



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ DEL FÁRMACO
ANTI-INFLAMATORIO ISOXICAM”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NORMA ALICIA HERRERA CÁRDENAS

ASESORES: Dra. MARÍA DEL ROSARIO MOYA HERNÁNDEZ

Dr. ALBERTO ROJAS HERNÁNDEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

MAMI

*Gracias por darme la vida, estar al pendiente en cada pasó que damos y sobre todo por demostrar tu fortaleza. Sabes ahora que estuve más tiempo contigo, me di cuenta que **ERES LA MAMI MÁS LINDA, CARIÑOSA Y AGRADABLE QUE QUIERO Y AMO CON TODO MI CORAZÓN.***

Te agradezco por ser la mujer en la que me he convertido, me enseñaste que los obstáculos en el camino hay que quitarlos para poder crecer y tener el éxito anhelado; que solo una persona valiente tiene las agallas para llegara la meta.

*Quiero que sepas que desde niña fuiste mi modelo a seguir, **MAMI ESTE TRIUNFO ES TUYO. GRACIAS POR TÚ APOYO, CARIÑO Y COMPRENSIÓN.***

GRACIAS ALICIA TÉ QUIERO MUCHO.

A MIS HERMANOS

Gonzalo y Ruth les agradezco cada momento de alegría y tristeza compartidas. HERMANITA gracias por todo el apoyo que me brindas.

LOS QUIERO MUCHO

A MI PADRE

Te agradezco la confianza que tienes en mí. El pasó que estoy dando, es una muestra que el pasado quedo atrás.

No tiene caso mirar hacia atrás y mucho menos tener resentimientos, al contrario eso es lo que hace que la gente sea más fuerte.

TE QUIERO PAPÁ

A MI AMIGA ERIKA SÁNCHEZ REYES

Por animarme a seguir con los estudios de licenciatura, gracias por se mi amiga desde hace 12 años y sobre todo brindarme la mano, en aquellas ocasiones que me hace falta palabras de consuelo y un hombro en quién apoyarme.

TE QUIERO MUCHO

A CINTÍA MEDINA

Por cada momento de convivencia familiar, sabes que más que una amiga eres como una hermana, me da gusto haber encontrado una persona como tú con la que puede compartir parte de mi vida en la licenciatura.

TE QUIERO MUCHO

A MIS AMIGOS

Antonio Zamora, Diego Moreno, César, Carlitos, Erika Sánchez, Cintía Medina, Guadalupe Ugalde, Mireya Valle, Alicia Hernández, Fabiola Moreno, Erika Barrera, Rocío Chávez, Eva Irma, Gabriela Roldán, Sandra Martínez por su apoyo y animo cuando estuve convaleciente.

A MIS AMIGOS

Luis Reyes, Norma Rodríguez, Rodolfo Gómez por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes en la facultad y realizar un buen trabajo en equipo.

A MI ASESORA Y AMIGA ROSARIO MOYA

Gracias por el apoyo brindado durante la realización de la tesis y en cada uno de los congresos de Química Analítica.

Gracias por escucharme en aquellos momentos en los que sentía que no podía cumplir con mi objetivo y sobre todo gracias por cada consejo brindado.

A MI AMIGA MERCEDES

Por todo el cariño y comprensión que me brindaste, para poder reconocer la persona que soy. Que soy la dueña de mi vida y decido el camino que quiero para poder alcanzar lo que siempre he deseado.

TE QUIERO.

MUCHAS GRACIAS POR CADA PALABRA DE CONSUELO.

INDICE

1. Introducción	1
2. Objetivo general	4
2.1. Objetivos específicos	5
3. Antecedentes	6
3.1. Oxicams	
3.2. Métodos espectrométricos	10
3.2.1. Espectrofotometría de absorción molecular Ultravioleta/Visible	15
3.3. Métodos de determinación de constantes de formación	23
3.3.1. Métodos gráficos tradicionales	25
3.3.2. Métodos computacionales	33
4. Materiales y Métodos	39
5. Procedimiento Experimental	42
5.1. Determinación de concentración de isoxicam óptima de trabajo en medio acuoso	43
5.2. Determinación de pKa de isoxicam en medio acuoso, bajo condiciones pseudofisiológicas.	44
5.3. Determinación de concentración de isoxicam en diferentes mezclas DMSO-H ₂ O.	47
5.4. Especiación de isoxicam en mezcla (10% DMSO-90% H ₂ O)	48

6. Resultados	51
6.1. Concentración óptima de trabajo de isoxicam en medio acuoso	52
6.2. Valoraciones ácido-base de isoxicam en medio acuoso seguidas espectrofotométricamente, bajo condiciones Pseudofisiológicas	53
6.3. Valoración ácido-base del anti-inflamatorio isoxicam en mezclas DMSO-H ₂ O (10% DMSO-90% H ₂ O) seguidas espectrofotométricamente, bajo condiciones Pseudofisiológicas	57
7. Análisis de Resultados	61
7.1. Concentración óptima de isoxicam en mezclas DMSO-H ₂ O	62
7.2. Determinación del pKa de isoxcam a en medio acuoso bajo condiciones pseudofisiológicas.	63
7.3. Determinación de la constante de acidez del fármaco isoxicam en mezclas DMSO-H ₂ O (10%-90%) a 37°C y I=0.15M	70
8. Conclusiones	77
9. Referencias	79
10. Anexos	83
Anexo 1	84
10.1. Electroforesis capilar	85
10.2. Determinación de la carga eléctrica sobre las especies formadas a partir de un estudio de Electroforesis capilar	87
10.3. Resonancia Magnética Nuclear	91

10.4.	Resonancia Magnética bidimensional	97
10.5.	Estudios preliminares de isoxicam a través de estudios de Resonancia Magnética Nuclear	100
Anexo 2		110
10.6.	Datos estadísticos del programa computacional SQUAD	111

1. INTRODUCCIÓN.

La determinación de las diferentes especies ácido-base de un fármaco es de suma importancia ya que proporciona información acerca del mecanismo de acción del fármaco.

De esta manera al conocer las especies ácido-base y las constantes de acidez de un fármaco, se puede saber que especie es la que va absorber el organismo y el lugar de absorción del fármaco.

La constante de acidez de un fármaco está relacionada con pH y el grado de ionización como se representa en la ecuación de Henderson-Hasselbach (*ecuación 1.1*)

$$pH = pKa + \log \frac{A^-}{HA} \quad \text{ecuación 1.1}$$

Una de las enfermedades más comunes en la actualidad es la artritis reumatoide, que causa inflamación en músculos y articulaciones ⁽¹⁻⁴⁾. Entre los fármacos utilizados en estos últimos años se encuentra la familia de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's), Los AINE's son un conjunto de fármacos analgésicos estructuralmente diferentes ⁽⁵⁾. Estos fármacos tienen tres efectos principales: anti-inflamatorio, analgésico y antipirético ⁽⁵⁻⁶⁾. La mayoría de los AINE's son ácidos débiles con valores de pka que oscilan entre 3-5. ⁽⁷⁾

La familia de los oxicams integrada por piroxicam, tenoxicam, meloxicam, isoxicam y lornoxicam pertenecen al grupo de los AINE's. ⁽⁸⁾.

De la familia de los oxicams, los más estudiados hasta ahora han sido el piroxicam y el tenoxicam. En este trabajo se pretende determinar las constantes de acidez del fármaco isoxicam.

Actualmente resulta importante utilizar métodos numéricos ⁽⁹⁻¹⁵⁾ que ofrecen mayor exactitud que los métodos gráficos comunes empleados en la determinación de estas constantes termodinámicas.

Uno de los problemas que presenta la familia de los oxicams, es que son casi insolubles en agua por esta razón es necesario recurrir a solventes orgánicos para aumentar la solubilidad del fármaco en cuestión.

Debido a que el cuerpo humano presenta una fuerza iónica de 0.15M y una temperatura entre 36.2°C y 37°C fue necesario semejar dichas condiciones al momento de trabajar con la finalidad de acercarse al mecanismo de acción del fármaco.

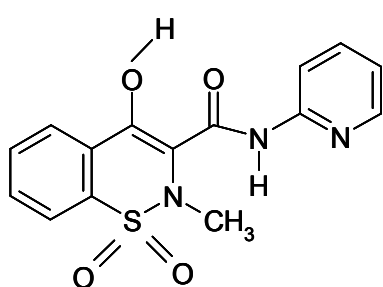
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las diferentes especies ácido-base que presenta el fármaco isoxicam en medio acuoso bajo condiciones pseudofisiológicas ($T=37^{\circ}\text{C}$, $I=0.15\text{M}$ con NaCl) a partir de valoraciones espectrofotométricas con la evidencia de puntos isobésticos y el programa computacional TRIANG.
2. Identificar las diferentes especies ácido-base que presenta el fármaco isoxicam en mezclas DMSO- H_2O (10%-90%) a $T=37^{\circ}\text{C}$, $I=0.15\text{M}$ con NaCl, a partir de valoraciones espectrofotométricas con la evidencia de puntos isobésticos y el programa computacional TRIANG.
3. Determinar las constantes de acidez del fármaco en medio acuoso, a partir de valoraciones espectrofotométricas, utilizando el programa computacional SQUAD.
4. Determinar las constantes de acidez del fármaco en mezclas DMSO- H_2O , a partir de valoraciones espectrofotométricas, utilizando el programa computacional SQUAD.
5. Presentar evidencias de las especies presentes del fármaco por los métodos de Electroforesis Capilar y Resonancia Magnética Nuclear.

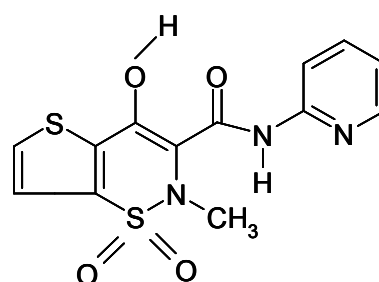
3. ANTECEDENTES.

3.1 Oxicams

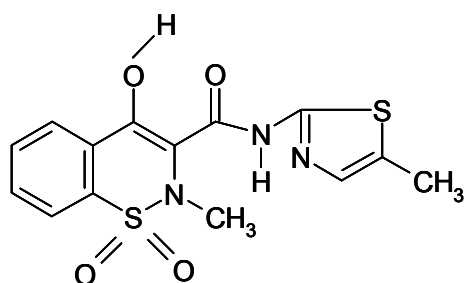
Entre los diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades reumáticas, se encuentra la familia de los "oxicams" ⁽¹⁶⁾, entre los cuales se encuentran, el Meloxicam, Piroxicam, Tenoxicam, Lornoxicam e ***Isoxicam***, cuya estructura se muestra en la *figura 3.1*.



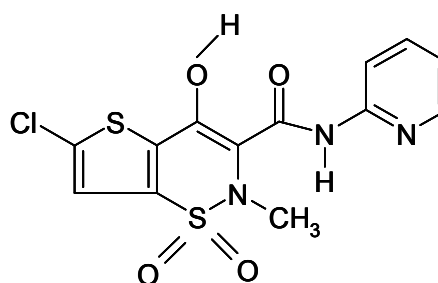
piroxicam



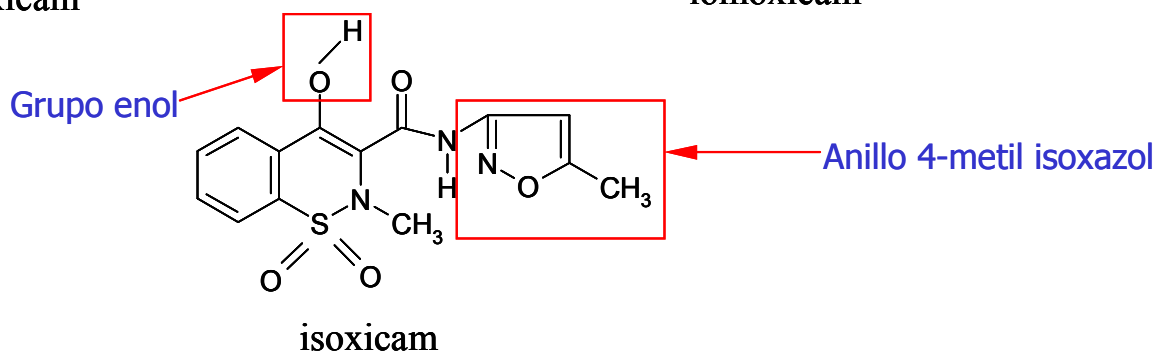
tenoxicam



meloxicam



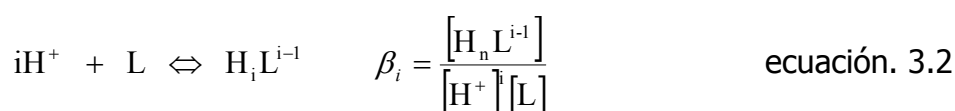
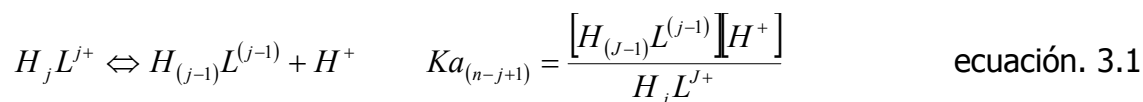
lomoxicam



isoxicam

Figura 3.1. Estructuras químicas de la familia de los oxicams.

Es sabido que las propiedades ácido-base de los fármacos son de fundamental importancia en farmacología. Para caracterizar la capacidad de ionización (disociación/protonación) de las moléculas, se calculan los valores de pKa o bien log β (Ecuación. 3.1 y 3.2)



Donde i y j toman valores de {1,2,.....,n }

En la estructura química de los fármacos que se muestran en la *figura 3.1*, es posible observar que para isoxicam, existen dos centros con carácter ácido-base; el grupo enol y el nitrógeno del anillo 4-metil-isoxazol.

En 1984, Bernhard y Zimmermann ⁽¹⁷⁾, reportan un estudio espectrofotométrico para el comportamiento ácido-base de los oxicams, ellos encuentran un valor de pKa para el fármaco isoxicam (*tabla 3.1*). El estudio espectrofotométrico, fue realizado en mezclas acuosas DMSO-buffer en una relación 1:100, a una temperatura de 22±0.5°C, reportando lo que ellos llamaban "valores aparentes de pKa", denotados como pKa*, ellos asignan el valor de pKa al grupo enólico.

Tabla 3.1 Valor de pKa* de isoxicam en mezclas acuosas DMSO-buffer, reportado por Bernhard y Zimmermann

Fármaco	pKa*
Isoxicam	3.93±0.03

En 1993, Ruey-Shivan Tsai ⁽¹⁸⁾, realiza un estudio de comportamiento ácido-base de los oxicams. Para asignar los valores correspondientes de pKa, realiza estudios potenciométricos en agua y mezclas agua/etanol (*tabla 3.2*); los resultados que obtiene en agua concuerdan con los reportados por Bernhard y Zimmermann para las mezclas agua/etanol el valor cambia 0.92 unidades, al igual que Bernhard y Zimmermann el valor lo asignan al grupo enólico.

Tabla 3.2 Valores de pKa de isoxicam en agua y mezclas etanol agua, reportados por Ruey-Shivan Tsai

Fármaco	pKa H ₂ O	pKa mezclas H ₂ O /C ₂ H ₅ OH
Isoxicam	3.93	4.85(±0.01)

3.2 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

Los métodos espectrofotométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en las espectroscopias atómicas y molecular. La espectroscopia es un método general para la ciencia que trata de distintas interacciones de la radiación con materia.

La espectroscopia y los métodos espectrométricos hacen referencia a la medida de la intensidad de la radiación electromagnética mediante un detector fotoeléctrico o con otro tipo de dispositivo electrónico. ⁽¹⁹⁾

Los métodos espectrométricos más ampliamente utilizados son los relacionados con la radiación electromagnética, que es un tipo de energía que toma varias formas, de las cuales las más fácilmente reconocidas son la luz y la radiación electromagnética de microondas o infrarrojo.

Los métodos espectrométricos son utilizados por los químicos para la identificación y determinación de las sustancias o compuestos presentes de distintas formas de la materia.

La radiación electromagnética se representa como un campo eléctrico y otro magnético que están en fase, con oscilaciones sinusoidales en un ángulo recto de uno respecto al otro y respecto a la dirección de propagación. ⁽¹⁹⁾

Las ondas de luz están constituidas por campos eléctricos y magnéticos oscilantes, perpendiculares entre sí. La longitud de onda (λ), es la distancia entre la cresta y cresta de una onda. La frecuencia (ν) es el número de oscilaciones completas de la onda cada segundo. Esto se representa en la *figura 3.2.a*, para un rayo individual de una radiación electromagnética polarizada en un plano dicha expresión es que todas las oscilaciones tanto del campo eléctrico como del campo magnético están en un solo plano. **(19)**

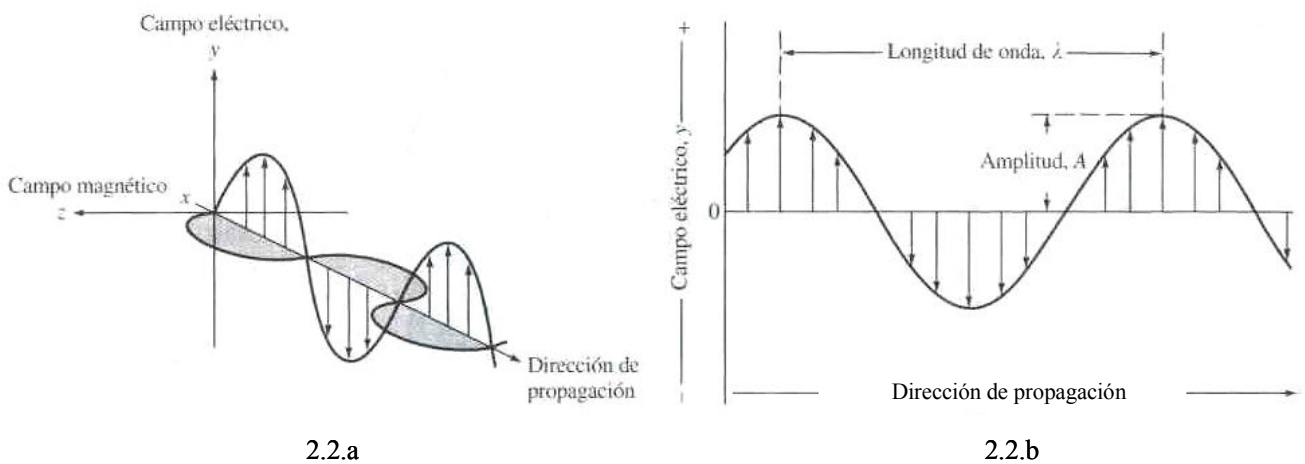


Figura 3.2. Representación de un haz de radiación monocromática, polarizada en el plano: 3.2.a, campo eléctrico y magnético perpendiculares entre sí con respecto a la dirección de propagación.

3.2.b, representación del vector eléctrico.

En la *figura 3.2.b*, el campo eléctrico se representa como vectores cuya amplitud es proporcional a la intensidad del campo. La abscisa de esta representación gráfica es la distancia (x) que recorre la onda, a un tiempo dado. La distancia recorrida es proporcional al tiempo. Una representación similar puede darse para el campo magnético oscilante.

Cabe señalar que la componente magnética de la radiación electromagnética es la responsable de la absorción de las ondas de radiofrecuencia en la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

La relación entre la frecuencia y la longitud de onda se muestra en la *ecuación 3.3*:

$$\lambda \nu = c \quad \text{ecuación 3.3}$$

Donde c es la velocidad de la luz ($2.997\,924\,58 \times 10^8$ m/s en el vacío).

Desde el punto de vista de ciertos fenómenos (como la absorción y emisión de luz, es más conveniente considerar a la luz constituida por partículas llamadas fotones. Cada fotón tiene una energía (E_f), la cual está dada por la *ecuación 3.4*:

$$E_f = h\nu \quad \text{ecuación 3.4}$$

Donde h es la constante de Planck ($h=6.626\,075\,5 \times 10^{-34}$ Js). Esta ecuación indica que la energía es proporcional a la frecuencia y, por lo tanto, al combinar la *ecuación 3.3* con *3.4* resulta la *ecuación 3.5*:

$$E_f = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad \text{ecuación 3.5}$$

donde $\bar{\nu}$ es igual $\frac{1}{\lambda}$ y se denomina número de onda. De las *ecuaciones 3.4 y 3.5* se puede observar que la energía por fotón es inversamente proporcional a la longitud de onda y directamente proporcional al número de onda y a la frecuencia. La unidad de frecuencia es el segundo recíproco (s^{-1}). Una oscilación por segundo es igual a un Hertz (Hz), por lo tanto una frecuencia de $10^6 s^{-1}$ es igual a 10^6 Hz, o sea megahertz (MHz) ⁽¹⁹⁾

La radiación monocromática es un haz de radiación cuyos rayos tienen la misma longitud de onda. La radiación policromática está compuesta por rayos de diferentes longitudes de onda.

El espectro electromagnético es una clasificación de radiaciones electromagnéticas monocromáticas. Como función de longitud de onda, frecuencia o número de onda, como se muestra en *figura 3.3*.

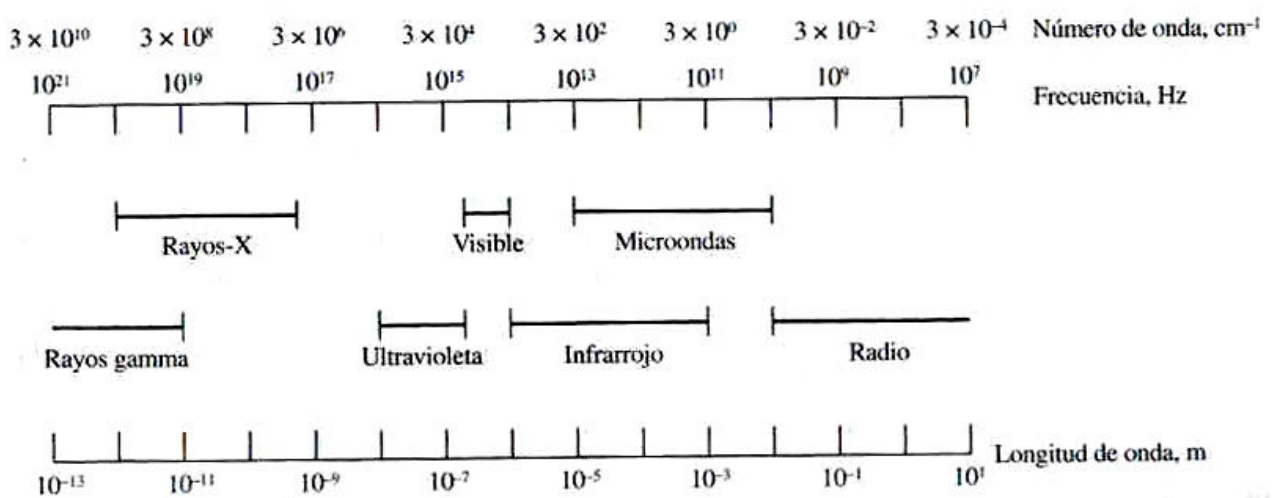


Figura 3.3. Regiones del espectro electromagnético

Las fronteras se basan en los métodos que se precisan para generar y detectar las diversas clases de radiación.

3.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular Ultravioleta/Visible

La región ultravioleta y visible se definen como la radiación asociada a la absorción en un intervalo de 200 a 700 nm, como se muestra en la *figura 3.4*, para la región de Ultravioleta corresponde una longitud de onda de 200 a 400 nm y para la región del Visible la longitud de onda que corresponde es de 400 a 700nm.

