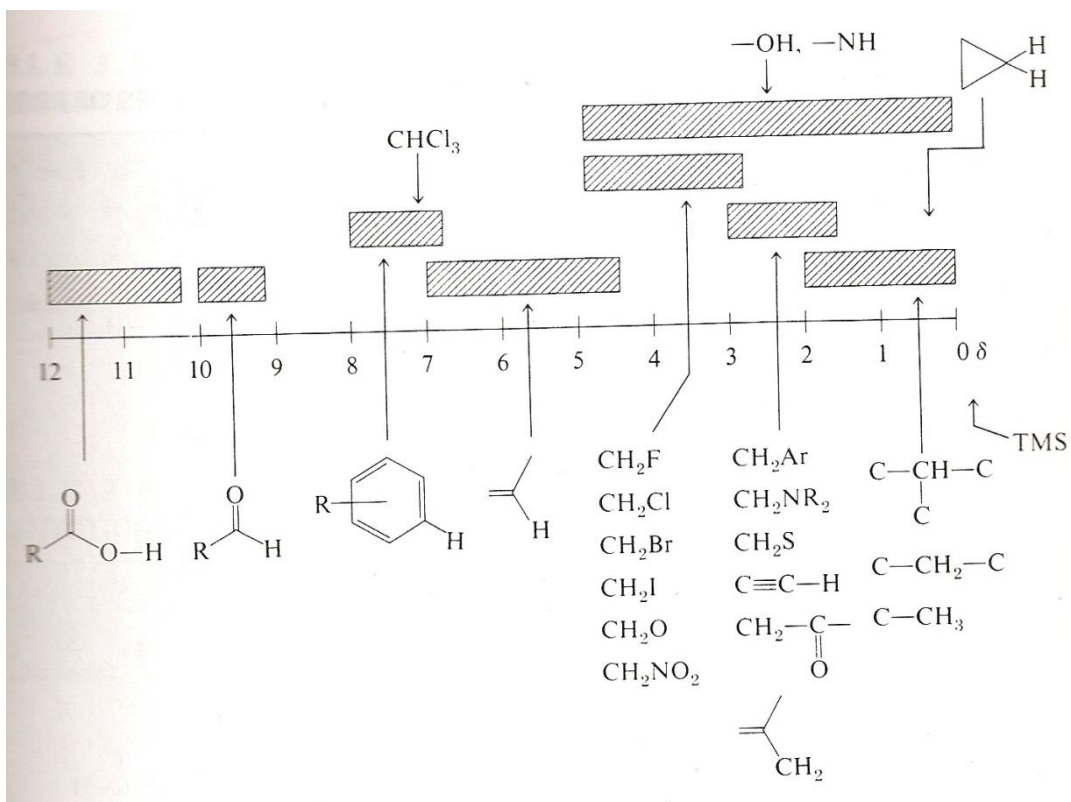


Figura A. 1 Gráfico de correlación para valores de desplazamientos químicos de protón

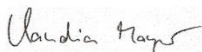
[46]

ANEXO 5. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE REACTIVOS

Certificate of Analysis

Product Name: SODIUM BOROHYDRIDE
 purum p.a., >= 96 % gas-volumetric
Product Number: 71320
Batch Number: STBD0715V
Brand: Aldrich
CAS Number: 16940-66-2
Formula: H₄BNa
Formula Weight: 37.83
Quality Release Date: 13 DEC 2012
Recommended Retest Date: JUN 2016

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER TO POWDER WITH LUMPS	POWDER
ASSAY (GASVOLUMETR.)	96.0 - 104.0 %	103.0 %
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS	PASSED
CALCIUM (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
CADMIUM (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COBALT (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COPPER (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
IRON (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
POTASSIUM (ICP)	≤ 1000 MG/KG	< 1000 MG/KG
NICKEL (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
LEAD (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
ZINC (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
TOTAL SULFUR AS SO ₄ (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
CHLORIDE (CL)	≤ 5000 MG/KG	< 5000 MG/KG



Claudia Mayer, Manager
 Quality Control
 Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificate of Analysis

Product Name:

Tetrahydrofuran - anhydrous, ≥99.9%, inhibitor-free

Product Number: 401757
Batch Number: SHBC8891V
Brand: SIAL
CAS Number: 109-99-9
MDL Number: MFCD00005356
Formula: C₄H₈O
Formula Weight: 72.11 g/mol
Quality Release Date: 28 DEC 2012



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	≥ 99.90 %	99.91 %
Residue on Evaporation	< 0.0005 %	0.0002 %
Peroxide	< 20 ppm	12 ppm
Water (by Karl Fischer)	< 0.002 %	0.001 %
Note	-----	-----
For 100 mL unit size, water content may exceed above specification; not to exceed 0.005%.		

Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Sheboygan Falls, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

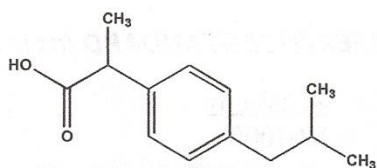


Certificate of Analysis

ISO GUIDE 34
ACCLASS Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025
ACCLASS Cert# AT-1467

IBUPROFEN CERTIFIED REFERENCE MATERIAL



CERTIFIED PURITY: 99.9%, $U_{\text{CRM}} = \pm 0.1\%$ $k = 2$
(Mass Balance/as is basis)

NOMINAL PACKAGE SIZE: 1g

CATALOG #: PHR1004

LOT #: P500004

CERTIFICATE VERSION: 500004.10

ISSUE DATE: 17 April 2012

Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot changes or the availability of new data.

Check our website at: www.RT-Corp.com or www.sigma-aldrich.com for the most current version.

CRM EXPIRATION: 12 Months from Receipt (Proper Storage and Handling Required).

RECEIPT DATE: _____

Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

STORAGE: Store at Room Temperature, keep container tightly closed. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

CHEMICAL FORMULA: $C_{13}H_{18}O_2$

MW: 206.29

PHYSICAL DESCRIPTION: White Powder in amber vial.

CAS #: 15687-27-1

HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.



SIGMA-ALDRICH

Page 1 of 8



INSTRUCTIONS FOR USE: Do not dry, use as is. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. This material is intended for R&D use only. Not for drug, household or other uses.

TRACEABILITY ASSAY

Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards
Specification: 97.0-103.0 % (anhydrous, USP)

ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (as is basis)

ASSAY VALUE
99.5%

vs. USP LOT
K0J008

Labeled Content = 0.999mg/mg

METHOD: HPLC (ref.: Ibuprofen; USP32)

Column: ProteCol-GP C18 125, 4.6 x 250mm, 5µm

Mobile Phase: Acetonitrile/Water/chloroacetic acid (600:400:4)

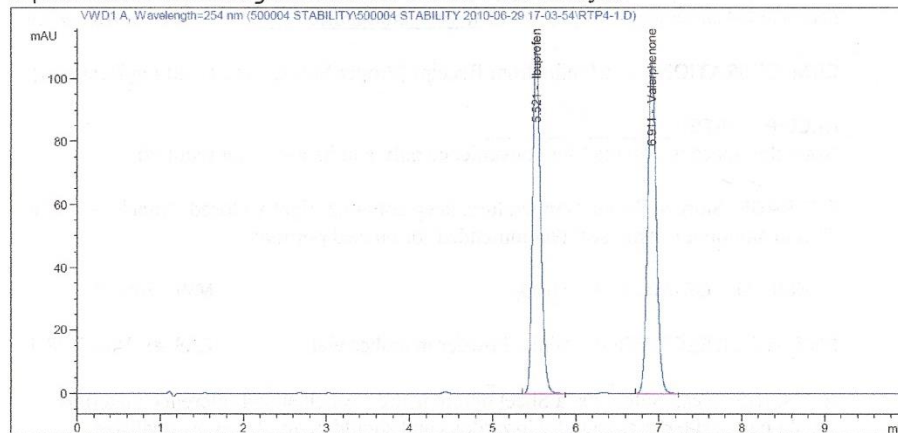
Column Temperature: 30°C

Flow Rate: 2 mL/min

Injection: 5µl

Detector Wavelength: 254 nm

Representative Chromatogram from Lot: P500004 USP Analysis





ASSAY vs. EP CRS (as is basis)

