



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

SÍNTESIS DE METABOLITOS DEL PARACETAMOL  
IMPLICADOS EN REACCIONES DE  
HIPERSENSIBILIDAD

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Roig Ferrer, Ángela

Tutor/a: Morais Ezquerro, Sergi Beñat

Cotutor/a externo: ANDREU ROS, MARIA INMACULADA

Director/a Experimental: SOLDEVILA SERRANO, SONIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural

*UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (UPV)*

*ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL  
(ETSIAMN)*

# SÍNTESIS DE METABOLITOS DEL PARACETAMOL IMPLICADOS EN REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Curso académico 2022-2023

**Ángela Roig Ferrer**

**Tutor Académico:** Morais Ezquerro, Sergi Beñat

**Cotutora Externa:** Andreu Ros, María Inmaculada

**Directora Experimental:** Soldevila Serrano, Sonia

Valencia, diciembre 2022



**Autora:** Ángela Roig Ferrer

**Tutor Académico:** D. Sergi Beñat Morais Ezquerro

**Cotutora Externa:** Dña. María Inmaculada Andreu Ros

**Directora Experimental:** Dña. Sonia Soldevila Serrano

Valencia, diciembre de 2022

**Título:** Síntesis de metabolitos del paracetamol implicados en reacciones de hipersensibilidad

**Resumen:**

El paracetamol (N-4-hidroxifenil-acetamida) es uno de los fármacos más utilizado como analgésico y antipirético a nivel mundial, ya que se encuentra disponible sin necesidad de prescripción médica. Durante la biotransformación de los fármacos, proceso diseñado para eliminar los fármacos del organismo, algunos metabolitos resultan ser más tóxicos y reactivos que el fármaco original, teniendo así la capacidad de unirse a proteínas, conduciendo a las reacciones de hipersensibilidad.

Recientemente, mediante la utilización de HPLC-masas, se han identificado una serie de metabolitos procedentes de la biotransformación del paracetamol presentes en orina de pacientes que presentaron reacciones de hipersensibilidad. Por tanto, con el fin de confirmar la estructura química de estos metabolitos, el objetivo del presente trabajo de fin de grado es sintetizar muestras auténticas de estos metabolitos para usarlos como patrón en el HPLC.

Para este fin, se llevó a cabo la síntesis de los compuestos 3-nitro-acetaminofenol y 4-amino-2-yodofenol mediante reacciones orgánicas clásicas. Estos fueron purificados empleando técnicas de cromatografía en capa fina y columna, caracterizados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN:  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN) y analizados mediante UPLC-masas.

**Palabras clave:** acetaminofén, alergia, metabolismo, resonancia magnética nuclear, síntesis orgánica.



**Author:** Ángela Roig Ferrer

**Academic Tutor:** Mr. Sergi Beñat Morais Ezquerro

**External Cotutor:** Ms. María Inmaculada Andreu Ros

**Experimental Director:** Ms. Sonia Soldevila Serrano

Valencia, December 2022

**Title:** Synthesis of paracetamol metabolites involved in hypersensitivity reactions

**Summary:**

Paracetamol (N-4-hydroxyphenyl-acetamide) is one of the most widely used analgesic and antipyretic drugs since it is available without the need for a prescription. During drug biotransformation, a process designed to eliminate drugs from the organism, some metabolites turn out to be more toxic and reactive than the original drug, thus having the ability to bind to proteins, leading to hypersensitivity reactions.

Recently, using HPLC-mass, a series of metabolites from the biotransformation of paracetamol were identified on the urine of patients who presented with hypersensitivity reactions. Therefore, in order to confirm the chemical structure of these metabolites, the objective of this bachelor's thesis is to synthesize authentic samples of these metabolites to use them as a standard in HPLC.

Thus, for this purpose, the synthesis of the metabolites 3-nitro-acetaminophenol and 4-amino-2-iodophenol was carried out by means of classical organic reactions. These compounds were purified using thin layer and column chromatography techniques, characterised by Nuclear Magnetic Resonance (NMR:  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) and analysed by UPLC-mass.

**Keywords:** acetaminophen, allergy, metabolism, nuclear magnetic resonance, organic synthesis.



**Autora:** Àngela Roig Ferrer

**Tutor Acadèmic:** Sr. Sergi Beñat Morais Ezquerro

**Cotutora externa:** Sra. María Inmaculada Andreu Ros

**Directora Experimental:** Sra. Sonia Soldevila Serrano

València, desembre de 2022

**Títol:** Síntesi de metabòlits del paracetamol implicats en reaccions d'hipersensibilitat

**Resum:**

El paracetamol (N-4-hidroxifenil-acetamida) és un dels fàrmacs més utilitzat com analgèsic i antipirètic a nivell mundial, ja que es troba disponible sense necessitat de prescripció mèdica. Durant la biotransformació dels fàrmacs, procés dissenyat per eliminar els fàrmacs de l'organisme, alguns metabòlits resulten ser més tòxics i reactius que el fàrmac original, tenint així la capacitat de unir-se a proteïnes, conduint a les reaccions d'hipersensibilitat.

Recentment, mitjançant l'ús d'HPLC-masses, s'han identificat una sèrie de metabòlits procedents de la biotransformació del paracetamol presents en orina de pacients que presenten reaccions d'hipersensibilitat. Per tant, per tal de confirmar l'estructura química d'aquests metabòlits, l'objectiu del present treball de fi de grau és sintetitzar mostres autèntiques d'aquests metabòlits per a utilitzar-los com a patró a l'HPLC.

Per aquest fi, es portà a terme la síntesi dels compostos 3-nitro-acetaminofenol i 4-amino-2-iodofenol mitjançant reaccions orgàniques clàssiques. Aquests foren purificats emprant tècniques de cromatografia en capa fina i columna, caracteritzats mitjançant Ressonància Magnètica Nuclear (RMN:  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN) i analitzats mitjançant UPLC-masses.

**Paraules clau:** acetaminofèn, al·lèrgia, metabolisme, ressonància magnètica nuclear, síntesi orgànica.





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1	PARACETAMOL .....	1
1.2	METABOLISMO DE FÁRMACOS.....	2
1.2.1	REACCIONES DE FASE I.....	4
1.2.2	REACCIONES DE FASE II.....	5
1.3	METABOLISMO DEL PARACETAMOL .....	7
1.4	REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS .....	8
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1	GENERAL .....	12
3.2	INSTRUMENTACIÓN .....	13
3.2.1	ROTAVAPOR.....	13
3.2.2	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	13
3.2.2.1	FUNDAMENTO TEÓRICO .....	14
3.2.3	UPLC-MASAS .....	16
3.3	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .....	17
3.3.1	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .....	18
3.3.2	CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA .....	19
3.4	SÍNTESIS DEL 3-NITRO-ACETAMINOFENOL .....	20
3.5	SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL.....	21
3.5.1	SÍNTESIS DEL 2-YODO-4-NITROFENOL .....	22
3.5.2	SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL.....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>24</b>
4.1	SÍNTESIS DEL 3-NITRO-ACETAMINOFENOL .....	24
4.2	SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL.....	26
4.2.1	SÍNTESIS DEL 2-YODO-4-NITROFENOL .....	26
4.2.2	SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL.....	30
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>35</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1.** Estructura química del paracetamol.

**Figura 1.2.** Conversión del ácido araquidónico (AA) en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) catalizada por la enzima prostaglandina H sintasa (PGHS).

**Figura 1.3.** Etapas en la biotransformación de fármacos. Los procesos se agrupan en 2 fases.

**Figura 1.4.** Estructura del ácido glucurónico.

**Figura 1.5.** Estructura del glutatión.

**Figura 1.6.** Estructura del fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS).

**Figura 1.7.** Estructura del Acetil-CoA.

**Figura 1.8.** Principales rutas de biotransformación del paracetamol (APAP, situado en el centro).

**Figura 1.9.** Biotransformación, bioactivación y detoxificación.

**Figura 3.1.** Rotavapor empleado para la evaporación de los disolventes.

**Figura 3.2.** Equipo empleado para realizar los análisis de RMN.

**Figura 3.3.** Localización de los espines antes y después de aplicar un campo magnético.

**Figura 3.4.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del paracetamol.

**Figura 3.5.** Diagrama de los componentes de un espectrómetro de RMN.

**Figura 3.6.** Equipo de UPLC-masas.

**Figura 3.7.** Esquema de la preparación del material para la realización de una cromatografía en capa fina.

**Figura 3.8.** *Work-up* de la reacción de síntesis del 3-nitro-acetaminofenol.

**Figura 3.9.** Columna cromatográfica empleada para la purificación del metabolito 3-nitro-acetaminofenol.

**Figura 3.10.** Secuencia propuesta de síntesis del 3-mercaptopurato-acetaminofenol a partir del 2-yodofenol.

**Figura 3.11.** Reacción a reflujo bajo atmósfera de argón.

**Figura 4.1.** Esquema de la reacción de síntesis del metabolito 3-nitro-acetaminofenol.

**Figura 4.2.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (arriba) y <sup>13</sup>C-RMN (abajo) del 3-nitro-acetaminofenol junto con las asignaciones de las señales.

**Figura 4.3.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del 3,5-dinitro-acetaminofenol junto con las asignaciones de las señales.

**Figura 4.4.** Esquema de la reacción de síntesis del metabolito 2-yodo-4-nitrofenol.

**Figura 4.5.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (Arriba) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (abajo) del 2-yodo-4-nitrofenol junto con las asignaciones de las señales.

**Figura 4.6.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (arriba) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (abajo) del 2-yodo-6-nitrofenol junto con las asignaciones de las señales.

**Figura 4.7.** Esquema de la reacción de síntesis del metabolito 4-amino-2-yodofenol.

**Figura 4.8.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN 4-amino-2-yodofenol junto con las asignaciones de las señales de los protones.

**Figura 7.1.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN del paracetamol junto con las asignaciones de las señales.

**Figura 7.2.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción del 3-nitro-acetaminofenol junto con las asignaciones de las señales.

**Figura 7.3.** Resultados del UPLC-MS/MS del 3-nitro-acetaminofenol.

**Figura 7.4.** Resultados del UPLC-MS/MS del 3,5-dinitro-acetaminofenol.

**Figura 7.5.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del 2-yodofenol junto con las asignaciones de las señales.

**Figura 7.6.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción del 2-yodo-4-nitrofenol junto con las asignaciones de las señales.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.1.** Clasificación de las reacciones adversas a medicamentos.

**Tabla 3.1.** Listado de los productos empleados, junto con su número CAS y su distribuidor comercial.

**Tabla 3.2.** Características de los componentes de la cromatografía en capa fina en función de su método de trabajo.



# LISTADO DE ABREVIATURAS

**AA:** ácido araquidónico

**AcOEt:** acetato de etilo

**AINES:** fármacos antiinflamatorios no esteroideos

**APS:** 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato

**CDCl<sub>3</sub>:** cloroformo deuterado

**COX:** ciclooxigenasa

**DCM:** diclorometano

**EMF:** enzima metabolizadora de fármacos

**FAD:** flavina-adenosina dinucleótido

**FMO:** flavín-monooxigenasas

**GSH:** glutatión

**GST:** glutatión-S-transferasa

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*)

**MeOD:** metanol deuterado

**MS:** espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*)

**m/z:** proporción masa/carga

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NAPQI:** N-acetil-para-benzoquinona imina

**NAT:** N-acetil transferasa

**P450 y CYP450:** monooxigenasas dependientes de citocromo P450

**PAPS:** fosfoadenosil-fosfosulfato

**PGG<sub>2</sub>:** prostaglandina G<sub>2</sub>

**PGH<sub>2</sub>:** prostaglandina H<sub>2</sub>

**PGHS:** prostaglandina H sintasa

**POX:** peroxidasa

**ppm:** partes por millón

**RAM:** Reacciones adversas a medicamentos

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**ROS:** especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

**SULTs:** sulfotransferasas

**TLC:** cromatografía en capa fina (*Thin-Layer Chromatography*)

**UDP:** uridíndifosfato

**UDPGA:** uridíndifosfato del ácido glucorónico

**UGT:** UDP-glucoronosil transferasa

**UPLC:** cromatografía líquida de ultra-alta resolución (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*)





# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 PARACETAMOL

El paracetamol (nombre IUPAC: N-(4-hidroxifenil)-acetamida, CAS 103-90-2), también conocido como acetaminofén o N-acetil-para-aminofenol es un fármaco analgésico y antipirético que no presenta efectos antiinflamatorios (1). Su estructura química puede observarse en la Figura 1.1.

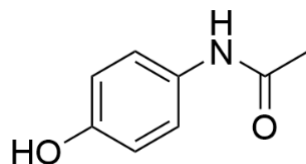


Figura 1.1. Estructura química del paracetamol.

Según la escala analgésica, definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y que determina las reglas para la aplicación de los fármacos analgésicos, el paracetamol puede emplearse para el tratamiento de los tres niveles de intensidad del dolor (débil, moderado y fuerte) (2). Por este motivo, el paracetamol es uno de los medicamentos analgésicos y antipiréticos más ampliamente utilizados, ya que además se encuentra disponible sin prescripción médica. A su vez, es el fármaco de elección para pacientes que presentan alergia o intolerancia a los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) y no pueden ser tratados con ellos. Por lo general, es un medicamento bien tolerado por los pacientes y produce pocos efectos secundarios. Sin embargo, y a pesar de esto, se ha visto un incremento en el número de casos de hepatotoxicidad inducida por el paracetamol, ya que entre el 90 y el 95% de dicho fármaco es metabolizado en el hígado y eliminado por la orina. (2-4)

Se cree que el paracetamol aumenta el umbral de tolerancia al dolor inhibiendo las ciclooxigenasas en el sistema nervioso central, enzimas que participan en la síntesis de las prostaglandinas. Sin embargo, el paracetamol no inhibe las ciclooxigenasas en los tejidos periféricos, razón por la cual carece de actividad antiinflamatoria. El paracetamol también parece inhibir la síntesis y/o los efectos de varios mediadores químicos que sensibilizan los receptores del dolor a los estímulos mecánicos o químicos, por lo que se cree que ejerce su acción inhibiendo la conversión del ácido araquidónico (AA) en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Esta conversión es catalizada por la enzima prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS o COX), que posee una actividad enzimática dual como ciclooxigenasa y como peroxidasa. (2, 5)

La conversión AA → PGH<sub>2</sub> tiene lugar en dos reacciones consecutivas, ilustradas en la Figura 1.2 (2, 5):

- 1) Ciclación del AA en el metabolito inestable prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), seguida por la doble oxidación en las posiciones 9 y 11 mediante el componente ciclooxigenasa (COX).
- 2) Reducción de esta molécula hacia su análogo 15-hidroxi, transformándolo en el igual inestable PGH<sub>2</sub>, mediante la actividad peroxidasa (POX) de la PGHS.

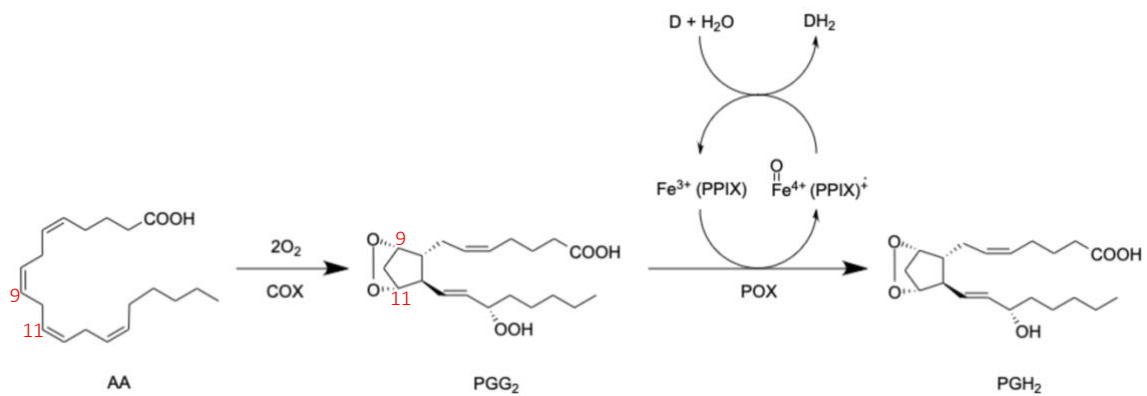


Figura 1.2. Conversión del ácido araquidónico (AA) en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) catalizada por la enzima prostaglandina H sintasa (PGHS).