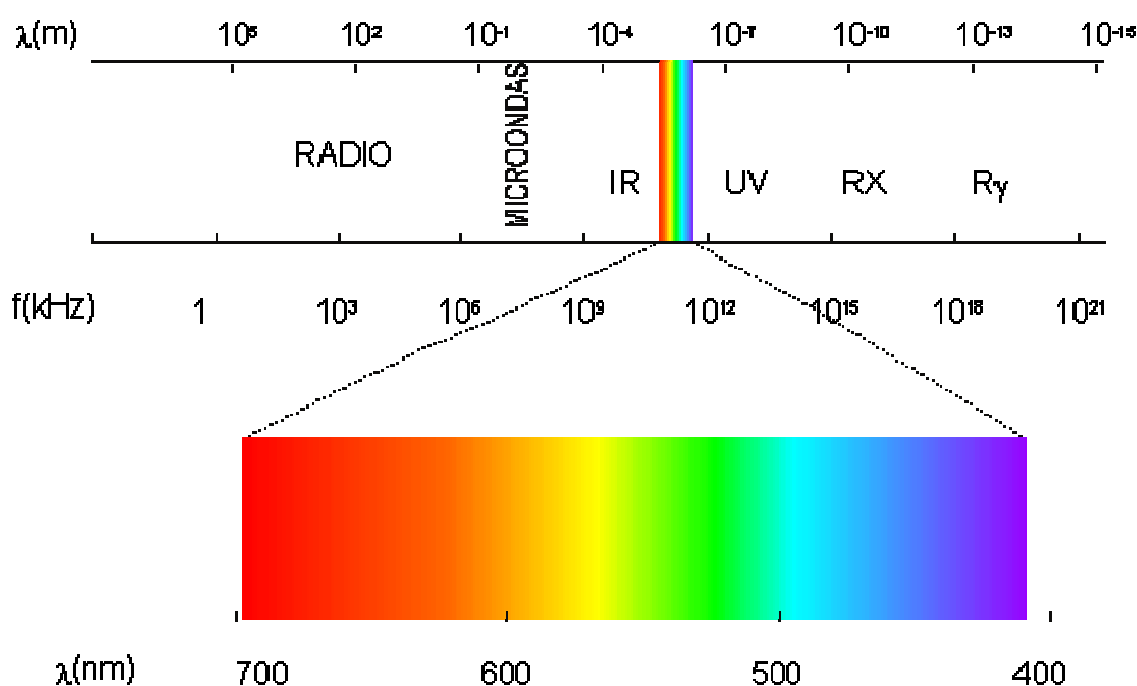


Figura 3.4. Región de espectro Ultravioleta-Visible del espectro electromagnético

La radiación visible (luz), sólo representa una fracción muy pequeña del espectro electromagnético. ⁽¹⁹⁾

La espectroscopia de absorción se basa en la medida de la transmitancia (T) o de la absorbancia (A) de disoluciones que se encuentran en celdas transparentes que tienen un paso óptico de (b) en cm. ⁽²⁰⁾

Cuando una partícula absorbe un fotón, la energía de la partícula se incrementa. Entonces se dice que la partícula pasa a un estado excitado. Si una partícula emite un fotón, su energía disminuye. El estado de menor energía de una partícula se llama estado basal o fundamental, como se muestra en la *figura 3.5*.

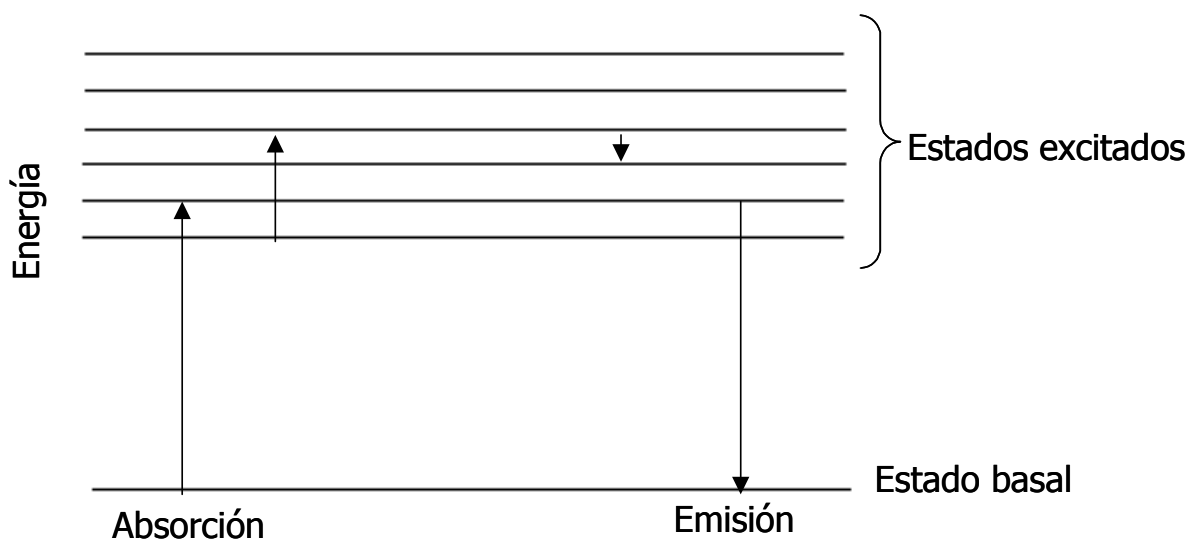


Figura 3.5. Absorción y emisión de la luz.

Cuando una muestra absorbe luz, la potencia radiante del haz de luz disminuye. La potencia radiante (P) se evalúa como energía por segundo por unidad de área del haz de luz. En la *figura 3.6* se muestra un esquema del experimento de espectrofotometría. La luz policromática se hace pasar por un monocromador (un filtro de absorción, una rejilla de difracción o un prisma)

para aislar una sola longitud de onda. Este rayo de luz monocromática de potencia radiante (P_0) incide sobre una muestra de espesor (b). La potencia radiante del haz emergente es (P); la muestra puede absorber una fracción de la luz, de manera que $P \leq P_0$.⁽²⁰⁾

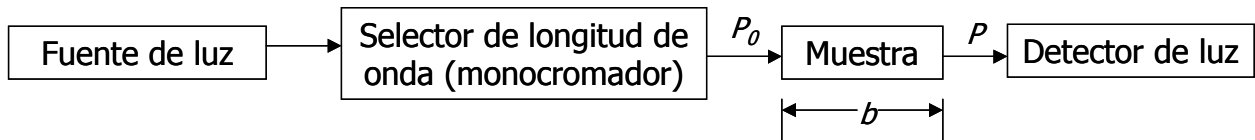


Figura 3.6. Principio de la medición espectrofotométrica

La transmitancia (T) se define como la fracción de la potencia de luz transmitida entre la potencia de la luz incidente. *ecuación 3.6:*

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{ecuación 3.6}$$

Donde:

T = transmitancia

P_0 = es la radiación de la intensidad incidente

P = intensidad de la radiación que emerge después de su paso por la solución que contiene la especie absorbente.

Por lo tanto (T) se encuentra entre cero a uno. La transmitancia porcentual es simplemente $100 \cdot T$ y se encuentra entre cero y 100%.

Una magnitud más útil es la absorbancia, la cual está definida por la *ecuación 3.7*, en la absorbancia a diferencia de la transmitancia, la muestra absorbe más cuando la atenuación del haz se hace mayor.

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) \quad \text{ecuación 3.7}$$

La *figura 3.7* representa un rayo de luz monocromática de potencia radiante (P_0) donde se hace incidir sobre una muestra de espesor (b), la potencia radiante del haz que sale es (P).

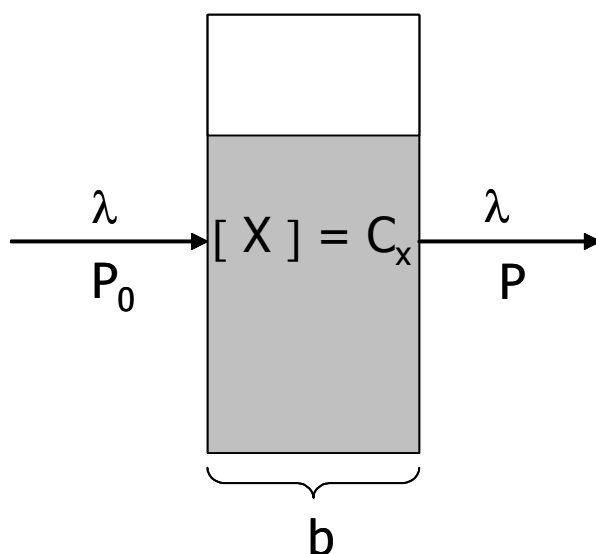


Figura 3.7. Absorción de haz de luz en una muestra absorbente.

Frecuentemente la absorbancia suele expresarse como se muestra en la *ecuación 3.8* mejor conocida como ley de Beer.

$$A^{(\lambda)} = \epsilon_x^{(\lambda)} b C_x \quad \text{ecuación 3.8}$$

Donde:

A =absorbancia

ϵ =coeficiente de absortividad de la especie

b =longitud del paso de la luz a través de la solución.

C =concentración de la especie absorbente.

La ley de Beer establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente en la muestra, donde la absortividad es una constante de proporcionalidad independiente de la concentración, paso de luz e intensidad de la radiación independiente, ya que la absortividad depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular y longitud de onda de la radiación. Las unidades de (ϵ) se determinan a partir del espesor de la celda y la concentración de la muestra.

Ley de aditividad de las absorbancias

La ley de aditividad dice que la absorbancia total es la suma de las contribuciones de sustancias que absorben a cierta longitud de onda, como se muestra en la *ecuación 3.9*.

$$A_T^\lambda = \sum_{i=1}^n A_i^\lambda \quad \text{ecuación 3.9}$$

Donde:

A_T^λ es la absorbancia total a una longitud dada

$\sum_{i=1}^n A_i^\lambda$ es la suma total de todas las sustancias que absorben

Suponga que tiene dos celdas del mismo espesor (b) que contiene en disolución dos sustancias diferentes, y sean C_x y C_y las concentraciones de cada una de las soluciones; como se representan en la *figura 3.8.b*:

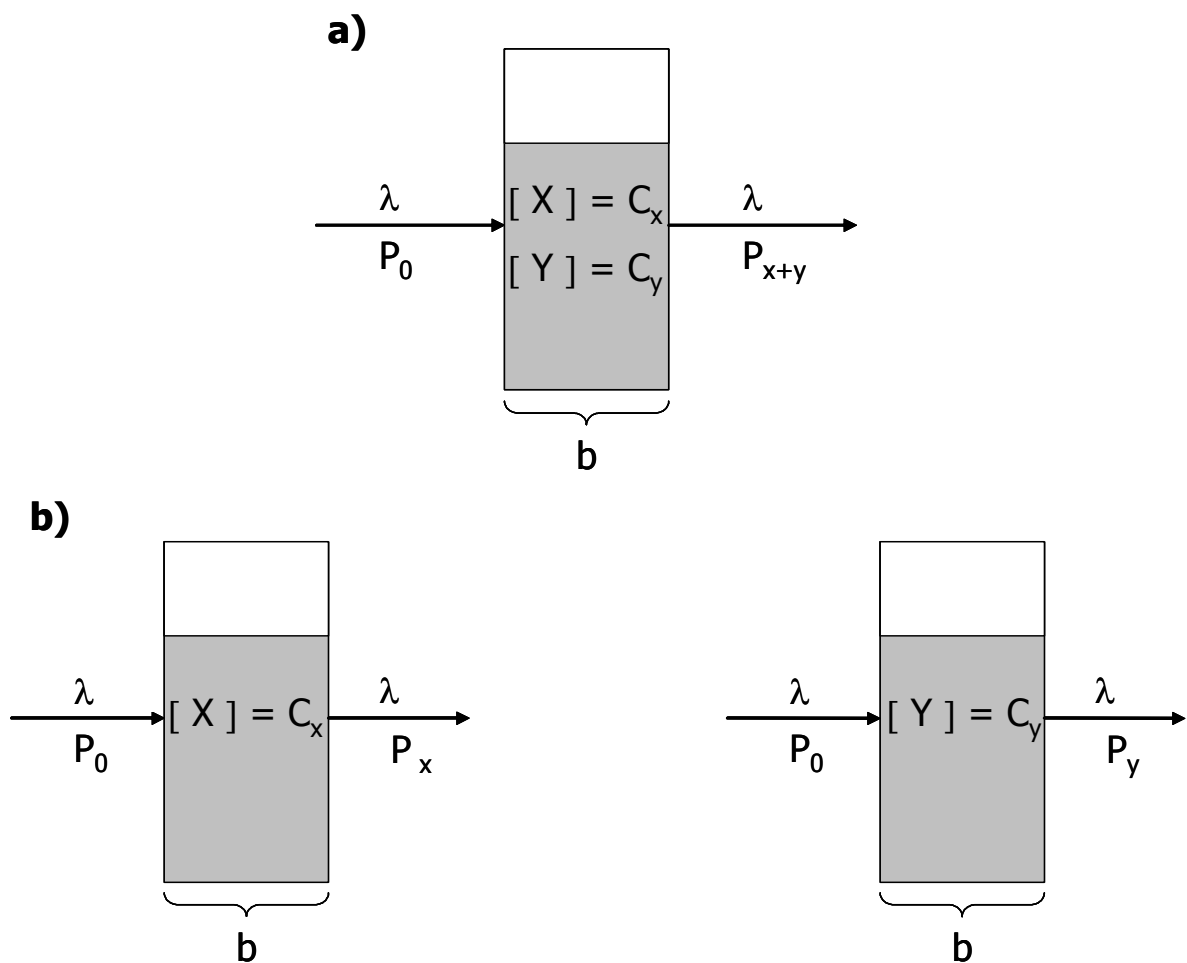


Figura 3.8.a) Absorción de haz de luz en una muestra absorbente con dos sustancias, **3.8.b)** Absorción de un haz de luz de con diferentes sustancias

Por otra parte si se supone que se tiene una única celda de espesor (b), figura 3.8.a, conteniendo a su vez las dos sustancias a las concentraciones respectivas C_x y C_y con luz monocromática. Lo que dice la ley aditividad es la absorbancia de la celda con ambas sustancias es igual a la suma de las absorbancias A_x y A_y de las otras dos celdas, como se muestra en la ecuación 3.10:

$$A_{x,y}^{\lambda} = -\log \frac{P_{x,y}}{P_0}, A_x^{\lambda} = -\log \frac{P_x}{P_0} \text{ y } A_y^{\lambda} = -\log \frac{P_y}{P_0} \quad \text{ecuación 3.10}$$

Entonces sería igual a la ecuación 3.11.

$$A^\lambda = A_x^\lambda + A_y^\lambda \quad \text{ecuación 3.11}$$

Por lo tanto la ley de aditividad establece que independientemente de que las sustancias se encuentren solas o en mezcla, absorben lo mismo.

Entonces al aplicar la ley de Beer y aditividad se tiene la *ecuación 3.12*.

$$A = A_X + A_Y = b(\varepsilon_X C_X + \varepsilon_Y C_Y) \quad \text{ecuación 3.12}$$

La primera componente de la igualdad en la *ecuación 3.12* se conoce como ley de aditividad y la segunda incorpora la leyes de Beer para (X) y (Y) .

Estas leyes son importantes, ya que son básicas para la mayor parte de las determinaciones y permiten la determinación de sustancias absorbentes, unas en presencias de otras. **(21)**

3.3 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE FORMACIÓN.

Existen diferentes métodos por los cuales se puede determinar experimentalmente las constantes de equilibrio, estos métodos requieren de datos potenciométricos, espectrofotométricos, etc. Siendo la espectrofotometría Ultravioleta-Visible es uno de los métodos más usados.

La forma de procesar los datos espectrofotométricos depende de la complejidad que presente el sistema. En el caso de sistemas sencillos el proceso de datos puede simplificarse aplicando los métodos gráficos tradicionales, para el caso de sistemas más complicados el tratamiento de los datos requiere de la aplicación de métodos gráficos más desarrollados o bien de métodos computacionales.

Para llevar a cabo la determinación de las constantes es necesario que el sistema se encuentre en equilibrio o al menos en estado estacionario, el cumplimiento de las leyes ideales de absorción (ley de Beer y ley de aditividad) y de una estequiometría simple.

Pero al existir más de un equilibrio representativo para determinar las constantes es necesario recurrir a los métodos gráficos que involucran funciones lineales desarrolladas a partir de parámetros fisicoquímicos tales como el coeficiente de absorción molar y la constante de equilibrio. ⁽²²⁾

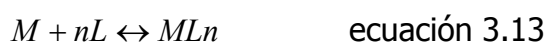
Otra alternativa es el uso de métodos numéricos que permiten el procesamiento de los datos experimentales para sistemas multirreaccionantes y multicomponentes con un determinado algoritmo matemático. ⁽²³⁾

Entre los métodos gráficos tradicionales más usados se encuentran el método de relaciones molares y el método de variaciones continuas.

3.3.1 MÉTODOS GRÁFICOS TRADICIONALES

Método de relaciones molares

Al considerar la *ecuación 3.13* una reacción única.



Donde el complejo ML_n absorbe radiación electromagnética, en tanto que M y L no lo hacen, o al menos no absorben apreciablemente a la longitud de onda de absorción del complejo. Las disoluciones de M y L se encuentran preparadas a la misma concentración; Job y colaboradores demostraron que si el complejo se encuentra muy poco disociado, la representación gráfica de la absorbancia frente a la relación molar L/M , en serie de disoluciones en las que $[M]$ permanece constante y $[L]$ varía, da lugar a una línea recta desde el origen de coordenadas hasta el punto que corresponde a la relación molar del complejo formado, a partir del cual cambia de pendiente y alcanza una absorbancia constante para la relación molar M/L del complejo.

De manera similar se puede mantener $[L]$ constante y variar $[M]$, para este caso el punto de cambio de pendiente indica la relación M/L . Cuando el complejo se encuentra disociado de manera apreciable (pero no demasiado) no se observa un cambio brusco en la pendiente, al contrario lo que se observa es

una curvatura en el entorno de la relación molar que corresponde a la composición del complejo y una aproximación asintótica a una absorbancia constante a relaciones molares altas. Al presentarse este caso, la extrapolación de los puntos iniciales y finales de la curva al punto de intersección puede definir la relación de composiciones en la reacción. (*figura 3.9*)

La curvatura de la línea obtenida por el método de relaciones molares puede aprovecharse para determinar la constante de formación del complejo. Ejemplo considere la *ecuación 3.14*:



Esta disociación tiene la fórmula ML_n ; muestra que la línea experimental es la mostrada en la *figura 3.9*. Donde, si la disociación fuera muy estable la línea debería consistir en dos rectas que se intersecan en el punto A_m (ordenada) y 2 (abcisa). La curvatura de la línea indica el grado de disociación del complejo y la absorbancia experimental puede utilizarse para calcular las constantes de formación del complejo.

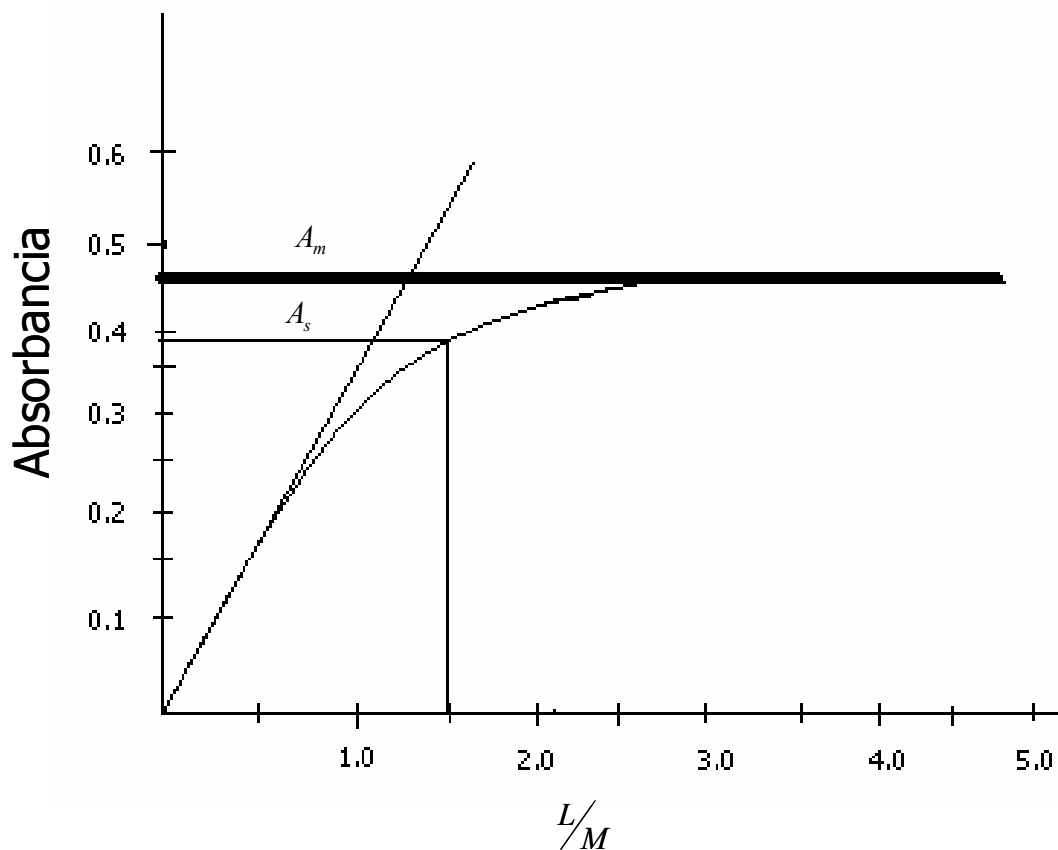


Figura 3.9. Absorbancia en función de la relación molar $[L]/[M]$

Si C_M es la concentración analítica de M y se ha llevado a cabo una transformación completa a ML_2 ; entonces $[ML_2] = C_M$. La absorbancia A_m representará la concentración de ML_2 . En cualquier punto donde la formación del complejo es incompleta se tiene la *ecuación 3.15*:

$$[ML_2] = C_M * \frac{A_s}{A_m} \quad \text{ecuación 3.15}$$

Donde A_s es la absorbancia medida en una disolución de concentración conocida con respecto a las C_M y C_L utilizadas para su preparación. Se tiene la *ecuación 3.16 y 3.17*:

$$[M] = C_M - [ML_2] \quad \text{ecuación 3.16}$$

$$[L] = C_L - 2[ML_2] \quad \text{ecuación 3.17}$$

Y la constante de formación del complejo es la *ecuación 3.18*:

$$K_f = \frac{[ML_2]}{[M][L]^2} \quad \text{ecuación 3.18}$$

Se puede hacer cálculos más precisos de K_f a partir de datos sobre la composición estequiométrica del complejo, pero también se pueden utilizar datos de otro punto distinto.

Este método está limitado para los casos en que A_s vale 0.7-0.9 A_m . Si el valor de A_s es muy cercano a A_m se tiene la incertidumbre en los valores de $[M]$ y $[L]$. Pero si A_s es menor de 0.7 A_m , la curvatura de la línea es tan pronunciada que la composición estequiométrica del complejo no puede determinarse con certeza.

Métodos de variaciones continuas

Al considerar la ecuación 3.19



Donde el ML_n absorbe radiación electromagnética en tanto que M y L no lo hacen o no presentan absorbanza significativa en la longitud de onda donde absorbe el complejo. Las soluciones de M y L tienen la misma concentración y a partir de éstas se prepara una serie de disoluciones en la que la concentración total ($[M] + [L]$) es constante, pero la relación de concentraciones es variable. Se mide la absorbanza de cada uno de los sistemas de la serie a la longitud de onda óptima de absorción del complejo ML_n frente a la fracción molar de L

$f_L = \frac{[L]}{[L] + [M]}$. Por lo tanto la grafica que se muestra en la *figura 3.10*, presenta

un máximo en la fracción correspondiente a la composición del complejo formado.

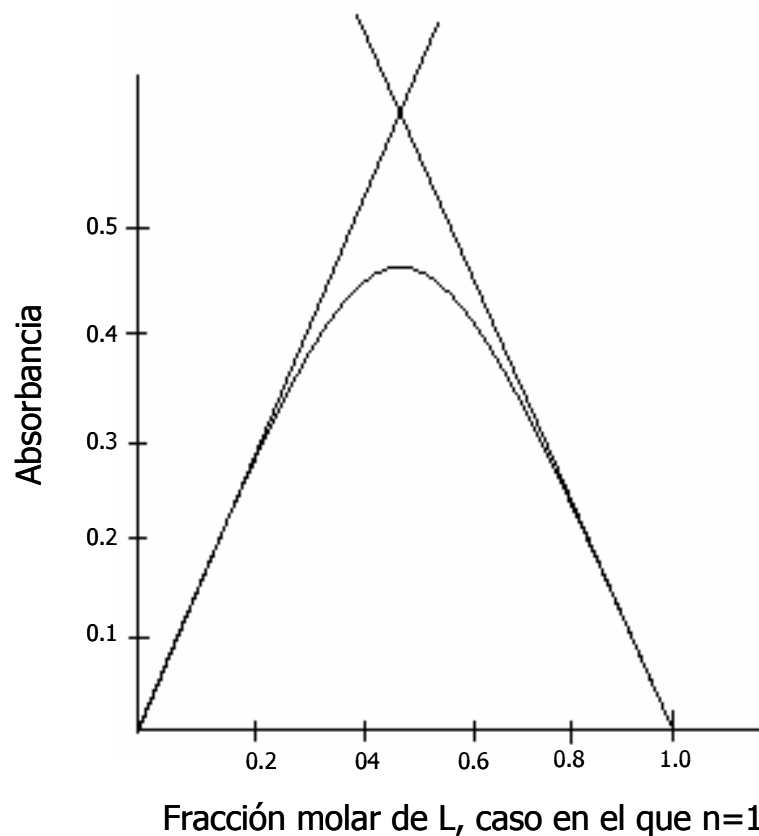


Figura 3.10. Absorbancia en función de la fracción molar de L

En general las dos rectas se, intersecan cuando $X_L = \frac{n}{1+n}$. Este método fue ideado por Job en 1928, él supuso que este método solo resultaba para una relación 1:1 entre los reactivos; posteriormente en 1941 Vosburgh y Cooper demostraron que este método se aplicaba a complejos de relación molar superior. ⁽²⁴⁾

Cuando se forma más de un complejo, y cada uno de ellos presenta un espectro de absorción que indique la presencia de una longitud óptima de absorbancia diferente para cada uno de ellos, entonces se podrá determinar la

estequiometría de los dos complejos a su longitud de onda óptima para cada caso.