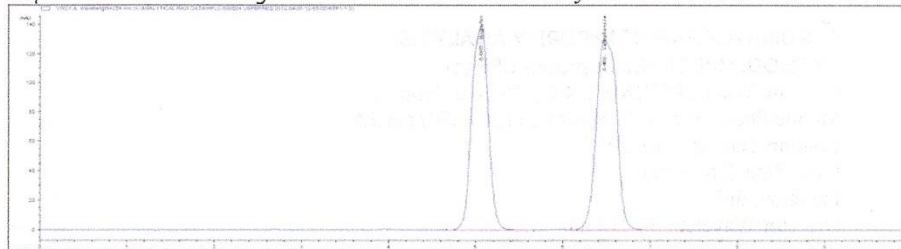
<u>ASSAY VALUE</u>	<u>vs. EP BATCH</u>
99.8%	5.0
	Labeled Content = None
	Assigned Content = 99.8% *

METHOD: HPLC (ref.: Ibuprofen; USP34)

Column: Ascentis C18, 4.6 x 250mm, 5µm
Mobile Phase: Acetonitrile/Water/chloroacetic acid (600:400:4)
Column Temperature: 30°C
Flow Rate: 2 mL/min
Injection: 10µl
Detector Wavelength: 254 nm

*The assigned content of the EP CRS was determined by assay against the USP Reference Standard

Representative Chromatogram from Lot: P500004 EP Analysis



ASSAY vs. BP CRS (as is basis)

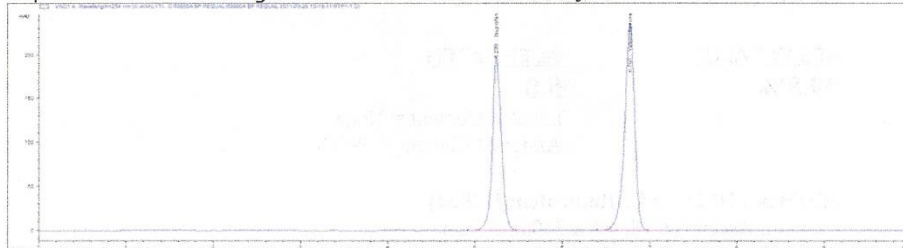
<u>ASSAY VALUE</u>	<u>vs. BP BATCH</u>
101.2%	3309
	Labeled Content = 99.9%

METHOD: HPLC (ref.: Ibuprofen; USP34)

Column: Ascentis C18, 4.6 x 250mm, 5µm
Mobile Phase: Acetonitrile/Water/chloroacetic acid (600:400:4)
Column Temperature: 30°C
Flow Rate: 2 mL/min
Injection: 10µl
Detector Wavelength: 254 nm



Representative Chromatogram from Lot: P500004 BP Analysis



ASSAY BY TITRATION

Method: Dissolve in MeOH. Titrate with 0.1 M NaOH to phenolphthalein end point.
Ref.: Ibuprofen; EP6

Mean of nine measurements: **99.7%**

PURITY DETERMINATION BY MASS BALANCE

CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS

METHOD: HPLC (ref.: Ibuprofen USP32)

Column: Wakosil 5C18 RS, 4.6 x 150mm, 5 μ m

Mobile Phase: Water/Acetonitrile (1340:680) pH 2.5

Column Temperature: 30°C

Flow Rate: 2 mL/min

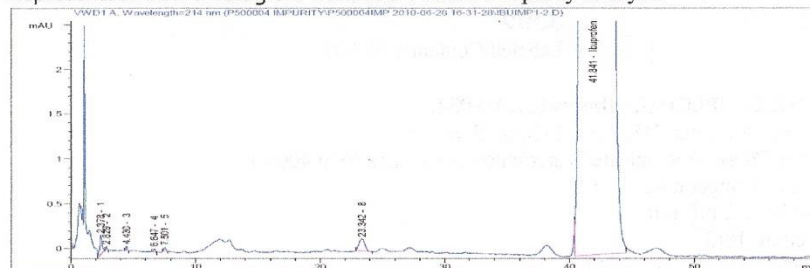
Injection: 5 μ l

Detector Wavelength: 214 nm

Six individual impurities detected

Total Detected Impurities: **0.03%**

Representative Chromatogram from Lot: P500004 Impurity Analysis





RESIDUAL SOLVENTS

Method: GC-MS Headspace (ref.: Residual Solvents <467>, USP34)
Column: DB-1301
Carrier gas: He
Flow: 1.2mL/min
Split Ratio: 1:5
Injection/Temperature: 1µl/250°C
Temperature Program: 40°C for 20min, 10°C/min to 240°C, hold 20min