La PGH<sub>2</sub> actúa como sustrato para sintasas específicas, isomerasas dependientes de tejido que catalizan su transformación en prostaglandinas de las familias D, E y F, prostaciclina y tromboxanos. Todos ellos poseen una gran variedad de actividades biológicas, y muchos de ellos poseen actividad pro-inflamatoria. (2, 5)

La enzima COX presenta dos isoformas: COX-1 y COX-2 que estructuralmente son parecidas, pero el sitio de unión para el AA es diferente. La COX-2 es una enzima inducible responsable de la síntesis de prostaglandinas implicadas en procesos inflamatorios y carcinogénicos. Por lo tanto, ante un dolor inflamatorio, es muy importante inhibir la síntesis de prostaglandinas inducidas por la COX-2. Por otro lado, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas originadas por la COX-1 es la responsable de muchas de las reacciones adversas que se observan durante el tratamiento con AINEs. Se ha observado que el paracetamol tiene un efecto inhibitorio en ambas isoformas, pero no en la misma medida, sino que tiene mayor efecto en COX-2, especialmente en las células del endotelio vascular. Por lo tanto, en la actualidad, el desarrollo de fármacos que inhiben de manera específica o selectiva la COX-2 ha abierto una vía terapéutica que permite tratar los efectos antiinflamatorios dependientes de la COX-2, al tiempo que se evitan los efectos indeseables gastrointestinales dependientes del bloqueo sobre COX-1. Así, aunque el mecanismo de acción del paracetamol no está totalmente esclarecido, parece estar mediado por la inhibición preferencial de la COX-2. (2, 5)

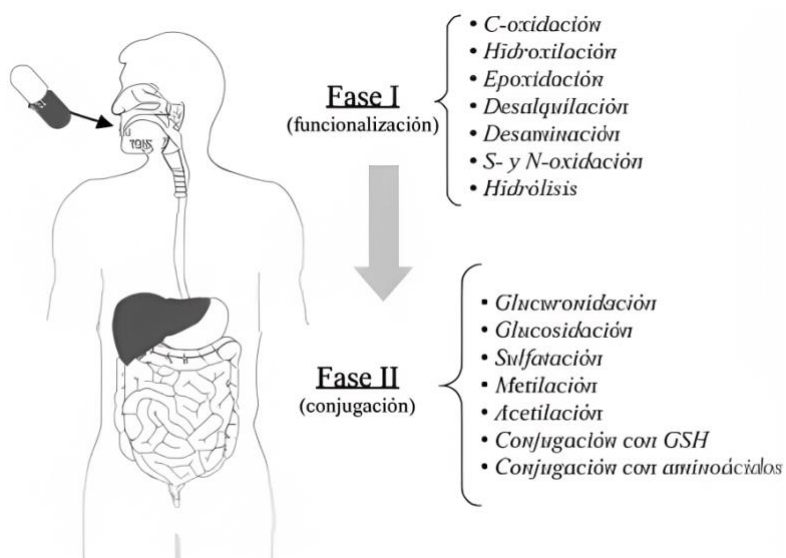
## 1.2 METABOLISMO DE FÁRMACOS

La mayoría de los fármacos son ácidos o bases orgánicas débiles que se encuentran en las formas ionizada y no ionizada en un entorno acuoso. La forma no ionizada suele ser liposoluble (lipofílica) y difunde con facilidad a través de las membranas celulares. A diferencia de los compuestos volátiles (eliminación mediante intercambio gaseoso en los pulmones) o los hidrosolubles (filtración renal), la eliminación de los compuestos lipófilos es más problemática, por lo que su acumulación en el organismo puede llegar a desencadenar fenómenos de toxicidad. (6, 7)

El metabolismo es la principal ruta de eliminación de fármacos del organismo. Su función consiste en modificar la parte activa de los medicamentos, convirtiendo los fármacos lipofílicos en compuestos más hidrosolubles, facilitando así su eliminación por *vía* renal o biliar. Este proceso se denomina biotransformación. Como dichas reacciones generalmente conllevan la inactivación

del fármaco y una disminución del potencial tóxico, se les conoce también como reacciones de inactivación o detoxificación. Sin embargo, cada vez es más común el desarrollo de pro-fármacos farmacológicamente inactivos que poseen buenas características de absorción pero que requieren de la biotransformación enzimática para formar la entidad activa. (6-10)

Las biotransformaciones se pueden dividir en 4 categorías: oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación (Figura 1.3). Las 3 primeras componen las reacciones de funcionalización (Fase I), y su resultado es la modificación química de las moléculas con la aparición de nuevos grupos funcionales. Frecuentemente, los metabolitos generados en la Fase I se unen covalentemente a moléculas endógenas de la célula (como ácido glucurónico, glutatión, sulfato y aminoácidos), dando lugar a las reacciones de conjugación (Fase II). Sin embargo, cabe tener en cuenta que no todos los fármacos necesariamente sufren un proceso de Fase I seguido de otro de Fase II. (6, 9)



**Figura 1.3. Etapas en la biotransformación de fármacos. Los procesos se agrupan en 2 fases.** En la Fase I, los fármacos sufren reacciones de funcionalización, destinadas a introducir nuevos grupos funcionales en la molécula. En la Fase II, los metabolitos son conjugados con moléculas endógenas, lo que finalmente facilita su eliminación del organismo. *Imagen adaptada de Castell, 2006 (6).*

Las reacciones de biotransformación tienen lugar principalmente en el hígado, aunque también pueden ocurrir en el riñón, músculo esquelético, intestino o el plasma sanguíneo. En cuanto a su localización subcelular, la mayoría de ellas tienen lugar en el retículo endoplasmático o el citosol, y en menor medida en las mitocondrias y las membranas plasmática y nuclear. La mayoría de las enzimas que catalizan las reacciones de Fase I se encuentran en la fracción microsomal del homogenado celular, mientras que las que catalizan las reacciones de Fase II se encuentran en la fracción citosólica. (6, 9)

La conversión metabólica de fármacos es generalmente de carácter enzimático. El grupo más importante de enzimas metabolizadoras de fármacos (EMFs) es el citocromo monooxigenasa P450 (CYP450). No se trata de un único enzima, sino que en realidad es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes. Todos los P450s conocidos se nombran siguiendo un criterio común y se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en

la secuencia del ADN que los codifica. Las familias 1, 2 y 3 están constituidas por enzimas encargados de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de las familias incluyen P450s que intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos. Así, la enzima P450 acelera la eliminación del organismo de gran número de fármacos y compuestos tóxicos, pero también es responsable de la activación de toxinas o procarcinógenos (sustancias químicas que, tras ser metabolizadas por el organismo, poseen la capacidad de causar cáncer). (9)

La biotransformación de fármacos puede presentar una gran variabilidad entre diferentes individuos, lo que supone diferencias significativas en el grado de procesamiento, y consecuentemente en la eliminación del fármaco. Los factores más importantes que afectan al metabolismo son: la variación genética, factores ambientales, estrés, falta de descanso adecuado, falta de ejercicio físico, alimentación, meditación y la presencia de enfermedades, entre otras. (9)

### *1.2.1 REACCIONES DE FASE I*

Las reacciones de Fase I son reacciones de funcionalización. Estas introducen un grupo funcional en el compuesto original (fármaco), y como resultado hay una pérdida en su actividad farmacológica. Sin embargo, también pueden generar especies intermedias químicamente reactivas. (9)

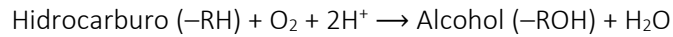
Las enzimas que catalizan estas reacciones se encuentran tanto en el citosol como en el retículo endoplasmático, y la mayoría presentan actividad monooxigenasa, aunque también se encuentran actividades no oxidativas, como las esterasas, reductasas, deshidrogenasas, hidrolasas, etc. (6)

Las monooxigenasas son una familia de enzimas presentes en múltiples seres vivos, bacterias, plantas y animales, responsables de transformar las sustancias tóxicas que ingresan en los organismos como toxinas, pesticidas y drogas. Estas enzimas hacen uso del oxígeno molecular, del que usan uno de los átomos para oxigenar el fármaco (oxidación + incorporación de oxígeno a una molécula orgánica), mientras que el otro átomo termina reducido a H<sub>2</sub>O. (6)

En el hígado se encuentran presentes 2 grandes familias de oxigenasas: las dependientes del citocromo P450 (llamadas P450 o CYP) y las flavín-monooxigenasas (llamadas FMO). La acción de las CYP requiere de la participación de una enzima auxiliar, la CYP-reductasa, a través de la cual fluyen los electrones necesarios para la reducción de uno de los átomos de oxígeno hacia la formación de H<sub>2</sub>O. (6)

Como ya se ha comentado anteriormente, las P450 son un conjunto de hemoproteínas de peso molecular de unos 50 kDa. En el ser humano existen 18 familias y 29 subfamilias, con un total de 50 genes CYP identificados. Aquellos pertenecientes a las familias 1, 2 y 3 son los implicados de manera más directa en el metabolismo de los fármacos. En concreto, los genes CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, y CYP3A4 son los responsables del metabolismo de la mayoría de los fármacos, estimándose que aproximadamente el 60% de los administrados a pacientes son metabolizados por este grupo de enzimas. (6, 11)

De manera abreviada, la reacción que llevan a cabo estas enzimas es la siguiente: (11)



Las FMO están implicadas en la oxigenación de compuestos con heteroátomos nucleofílicos (como el nitrógeno y el azufre). Se localizan principalmente en el hígado, aunque algunas isoformas se encuentran también en el pulmón. En el ser humano existen 5 familias de FMOs, sin embargo, la más importante es la FMO-3 (11). Estas enzimas poseen como coenzima el flavina-adenosina dinucleótido (FAD) y son capaces de utilizar directamente NADPH como cofactor para reducir uno de los dos átomos de oxígeno. La interacción del fármaco con la enzima es más laxa, y la oxidación se produce a través de un intermedio reactivo oxidante generado en el mismo centro catalítico de la enzima que oxida al fármaco. (6)

### 1.2.2 REACCIONES DE FASE II

Las reacciones de Fase II son reacciones de conjugación en las que se produce una unión covalente entre un grupo funcional del fármaco original (o metabolito de fase I) y un compuesto o ligando endógeno altamente polar e hidrosoluble (generalmente ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato). Como consecuencia, los conjugados resultantes son altamente hidrosolubles y presentan menor actividad farmacológica, y a su vez son eliminados más fácilmente a través de la orina. (9, 12)

Las reacciones de conjugación más comunes son la glucuronidación, la conjugación con glutatión, la sulfonación y la acetilación.

La glucuronidación es uno de los sistemas de depuración más importantes de nuestro cuerpo. Consiste en la transferencia del componente de ácido glucurónico (Figura 1.4) del ácido uridina difosfato (UDP) glucurónico (UDPGA) a un sustrato por cualquiera de los varios tipos de UDP-glucuronosiltransferasa (UGT). (6, 12)

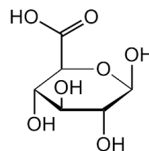


Figura 1.4. Estructura del ácido glucurónico.

En humanos, existen 4 familias de UGTs, aunque solamente 2 son relevantes para el metabolismo de fármacos: UGT1 y UGT2, entre las que destacan las subfamilias UGT1A, UGT2A y UGT2B. Todas las UGTs presentan una gran cantidad de similitudes estructurales y catalíticas, por lo que un sustrato puede ser metabolizado por diferentes isoformas. En el caso concreto del paracetamol, este es metabolizado por al menos 4 isoformas: UGT1A1, 6 y 9 y UGT2B15. (12)

La conjugación con glutatión (Figura 1.5) está catalizada por la glutatión-S-transferasa (GST), que usa directamente glutatión (GSH), formando tioéteres. Estos conjugados son eliminados directamente por la bilis, y en menor medida por la orina. En este último caso, antes de ser excretado, el conjugado con GSH sufre un proceso metabólico por el que secuencialmente es eliminado el resto  $\gamma$ -glutámico (la glicina) de la molécula de GSH y finalmente es acetilado el grupo amino de la cisteína, dando origen a derivados del ácido mercaptúrico. Existe actividad GST en

los tejidos que están en contacto con el O<sub>2</sub> y en los que existe un metabolismo oxidativo importante. [3]

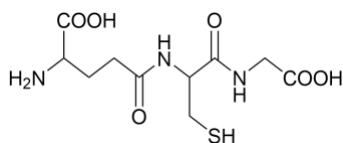


Figura 1.5. Estructura del glutatión.

La sulfonación (conjugación con sulfato) es llevada a cabo por las enzimas sulfotransferasas (SULTs), presentes en la mayoría de los tejidos con diferentes niveles de actividad, siendo más elevada en el hígado, intestino delgado y colon. Además, se encuentran especialmente activas durante el desarrollo fetal, por lo que poseen un papel importante en la defensa fetal y neonatal contra los xenobióticos. (12)

Estas enzimas, en lugar de unir directamente la molécula de sulfato al fármaco, requieren la acción de una sulfurilasa y 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (APS) fosfoquinasa para transformar el sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) en sulfonato (RSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en forma de fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS), forma que la enzima puede unir más fácilmente al fármaco. (Figura 1.6) (6, 12)

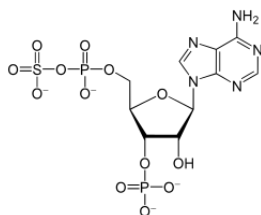


Figura 1.6. Estructura del fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS).

Todas las SULTs presentan la misma estructura en la región de unión al cofactor, aunque evidentemente presentan diferencias considerables en la región de unión al sustrato, lo que les confiere la habilidad de unirse a una gran variedad de grupos de sustratos. (12)

La última reacción de conjugación es la acetilación. Esta es considerada un proceso de Fase II, lo que puede parecer contradictorio teniendo en cuenta que los metabolitos acetilados presentan menos hidrosolubilidad que el fármaco inicial. Por tanto, la excreción de estos metabolitos resulta más complicada ya que se ha observado que metabolitos altamente acetilados de algunas sulfonamidas son tan poco hidrosolubles que cristalizan en los riñones de los pacientes. (12)

Las N-acetil transferasas (NATs) más relevantes en el metabolismo de fármacos son la NAT-1, presente en todo el organismo, y la NAT-2, de mayor relevancia y presente en grandes cantidades en el hígado y el intestino. El proceso de acetilación tiene lugar en dos fases: en primer lugar, se forma un intermediario acetilado de la NAT, debido a su interacción con el Acetil-CoA (Figura 1.7), y finalmente se acetila el sustrato, liberando así CoA. (12)

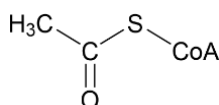
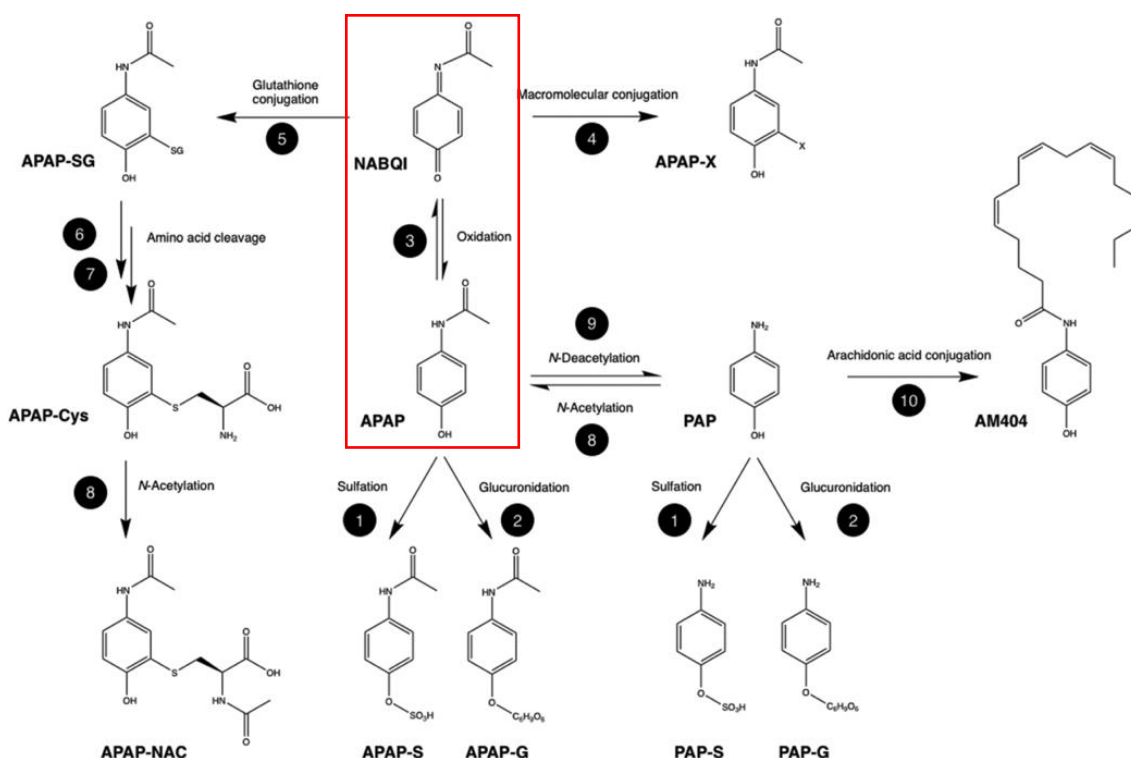


Figura 1.7. Estructura del Acetil-CoA.