En el caso de que la formación del complejo ML_n no sea tan cuantitativa es decir que el complejo se encuentre parcialmente disociado, la representación de la absorbancia contra a la fracción molar no da un máximo agudo, sino achatado; siendo esto un indicador del grado de disociación del complejo. En este caso se hace una extrapolación de los extremos de la curva donde la disociación de ML_n se ha suprimido debido al exceso de reactivos.

La deducción exacta de la estequiometría del complejo ML_n por este método no es precisa cuando la relación $L:M$ es mayor de 4:1 (fracción $L=0.80$), ya que los datos no son lo suficientemente exactos para distinguir esta composición de la 5:1 (fracción molar $L=0.83$).

Este método puede ser utilizado para determinar el valor de la constante de formación condicional del complejo ML_n de la misma manera que en el caso de método de relaciones molares; teniendo como ventaja poder determinar constantes de formación de complejos más débiles, debido a que la primer parte de curva (exceso de M) y la última parte (exceso de L), son aproximadamente lineales puesto que se elimina la disociación del complejo con lo que se obtiene un ángulo más agudo que el que corresponde a la representación de las relaciones molares, por lo tanto es más fácil obtener una intersección por extrapolación.

Los métodos gráficos presentan ciertas limitaciones como la existencia de un solo equilibrio representativo del sistema estudiado, que la reacción sea cuantitativa y que la estequiometría de la reacción no sea muy complicada.

Hoy en día se han desarrollado diversos modelos algebraicos expresados en función de los coeficientes de absorción de las diferentes especies involucradas y las constantes de equilibrio cuya complejidad depende de cada una de las incógnitas del sistema. Dichos métodos permiten determinar indirectamente estas incógnitas a partir de ecuaciones lineales que de manera directa sería imposible conocer. Entonces si el modelo es demasiado complicado se recurre a sistemas computacionales que mediante pruebas estadísticas facilita el cálculo de dichos parámetros.

3.3.2 MÉTODOS COMPUTACIONALES

Actualmente se cuenta con métodos computacionales que superan las limitaciones de los métodos gráficos. Estos métodos refinan las constantes de equilibrio en sistemas multirreaccionantes y multicomponentes complicados. Los resultados obtenidos por dichos métodos son evaluados por parámetros estadísticos como desviación estándar y suma de cuadrados.

En la presente tesis los métodos computacionales como SQUAD y TRIANG fueron los utilizados para determinar el número de especies que absorben de forma diferente en el sistema y las constantes de equilibrio del fármaco anti-inflamatorio isoxicam. Para alimentar el programa SQUAD es necesario conocer el número de especies químicas que absorben la radiación electromagnética, proponer el número de equilibrios químicos representativos independientes en el sistema así como los valores de los coeficientes de absorción molar y los valores de las constantes de equilibrio a refinar. Previamente al aplicar SQUAD, se puede utilizar el programa computacional TRIANG.

Descripción del programa TRIANG.

TRIANG es un programa computacional escrito en lenguaje FORTRAN. El listado de este programa se reporta en el libro "Solution equilibria"⁽²⁴⁾

TRIANG estima el número de especies que absorben radiación electromagnética en el sistema, a partir de los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda para distintas soluciones, y considerando el error en las lecturas de transmitancia (ΔT).

La forma de establecer si una especie química absorbe radiación electromagnética involucra una comparación entre valores de absorbancia y los errores asociados a las mismas, suponiendo el cumplimiento de la ley de Beer y la de aditividades, de acuerdo al algoritmo que se muestra en la *figura 3.11.*⁽³⁴⁾

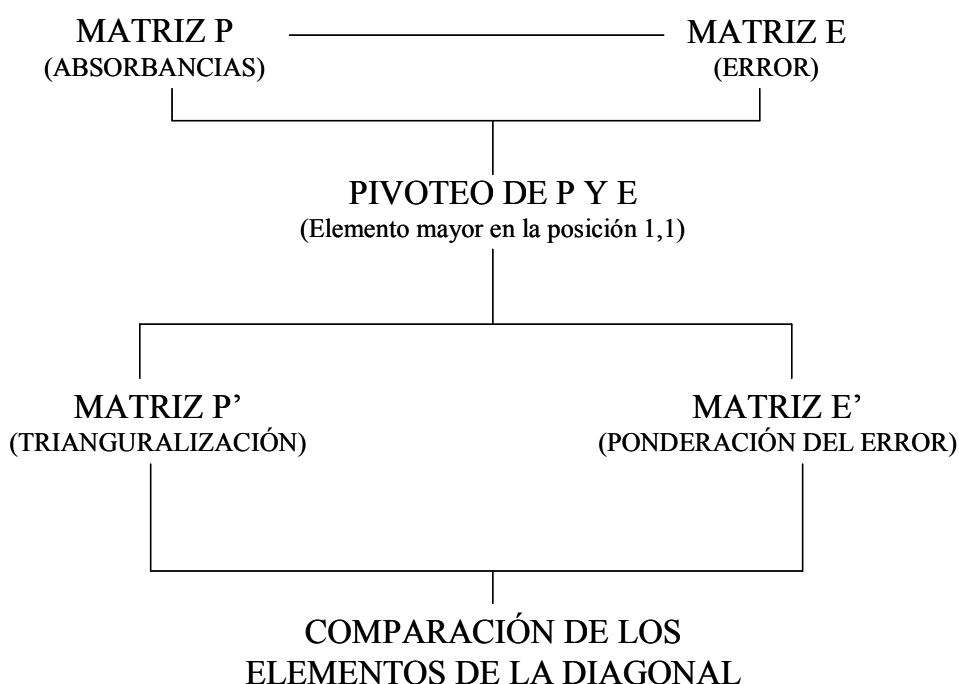


Figura 3.11. Algoritmo del programa TRIANG.

TRIANG calcula los elementos de una matriz de error, considerando el valor de ΔT , la ecuación del error en absorbancia y la teoría de propagación del error.

Al comparar diagonales, verifica si el elemento $E'_{j,j}$ de la matriz del error multiplicado por tres es menor que el elemento $P'_{j,j}$ de la matriz de absorbancias; entonces se concluye que este elemento diagonal de la matriz de absorbancias es diferentes de cero. En caso contrario se concluye que ese elemento es igual a cero.

El número de especies que absorban en el sistema se estima como la suma de los elementos P'_{jj} diferentes de cero.

El error en las lecturas de transmitancia (ΔT) es igual:

$$\Delta T = \left(Error_{instrumental}^2 - Error_{volumetrico} \right)^{1/2}$$

El error experimental es igual al error que se comete en las lecturas de absorbancia y en función directa del espectrofotómetro usado.

El error volumétrico está asociado fundamentalmente al material utilizado en el experimento para la manipulación y medición de líquidos

Para datos espectrofotométricos obtenidos experimentalmente el valor de ΔT debe encontrarse en el intervalo de $0.003 \leq \Delta T \leq 0.010$.

Descripción del programa SQUAD.

SQUAD es un programa creado por Legget escrito en lenguaje FORTRAN. Esta diseñado para refinar constantes de equilibrio de un modelo químico propuesto, a partir de datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda y a diferentes composiciones químicas del sistema ⁽²⁵⁾.

El modelo químico propuesto puede ser dependiente o independiente del pH y puede tener especies del tipo:



$$m, l, j, i, q \geq 0$$

El refinamiento de las constantes se realiza por medio de una minimización de la suma de los residuos de absorbancia cuadráticos por mínimos cuadrados no lineales, empleando el algoritmo de Gauss-Newton.

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{NW} (A_{i,k}^T - A_{i,k}^E)^2$$

Donde:

I = todas las soluciones.

NW = todas las longitudes de onda.

$A_{i,k}^T$ = absorbancia calculada por SQUAD en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

$A_{i,k}^E$ = absorbancia experimental en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

La resolución de la minimización requiere el cálculo de las absorbancia a la k-ésima longitud de onda en la i-ésima solución.

Para conocer los valores de absorbancia se necesita resolver la ecuación de Beer; SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar por especie, y determina la concentración de cada una empleando el algoritmo de Newton-Raphson.

La convergencia se da si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro, difiere como máximo 0.001. Que el criterio anterior se cumpla no significa que se tiene el mejor refinamiento de constantes, debido a que se puede caer en el caso de una convergencia en un mínimo relativo.

Los parámetros estadísticos que emplea SQUAD para determinar si el modelo químico propuesto explica la información experimental alimentada son los siguientes:

- Parámetro de correlación (matriz)
- La desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{datos}), y de las constantes ($\sigma_{\text{ctes.}}$).
- La desviación estándar por espectro (σ_{espectro}).

✿ La desviación estándar sobre los coeficientes de absorptividad molar ($\sigma_{\text{coef.}}$)

El proceso de selección del mejor modelo químico no se basa solamente en la obtención de los mejores parámetros estadísticos, también se debe verificar la consistencia del mismo. Es decir, que los coeficientes de absorptividad molar calculados para cada una de las especies sean congruentes con el comportamiento experimental y que las especies refinadas puedan predominar bajo las condiciones experimentales trabajadas.

4. MATERIALES

Y

MÉTODOS

4.1 Métodos

1. Espectrofotometría UV/Vis
2. Potenciometría

4.2 Programas Computacionales

1. TRIANG
2. SQUAD

Equipo

1. Baño termostático (Poly Science Niles IL 60714)
2. pH metro (Mettler Toledo MAD235)
3. Espectrofotómetro UV-Visible (PERKIN ELMER Lambda 18)
4. Balanza analítica (Mettler Toledo AB204)
5. Reactivos
 - a. Principio activo Isoxicam $C_{14}H_{13}N_3O_5S$ PM:335.3 (Sigma Lote 127F0579)
 - b. N_2 (AGA ®)
 - c. Agua desionizada
 - d. Dimetilsulfóxido $(CH_3)_2SO$ (DMSO) (J.T. Baker lote. A41651)
6. Material:
 - a. pipetas volumétricas de 50 mL, 25 mL y 10 mL (PYREX)
 - b. matraz aforado de 100 mL, 50 mL, 25 mL y 10 mL (PYREX)

-
- c. vasos de precipitados de 50 mL (PYREX)
 - d. celda termostataada
 - e. micropipetas 0.5-5 μ L, 5-50 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L, 1-5 mL
(Thermo Labsystems)

5.PROCEDIMIENTO

EXPERIMENTAL

5.1 Determinación de concentración de isoxicam óptima de trabajo en medio acuoso

El inconveniente que presenta la especiación química del isoxicam en medio acuoso es su baja solubilidad en agua. A pesar de dicho problema, los coeficientes de absorptividad molar son lo suficientemente grandes para poder llevar a cabo el estudio de especiación química a concentraciones donde la precipitación puede ser evitada.

Se preparan soluciones de isoxicam a concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 2×10^{-5} M en condiciones básicas (pH=9), a dichas soluciones se les modifica el pH cada 0.2 unidades de pH con HCl 0.15 M hasta llegar a un pH=3 para verificar si ocurre o no precipitación del fármaco.

Dichas soluciones se leen en el espectrofómeto UV-Visible a una longitud de onda de 450 a 200 nm, para obtener el comportamiento que presenta cada una de las soluciones y observar que concentración es la adecuada a las condiciones de trabajo.

5.2 Determinación de pKa de isoxicam en medio acuoso, bajo condiciones pseudofisiológicas

De acuerdo a lo observado anteriormente se determinó que la concentración más adecuada es la de 10^{-5} M.

Se preparó la solución de isoxicam, disolviendo inicialmente la especie neutra (HIsox), posteriormente con una cantidad equivalente de NaOH se obtuvo el anión Isox⁻.

Solución de isoxicam:

- 1) Se peso aproximadamente 17 mg de fármaco isoxicam, la cantidad de fármaco pesada se colocó en un vaso de precipitado previamente con agua;
- 2) Se agregó una cantidad equivalente de NaOH de concentración 11.8803 para disolver el fármaco isoxicam;
- 3) El vaso de precipitado que contenía el fármaco isoxicam se colocó en el ultrasonido para disminuir el tamaño de la partícula y ayudar a la disolución;
- 4) Se transfirió la solución anterior a un matraz aforado de 50 mL se aforo con agua desionizada obteniendo una concentración aproximadamente 10^{-3} M
(solución A)
- 5) Con una pipeta volumétrica se tomó 1 mL de la ***solución A*** se agregó a un matraz aforado de 100 mL
- 6) En un vaso de precipitado de 50 mL se colocó aproximadamente 877 mg de NaCl y se disolvió con la mínima cantidad de agua desionizada;

7) Se añadió la solución de NaCl al matraz aforado de 100 mL y se aforo con agua desionizada.

Solución de HCl 0.15 M

- 1) Se añadió 1300 μ L de HCl concentrado en un matraz aforado de 100 mL
- 2) En una vaso de precipitado se colocó aproximadamente 877 mg de NaCl y se disolvió con la mínima cantidad de agua desionizada.
- 3) Se añadió la solución de NaCl al matraz aforado de 100 mL y se aforo con agua desionizada.

Así mismo se valoró la solución de isoxicam 10^{-5} M con HCl de concentración 0.15M.

**Valoración de la solución acuosa isoxicam 10^5 M bajo condiciones
pseudofisiológicas ($T=37^{\circ}\text{C}$, $I=0.15$)**

- 1) Se colocó 50 mL de la solución acuosa de isoxicam en una celda termostataada.
- 2) Se tapó la celda termostataada.
- 3) Se impuso un flujo de N_2 sobre la solución para evitar carbonatar la solución.
- 4) Se mantuvo a una temperatura de 37°C con el baño termostataado.
- 5) Se colocó un electrodo combinado de pH dentro de la celda termostataada para medir el pH de la solución acuosa de isoxicam.
- 6) Se mantuvo con agitación constante la solución, para homogenizar.
- 7) Se midió el pH inicial de la solución acuosa de isoxicam.
- 8) Se agregó pequeñas cantidades de HCl 0.15 M, para obtener el espectro de absorción cada 0.2 unidades de pH dentro de un intervalo de longitud de onda de 200nm-450nm (de nm en nm). El intervalo de pH en el cual se trabajó fue de $1.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$.

La valoración se realizó por quintuplicado para verificar la reproducibilidad de los resultados.

Los espectros obtenidos se corrigieron por dilución para llevar a cabo el estudio de especiación química.

5.3 Determinación de concentración de isoxicam en diferentes mezclas DMSO-H₂O

Debido al inconveniente que presenta la especiación química del isoxicam en medio acuoso se decidió proponer mezclas de DMSO-H₂O al 10, 20 y 50%, para aumentar la solubilidad y así obtener absorbancias mayores en comparación a las de medio acuoso.

Se prepararon soluciones de isoxicam a concentraciones de 2×10^{-2} al 20% DMSO- 80% H₂O, 5×10^{-5} al 10% DMSO- 90% H₂O y 5×10^{-5} 50% DMSO- 50% H₂O en condiciones básicas (pH=9), a dichas soluciones se les modifica el pH cada 0.2 unidades de pH con HCl 0.15 M hasta llegar a un pH=3 para verificar si ocurre o no precipitación del fármaco.

Dichas soluciones se leen en el espectrofotómetro UV- visible a una longitud de onda de 450nm a 200nm, para obtener el comportamiento que presenta cada una de las soluciones y observar que concentración es la adecuada a las condiciones de trabajo.

5.4 Especiación de isoxicam en mezcla (10% DMSO-90% H₂O)

De acuerdo a lo observado en los tres sistemas estudiados anteriormente la mezcla de DMSO-H₂O que se aproxima más a la propuesta que se esperaba en medio acuoso fue la de 10% DMSO-90% H₂O.

Se preparo una solución de isoxicam concentración de 5.0×10^{-5} M, disolviendo inicialmente la especie neutra (HIslox), posteriormente con una cantidad equivalente de NaOH se obtiene el anión Isox.

Solución de isoxicam:

- 1) Se peso aproximadamente 17 mg de fármaco isoxicam, la cantidad de fármaco pesada se coloca en un vaso de precipitado de 50 ml previamente con Dimetilsulfóxido (DMSO).
- 2) El vaso de precipitado que contenía la solución de isoxicam se coloco en el ultrasonido para disminuir el tamaño de la partícula y ayudar en la disolución.
- 3) Se coloco la solución anterior a un matraz aforado de 50 mL., posteriormente se aforó con Dimetilsulfóxido (DMSO) obteniendo una concentración aproximada de 1.0×10^{-3} M (***solución A***).
- 4) Con una micropipeta de 1-5 mL se tomo 5 mL de la ***solución A*** y se agrego a un matraz aforado de 100 mL.
- 5) Al matraz que contenía previamente los 5 mL de la solución de isoxicam se le agregó 5 mL de DMSO concentrado.

-
- 6) En otro vaso de precipitado de 50 mL se colocó aproximadamente 877 mg de NaCl y se disolvió con la mínima cantidad de agua desionizada.
 - 7) La solución de NaCl se agregó al matraz aforado de 100 mL que previamente contenía la solución de isoxicam.
 - 8) Se adicionó aproximadamente 1250 μ L de NaOH 11.8603 M y se aforó con agua desionizada.

Solución de HCl 0.15 M

- 1) Se añadió 1300 μ L de HCl concentrado en un matraz aforado de 100 mL.
- 2) En un vaso de precipitado se colocó aproximadamente 877 mg de NaCl y se disolvió con la mínima cantidad de agua desionizada.
- 3) Se añadió la solución de NaCl al matraz aforado de 100 mL.
- 4) Se agregó 10 mL de DMSO concentrado y se aforó con agua desionizada.

De esta manera se valoró la solución de mezclas DMSO-H₂O de isoxicam 5×10^{-5} M con HCl al 10% DMSO de concentración 0.15M.

**Valoración ácido-base de la solución de isoxicam en mezclas
DMSO- H₂O (90%-10%)**

- 1) Se colocó 25 mL de la solución isoxicam en mezclas DMSO-H₂O al 10% en una celda termostataada.
- 2) Se tapó la celda termostataada
- 3) Se impuso un flujo de N₂ sobre la solución, para evitar carbonatar.
- 4) Se mantuvo una temperatura de 37°C con el baño termostataado.
- 5) Se colocó un electrodo combinado de pH dentro de la celda termostataada para medir el pH de la mezcla DMSO-H₂O al 10% de isoxicam.
- 6) Se mantuvo en agitación constante la mezcla DMSO-H₂O al 10% de isoxicam, para homogenizar.
- 7) Se midió el pH inicial de la mezcla DMSO-H₂O al 10% de isoxicam.
- 8) Se valoró con HCl 0.15 M.
- 9) Se obtuvo el espectro de absorción cada 0.2 unidades de cambio de pH en un intervalo de longitud de onda entre 200nm-450nm(de nm-nm). El intervalo de pH en el cual se trabajó fue de $1.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$.

La valoración se repitió por quintuplicado para verificar la reproducibilidad de los resultados.

Los espectros que se obtuvieron se corrigieron por dilución para llevar a cabo el estudio de especiación.

6. RESULTADOS

6.1 Concentración óptima de isoxicam

En la *tabla 6.1* se muestran los parámetros considerados para determinar la concentración óptima de trabajo.

Tabla 6.1 Parámetros de concentración de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 2.0×10^{-5} y una longitud de onda 200nm a 450nm

Concentración	pH	Absorbancia	Solubilidad
10^{-3}	9.0	mayor a 6	
	3.0		↓
10^{-4}	9.0	mayor a 6	
	3.0		↓
2×10^{-5}	9.0	0.0-0.16	
	3.0		↓
10^{-5}	9.0	0.0-0.14	
	3.0		

Los parámetros que se tomaron en cuenta para obtener la concentración adecuada para trabajar con el fármaco fueron solubilidad a pH = 3.0 y absorbancia menor a 3.

6.2 Valoraciones ácido–base del anti-inflamatorio isoxicam en medio acuoso seguidas espectrofotométricamente, bajo condiciones pseudofisiológicas.

En la *figura 6.1* se muestra un resumen de los espectros de absorción de isoxicam en función del pH, de acuerdo a la desviación estándar (σ) y suma de cuadrados (U) proporcionados por el programa SQUAD.

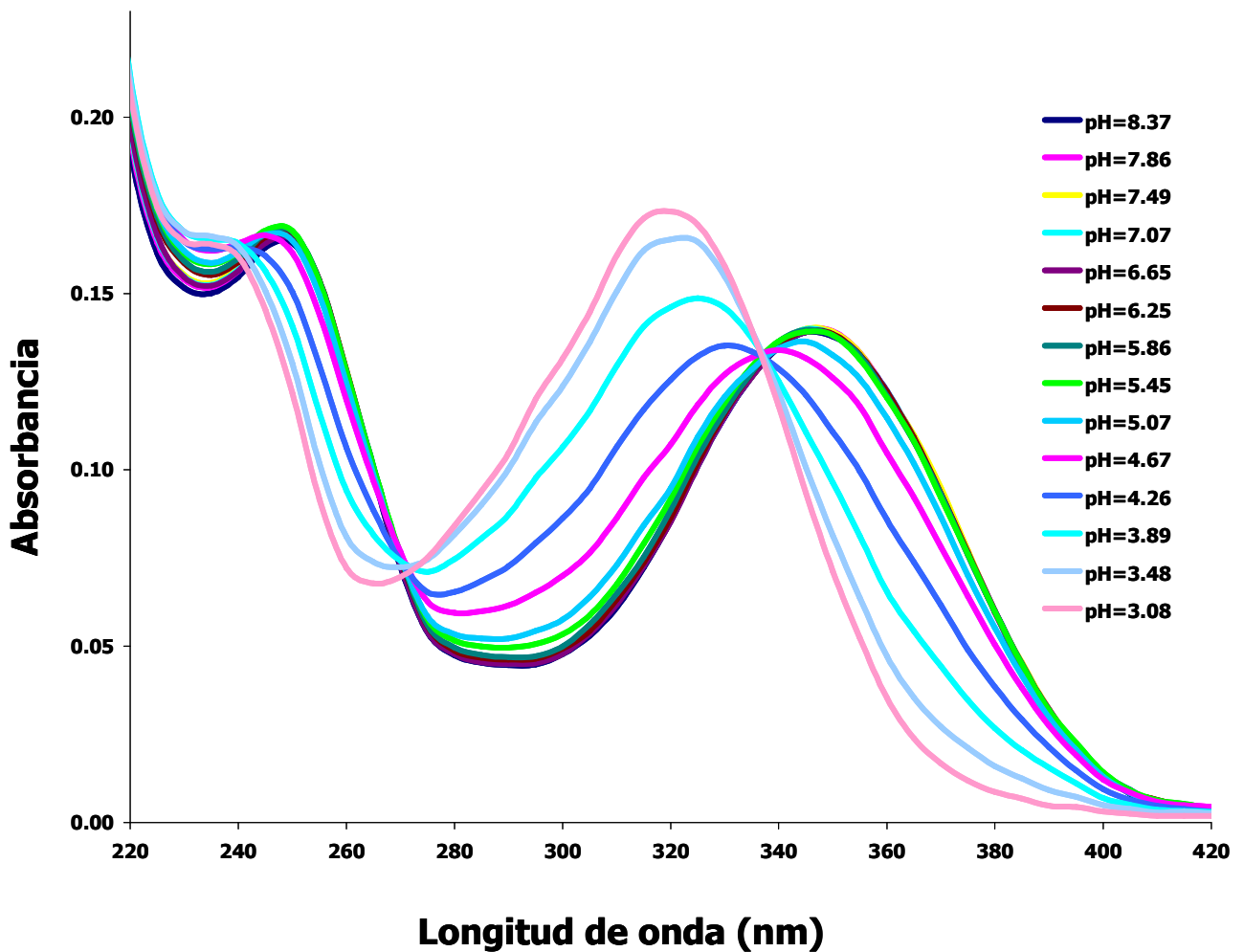


Figura 6.1. Espectros de absorción de isoxicam $10^{-5} M$ en medio acuoso en función del pH.

La *figura 6.1* muestra el espectro ultravioleta-visible para el fármaco isoxicam, donde se puede observar que a valores de pH más altos se presenta un máximo de absorción en 348nm y otro en 250nm, que al disminuir el valor de pH en el sistema; el máximo de absorción de 348nm se recorre a 320nm y el máximo de 248nm comienza a desaparecer. En el espectro ultravioleta-visible también se puede observar la presencia de dos puntos isobéuticos uno localizado en 340nm y el otro en 272nm, dichos puntos isobéuticos revelan la existencia de un equilibrio ácido-base en la zona de pH de 3.08 a 7.49.

En la *figura 6.2* se muestra los cambios de absorbancia en función del pH, a partir de los datos obtenidos del espectro ultravioleta visible, de acuerdo a los valores máximos de absorbancia del fármaco a partir de una concentración 10^{-5} M.