Solvents Detected: None

WATER DETERMINATION

Method: Karl Fisher titration after drying over P₂O₅
Mean of three samples, Water Content = **0.04 %**

LOSS ON DRYING/VOLATILES

Method: Dry in vacuum over P₂O₅
Mean of three samples, Loss = **0.008 %**

RESIDUE ANALYSIS

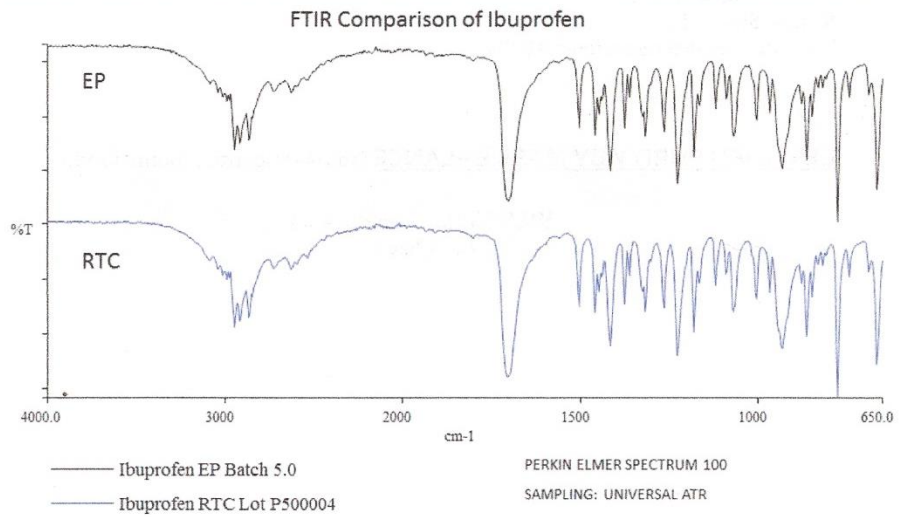
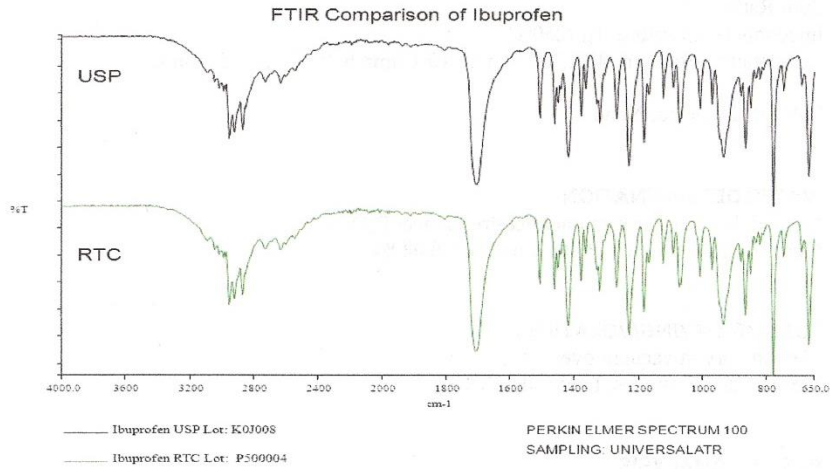
Method: Sulfated Ash
Sample Size: ~ 1 g
Mean of three determinations: **0.02%**

CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE [100% - Impurities (normalized)]