### 1.3 METABOLISMO DEL PARACETAMOL

El paracetamol es un fármaco que puede ser altamente nefrotóxico cuando es desacetilado a 4-aminofenol.

Aproximadamente el 95% del paracetamol ingerido es eliminado por el hígado siendo transformado en conjugados O-glucuronatos o sulfatos y un 2% escapa sin ser modificado. Una pequeña fracción, entre el 1 y 3%, es oxidada, principalmente por el citocromo P450 2E1 (CYP2E1), a la especie reactiva N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), subproducto tóxico producido durante el metabolismo xenobiótico del analgésico paracetamol (Figura 1.8). Este compuesto se une covalentemente a los hepatocitos en diferentes regiones celulares, como la membrana, aunque esta unión es normalmente insignificante, ya que el NAPQI es rápidamente inactivado mediante la conjugación con GSH y finalmente excretado en la orina. (13-15)



**Figura 1.8. Principales rutas de biotransformación del paracetamol (APAP, situado en el centro).** En rojo se indica la reacción que da lugar al NAPQI (también denominado NABQI), metabolito responsable de la hepatotoxicidad asociada al paracetamol. Los metabolitos presentes en esta imagen son: APAP: paracetamol; PAP: p-aminofenol; AM404: n-araquidonoilaminofenol; NABQI: N-acetil-para-benzoquinona imina; APAP-X: conjugado macromolecular del paracetamol; APAP-SG: conjugado del paracetamol con glutatión; APAP-Cys: aducto proteico paracetamol-cisteína; APAP-NAC: mercapturato del paracetamol; APAP-S: sulfato del paracetamol; APAP-G: sulfato del paracetamol; PAP-S: p-aminofenol sulfato; PAP-G: p-aminofenol sulfato. Las enzimas y cofactores presentes son: (1) sulfotransferasa, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS); (2) uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasa (UGT), uridíndifosfato del ácido glucurónico (UDPGA); (3) citocromo P450, O<sub>2</sub>, NADPH; (4) adición electrofílica no enzimática (5) glutatión-S-transferasa (GST), glutatión (GSH); (6) gamma-glutamil transpeptidasa; (7) cisteinil glicinasa; (8) n-acetiltransferasa (NAT); (9) n-desacetilasa; (10) hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH). *Imagen adaptada de Athersuch et al, 2017 (3).*



Sin embargo, cuando se produce una sobredosis, la proporción de este fármaco convertido en NAPQI aumenta a un 15%. La demanda de GSH se incrementa en consecuencia para poder detoxificar este compuesto. Entre las 10-12 horas que siguen a la sobredosis, el organismo es capaz de mantener los niveles de GSH mediante reciclaje y re-síntesis. Sin embargo, la cisteína (que contiene el grupo tiol), compuesto clave para esta detoxificación, posee un suministro limitado en el hepatocito y por ello, tras 8-16 h, el consumo de GSH por el NAPQI excede gradualmente la demanda y las reservas celulares de cisteína se agotan. (13)

Como se ha mencionado anteriormente, el NAPQI es un metabolito altamente reactivo que se une covalentemente a macromoléculas presentes en el hepatocito, lo que lleva a un empobrecimiento de los sistemas enzimáticos y a daños estructurales y metabólicos en el hígado, potencialmente causando necrosis hepática. (2, 15)

## 1.4 REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS

Durante la biotransformación de los fármacos, proceso diseñado para eliminar los fármacos del organismo, algunos metabolitos resultan ser más tóxicos y reactivos que el fármaco original, teniendo así la capacidad de interactuar con biomoléculas presentes en la célula. (6)

Por ejemplo, en el transcurso de las reacciones de oxidación se pueden generar intermedios electrófilos reactivos, que son compuestos ávidos de electrones capaces de abstraerlos de otras biomoléculas y capaces de reaccionar con nucleófilos presentes en la célula y/o unirse covalentemente a macromoléculas. El resultado es la bioactivación del compuesto derivado del fármaco. Además, también pueden generarse especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) capaces de iniciar reacciones radicalarias en cadena de peroxidación de lípidos. Todas estas reacciones tienen como resultado daño tisular. (6)

Para contrarrestar estos efectos dañinos, las células con capacidad para metabolizar fármacos (principalmente los hepatocitos) poseen eficaces mecanismos de defensa, entre los que destacan las enzimas especializadas capaces de conjugarse los intermedios, moléculas reductoras y los mecanismos de reparación del ADN y las proteínas. (6)

El balance entre la bioactivación del fármaco y los mecanismos de defensa es lo que determina si la biotransformación resultará en un proceso de detoxificación o, por el contrario, en daño celular (Figura 1.9). (6)

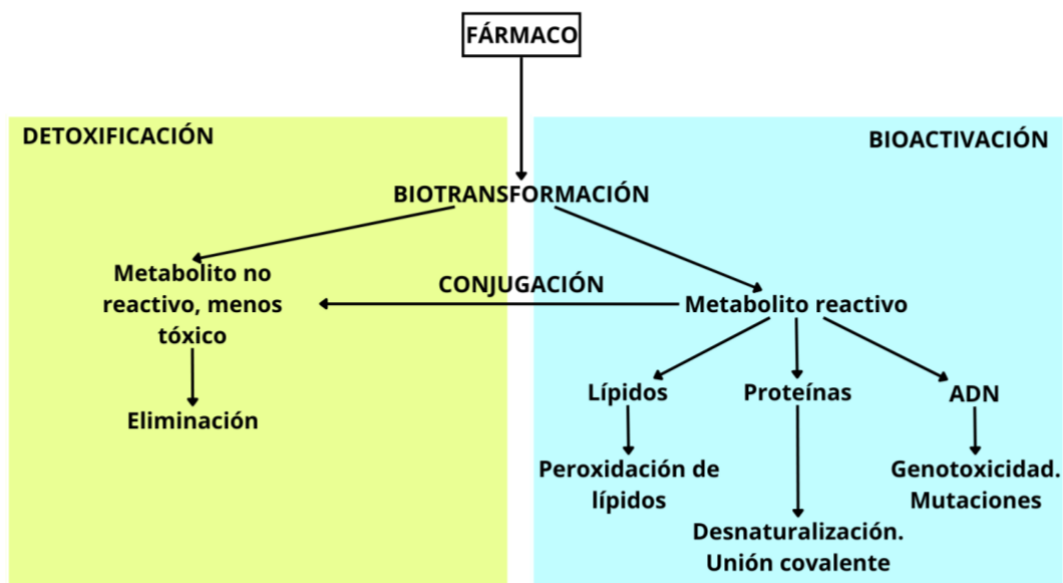


Figura 1.9. Biotransformación, bioactivación y detoxificación. Aunque en la mayoría de los casos la biotransformación de un compuesto va ligada a una disminución de su potencial tóxico, como consecuencia del metabolismo se pueden originar especies más reactivas capaces de interactuar con biomoléculas celulares, provocando daño celular (bioactivación). *Imagen adaptada de Castell, 2006 (6)*

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) se clasifican en diferentes tipos (A-F), siendo los más comunes los tipos A y B. En la Tabla 1.1 se muestran las características de cada uno de ellos:

Tabla 1.1. Clasificación de las reacciones adversas a medicamentos. *Adaptada de Fricke-Galindo et al, 2018. (16)*

Tipo de RAM	Características
A	Dependiente de la dosis. Respuesta farmacológica excesiva. Predecible. Reversible. Frecuente. Baja severidad.
B	No relacionada con la dosis ni con el mecanismo de acción farmacológico. Relacionada con la vulnerabilidad individual. No predecible. Reversible. Poco frecuente. Alta morbimortalidad.
C	Relacionada con la dosis y el tiempo (acumulación de dosis). La mayoría son reversibles. Poco frecuente. Crónica.
D	Relacionada con el tiempo, la dosis y la exposición parental. Irreversible. Poco frecuente.
E	Relacionada con la suspensión del medicamento.
F	Relacionada con la dosis y la interacción de fármacos. Falla terapéutica no esperada. Frecuente.

Las reacciones de tipo B se dividen en 3 subgrupos: B1, B2 y B3 (13):

- Las reacciones de tipo B1 generan sobre todo hepatotoxicidad, aunque pueden llegar a causar necrosis del tejido.
- Las reacciones de tipo B2 son consecuencia de la inmunotoxicidad, y son las que dan lugar a las reacciones de hipersensibilidad a fármacos.
- Las reacciones de tipo B3 son las que conllevan la formación de algún tipo de cáncer.

La respuesta a fármacos y, concretamente, la susceptibilidad a padecer reacciones de hipersensibilidad a los mismos, varía considerablemente entre unos individuos y otros, y es un proceso complejo en el que interactúan factores tanto ambientales (sexo, edad, ingesta de alcohol, patologías subyacentes o infecciones virales) como genéticos. (17)

Se estima que el 10-20% de los pacientes hospitalizados y el 7% de la población general pueden padecer reacciones adversas a fármacos, siendo un tercio de estas reacciones de hipersensibilidad (18). Para la producción de una reacción de hipersensibilidad es necesaria la sensibilización previa del individuo, es decir, es necesario un contacto previo con el fármaco. (19)

Según la nomenclatura de la EAACI/WAO (*European Academy of Allergy and Clinical Immunology/World Allergy Organization*), las reacciones de hipersensibilidad a AINEs y analgésicos pueden ser divididas en alérgicas (mediadas por un mecanismo inmunológico) y no alérgicas (dependientes de mecanismos no inmunológicos). Además, también se tiene en cuenta el tiempo que transcurre desde la toma del medicamento hasta la aparición de los síntomas, clasificándose así en agudas o tardías. (20)

Las reacciones de hipersensibilidad no alérgicas suelen ser causa de la reactividad cruzada, es decir, los pacientes presentan hipersensibilidad a dos o más AINEs químicamente no relacionados, pero que comparten la propiedad de inhibir la COX-1. Por tanto, se trata de un mecanismo no inmunológico relacionado con la *vía* del AA y la enzima COX-1, aunque el mecanismo no se conoce completamente. (17)

Las reacciones de hipersensibilidad alérgica (específica) son relativamente poco frecuentes (19). Estas son reacciones selectivas, es decir, los síntomas de hipersensibilidad aparecen tras la administración de un AINE concreto, o más de uno perteneciente al mismo grupo químico, mientras que los pacientes toleran otros AINEs no relacionados químicamente. En estos casos, las reacciones se producen a través de mecanismos inmunológicos en los que se producen respuestas de tipo IgE (reacciones agudas, tipo I) o mediadas por linfocitos T (reacciones tardías, tipo IV). (17)

En este contexto, se ha observado que las reacciones alérgicas a paracetamol suponen más de un 10% del total de reacciones alérgicas a AINEs, siendo este el cuarto causante más frecuente dentro de este grupo (21). En concreto, las reacciones de hipersensibilidad a paracetamol varían desde reacciones inmediatas de tipo I (angioedema, urticaria y anafilaxis) hasta reacciones retardadas de tipo IV (síndrome de Stevens-Johnson, erupción localizada por fármacos y necrólisis epidemial tóxica) (22, 23). Además, se ha visto que en pacientes con alergia al ácido acetilsalicílico (aspirina) y asma, la ingesta de dosis elevadas de paracetamol puede inducir un fallo en la función pulmonar, indicando la existencia de reactividad cruzada entre estos fármacos (1).

## 2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es sintetizar varios metabolitos del paracetamol, concretamente el 3-nitro-acetaminofenol y el 3-mercapturato-acetaminofenol, con el fin de obtener muestras auténticas y confirmar así su estructura química, ya que estos fueron identificados previamente mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) en orina de pacientes que presentaron reacciones de hipersensibilidad.

Para conseguirlo, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar 3-nitro-acetaminofenol y 4-amino-2-yodofenol, mediante síntesis orgánicas clásicas.
- Caracterizar estructuralmente los metabolitos obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN).
- Analizar las muestras mediante UPLC-masas.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 GENERAL

En la Tabla 3.1 se muestra el número CAS y el distribuidor comercial de los productos químicos empleados en este trabajo de fin de grado.

Tabla 3.1. Listado de los productos empleados, junto con su número CAS y su distribuidor comercial.

PRODUCTO	N.º CAS	DISTRIBUIDOR COMERCIAL
Acetato de etilo	141-78-6	Labbox Labware S.L. (Premià de Dalt, Barcelona)
Ácido cítrico	77-92-9	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	144-55-8	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales
Cloroformo deuterado (CDCl <sub>3</sub> )	865-49-6	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales
Cloruro de estaño (II) dihidrato (SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	10025-69-1	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales
Diclorometano (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	75-09-2	Labbox Labware S.L. (Premià de Dalt, Barcelona)
Etanol absoluto	64-17-5	Scharlab S.L. (Sentmenat, Barcelona)
<i>n</i> -Hexano	110-54-3	Labbox Labware S.L. (Premià de Dalt, Barcelona)
Metanol deuterado (MeOD)	811-98-3	Eurisotop (Saint-Aubin, Francia)
Nitrito de sodio (NaNO <sub>2</sub> )	7632-00-0	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales
Paracetamol (acetaminofén)	103-90-2	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales
Sílice (SiO <sub>2</sub> )	7631-86-9	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO <sub>4</sub> )	7487-88-9	VWR Chemicals (Ohio, Estados Unidos)
Sulfato de sodio anhidro (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	7757-82-6	VWR International (Leuven, Bélgica)
2-yodofenol	533-58-4	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o sus filiales

## 3.2 INSTRUMENTACIÓN

### 3.2.1 ROTAVAPOR

Los disolventes de las diferentes disoluciones se evaporaron empleando un rotavapor Büchi R-114 (BUCHI Ibérica S.L.U.) (Figura 3.1 ①) equipado con un baño de agua (Büchi Waterbath B-480, BUCHI Ibérica S.L.U.) (Figura 3.1 ②), una bomba de vacío (Büchi Vacuum Pump V-700, BUCHI Ibérica S.L.U.) (Figura 3.1 ③) y un controlador de vacío (Büchi Vacuum Controller V-850, BUCHI Ibérica S.L.U.) (Figura 3.1 ④).



**Figura 3.1. Rotavapor empleado para la evaporación de los disolventes.** ① Büchi Rotavapor R-114 (BUCHI Ibérica S.L.U.). ② Baño de agua (Büchi Waterbath B-480, BUCHI Ibérica S.L.U.). ③ Bomba de vacío (Büchi Vacuum Pump V-700, BUCHI Ibérica S.L.U.). ④ Controlador de vacío (Büchi Vacuum Controller V-850, BUCHI Ibérica S.L.U.).

### 3.2.2 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) se registraron empleando un espectrómetro Bruker Ascend 400/R (Figura 3.2) (Bruker Española S.A) operando a frecuencias de 400 y 101 MHz, respectivamente. Como disolventes se emplearon metanol deuterado (MeOD) (para la caracterización del 3-nitro-acetaminofenol y del 4-amino-2-yodofenol) y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) (para la caracterización del 2-yodo-4-nitrofenol), tomando la señal correspondiente al disolvente como referencia.

Los espectros obtenidos fueron interpretados empleando el programa MestReNova (versión 14.2.1-27684).

Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se indican en partes por millón (ppm). En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, cada señal se indica entre paréntesis con la multiplicidad del pico, los valores de la constante de acoplamiento (J) en Hz y la integración. Cuando se indica la multiplicidad de los picos, se emplean las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), m (multiplete), dd (doble doblete), ddd (doble doble doblete).