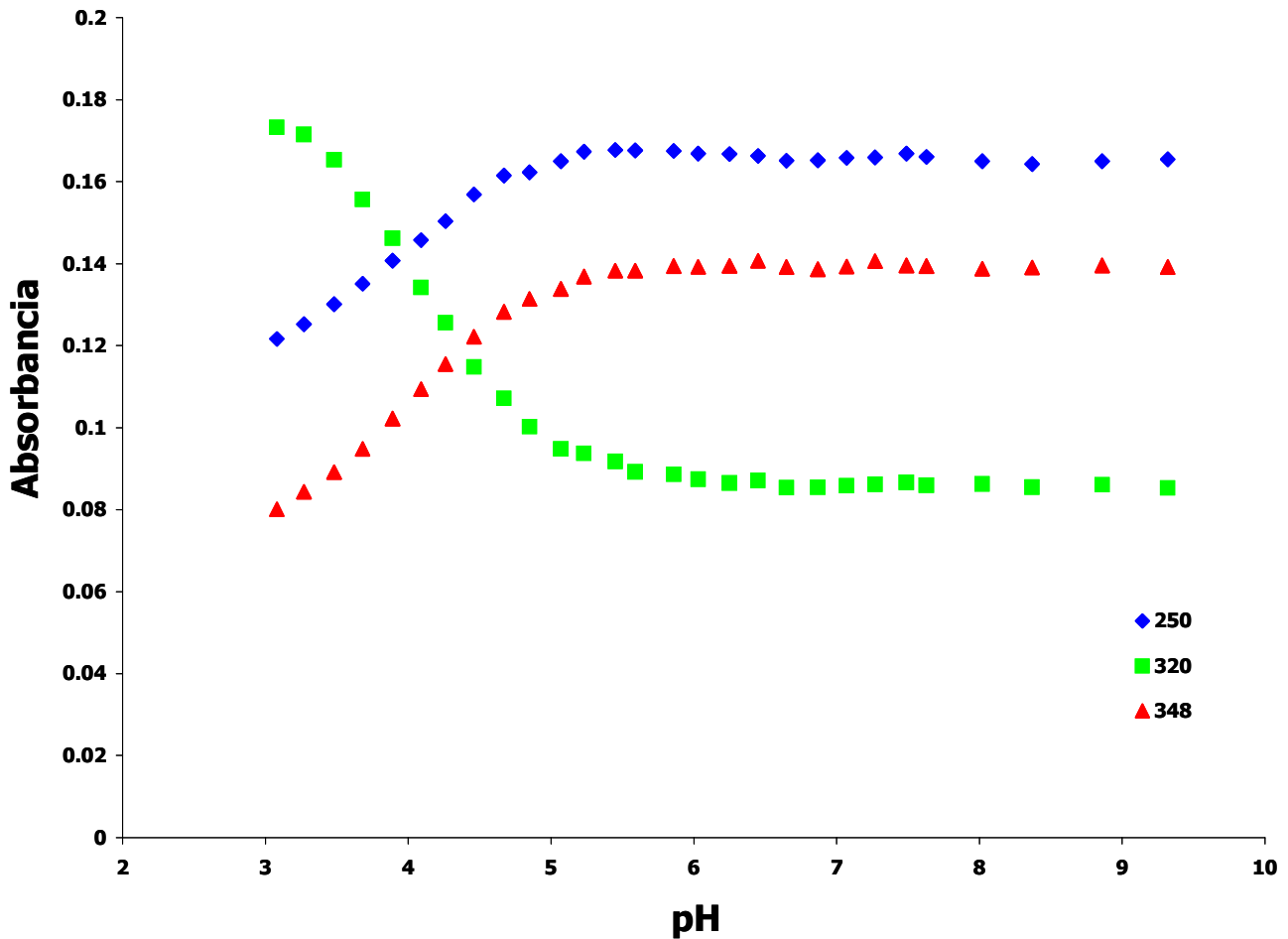


Figura 6.2 Absorbancia en función de pH de isoxicam 10^{-5} M en medio acuoso a $\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}$ 320 nm y 348 nm

Al alimentar los datos obtenidos de absorbancia al programa TRIANG con un error de transmitancia de 0.0009 a 0.01 los resultados que nos proporciono fueron los que se encuentran en *tabla 6.2*

Tabla 6.2 *Número de especies que presenta el fármaco isoxicam en medio acuoso de acuerdo a cada error de transmitancia.*

ΔT	Número de especies
0.0009	3
0.002	3
0.003	3
0.004	3
0.005	3
0.006	2
0.007	2
0.008	2
0.009	2
0.01	2

6.3 Valoración ácido base del fármaco anti-inflamatorio isoxicam en mezclas DMSO-H₂O (10%-90%) seguidas espectrofotométricamente.

La *figura 6.3* muestra un resumen de los espectros de absorción del isoxicam en mezclas DMSO-H₂O 10% en función del pH. Tomando en cuenta la mejor (σ) y (U) de acuerdo al programa computacional SQUAD.

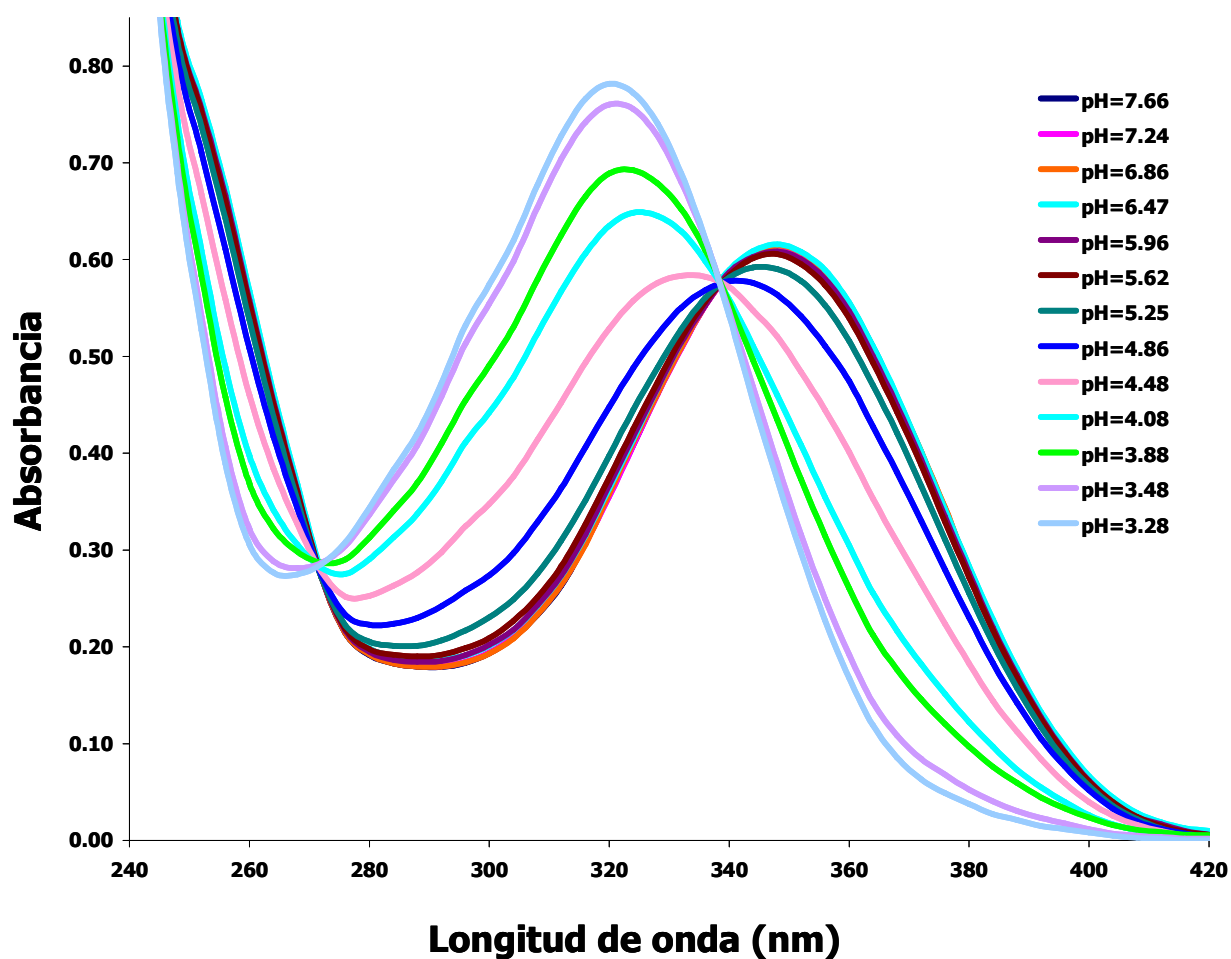


Figura 6.3 Espectros de absorción de isoxicam $5 \times 10^{-5} M$ en mezclas DMSO-H₂O (10%-90%) en función del pH.

En la *figura 6.3* se puede observar que el espectro ultravioleta-visible para el fármaco isoxicam, a valores más altos de pH presenta un máximo de absorción de 348 nm, que al disminuir el valor de pH en el sistema; el máximo de absorción de 348nm se recorre a 320 nm. En el espectro electrónico ultravioleta-visible se puede observar la presencia de dos puntos isobéuticos uno se encuentra en 340nm y el otro punto se ve en 272 nm, donde estos puntos isobéuticos revelan la existencia de un equilibrio ácido-base en la zona de pH de 7.24 a 3.28.

De acuerdo a los valores máximos de absorción del fármaco isoxicam se gráfico los cambios de la absorbancia en función del pH. (*Figura 6.4*)

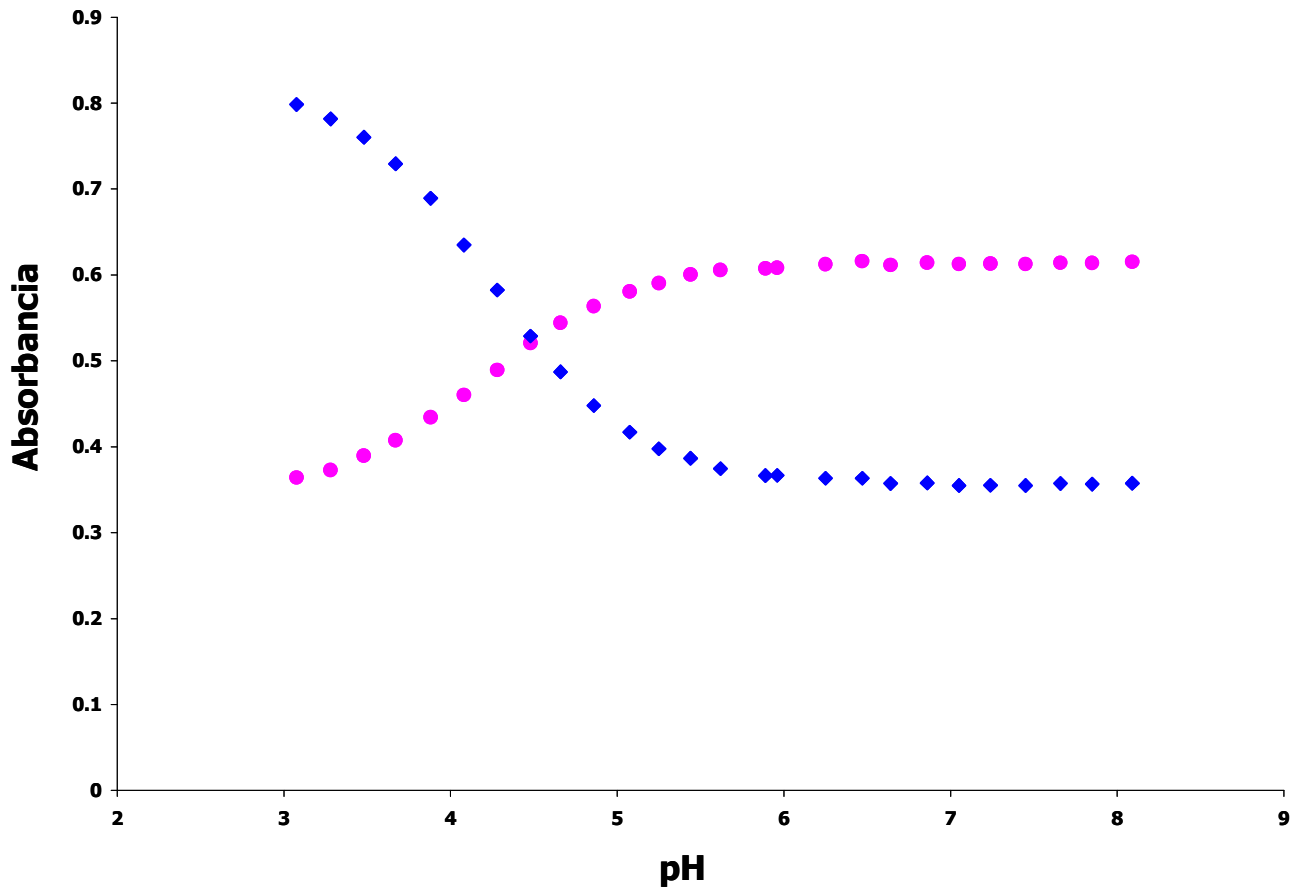


Figura 6.4. Absorbancia en función del pH en mezclas DMSO-H₂O (10%-90) 5x10⁻⁵ M a $\lambda_{\max} = 348$ y 320

Los datos espectrales de la mezcla DMSO-H₂O (10%-90%) que se obtuvieron se alimentaron al programa computacional TRIANG con un error de transmitancia de 0.0009 a 0.01 (*Tabla 6.3*)

Tabla 6.3 *Número de especies que presenta el fármaco isoxicam en mezclas DMSO-H₂O (10%-90%) 5 x 10⁻⁵ M, de acuerdo a cada error de transmitancia.*

ΔT	Número de especies
0.0009	5
0.002	4
0.003	4
0.004	2
0.005	2
0.006	2
0.007	2
0.008	2
0.009	2
0.01	2

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Concentración óptima de isoxicam

Tomando en cuenta los parámetros en la *tabla 6.1*, para la concentración 10^{-3}M y 10^{-4}M la absorbancia era muy grande y comenzaba a precipitar para el caso de la concentración $2 \times 10^{-5}\text{M}$ la absorbancia era mayor que 10^{-5} pero la precipitación del fármaco comenzaba, por lo tanto se decidió que la concentración más adecuada era 10^{-5}M , ya que mostró que a dicha concentración la precipitación no ocurría.

7.2 Determinación de pKa de isoxicam en medio acuoso, bajo condiciones pseudofisiológicas

Los espectros de absorción ultravioleta-visible (*figura 6.1*) del fármaco isoxicam en medio acuoso presentaron dos puntos isobéuticos uno en 340nm y otro en 272nm lo cual indicó la existencia de dos equilibrios ácido-base involucrando el intercambio del protón.

Como se observó en la *figura 6.1* al ir de medio básico a medio ácido se presento un desplazamiento hipsocrómico de 348nm a 320nm, y el máximo de 272nm comienza a desaparecer.

Por otra parte se realizó el gráfico de absorbancia en función del pH de acuerdo a las longitudes de máxima absorbancia de 250nm, 320nm y 348 mostrados en la *figura 6.2*. A las longitudes de 250nm y 320nm se observo que a valores de pH cercanos a 3.6 presentan una dependencia, mientras que a las longitudes de 320nm y 348nm presentaban una dependencia de pH a valores cercanos 4.0 y a pH mayor a 5.0. En los tres casos de absorbancia tendían a ser constante, lo cual indicó sólo existía un equilibrio químico.

Los datos espectrofotométricos se alimentaron al programa computacional TRIANG (*tabla 6.2*) el cual estima el número de especies que absorben radiación electromagnética en el sistema a diferentes longitudes de onda de acuerdo al error en las lecturas de transmitancia, los resultados que

proporcionó el programa computacional fueron que el fármaco isoxicam presentaba de dos especies ácido-base.

Al comparar los espectros de absorción del fármaco isoxicam a las mismas condiciones que el piroxicam (*figura 7.1*); se observó que el punto máximo de absorción a 285 nm comienza a desaparecer para formar otro punto máximo en 250nm; para el caso del isoxicam el máximo de absorción de 272nm comienza a desaparecer.

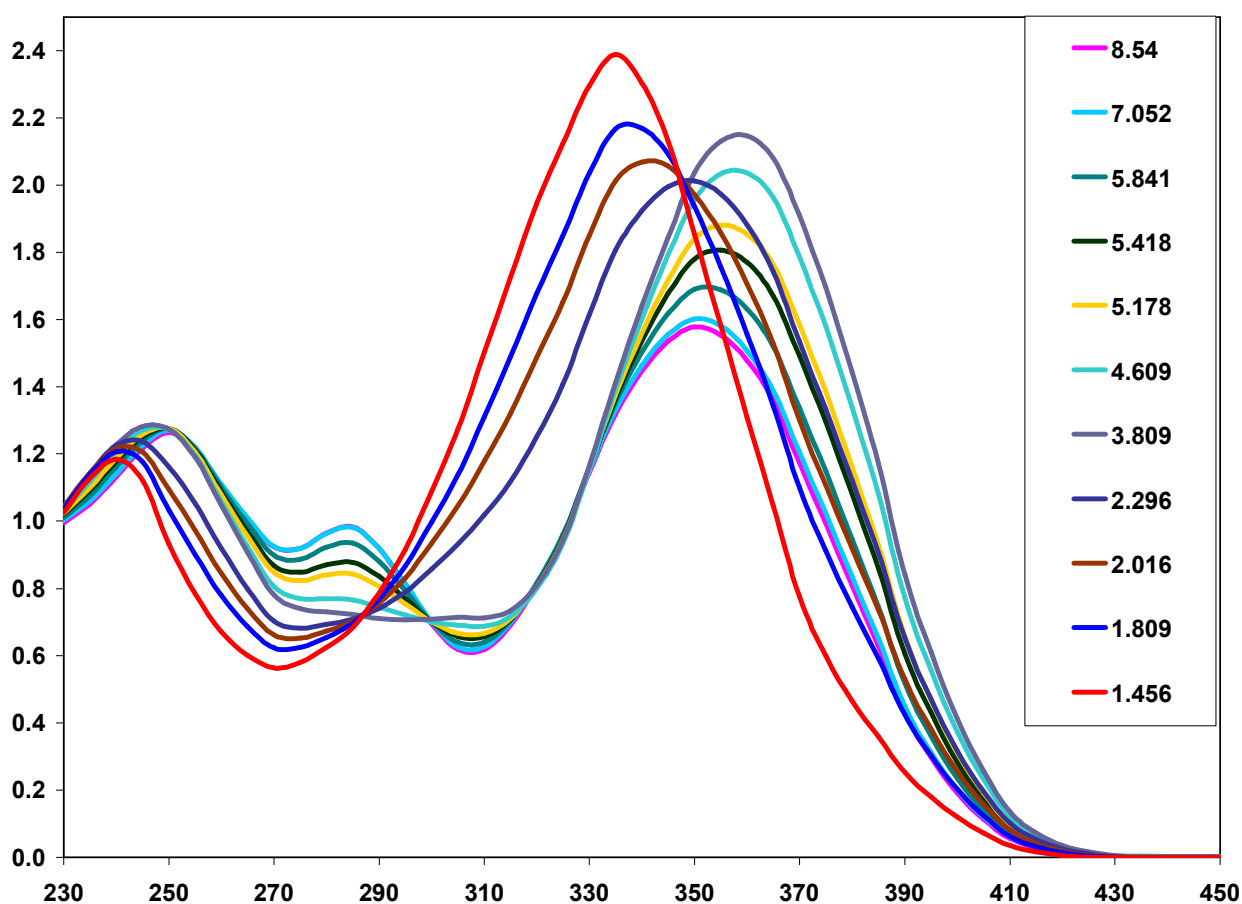


Figura 7.1 Espectros de absorción de piroxicam en función de pH a concentración 1.0×10^{-4}

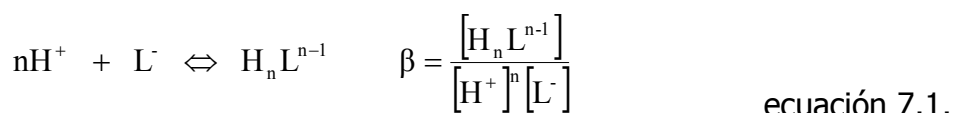
Dicho comportamiento llevo a pensar que el isoxicam haría lo mismo; la razón de esto es que el isoxicam presenta dos grupos ácidos, el anillo del 4-metil-isoxazol y el grupo enólico.

Los datos espectrofotométricos se alimentaron al programa computacional SQUAD, el cual está diseñado para refinar constantes de equilibrio con datos espectrofotométricos a partir de un modelo químico propuesto ⁽³³⁾. A su vez, se calcularon los coeficientes de absorptividad molar de las diferentes especies ácido-base del fármaco isoxicam.

En total se alimentaron 24 espectros, en un intervalo de longitudes de onda de 200 a 420 nm (cada 5 nm), con 46 datos por cada espectro.

Se utilizaron dos modelos, considerando como base los estudios publicados en la literatura sobre estos sistemas y el comportamiento del isoxicam parecido al piroxicam. Finalmente, se eligió un modelo químico que considera uno y dos equilibrio ácido-base.

La mejor convergencia para el modelo de dos equilibrios se muestra en la *tabla 7.1* y para el modelo de un solo equilibrio se muestra en la *tabla 7.3 (anexo 2)*, considerando uno y dos equilibrios generales como se muestra en la *ecuación 7.1*:



donde L = Isox

Tabla 7.1. Constante de acidez del fármaco isoxicam en medio acuoso calculada por el programa SQUAD considerando dos equilibrios.

Especies	Log β	Valores de pKa	σ	U
H ₂ Isox	$\log \beta_1 = 6.15 \pm 0.0006$	pKa ₂ =6.15	1.11×10^{-2}	1.11×10^{-1}
HIsox	$\log \beta_2 = 10.31 \pm 0.0005$	pKa ₁ =4.16		

Tabla 7.2. Constante de acidez del fármaco isoxicam en medio acuoso calculada por el programa SQUAD considerando un equilibrio.

Especies	Log β	Valores de pKa	σ	U
HIsox	$\log \beta = 3.93 \pm 0.0003$	pKa=3.93	8.33×10^{-3}	6.23×10^{-2}

Donde σ es la desviación estándar sobre los datos de absorbancia y U es la suma de residuales de absorbancia cuadrática.

Al analizar los modelos propuestos de uno y dos equilibrios se observó que valor de pKa es muy similar con la diferencia que para un solo equilibrio la desviación estándar y la suma de cuadrados es más pequeña que para el de dos equilibrios ácido-base.

Los autores Ruy-Shiuan Tsai, Pierre-Alain Carrupt y col. reportaron el valor de pKa en agua de 3.93 por valoración espectrofotométrica ⁽²⁶⁾. En comparación al valor de pKa que se obtuvo en el presente trabajo por valoración espectrofotométrica a condiciones pseudofisiológicas, con la ayuda de los programas computacionales TRIANG Y SQUAD fue de 3.93 ± 0.0003 .

En el presente trabajo se obtuvo una desviación estándar pequeña lo cual dichos autores no reportan.

Por medio del programa SQUAD se puede obtener los coeficientes de absortividad molar, ya que es muy importante al estudiar sustancias seguidas espectrofotométricamente.

La *figura 7.2* muestra los coeficientes de absorptividad molar, calculados por el programa SQUAD con dos equilibrios y en la *figura 7.3* para un solo equilibrio para las diferentes especies ácido-base del fármaco isoxicam.