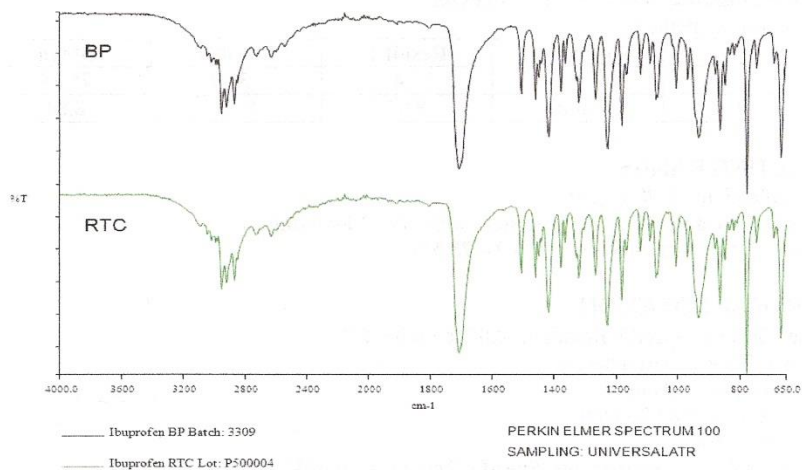
99.9% U_{CRM} = ±0.1%, k = 2
(as is basis)

IDENTIFICATION TESTS

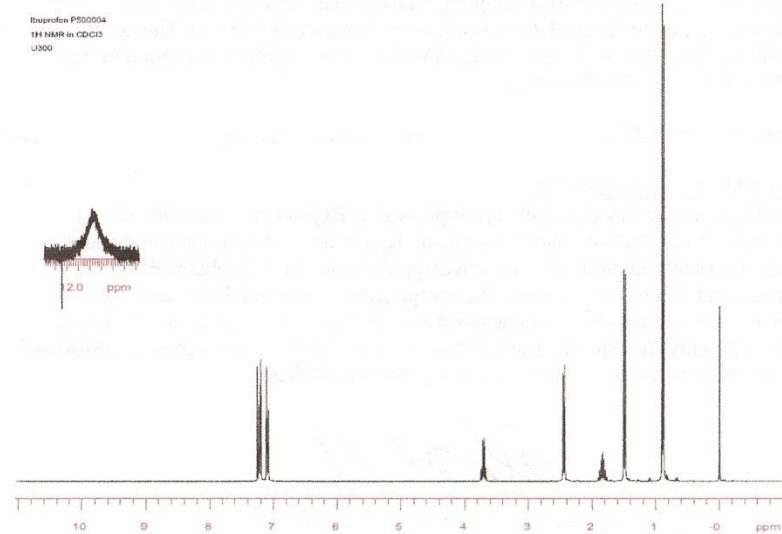
INFRARED SPECTROPHOTOMETRY (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopeial standards)



FTIR Comparison of Ibuprofen



¹H NMR (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)



Consistent with structure



ELEMENTAL ANALYSIS (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)

Exeter Analytical 440 Elemental Analyzer

Combustion method

%	Theoretical	Result 1	Result 2	Mean
C	75.69	75.47	75.49	75.48
H	8.80	8.88	8.79	8.84

MELTING RANGE

Specification: 75-78°C (EP)

Mettler Toledo FP900 Thermosystem with FP81 Measuring Cell

Mean of nine measurements = **75.0 – 75.3 °C**

OPTICAL ROTATION

Specification: Specific Rotation: -0.05 to +0.05 (EP)

Perkin Elmer Polarimeter 343

Wavelength: 589 nm

Concentration: 0.025 g/mL

Cell Path: 100 mm

Mean of three Measurements, Specific Rotation = **-0.0137**

HOMOGENEITY ASSESSMENT

Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical Method: HPLC

Sample size: ~120mg

UNCERTAINTY STATEMENT

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U_{cm}) corresponding to the 95% confidence interval. U_{cm} is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

General Manager, Pharmaceutical Standards Operations

Manufactured and certified by Sigma-Aldrich RTC, Inc.



Page 8 of 8

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Sebastián Adolfo Cuesta Hoyos, C.I. 171636188-4 autor del trabajo de graduación titulado: “Estudio químico, computacional y farmacológico de Ibuprofeno”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA** en la Facultad de **Ciencias Exactas y Naturales**:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 21 de Abril del 2014

Sr. Sebastián Adolfo Cuesta Hoyos

C.I. 171636188-4