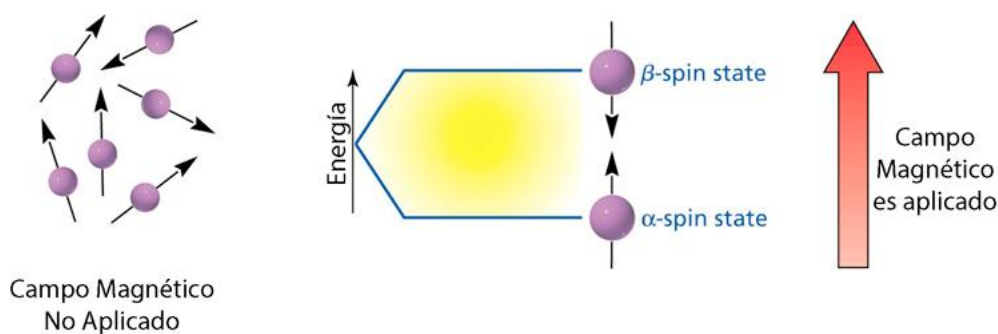
**Figura 3.2. Equipo empleado para realizar los análisis de RMN.** En concreto se trata de un espectrómetro Bruker Ascend 400/R (Bruker Española S.A).

### 3.2.2.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias. Las propiedades que poseen los núcleos atómicos y que hacen posible este fenómeno se dividen en dos tipos: mecánicas y eléctricas. Las propiedades mecánicas son el momento angular ( $L$ ) y el espín nuclear ( $I$ ) (relación carga/masa), mientras que las propiedades eléctricas son la carga eléctrica ( $q$ ), el momento magnético ( $\mu$ ) y el momento cuadrupolar ( $Q$ ).

No cualquier tipo de núcleo da lugar a una señal de RMN. Aquellos que poseen un número par de carga y masa poseen un número cuántico de espín de 0 (como el  $^{12}\text{C}$ ), por lo que no poseen momento angular nuclear y no producirán señal de RMN. Los núcleos atómicos útiles para espectroscopia de RMN son  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ , aunque los más comúnmente empleados son los protones (H) y el carbono. (24)

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín  $\alpha$ , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín  $\beta$ . (Figura 3.3) (25)

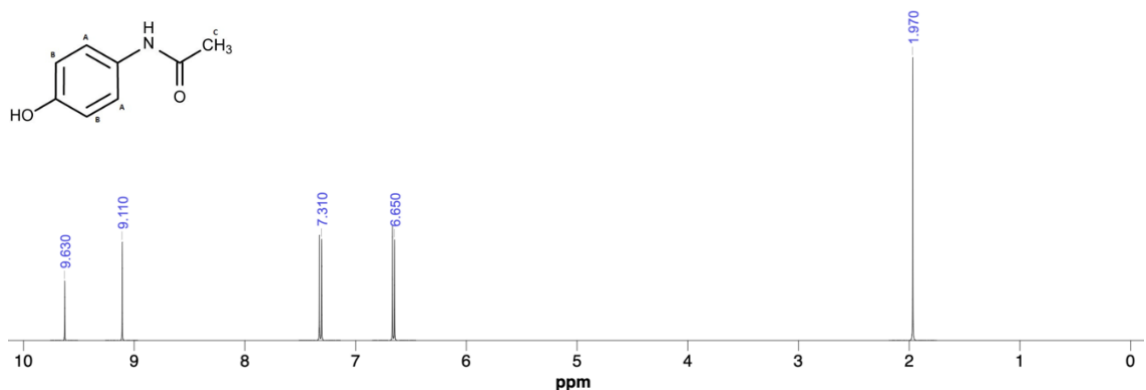


**Figura 3.3. Localización de los espines antes y después de aplicar un campo magnético.** Antes de aplicar el campo magnético, los espines se encuentran orientados al azar. Tras la aplicación de este, los espines se orientan en direcciones determinadas. *Imagen obtenida de Castell, 2013. (25)*

El espectro de RMN se obtiene situando una muestra en un campo magnético homogéneo y aplicando energía electromagnética en la frecuencia adecuada. (26)

Hay 3 tipos de información que se pueden obtener a partir de un espectro de RMN: frecuencias, áreas y el ancho o la forma de las líneas de resonancia. En estos espectros se puede asignar cada uno de los picos a un grupo funcional de la muestra. La línea en forma de escalera que se suele mostrar sobre los picos es una integral, siendo la altura de cada escalón proporcional al área de la línea espectral correspondiente. Las áreas debajo de cada pico son diferentes, debido a que esta es proporcional al número de núcleos que contribuyen. Otro dato importante en la espectrometría de RMN es que las frecuencias de resonancia (posición de cada pico) depende del ambiente químico que rodea la molécula, es decir, del disolvente en el que se encuentra la muestra. (26)

En la Figura 3.4 se observa el espectro de protón del paracetamol. En este se observan dos multipletes, a 7,31 y 6,65 ppm, es decir diferentes picos correspondientes a un mismo grupo funcional. Estos aparecen debido a las interacciones entre núcleos denominadas acoplamiento espín-espín.



**Figura 3.4. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del paracetamol.**  $^1\text{H}$ -RMN [500 MHz, 5%\_DMSO]. Los picos que se observan en el espectro corresponden a los siguientes grupos funcionales:  $\delta = 1,97$  al  $\text{CH}_3$ ; 6,65 a los CH correspondiente a los átomos B de la estructura del paracetamol; 7,31 a los CH correspondiente a los átomos A de la estructura del paracetamol; 9,11 al NH; y 9,63 al OH. *Imágenes obtenidas de HMDB, 2012 (27).*



Los componentes básicos de un espectrómetro de RMN se observan en la Figura 3.5, e incluyen 3 elementos principales: el imán, la consola y el ordenador huésped. (24)

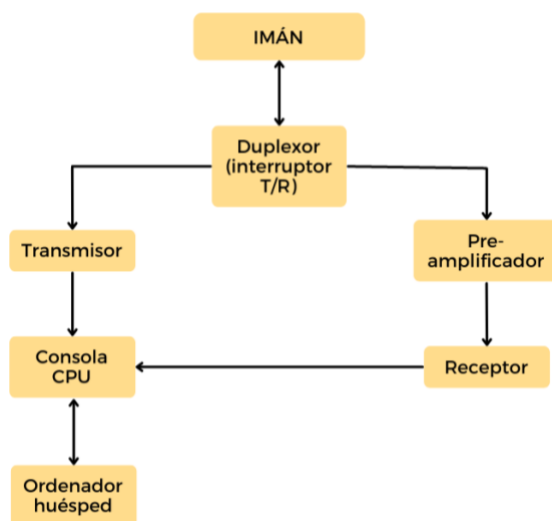


Figura 3.5. Diagrama de los componentes de un espectrómetro de RMN. Imagen adaptada de Teng, 2013 (24).

El imán de un espectrómetro de RMN produce un campo magnético estático estable, que es usado para generar magnetización macroscópica en la muestra de RMN. El campo electromagnético lineal oscilante es inducido por un transmisor con el campo de fuerza deseable para interactuar con los núcleos a estudiar. La señal de RMN generada tras la irradiación con pulsos de radiofrecuencia es amplificada por un preamplificador y posteriormente detectada por el receptor. Dicha señal es digitalizada para el procesamiento de los datos en un ordenador. (24)

### 3.2.3 UPLC-MASAS

Para llevar a cabo el análisis de masa exacta de los metabolitos se utilizó un equipo UPLC-Masas constituido por un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp.) equipado con un autosampler a 4°C (Figura 3.6 (a)). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm de diámetro interno, 1.7 µm), manteniendo la temperatura de la columna en 40°C. El análisis se realizó en gradiente, utilizando como fase móvil una mezcla creciente de metanol/agua, en la que la fase acuosa contenía, además, un 0.01% de ácido fórmico. El volumen de inyección fue de 2 mL.

El espectrofotómetro Waters ACQUITY™ XevoQToF (Waters Corp.) (Figura 3.6 (b)) se conectó al sistema UPLC a través de una interfase de ionización por electrospray (ESI) (Figura 3.6 (c)). La fuente ESI, operó en modo ionización positivo con un voltaje de 3.0 kV. La temperatura se mantuvo entre los 100°C y 400°C.

Todos los datos se recogieron usando el software Masslynx™ (Waters Corp.).



Figura 3.6. Equipo de UPLC-masas. ① Sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp.). ② Espectrofotómetro Waters ACQUITY™ Xevo QToF (Waters Corp.). ③ Interfase de ionización por electrospray (ESI).

### 3.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía es una técnica física de separación basada en la distribución diferencial de los componentes de una mezcla entre dos fases, una estacionaria y una móvil, cuando son arrastrados por la fase móvil que se desplaza en contacto con, y a través de, la fase estacionaria. (28).

La fase móvil transporta los analitos a través de la fase estacionaria. Por tanto, ambas fases deben ser elegidas de tal forma que los analitos a separar se distribuyan de manera diferente entre ambas. Así, los componentes que tengan mayor afinidad por la fase estacionaria serán retenidos con más fuerza, y por tanto se desplazarán más lentos. Por el contrario, aquellos que tengan menor afinidad, serán retenidos con menor fuerza, y avanzarán a mayor velocidad junto con la fase móvil. (29)

Clásicamente, se han diferenciado dos modos de trabajo cromatográficos, fase normal y reversa. Como se muestra en la Tabla 3.2, en fase normal, la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar. En fase reversa, la situación es a la inversa, la fase estacionaria es apolar y la móvil es polar. (28)

Tabla 3.2. Características de los componentes de la cromatografía en capa fina en función de su método de trabajo.

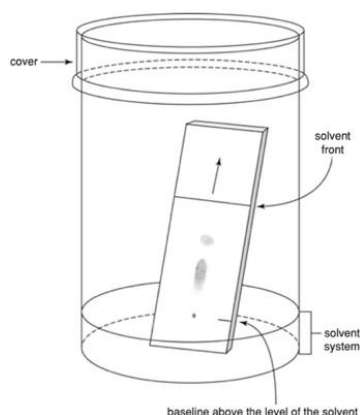
	Fase estacionaria	Fase móvil	Al aumentar la polaridad de la fase móvil:
Fase normal	Polar	Apolar	Disminuye la retención.
Fase reversa	Apolar	Polar	Aumenta la retención.

En este trabajo se emplearán 3 técnicas cromatográficas diferentes: la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en columna y la cromatografía líquida de ultra-alta presión (UPLC) acoplada a un detector de espectrometría de masas (UPLC-Masas).

### 3.3.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin-Layer Chromatography*) es una técnica de cromatografía plana en la que la fase estacionaria está distribuida en forma de capa de pequeño espesor sobre un soporte plano de vidrio, plástico o metal. Esta fase suele estar compuesta por capas finas orgánicas o inorgánicas hechas de sílice, sílice alquilada (C8 o C18), celulosa o un polímero monolítico, mientras que la fase móvil suele ser una mezcla de disolventes orgánicos puros que abarcan un amplio rango de hidrofobicidades. Los soportes de sílice son los más empleados en cromatografía. (30, 31)

La muestra disuelta, con una concentración de analito de entre 0,01-0,1%, se aplica en forma de gota mediante un capilar cerca de uno de los extremos de la fase estacionaria, a una distancia entre 1-2 cm del borde de la placa. Después de la aplicación de la muestra, el disolvente debe evaporarse antes de introducir la placa en la fase móvil. Para desarrollar el cromatograma, la placa se coloca en una cámara cerrada, siendo el extremo en el que se ha aplicado la muestra el que se introduce en la fase móvil, aunque teniendo cuidado de que las manchas de muestra no se introduzcan directamente en la fase móvil (Figura 3.7). (28, 30)



**Figura 3.7. Esquema de la preparación del material para la realización de una cromatografía en capa fina.** La muestra se deposita sobre la placa en el extremo inferior y, una vez se ha evaporado el disolvente, la placa se introduce en la fase móvil, teniendo en cuenta que la muestra no debe sumergirse. El recipiente se cierra y los analitos presentes en la muestra empiezan a ascender a causa de la subida de la fase móvil. *Imagen de Meyers y Meyers, 2008. (32)*

El disolvente asciende por la placa por fuerzas de capilaridad a velocidad que no es constante, decreciendo a medida que la mancha asciende por la placa. Cuando el disolvente ha recorrido la mayor parte de la placa, esta se retira de la cámara marcando el punto exacto hasta el que ha llegado. Finalmente, se evapora el disolvente y la placa queda en condiciones adecuadas para detectar y evaluar los resultados. Los analitos quedan distribuidos en el cromatograma resultante en forma de manchas o zonas de forma elíptica. (28)

La migración diferencial de los analitos es el resultado de los diferentes grados de afinidad de los diferentes analitos presentes en la muestra por las fases estacionaria y móvil. (30)

Existen varias técnicas disponibles para la detección de los analitos. Las técnicas luminiscentes son útiles para analitos orgánicos fluorescentes y para analitos inorgánicos fosforescentes. En este caso, las manchas se detectan irradiando la placa con radiación UV. Cuando los analitos no presentan propiedades luminiscentes, se puede impregnar la capa fina con una sustancia

iniciadora fluorescente. Alternativamente, se puede rociar o revelar la placa con un oxidante fuerte no específico, como el nítrico, permanganato potásico o ácido sulfúrico, o con una disolución de reactivo específico de una sustancia o de un grupo funcional, como la ninhidrina para los grupos amino o el cloruro de hierro para los fenoles. (28)

La identificación de los compuestos en TLC se basa principalmente en la comparación de los valores del factor de retardo ( $R_f$ ) con valores de referencia. Sin embargo, estos valores no son reproducibles entre diferentes laboratorios o incluso entre diferentes corridas en un mismo laboratorio, por lo que deben ser considerados como guías. (30) El valor  $R_f$  se calcula siguiendo la Ecuación 1 y presenta valores comprendidos entre 0 y 1.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el analito}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}} \quad (\text{Ec. 1})$$

### 3.3.2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La cromatografía en columna consiste en la aplicación de una muestra compleja a una columna de cristal. Dicha columna contiene en su interior una matriz sólida porosa (generalmente sílice) que está inmersa en el disolvente, el cual se hace pasar en gran cantidad a través de la columna. El flujo de la fase móvil a través de la estacionaria se consigue por presión, por capilaridad o por gravedad. Los diferentes componentes de la muestra se van eluyendo de manera distinta según sus interacciones con la matriz. Se pueden separar de acuerdo con su carga, hidrofobicidad, tamaño o capacidad de unirse a grupos químicos particulares. La pureza de las fracciones obtenidas se suele comprobar mediante TLC. (33, 34)

Hay varios tipos de métodos cromatográficos en columna: cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión y cromatografía de afinidad. Estos métodos se diferencian en el tipo de retención de la fase estacionaria, el tipo de eluyente y el material empleado como fase estacionaria. (35)

En la cromatografía de adsorción, son las interacciones polares las implicadas en la retención del soluto. Esta es la técnica más antigua y, aunque no posee la especificidad de los otros métodos, es uno de los más simples y efectivos para la separación de mezclas de compuestos poco polares, insolubles en agua y poco volátiles. La sílice, aluminio, carbón activado y polímeros no iónicos macroporosos son los adsorbentes empleados con mayor frecuencia. En cuanto a los eluyentes, los más comunes son los disolventes orgánicos de bajo peso molecular (algunos ejemplos son el ciclohexano, el acetato de etilo, el cloroformo, el metanol o el agua). (28, 35)

En la cromatografía de intercambio iónico, se forman uniones químicas reversibles entre componentes iónicos de las fases móvil y estacionaria. El eluyente suele ser agua o un tampón acuoso. Por tanto, esta técnica se suele emplear para compuestos solubles en agua presentes en disolución en forma de iones. (28, 35)

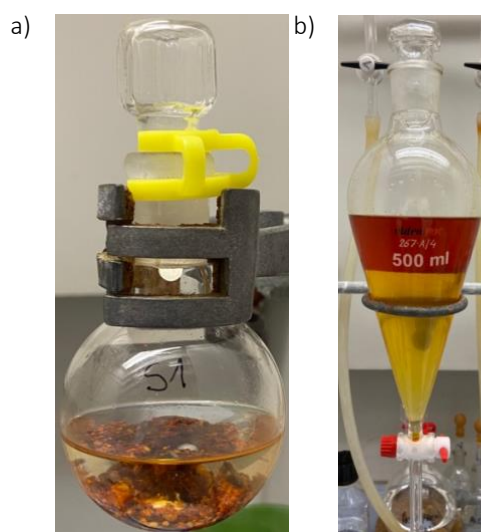
En la cromatografía de exclusión la fase estacionaria sirve como un tamiz molecular para separar los solutos en función de su peso molecular. Esta técnica se puede emplear tanto para moléculas poliméricas insolubles en agua (cromatografía de permeación en gel) como para moléculas grandes polares y solubles en agua (cromatografía de filtración en gel). (28, 35)

La cromatografía de afinidad se basa en una propiedad bioquímica única y fundamental de las moléculas: su reconocimiento selectivo y con elevada afinidad de otras moléculas y su interacción reversible con ellas. (35)

### 3.4 SÍNTESIS DEL 3-NITRO-ACETAMINOFENOL

Una disolución de paracetamol (2 g, 13,23 mmol), nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) (0,912 g, 13,23 mmol), ácido cítrico (2,542 g, 13,23 mmol) y sílice húmeda (al 50%) (1,32 g, 14,32 mmol) en 80 mL de *n*-hexano se puso en agitación durante 3h. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, y tomando las precauciones necesarias, debido al desprendimiento de vapores de dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ). La evolución de la reacción se siguió mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Tras este tiempo, se filtró por gravedad la disolución resultante, que contenía un producto anaranjado insoluble (Figura 3.8 a), descartando así el hexano. El residuo sólido se disolvió en acetato de etilo (AcOEt) y se extrajo con agua (3 x 100 mL) empleando un embudo de decantación. Ambos líquidos son inmiscibles, por lo que tras dejar reposar se observaron dos fases claramente diferenciadas debido a su diferencia de polaridad: la fase acuosa en la parte inferior del embudo y la fase orgánica (AcOEt) en la parte superior (Figura 3.8 b). El resto de agua de la fase orgánica se eliminó con el agente desecante sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida utilizando un rotavapor. El disolvente residual se eliminó a vacío, obteniendo así el crudo de reacción, que se caracterizó mediante resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN).