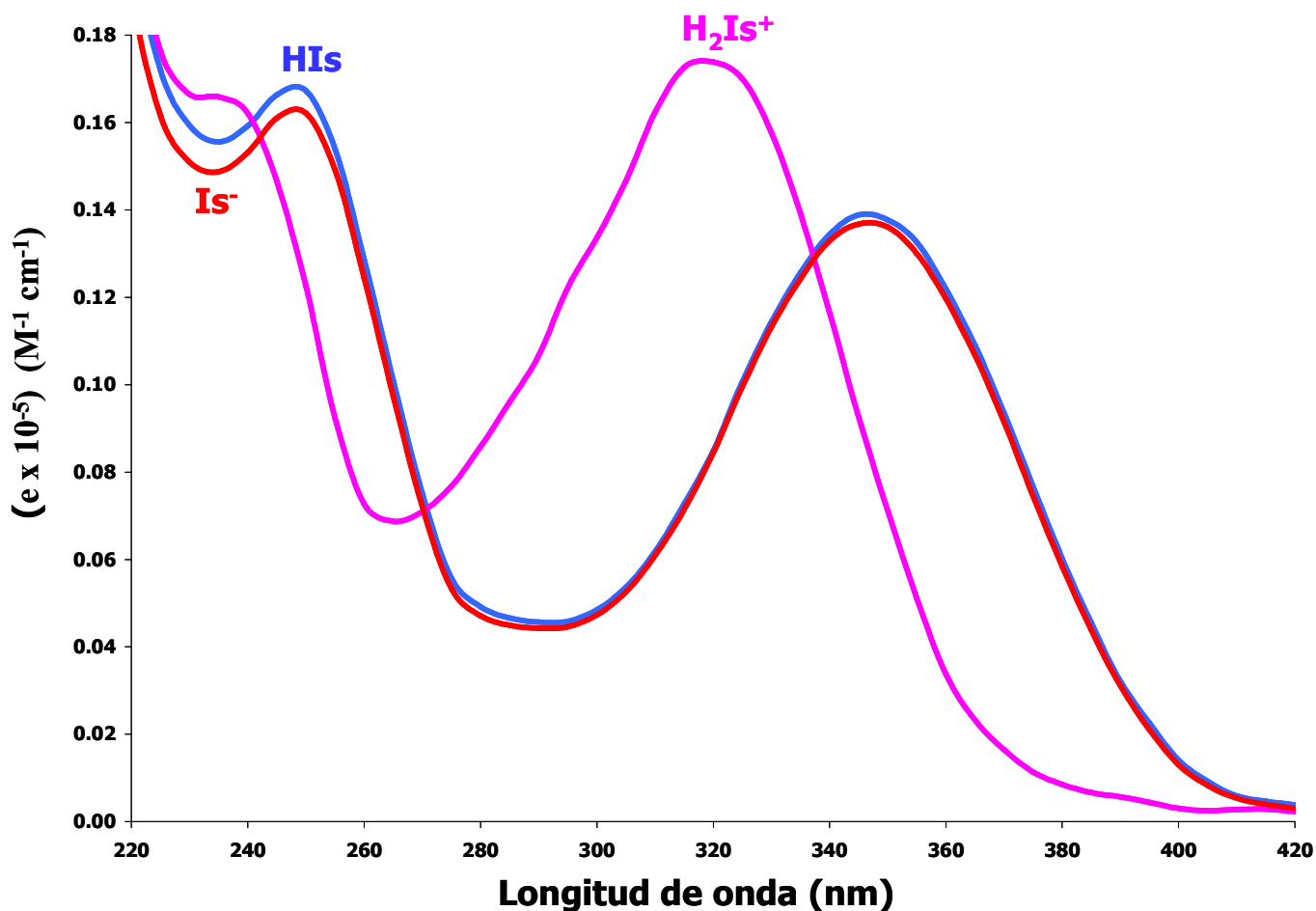


Figura 7.3. Coeficientes de absorptividad molar para las diferentes especies ácido-base de isoxicam en un medio acuoso calculadas por SQUAD.

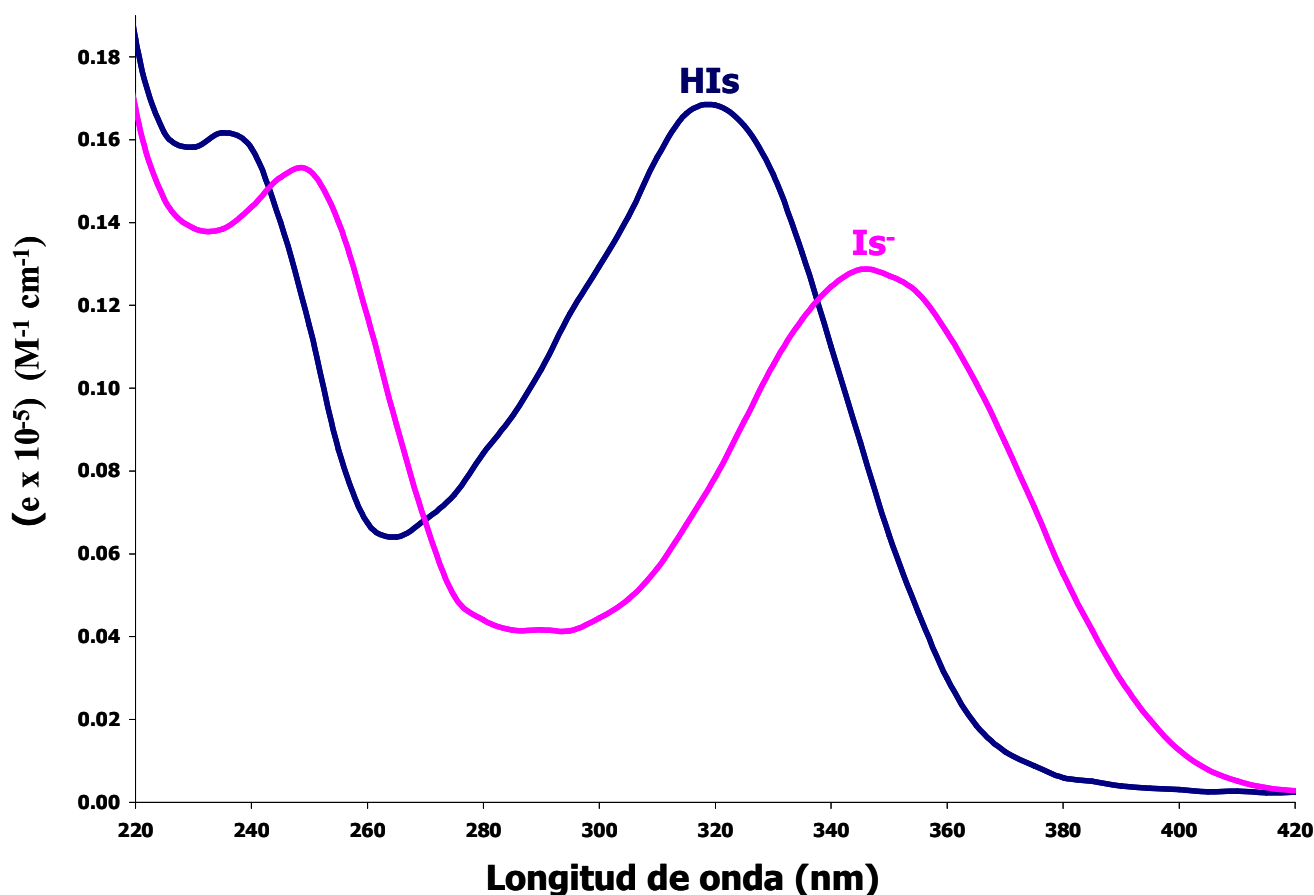


Figura 7.3. Coeficientes de absorción molar para las diferentes especies ácido-base de isoxicam en un medio acuoso calculadas por SQUAD.

Los coeficientes de absorción molar obtenidos por el programa SQUAD con dos equilibrios químicos (*figura 7.2*) revelan la existencia de tres especies la catiónica H_2Is^+ , la neutra (HIs) y la especie aniónica (Is^-), para un solo equilibrio químico (*figura 7.3*) presenta dos especie neutra (HIs) y la especie aniónica (Is^-).

Debido a la baja absorción que presentaba el isoxicam en agua se decidió aumentar la solubilidad con el solvente DMSO.

7.3 Determinación de la constante de acidez del fármaco isoxicam en mezclas DMSO-H₂O (10%-90%) a 37°C y I=0.15 M

Los espectros de absorción de la *figura 6.3* al igual que los espectros de absorción de la *figura 6.1*, presentaron dos puntos isobéuticos localizados a las mismas longitudes de onda 272nm y 340nm, por lo tanto se pudo observar que el comportamiento espectral era muy semejante, con la diferencia que la longitud máxima de 250nm ya no era tan notoria como en agua. Se observó que en mezcla DMSO-H₂O al 10% la absorbancia del punto máximo de 320nm presentó un efecto hipercrómico con respecto al agua.

En la *figura 6.3* también se observó que el comportamiento ácido-base que presenta el fármaco isoxicam seguido espectrofotométricamente muestra un desplazamiento hipsocrómico del máximo de 348nm a 320nm de medio básico a medio ácido.

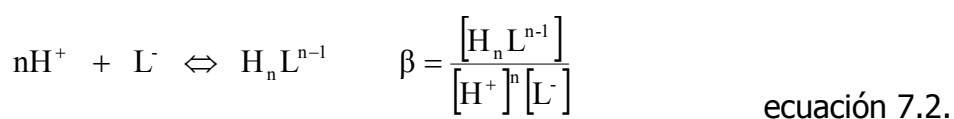
Los puntos máximos que presentó la mezcla de DMSO-H₂O al 10% fueron en 320nm y 348nm, donde los máximos de absorbancia se graficaron en función del pH (*figura 6.4*), en la *figura* se pudo observar que a valores de pH menores a 4.0 dependían del pH y a valores mayores a 5.0 la absorbancia era constante, al igual que en agua solo se encontró un solo equilibrio ácido-base y por lo tanto dos especies.

Los datos espectrofotométricos se alimentaron al programa computacional TRIANG, los resultados (*tabla 6.3*) que arrojo se compararon con los resultados de la *tabla 6.2* ambos presentaron dos especies en el sistema.

Al igual que en el programa TRIANG los datos espectrofotométricos obtenidos se alimenta al programa computacional SQUAD ⁽³⁾, el cual se diseñó para refinar constantes de equilibrio a partir de un modelo químico propuesto.

En total se alimentaron 24 espectros, en un intervalo de longitud de onda de 220 a 440 nm, con 46 datos cada espectro.

De la misma manera se consideraron uno y dos equilibrios químicos. La mejor convergencia para dos equilibrios se muestra en la *tabla 7.3* y para un equilibrio en la *tabla 7.4 (anexo 2)* considerando un y dos equilibrios generales como la *ecuación 7.2*:



donde L = Isox

Tabla 7.3. Constante de acidez del fármaco isoxicam mezclas DMSO-H₂O al 10% calculada por el programa SQUAD considerando dos equilibrios.

Especies	Log β	Valores de pKa	σ	U
H ₂ Isox	$\log \beta_1 = 6.14 \pm 0.0001$	pKa ₂ = 6.14	2.25×10^{-3}	4.77×10^{-3}
HIsox	$\log \beta_2 = 10.11 \pm 0.0001$	pKa ₁ = 4.03		

Tabla 7.4. Constante de acidez del fármaco isoxicam en mezclas DMSO-H₂O al 10% calculada por el programa SQUAD para un equilibrio ácido-base.

Especies	Log β	Valor de pKa	σ	U
HIsox	$\log \beta_1 = 4.02 \pm 0.0001$	pKa = 4.02	2.34×10^{-3}	5.44×10^{-3}

Donde σ es la desviación estándar sobre los datos de absorbancia y U es la suma de residuales de absorbancia cuadrática.

Debido a que la desviación estándar y la suma de cuadrados en mezclas DMSO-H₂O al 10% fueron más pequeñas que en agua; se decidió corroborar estos resultados por métodos como Electroforesis Capilar para ver la migración de las cargas y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para asignar el o los valores de pKa a la especie del 4-metil-isoxazol o al grupo enólico. (Anexo 3)

Por otra parte el valor de pKa que reportaron los autores Bernhard y Zimmermann en mezclas DMSO-Buffer en relación 1:100 a temperatura de $22\pm 0.5^\circ\text{C}$ fue de 3.93 ± 0.03 por valoración espectrofotométrica ⁽¹³⁾.

Al comparar el valor de pKa que se obtuvo en el presente trabajo por valoración espectrofotométrica a condiciones pseudofisiológicas, con la ayuda de los programas computacionales TRIANG Y SQUAD fue de 4.02 ± 0.003 .

Las condiciones pseudofisiológicas y el cambio del solvente influyen en el valor de la constante de acidez; esto debido a que la escala de pH para el agua es de 0 a 14 mientras que para el DMSO es de -5.2 a 27.5 ⁽²⁷⁾, que a su vez el agua es débilmente ácida en DMSO ⁽²⁸⁾; la constante dieléctrica es otro variable puesto que la constante dieléctrica del DMSO es de 45 y la del agua es de 87.74 por lo tanto entre mayor sea la constante dieléctrica menor será la atracción entre los iones.

Sin embargo el cambio que presentó el pKa no se aleja del reportado por lo autores.

La ventaja que presenta este trabajo es que se obtuvo una desviación estándar más pequeña a la que reportan los autores.

Por otro lado con el programa SQUAD se puede obtener el coeficiente de absorptividad molar, ya que es muy importante al estudiar sustancias seguidas espectrofotométricamente.

La *figura 7.4* muestra los coeficientes de absorptividad molar, calculados por el programa SQUAD para las diferentes especies ácido-base del fármaco isoxicam.

Los coeficientes de absorptividad molar obtenidos por el programa SQUAD en mezclas DMSO-H₂O al 10% con dos equilibrios (*figura 7.4*) químicos revelan la existencia de dos especies ácido-base, la especie neutra (HIs) y la especie aniónica (Is⁻), ya que la especie catiónica es muy semejante a la especie neutra.

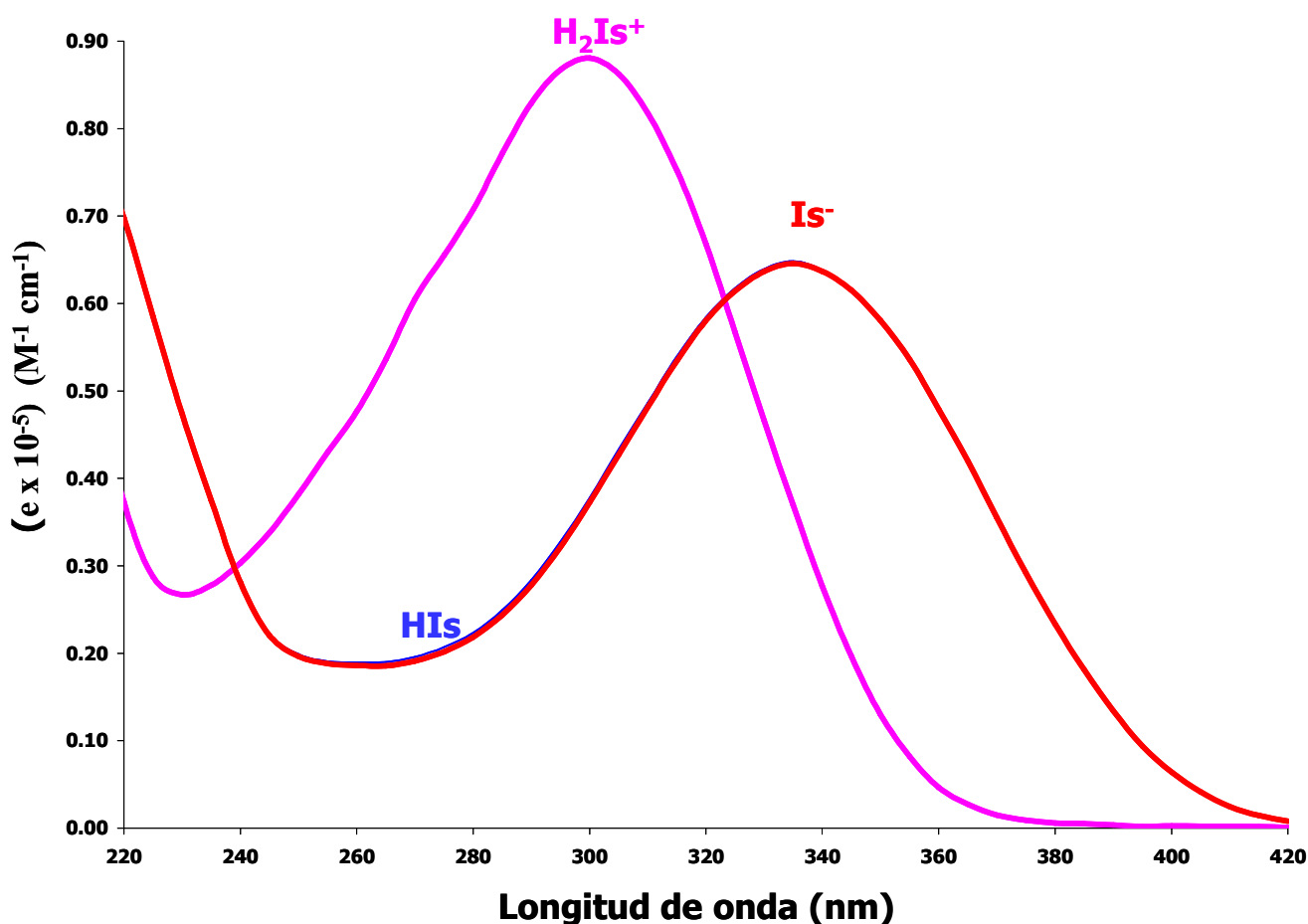


Figura 7.4. Coeficientes de absorptividad molar para las diferentes especies ácido-base de isoxicam en un mezclas DMSO-H₂O al 10%-90% calculadas por SQUAD.

En la *figura 7.5* también se puede observar la existencia de dos especies ácido-base la neutra (HIs) y aniónica (Is⁻).

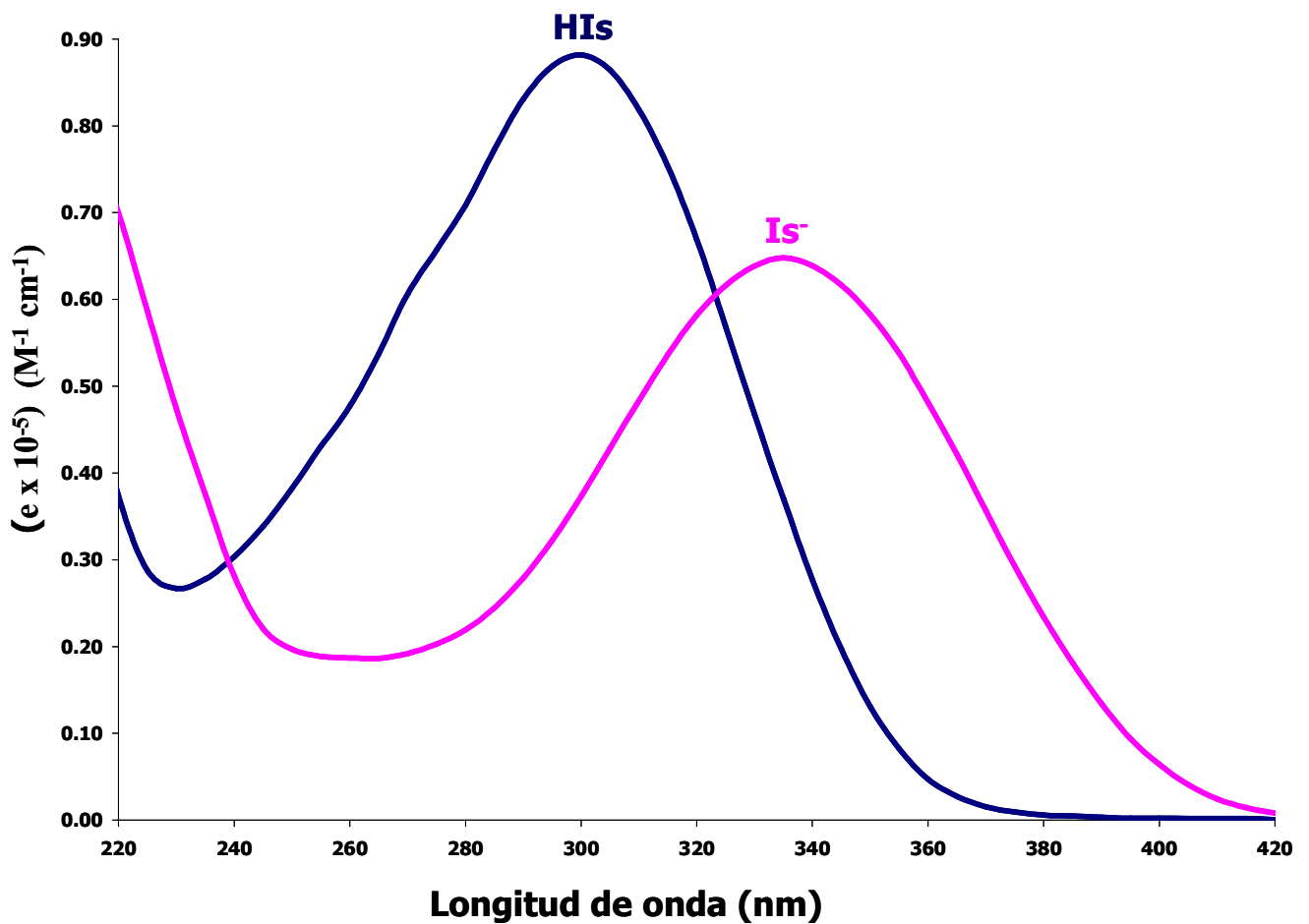


Figura 7.5. Coeficientes de absorción molar para las diferentes especies ácido-base de isoxicam en un mezclas DMSO- H_2O al 10%-90% calculadas por SQUAD.

En la *figura 7.5* se puede observar que al igual que en medio acuoso existen dos diferentes especies ácido-base para el fármaco isoxicam.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó que existen dos especies ácido-base para el fármaco anti-inflamatorio isoxicam en medio acuoso bajo condiciones pseudofisiológicas esto debido a que las condiciones del cuerpo humano se encuentran a una temperatura de 37°C y una fuerza iónica de 0.15M.
- Se identificó que existen dos especies ácido-base en mezclas DMSO-H₂O al 10% a T=37°C, I=0.15 M obteniendo un aumento en la absorbancia y así poder obtener mejores resultados estadísticos que en medio acuoso.
- Se determinó que existe un solo equilibrio ácido-base y por tanto una constante de acidez de (pK_a=3.93) igual a la reportada por Ruy y colaborador, con la diferencia que en este trabajo si se reportó la desviación estándar lo cual ellos no hacen.
- Se dedujo que en mezclas DMSO-H₂O al 10% sólo existía un solo equilibrio químico y por lo tanto una constante de acidez de (pK_a=4.02) diferente a la reportada por Bernhard y Zimmermann a otras condiciones, con la variable que en este trabajo se muestran los valores de absorbancia y en el artículo que publicaron no se presentan.

-
- Con la ayuda de los estudios de Electroforesis Capilar se pudo afirmar que solo existían dos especies ácido-base la aniónica y la neutra y por RMN se le pudo asignar el valor de pKa al grupo enólico
 - A diferencia de las referencias tanto en agua como en mezclas se demostró que no sólo basta realizar estudios espectrofotométricos sino también es necesario utilizar métodos computacionales y corroborar dichos resultados por medio de otros estudios de identificación de especies.

9. REFERENCIAS

1. Pedro Gili, Alfredo Mederos and Pablo A. Lorenzo-Luis. Rev. Acad. Canar. Cienc. XII (Núm. 3-4), (2000) 199.
2. David M. Taylor and David R. Williams. Trace Elements Medicine and Chelation Therapy. The Royal Society of Chemistry. Cambridge (1995).
3. E. J. Baran. Química Bioinorgánica. McGraw-Hill, Madrid (1994).
4. Wolfgang Kaim, Brigitte Schwederski. Bioinorganic Chemistry of Life. An Introduction and Guide. Wiley, New York, (1994).
5. Florez, Jesús. ***Farmacología humana***, 4ª, masson, España, 2004, 26-30.
6. Rang, h. p. ***Pharmacology***, 5th, churchill livingstone, uk, 2003, 244-249.
7. Brooks, P.M. and Day R.O. ***"Non steroidal anti-inflammatory drugs- difefrences and similarities"***, N. Engl. J Med. 324, 1716-1725
8. Zijian Guo and Peter J. Sadler. Angewandte Chemie International Edition. 38 (1999) 1512.
9. Legget D, ***"Computational for Methods for Determination of Formation Constants"***. New York, Plenum Press,(1985).
10. Meloun M. Havel J, y Högfeltdt H. ***"Computation of Solution Equilibria"***. Ellis-Horwood Limited. Inglaterra, (1988).
11. J. Van Westrenen, P.L. Khizhnyak y G.R. Choppin. Comput. Chem., 15, (1991) 121.

-
12. Hartley F.R., Burgess C., Alcock R.M. **"Solution Equilibria"**. Wiley Chichester, (1980).
13. D. J. Leggett, S. L. Kelly, L. R. Shiue, Y. T. Wu, D. Chang and K. M. Kadish. *Talanta*. 30, No.8, (1983) 579.
14. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*. 43, (1996) 1739.
15. L. Alderighi, P. Gans, A. Lenzo, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* 184, (1999) 311.
16. Sandra Defazio and Renzo Cini. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (2002) 1888.
17. E. Bernhard and F. Zimmermann. *Arzneim-Forsch.* 34, (1984) 647.
18. Ruey-Shivan, Tsai, *Helv. Chim. Acta*, 76, (1993) 842
19. Skoog Douglas A, **"Principios de análisis Instrumental"**, 5ª ed. 1992 Mc. Graw Hill Madrid España. Pp 122-123, 322, 481-490
20. Harris C. Daneil, **"Análisis Químico Cuantitativo"**, Grupo Editorial Iberoamericana, 1992 México D.F. pp. 495-497
21. Charlot Gaston, "Curso de Química Analítica General" vol. II Métodos Químicos y absorciométricos, cromatografía, p.p. 169.
22. Ramette, R. W, **"Equilibrio y análisis químico"**, Fondo Educativo Interamericano, México, 1983.
23. Morales Pérez Adriana. Tesis de maestría: **"Estudios de sistemas químicos multirreaccionantes en soluciones acuosas por métodos espectrofotométricos con el programa squad y otros métodos computacionales"** FES-Cuautitlán UNAM, México. 1993

-
24. Moya Hernández. María del Rosario, tesis de licenciatura **"Estudio espectrofotométrico del sistema Lantano-4-(2pyridilazo) resorcinol en medio acuoso"** FES-Cuautitlán UNAM, Edo. de México 1994, pp. 39.
25. M. Soledad García, C. Sánchez-Pedreño, Ma. Isabel Alberro, M. José Jiménez. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 21 (1999) 731.
26. Ruy-Shiuan Tsai, Pierre-Alain Carrupt, Nabil El Tayar, Yvan Gieoud, Pedro Andrade and Bernard Testa, **Physicochemical and Structural Properties of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Oxicams**. Vol. 76(1993)
27. Trémillon Bernard, **Reactions in solutions. An Applied Analytical Approach**, Great Britain 1997 pp 264-269
28. Kolthoff and Reddy, **Acid-Base Strength in Dimethyl Sulfoxide**, 1962.
29. Castillo Rodríguez Miriam A. tesis de licenciatura **"Desarrollo de un programa en ambiente multimedia sobre electroforesis capilar"** FES-Cuautitlán UNAM, Edo. de México 2001, pp 14.
30. Skoog Douglas A, **Análisis Instrumental**, 4ª ed. 1994 Mc. Graw Hill Madrid España. Pp 785-787, 517-518
31. Smith I. Feinberg J, 1979 **"Cromatografía sobre papel y capa fina. Electroforesis"** Ed. Alambra. España, pp. 129-143
32. Requena Rodríguez Alberto, Zúñiga Román José, **"Espectroscopia"**, Pearson Prentice Hall SA:, Madrid, 2004, pp.365,366, 369,394.

-
33. Willard Hobart, ***Métodos instrumentales de análisis***, Ed. Continental, México 1984, pp 231-234.
34. Silverstein Robert M, ***identificación espectrométrica de compuestos orgánicos***, Ed. Diana, México 1980. pp.171-172.
35. Dr. F. Conejero Lara y Dr. O. López Mayorga, Departamento de Química Física. Universidad de Granada, Curso de doctorado de RMN de proteínas de la Universidad de Granada.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1

10.1 ELECTROFORESIS CAPILAR

En los últimos años la electroforesis capilar se ha llevado a cabo en capilares de sílice fundida de sólo unas cuantas micras de diámetro interno, y se ha determinado su gran utilidad en separación de diversas sustancias, especialmente macromoléculas.⁽²⁹⁾

En electroforesis capilar, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por el efecto de un elevador potencial de corriente continua que se aplica a lo largo de la longitud del tubo.⁽³⁰⁾

En este trabajo la electroforesis se usó para ver el signo de la carga eléctrica de las especies en ciertos valores de pH, con el fin de verificar algunas hipótesis de los modelos de SQUAD.

Fundamento de la técnica

Muchas moléculas poseen grupos ionizables y pueden tenerse en disolución en forma de especies con carga eléctrica, tanto como ***cationes (+)*** o como ***aniones (-)***. Las moléculas que tienen cargas similares poseen distintas relaciones carga/masa, debido a inherentes diferencias de peso molecular. En conjunto estas diferencias son la base para una diferencial la migración, cuando los iones en disolución son sometidos a un campo eléctrico.

Generalmente los cationes se trasladan hacia el **cátodo (-)** y los aniones hacia el **ánodo (+)** a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas sobre los iones cargados de las moléculas que migran y el medio circulante, que son principalmente las fuerzas de fricción electrostática. El material de la muestra debe estar disuelto o suspendido en algún disolvente miscible con agua (ej. buffer) para que tenga efecto el fenómeno electroforético. La corriente se mantiene por todo el circuito ya que los electrodos, están sumergidos en viales que contienen el buffer. Durante la separación en los electrodos se producen iones hidroxilo e hidrógeno en el cátodo, mientras que en el ánodo se forma el oxígeno e iones hidrógeno⁽³¹⁾.

El tubo capilar cuenta con un flujo electroosmótico que mueve el disolvente desde el caso que contiene el electrodo positivo al que contiene el negativo. La causa del flujo electroosmótico es la doble capa eléctrica que se desarrolla en la interfaz entre el sílice y la disolución. Las cargas negativas fijada sobre la superficie del capilar provienen de la disociación de los grupos funcionales que constituyen la superficie de sílice fundida. Esta carga atrae a los iones positivos de la solución reguladora, originando así una estructura doble de la capa típica. Los iones positivos móviles que rodean la superficie interior del tubo son atraídos por el electrodo negativo arrastrando con ellos a las moléculas del disolvente.

10.2 Determinación de la carga eléctrica sobre las especies formadas a partir de un estudio de Electroforesis capilar

Para verificar la existencia de cada una de las especies con las que cuenta el fármaco anti-inflamatorio isoxicam se realizó un experimento por medio de la técnica de separación de electroforesis capilar, los resultados de cada uno de los electroferogramas a pH= 2.14 y pH= 7.90 se muestran en las *figuras 10.1 y 10.3* respectivamente.

En el electroferograma a pH= 2.14 (*figura 10.1 y 10.2*) se observó que la especie catiónica no estaba presente en la muestra del fármaco anti-inflamatorio isoxicam, ya que la especie catiónica no migró hacia el ánodo.

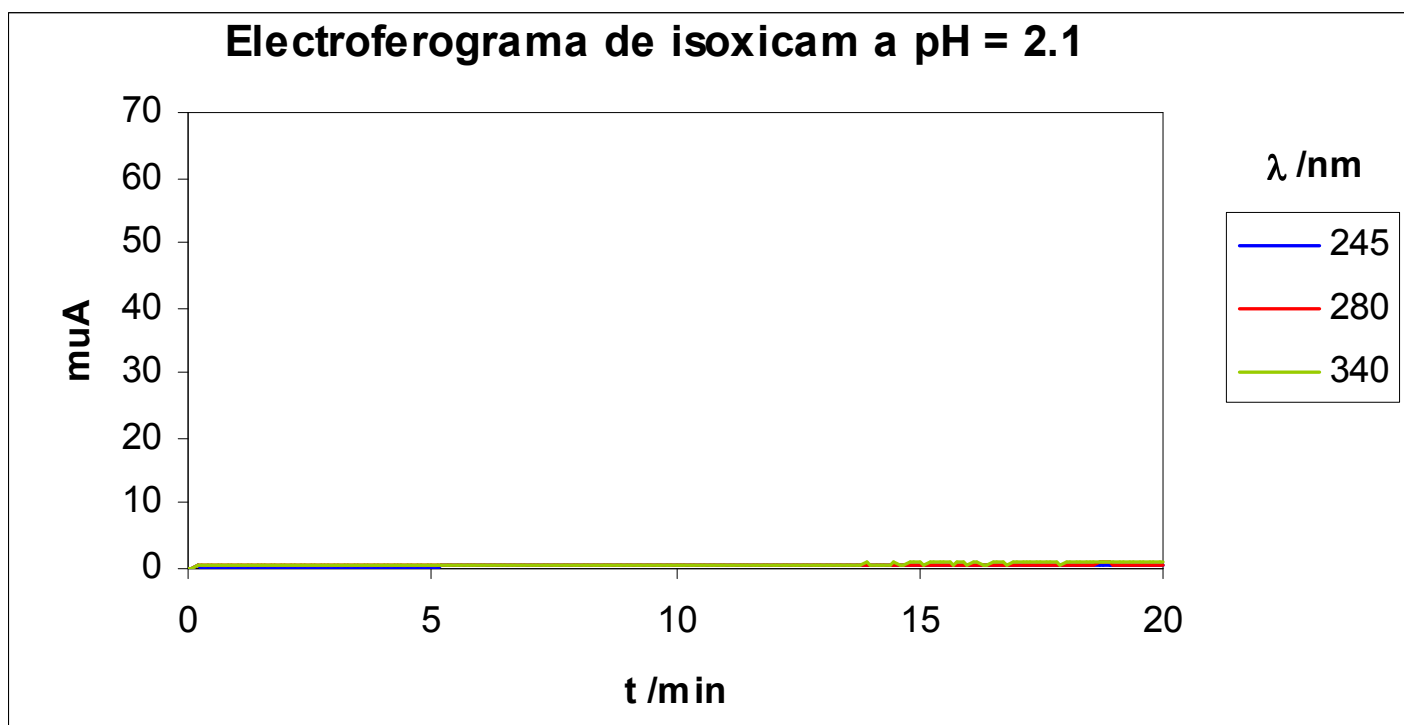


Figura 10.1. Electroferograma de isoxicam, Absorbancia contra tiempo a pH=2.14 con buffer de fosfato 50mmM, tubo capilar con longitud total de 50.2cm, longitud capilar a la ventana de 40cm y un voltaje de 9 mV.

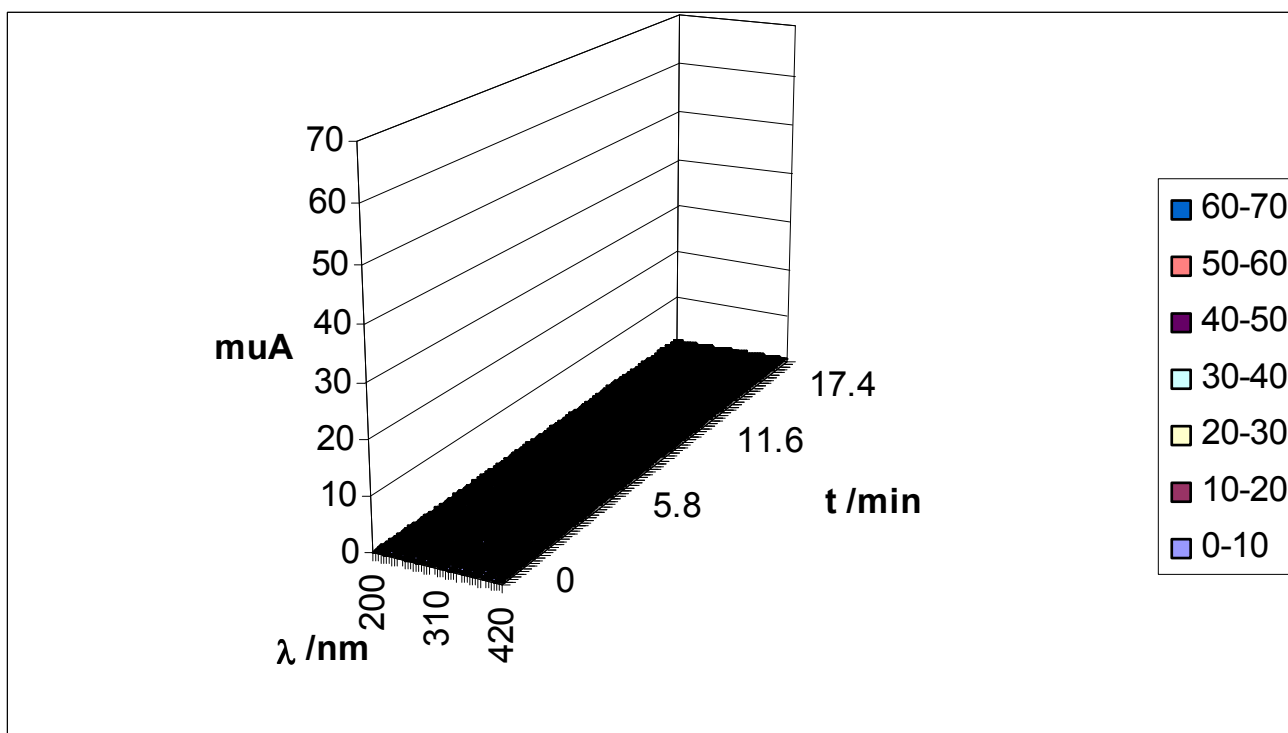


Figura 10.2. Espectros de absorción Ultravioleta-Visible a diferentes tiempos de migración obtenidos en el experimento de la figura 10.1 a pH= 2.14

Cuando se realizó la corrida a pH= 7.90 (figura 10.3 y 10.4) se observaron dos señales, a un tiempo de 5 minutos el espectro de la acetona; en un tiempo de 8.043 el espectro de la especie aniónica que se desplazó hacia el ánodo. Se corroboró que el espectro que se observó en la figura 10.4 es la misma que presentaron los espectros de absorción Ultravioleta-Visible de la figura 6.1 en medio acuoso.

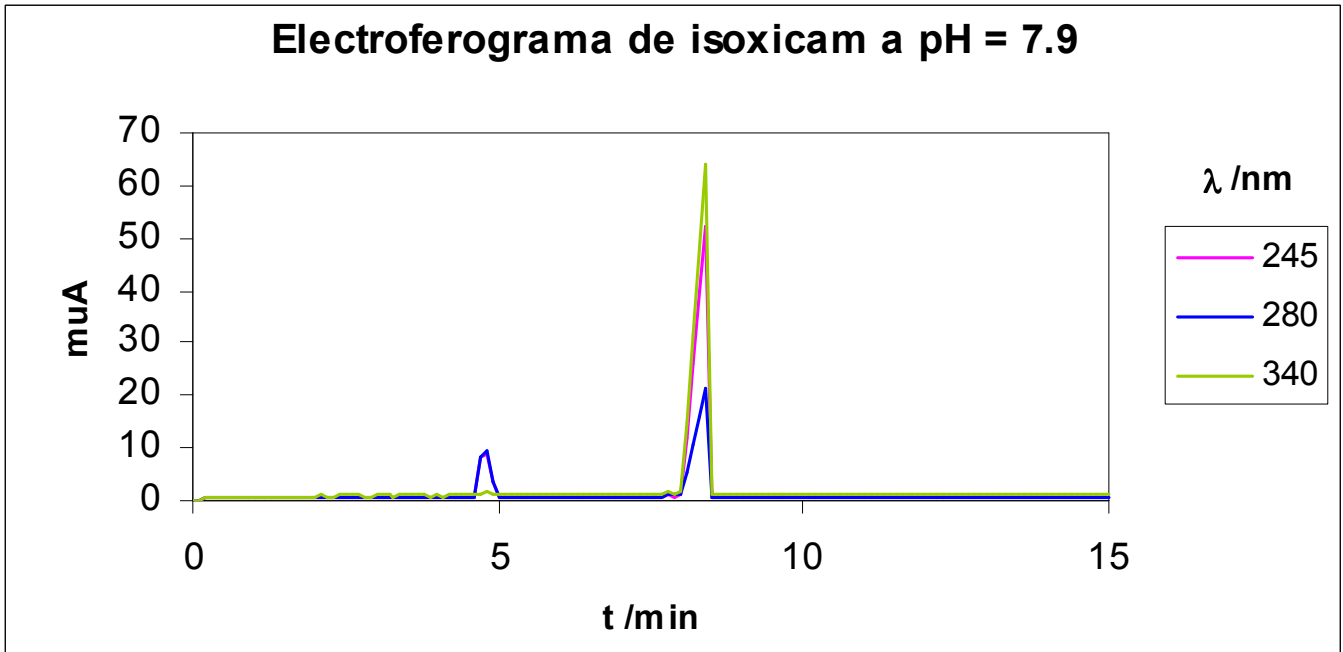


Figura 10.3. Electroferograma de isoxicam, Absorbancia contra tiempo a pH=7.90 con buffer de fosfato 50mmM, tubo capilar con longitud total de 50.2cm, longitud capilar a la ventana de 40cm y un voltaje de 9 mV.

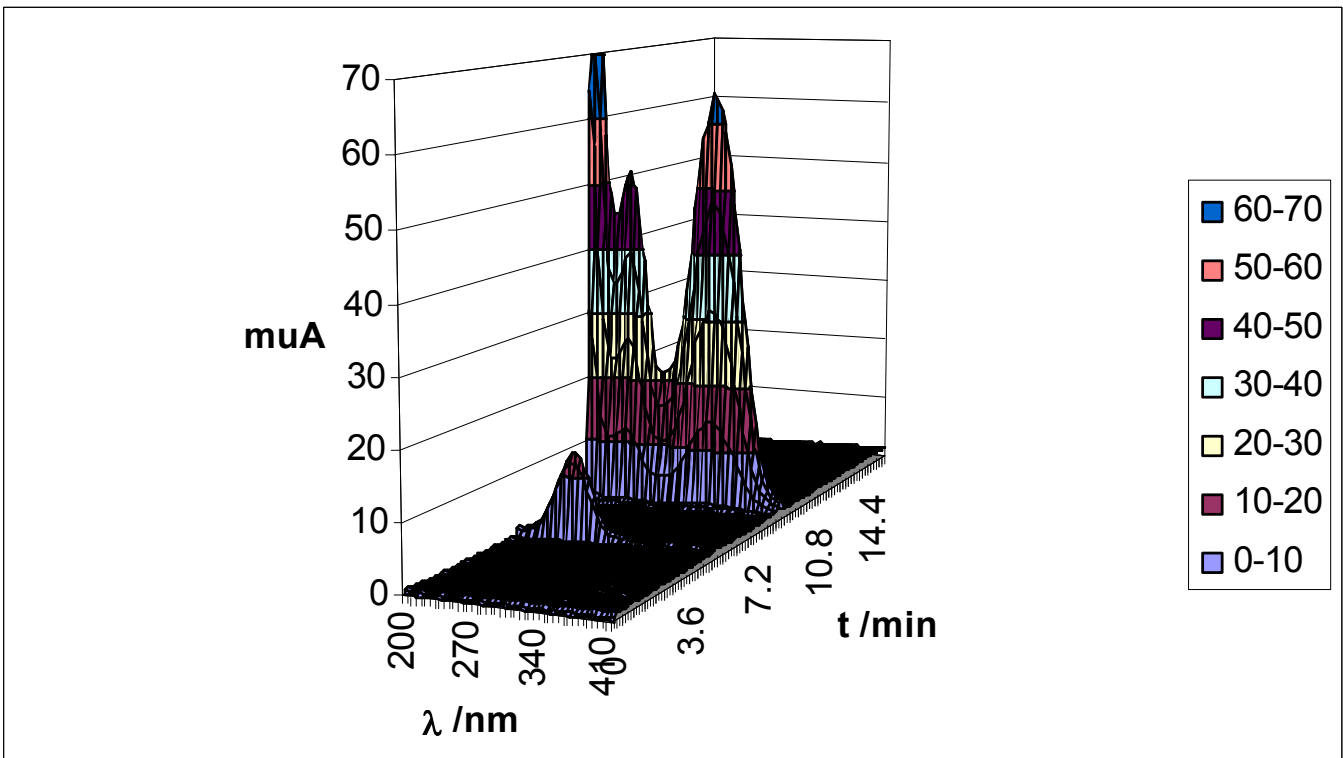


Figura 10.4. Espectros de absorción Ultravioleta-Visible a diferentes tiempos de migración obtenidos en el experimento de la figura 10.3 a pH= 7.90

10.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La resonancia magnética nuclear es un método basado en las propiedades magnéticas de los núcleos. Bajo condiciones adecuadas, la muestra absorbe radiación electromagnética en la región de radio frecuencia. Todos los núcleos contienen carga. En algunos núcleos, esta carga hace un "spin" (gira) en el eje nuclear y esta circulación de la carga genera un dipolo magnético a lo largo del eje. ⁽³²⁻³³⁾

El momento angular de spin se describe en términos del número de spin nuclear (I) donde tiene valores de $0, 1/2, 1, 3/2, \dots$; la magnitud intrínseca del dipolo magnético generado se expresa como momento magnético nuclear (μ).

Cada protón y neutrón de un núcleo tiene su propio spin y el momento angular del núcleo es el resultado de esos momentos de spin. Cuando la suma de protones y neutrones es par, I es igual a cero o a un número entero ($0, 1, 2, \dots$); si la suma es impar I es la mitad de un número entero ($1/2, 3/2, 5/2, \dots$). ⁽³⁴⁾

Los núcleos ^1H , ^{19}F , ^{13}C y ^{31}P tienen número de spin $I=1/2$ y una distribución de carga esférica uniforme.

El número de spin determina el número de orientaciones que debe adquirir un núcleo en un campo magnético uniforme exterior, de acuerdo a la *ecuación 2.10*:

$$2I + 1$$

ecuación 10.1

Donde I es el número de spin nuclear

El protón tiene dos orientaciones en un campo magnético uniforme aplicado paralelo al campo magnético, es decir alineado al campo magnético, o antiparalelo con el campo magnético, (alineado en contra del campo magnético). al estar paralelo al campo magnético se encuentra en un estado de baja energía (estable) mientras que al quedar en estado antiparalelo se halla en un estado de alta energía (inestable), como se observa en la *figura 10.4*.

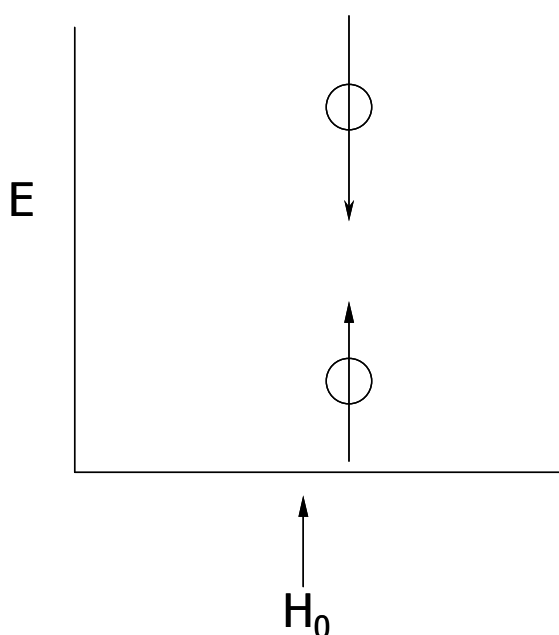


Figura 2.9. Niveles de energía de un protón.

Al establecer los niveles de energía para el protón ahora se puede introducir un cuanto de energía ($h\nu$); donde (h) es la constante de Planck y (ν) es la frecuencia de radiación electromagnética; de tal manera que la orientación paralela (estado de energía baja) se puede desplazar rápidamente hacia la orientación antiparalela (estado de alta energía) en un campo magnético de cierta intensidad H_0 .

La ecuación de RMN fundamental que correlaciona la frecuencia electromagnética con una intensidad de campo es la *ecuación 10.2*

$$\nu = \frac{\gamma H_0}{2\pi} \quad \text{ecuación 10.2}$$

donde

γ = relación giromagnética y constituye una constante fundamental

La relación giromagnética es un factor en la constante de proporcionalidad entre la frecuencia de energía absorbida y la intensidad del campo magnético

Por lo tanto al aplicar un campo magnético uniforme e intenso (H_0) los núcleos sufren el efecto de una fuerza de rotación y tienden a sufrir orientaciones permisibles con respecto al campo externo. Sus ejes de spin se inclinan hacia el campo y exhiben un movimiento de precesión con respecto a la dirección del campo; como se muestra en la *figura 10.5*

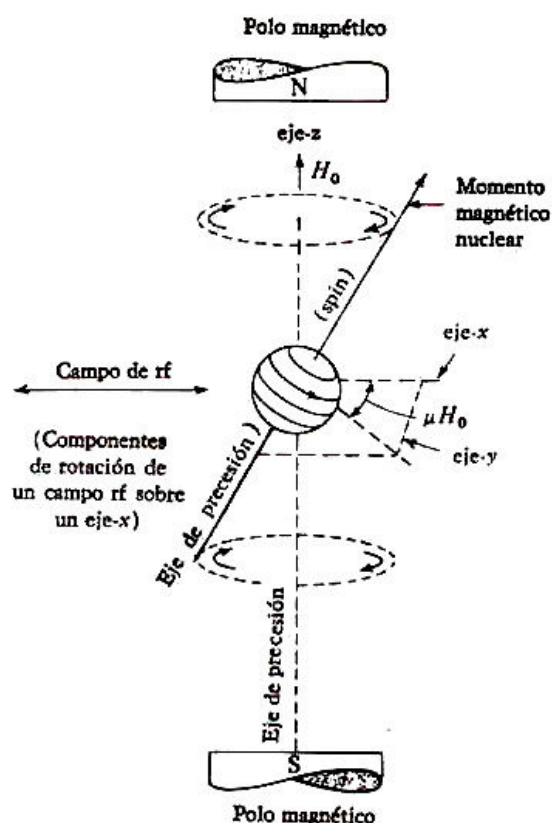


Figura 10.5 Núcleo rotatorio en un campo magnético

Los núcleos con número de spin pequeño permiten obtener los espectros de mejor resolución.

La *ecuación 10.2* es la frecuencia (ν) relacionada con las transiciones en RMN, y establece la frecuencia de absorción de resonancia magnética que varía de acuerdo al valor del campo aplicado; por lo tanto ν aumenta linealmente con el campo magnético aplicado ⁽¹²⁾, como se puede observar en la *figura 10.6*.