**Figura 3.8.** *Work-up* de la reacción de síntesis del 3-nitro-acetaminofenol. a) Balón de reacción tras el proceso de síntesis. Se observa un sólido pastoso (producto) en una disolución de hexano. b) Embudo de decantación. Se observan dos fases claramente diferenciadas, la fase acuosa (inferior) y la fase orgánica (superior).

Las señales de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) del crudo de reacción se indican a continuación:

$^1\text{H}$ -RMN [400 MHz, MeOD]  $\delta$  = 8,43 (d,  $J$  = 2,6 Hz, 1H); 7,68 (dd,  $J$  = 9,0 y 2,7 Hz, 1H); 7,34 – 7,25 (m, 2H); 7,10 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 1H); 6,76 – 6,68 (m, 2H); 2,08 (s, 6H).

El crudo de la reacción fue purificado mediante cromatografía en columna de adsorción-desorción usando acetato de etilo/hexano en proporción 6:4 como fase móvil (Figura 3.9). El seguimiento de la columna se realizó mediante TLCs de las fracciones obtenidas.

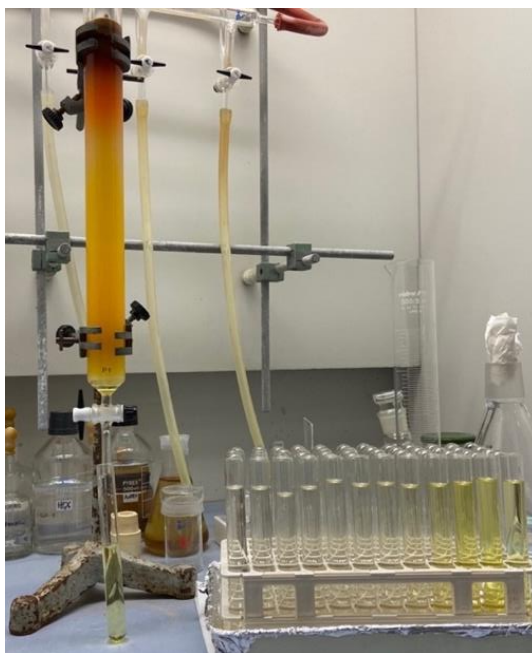


Figura 3.9. Columna cromatográfica empleada para la purificación del metabolito 3-nitro-acetaminofenol.

Se obtuvo el producto 3-nitro-acetaminofenol (0,3 g, 1,53 mmol, 11,57%) y, como producto secundario, el 3,5-dinitro-acetaminofenol (0,15 g, 0,62 mmol, 4,70%). El primero fue caracterizado mediante resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN), mientras que el segundo por  $^1\text{H}$ -RMN. Además, ambos productos se estudiaron mediante UPLC-MS/MS, para determinar su masa exacta.

El rendimiento de la reacción se calculó siguiendo la fórmula descrita en la Ecuación 2.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Moles de metabolito puro obtenidos}}{\text{Moles de metabolito esperados}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

### 3.5 SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL

Otro metabolito de interés era el 3-mercaptopurato-acetaminofenol, cuya síntesis a partir del 2-yodofenol no es directa, sino que se deben realizar varias secuencias de reacción (Figura 3.10). Sin embargo, para este trabajo de fin de grado no se pudo completar la secuencia de síntesis debido a falta de tiempo, sino que se obtuvo el intermedio 4-amino-2-yodofenol.

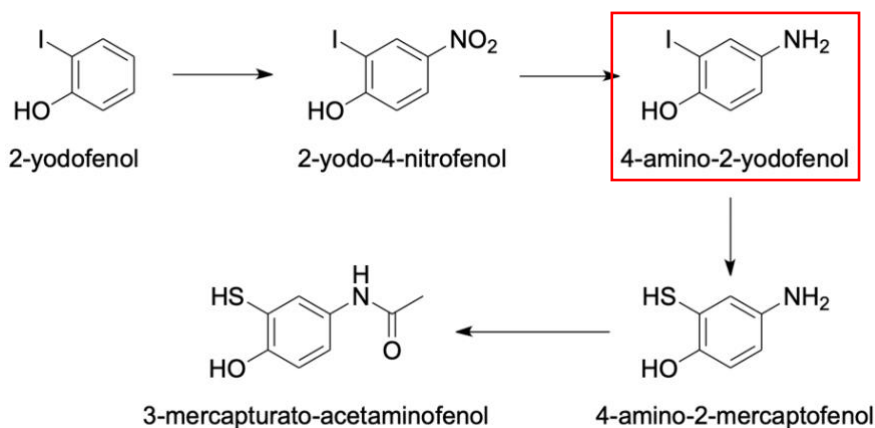


Figura 3.10. Secuencia propuesta de síntesis del 3-mercapturato-acetaminofenol a partir del 2-yodofenol. Enmarcado en rojo se indica el intermedio que se sintetizó en este trabajo de fin de grado.

### 3.5.1 SÍNTESIS DEL 2-YODO-4-NITROFENOL

Una disolución de 2-yodofenol (200 mg, 0,91 mmol), nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) (91,2 mg, 1,32 mmol), ácido cítrico (254,2 mg, 1,32 mmol) y sílice húmeda (al 50%) (150 mg, 1,63 mmol) en 8 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , DCM) se puso en agitación durante 3h. Tras este tiempo, la disolución resultante se extrajo con agua (3 x 20 mL). En este caso la fase acuosa en la parte superior del embudo y la fase orgánica (DCM) en la inferior.

El resto de agua que pudiera quedar en la fase orgánica se eliminó con el agente desecante sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida utilizando un rotavapor. El disolvente residual del crudo de reacción se eliminó a vacío.

Las señales de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) del crudo de reacción se indican a continuación:

$^1\text{H}$  RMN [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 11,36 (s, 1H); 8,60 (d,  $J$  = 2,6 Hz, 1H); 8,18 (dd,  $J$  = 9,0 y 2,6 Hz, 1H); 8,13 (dd,  $J$  = 8,5 y 1,6 Hz, 1H); 8,09 (dd,  $J$  = 7,7 y 1,6 Hz, 1H); 7,66 (dd,  $J$  = 8,0 y 1,5 Hz, 3H); 7,30-7,22 (m, 6H); 7,07 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 1H); 7,00 (dd,  $J$  = 8,1 y 1,5 Hz, 3H); 6,80 (dd,  $J$  = 8,5 y 7,7 Hz, 1H); 6,68 (ddd,  $J$  = 8,0, 7,3 y 1,5 Hz, 3H); 6,16 (s, 1H).

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de la reacción se observaron señales correspondientes al 2-yodofenol (producto de partida), el 2-yodo-4-nitrofenol y el 2-yodo-6-nitrofenol. Por este motivo, se realizó una purificación mediante cromatografía en columna de adsorción-desorción en gradiente, con el fin de aislar cada uno de los productos. En un principio se usó hexano/acetato de etilo en proporción 15:1 como disolvente y, una vez dejó de aparecer la señal correspondiente al 2-yodofenol en la TLC, esta se cambió a hexano/acetato de etilo (5:1). El seguimiento de la columna se realizó mediante TLCs de las fracciones obtenidas.

Se obtuvieron los productos 2-yodo-4-nitrofenol (120 mg, 0,45 mmol, 49,81%) y 2-yodo-6-nitrofenol (60 mg, 0,226 mmol, 24,91%), que fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN).

El rendimiento de la reacción se calculó siguiendo la fórmula descrita en la Ecuación 2.

### 3.5.2 SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL

Una disolución de 2-yodo-4-nitrofenol (120 mg, 0,45 mmol) y cloruro de estaño dihidrato ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (511 mg, 2,27 mmol) en 9 mL de etanol absoluto se calentó a 70°C y se puso en reflujo bajo atmósfera inerte de argón durante 12h (Figura 3.11).



**Figura 3.11. Reacción a reflujo bajo atmósfera de argón.** Previamente al inicio de la reacción se purgó el sistema para así eliminar el oxígeno atmosférico.

Una vez finalizada la reacción, la disolución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se vertió en hielo, pasando de ser una dilución color amarillo a una blanquecina. La disolución obtenida se basificó (hasta  $\text{pH} = 7-8$ ) empleando una disolución acuosa de bicarbonato de sodio al 5% ( $\text{NaHCO}_3$ ). A continuación, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Las fases orgánicas obtenidas se lavaron con salmuera y los restos de agua que pudieran quedar en dicha fase se eliminaron con el agente desecante sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ). Finalmente, se evaporó el disolvente a presión reducida utilizando un rotavapor y, el disolvente residual se eliminó a vacío.

En el  $^1\text{H}$ -RMN se vio que el crudo de la reacción correspondía únicamente con el producto 4-amino-2-yodofenol (90 mg, 0,38 mmol, 84,57 %), de manera que la reacción fue completa, es decir, no quedó producto de partida sin reaccionar, y no se obtuvieron otros productos secundarios.

El rendimiento de la reacción se calculó siguiendo la fórmula descrita en la Ecuación 2.



## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SÍNTESIS DEL 3-NITRO-ACETAMINOFENOL

El 3-nitro-acetaminofenol, junto con el producto secundario minoritario 3,5-dinitro-acetaminofenol, se sintetizaron a partir del paracetamol (Figura 4.1).

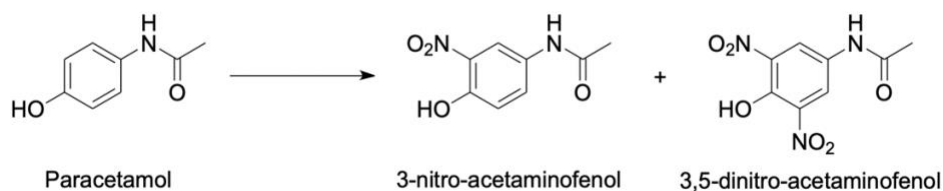


Figura 4.1. Esquema de la reacción de síntesis del metabolito 3-nitro-acetaminofenol. Se forma también 3,5-dinitro-acetaminofenol como producto secundario.

Esto se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Mohammad, et al. (36), donde se describe un método para nitrar fenoles para-sustituídos, empleando ácido cítrico como fuente de protones ( $H^+$ ) y nitrito de sodio ( $NaNO_2$ ) como agente nitrante. Además, este proceso debe realizarse en presencia de sílice ( $SiO_2$ ) húmeda, que actúa como superficie para la generación *in situ* de  $HNO_2$ .

El crudo de reacción obtenido se purificó mediante cromatografía de columna de sílice, usando como eluyente acetato de etilo/hexano (6:4 v/v). El análisis de los espectros de RMN de protón y de carbono ( $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN) de las diferentes fracciones obtenidas reveló la formación de dos productos: el 3-nitro-acetaminofenol (Figura 4.2) y el 3,5-dinitro-acetaminofenol (Figura 4.3). Estas técnicas, junto con el UPLC-MS/MS, permitieron la caracterización de ambos compuestos.

Las señales de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN del 3-nitro-acetaminofenol y las señales de  $^1H$ -RMN del 3,5-dinitro-acetaminofenol, así como las masas obtenidas en el equipo UPLC-MS/MS se indican a continuación:

a) *3-nitro-acetaminofenol*:

$^1H$ -RMN [400 MHz, MeOD]  $\delta$  = 8,46 (d,  $J$  = 2,6 Hz, 1H); 7,70 (dd,  $J$  = 9,0 y 2,6 Hz, 1H); 7,13 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 1H); 2,14 (s, 3H).

$^{13}C$ -RMN [101 MHz, MeOD]  $\delta$  = 171,70; 151,94; 135,08; 132,58; 130,39; 121,00; 116,57; 23,62.

Masa exacta:  $m/z$ , encontrada 197,0562, calculada para  $C_8H_8N_2O_4$  ( $MH^+$ ) 197,160.

b) *3,5-dinitro-acetaminofenol*:

$^1H$ -RMN [400 MHz, MeOD]  $\delta$  = 8,49 (s, 2H); 2,14 (s, 3H).

Masa exacta:  $m/z$ , encontrada 240,0259, calculada para  $C_8H_7N_3O_6$  ( $MH^+$ ) 240.

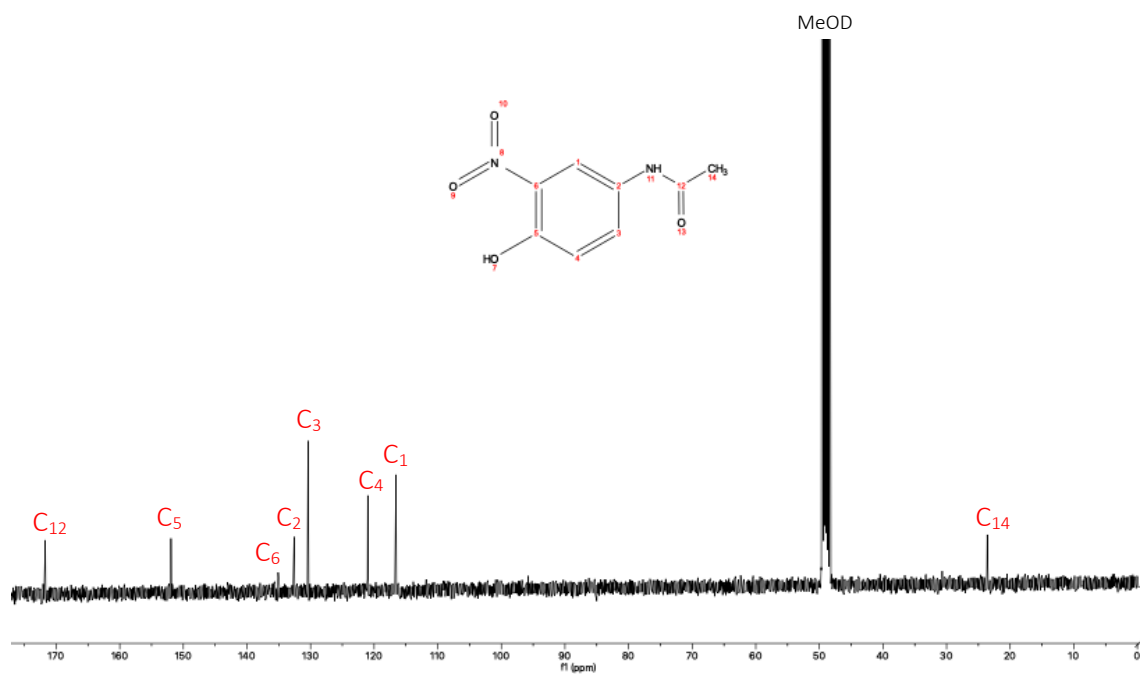


Figura 4.2. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (arriba) y <sup>13</sup>C-RMN (abajo) del 3-nitro-acetaminofenol junto con las asignaciones de las señales. Las asignaciones se basan en las predicciones del programa MestReNova.