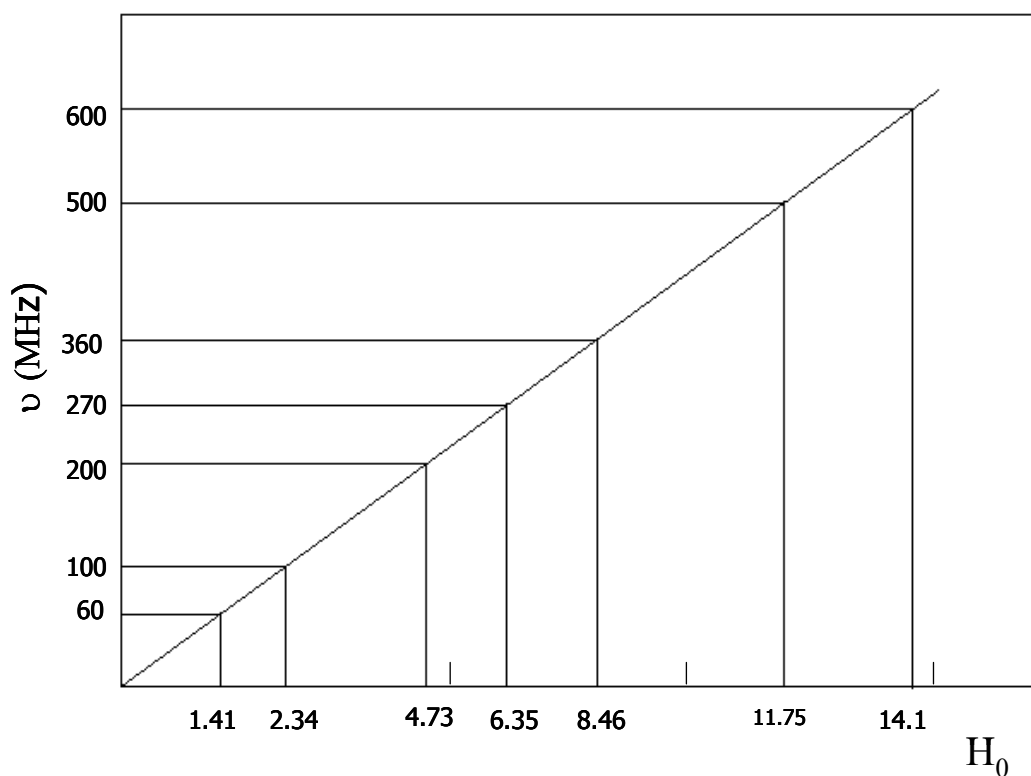


Figura 10.6. Variación de la frecuencia de resonancia que induce las transiciones de spin protónicas con la intensidad del campo magnético aplicado H_0 .

Las frecuencias de resonancia dependen ligeramente del entorno electrónico y del protón de la molécula y da lugar a lo que se conoce como desplazamiento químico (δ), los desplazamientos químicos pueden expresarse en partes por millón (ppm) ^(19,31) como se muestra en la *ecuación 10.3*

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_r}{\nu_r} \times 10^6 \quad \text{ecuación 10.3}$$

donde:

ν_s = a la frecuencia de la muestra o el analito

ν_r = a la frecuencia de la referencia

El compuesto patrón que se utiliza en la RMN de ^1H y ^{13}C es el tetrametilsilano $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, mejor conocido como (TMS), en este compuesto todos los protones son idénticos ya que es prácticamente inerte, fácilmente soluble en la mayoría de líquidos orgánicos, pero insoluble en agua. **(32-33)**

10.4 Resonancia magnética nuclear bidimensional

Si al campo magnético principal se le coloca un campo magnético de menor intensidad entonces se puede generar espectros de absorción bidimensionales.

El término RMN-2D abarca un amplio conjunto de técnicas que tienen en común el uso de secuencias específicas de pulsos de radiofrecuencia para manipular la evolución de la magnetización de una muestra.

El esquema general para un experimento de RMN-2D puede considerarse formado por cuatro periodos de tiempo o bloques a los que llamamos preparación, evolución, mezcla y detección, *figura 10.7*.

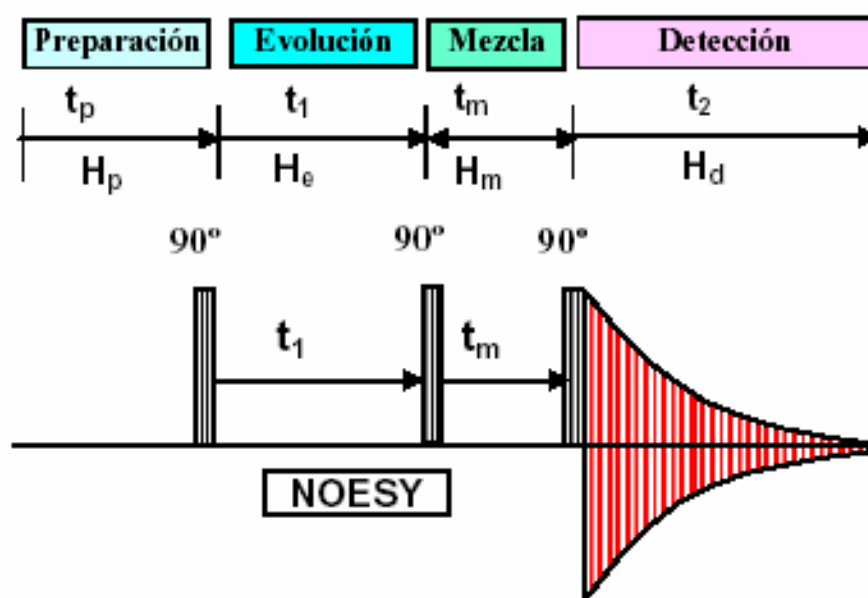


Figura 10.7. Esquema experimental general para los experimentos de RMN-2D. Ejemplo del NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

El periodo de preparación, t_p , es un tiempo de retardo cuyo propósito es asegurar que la magnetización de equilibrio se ha restablecido antes de repetir la secuencia de pulsos en el proceso acumulativo que usualmente se realiza para mejorar la relación señal/ruido. Este periodo termina con la aplicación de uno o más pulsos para crear coherencia. El periodo de evolución, t_1 , que sigue al de preparación corresponde a la 2ª dimensión de los espectros bidimensionales; durante este periodo la coherencia evoluciona hasta alcanzar un estado que depende del valor t_1 .

El periodo de mezcla, t_m , incluye uno o varios pulsos de radiofrecuencia y tiempos de retardo; este periodo se diseña con el propósito de transferir coherencia entre espines.

Durante el periodo de detección, t_2 , el sistema evoluciona y se registra la FID (atenuación libre de la inducción magnética) cuya T.F. (transformación de Fourier) generará la dimensión de frecuencia F_2 del espectro bidimensional. En un experimento completo los tiempos de preparación, mezcla y detección son fijos en cada medida, mientras que el tiempo de evolución se incrementa a intervalos regulares entre medidas. Como se muestra en la *figura 10.8*⁽³⁵⁾

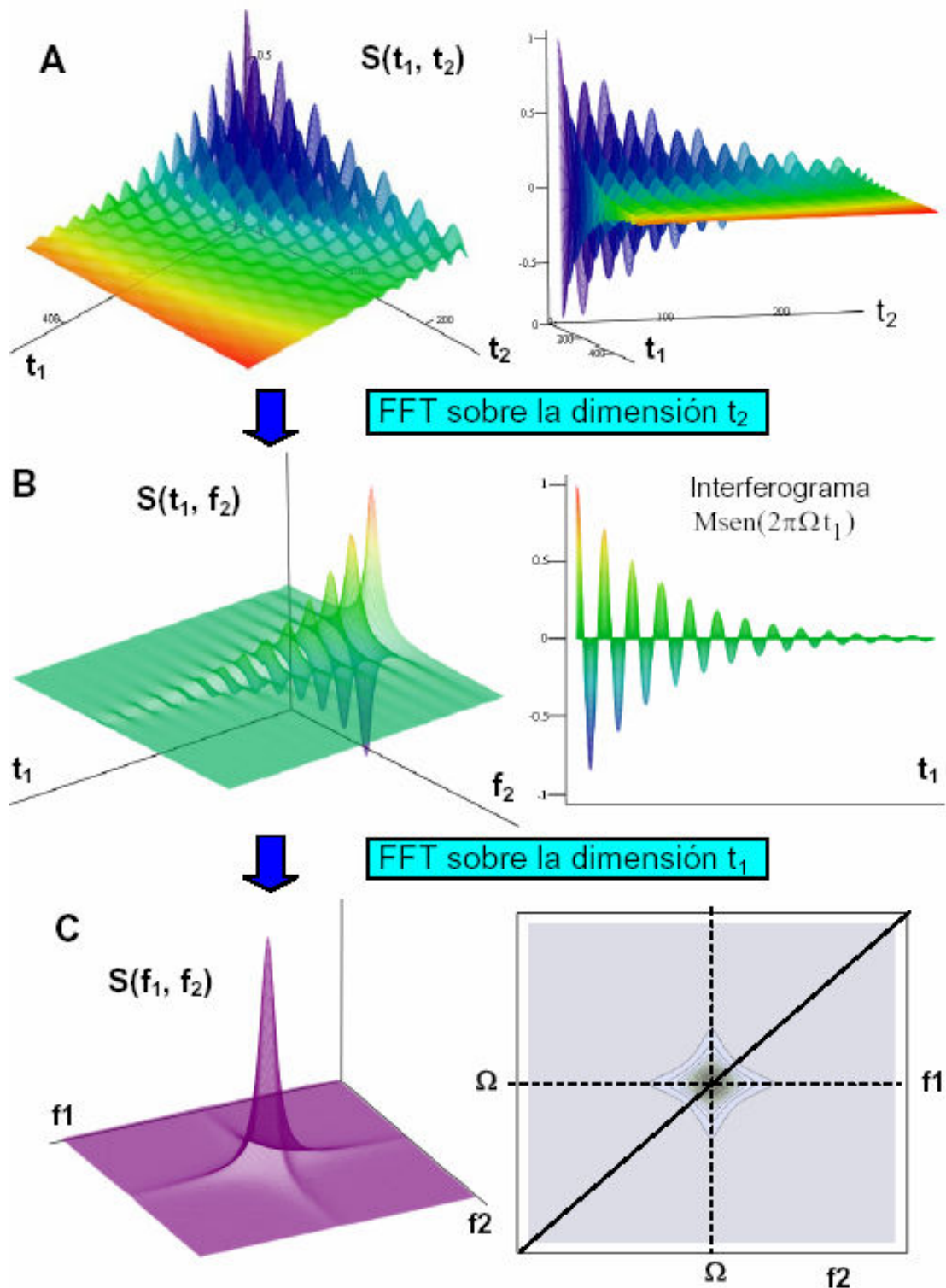


Figura 10.8: **A:** Conjunto de datos $S(t_1, t_2)$ obtenidos al digitalizar las FID's en el dominio de la variable t_2 para valores discretos regularmente separados de la variable t_1 . **B:** $S(t_1, f_2)$, espectros obtenidos por FFT en el dominio t_2 cuyas amplitudes están moduladas en el dominio t_1 . **C:** $S(f_1, f_2)$, espectro bidimensional obtenido por doble FFT de $S(t_1, t_2)$ y mapa de contornos del espectro bidimensional.

**10.5 ESTUDIOS
PRELIMINARES DE
ISOXICAM A
TRAVÉS DE
ESTUDIOS DE
RESONANCIA
MAGNÉTICA
NUCLEAR.**



11.451

¹H
Isoxicam, 5mg.
Disolvente: DMSO-d₆, 500 ul.
Temperatura: 298 K
DMX500

Current Data Parameters
NAME AR.Isoxicam2
EXPNO 1
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20061004
Time 10.12
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinuc1
PULPROG zg
TD 130432
SOLVENT DMSO
NS 48
DS 0
SWH 10869.565 Hz
FIDRES 0.060242 Hz
AQ 8.2999220 sec
RG 256
DM 46.000 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 2.0000000 sec
MCREST 0.0000000 sec
MCWRR 0.015000000 sec
***** CHANNEL #1 *****
NUC1 ¹H
P1 4.00 usec
PL1 0.70 dB
SFO1 500.1341338 MHz
F2 - Processing parameters
SI 282144
SF 500.1300036 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

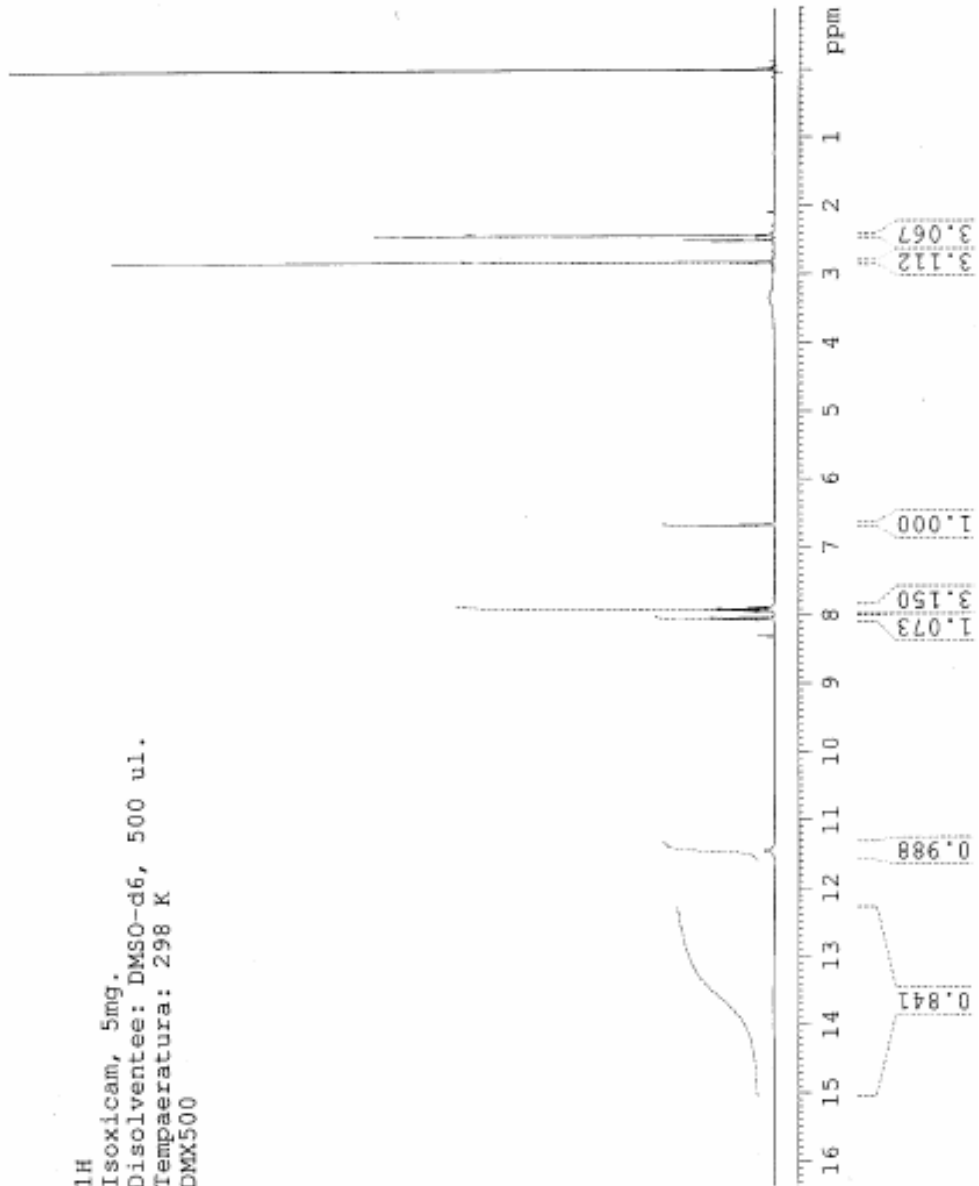


Figura 10.9. Espectro de protón deuterado



¹³C
 Isoxicam, 5mg.
 Disolvente: DMSO-d6, 500 u.l. + D2O < 10ul
 Temperatura: 298 K
 DMX500

$\Delta\delta$ (efecto isotopico de 2H)

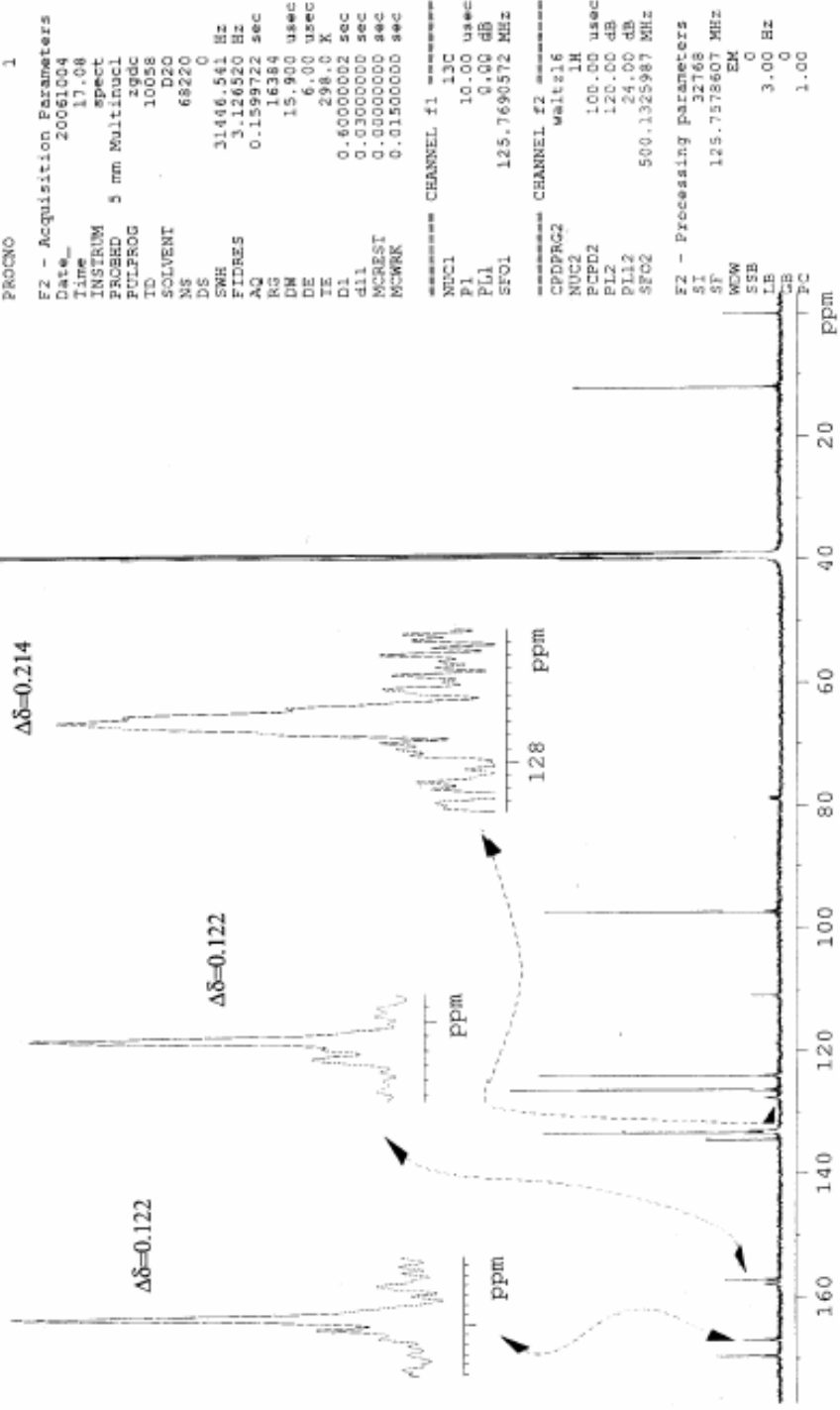


Figura 10.10. Espectro de ¹³C deuterado

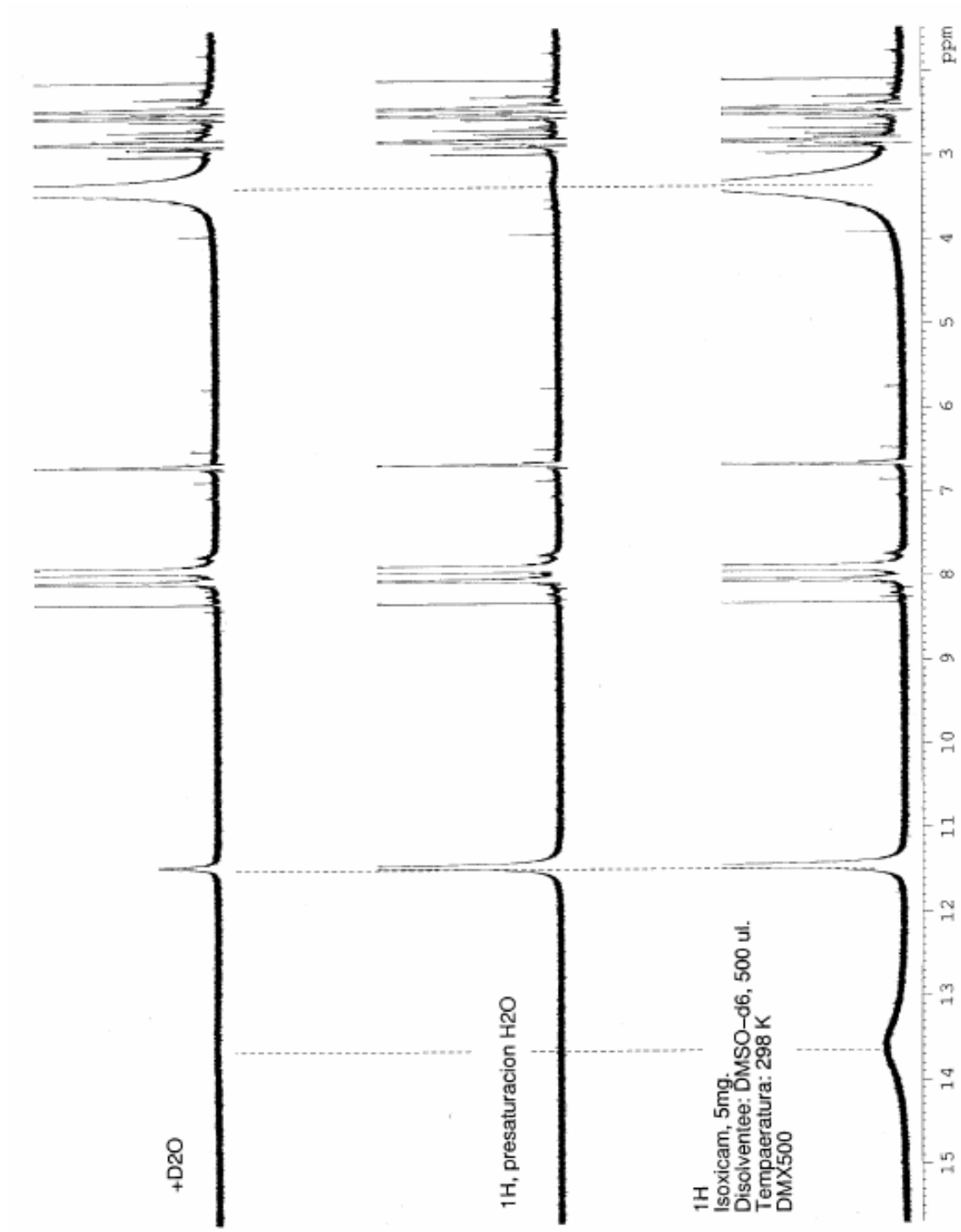
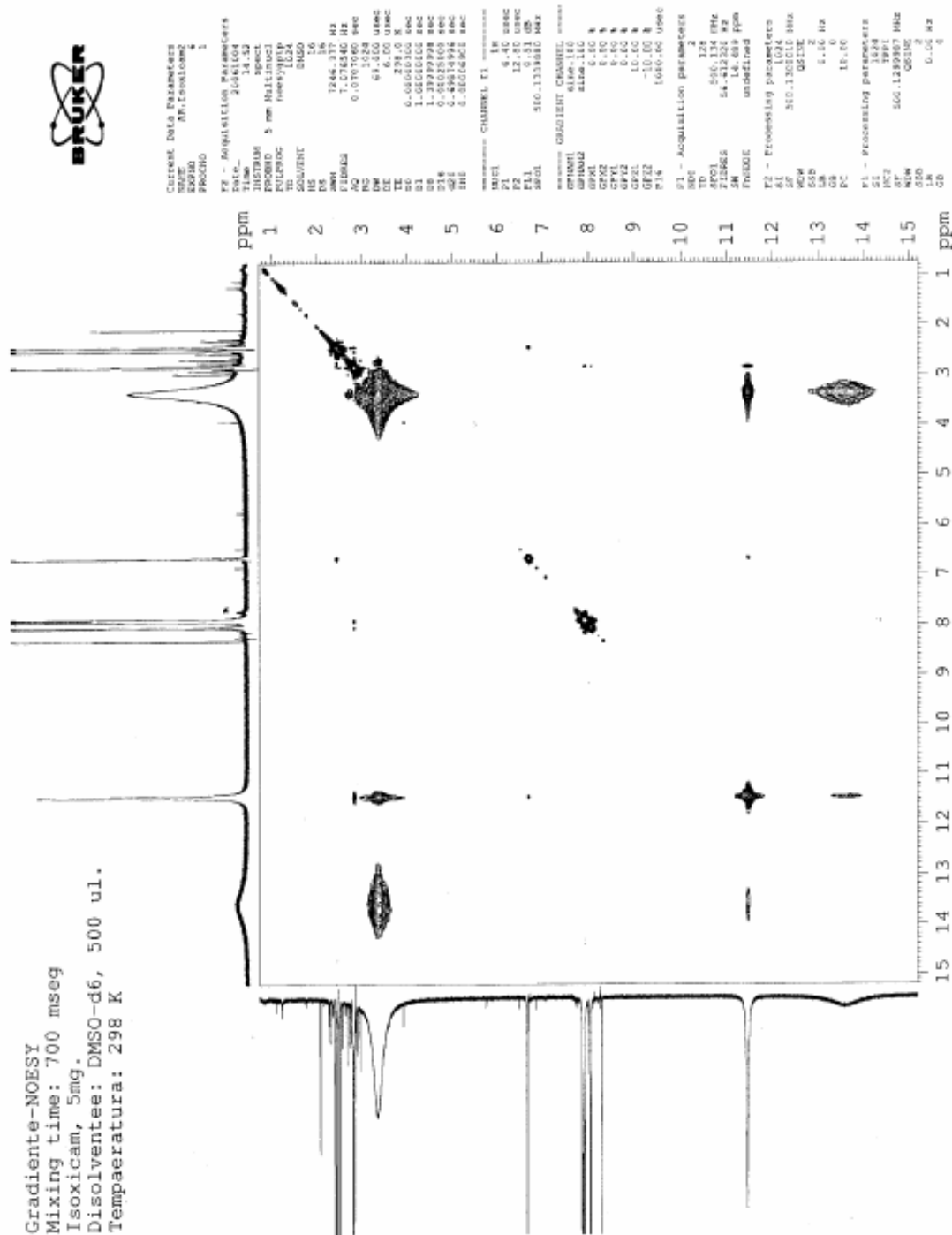


Figura 10.11. Espectro de efecto de Hidrógeno de la Amina con respecto al del grupo enólico

Gradiente-NOESY
 Mixing time: 700 msec
 Isoxicam, 5mg.
 Disolventee: DMSO-d6, 500 ul.
 Tempaeratura: 298 K



CHANNEL DATA PARAMETERS
 NAME: MR15WAL002
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 20101010
 Time: 12.22
 INSTRUM: spect
 PROBRD: 5 mm HLLH1001
 PULPROG: zgpg30
 FIDRES: 0.000150
 SOLVENT: DMSO
 NS: 16
 DS: 16
 SWH: 12442.317 Hz
 FIDRES: 0.000150
 AQ: 0.0707040 sec
 RG: 1524
 DM: 67.500 usec
 DE: 298.0 K
 TE: 298.0 K
 SI: 0.000000 sec
 S1: 1.000000 sec
 S2: 0.297978 sec
 S3: 0.297978 sec
 S4: 0.297978 sec
 S5: 0.4981994 sec
 S6: 0.000000 sec
 S7: 0.000000 sec
 ===== CHANNEL F1 =====
 NUCL1: 1H
 P1: 6.40 usec
 F2: 12.80 usec
 SFO1: 500.135800 MHz
 ===== CHANNEL F2 =====
 GRAB1: 6100.100
 GRAB2: 6100.100
 GRAB3: 6100.100
 GRAB4: 6100.100
 GRAB5: 6100.100
 GRAB6: 6100.100
 GRAB7: 6100.100
 GRAB8: 6100.100
 GRAB9: 6100.100
 GRAB10: 6100.100
 GRAB11: 6100.100
 GRAB12: 6100.100
 GRAB13: 6100.100
 GRAB14: 6100.100
 GRAB15: 6100.100
 GRAB16: 6100.100
 GRAB17: 6100.100
 GRAB18: 6100.100
 GRAB19: 6100.100
 GRAB20: 6100.100
 ===== Acquisition parameters =====
 SFO1: 500.135800 MHz
 SFO2: 500.135800 MHz
 SFO3: 500.135800 MHz
 SFO4: 500.135800 MHz
 SFO5: 500.135800 MHz
 SFO6: 500.135800 MHz
 SFO7: 500.135800 MHz
 SFO8: 500.135800 MHz
 SFO9: 500.135800 MHz
 SFO10: 500.135800 MHz
 SFO11: 500.135800 MHz
 SFO12: 500.135800 MHz
 SFO13: 500.135800 MHz
 SFO14: 500.135800 MHz
 SFO15: 500.135800 MHz
 SFO16: 500.135800 MHz
 SFO17: 500.135800 MHz
 SFO18: 500.135800 MHz
 SFO19: 500.135800 MHz
 SFO20: 500.135800 MHz
 ===== Processing parameters =====
 SI: 16
 SF: 500.135800 MHz
 DS: 16
 SWH: 12442.317 Hz
 FIDRES: 0.000150
 AQ: 0.0707040 sec
 RG: 1524
 DM: 67.500 usec
 DE: 298.0 K
 TE: 298.0 K
 SI: 16
 SF: 500.135800 MHz
 DS: 16
 SWH: 12442.317 Hz
 FIDRES: 0.000150
 AQ: 0.0707040 sec
 RG: 1524
 DM: 67.500 usec
 DE: 298.0 K
 TE: 298.0 K

Figura 10.12. Espectro NOESY H-H.

Gradiente-NOESY
 Mixing time: 700 mseg
 Isoxicam, 5mg.
 Disolvente: DMSO-d6, 500 ul.
 Temperatura: 298 K

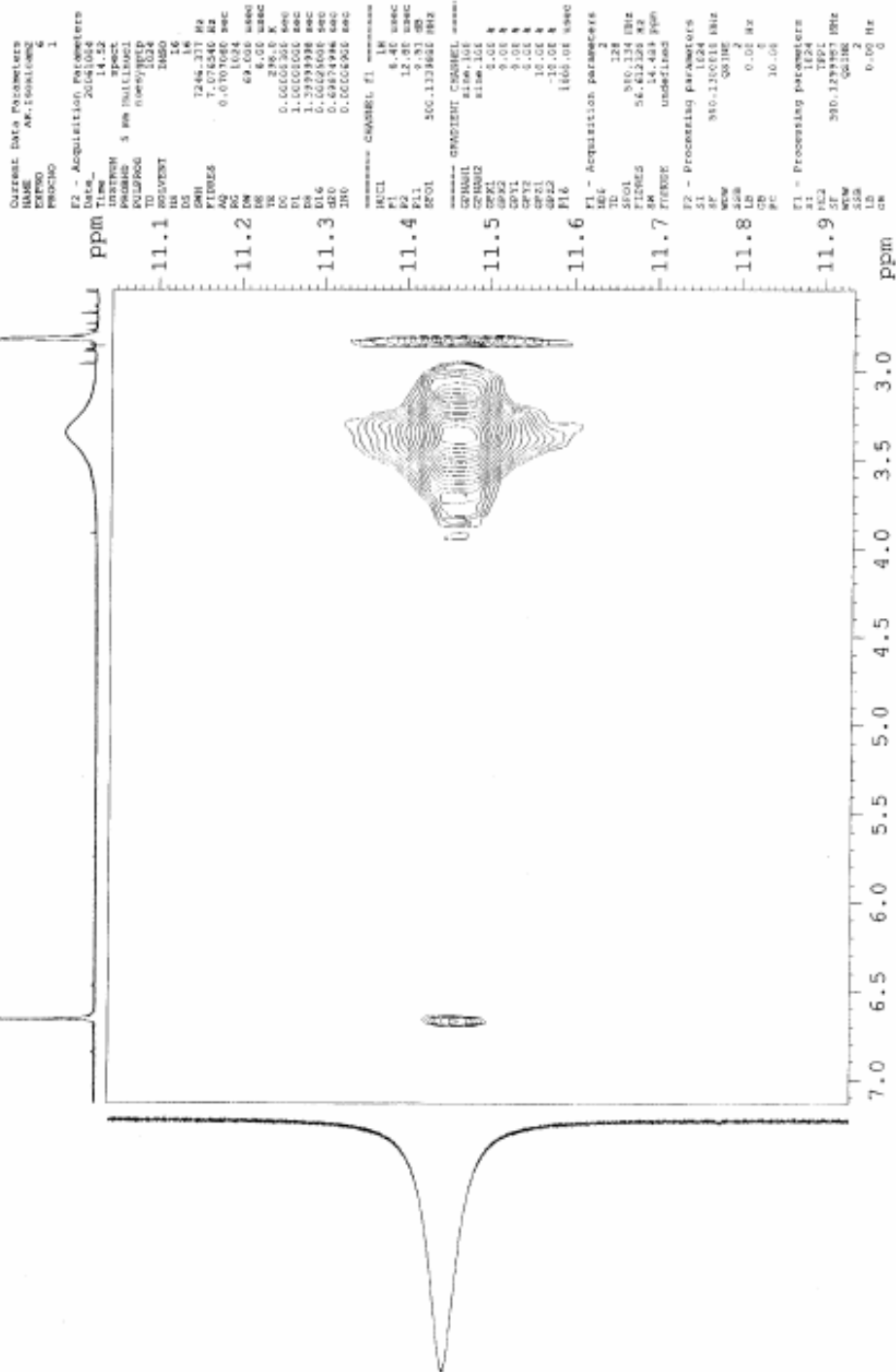


Figura 10.13. Ampliación de Espectro NOESY H-H.

Gradiente-NOESY
 Mixing time: 700 msec
 Isoxicam, 5mg.
 Disolvente: DMSO-d6, 500 ul.
 Temperatura: 298 K

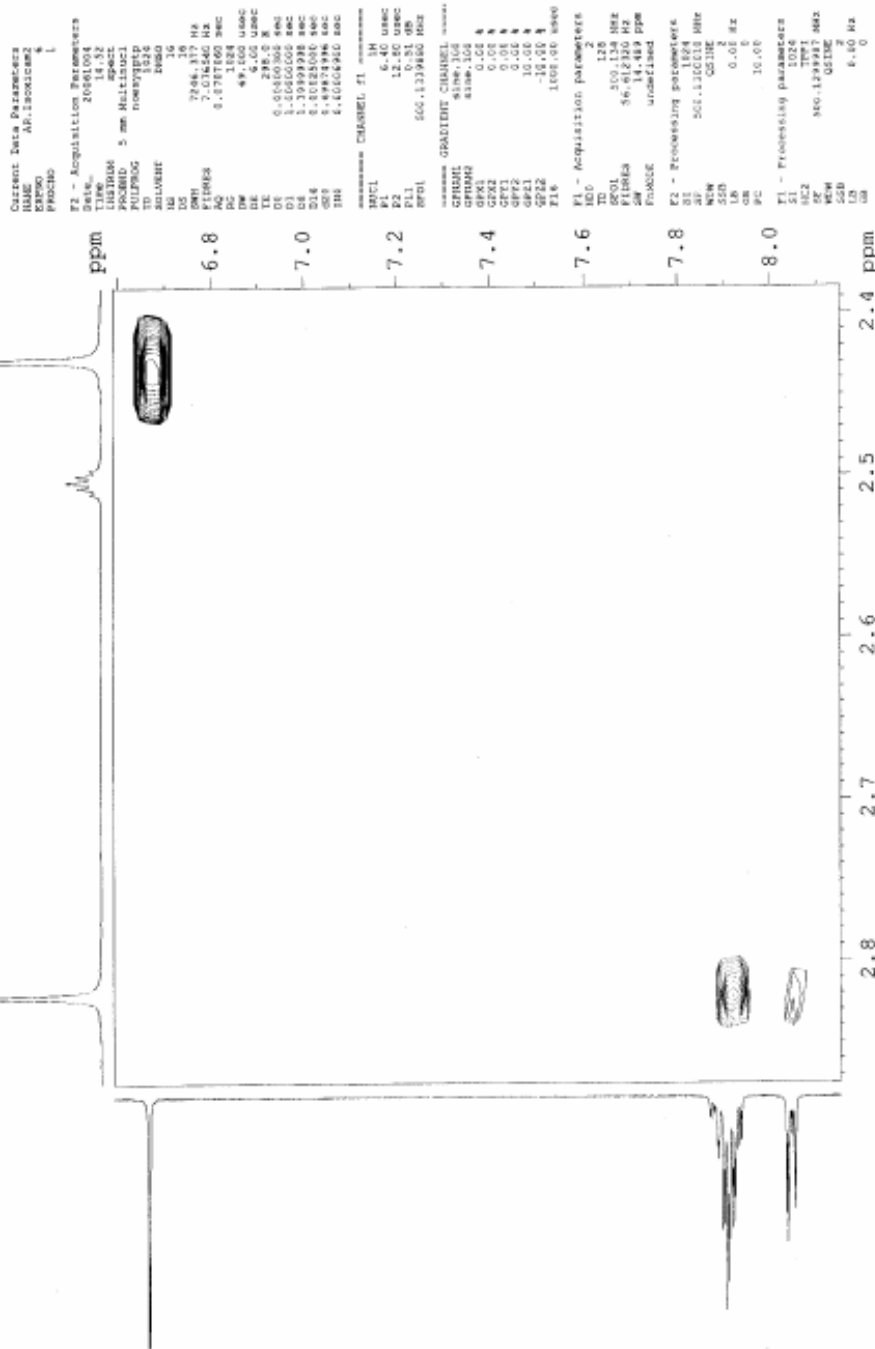


Figura 10.14. Espectro que muestra la correlación de los Hidrógenos del anillo 4-metil-isoxazol.

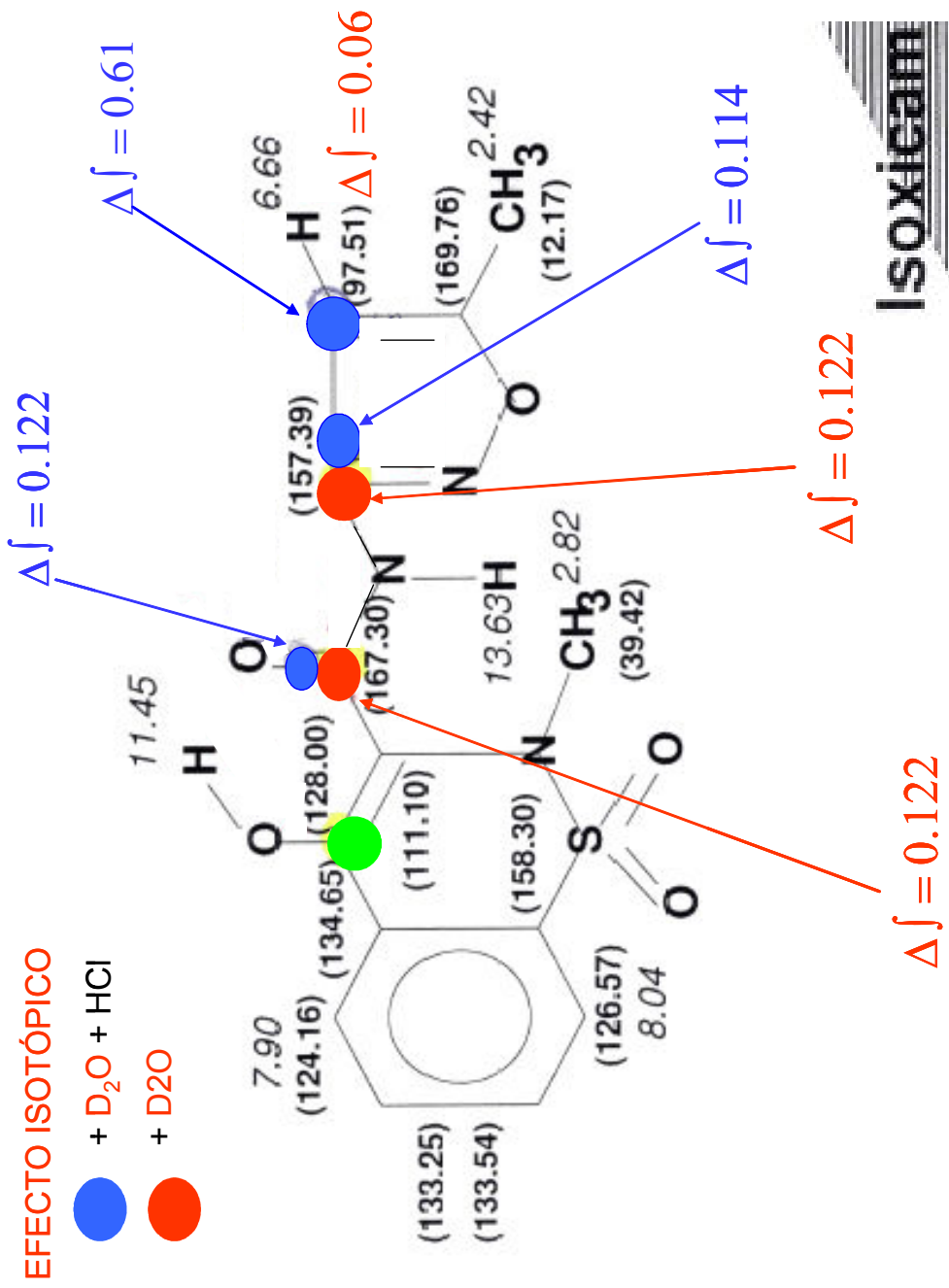


Figura 10.15. Molécula de Isoxicam con desplazamiento de la molécula de DMSO, para ¹H y ¹³C

La *figura 10.9* muestra el espectro de protón en DMSO deuterado con la integración de cada grupo de enol, amina, cetona y sulfato de la molécula de Isoxicam; la *figura 10.10* muestra el espectro de ^{13}C en agua deuterada mostrando un efecto isotópico del intercambio de los protones sobre el desplazamiento del carbón.

La *figura 10.11*, muestra el espectro donde al ser saturada la señal del agua, el hidrógeno del nitrógeno del anillo 4-metil-isoxazol (13.63 ppm) siente más el efecto que el del hidrógeno del grupo enol (11.45 ppm), demostrando que hay intercambio fácil de estos protones con el agua en DMSO, por lo tanto debería ser más ácido desde el punto de vista de Bronsted.

En la *figura 10.12* muestra un NOESY H-H, para ver la correlación y el acoplamiento de las señales de hidrógeno.

La *figura 10.13* representa la amplificación de la figura 10.12, donde la señal horizontal en aproximadamente 3.4 ppm corresponde a los protones del agua y la señal vertical en aproximadamente 11.45 ppm corresponde al hidrógeno del enol. Esto corrobora la correlación entre estos hidrógenos por el intercambio de protones entre ambas moléculas por esos grupos.

La *figura 10.14* muestra la correlación de los hidrógenos del anillo aromático con los protones del metilo que se encuentra sobre el nitrógeno, lo que permite hacer la asignación de las señales de un metilo y otro: en 2.82

ppm está señal del metilo que está sobre el hidrógeno del heterocíclico grande, en tanto que en 2.42 ppm está la señal del metilo del heterociclo de cinco miembros.

La *figura 10.15* muestra la molécula del Isoxicam con los desplazamientos de la molécula del DMSO, tanto en ^1H como en ^{13}C .

Los espectros en conjunto muestra que los protones enólico y nitrógeno del anillo 4-metil-isoxazol tienen gran intercambio con el agua, lo que hace pensar que uno de ellos es el protón ácido (de Broted) de la molécula, lo que contribuye a pensar que el pKa se debe al grupo enol, como se ha asignado siempre.

ANEXO 2

10.2 Resultados de SQUAD

Tabla 10.1 Constante de acidez del fármaco isoxicam en medio acuoso calculada por el programa SQUAD considerando dos equilibrios.

Especies	Log β	Valores de pKa	σ	U
H ₂ Isox	log $\beta_1=6.14 \pm 0.0001$	pKa ₂ = 6.14	2.25 x 10 ⁻³	4.77 x 10 ⁻³
HIsox	log $\beta_2=10.11 \pm 0.0001$	pKa ₁ =4.03		
H ₂ Isox	log $\beta_1=5.92 \pm 0.0520$	pKa ₂ =5.92	5.51 x 10 ⁻³	2.87 x 10 ⁻²
HIsox	log $\beta_2=9.49 \pm 0.0550$	pKa ₁ =3.86		
H ₂ Isox	log $\beta_1=7.15 \pm 0.0248$	pKa ₂ = 7.15	4.10 x 10 ⁻³	2.11 x 10 ⁻³
HIsox	log $\beta_2=10.85 \pm 0.0251$	pKa ₁ =3.07		
H ₂ Isox	log $\beta_1=7.21 \pm 0.026$	pKa ₂ = 7.21	7.15 x 10 ⁻²	4.59 x 10 ⁻²
HIsox	log $\beta_2=10.97 \pm 0.0493$	pKa ₁ =3.76		
H ₂ Isox	log $\beta_1=6.43 \pm 0.1335$	pKa ₂ = 6.43	3.47 x 10 ⁻³	1.13 x 10 ⁻³
HIsox	log $\beta_2=10.17 \pm 0.1338$	pKa ₁ =3.75		

Tabla 10.2 Constante de acidez del fármaco isoxicam en medio acuoso calculada por el programa SQUAD considerando un equilibrio.

Especies	Log β	Valores de pKa	σ	U
HIsox	$\log \beta = 3.93 \pm 0.0419$	pKa=3.93	8.33×10^{-3}	6.23×10^{-2}
HIsox	$\log \beta = 4.13 \pm 0.074$	pKa ₁ =4.13	1.21×10^{-2}	1.39×10^{-1}
HIsox	$\log \beta = 7.72 \pm 0.0003$	pKa ₁ =7.12	1.21×10^{-3}	1.39×10^{-1}
HIsox	$\log \beta = 3.67 \pm 0.0576$	pKa ₁ =3.67	1.40×10^{-2}	1.85×10^{-1}
HIsox	$\log \beta = 3.72 \pm 0.0256$	pKa ₁ =3.72	3.73×10^{-3}	1.38×10^{-2}

Tabla 10.3 Constante de acidez del fármaco isoxicam en mezclas DMSO-H₂O al 10% calculada por el programa SQUAD considerando dos equilibrios.

Especies	Log β	Valores de pKa	σ	U
H ₂ Isox	$\log \beta_1 = 6.14 \pm 0.0001$	pKa ₂ = 6.14	2.25×10^{-3}	4.77×10^{-3}
HIsox	$\log \beta_2 = 10.16 \pm 0.0001$	pKa ₁ =4.02		
H ₂ Isox	$\log \beta_1 = 7.48 \pm 0.0166$	pKa ₂ =7.48	3.76×10^{-3}	1.30×10^{-2}
HIsox	$\log \beta_2 = 11.53 \pm 0.0168$	pKa ₁ =4.05		
H ₂ Isox	$\log \beta_1 = 6.45 \pm 0.2006$	pKa ₂ = 6.45	3.19×10^{-2}	9.82×10^{-1}
HIsox	$\log \beta_2 = 10.47 \pm 0.1977$	pKa ₁ =4.01		
H ₂ Isox	$\log \beta_1 = 7.15 \pm 0.0248$	pKa ₂ = 7.15	2.11×10^{-3}	4.10×10^{-2}
HIsox	$\log \beta_2 = 10.85 \pm 0.0251$	pKa ₁ =3.70		
H ₂ Isox	$\log \beta_1 = 6.81 \pm 0.0555$	pKa ₂ = 6.81	3.52×10^{-3}	9.66×10^{-3}
HIsox	$\log \beta_2 = 10.80 \pm 0.0557$	pKa ₁ =3.99		

Tabla 10.4 Constante de acidez del fármaco isoxicam en mezclas DMSO-
H₂O al 10% calculada por el programa SQUAD considerando un equilibrio.

Especies	Log β	Valores de pKa	σ	U
HIsox	$\log \beta = 4.02 \pm 0.0016$	pKa=4.02	2.34×10^{-3}	5.44×10^{-3}
HIsox	$\log \beta = 3.99 \pm 0.0047$	pKa ₁ =3.99	7.44×10^{-3}	4.57×10^{-2}
HIsox	$\log \beta = 3.89 \pm 0.0339$	pKa ₁ =3.89	8.20×10^{-3}	6.65×10^{-2}
HIsox	$\log \beta = 4.02 \pm 0.0016$	pKa ₁ =4.05	1.35×10^{-2}	1.77×10^{-1}
HIsox	$\log \beta = 4.23 \pm 0.0013$	pKa ₁ =4.23	4.23×10^{-3}	1.79×10^{-3}