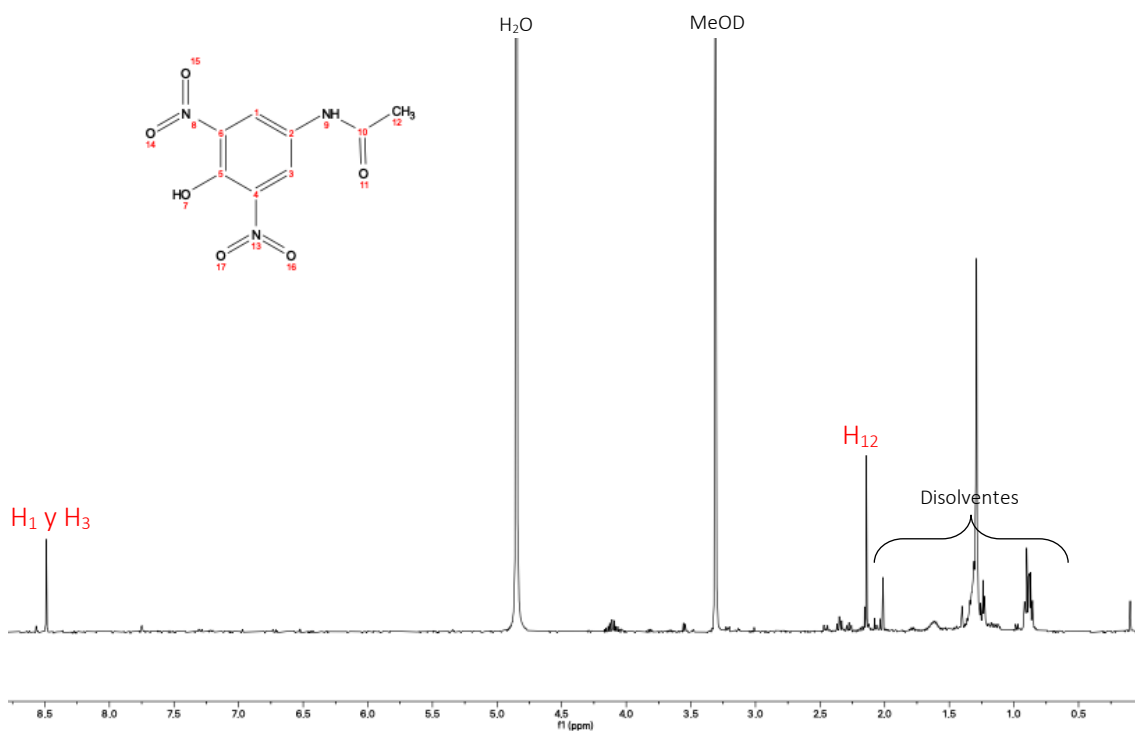


Figura 4.3. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del 3,5-dinitro-acetaminofenol junto con las asignaciones de las señales. Las asignaciones se basan en las predicciones del programa MestReNova.

La formación del 3,5-dinitro-acetaminofenol como metabolito secundario no se esperaba. Sin embargo, teniendo en cuenta que el grupo hidroxilo (OH) es orto- y para-director, mientras que el grupo acetamida ( $\text{NHCOCH}_3$ ) es meta-director, es posible que el grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ) se introduzca en ambas posiciones orto respecto al grupo OH, dando lugar a este metabolito.

## 4.2 SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL

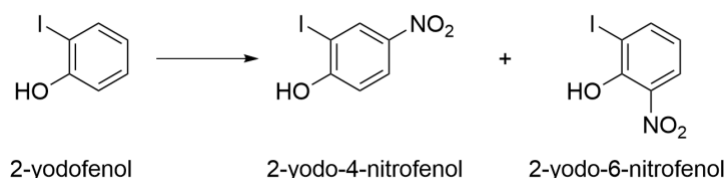
La ruta sintética del 3-mercaptopato-acetaminofenol propuesta consta de 4 etapas:

- 1) Nitración del 2-yodofenol, dando lugar al 2-yodo-4-nitrofenol.
- 2) Este compuesto es reducido a 4-amino-2-yodofenol.
- 3) Sustitución nucleofílica del yodo por un grupo tiol, dando lugar a 4-amino-2-mercaptofenol.
- 4) Acetilación de la amina, dando lugar a 3-mercaptopato-acetaminofenol.

En este trabajo de fin de grado se pudo llegar a obtener el intermedio 4-amino-2-yodofenol.

### 4.2.1 SÍNTESIS DEL 2-YODO-4-NITROFENOL

La primera etapa del proceso de síntesis implica una reacción de nitración del compuesto 2-yodofenol, dando lugar al 2-yodo-4-nitrofenol y a su isómero de posición, el 2-yodo-6-nitrofenol (Figura 4.4).



**Figura 4.4. Esquema de la reacción de síntesis del metabolito 2-yodo-4-nitrofenol.** Se forma también su isómero de posición, el 2-yodo-6-nitrofenol, como producto secundario.

Esta secuencia de síntesis se llevó a cabo siguiendo la misma metodología descrita para el metabolito anterior, que implica el uso de  $\text{NaNO}_2$  como agente nitrante. Cabe destacar que se intentó seguir la ruta de síntesis descrita por Vojtičková et al. (37), donde se describe específicamente la nitración del 2-yodofenol en posición para respecto al OH. Sin embargo, la nitración empleando una solución al 70% de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) como agente nitrante en presencia de diclorometano no tuvo éxito.

El análisis de los espectros de RMN de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) de las diferentes fracciones obtenidas tras la purificación mediante cromatografía en columna de adsorción-desorción permitió la caracterización de los dos isómeros obtenidos: el 2-yodo-4-nitrofenol (Figura 4.5) y el 2-yodo-6-nitrofenol (Figura 4.6). Sus señales de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se indican a continuación:

*a) 2-yodo-4-nitrofenol:*

$^1\text{H}$ -RMN [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 8,59 (d,  $J$  = 2,7 Hz, 1H); 8,16 (dd,  $J$  = 9,0 y 2,7 Hz, 1H); 7,05 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$ -RMN [101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 160,66; 141,99; 134,62; 126,22; 114,74; 84,51.

*b) 2-yodo-6-nitrofenol:*

$^1\text{H}$ -RMN [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 11,35 (s, 1H); 8,11 (ddd,  $J$  = 17,8, 8,1 y 1,6 Hz, 2H); 6,80 (dd,  $J$  = 8,5 y 7,7 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$ -RMN [101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 154,18; 147,30; 133,52; 125,59; 121,78; 87,16.

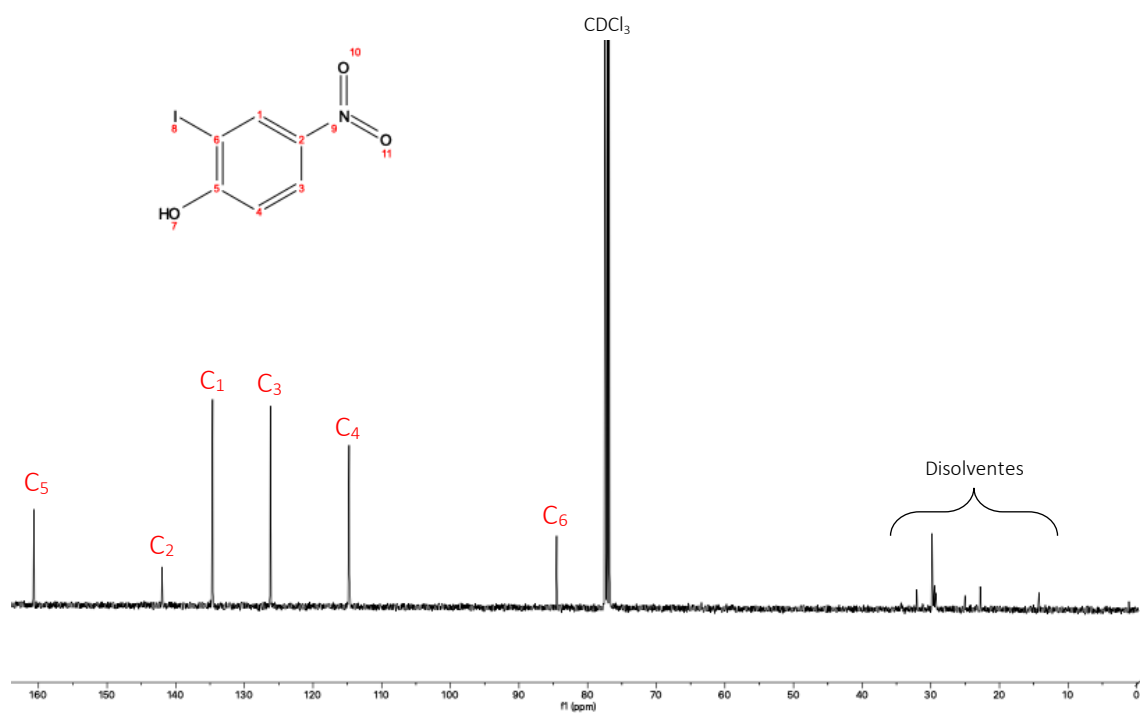
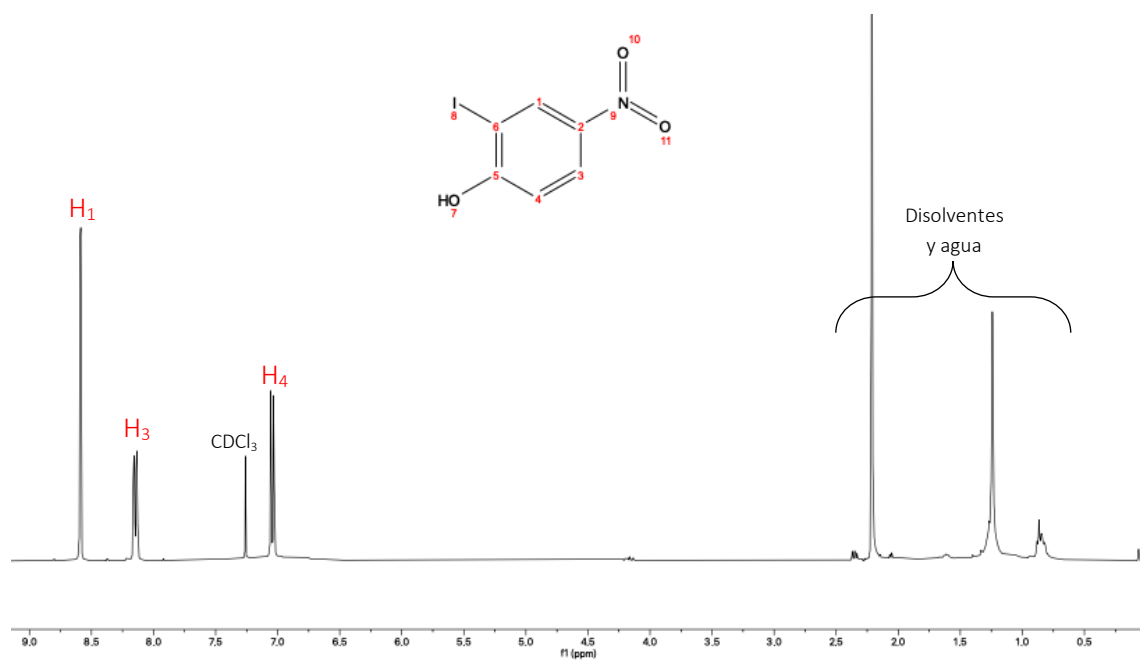


Figura 4.5. Espectros de  $^1\text{H-NMR}$  (Arriba) y  $^{13}\text{C-NMR}$  (abajo) del 2-yodo-4-nitrofenol junto con las asignaciones de las señales. Las asignaciones se basan en las predicciones del programa MestReNova.

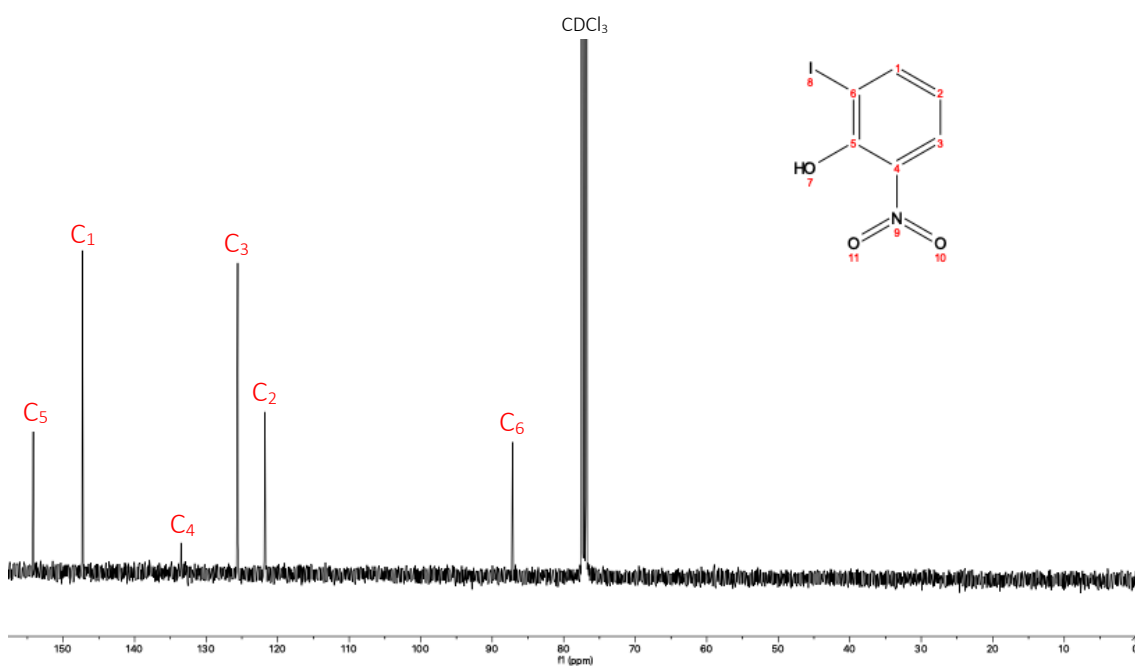
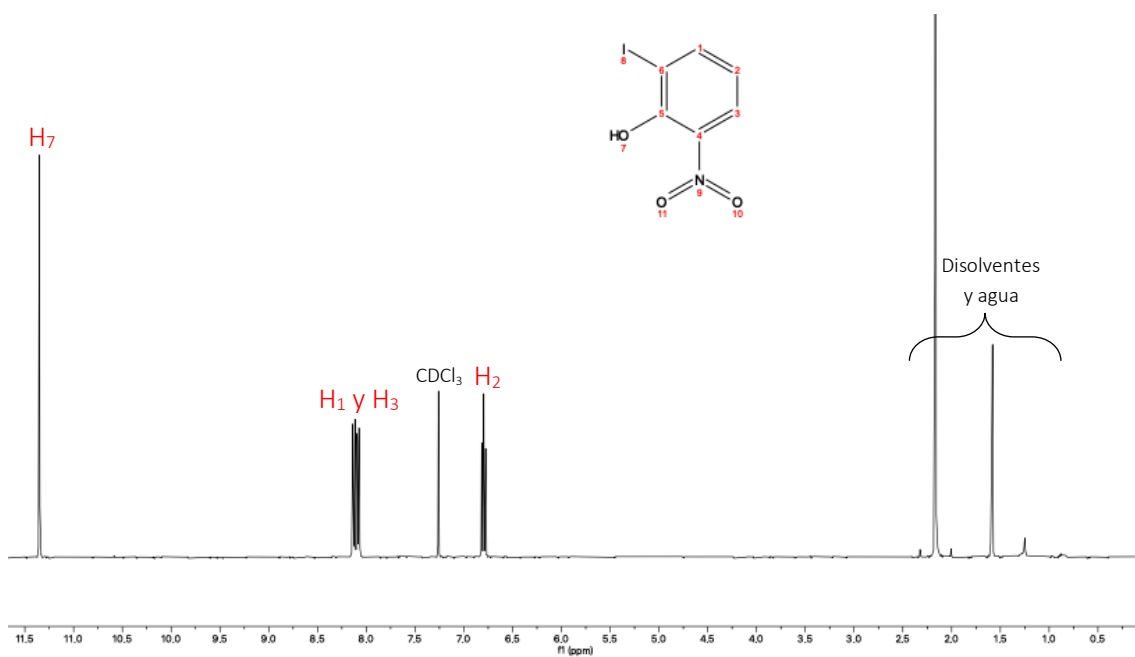


Figura 4.6. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (arriba) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (abajo) del 2-yodo-6-nitrofenol junto con las asignaciones de las señales. Las asignaciones se basan en las predicciones del programa MestReNova.

La formación del isómero 2-yodo-6-nitrofenol se explica en base a que el grupo OH es orientador a orto y para, por lo que el grupo nitro puede introducirse tanto en la posición C2 del anillo aromático (en para) como en la posición C4 (en orto). En la otra posición orto (C6) no puede introducirse, ya que dicha posición está ocupada por el átomo de yodo.

#### 4.2.2 SÍNTESIS DEL 4-AMINO-2-YODOFENOL

En la segunda etapa se redujo el grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) del 2-yodo-4-nitrofenol a amino (NH<sub>2</sub>), dando lugar al 4-amino-2-yodofenol (Figura 4.7).

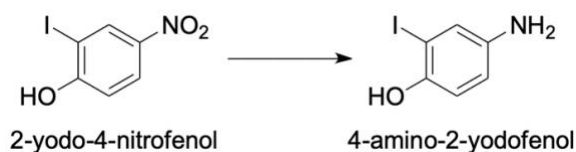


Figura 4.7. Esquema de la reacción de síntesis del metabolito 4-amino-2-yodofenol.

Esta síntesis se realizó siguiendo la ruta descrita por Vojtičková et al. (37), donde se describe la reducción del grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) a amino (NH<sub>2</sub>) en presencia de cloruro de estaño (II) dihidrato (SnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O) y empleando como disolvente etanol absoluto.

El análisis del espectro de RMN de protón (<sup>1</sup>H-RMN) del crudo de la reacción permitió la caracterización del producto obtenido, el 4-amino-2-yodofenol (Figura 4.8). Las señales de <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción se indican a continuación:

<sup>1</sup>H-RMN [400 MHz, MeOD] δ = 7,14 (dd, J = 1,8 y 1.2 Hz, 1H); 6,68 – 6,59 (m, 2H).

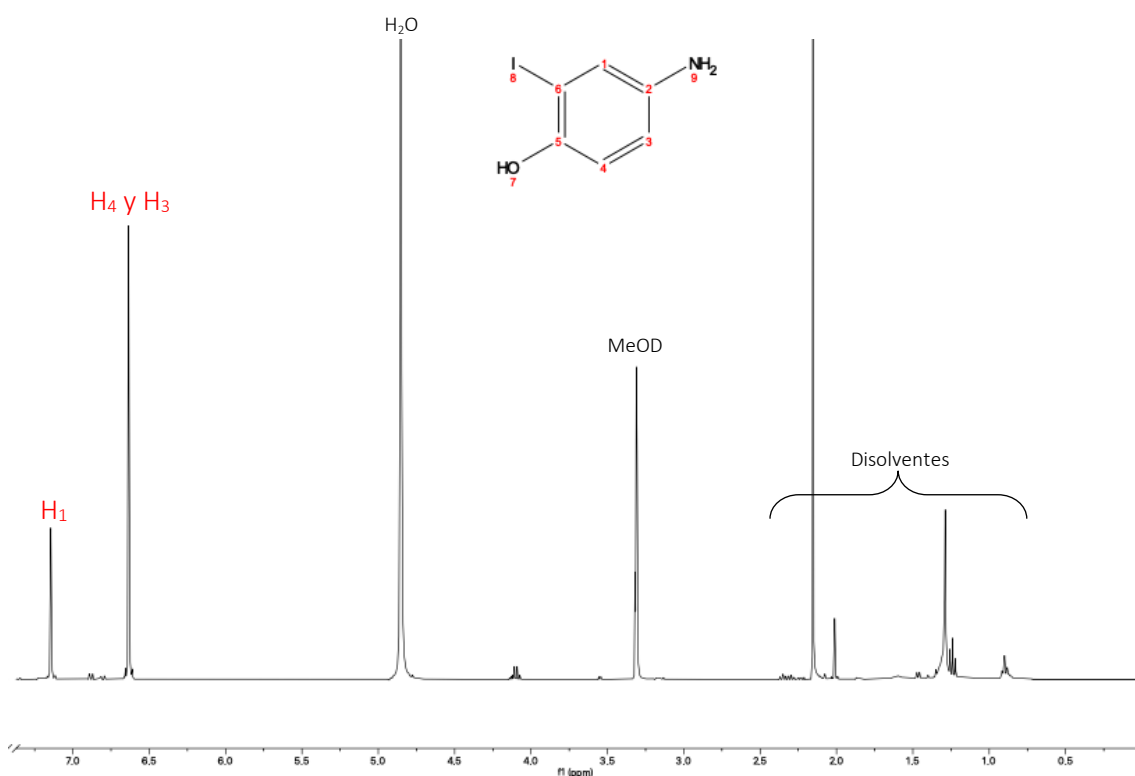


Figura 4.8. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN 4-amino-2-yodofenol junto con las asignaciones de las señales de los protones. Las asignaciones se basan en las predicciones del programa MestReNova.

## 5 CONCLUSIONES

A modo de conclusión, la síntesis de ambos metabolitos (3-nitro-acetaminofenol y 4-amino-2-yodofenol) fue exitosa.

En lo referente a la síntesis del metabolito 3-nitro-acetaminofenol, se pudo obtener este producto con un grado elevado de pureza. Sin embargo, el rendimiento de la reacción fue muy bajo (11,57%) y, además, se formó un metabolito secundario no deseado (3,5-dinitro-acetaminofenol). Por tanto, sería conveniente optimizar el proceso de reacción para obtener mayor cantidad de 3-nitro-acetaminofenol y disminuir al mínimo la formación de 3,5-dinitro-acetaminofenol.

En cuanto a la síntesis del 3-mercapturato-acetaminofenol, este no se pudo sintetizar, por falta de tiempo. A pesar de esto, sí que se pudieron obtener sus intermedios, el 2-yodo-4-nitrofenol y el 4-amino-2-yodofenol. Los rendimientos fueron considerablemente más elevados respecto al obtenido en la síntesis anterior (49,81% y 84,57 %, respectivamente). En futuros proyectos, sería interesante tratar de sintetizar el 3-mercapturato-acetaminofenol a partir del 4-amino-2-yodofenol, mediante la sustitución del yodo por un grupo tiol y la acetilación del grupo amino.



## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Paramo BJ, Gancedo SQ, Cuevas M, Camo IP, Martin JA, Cosmes EL. Paracetamol (acetaminophen) hypersensitivity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2000;85(6):508-11.
2. Jóźwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm*. 2014;71(1):11-23.
3. Athersuch TJ, Antoine DJ, Boobis AR, Coen M, Daly AK, Possamai L, et al. Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective. *Toxicology Research*. 2018;7(3):347-57.
4. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS drug reviews*. 2006;12(3-4):250-75.
5. Nowak J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in ophthalmology: pharmacological and clinical characteristics. *Mil Pharm Med*. 2012;5(4):33-50.
6. Castell JV. El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos 2006 [citado en noviembre, 2022]. Disponible en: [http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo\\_de\\_farmacos.pdf](http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf).
7. Fura A, Shu Y-Z, Zhu M, Hanson RL, Roongta V, Humphreys WG. Discovering Drugs through Biological Transformation: Role of Pharmacologically Active Metabolites in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47(18):4339-51.
8. Khojasteh SC, Wong H, Hop CECA. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide [recurso electrónico]*. 1ª ed. New York, NY: Springer New York; 2011.
9. Ionescu C, Caira MR. *Drug metabolism [recurso electrónico]: current concepts*. Dordrecht: Springer; 2005.
10. Obach RS, Isoherranen N. Chapter 10 - Pathways of drug metabolism. En: Huang S-M, Lertora JLL, Vicini P, Atkinson AJ, editors. *Atkinson's Principles of Clinical Pharmacology (4ª ed.)*. Boston: Academic Press; 2022. p. 151-68.
11. Coleman MD. How Oxidative Systems Metabolise Substrates. *Human Drug Metabolism*. 2020. p. 37-107.
12. Coleman MD. Conjugation and Transport Processes. *Human Drug Metabolism*. 2020. p. 263-329.
13. Coleman MD. Role of Metabolism in Drug Toxicity. *Human Drug Metabolism*. 2020. p. 447-530.
14. Forrest JAH, Clements JA, Prescott LF. Clinical Pharmacokinetics of Paracetamol. *Clinical Pharmacokinetics*. 1982;7(2):93-107.
15. Trettin A, Modun D, Madunic S, Vukovic J, Radman M, Batkai S, et al. LC-MS/MS and GC-MS/MS measurement of plasma and urine di-paracetamol and 3-nitro-paracetamol: Proof-of-concept studies on a novel human model of oxidative stress based on oral paracetamol administration. *Journal of Chromatography B*. 2014;959:71-81.

16. Fricke-Galindo I, Jung-Cook H, Llerena A, López-López M. Farmacogenética de reacciones adversas a fármacos antiepilépticos. *Neurología*. 2018;33(3):165-76.
17. Amo Marín G. Identificación de biomarcadores genéticos y funcionales de las reacciones de hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos: Vitamina D y receptor de alta afinidad de IgE.: Universidad de Extremadura; 2022.
18. Fernández Herrera J, Pedraz J. Síndrome de hipersensibilidad a fármacos. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*. 2007;8(2):55-67.
19. Duarte de Prato AA. Reacciones de Hipersensibilidad a los Antiinflamatorios no Esteroideos: Universidad de Murcia; 2010.
20. Calvo Campoverde K, Giner-Muñoz MT, Martínez Valdez L, Rojas Volquez M, Lozano Blasco J, Machinena A, et al. Reacciones de hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos y su tolerancia a fármacos alternativos. *Anales de Pediatría*. 2016;84(3):148-53.
21. Agúndez JAG, Gómez-Tabales J, Ruano F, García-Martin E. The potential role of pharmacogenomics and biotransformation in hypersensitivity reactions to paracetamol. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2018;18(4):302-9.
22. Rutkowski K, Nasser SM, Ewan PW. Paracetamol Hypersensitivity: Clinical Features, Mechanism and Role of Specific IgE. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012;159(1):60-4.
23. Thompson G, Bundell C, Lucas M. Paracetamol allergy in clinical practice. *Australian Journal for General Practitioners*. 2019;48(4):216-9.
24. Teng Q. Structural Biology [recurso electrónico] : Practical NMR Applications. 2ª ed. New York, NY: Springer US; 2013.
25. Castell JV. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear: Universitat de València.
26. Meurant G. High Resolution NMR [recurso electrónico]: Theory and Chemical Applications. 2ª ed. Saint Louis: Elsevier Science; 2013.
27. Human Metabolome DataBase (HMDB). Acetaminophen 2006 [actualizado el 09/11/2020; citado el 21/11/2022]. Disponible en: [https://hmdb.ca/spectra/nmr\\_one\\_d/1761](https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1761).
28. Polo Díez LM. Fundamentos de cromatografía. Madrid: Dextra Editorial; 2015.
29. Gismera García MJ, Quintana Mani MdC, Da Silva de Campos MdP. Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución. Madrid: Editorial Universidad Autónoma de Madrid; 2012.
30. Sherma J, Fried B. Handbook of thin-layer chromatography: CRC press; 2003.
31. Cheng S-C, Huang M-Z, Shiea J. Thin layer chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2700-11.
32. Meyers C, Meyers D. Thin-layer chromatography. *Current protocols in nucleic acid chemistry*. 2008;34(1):A. 3D. 1-A. 3D. 13.

33. Pássaro Carvalho CP, Rivera Narváez CM, Román Páez MA, Cardona Bermúdez LM, Muñoz Echeverri LM, Gómez DD, et al. Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. 2016.
34. Valcárcel Cases M, Gómez Hens A. Técnicas analíticas de separación. 1ª ed. Barcelona: Reverté; 1988.
35. Dechow FJ. Separation and purification techniques in biotechnology: Noyes Publications Park Ridge; 1989.
36. Mohammad AZ, Ezat G, Elaheh M, Arash GC. 1,3-Dihalo-5,5-dimethylhydantoin or citric acid/NaNO<sub>2</sub> as a heterogeneous system for the selective mononitration of phenols under mild conditions. Mendeleev Communications. 2006;16(1):41-2.
37. Vojtičková M, Dobiaš J, Hanquet G, Addová G, Cetin-Atalay R, Yildirim DC, et al. Ynamide Click chemistry in development of triazole VEGFR2 TK modulators. European Journal of Medicinal Chemistry. 2015;103:105-22.

## 7 ANEXO

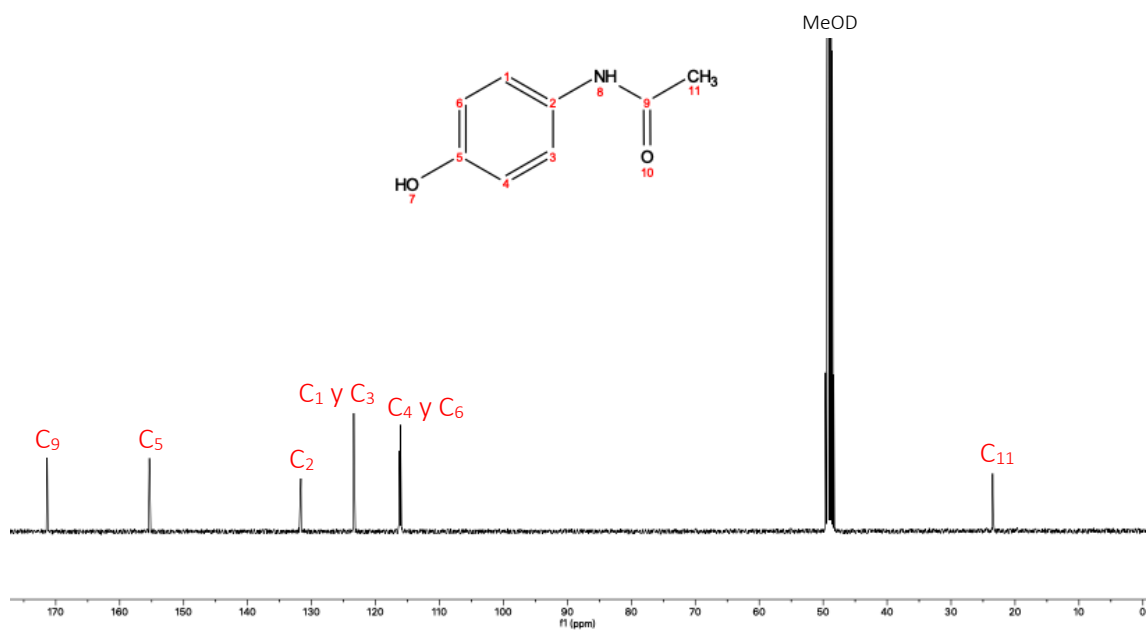
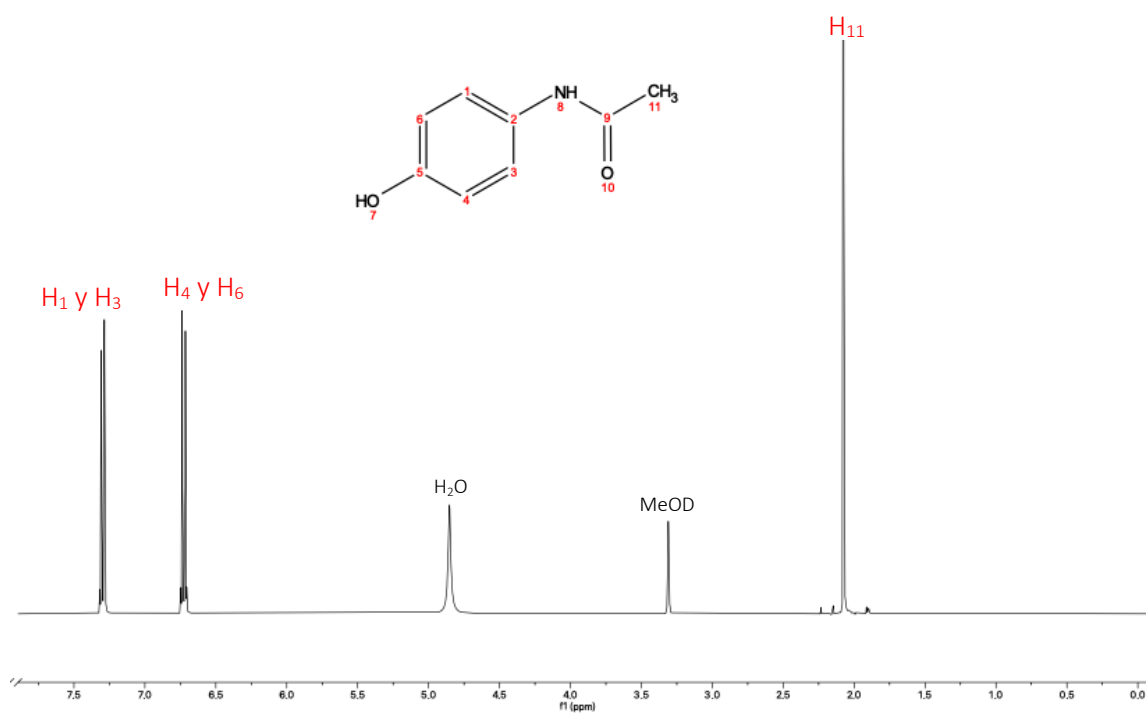


Figura 7.1. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN del paracetamol junto con las asignaciones de las señales. Arriba: <sup>1</sup>H-RMN [400 MHz, MeOD]  $\delta$  = 7,34 – 7,25 (m, 2H); 6,77 – 6,68 (m, 2H); 2,07 (s, 3H). Abajo: <sup>13</sup>C-RMN [101 MHz, MeOD]  $\delta$  = 171,34; 155,36; 131,67; 123,40; 123,32; 116,24; 116,18; 116,11; 23,55; 23,50; 23,45; 23,40.

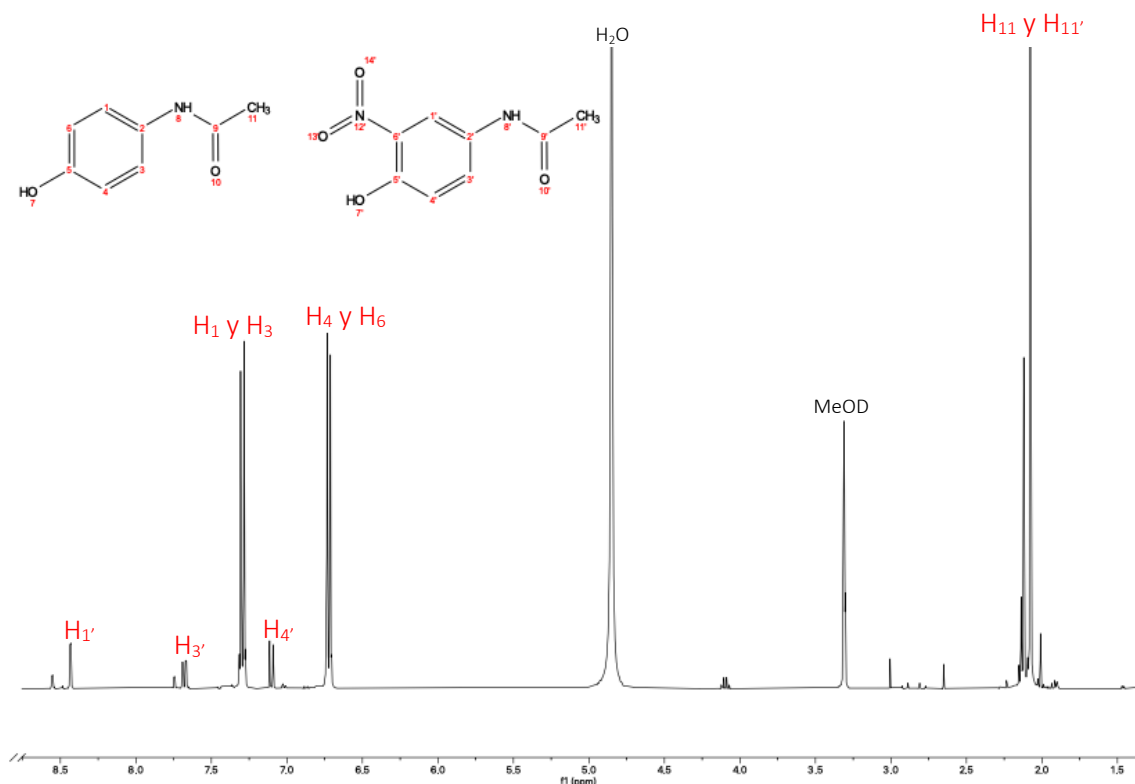


Figura 7.2. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción del 3-nitro-acetaminofenol junto con las asignaciones de las señales. Se observa la presencia de paracetamol (estructura izquierda) y 3-nitroacetaminofenol (figura derecha).  $^1\text{H}$ -RMN [400 MHz, MeOD]  $\delta$  = 8,43 (d,  $J$  = 2,6 Hz, 1H); 7,68 (dd,  $J$  = 9,0 y 2,7 Hz, 1H); 7,34 – 7,25 (m, 2H); 7,10 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 1H); 6,76 – 6,68 (m, 2H); 2,08 (s, 6H).

### Elemental Composition Report

Page 1

#### Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

817 formula(e) evaluated with 2 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

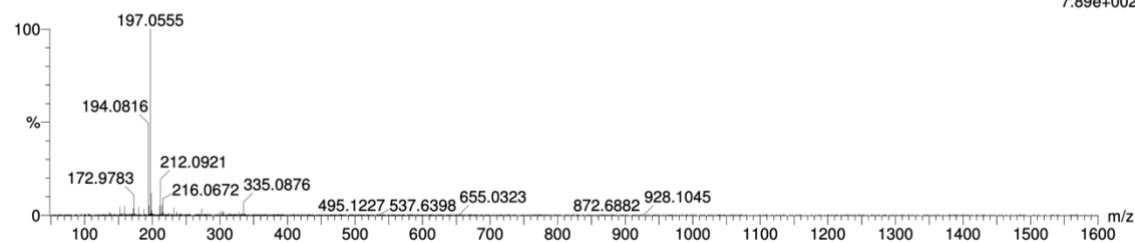
Elements Used:

C: 0-30 H: 0-40 N: 0-4 O: 0-10  $^{23}\text{Na}$ : 0-1 S: 0-2 K: 0-1 I: 0-1

ZORBAX

2R 518 (3.990) Cm (510:518-690:712)

1: TOF MS ES+  
7.89e+002



Minimum:

Maximum: 10.0 5.0 -1.5

Mass Calc. Mass mDa PPM DBE i-FIT i-FIT (Norm) Formula

197.0555 197.0556 -0.1 -0.5 -1.5 18.3 1.5 C6 H15 O3  $^{23}\text{Na}$  K

197.0562 -0.7 -3.6 5.5 17.1 0.3 C8 H9 N2 O4

Figura 7.3. Resultados del UPLC-MS/MS del 3-nitro-acetaminofenol. Enmarcado en rojo se encuentra el resultado correspondiente al metabolito. Este se encuentra a menos de 5 ppm (3,6 concretamente), por lo que su grado de pureza es suficientemente elevado.

## Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

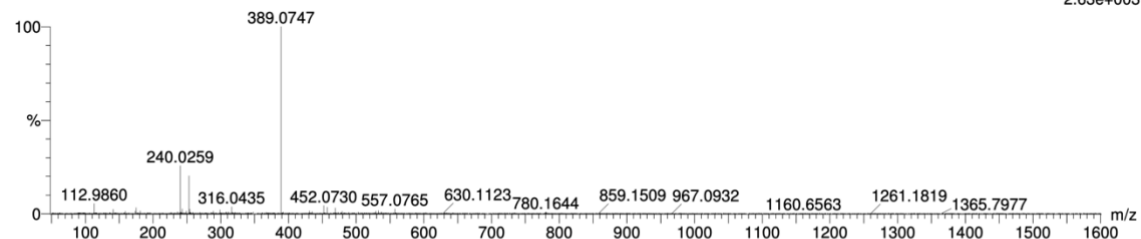
514 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-30 H: 0-7 N: 0-4 O: 0-10 <sup>23</sup>Na: 0-1 S: 0-2 K: 0-1 I: 0-1

ZORBAX

3NEG 627 (4.830) Cm (627:635-542:553)

1: TOF MS ES-  
2.63e+003

Minimum: -1.5  
Maximum: 10.0 5.0 100.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
240.0259	240.0257	0.2	0.8	7.5	48.6	0.0	C8 H6 N3 O6

Figura 7.4. Resultados del UPLC-MS/MS del 3,5-dinitro-acetaminofenol. Este se encuentra a menos de 5 ppm (0,8 concretamente), por lo que su grado de pureza es suficientemente elevado.

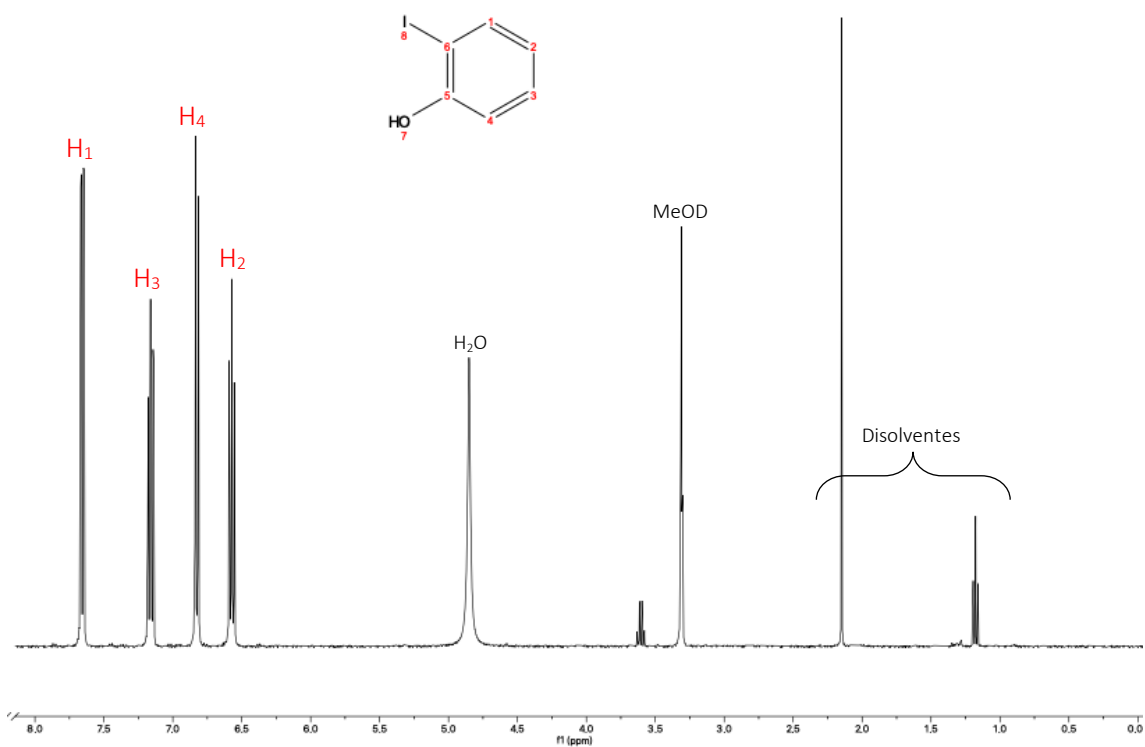


Figura 7.5. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del 2-yodofenol junto con las asignaciones de las señales. <sup>1</sup>H-RMN [400 MHz, MeOD] δ = 7,66 (dd, J = 7,9 y 1,6 Hz, 1H); 7,16 (ddd, J = 8,1, 7,3 y 1,6 Hz, 1H); 6,83 (dd, J = 8,1 y 1,4 Hz, 1H); 6,57 (ddd, J = 7,9, 7,3 y 1,5 Hz, 1H).

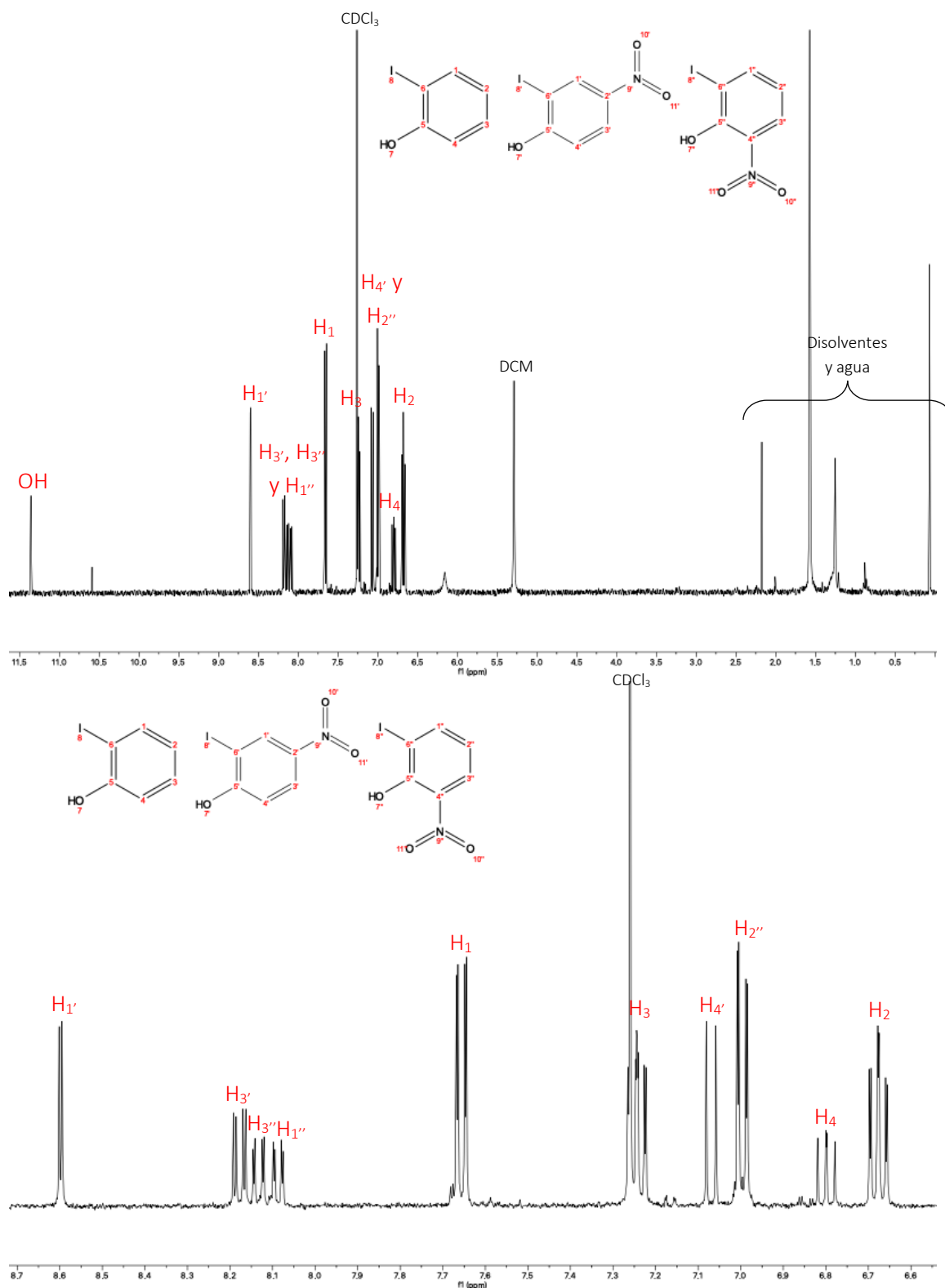


Figura 7.6. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  del crudo de reacción del 2-yodo-4-nitrofenol junto con las asignaciones de las señales. Se observa la presencia de 2-yodofenol (estructura izquierda), 2-yodo-4-nitrofenol (estructura centro) y 2-yodo-6-nitrofenol (estructura derecha). Arriba:  $^1\text{H-NMR}$  [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta = 11,36$  (s, 1H); 8,60 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1H); 8,18 (dd,  $J = 9,0$  y 2,6 Hz, 1H); 8,13 (dd,  $J = 8,5$  y 1,6 Hz, 1H); 8,09 (dd,  $J = 7,7$  y 1,6 Hz, 1H); 7,66 (dd,  $J = 8,0$  y 1,5 Hz, 3H); 7,30-7,22 (m, 6H); 7,07 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H); 7,00 (dd,  $J = 8,1$  y 1,5 Hz, 3H); 6,80 (dd,  $J = 8,5$  y 7,7 Hz, 1H); 6,68 (ddd,  $J = 8,0, 7,3$  y 1,5 Hz, 3H); 6,16 (s, 1H). Abajo: ampliación de la región 8,72 – 6,54 ppm.